

氏名	ちゃん どうい びん TRAN DUY BINH
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第933号
学位授与の日付	令和元年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 物質・材料化学専攻
学位論文題目	Function of lipid storage droplet-1 and 2 genes in development of <i>Drosophila melanogaster</i> (ショウジョウバエ lipid storage droplet-1 および 2 遺伝子の発生過程における機能)
審査委員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 小堀哲生 教授 山口政光

## 論文内容の要旨

脂質は生体エネルギー源としてだけでなく、細胞内シグナル、細胞膜構成、代謝調節など多様な機能を持つ。全身の細胞に存在する脂肪滴はリン脂質でできた一重膜によって囲まれた細胞内小器官であり、貯蔵脂質トリアシルグリセロールを蓄えている。脂肪滴膜には脂質分解酵素や調節タンパク質など複数のタンパク質が存在する。栄養欠乏状態では、脂肪滴内のトリアシルグリセロールは脂質分解酵素によって加水分解されて遊離脂肪酸となり、脂肪酸がさらに酸化されることによってエネルギーが供給される。ヒトのペリリピン1およびペリリピン2は脂肪滴膜の脂質分解酵素の活性を調節することによって、栄養状態に依存した脂質代謝の制御を担っている。脂肪滴タンパク質は肥満、糖尿病、先天性魚鱗癬などの疾病と関連していることが明らかになっているが、脂質代謝以外の多様な生命現象における機能の全容は明らかとなっていない。

ショウジョウバエはヒトのモデル生物としての有用性が明らかにされている。ショウジョウバエにおいて、ヒトペリリピン1のホモログはLipid storage droplet-1 (LSD1)であり、ヒトペリリピン2に相当する機能を担うのがLipid storage droplet-2 (LSD2)である。本申請論文は、脂質代謝の制御を担う脂肪滴膜タンパク質LSD1およびLSD2に着目し、発生過程におけるこれらの因子の機能を解析することによって、脂質代謝と発生過程の関係を明らかにすることを目的としている。本申請論文は「序論」、第1章「ショウジョウバエにおけるLSD1の機能喪失はJNKシグナル経路を介した中胸背板の形成異常およびアポトーシスを誘導する」、第2章「LSD2の機能喪失はショウジョウバエの翅においてdFoxOを介した細胞死を誘導する」、および「結論」から構成されている。

「序論」では本研究の背景と目的を述べている。背景では、貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールの代謝機構および脂肪滴タンパク質について述べるとともに、本論文の研究対象であるLSD1およびLSD2の機能について概説している。また、ショウジョウバエの脂質代謝と発生の関係についてのこれまでの研究について述べ、さらに本論文で用いた特定遺伝子の組織特異的ノックダウン法であるGAL4/UASシステムについて説明した。次に、「発生過程におけるLSD1およびLSD2の機能を解析することによって、脂質代謝と発生過程の関係を解明する」という本研

究の目的を述べている。

第1章「ショウジョウバエにおけるLSD1の機能喪失はJNKシグナル経路を介した中胸背板の形成異常およびアポトーシスを誘導する」では、GAL4/UASシステムによって*Lsd1*を中胸背板特異的にノックダウンした結果、中胸背板に割れ目ができる異常な表現型を呈することを見出した。これは、LSD1が中胸背板の形成に関与していることを示唆している。さらに、ショウジョウバエのJNKホモログである*bsk*を過剰発現した*Lsd1*ノックダウン系統を樹立し、*Lsd1*ノックダウンによる異常な中胸背板形成が有意に回復することを明らかにした。さらに、リン酸化JNK抗体を用いた免疫染色、LacZエンハンサートラップ系統による*puc*の発現量解析等によって、コントロールと比較して*Lsd1*ノックダウン系統でJNKシグナル経路が抑制されていることを示した。カスパーゼ3抗体を用いた組織免疫染色によってアポトーシスが亢進していることを見出すとともに、*Lsd1*をノックダウンかつアポトーシスインヒビターDIAP1を発現するショウジョウバエ系統を樹立し、*Lsd1*ノックダウンによる表現型が回復することを明らかにした。これは、中胸背板基特異的*Lsd1*ノックダウン系統ではアポトーシスの亢進によって割れ目のある中胸背板が形成されることを示している。一方、翅原基における*Lsd1*ノックダウンによって翅の形態異常も起こるが、中胸背板形成の場合とは異なり、JNKシグナル経路は関係しないことも明らかにした。以上の結果より、*Lsd1*はJNKシグナルと遺伝学的に相互作用しており、JNKシグナルを正に制御することによって、発生過程における正常な中胸背板形成に関与していることを示した。

