

氏 名	かわもり あきひと 河森 秋人
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 612 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 23 年 9 月 26 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 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>Studies on molecular mechanism of insect development</b> (昆虫の発生の分子機構の研究)
審 査 委 員	(主査)教授 山口政光 教授 遠藤泰久 教授 原田繁春

### 論文内容の要旨

申請論文は「序論」、第 1 章「塩酸処理によるカイコ休眠卵コリオンタンパク質の消失」、第 2 章「転写因子 DREF はシャフト細胞のエンドレプリケーションを制御することで剛毛の分化に重要である」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。カイコの卵は産卵後約 24 時間に休眠に入る。この休眠を打破するためには、産卵後 24 時間のカイコ卵に塩酸処理を施すのが最も効果的な方法として知られている。しかしながら、この休眠打破の分子機構については不明である。そこで申請者はカイコの休眠打破の分子機構を明らかにするため、休眠卵と非休眠卵に様々な塩酸処理を行った後 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、それらの卵のタンパク質構成を分析した。一方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要素に結合し、転写を制御す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。また細胞生物学的な解析が少ないとあって、発生の過程において DREF がどのようにそれら多様な遺伝子の発現を制御しているかについてもほとんどわかっていない。そこで申請者はショウジョウバエ成虫背部剛毛の発生システムに着目し、剛毛を形成する細胞群の増殖と分化における DREF の機能を解析した。

第 1 章では、まずカイコの休眠打破の分子機構解析の詳細について記載している。申請者はカイコ休眠卵と非休眠卵に様々な塩酸処理を行った後、それらの卵のタンパク質の構成について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことにより調べた。その結果、11 kDa と 8kDa のポリペプチドが塩酸処理後卵から消失することが明らかになった。これらのタンパク質の部分アミノ酸配列を調べると、濾胞細胞で合成されるコリオン AL12 ファミリーに属するタンパク質であることが明らかになった。次にこれらのタンパク質と塩酸処理による休眠打破との関連性を調べるために、様々な品種（多化性、2 化性、非休眠性品種）において、休眠卵の塩酸処理を行い、産卵後

の胚から孵化した後の卵殻における 11 kDa と 8kDa ポリペプチドの発現レベルを調べた。その結果、これらのタンパク質の消失と休眠の打破との直接的な関連性は見出せなかった。しかしながら、これらのタンパク質は休眠打破に有効な時期に消失することによって酸素の透過性を促し、その結果として間接的にではあるが休眠の打破に寄与している可能性も否定はできないと申請者は結論づけている。

第 2 章では、ショウジョウバエ成虫背部剛毛を形成する細胞群の増殖と分化における DREF の機能を解析した結果について記載している。ショウジョウバエの成虫背板には 22 本の大剛毛と 200 本以上の小剛毛が存在する。これらの剛毛は発生場所が固定されており、また発生過程が詳細に調べられているため、様々な生物学的現象を調べるために有効なモデルとして広く用いられている。剛毛の細胞系譜とその周辺細胞で機能する *scabrous-GAL4* ドライバー系統を用いて DREF 二本鎖 RNA を発現させて DREF 遺伝子をノックダウンした。その結果すべての大剛毛の矮小化や消失が確認された。*scabrous-GAL4* ドライバー系統とは異なる部位での発現パターンを示す *apterous-GAL4* ドライバー系統を用いて DREF をノックダウンすると、すべての小剛毛の矮小化が確認された。これらの表現型は GAL4 のみの過剰発現では観察されず、また DREF の過剰発現によって回復したことから、DREF の発現低下により引き起こされた結果であることが明らかになった。さらに剛毛始原細胞の細胞系譜特異的に *lacZ* を発現する *neuralized* 遺伝子エンハンサートラップ系統である A101-*lacZ* 系統を用いて剛毛始原細胞を標識し、DREF の始原細胞分化への関与を調べた。その結果、DREF は始原細胞の分化には関与しないことが明らかになり、また非対称分裂時においても剛毛を構成する 4 種類の細胞 (neuron, sheath cell, socket cell, shaft cell) の分化への関与も無いことが示唆された。一方 DREF の発現低下は非対称分裂時における細胞分裂のタイミングの遅延を引き起こし、分化後の socket cell, や shaft cell 核の成長効率の低下を引き起すことが明らかになった。さらに BrdU アッセイを行い、DNA 合成について調べた結果、socket cell や shaft cell では複製効率が顕著に低下していることが明らかになった。これらの結果より、shaft cell における細胞成長と複製効率低下の原因是、DREF が複製や成長に必要な標的遺伝子の発現を制御しているためであると申請者は考えた。そしてこの仮説を検証するため、内在性の *PCNA* 遺伝子の発現をモニターするツールとして広く用いられている PCNA-GFP 系統の GFP 発現を調査した。その結果、DREF をノックダウンした shaft cell では GFP 発現が消失していることが明らかとなった。さらに DREF は shaft cell の成長やタンパク質の合成過程には必要であることも示唆された。これら一連の解析結果より、DREF のノックダウンによる剛毛の矮小化や消失が起こった原因は、DREF が剛毛の鞘になる shaft cell において複製に必須である *PCNA* 遺伝子の発現を制御しているため、DREF タンパクの発現低下により、shaft cell の核が十分成長することができなくなり、その結果として剛毛が十分伸長できなくなったと申請者は考察している。これらの結果を総合して申請者は、DREF は剛毛の発生過程では細胞分化関連遺伝子群の発現は制御しておらず、むしろ増殖、複製やタンパク質合成関連遺伝子群の発現制御を通じて剛毛の発生において重要な役割を果たしていると結論している。

