

氏 名	すやり おさむ 須 鎗 理
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5 2 0 号
学位授与の日付	平成 21 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 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	Identification and characterization of <i>HP6</i> and <i>Mes4</i> genes as novel targets of DNA replication-related element-binding factor(DREF) (転写因子 DREF によって制御される新規遺伝子の同定と機能解析の研究)
審 査 委 員	(主査)教授 山口政光 教授 竹谷 茂 教授 森 肇

論文内容の要旨

申請論文は「序論」、第 1 章「キイロショウジョウバエにおける DREF 経路変更因子の遺伝学的スクリーニング：DREF の新規標的遺伝子としての HP6 の同定と解析」、第 2 章「DRE-DREF システムによるショウジョウバエ *Mes4* 遺伝子の転写制御」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。ショウジョウバエの転写因子 DREF (DNA replication-related element binding factor) は DNA 複製または細胞増殖関連遺伝子のプロモーター領域に共通して存在している 8 塩基対(5'-TATCGATA)からなる DNA replication-related element (DRE)と呼ばれるプロモーターエレメントに結合し、転写を制御していることが知られている。ゲノムデータベース上で DRE 配列を探索すると複製・増殖関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子など多くの遺伝子のプロモーターに DRE 配列が存在していることがわかるが、それらの遺伝子が実際に DRE-DREF 経路により制御されているのかについては明らかではない。DREF を複眼原基で過剰発現させると異所的な S 期とアポトーシス誘導、光受容細胞分化の阻害を引き起こし成虫複眼の形態異常 (rough eye 表現型) を誘導する。そこで申請者はこの rough eye 表現型を変更する突然変異を網羅的にスクリーニングし、同定された変更遺伝子群の中で特に HP6 遺伝子と Mes4 遺伝子に注目し、それらが DRE-DREF 制御システムの標的であることを明らかにした。

第 2 章では、まず上記のゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングの結果について述べている。以前の研究で、欠失すると rough eye 表現型に影響を与える X 染色体上の 5 つのゲノム領域と第 2 染色体上の 17 のゲノム領域が同定されていた。これら計 22 のゲノム領域に変異が存在する遺伝子変異系統 238 系統と GMR-GAL4>UAS-DREF 系統を交配し、F1 での成虫複眼の形態を観察した。その結果、rough eye 表現型を抑圧したもの 27 系統、増強したもの 19 系統が同定できた。申請者は、その変異が強く rough eye 表現型を抑圧した HP 6 遺伝子に注目した。申請者は HP6 遺伝子の 5' 上流領域に 4 つの DRE 様配列が存在していることを見出し、HP6 遺伝子は DREF によって転写制御されている可能性を考えた。Kc 細胞の核抽出液を用いたゲルシフト法及びクロマチン免

疫沈降法により4つのDRE様配列には *in vitro* 及び *in vivo* でDREFが結合することが示唆された。またRNA干渉により、DREFを特異的にノックダウンしたS2細胞ではHP6遺伝子のmRNA発現量が減少していた。これらの結果からDREFはHP6の発現を直接的に制御していることが示唆された。ショウジョウバエの全ての発生過程においてHP6 mRNAが検出できるが、特に成虫雄精巣で高発現していることがわかった。更なるHP6の機能を調べるために抗HP6抗体を作製した。精巣での局在を調べるために抗HP6抗体と抗DREF抗体とで二重染色を行ったところ、細胞増殖が盛んな精巣先端の核で両者が共局在していることが観察された。

第2章では、もう一つのDREF標的遺伝子 *Mes4* について述べられている。*Mes4* 遺伝子は母性因子であるDorsalの標的遺伝子のひとつであり初期胚中胚葉で強く発現していることが知られている。*Mes4* 遺伝子の5'上流領域をデータベース上で調べたところ、DRE配列が存在していた。このことから申請者は、*Mes4* 遺伝子がDREFによって転写制御されている可能性を考えた。ルシフェラーゼ遺伝子上流に *Mes4* 遺伝子のプロモーター領域を連結したプラスミドを作製し、ルシフェラーゼの一時発現アッセイを行った。この結果、DREの変異による著しいプロモーター活性の減少が見られたことから、DREがプロモーター活性に重要な配列であることが示唆された。次に申請者は *LacZ* 遺伝子上流に *Mes4* 遺伝子のプロモーター領域を連結したプラスミドを作製し、遺伝子導入ショウジョウバエ系統を作製した。この系統でのβガラクトシダーゼ発現を指標にして、*in vivo* でのプロモーター活性におけるDREの効果を調べたところ、ルシフェラーゼ一時発現アッセイの結果と同様に、DREの変異によるβガラクトシダーゼの発現低下が見られた。また、RNA干渉によりDREFを特異的にノックダウンしたS2細胞を用いてルシフェラーゼ一時発現アッセイを行ったところ、*Mes4* 遺伝子のプロモーター活性が40%低下した。これらの結果から、DREFは *Mes4* の発現を正に制御していることが示唆された。Kc細胞の核抽出液を用いたゲルシフト法及び抗DREF抗体を用いたクロマチン免疫疫沈降法により *Mes4* 遺伝子プロモーターのDRE配列には *in vitro* 及び *in vivo* でDREFが結合することが示唆された。これらの結果から申請者は *Mes4* 遺伝子の発現はDRE/DREFシステムにより制御されると結論付けている。更に *Mes4* の機能を調べるためにGAL4-UASシステムを用いて *Mes4* 遺伝子を全身でノックダウンすると翅の萎縮が観察された。このことから *Mes4* は翅の形態形成に必要であることが示唆された。HP6はクロマチン構造の制御に、一方 *Mes4* は初期胚中胚葉や成虫翅の形態形成に必要であるので、DREFはこれまでに言われていた細胞増殖に関わる機能だけでなく、様々な生物機能における遺伝子発現を制御しているのかもしれないと申請者は考察している。