第2章「LSD2の機能喪失はショウジョウバエの翅においてdFoxOを介した細胞死を誘導する」においては、*Lsd2*を各組織特異的にノックダウンした結果、翅原基特異的ノックダウンによって翅が湾曲することを見出した。アクリジン染色、抗カスパーゼ抗体を用いた免疫染色、アポトーシスインヒビター発現系統との交配実験によって、翅原基特異的*Lsd2*ノックダウン系統においてアポトーシスが亢進していることを明らかにした。しかし、活性酸素種の産生増加は認められなかった。*Lsd2*ノックダウンによるアポトーシスの亢進機構を明らかにするため、ショウジョウバエ Forkhead box O (dFoxO)に着目した。dFoxOは、飢餓ストレス応答性の転写因子であるが、細胞が強いストレスにさらされた場合に細胞死誘導因子の発現制御にも関与することが知られている。これらの知見に基づいて、*Lsd2*ノックダウン系統においてdFoxOの機能を喪失させると、翅のカーブ表現型が回復した。さらに、dFoxOの転写標的遺伝子であるアポトーシス活性化因子*reaper(rpr)*の発現が亢進していることなどを見出した。以上の結果より、翅原基特異的*Lsd2*ノックダウンはdFoxOを介した細胞死を誘導し、その結果、湾曲した翅が形成されることが示された。すなわち、*Lsd2*はdFoxOと遺伝学的に相互作用しており、dFoxOを介した細胞死を抑制することによって正常な翅の形成に関与していることを明らかとした。

「結論」の章では、第1章、第2章の総括を述べている。

## 論文審査の結果の要旨

脂質は生体エネルギー源としてだけでなく、細胞内シグナル因子、細胞膜成分などとしての機能も持つ。全身の細胞に存在する脂肪滴は貯蔵脂質トリアシルグリセロールを蓄える細胞内小器官であり、脂肪滴を囲む一重膜上に脂質分解酵素やその調節因子など複数のタンパク質が存在し

ている。これらの脂肪滴タンパク質は、栄養状態に応じて制御された脂肪滴内の脂質分解を担っている。ヒト脂肪滴タンパク質は種々の疾患と関連していることが明らかにされているが、脂肪滴の生理機能には未解明な部分が多い。

本申請論文は、ヒトのモデル生物として有用なショウジョウバエを用いて、発生過程における脂質代謝の役割を解明することを目的として行われた研究成果をまとめている。申請者は、脂肪滴タンパク質であるヒトペリリピン1のショウジョウバエホモログ Lipid storage droplet-1 (LSD1)、ヒトペリリピン2に相当する機能を担う Lipid storage droplet-2 (LSD2)に着目し、それぞれの発生過程における機能について解析した。

LSD1に関する研究では、中胸背板特異的に *Lsd1* をノックダウンしたショウジョウバエは、割れ目のある異常な形態の中胸背板を形成することを見出した。さらに、異常な表現型の原因として、*Lsd1* のノックダウンによって JNK (c-Jun N-terminal kinase) シグナル経路が抑制され、その結果アポトーシスが亢進することを明らかにした。本研究成果は、遺伝学的相互作用の観点から、LSD1 が JNK シグナルを正に制御し、中胸背板の正常な形成に関与していることを示したものである。

LSD2に関する研究において、*Lsd2* を翅原基でノックダウンすると翅がカールすることを見出した。組織免疫学的解析等により、異常な翅形成の原因はアポトーシスの亢進である可能性を示した。翅原基特異的 *Lsd2* ノックダウン系統において活性酸素種の産生量は増加していなかったことから、申請者はアポトーシス亢進に関わる因子として転写因子 dFoxOに着目した。*Lsd2* ノックダウン系統において dFoxO の機能を欠失させると表現型が回復すること、dFoxO の標的遺伝子であるアポトーシス活性化因子の発現が亢進することを明らかにした。これによって、*Lsd2* が dFoxO を介した細胞死を抑制することによって正常な翅の形成に関与していることを明らかにした。

以上の研究成果は、脂肪滴タンパク質 LSD1 および LSD2 が発生過程に必須であることを遺伝学的に証明したものであり、独創的かつ学術的意義が非常に高いものである。

本論文の内容は、査読制のある国際科学雑誌にすでに発表済みの下記の2編の論文を基礎としている。なお、いずれも申請者が筆頭著者である。

1. Binh TD, Pham TLA, Men TT and Kamei K. Dysfunction of LSD-1 induces JNK signaling pathway-dependent abnormal development of thorax and apoptosis cell death in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2019) Vol. 516, pp. 451-456. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.075.
2. Binh TD, Pham TLA, Men TT, Dang TTP and Kamei K. LSD-2 dysfunction induces dFoxO-dependent cell death in the wing of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2019) Vol. 509, pp. 491-497. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.132.