

氏名	たなかりょう 田中 領
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第910号
学位授与の日付	平成31年3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	Biological analyses of transcriptional regulators in <i>Drosophila</i> (キイロショウジョウバエにおける転写制御因子の生物学的解析)
審査委員	(主査)准教授 吉田英樹 教授 高野敏行 教授 宮田清司

### 論文内容の要旨

生物にとって、遺伝子の発現制御は発生、組織の恒常性、行動の基盤となる、なくてはならない機構である。本申請論文では、この遺伝子の発現制御に関わる因子の異常が、発生及び行動に与える影響、及びその分子メカニズムを明らかにするために、ショウジョウバエを用いて行った研究について英文で記述されている。本申請論文は、序論、第二章「ショウジョウバエの発生における *Smallish* の機能解析」、第三章「*G9a* はキイロショウジョウバエの飢餓誘発行動の重要な制御因子である」から構成されている。

序論では、本研究の背景が述べられている。遺伝子発現の重要なステップである転写は、転写因子が遺伝子の制御領域に結合することで誘導されるが、この転写因子の制御が、組織や発生時期における遺伝子発現に非常に重要となる。転写因子の制御機構の一つに、核膜内膜タンパク質である *Emerin* による転写誘導因子であり細胞接着因子としても機能する *LMO7* の制御を挙げている。*LMO7* は線虫からヒトまで保存されており、ショウジョウバエでは *smash* と呼ばれている。*smash* は、胚から成虫まで、あらゆる組織で発現しているが、先行研究では初期胚における細胞接着因子としての機能しか報告がなく、他の組織での *smash* の機能解析はなされていない。転写が起こるためには、ヒストンに巻かれた DNA をほどこく必要があるが、このステップをクロマチンのリモデリングと言う。このリモデリングは、ヒストンのメチル化やアセチル化等の修飾により制御されている。このヒストンのメチル化を行う酵素として *G9a* が知られている。*G9a* の生化学的な機能は詳細に解析されていたが、ノックアウトマウスが胚生致死となるために、生体内におけるその役割については不明であった。*G9a* のショウジョウバエホモログは、*dG9a* として同定され、*G9a* と同様にヒストンをメチル化することが明らかになっていた。一方で、*dG9a* の欠失突然変異体は、生存可能で形態的な異常は見られなかったが、飢餓条件下において、オートファジーの低下が報告されていた。

第二章では、哺乳動物において個体発生、細胞骨格の制御、腫瘍形成に関与する *LMO7* のショウジョウバエホモログ *smash* の生体内における機能について述べられている。複眼成虫原基特異的に *smash* をノックダウンすると、複眼を構成する個眼の配列や形状が乱れるラフアイ表現型が

観察された。データベースの情報より、*smash* 遺伝子は 10 種の転写バリエーションを有する可能性が考えられたため、複眼成虫原基において発現している転写産物を 6 種に特定し、更にこの 6 種のうち発現低下によりラフアイ表現型を示す転写産物を 2 種に絞り込んだ。また、Smash タンパク質を特異的に認識する抗体を作製し、複眼成虫原基において Smash タンパク質は核内に局在することを明らかにした。*smash* のホモログである *LMO7* は、核内で転写誘導機能を有するため、Smash も *LMO7* 同様の転写誘導活性を有することが予想された。実際、*smash* のノックダウンにより *LMO7* の標的遺伝子のショウジョウバエホモログである *ote* や *bocks* の発現が低下した。更に、*smash* のノックダウンにより誘導されるラフアイ表現型には、異所的な細胞死の誘導とこの細胞減少を一部補うための異所的な細胞増殖を伴うことを明らかにしたが、*ote* や *bocks* のノックダウンによっても、同様の異所的な細胞死が誘導されることから、機能的にも *LMO7* の役割が Smash に保存されていることが示唆された。

