

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

低酸素下の個体成長制御におけるSIMILAR/HIF- $\alpha$ とその関連遺伝子の機能解析

Functional Analysis of SIMILAR/HIF- $\alpha$  and its Related Genes in the Regulation of Body Growth under Hypoxia

申請者

野口 晃司

Koji NOGUCHI

生命医科学専攻 分子病態医化学研究

2023年2月

## 1. 学位論文内容の要旨

生物を取り巻く環境の酸素濃度が低下すると、生物は成長を抑制する。この応答では、低酸素誘導因子 **hypoxia inducible factor (HIF)** が転写因子として中心的な役割を担う。低酸素環境下では、細胞内の様々な代謝経路が変化するが、個体成長との関係には不明な点が多い。本研究では、酸素環境によってその個体成長が大きく変化する代表的なモデル生物のキイロショウジョウバエを用いて、低酸素による成長抑制にかかわるメカニズムの解明に取り組んだ。また、哺乳類 HIF- $\alpha$  のホモログ SIMA と機能的にかかわる新規因子の探索とその機能の解析を行った。

様々な臓器特異的に *sima* 遺伝子の過剰発現を行うと、**insulin producing cells (IPCs)** および **fat body (FB)** 特異的な過剰発現系統 (*dilp2 > sima*, *r4 > sima*) において、3 齢後期幼虫の成長抑制が認められた。*dilp2 > sima* の IPCs では *dilp* 遺伝子の発現量の減少が確認された。また、*r4 > sima* では FB 内の AKT のリン酸化を阻害する *tribbles (trbl)* 遺伝子が SIMA によって発現誘導されることが明らかとなり、*trbl* 遺伝子の発現を阻害すると *r4 > sima* の個体サイズが回復することが分かった。これらの結果は、IPCs および FB における SIMA が個体成長を制御し、また FB では *trbl* 遺伝子の発現制御を介した自律的な代謝変容によって、低酸素下の個体成長を調節することを示している。続いて、*r4 > sima* の表現型を回復させる *trbl* 以外の遺伝子をスクリーニングによって探索し、4 つの遺伝子が見出された。これらの遺伝子の中で、水酸化され電子供与体としての機能を失った NAD(P)HX の修復にかかわる *Carkd* 遺伝子に着目し解析を行った。その結果、*Carkd* 遺伝子の発現抑制によって *r4 > sima* における表現型が回復すること、*Carkd* 遺伝子の過剰発現によって飢餓耐性、酸化ストレス耐性が向上することが明らかとなった。続いて *Carkd* 遺伝子を発現抑制したマウス由来の培養細胞において解析を行い、通常酸素下の細胞増殖能が減少することを見いだした。また、CARKD の細胞増殖能に対する作用点を模索するため、CARKD 結合タンパク質を HPLC-MS/MS を用いて探索した。その結果、CARKD が電子伝達系の Complex I と結合していることが明らかとなった。これらの結果は、CARKD が低酸素応答を始めとするストレス応答や細胞増殖能を制御する重要な代謝経路と関与する可能性を示している。

## 2. 学位論文審査結果

2022 年 12 月 6 日に行われた公聴会では、学位論文内容の説明と質疑応答が行われた。その概要を以下に記載する。

1. 抗 DILP2 抗体による IPCs 以外の染色領域の特異性について問われ、摂食行動の有無に関わらず染色されている領域であるため、本抗体の非特異的な結合によるものである可能性が高いという回答がなされた。

2. TRBL による AKT のリン酸化阻害機構について質問があった。TRBL と AKT の結合により AKT リン酸化酵素の結合領域の立体構造が変化し、リン酸化酵素の AKT への結合性が低下することに起因しているという回答がなされた。

3. CARKD 結合タンパク質の探索について、免疫沈降法に基づくウェスタンブロット法と

HPLC-MS/MS を用いた質量分析法の結果の差異について質問があった。前者の解析ではマウス由来同士のタンパク質結合を、後者の解析ではマウス由来の *CARKD* とヒト由来の内蔵タンパク質の結合を確認しており、その差異によると考えられると回答がなされた。

4. インスリンシグナルが減弱する *r4 > sima* の寿命変化について問われ、蛹の段階で致死となる個体が多く評価すること自体が適当でないと判断したと回答がなされた。

5. 2次スクリーニング実験で見つかった *Carkd* 遺伝子以外の3つの遺伝子に対して今後行うべき実験について質問があった。2つの遺伝子に関しては機能未知であることから SIMA と関与する代謝経路の変化を中心に変異系統で探索することにより作用点を模索する。機能が判明している *P5CDh1* 遺伝子は SIMA の発現レベルを制御する  $\alpha$ -ケトグルタル酸の代謝と関与する因子であることから、変異系統を用いて SIMA のタンパク質量やターゲット遺伝子の発現量変化といった SIMA の機能指標の変化を探索すべきであるという回答がなされた。

