

氏名	橋本麗奈 はしもと れいな
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第447号
学位授与の日付	平成19年3月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	Cell biological and genetical studies on β -Sarcoglycan in <i>Drosophila</i> (ショウジョウバエ β -サルコグリカンの細胞生物学的・遺伝学的研究) (主査)
審査委員	教授 山口政光 教授 遠藤泰久 教授 森 肇 助教授 伊藤雅信

論文内容の要旨

申請論文は、「序論」、第1章「ショウジョウバエ β -サルコグリカンの様々な組織での発現パターンと細胞内局在」、第2章「ショウジョウバエにおける β -サルコグリカンと Egfr シグナル伝達経路の遺伝学的なリンク」と「展望」から構成されている。

「序論」では、本論文の背景と目的が述べられている。サルコグリカン複合体はジストロフィン糖タンパク質複合体 (DGC ; Dystrophin Glycoprotein Complex) を形成する因子の一つで、主な機能としては DGC 自身の細胞膜上への局在の安定化に寄与すると言われている。哺乳類においては、これまでに、 α -、 β -、 γ -、 δ -、 ε -、 ζ -サルコグリカンの六種類が同定されており、これらがヘテロ四量体を形成して機能している。また、 α -、 β -、 γ -、 δ -のいずれの遺伝子に変異が生じても、肢帶型筋ジストロフィー (それぞれ、type2D, 2E, 2C, 2F) を発症することが明らかとなっている。しかしながら、その詳細な発症メカニズムや生理的条件下でのサルコグリカンの機能については未解明な部分が多く、根本的な治療法も確立されていない。

これまで、サルコグリカンに関する研究は主に筋ジストロフィーとの関わりを背景に進められてきたが、近年、サルコグリカンが筋組織以外でも発現し、機能していることが明らかとなってきた。しかしながら、これら非筋組織でのサルコグリカンの基本的な機能については良くわかつていなかった。本論文では、これらの問題点に検討を加え、ショウジョウバエにおける β -サルコグリカンの新しい機能についてのモデルを提唱している。第1章と第2章の要旨を以下に示す。

第1章では、免疫組織化学的手法を用いて、ショウジョウバエ β -サルコグリカン ($dScg\ \beta$; *Drosophila* β -Sarcoglycan) の様々な組織における発現、および、細胞内局在について検討した。その結果、筋組織をはじめとして胚上皮細胞、複眼原基、翅原基、肢原基、唾腺にも発現していることが認められた。また、胚、複眼原基、唾腺における細胞内局在の検討により、DNA複製期では $dScg\ \beta$ が細胞膜のみならず、細胞質内にも局在することを示した。さらに、 $dScg\ \beta$ は細胞分裂の進行に伴いその細胞内局在を変化させることを認めた。その $dScg\ \beta$ の局在変化は細胞分裂の進行に必須であるチューブリンと密接な関係にあることが示唆された。この細胞周期の進行に付随した $dScg\ \beta$ の動的局在変化の生物学的意義は未だ不明ではあるが、 $dScg\ \beta$ の新規な性

質の発見はその機能解明における理解につながると考えられる。

第2章では、第1章における dScg βの複眼での発現が認められた結果をもとに、非筋組織である複眼における dScg βの機能を解析した。GAL4-UAS 標的発現システム及び二本鎖 RNA 干渉法の組み合わせにより、ショウジョウバエの複眼特異的に dScg βをノックダウンすると、成虫複眼において個眼の融合、剛毛の欠損を伴う形態形成異常が認められた。この形態形成異常を指標として、様々な遺伝子の突然変異系統との交配により、 $\square scg\beta$ が Egfr シグナル伝達に関する三種類の遺伝子、*rhomboid-1*, *rhomboid-3*, *mirror* を負に制御することが示唆された。そこで、免疫組織化学的手法を用い、 $\square scg\beta$ ノックダウン体の複眼における Rhomboid の発現を調査した。その結果、光受容細胞のいくつかで Rhomboid の発現亢進が見られるとともに、Rhomboid を異所的に発現する細胞がひとつの個眼当たり二つ存在することを認めた。また、抗 dpERK 抗体を用いた免疫組織化学的手法により、光受容細胞及びこれら二つの細胞では Egfr シグナルにより活性化される ERK が確かにリン酸化されていることが示された。以上の *in vivo* の結果より、dScg βは Egfr シグナルを負に制御している可能性が示唆され、 $\square scg\beta$ ノックダウン体ではこの異常が引き金となって成虫複眼の形態形成異常がもたらされると考えられる。

