

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	細胞性粘菌STATa シグナル構成因子の機能解析
作成者(著者)	嵯峨, 幸夏
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 川田 健文 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第966号
学位記番号	甲第155号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD29626973

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2017年入学	研究分野 生物学	氏名 嵯峨 幸夏
審査委員	(主査) 東邦大学大学院理学研究科 教授 川田 健文 (副査) 東邦大学大学院理学研究科 教授 岩室 祥一 (副査) 東邦大学大学院理学研究科 教授 多田 政子 (副査) 東邦大学大学院理学研究科 講師 村本 哲哉	
(論文題目) 細胞性粘菌 STATa シグナル構成因子の機能解析		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) 本学位論文は、多細胞真核微生物の細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> 発生過程におけるオーガナイザー（形成体）で中心的な役割を担う転写因子 STATa とそのシグナル伝達経路を構成する諸因子の機能を解析することで、オーガナイザー領域の分子メカニズムの解明を目指した。 本学位論文は3つの章からなり、1) STATa 標的候補遺伝子でオーガナイザー特異的発現を示す転写因子間の上下関係の解析、2) STATa のリン酸化（活性化）を制御するチロシンキナーゼ様キナーゼ (Tyrosine kinase-like kinase; TKL キナーゼ) DrkA の性質解析、3) 細胞質 long non-coding RNA (lncRNA)である <i>dutA</i> の機能解析、から構成される。 1章では、まず、転写因子 MybC の遺伝子発現が STATa によって制御され、オーガナイザー特異的な <i>ecmF</i> 遺伝子の発現を活性化することを示した。また、オーガナイザー特異的な遺伝子発現は STATa の下流で転写因子 CudA 或いは MybC に依存する少なくとも2つの経路に分けられることを示し、GtaG も STATa により遺伝子発現が活性化されることを示した。オーガナイザーで発現する遺伝子間の遺伝学的上下関係についてレポーター解析を行い、 <i>mybC</i> と <i>gtaG</i> 遺伝子プロモーターの最大活性には STATa が必要だが、 <i>gtaG</i> の発現には MybC は不必要で、 <i>mybC</i> の発現には MybC 自身が必要であることを明らかにした。これらの転写因子の遺伝子破壊株は全て移動体期で発生が止まるが、各株の移動体の長さや走光性が異なり、STATa の下流では少なくとも3つの異なる経路に分岐し、それぞれの経路が異なった転写因子によって異なる機能を担うことで、STATa の多機能性に寄与していることを示した。 2章では、未同定であった STATa の活性化 (STATa は細胞外からの cAMP の刺激により 702 番目のチロシン残基 Tyr702 がリン酸化されて活性化される)に関わるキナーゼの解析について述べられている。チロシン選択的なチロシンキナーゼ様キナーゼ (TKL)とチロシンキナーゼ JAK の相同性に基つき、		

Dictyostelium receptor-like kinase (DRK)サブファミリーに属する DrkA が STATa キナーゼ候補として同定されていたが、本論文では、*drkA* 遺伝子が STATa の活性化領域であるオーガナイザー領域に特異的に発現していることを見出した。また、一過性の DrkA 過剰発現株の作製に成功し、DrkA の過剰発現は STATa のリン酸化レベルを上昇させたが、細胞の増殖に著しく影響し、細胞死を引き起こすことも示した。さらに、大腸菌から精製したリコンビナント DrkA のチロシン残基とスレオニン残基が自己リン酸化され、pull-down 実験によって DrkA が cAMP 依存的に STATa と結合していることも示した。これらの事実と、先行研究での *in vitro* キナーゼ実験の結果を合わせ、本論文の結果は DrkA が STATa を直接活性化できる重要な分子の 1 つであると証明した。

3章では、RNA polymerase II で転写される細胞性粘菌 RNA で最も量が多い long non-coding RNA (lncRNA)である *dutA* RNA の機能について述べられている。当研究室の先行研究で、STATa と *dutA* RNA の機能的な繋がりが示唆されていたが、本論文ではさらに、*dutA* RNA を過剰発現させると移動体初期では STATa のリン酸化レベルが低下することも示した。また、RACE 解析によって 5' と 3' の両端の位置を決定し、先行研究とデータベースで示されていた *dutA* のゲノム上の位置と長さに誤りがあることを発見して 938 ヌクレオチドの RNA であると改定した。FLAG タグを利用した発現株を用いることで、*dutA* RNA から小さなペプチドが翻訳される可能性は低いことも示した。さらに、RNA fluorescence *in situ* hybridization 実験により *dutA* RNA は細胞質中に点状に散在し、組織特異的な局在が発生時期に応じて劇的に変化することを見出した。オーガナイザー特異的な遺伝子のプロモーターを利用してオーガナイザー領域に異所的に *dutA* RNA を強制発現させると、移動体期から子実体形成期への移行が遅延することを示した。また、*dutA* RNA の機能を明らかにするため、*dutA* 遺伝子破壊株、過剰発現株、異所的発現株と野生株を用いて RNA-seq 解析を行い、多くの種類の mRNA 量が株間で変動することを見出した。これらの発現変動遺伝子には *mybC* や *gtaG* など STATa によって制御される転写因子の遺伝子も含まれており、異所的発現株の表現型に影響を与えた可能性を示した。上記の結果を総合して *dutA* RNA が何らかのメカニズムで mRNA の安定性に影響を及ぼし、STATa の活性化に間接的な影響を与える可能性を示した。また、RNA-seq を検証する定量的 RT-PCR で、*dutA* RNA 依存的な発現を示す遺伝子を幾つか同定した。これらの発見は *dutA* RNA がどのように STATa の活性化に作用して機能するのかというメカニズムを解明する上で有用な手がかりとなり得る。