論文審査の結果の要旨

ショウジョウバエの転写因子DREFは複製・増殖関連遺伝子のプロモーター領域に共通して存在するDREと呼ばれるエレメントに結合し、転写を制御していることが知られている。DREFを複眼原基で過剰発現させると異所的なS期とアポトーシス誘導、光受容細胞分化の障害を引き起こし成虫複眼の形態異常(rough eye表現型)を誘導する。申請者はこのrough eye表現型を変更する突然変異を網羅的にスクリーニングし、同定された変異遺伝子群の中で特にHP6遺伝子と *Mes4* 遺伝子に注目し、それらがDRE-DREF制御システムの標的であることを明らかにした。

遺伝学的スクリーニングによりrough eye表現型を変更した突然変異系統46系統を同定した。

同定した遺伝子の一つである HP6 遺伝子の 5' 上流領域には 4 つの DRE 様配列が存在していた。ゲルシフト法及びクロマチン免疫沈降法により 4 つの DRE 様配列には *in vitro* 及び *in vivo* で DREF が結合することが示された。また DREF を特異的にノックダウンした S2 細胞では HP6 の mRNA レベルが減少していた。これらの結果から DREF は HP6 の発現を正に制御していることが示唆された。ショウジョウバエの全ての発生過程において HP6 mRNA が検出できるが、特に成虫の精巣で高発現し、特に細胞増殖が盛んな精巣先端の核に DREF と HP6 が共に局在していることが明らかにされた。

もう一つの DREF 標的遺伝子候補 *Mes4* は初期胚中胚葉で強く発現していることが知られていた。*Mes4* 遺伝子の 5' 上流領域にも DRE 配列が存在していた。申請者はルシフェラーゼの一時発現アッセイや、*LacZ* レポーター遺伝子導入ショウジョウバエ系統を用いた *in vivo* でのプロモーター活性測定により、DRE が *Mes4* プロモーター活性に重要な働きを持つことを明らかにした。また DREF を特異的にノックダウンするとプロモーター活性が低下することから、DREF は *Mes4* 発現を正に制御していると結論した。またゲルシフト法及びクロマチン免疫沈降法により *Mes4* 遺伝子プロモーターの DRE 配列に DREF が結合することを示した。これらの結果から申請者は *Mes4* 遺伝子の発現は DRE/DREF システムにより制御されると結論付けている。更に *Mes4* 遺伝子を全身でノックダウンすると翅の萎縮が観察されたことから *Mes4* は翅の形態形成に必要であることが明らかになった。HP6 はクロマチン構造の制御に、一方 *Mes4* は初期胚中胚葉や成虫翅の形態形成に必要であるので、DREF はこれまでに言われていた細胞増殖に関わる機能だけでなく、様々な生物機能における遺伝子発現をも制御しうると申請者は考察している。これらの研究は、DRE/DREF 制御システムの理解をさらに深めるものであり、その学問的意義は高く評価できる。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印刷中である下記の 2 編の論文を基礎としている。

1. Ida, H., Suzusho, N., Suyari, O., Yoshida, H., Ohno, K., Hirose, F., Itoh, M. and Yamaguchi, M.: Genetic screening for modifiers of the DREF pathway in *Drosophila melanogaster*: Identification and characterization of HP6 as a novel target of DREF. **Nucleic Acids Res.** in press.
 2. Suyari, O., Ida, H., Yoshioka, Y., Kato, Y., Hashimoto, R. and Yamaguchi, M.: Identification of the *Drosophila Mes4* gene as a novel target of the transcription factor DREF. **Exp. Cell Res.** in press.
- また、参考論文として以下の論文が公表されている。

1. Cui, L., Yoshioka, Y., Suyari, O., Kohno, Y., Zhang, X., Adachi, Y., Ikehara, S., Yoshida, T., Yamaguchi, M. and Taketani, S.: Relevant expression of *Drosophila* Heme oxygenase is necessary for the normal development of insect tissues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 377, 1156-1161, 2008.
2. Yoshioka, Y., Suyari, O. and Yamaguchi, M.: Transcription factor NF-Y is involved in regulation of the JNK pathway during *Drosophila* thorax development. **Genes to Cells**, 13, 117-130, 2008.
3. Yoshioka, Y., Suyari, O., Yamada, M., Ohno, K., Hayashi, Y. and Yamaguchi, M.: Complex interference in the eye developmental pathway by *Drosophila* NF-YA. **Genesis** 45, 21-31, 2007