京都工芸繊維大学

氏　　名	しまじ　こうへい **嶋路　耕平**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　８２３　号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 24 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	Studies on the biological roles of histone methyltransferase G9a in *Drosophila melanogaster* （キイロショウジョウバエにおけるヒストンメチル基転移酵素 G9a の生物学的役割についての研究）
審査委員	(主査)教授　山口政光 教授　伊藤雅信 教授　片岡孝夫

論文内容の要旨

キイロショウジョウバエにおけるヒストンメチル基転移酵素 G9a の生物学的役割について論じている本申請論文は、英文で記述されている。序論、第一章「ショウジョウバエ胚発生過程でのゲノムワイドなヒストンメチル基転移酵素 dG9a ターゲット遺伝子の同定」、第二章「ゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングにより明らかになった dG9a と EGFR シグナル経路の関連性」、第三章「飢餓ストレスにより誘導されるオートファジーのショウジョウバエヒストンメチル基転移酵素 G9a によるエピジェネティック制御」から構成されている。序論では本研究の背景と目的が述べられている。ヒストンのメチル基転移酵素のひとつとして哺乳類では G9a が同定されているが、G9a ノックアウトマウスが胚性致死となるために、胚期以降での G9a の機能はあまり研究されていない。ショウジョウバエ G9a（dG9a）はユークロマチン領域のヒストン H3 のリジン残基 K9 (H3K9)をメチル化することができ、それによって生体内で特異的な遺伝子群の発現を抑制することが知られている。これまでのいくつかの論文で dG9a は様々な発生過程を調節することが明らかとなってきたが、dG9a がショウジョウバエの生存に不必要な遺伝子であるとの報告もあり、その機能については未だ不明な点が多い。これらの学術的背景のもとに、申請者がショウジョウバエの発生や生存における dG9a の生物学的役割に着目して研究を開始したことが述べられている。

第一章では、ショウジョウバエの初期胚発生における dG9a の機能について述べられている。申請者はまず、dG9a 欠失変異系統では卵の孵化にかかる時間が増加することを明らかにした。また、免疫組織学的手法により、dG9a の局在が初期胚発生過程でダイナミックに変化することを示した。さらにゲノムワイドな RNA-sequence 解析により、dG9a 欠失変異系統では初期胚で胚発生の進行や形態形成に関与するいくつかの遺伝子の発現が変化することが明らかとなった。これらの結果から申請者は、dG9a は初期胚発生過程でダイナミックにその局在を変え、また胚発生の進行に関わる遺伝子の発現を調節することによって卵の孵化に要する時間を制御していると結論づけた。

第二章で申請者は遺伝学的に相互作用する因子を同定することで dG9a の生体内での機能を探究した。複眼原基特異的に dG9a を過剰発現させたショウジョウバエ系統では、個眼の融合等の複眼形態異常が観察される。この複眼形態異常（rough eye 表現型）を指標としたゲノムワイドな遺

伝学的スクリーニングによって、申請者は 16 個の遺伝子が、dG9a 過剰発現により引き起こされた複眼形態異常を増強することを明らかにした。さらに免疫組織学的手法によって、dG9a と EGFR シグナル伝達経路との強い関連性が明らかとなった。

第三章では、飢餓ストレス耐性獲得における dG9a の役割に焦点が当てられている。dG9a 欠失変異系統では、成虫の飢餓ストレス耐性が著しく低下することが見出された。このような耐性低下は高温ストレスや酸化ストレス等の他のストレス条件下では観察されなかった。興味深いことに、さらなる解析によって dG9a 欠失変異系統では、飢餓に応答して誘導される細胞内のエネルギーリサイクルにはたらくオートファジー活性が著しく低下していることが明らかとなった。また、定量的 RT-PCR 法により dG9a 欠失変異系統では、オートファジーの進行に必須な遺伝子である *Atg8a* の発現量が低下していることが明らかになった。これらの結果から、dG9a は通常はショウジョウバエの生存には不必要な遺伝子であるが、飢餓条件下ではオートファジーの進行に必須な遺伝子の発現を調節することによって、オートファジー活性を上昇させ、個体の生存に大きく寄与していると申請者は結論づけた。

