

氏 名	ふじわら しゅんすけ <b>藤原 俊介</b>
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6 5 7 号
学位授与の日付	平成 25 年 3 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	<b>Identification of the <i>warts</i> and <i>basket</i> genes as novel targets of the <i>Drosophila</i> DRE/DREF transcriptional regulatory system</b> (ショウジョウバエ DRE/DREF 転写制御システムの新たな標的としての <i>warts</i> 遺伝子と <i>basket</i> 遺伝子の同定)
審 査 委 員	(主査)教授 山口政光 教授 遠藤泰久 教授 中島敏博

## 論文内容の要旨

申請論文は第 1 章「序論」、第 2 章「ショウジョウバエ DRE/DREF 転写経路の新規標的遺伝子としての *warts* 遺伝子」、第 3 章「ショウジョウバエ DREF は JNK 経路を介して背部発生に必須である」、第 4 章「総合討論」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。ショウジョウバエ転写因子 DREF (DNA replication-related element binding factor) は細胞増殖関連遺伝子の転写に深く関わっている。DREF は標的遺伝子のプロモーター上に存在する DRE (DNA replication-related element) と呼ばれる 8 塩基対 (5'-TATCGATA) に特異的に結合し、遺伝子の転写を正に制御している。DRE/DREF 転写制御システムが、細胞増殖関連遺伝子と関わりが深いことから、申請者はその新たな標的候補として Hippo シグナル伝達経路に関わる遺伝子に注目した。Hippo 経路はショウジョウバエからヒトにいたるまで、高度に保存されたがん抑制経路である。近年 Hippo 経路は組織や器官再生にも関与し、細胞ストレス応答に重要な JNK シグナル伝達経路とのリンクも明らかにされつつある。このような背景のもとに、申請者は Hippo 経路の代表的な構成因子 *warts* 遺伝子と JNK 経路の代表的な構成因子 *basket* 遺伝子に焦点をあてた研究を行い、両遺伝子が DRE/DREF システムによって転写制御されていることを明らかにした。

第 2 章では、まず DREF 過剰発現が誘導するショウジョウバエ複眼形態異常を指標にして行った遺伝学的相互作用の検討結果について述べている。Hippo 経路の中核をなす *warts* (*wt*s) 遺伝子と DREF との間に遺伝学的な相互作用が見られたため、分生生物学的手法を用いてさらに詳細な解析を行った。ショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞を用いて行ったルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*wt*s 遺伝子プロモーター上に存在する 3 つの DRE 配列がそのプロモーター活性に必須であることを明らかにした。RNAi 法を用いて DREF をノックダウンした S2 細胞では、そのプロモーター活性が顕著に低下し、さらに定量的 RT-PCR 法により *wt*s の mRNA 量も低下した。また抗 DREF 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、*in vivo* で *wt*s プロモーター上の DRE 配列を含むゲノム領域に DREF が結合していることを明らかにした。これらの結果から *in vivo* において

DRE/DREF 制御システムが *wt*s 遺伝子の転写活性化に大きく貢献していることが示唆された。

第 3 章では、細胞ストレス応答に重要な JNK 経路の中核をなす *basket*(*bsk*) 遺伝子が、DREF の標的遺伝子であることを証明した実験について述べている。*bsk* 遺伝子は、従来転写因子 NF- $\kappa$ B がその転写に関わっていることが明らかになっていたが、他の転写因子の関与も示唆されていた。そこで、遺伝学的スクリーニングとゲノムデータベース検索を行ったところ、DREF と遺伝学的相互作用することと、*bsk* プロモーター上に DRE 配列が存在していることを見いだした。*wt*s 遺伝子と同様にレポーターアッセイや、定量的 RT-PCR、クロマチン免疫沈降法を用いた解析から、*in vivo* で DREF が *bsk* 遺伝子の転写に重要であることが明らかとなった。ショウジョウバエ成虫背部において特異的に DREF をノックダウンすると、*bsk* が関わる JNK 経路の異常によって生じるものと同様の split thorax 表現型が見られ、さらに野生型 Bsk の過剰発現によって、この表現型が緩和された。これらのことから、DREF は *bsk* 遺伝子の転写を活性化することによって、JNK 経路を活性化し、ショウジョウバエ成虫背部形成に関わっていることが明らかとなった。