これらの成果は、国内学会に 10 度発表し、2 報の英文の査読付き論文が筆頭著者として(うち 1 報は学会誌奨励賞を受賞)、1 報が共著者として公表された。また、第 3 章の仕事については論文執筆中で、不足分データを加えれば投稿出来る状態にある。以上のような研究能力から判断し、4 名の審査委員は、学位論文提出者 嗟峨 幸夏 は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。

論文題目

細胞性粘菌 STATa シグナル構成因子の機能解析

論文要旨

STATa は細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における後生動物の転写因子 STAT (signal transducer and activator of transcription) のホモログで、細胞性粘菌の移動体先端の prestalk A (pstA) 領域に位置する発生のオーガナイザーにおいて、極めて重要な働きを司っている。特に、STATa はオーガナイザーを介して最終分化過程である子実体形成期に移行するかの決定を担っている。これまでの研究で、筆者は転写因子 MybC が STATa によって遺伝子発現を制御され、pstA 特異的な *ecmF* 遺伝子の発現を活性化することを示した。また、pstA 細胞特異的な遺伝子間の階層は STATa の下流で転写因子 CudA 或いは MybC に依存する少なくとも 2 つの経路に分けられることを示した。本研究において、*ecmF* 遺伝子を活性化する別の転写因子として報告されていた *GtaG* も STATa により発現が活性化されることを示した。オーガナイザーで発現する遺伝子間の遺伝学的上下関係を明らかにするため、*lacZ* レポーター解析を行った。その結果、*mybC* と *gtaG* 遺伝子プロモーターの最大活性には STATa が必要であり、*gtaG* の発現には MybC が不必要で、*mybC* の発現には MybC 自身が必要であることを明らかにした。これらの転写因子の遺伝子破壊株は全て移動体期で発生が止まるが、各株の移動体の長さや走光性が異なっていた。*gtaG* 遺伝子破壊株の移動体の形状は STATa 遺伝子破壊株のものと類似し、走光性も *gtaG* と STATa 遺伝子破壊株のみが示さなかった。これらの結果は、STATa の下流では少なくとも 3 つの異なる経路に分岐し、それぞれの経路が異なった転写因子によって異なる機能を担うことで、STATa の多機能性に寄与していると示唆された。

STATa は細胞外からの cAMP の刺激により 702 番目のチロシン残基 (Tyr702) がリン酸化されて活性化されるが、STATa の活性化に関わるキナーゼは未同定であった。先行研究において、それまでに同定されたチロシン選択的なチロシンキナーゼ様キナーゼ (TKL) とチロシンキナーゼ JAK の相同性に基づき、*Dictyostelium receptor-like kinase* (DRK) サブファミリーに属する DrkA が STATa キナーゼ候補として同定されていた。本研究では、*drkA* 遺伝子が STATa の活性化領域である pstA 細胞に特異的に発現していることを見出した。一過性の DrkA 過剰発現は STATa のリン酸化レベルを上昇させたが、DrkA の過剰発現は細胞の増殖に著しく影響し、細胞死を引き起こした。また、大腸菌から精製したリコンビナント DrkA はチロシン残基とスレオニン残基が自己リン酸化された。さらに、pull-down 実験によって DrkA が cAMP 依存的に STATa と結合していることも示した。これらの事実と、先行研究での *in vitro* キナーゼ実験の結果を合わせると、本研究結果は DrkA が STATa を直接活性化できる重要な分子の 1 つであることを強く示している。

dutA RNA は細胞性粘菌の RNA polymerase II によって転写される RNA の中で最も量が多い long non-coding RNA (lncRNA) である。先行研究において、*dutA* cDNA 断片が STATa 部分破壊株のサプレッサーとして単離されたことから、STATa と *dutA* RNA の機能的な繋がりが示唆された。本研究では、まず RACE 解析によって 5' と 3' の両端の位置を決定した。その結果、先行研究とデータベースで示されていた *dutA* のゲノム上の位置と長さに誤りがあることを発見し、938 ヌクレオチドの RNA であると改定した。FLAG タグを利用した発現株を用いることで、*dutA* RNA から小さなペプチドが翻訳される可能性は低いことも示した。さらに、*in situ* hybridization 実験により *dutA* RNA は細胞質中に点状に散在し、その組織特異的な局在が発生時期に応じて劇的に変化することを見出した。ヘテロな *ecmF* 遺伝子のプロモーターを利用して移動体のオーガナイザー領域に異所的に *dutA* RNA を強制発現させると、移動体期から子実体形成期への移行が遅延した。さらに、*dutA* RNA を過剰発現させると移動体初期では STATa Tyr702 のリン酸化レベルが低下した。*dutA* RNA の機能を明らかにするため、*dutA* 遺伝子破壊株、過剰発現株、異所的発現株と野生株を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、多くの種類の mRNA 量が株間で変動していた。これらの発現変動遺伝子には *mybC* や *gtaG* など STATa によって制御される転写因子の遺伝子も含まれており、異所的発現株の表現型に影響を与えたと思われる。今までの結果を総合すると、何らかのメカニズムで *dutA* RNA が mRNA の安定性に影響を及ぼし、STATa の活性化に間接的に影響を与えていると考えられる。RNA-seq の結果を検証するための定量的 RT-PCR で、*dutA* RNA 依存的な発現を示す遺伝子を幾つか同定した。これらは *dutA* RNA がどのように STATa の活性化に作用して機能するのかというメカニズムを明らかにする上で有用な手がかりとなり得る。