氏　　名	よしおか　やすひで **吉　岡　泰　秀**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　４８５　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	**Studies on role of the *Drosophila* transcription factor NF-Y in development** （ショウジョウバエ転写因子ＮＦ-Ｙの個体発生における役割の研究）
審査委員	(主査) 教授　山口政光 教授　山岡亮平 教授　遠藤泰久

論文内容の要旨

申請論文は、第１章「NF-Yの構造と発生過程における役割」、第２章「ショウジョウバエNF-YAによる複眼発生過程の干渉」、第３章「転写因子NF-Yはショウジョウバエthorax形成においてJNKシグナル伝達経路の制御に関与する」とサマリーから構成されている。

第１章では、転写因子Nuclear Factor Y box (NF-Y)が酵母から哺乳動物まで真核生物に幅広く存在すること、NF-YはサブユニットA,B,Cの三量体からなる転写因子であり、A, B, Cが複合体を形成したときにのみDNAに結合するという特徴をもつこと。またNF-YAにはDNA結合ドメインが、NF-YB, NF-YCにはhistone fold motifと呼ばれる特徴的なドメインが存在することなど研究の背景が述べられている。NF-Yはこれまで哺乳動物培養細胞を用いた研究により、免疫、細胞周期、鉄の貯蔵などに関わる遺伝子の発現を調節することが示唆されているが、個体レベルでの機能は未知である。そこで申請者は個体レベルでの解析が比較的容易なショウジョウバエの実験系を用いてNF-Yの生体内機能の解析を行った。

第２章では､特にショウジョウバエNF-Y (dNF-Y)のDNA結合サブユニットであるdNF-YAに着目し、dNF-YAを過剰発現する遺伝子導入系統とdNF-YAをノックダウンするために二本鎖RNAを発現させるRNAi系統をそれぞれ樹立し、複眼形成でのdNF-YAの働きにについて検討した結果について述べている。GAL4-UAS標的発現システムを用いて、様々な発生時期、組織特異的にdNF-YAの過剰発現あるいは、ノックダウンを行ない、その生体への効果を調べた結果、*eyeless(ey)*-GAL4でdNF-YAを複眼･触覚原基特異的に過剰発現させると成虫頭部の形態形成が阻害され致死になるという表現型が見られた。翅原基でEyを異所的に発現させると成虫翅での複眼の異所的な形成が起こる事が知られている。そこで、翅原基上でEyとdNF-YAを同時に発現させてみると、Eyが誘導する翅での複眼の異所的形成の抑圧が見られた。このようにdNF-YAの過剰発現は複眼形成を阻害し得ることが示された。これらの結果は、複眼形成へのdNF-Yの関与を示唆するものである。

第３章では、成虫 thorax 形成での dNF-YA の働きについて検討している。*pannir(pnr)*-GAL4 を用いて dNF-YA を翅原基の notum 予定領域で特異的にノックダウンさせると、成虫背部が正常に形成されず、thorax が分割される表現型が見られた。この表現型は、thorax 形成で重要な働きを持つ事が知られている JNK シグナル伝達経路構成因子の突然変異系統が示す表現型と類似してい

る。そこでこの系統(*pnr*-GAL4>UAS-d*NF-YAIR*)と JNK シグナル伝達経路上の遺伝子の突然変異系統を交配し、F１での表現型の変化を調べた。*basket (bsk, Drosophila JNK)*突然変異系統との交配で得られた F１では、表現型の増強が見られた。また、*pnr*-GAL4>UAS-d*NF-YAIR 系統*に、野生型 Bsk を発現させる UAS-bsk 系統を交配させ、Bsk を dNF-YA 二本鎖 RNA と同時に発現させると *pnr*-GAL4>UAS-d*NF-YAIR* で見られる表現型が部分的に抑圧された。さらに、翅原基上で dNF-YA をノックダウンさせる RNAi 体細胞クローンを作製し、活性化 JNK の阻害因子 *puckered (puc)*の発現レベルをモニターしたところ、dNF-YA がノックダウンされた体細胞クローンでは、*puc* の発現量が減少していることがわかった。これらの結果は、dNF-Y が、*bsk* 遺伝子発現を正に制御することを示唆する。一方、ゲノム上の *bsk* 遺伝子の上流-90bp 部位に NF-Y の結合コンセンサス配列である 5'-YYRRCCAATCAG-3'が見出された。そこで抗 dNF-YA 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行ない、*bsk* 遺伝子上流域の NF-Y 結合コンセンサス配列を含むゲノム領域に確かに、dNF-Y が結合していることが示された。また、ショウジョウバエ S2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、*bsk* プロモーター上の CCAAT motif を変異させるとプロモーター活性が低下することも明らかになった。さらに、dNF-YA をノックダウンした幼虫では、内在性の *bsk* の mRNA 量が減少していることも定量的 RT-PCR により確認された。これらの結果は、dNF-Y が *bsk* 遺伝子の発現を直接正に制御していることを強く示唆している。申請者はこれらの研究で、dNF-Y が JNK シグナル伝達経路の制御に関与する事をはじめて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

