

氏名	もりした かずしげ <b>森下 和茂</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第847号
学位授与の日付	平成29年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>The cell biological studies on roles of disease-related genes <i>Sponge</i>, <i>Zizimin</i> and <i>fat</i> during <i>Drosophila</i> development</b> (ショウジョウバエ発生過程における疾患関連遺伝子 <i>Sponge</i> , <i>Zizimin</i> 及び <i>fat</i> の細胞生物学的研究)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 宮田清司 教授 片岡孝夫

### 論文内容の要旨

疾患関連遺伝子として知られる *Sponge*、*Zizimin* と *fat* のショウジョウバエ発生過程における役割について論じている申請論文は、英文で記述されている。序論、第一章「ショウジョウバエ DOCK ファミリータンパク質 *Sponge* は air sac 原基の発生に必要である」、第二章「ショウジョウバエ DOCK ファミリータンパク質 *Zizimin* は蛹網膜の色素細胞分化に関与する」、第三章「ショウジョウバエ *fat* 遺伝子の神経特異的なノックダウンは寿命短縮、運動能力低下、運動神経末端シナプス長の短縮と軸索伸長不全を誘導する」から構成されている。

序論では本研究の背景と目的が述べられている。The dedicator of cytokinesis (DOCK)ファミリータンパク質は GDP/GTP 交換因子 (GEF) として知られ、低分子 G タンパク質を活性化することで、細胞内シグナル伝達経路に寄与している。哺乳類では DOCK1~DOCK11 まで 11 種類の DOCK ファミリータンパク質が同定されている。DOCK ファミリータンパク質は DOCK-A、B、C、D の 4 つのサブファミリーから構成されている。DOCK ファミリータンパク質は癌、アルツハイマー病、免疫不全症候群など様々なヒトの疾患に関与していることが紹介されている。*Sponge* は DOCK-B に、*Zizimin* は DOCK-D サブファミリーに属している。これまで DOCK ファミリータンパク質は GEF としての生化学的研究が中心であり、個体の発生過程での役割については、まだあまり明らかにされていない。一方、ヒト *FAT* ファミリー遺伝子の一つである *FAT4* 遺伝子は、Van Maldergem 症候群や Hennekam リンパ管拡張症リンパ浮腫症候群の責任遺伝子である。ショウジョウバエ *fat* 遺伝子はヒト *FAT4* 遺伝子のホモログである。これまで *fat* 遺伝子は上皮細胞の細胞接着や細胞極性の決定に関する機能が研究されてきたが、その神経系での役割については明らかにされていなかった。これらの学術的背景のもとに、申請者がショウジョウバエの発生におけるこれら三つの遺伝子の生物学的役割に着目して研究を開始したことが述べられている。

第一章では、*Sponge* の air sac 原基 (ASP) 発生における役割について述べられている。air sac は成虫胸部筋肉に酸素を供給する気管の一種である。抗 *Sponge* 抗体を用いて翅原基の免疫染色

を行ったところ、ASP 細胞の細胞質及び細胞膜で *Sponge* の強い発現が見られた。そこで気管特異的に *Sponge* 遺伝子をノックダウンすると、アポトーシスの誘導を伴う ASP 形態異常を引き起こした。ASP の形態形成に ERK シグナル経路が関与していることが知られているため、ERK シグナル経路の構成タンパク質である D-raf を過剰発現させると、*Sponge* ノックダウンにより誘導された ASP の縮小及び気管細胞死が抑制された。さらに抗リン酸化 ERK 抗体で免疫染色を行ったところ、*Sponge* 遺伝子をノックダウンした細胞で ERK シグナル経路の活性低下が確認された。以上の結果から、*Sponge* は ERK シグナル経路を活性化し、ASP の形態形成及び気管細胞の生存に寄与していると結論している。

第二章で申請者は、複眼原基特異的に *Zizimin* 遺伝子をノックダウンすると個眼の融合と感覚毛及び色素の消失を伴う成虫複眼形態異常が誘導されることを述べている。抗 *Zizimin* 抗体を用いて蛹網膜の免疫染色を行ったところ、主に二次及び三次色素細胞で *Zizimin* の局在が確認された。また、蛹網膜で *Zizimin* 遺伝子をノックダウンするとこれらの色素細胞様細胞の形態異常が誘導された。EGFR シグナル経路の下流ターゲットである *Delta* 遺伝子は色素細胞の分化に関与していることが知られている。*Delta* 遺伝子機能喪失型変異により、*Zizimin* 遺伝子ノックダウンによって誘導された複眼及び色素細胞の形態異常が抑圧された。また抗 D1 抗体で免疫染色を行ったところ、*Zizimin* をノックダウンすると *Delta* タンパク質の発現量が増大し、ERK シグナル経路が活性化されることを明らかにしている。以上の結果から、申請者は、*Zizimin* は二次及び三次色素細胞において、EGFR シグナル経路を介して *Delta* の発現を負に制御していると結論している。

第三章では、神経特異的に *fat* 遺伝子をノックダウンすると、成虫の生存期間の短縮と運動機能の低下が誘導されたことが示されている。さらに 3 齢幼虫の光受容細胞軸索の標的化の異常が誘導され、*fat* 遺伝子が軸索伸長にも関与していることを示している。このように *fat* 遺伝子の神経系での役割について明らかにしている。