第 4 章では、Hippo 経路と JNK 経路間に機能的なクロストークが報告されていることから、両経路への DREF の関与から推測される生物学的な意義について考察が加えられている。Hippo 経路と JNK 経路は過剰な細胞増殖の抑制や異常細胞の組織からの排除など、機能的な類似点が多く、生物個体の組織や器官の正確な形成とその維持に大きく関わっているとされている。このことから、申請者は DRE/DREF システムが従来から言われていた細胞の増殖を単純に促進させるだけではなく、最終的に理想的な大きさと機能を持った組織や器官の形成とさらにその維持に重要な細胞増殖の微調整にも関わる制御因子ではないかと考察している。

## 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 DNA エlement 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 期とアポトーシスの誘導や光受容細胞分化の阻害を引き起こし、その結果成虫複眼の形態異常 (rough eye 表現型) を誘導する。

申請者は DREF の新たな標的候補として Hippo 経路に関わる遺伝子に注目した。Hippo 経路はショウジョウバエからヒトにいたるまで、高度に保存されたがん抑制経路である。rough eye 表現型を指標にした遺伝学的相互作用解析で、Hippo 経路構成因子 *warts* (*wt*s) 遺伝子と DREF が遺伝学的相互作用することを見出した。ショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞を用いて行ったルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*wt*s 遺伝子プロモーター上に存在する 3 つの DRE 配列がそのプロモーター活性に必須であることを明らかにした。RNAi 法を用いて DREF をノックダウンした S2 細胞では、そのプロモーター活性が顕著に低下し、さらには定量的 RT-PCR 法により *wt*s mRNA 量の低下も観察された。また抗 DREF 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、*in vivo* で *wt*s プロモーター上の DRE 配列を含むゲノム領域に DREF が結合することを明らかにした。これらの結果は *in vivo* において DRE/DREF システムが *wt*s 遺伝子の転写活性化に大きく貢献していることを示唆している。さらに細胞ストレス応答に重要な JNK 経路の中核をなす *basket*(*bsk*) 遺伝子についても同様の解析を行い、*in vivo* で DREF が *bsk* 遺伝子の転写に重要であることを明らかにした。

本研究によって、DRE/DREF システムがショウジョウバエ生体内の恒常性維持に重要な役割をも

つ Hippo 経路と JNK 経路の転写活性化にも関わっていることが明らかとなった。興味深いことに Hippo 経路と JNK 経路は過剰な細胞増殖の抑制や異常細胞の組織からの排除など、機能的な類似点が多く、生物個体の組織や器官の正確な形成とその維持に関わっているとされている。このことから、DRE/DREF システムが従来から言われていた細胞の増殖を単純に促進させるだけではなく、最終的に理想的な大きさと機能を持った組織や器官の形成とさらにその維持にとって重要な細胞増殖の微調整にも関わる制御因子であることが示唆された。これらの研究は、生物個体内での DRE/DREF システムの重要性を明らかにすることとなり、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、申請者が筆頭著者である 1 編を含む、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。

- 1) Fujiwara, S., Ida, H., Yoshioka, Y., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: The *warts* gene as a novel target of the *Drosophila* DRE/DREF transcription pathway. Am. J. Cancer Res. 2 (1) 36-44, 2012.
- 2) Yoshioka, Y., Tue, N. T., Fujiwara, S., Matsuda, R., Valadez-Gtaham, V., Zurita, M. and Yamaguchi, M.: *Drosophila* DREF acting via the JNK pathway is required for thorax development. Genesis 50 (8), 599-611, 2012.

また、参考論文として以下の論文も公表されている。

- 1) Fujiwara, S., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: DREF, a concertmaster for Hippo pathway and JNK pathway in *Drosophila*. J. Carcinogene. Mutagene. 4: e110.doi:10.4172/2157-2518.1000e110, 2013.