第三章では、クロマチンのリモデリングに関わるマウス *G9a* のキロショウジョウバエホモログである *dG9a* の飢餓条件下での役割について述べられている。*dG9a* 欠失突然変異体を飢餓条件下で 12 時間飼育した際に発現量が変化する遺伝子を調べたところ、複数種の匂い物質結合タンパク質や味覚受容体の発現量が増加することが明らかとなった。その内の一つは、ショ糖のセンサーとして働くことが知られており、*dG9a* 欠失突然変異体は、飢餓条件下において、このショ糖センサーの発現増加と一致するようにショ糖に対して敏感になることが明らかとなった。ショウジョウバエは、飢餓時、エサに対して敏感になり探索行動が活発になることが知られている。そこで、*dG9a* 欠失突然変異体での活動量を調べたところ、野生型に比べ優位に増加していることが明らかとなった。野生型でも、飢餓時に活動量がしだいに増加するが、エネルギー消費を抑えるために、インスリン様ペプチドにより活動を抑える仕組みも併せ持つことが知られている。*dG9a* 欠失突然変異体では同ペプチドの発現量が低下しており、このことが異常な活動量の増加につながっているのかもしれない。*dG9a* はヒストンのメチル化を介しクロマチンの構造を変化させ、遺伝子発現を調節することが知られているため、他の因子と協調して飢餓時の行動を制御している可能性を示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子の正確な発現制御は、正常な発生や行動に密接に関係している。申請者は、転写制御及び細胞接着で重要な働きをする哺乳動物 *LMO7* のショウジョウバエホモログである *smash* の生体内での働き、及びクロマチンのリモデリングの中心的な役割を担う *G9a* のショウジョウバエホモログ *dG9a* のストレス応答における新しい知見を報告している。

*smash* の生体内での機能を明らかにするために、ショウジョウバエを用い発生時期・組織特異的に *smash* をノックダウンし、成虫形態への影響を調べた。その結果、複眼成虫原基でノックダウンされたときに、複眼の形態形成異常を示すことが見出されたが、データベースにある情報から、*smash* は一つの遺伝子より 10 種の転写産物を産出し、最終的に 8 種のタンパク質を作り出す可能性が示されていた。そこで、まず複眼成虫原基において、*smash* のどの転写産物が発現しているか、またノックダウンによる複眼の形態形成異常は、どの転写産物の減少によるものかについて詳細に検討した。転写産物の検出には、逆転写 PCR、リアルタイム PCR を用い、タンパ

ク質の検出には、申請者が作製した特異的抗体を用い、ウェスタンブロット法や免疫染色法により解析した結果、1種の転写産物へ絞り込むことに成功した。また免疫染色の結果、複眼成虫原基において **Smash** タンパク質は核内に局在することが明らかとなり、これまでに初期胚で報告のあった細胞接着における機能ではなく、転写調節での働きを指摘し、その後の解析を進めている。その結果、直接か間接かは不明ではあるが、哺乳動物 **LMO7** が転写調節する遺伝子のショウジョウバエホモログの転写を制御しており、その制御に異常が生じると、アポトーシスが誘導され細胞数が減少すること、その細胞数の減少を一部補うために起きた異所的な細胞増殖を伴う仕組みで複眼の形態異常が起こることを明らかにしている。

また、ショウジョウバエホモログ **dG9a** の欠失突然変異体は、発生は正常であるが飢餓ストレス条件下においてオートファジーが減少することが、報告されていた。飢餓ストレスを受けた野生型ショウジョウバエは、餌への感受性を高めると同時に探索行動を活発化させる。しかしそれと同時に、体力の消耗を避けるために、過剰な活動を抑えることも知られていた。申請者は、飢餓ストレス時のショウジョウバエの行動と **dG9a** に注目し、**dG9a** 欠失突然変異体を用いて詳細な解析を行った。その結果、**dG9a** 欠失突然変異体では、ショ糖の感受性に関わる受容体の発現が増加し、ショ糖への感受性が異常に亢進すること、また、活動を抑制的に制御するインスリン様ペプチドの量が減少し、活動が異常に活発になり飢餓への耐性が低下することが明らかとなった。

