

氏 名	だん ち ぶおん たお DANG THI PHUONG THAO
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 4 8 7 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 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	Identification of a novel target gene of DREF and studies on DREF gene transcriptional regulation (ショウジョウバエ DREF 標的遺伝子の同定と DREF 遺伝子転写制御機構の研究) (主査)
審 査 委 員	教授 山口政光 教授 竹谷 茂 教授 原田繁春

論文内容の要旨

申請論文は、「序論」、第 1 章「ショウジョウバエの転写因子 DREF の新規標的遺伝子としての *skpA* 遺伝子の同定」と第 2 章「ショウジョウバエのプロトオンコジーン dMyc は正常な *DREF* 遺伝子発現に必須である」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。転写因子 DREF は、ショウジョウバエの DNA 複製・増殖関連遺伝子を制御する重要な制御因子のひとつである。DREF は標的遺伝子のプロモーターに存在する DRE 配列に特異的に結合してその転写を活性化する。一方、DREF は細胞分化を司るいくつかの転写因子により負の制御を受けていることが明らかになっており、DRE/DREF 制御経路は増殖と分化の切り替えで重要な役割を担っていると考えられる。DREF の標的遺伝子や DREF 遺伝子自身の転写制御機構を理解する事は、この増殖と分化を統合的に制御する機構を明らかにする上でも重要である。このような背景のもとに、申請者は DREF の新たな標的遺伝子として *skpA* 遺伝子を同定する(第 1 章)とともに、ショウジョウバエの Myc が *DREF* 遺伝子発現制御に関与する事を見出した(第 2 章)。第 1 章と第 2 章の要旨を以下に示す。

第 1 章：SKPa はユビキチン連結酵素 UbcD1 と共同して機能するショウジョウバエ SCF 複合体構成因子のひとつである。*skpA* 突然変異は中心体の過剰複製、異常なクロマチン凝縮、多糸化や細胞周期進行の異常をもたらすことが報告されているが、*skpA* 遺伝子の転写制御機構についてはほとんどわかっていない。そこで申請者は *skpA* プロモーターに DRE (5' -TATCGATA) と DRE 様 (5' -CATCGATT) 配列が存在し、ショウジョウバエ S2 細胞でのルシフェラーゼ一時発現アッセイと *skpA* promoter-*lacZ* 融合遺伝子を持つ遺伝子導入ショウジョウバエを用いた解析で、これらの配列が *skpA* プロモーター活性に重要であることを見出した。また、DREF を複眼原基後極側で過剰発現させるとその領域で *skpA* の発現が誘導されること、また逆に DREF をノックダウンするとその領域で *skpA* の発現低下が起こる事を見出した。これらの結果は *skpA* 遺伝子が転写因子 DREF の新たな標的遺伝子であることを意味し、DREF がタンパク質の分解促進(代謝促進)に関与することを示唆する。

第 2 章：*DREF* 遺伝子のプロモーター領域には、ショウジョウバエ Myc (dMyc) の結合配列として知られる E-box, 5' -CACGTG が存在する。ショウジョウバエ S2 細胞で dMyc をノックダウンする

と、*DREF* mRNA レベルの低下と *DREF* プロモーター活性の低下が見られた。また卵巣濾胞細胞で *dMyc* 突然変異の体細胞クローンを作製するとこれらの領域で *DREF* 遺伝子発現の顕著な低下が見られた。また *dMyc* とそのヘテロダイマー形成のパートナーである *dMax* を S2 細胞で共発現させると、*DREF* プロモーター活性を促進すること、さらに Flip-out 法を用いて、複眼原基や翅原基で *dMyc* を過剰発現する体細胞クローンを作製すると、これらの領域で *DREF* 遺伝子発現が誘導されることを観察した。これらの結果は増殖シグナルに直ちに応答する初期応答遺伝子として知られる *dMyc* 遺伝子の産物が、*DREF* 遺伝子発現を正に制御していることを示している。これは、増殖シグナルから転写因子 *DREF* へ至る経路の解明において、重要な知見である。