## 論文審査の結果の要旨

DOCK ファミリータンパク質は GDP/GTP 交換因子として知られ、低分子 G タンパク質を活性化することで、細胞内シグナル伝達経路に寄与している。DOCK ファミリータンパク質は DOCK-A、B、C、D の 4 つのサブファミリーから構成されており、癌、アルツハイマー病、免疫不全症候群など様々なヒトの疾患に関与している。これまで DOCK ファミリータンパク質については生化学的研究が中心であり、個体の発生過程での役割については、ほとんど明らかにされていなかった。一方、ヒト *FAT* ファミリー遺伝子の一つである *FAT4* 遺伝子は、Van Maldergem 症候群や Hennekam リンパ管拡張症リンパ浮腫症候群の責任遺伝子である。ショウジョウバエ *fat* 遺伝子はヒト *FAT4* 遺伝子のホモログであり、これまでは上皮細胞の細胞接着や細胞極性の決定に関する機能が研究されてきたが、その神経系での役割については明らかにされていなかった。これらの学術的背景のもとに、申請者はショウジョウバエの発生におけるこれら三つの遺伝子の生物学的役割に着目して研究を開始した。ショウジョウバエの DOCK-B に属する *Sponge* は、成虫胸部筋肉に酸素を供給する気管の一種である air sac の原基(ASP)で強く発現していることを見出した。気管特異的に *Sponge* 遺伝子をノックダウンすると、アポトーシスの誘導を伴う ASP 形

態異常を引き起こした。遺伝学的手法と細胞生物学的手法を組み合わせ、Sponge が ERK シグナル経路を活性化し、ASP の形態形成及び気管細胞の生存に寄与していることを明らかにした。次に申請者は、DOCK-D に属する Zizimin が、蛹網膜の二次及び三次色素細胞で強く発現していることを見出した。複眼原基特異的に Zizimin 遺伝子をノックダウンすると個眼の融合と感覚毛及び色素の消失を伴う成虫複眼形態異常が誘導されることを見出した。遺伝学的手法と細胞生物学的手法を組み合わせ、Zizimin が二次及び三次色素細胞において、EGFR シグナル経路を介して Delta の発現を負に制御していることを明らかにした。これらの研究は、GDP/GTP 交換因子としての生化学的な研究が中心であった DOCK ファミリータンパク質の生物個体での機能を明らかにしたものであり、学術的に高く評価できる。また申請者は、神経特異的に fat 遺伝子をノックダウンすると、成虫の寿命短縮と運動機能低下が誘導されたことも示している。さらに 3 齢幼虫の光受容細胞軸索標的化の異常も観察し、fat 遺伝子が神経軸索伸長にも関与していることを示した。この研究は、上皮細胞の細胞接着や細胞極性の決定に関して長年研究されてきた fat 遺伝子の神経系での役割について初めて明らかにしたものであり、学術的意義が大きい。またこれらの研究はヒト疾患研究へのショウジョウバエモデルの有用性を示したものであるとして社会的な意義も大きい。

これらの研究は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みの下記の論文 2 編を基礎としている。

- 1) Kazushige Morishita, Dang Ngoc Anh Suong, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi. The *Drosophila* DOCK family protein Sponge is required for development of the air sac primordium. *Experimental Cell Research* 354 (2017)85-102
- 2) Aya Nakamura, Ryo Tanaka, Kazushige Morishita, Hideki Yoshida, Yujiro Higuchi, Hiroshi Takashima and Masamitsu Yamaguchi. Neuron-specific knockdown of the *Drosophila fat* induces reduction of life span, deficient locomotive ability, shortening of motoneuron terminal branches and defects in axonal targeting. *Genes to Cells* 22 (7), 662-669, doi: 10.1111/gtc.12500. 2017 May 9., 2017.

また参考論文として査読制度のある下記の国際科学雑誌 3 編に掲載されている。

- 3) Fumito Ozasa\*, Kazushige Morishita\*, Dang Ngoc Anh Suong, Seiji Miyata, Hideki Yoshida and Masamitsu Yamaguchi. *Drosophila* DOCK family protein Zizimin involves in pigment cell differentiation in pupal retinae. *Cell Structure and Function* DOI: <http://doi.org/10.1247/csf.17014>, 2017 \*equal contribution
- 4) Kazushige Morishita, Fumito Ozasa, Koichi Eguchi, Yasuhide Yoshioka, Hideki Yoshida, Hiroshi Hiai, and Masamitsu Yamaguchi. *Drosophila* DOCK Family Protein Sponge Regulates the JNK Pathway during Thorax Development. *Cell Structure and Function* 39 (2014) 113–124
- 5) Koichi Eguchi, Yasuhide Yoshioka, Hideki Yoshida, Kazushige Morishita, Seiji Miyata, Hiroshi Hiai, Masamitsu Yamaguchi. The *Drosophila* DOCK family protein sponge is involved in differentiation of R7 photoreceptor cells. *Experimental Cell Research* 319 (2013) 2179-2195