

| | |
|-------------|--|
| 氏 名 | ぐえん とう あん てい NGUYEN TU ANH THI |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (学 術) |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 6 4 7 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 24 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 生命物質科学専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | <i>Drosophila</i> as a model for studying function of <i>Dual oxidase</i> gene and for screening of its bioavailable inhibitors and antioxidants (ショウジョウバエモデルを利用したデュアルオキシダーゼの機能研究および生物学的利用可能な阻害剤と抗酸化物質の探索) |
| 審 査 委 員 | (主査)教授 原田繁春 教授 山口政光 教授 亀井加恵子 |

論文内容の要旨

NADPH オキシダーゼファミリーに属する Dual oxidase (Duox)は、活性酸素種を産生する非ミトコンドリア性の酵素である。生体内において、活性酸素種は生体防御、甲状腺ホルモン合成、細胞内シグナリングに関与する重要な分子であるが、その過剰な産生は炎症、老化、各種疾病の原因となることが知られている。本申請論文は、ショウジョウバエを用いて Duox の新たな機能を明らかにするとともに、生物学的利用可能な Duox 阻害剤や抗酸化物質のスクリーニング系としてのショウジョウバエの有用性を示したものである。本論文は、序論、第 1 章、第 2 章、総括からなる。

序論では、本研究の背景および構成について述べている。この中で、Duox およびそれによって産生される活性酸素種の生体内での機能について解説するとともに、モデルとしてショウジョウバエを用いる意義を説明している。

第 1 章では、ショウジョウバエ Dual oxidase (dDuox)の新たな機能を明らかにすることを目的として、dDuox 遺伝子をショウジョウバエ組織特異的にノックダウンした。dDuox 遺伝子を全身でノックダウンすると致死となることから、dDuox は発生過程に必須であることを明らかにした。また、翅特異的にノックダウンすると、翅がオープンウイングとなるとともに、脆弱となることを見出した。その機構を詳細に解析し、dDuox のノックダウンによって、翅原基におけるアポトーシスが亢進していることを明らかにした。また、dDuox によって産生される活性酸素種が、メラニン産生による翅の硬化とチロシン間の架橋形成による翅の安定化に関与していることを解明した。dDuox と遺伝学的に相互作用する因子を明らかにするため、各種第 3 染色体欠失変異系統と dDuox ノックダウン系統を交配し、dDuox ノックダウンによる翅の異常な形態が次世代において亢進あるいは抑圧されるものをスクリーニングした。検討した 87 系統の第 3 染色体欠失変異

系統のうち、12 系統において翅の異常な形態が次世代で抑圧されることを見出した。この 12 系統の第 3 染色体欠失領域には、Wingless シグナリング、Notch シグナリング、アポトーシス、キューティクル合成、プロテインキナーゼ、プロテインチロシンホスファターゼに関連する重要な遺伝子が含まれていた。これらは Duox のネガティブレギュレーターである可能性があることから、Duox の活性制御を目的とする創薬等の標的である可能性を示した。