論文審査の結果の要旨

転写因子 *DREF* はショウジョウバエの DNA 複製・増殖関連遺伝子を制御する重要な制御因子のひとつである。*DREF* は標的遺伝子のプロモーターに存在する DRE 配列に特異的に結合してその転写を活性化する。一方、*DREF* は細胞分化を司るいくつかの転写因子により負の制御を受けていることが明らかになっており、DRE/*DREF* 制御経路は増殖と分化の切り替えで重要な役割を担っていると考えられる。*DREF* の標的遺伝子や *DREF* 遺伝子自身の転写制御機構を理解する事は、この増殖と分化を統合的に制御する機構を明らかにする上でも重要である。このような背景のもとに、申請者は *DREF* の新たな標的遺伝子として *skpA* 遺伝子を同定するとともに、ショウジョウバエの *Myc* が *DREF* 遺伝子発現制御に関与する事を見出した。

SKPa はユビキチン連結酵素 UbcD1 と共同して機能するショウジョウバエ SCF 複合体構成因子のひとつである。*skpA* 突然変異は中心体の過剰複製、異常なクロマチン凝縮、多糸化や細胞周期進行の異常をもたらすことが報告されているが、*skpA* 遺伝子の転写制御機構についてはほとんどわかっていない。申請者は *skpA* プロモーターに DRE (5' -TATCGATA) と DRE 様 (5' -CATCGATT) 配列が存在し、ショウジョウバエ S2 細胞でのルシフェラーゼ一時発現アッセイと *skpA* promoter-*lacZ* 融合遺伝子を持つ遺伝子導入ショウジョウバエを用いた解析で、これらの配列が *skpA* プロモーター活性に重要であることを見出した。また、*DREF* を複眼原基後極側で過剰発現させるとその領域で *skpA* の発現が誘導されること、また逆に *DREF* をノックダウンするとその領域で *skpA* の発現低下が起こる事を見出した。これらの結果は、*skpA* 遺伝子が転写因子 *DREF* の新たな標的遺伝子であることを意味し、また *DREF* がタンパク質の分解促進（代謝促進）に関与することを示唆し意義深い。

一方、*DREF* 遺伝子のプロモーター領域には、ショウジョウバエ *Myc* (*dMyc*) の結合配列として知られる E-box, 5' -CACGTG が存在する。ショウジョウバエ S2 細胞で *dMyc* をノックダウンすると、*DREF* mRNA レベルの低下と *DREF* プロモーター活性の低下が見られた。また、卵巣濾胞細胞で *dMyc* 突然変異の体細胞クローンを作製すると、これらの領域で *DREF* 遺伝子発現の顕著な低下が見られた。また、*dMyc* とそのヘテロダイマーパートナーである *dMax* を S2 細胞で共発現させると、*DREF* プロモーター活性を促進すること、さらに Flip-out 法を用いて、複眼原基や翅原基で *dMyc* を過剰発現する体細胞クローンを作製すると、これらの領域で *DREF* 遺伝子発現が誘導されることを観察した。これらの結果は増殖シグナルに直ちに応答する初期応答遺伝子として知られる *dMyc* 遺伝子の産物が、*DREF* 遺伝子発現を正に制御していることを示している。これは、増殖シグナルから

転写因子 DREF へ至る経路の解明において重要な新しい知見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、査読制のある国際的学会誌に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) Thao, D. T. P., Ida, H., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Identification of the *Drosophila* *skpA* gene as a novel target of the transcription factor DREF. Exp. Cell Res. 312, 3641-3650, 2006.
- 2) Thao, D. T. P., Seto, H. and Yamaguchi, M.: *Drosophila* Myc is required for normal *DREF* gene expression. Exp. Cell Res. 314, 184-192, 2008.

また、参考論文として以下の 3 編が公表されている。

- 1) Thao, D. T. P., and Thuoc, T. L.: Establishment of a recombinant yeast *Sacharomyces cerevisiae* expressing glucoamylase-coding gene, Science & Technology Development 5, 7-8, 2002.
- 2) Hieu, T. V., Truc, K. D. T., Thao, D. T. P., and Thuoc, T. L.: Cloning and expression of *jap* gene encoding p60 protein of *Listeria monocytogenes* in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 3, 325-331, 2005.
- 3) Hieu, T. V., Thao, D. T. P., and Thuoc, T. L.: Expression of the *jap* gene encoding p60 protein of *Listeria monocytogenes* on the *Sacharomyces cerevisiae* cell surface. Journal of Biotechnology, 4, 41-46, 2006.