転写因子 Nuclear Factor Y box (NF-Y)は、酵母から哺乳動物まで真核生物に幅広く存在する。NF-Y はサブユニット A,B,C の三量体からなる転写因子であり、A, B, C が複合体を形成したときにのみ DNA に結合する。NF-Y はこれまで哺乳動物培養細胞を用いた研究により、免疫、細胞周期、鉄の貯蔵などに関わる遺伝子の発現を調節することが示唆されているが、個体レベルでの機能は未知であった。そこで申請者は個体レベルでの解析が比較的容易なショウジョウバエの実験系を用いて、NF-Y の生体内機能の解析を行ない、以下の事を明らかにした。

申請者は、ショウジョウバエ NF-Y (dNF-Y)の DNA 結合サブユニットである dNF-YA に着目した。dNF-YA 遺伝子導入系統を作製し、*eyeless (ey)*-GAL4 ドライバー系統を用いて、複眼・触覚原基特異的に過剰発現させると成虫複眼の形態形成が阻害され致死になることを見出した。翅原基で Ey を異所的に発現させると成虫翅で複眼の異所的な形成が起こる事が知られている。そこで、翅原基上で Ey と dNF-YA を同時に発現させると Ey が誘導する翅での複眼の異所的形成の抑圧が見られた。これらの結果より dNF-YA の過剰発現は、複眼形成を阻害し得ることが示された。これらの結果は、複眼形成への dNF-Y の関与をはじめて示すものである。

一方申請者は dNF-YA ノックダウン系統も樹立し、それらと *pannir(pnr)*-GAL4 を用いて dNF-YA を翅原基の notum 予定領域で特異的にノックダウンすると、成虫背部が正常に形成されず、thorax が分割されること(thorax disclosed 表現型)を見出した。この表現型は、thorax 形成で働らく事が知られている JNK シグナル伝達経路構成因子の突然変異系統が示す表現型と酷似している。そこで dNF-YA ノックダウン系統と JNK シグナル伝達経路上の遺伝子突然変異系統を交配し、*basket (bsk, Drosophila JNK)*突然変異が thorax disclosed 表現型を増強することを見出した。一方、

dNF-YA ノックダウン系統に、野生型 Bsk 発現系統を交配させると thorax disclosed 表現型が抑圧された。さらに、翅原基上で dNF-YA をノックダウンさせる RNAi 体細胞クローンを作製し、活性化 JNK の阻害因子 *puckered (puc)*の発現レベルをモニターしたところ、dNF-YA がノックダウンされた体細胞クローンでは、*puc* の発現量が減少していることがわかった。これらの結果は、dNF-Y が *bsk* 遺伝子発現を正に制御することを示唆する。一方、ゲノム上の *bsk* 遺伝子の上流-90bp 部位に NF-Y の結合コンセンサス配列が見出された。そこで抗 dNF-YA 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行ない、*bsk* 遺伝子上流域の NF-Y 結合コンセンサス配列を含むゲノム領域に確かに、dNF-Y が結合していることが示された。また、ショウジョウバエ S2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、*bsk* プロモーター上の NF-Y 結合コンセンサス配列を変異させるとプロモーター活性が低下し、また dNF-YA をノックダウンした幼虫では内在性の *bsk* の mRNA 量が減少していることも定量的 RT-PCR により確認した。これらの結果は、dNF-Y が *bsk* 遺伝子の発現を直接正に制御していることを示している。申請者のこれらの発見は新規のものであり、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) 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.

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.