過剰な活性酸素種の産生は各種疾病に関係するため、Duox 阻害剤や活性酸素種を消去する抗酸化物質は治療薬としての効果が期待できる。第 2 章では、ショウジョウバエにヒト Duox 2 (hDuox2) 遺伝子を導入し、生物学的利用可能な Duox 阻害剤や抗酸化物質のスクリーニング系としての有用性を検討した。ヒト Duox 2 (hDuox2) を複眼特異的に過剰発現させると、ラフアイと呼ばれる異常な表現型をとることを見出した。植物葉の乾燥粉末を hDuox2 過剰発現ショウジョウバエ幼虫に経口投与した結果、ラフアイ表現型が回復し、コントロールショウジョウバエとほぼ同じ表現型を示した。植物葉には抗酸化活性を持つフラボノイドが含まれていることから、フラボノイドがショウジョウバエの腸管より吸収され、さらに複眼原基に取り込まれて活性酸素種を消去した可能性を示唆している。続いて、市販の各種フラボノイドをショウジョウバエ幼虫に経口投与すると、Quercetin-3-*O*-D-glucoside、Quercetin-3-*O*-glucose-6''-acetate、Naringin はラフアイ表現型を回復させたが、Quercetin、Rutin、Kaempferol、Epigallocatechin gallate はラフアイ表現型を回復させなかった。ヒトを含む哺乳類の腸管において、糖を含有するフラボノイド配糖体が吸収されることが知られており、その機構にグルコーストランスポーターの関与が示唆されている。本研究で、ラフアイ表現型を回復させた 3 種類のフラボノイドはいずれも配糖体であった結果は、哺乳類で報告されている結果と一致しており、ショウジョウバエの腸管での吸収システムが哺乳類のものと類似していることを示している。以上の結果より、本研究で樹立した hDuox2 過剰発現ショウジョウバエが生物学的利用可能な抗酸化物質および Duox 阻害剤のスクリーニング系として有用であることを明らかにした。

総括においては、本論文の総括的な結論を示している。

論文審査の結果の要旨

本申請論文は、活性酸素種を産生する酵素である Dual oxidase (Duox) について研究している。論文は大きく 2 つに分けられる。ひとつは、ショウジョウバエを用いて Duox の新たな機能を明らかにしたものであり、二つ目は、生物学的利用可能な Duox 阻害剤や抗酸化物質のスクリーニング系としてのショウジョウバエの有用性を示したものである。

一つ目では、ショウジョウバエにおいて組織特異的にショウジョウバエ Duox (dDuox) をノックダウンすることによって、dDuox が発生過程に必須であり、また翅の正常な形成に関与していることを明らかにした。dDuox によって産生される活性酸素種が、メラニン合成による翅の硬化と、チロシン間の架橋形成による翅の安定化に関与していることを解明した。dDuox の翅形成におけ

る機能は新規な知見であり、学術的に高く評価される。

続いて、過剰な活性酸素種の産生は各種疾病に関連することから、活性酸素種を消去する抗酸化物質や Duox 阻害剤が疾病の治療薬や予防薬として期待できることに着目した。ヒト Duox 2 (hDuox2) 遺伝子を導入して、複眼特異的に過剰発現させてラフアイと呼ばれる異常な表現型を示すショウジョウバエ系統を樹立した。このショウジョウバエ幼虫に各種フラボノイドを経口投与し、成虫での複眼の表現型への影響を解析した結果、ショウジョウバエ腸管でのフラボノイドの吸収システムが、哺乳類のものと類似していることを示唆する結果を得た。これによって、本研究で樹立した hDuox2 過剰発現ショウジョウバエが生物学的利用可能な抗酸化物質および Duox 阻害剤のスクリーニング系として有用であることを明らかにした。本成果は、創薬等において、*in vitro* でのスクリーニングと動物実験との間をつなぐスクリーニング系としてのショウジョウバエの有用性を示したもので、学術的な観点からも十分に評価される。

本論文の基礎となった論文を下記に示す。いずれも、審査のある論文誌に掲載された学術論文で、申請者が筆頭著者である。

- (1) Nguyen Thi Tu Anh, Maiko Nishitani, Shigeharu Harada, Masamitsu Yamaguchi, and Kaeko Kamei: Essential Role of Duox in Stabilization of *Drosophila* Wing. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**(38), pp. 33244-33251 (2011).
- (2) Nguyen Thi Tu Anh, Maiko Nishitani, Shigeharu Harada, Masamitsu Yamaguchi, and Kaeko Kamei: A *Drosophila* model for the screening of bioavailable NADPH oxidase inhibitors and antioxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **352**(1-2), pp. 91-98 (2011).

以上の検討結果から、本論文の内容には十分な新規性と独創性ならびに高い学術的価値があると認められ、本論文を博士論文として十分な内容を備えていると判定する。