本論文では、転写制御に関わる分子の異常が、発生、行動といった高次の現象に与える影響を明らかにした点において、学術的に大きな意義を持つ。また、生存に必須でない分子でも特殊な環境下で重要な機能を発揮する可能性を示した点でも、非常に重要な報告となる。例えば、がんは、低酸素や栄養飢餓状態へ適応しており、この適応の分子メカニズムを解明する上でも、本論文が大きな意義を持つ可能性が考えられる。

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) Kouhei Shimaji, Ryo Tanaka, Toru Maeda, Mamiko Ozaki, Hideki Yoshida, Yasuyuki Ohkawa, Tetsuya Sato, Mikita Suyama and Masamitsu Yamaguchi, Histone methyltransferase G9a is a key regulator of the starvation-induced behaviors in *Drosophila melanogaster*. SCIENTIFIC REPORTS 7:14763, DOI: 10.1038/s41598-017-15344-2, 2017
- 2) Ryo Tanaka, Seiji Miyata, Masamitsu Yamaguchi and Hideki Yoshida, Role of the *smallish* gene during *Drosophila* eye development. Gene 684 (2019) 10-19  
また参考論文として、査読制度のある下記の国際雑誌6編にも掲載されている。
- 3) Aya Nakamura, Ryo Tanaka, Kazushige Morishita, Hideki Yoshida, Yujiro Higuchi, Hiroshi Takashima and Masamitsu Yamaguchi (2017) 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.
- 4) Phan Nguyen Thuy An, Kouhei Shimaji, Ryo Tanaka, Hideki Yoshida, Hiroshi Kimura, Eiichiro Fukusaki and Masamitsu Yamaguchi, Epigenetic regulation of starvation-induced autophagy in *Drosophila* by histone methyltransferase G9a. SCIENTIFIC REPORTS 7(1) 7343. doi: 10.1038/s41598-017-07566-1, 2017

- 5) Ibuki Ueoka, Hitoshi Kawashima, Atsushi Konishi, Mikio Aoki, Ryo Tanaka, Hideki Yoshida, Toru Maeda, Mamiko Ozaki and Masamitsu Yamaguchi (2017) Novel *Drosophila* model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A. *Experimental Neurology* 300, 51-59. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.10.027.
- 6) Tomoki Hirashima, Ryo Tanaka, Masamitsu Yamaguchi and Hideki Yoshida, The ABD on the nascent polypeptide and PH domain are required for the precise Anillin localization in *Drosophila* syncytial blastoderm. *SCIENTIFIC REPORTS* 8(1) 12910. doi: 10.1038/s41598-018-31106-0, 2018
- 7) Yuuka Muraoka, Aya Nakamura, Ryo Tanaka, Kojiro Suda, Yumiko Azuma, Yukie Kushimura, Luca Lo Piccolo, Hideki Yoshida, Ikuko Mizuta, Takahiko Tokuda, Toshiki Mizuno, Masanori Nakagawa and Masamitsu Yamaguchi (2018) Genetic screening of the genes interacting with *Drosophila FIG4* identified a novel link between CMT-causing gene and long noncoding RNAs. *Experimental Neurology* 310, 1-13. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.08.009.
- 8) Keiko Tsuji Wakisaka, Ryo Tanaka, Tomoki Hirashima, Yuuka Muraoka, Yumiko Azuma, Hideki Yoshida, Takahiko Tokuda, Satoshi Asada, Kojiro Suda, Kenji Ichyanagi, Seiko Ohno, Masanobu Itoh and Masamitsu Yamaguchi (2018) Novel roles of *Drosophila* FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders. *Brain Research* S0006-8993 (18) 30646-2. doi: 10.1016/j.brainres.2018.12.028.