## 論文審査の結果の要旨

申請者はカイコ休眠卵と非休眠卵に様々な塩酸処理を行った後、それらの卵のタンパク質の構成について調べた結果、11 kDa と 8kDa のコリオン AL12 ファミリーに属するタンパク質が塩酸処理後、卵から消失することを明らかにした。これらのタンパク質の消失と休眠打破との直接的な関連性は見出せなかつたが、これらのタンパク質は休眠打破に有効な時期に消失することによって酸素の透過性を促し、その結果として間接的にではあるが休眠の打破に寄与している可能性もあると申請者は結論した。これらの研究はカイコ休眠打破の仕組みを考える上で重要な知見でありじゅうぶん評価できる。

一方申請者は、ショウジョウバエ成虫背部剛毛を形成する細胞群の増殖と分化における転写因子 DREF の機能を解析した。成虫背板には 22 本の大剛毛と 200 本以上の小剛毛が存在する。剛毛の細胞系譜とその周辺細胞で機能する *scabrous-GAL4* ドライバー系統を用いて DREF 遺伝子をノックダウンするとすべての大剛毛の矮小化や消失が誘導された。また *apterous-GAL4* ドライバー系統を用いて DREF をノックダウンすると、すべての小剛毛の矮小化が見られた。これらの表現型は GAL4 のみの過剰発現では観察されず、また DREF の過剰発現によって回復したことから、DREF の発現低下により確かに引き起こされたものであると申請者は結論した。さらに剛毛始原細胞の細胞系譜特異的に *lacZ* を発現する *neuralized* 遺伝子エンハンサートラップ系統を用いて始原細胞をマークし、DREF の始原細胞分化への関与を調べた結果、DREF は始原細胞の分化には関与しないことが明らかになり、また非対称分裂時においても剛毛を構成する 4 種類の細胞 (neuron, sheath cell, socket cell, shaft cell) の分化への関与も無いことを示唆した。一方 DREF の発現低下は非対称分裂時における細胞分裂のタイミングの遅延を引き起こし、また分化後の socket cell, や shaft cell 核の成長効率の低下を引き起すことを明らかにした。さらに BrdU アッセイにより DNA 合成をモニターした結果、DREF をノックダウンすると socket cell や shaft cell では複製効率が顕著に低下していることを明らかにした。これらの結果より、shaft cell における細胞成長と複製効率低下の原因是、DREF が複製や成長に必要な標的遺伝子の発現を制御しているためではないかと申請者は考えた。そしてこの仮説を検証するため、*PCNA-GFP* 系統を用いて複製に関与する *PCNA* 遺伝子の発現をモニターした結果、DREF をノックダウンした shaft cell では GFP 発現が確かに消失していることが明らかとなった。さらに DREF は shaft cell の成長やタンパク質の合成過程にも必要であることも示唆された。これら一連の解析結果より、DREF のノックダウンによる剛毛の矮小化や消失の原因是、DREF が剛毛の鞘になる shaft cell において *PCNA* 遺伝子の発現を制御しているため、DREF タンパク質の発現低下により、shaft cell の核が十分成長することができなくなり、その結果剛毛が十分伸長できなくなったのではないかと申請者は考察している。これらの結果を総合して申請者は、DREF は剛毛の発生過程では細胞分化関連遺伝子群の発現を制御しておらず、むしろ増殖、複製やタンパク質合成関連遺伝子群の発現制御を通じて剛毛の発生において重要な役割を果たしていると結論している。これらの研究は、転写因子 DREF の関与する発生のしくみについての理解を深めるものであり、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発表済みである下記の 2 編の論文を基礎としている。

1. Tsurumaru, S., Kawamori, A., Mitsumasu, K., Niimi, T., Imai, K., Yamashita, O. and

- Yaginuma, T. : Disappearance of chorion proteins from *Bombyx mori* eggs treated with HCl solution to prevent diapause. **Journal of Insect Physiology** 56 (12), 1721–1727, 2010.
2. Kawamori, A. and Yamaguchi, M. : DREF is critical for *Drosophila* bristle development by regulating endoreplication in shaft cells. **Cell Structure and Function** 36(1), 103–119, 2011.