6. 低酸素暴露による個体間の致死率のばらつきについて質問があった。個体発生では *critical weight* と呼ばれる閾値を3齢幼虫初期の段階で超えていなければ致死となる。また、高い低酸素耐性を示すショウジョウバエ群は平均的なショウジョウバエ群と比べ異なる遺伝子プロファイルを示す。つまり、遺伝子発現量や酵素活性の差異に起因して個体サイズが変化し、*critical weight* に達するか否かが決定された結果でないかという回答がなされた。

7. GAL4/UAS 遺伝子発現システムにおける、GAL4 発現量と目的遺伝子の発現量の関係について質問があった。1つの UAS 配列に対して GAL4 タンパク質は2量体として結合する。UAS 配列は一般的に4~10回程度繰り返される形で導入されるため、全ての UAS 配列に GAL4 タンパク質が結合したとき下流の遺伝子の発現量が最大になると考えられる。そのため、培養細胞や個体において、あるレベルまで目的遺伝子の発現量は GAL4 発現量に比例すると回答がなされた。

8. *sima* 過剰発現系統において *dilp* 遺伝子の発現量が減少した原因について問われ、*dilp5* 遺伝子の発現抑制因子として報告がある FOXO の核局在が SIMA によって誘導されることから、この系統における *dilp* 遺伝子の発現量についても同様な機構が働いている可能性があるという回答がなされた。

9. *dilp2, 3, 5* 遺伝子を発現誘導する転写因子が同一のものであるか問われ、*dilp5* 遺伝子の転写因子として知られる *eyeless* 遺伝子の変異系統では、*dilp5* 遺伝子の発現量は顕著に減少する一方で *dilp2, 3* 遺伝子の発現量は変化しない。また、飢餓状態の幼虫では *dilp2* 遺伝子の発現量は変化せず、*dilp3, 5* 遺伝子の発現量が減少する。このように *dilp2, 3, 5* 遺伝子がそれぞれ独立して制御されていることから、同一の転写因子で制御されている可能性は低いという回答がなされた。

10. FB から分泌される oxygen sensitive factor ( $O_2F$ ) の性状について質問があった。この因子は低酸素依存的に DILP 分泌を阻害する作用を示し、*r4 > sima* において DILP2 の分泌が阻害されたことから SIMA の制御を受ける未同定の因子であると回答がなされた。

11. 哺乳類とショウジョウバエの NAD<sup>+</sup>合成経路の違いについて質問があった。哺乳類ではトリプトファンとニコチン酸の両方が合成材料として用いられるが、ショウジョウバエではニコチン酸のみが用いられるという回答がなされた。

12. ショウジョウバエを用いてヒトの研究にも応用できるような代謝経路を研究することは一般的に困難であるか問われ、哺乳類の酵素反応と異なっていることが多く、代謝経路の精密な比較は難しい一方で、新規タンパク質の発見には神経系関連を中心に有用であることが多いという回答がなされた。

13. FB の重量と個体サイズとの相関性について質問がなされた。DILP 産生に働きかける FB 由来の分泌因子の機能が FB 量と相関すると考えているため、FB 量が増えれば個体サイズも増加すると予想され、本研究の *r4 > sima* においても FB 量と個体サイズは相関していると回答がなされた。

14. *Carkd* 遺伝子の哺乳類細胞の細胞増殖能に対する作用を考慮した上で、*Carkd* 遺伝子ノックダウンによる *r4 > sima* の表現型の回復についても、*Carkd* 遺伝子による細胞増殖能への作用が関与しているのかについて質問があった。幼虫期の FB はほとんど細胞数が増えないため、細胞サイズの変化が細胞機能に影響を与えた可能性が高いと考えられ、そのため哺乳類細胞で見られた表現型と同一とみなすことはできないと回答がなされた。

15. *Carkd* 発現抑制細胞と *Carkd* 変異細胞の表現型の違いについて問われ、*Carkd* 発現抑制細胞において残存する CARKD タンパク質によって変異細胞で報告されたような表現型が認められなかった可能性が高い、つまり CARKD 量依存的な表現型の発現制御があると考えられると回答がなされた。

16. 飢餓、酸化ストレス耐性が *Carkd* 遺伝子の過剰発現により向上した理由について問われた。これらのストレスによって細胞内が酸性に傾くことから、NAD(P)H の損傷が誘導され NAD<sup>+</sup>量が減少することが予想される。NAD<sup>+</sup>量はストレス環境下で生存率を向上させるために重要であることから、*Carkd* 遺伝子の過剰発現によって NAD<sup>+</sup>量が担保された結果だと推察されると回答がなされた。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が本研究の意義と目的を理解し、本学問領域の十分な学識を備えていると判断した。また、本研究成果は SIMA によって個体成長が制御される新規メカニズムを詳細に示し、SIMA と関与する新規因子の探索に成功した初めての報告であり、博士（理学）の学位を受けるに相応しいと判断された。

2022 年 12 月

審査員

主査 早稲田大学 教授 博士（医学）慶応義塾大学 合田 亘人 \_\_\_\_\_

副査 早稲田大学 教授 理学博士 東京大学 仙波 憲太郎 \_\_\_\_\_

副査 早稲田大学 教授 医学博士 山梨医科大学 大島 登志男 \_\_\_\_\_