また「展望」では、本研究の今後の方向性、特にヒト肢体型筋ジストロフィー病態解明と新規診断マーカーや治療薬候補物質探索へのショウジョウバエモデルの有用性について述べられている。

論文審査の結果の要旨

サルコグリカン複合体はジストロフィン糖タンパク質複合体を形成する因子の一つで、主な機能としては複合体の細胞膜上への局在の安定化であると言われている。哺乳類においては、これまでに、 α -, β -, γ -, δ -, ε -, ζ -サルコグリカンの六種類が同定されており、これらがヘテロ四量体を形成して機能する。また、 α -, β -, γ -, δ -のいずれの遺伝子に変異が生じても、肢帶型筋ジストロフィーを発症することが知られている。しかしながら、その詳細な発症メカニズムや生体内でのサルコグリカンの機能については未解明な部分が多く、根本的な治療法も確立されていない。これまで、サルコグリカンに関する研究は主に筋ジストロフィーとの関わりを背景に進められてきたが、近年、サルコグリカンが筋組織以外でも発現し、機能していることが明らかとなってきた。しかしながら、これら非筋組織でのたらきについては未だ不明瞭である。本論文において、申請者はショウジョウバエをモデル生物として用いて、これらの問題点に検討を加え、以下の事を明らかにした。

免疫組織化学的手法を用いて、ショウジョウバエβ-サルコグリカンの様々な組織における発現、および、細胞内局在について検討した。その結果、筋組織をはじめとして胚上皮細胞、複眼原基、翅原基、肢原基、唾腺にも発現していることが認められた。また、DNA 複製期ではβ-サルコグリカンが細胞膜のみならず、細胞質内にも局在すること、さらに、β-サルコグリカンは細胞分裂の進行に伴いその細胞内局在をダイナミックに変化させることを見出した。またβ-サルコグリカンの局在変化は細胞分裂の進行に必須であるチューブリンと密接な関係にあることが示唆された。

また非筋組織である複眼におけるβ-サルコグリカンの機能を解析した。GAL4-UAS 標的発現システムと RNA 干渉法の組み合わせにより、ショウジョウバエの複眼でβ-サルコグリカンをノック

ダウンすると、成虫複眼において個眼の融合、剛毛の欠損を伴う形態形成異常が認められた。次にこの形態形成異常を指標とした遺伝的スクリーニングにより、 β -サルコグリカン遺伝子が Egfr シグナル伝達に関する三種類の遺伝子、*rhomboid-1*, *rhomboid-3*, *mirror* を負に制御することが示唆された。そこで、 β -サルコグリカンノックダウン体の複眼における Rhomboid の発現を調査した結果、光受容細胞のいくつかで Rhomboid の発現亢進が見られるとともに、Rhomboid を異所的に発現する細胞がひとつの個眼当たり二つ存在することを見出した。また、光受容細胞及びこれら二つの細胞では Egfr シグナルにより活性化される ERK が確かにリン酸化されていることが示唆された。以上の結果より、 β -サルコグリカンは Egfr シグナルを負に制御している可能性が示唆され、 β -サルコグリカンノックダウン体ではこの異常が引き金となって成虫複眼の形態形成異常がもたらされると考えられる。これらの発見は新規のものであり、高く評価できる。

学位論文は英文で丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、すでに公表済みである申請者を筆頭著者とする下記の2編の論文を基礎としている。

1) R. Hashimoto and M. Yamaguchi

Dynamic Changes in the Subcellular Localization of *Drosophila* β -Sarcoglycan during the Cell Cycle.
Cell Structure and Function Advance Publication by J-STAGE doi:10.1247/csf.06025 (2006)

2) R. Hashimoto and M. Yamaguchi
Genetic link between β -sarcoglycan and the Egfr signaling pathway.
Biochemical and Biophysical Research Communications 348:212-221 (2006)