論文審査の結果の要旨

ヒストンメチル基転移酵素 G9a のノックアウトマウスは胚性致死となるために、胚期以降での G9a の生体内機能についてはあまり研究されていない。ショウジョウバエ G9a（dG9a）は、ユークロマチン領域のヒストン H3 のリジン残基 K9 (H3K9)をメチル化し、標的遺伝子群の発現を抑制することが知られている。dG9a は様々な発生過程で機能することが明らかとなってきたが、dG9a がショウジョウバエの生存に不必要な遺伝子であるとの報告もあり、その機能については未だ不明な点が多い。これらの学術的背景のもとに、申請者はショウジョウバエの発生や生存における dG9a の生物学的役割に着目して研究を開始した。dG9a 欠失変異系統では卵の孵化にかかる時間が増加する。また、免疫組織学的手法、ゲノムワイドな RNA-sequence 解析等を駆使して申請者は、dG9a が初期胚発生過程でダイナミックにその局在を変え、また胚発生の進行に関わる遺伝子の発現を調節することによって卵の孵化に要する時間を制御していることを見出した。また申請者は遺伝学的手法を用いて、dG9a と遺伝学的相互作用する遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを実施し、dG9a が EGFR シグナル伝達経路と強くリンクすることを明らかにした。さらに飢餓ストレス耐性獲得における dG9a の役割に注目し、dG9a 欠失変異系統では、成虫の飢餓ストレス耐性が著しく低下することを見出した。さらに詳細な解析により、dG9a は通常はショウジョウバエの生存には不必要な遺伝子であるが、飢餓条件下ではオートファジーの進行に必須な遺伝子の発現を調節することによって、オートファジー活性を上昇させ、個体の生存に大きく寄与していることを明らかにした。これら一連の研究は、生物発生過程と環境変化に応答するエピジェネティック制御の仕組みを明らかにしたものであり、学術的意義は大きい。またエピジェネティック制御研究分野でのショウジョウバエモデルの有効性を示した研究としても評価できる。

これらの研究は、申請者が筆頭著者である査読性のある下記の国際科学雑誌 2 編を基礎としている。

1) Kouhei Shimaji, Takahiro Konishi, Shintaro Tanaka, Hideki Yoshida, Yasuko Kato, Yasuyuki Ohkawa, Tetsuya Sato, Mikita Suyama, Hiroshi Kimura and Masamitsu Yamaguchi: Genomewide identification

of target genes of histone methyltransferase dG9a during *Drosophila* embryogenesis. Genes to Cells, 20 (11), 902-914, 2015.

2) Kouhei Shimaji, Takahiro Konishi, Hideki Yoshida, Hiroshi Kimura, Masamitsu Yamaguchi: Genome-wide genetic screen identified the link between dG9a and epidermal growth factor receptor signaling pathway *in vivo*. Exp. Cell Res., 346(1): 53-64, 2016.

また参考論文として査読性のある下記の国際科学雑誌 7 編に掲載されている。

3) Ei Nakajima, Kouhei Shimaji, Takanari Umegawachi, Saki Tomida, Hideki Yoshida, Nana Yoshimoto, Shingo Izawa, Hiroshi Kimura, & Masamitsu Yamaguchi: The histone deacetylase gene *Rpd3* is required for starvation stress resistance. PLoS One, 11 (12), e0167554, 2016.

4) Moyu Goto, Narumi Toda, Kouhei Shimaji, Dang Ngoc Anh Suong, Nicole Vo, Hiroshi Kimura, Hideki Yoshida, Yoshihiro H. Inoue, and Masamitsu Yamaguchi: Polycomb-dependent nucleolus localization of Jumonji/Jarid2 during *Drosophila* spermatogenesis. Spermatogenesis, 6 (3), e1232023, 2016.

5) Akihito Kawamori, Kouhei Shimaji, and Masamitsu Yamaguchi: Control of *e2f1* and *PCNA* by *Drosophila* Transcription Factor DREF. Genesis, 51, 741-750, 2013.

6) Akihito Kawamori, Kouhei Shimaji, and Masamitsu Yamaguchi: Temporal and Spatial Pattern of *Dref* Expression during *Drosophila* Bristle Development. Cell Struct. Funct., 38, 169-181, 2013.

7) Akihito Kawamori, Kouhei Shimaji, Masamitsu Yamaguchi: Dynamics of Endoreplication during *Drosophila* Posterior Scutellar Macrochaete Development. PLoS One 7(6), e38714, 2012.

8) Yuta Ushijima・Yoshihiro H. Inoue・Takahiro Konishi・Daishi Kitazawa・Hideki Yoshida・Kouhei Shimaji・Hiroshi Kimura・Masamitsu Yamaguchi: Roles of histone H3K9 methyltransferases during *Drosophila* spermatogenesis. Chromosome Res. 20 (3), 319-331, 2012.

9) Nguyen Trong Tue, Kouhei Shimaji, Naoki Tanaka, and Masamitsu Yamaguchi: Effect of αB-Crystallin on Protein Aggregation in *Drosophil*a. J. Biomed. Biotech. Volume 2012, Article ID 252049, 7 pages, doi:10.1155/2012/252049, 2012