

氏名	ふあむれ あん とうん PHAM LE ANH TUAN
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第973号
学位授与の日付	令和2年9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 物質・材料化学専攻
学位論文題目	Novel Function of Lipin and Serotonin Transporter in Development of <i>Drosophila melanogaster</i> (ショウジョウバエの発生におけるリピンおよびセロトニントランスポーターの新規機能に関する研究)
審査委員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 小堀哲生 准教授 吉田秀樹

## 論文内容の要旨

本申請論文は、序論、第1章「キイロショウジョウバエの翅形成におけるリピンの機能」、第2章「キイロショウジョウバエの複眼形成におけるセロトニントランスポーターの機能」、「結論」から構成されている。

序論では、リピンと脂質代謝、セロトニンシステム、発生研究のモデル生物としてのキイロショウジョウバエについて概説している。続いて、本申請論文の目的が、ショウジョウバエの発生過程におけるリピンおよびセロトニントランスポーターの機能解明であることが述べられている。

第1章「キイロショウジョウバエの翅形成におけるリピンの機能」では、まずリピンがホスファチジン酸をジアシルグリセロールに変換する酵素ホスファチジン酸ホスファターゼとしての機能、および脂肪酸 $\beta$ 酸化関連遺伝子の転写コアクチベーターとしての2つの機能を持つタンパク質であることを紹介した。申請者は、Sd-GAL4 ドライバーシステムを用いて翅原基特異的にリピンを特異的にノックダウンしたシステムを樹立し、ノックダウン系統成虫の翅が有意に小さく、先端が欠けた notch 型でカールしていることを見出した。これは、リピンが翅の形態形成に関与していることを示唆している。3齢幼虫の翅原基を採取し、免疫染色、定量的逆転写 PCR 等による解析を行い、ノックダウン系統でS期細胞が有意に増加し、逆にM期細胞が有意に減少していることを明らかにした。これらは、リピンのノックダウンによって翅原基細胞において細胞周期の停止が起り、S期細胞が蓄積したことを示唆している。次に、リピンノックダウンによるDNA損傷の増大とアポトーシス細胞死の亢進を確認した。これらの結果に基づいて、翅原基の形成過程におけるリピンの機能が、DNA損傷の抑制による正常な細胞周期の維持およびアポトーシス細胞死の抑制であると、結論づけている。他のグループによって、飢餓状態や、栄養センサーと呼ばれるTORC1の欠損によってリピンが核に移行すること、マウスにおいてリピン1は転写調節因子として機能し、脂肪酸酸化やTCAサイクルに関連する遺伝子の発現に関与していることが報告されている。申請者は、飢餓状態においても翅原基細胞でのリピンの核移行が認められないことを明らかにし、翅原基形成においてリピンは転写調節因子としては機能していない可能性を述べた。

第2章「キイロショウジョウバエの複眼形成におけるセロトニントランスポーターの機能」で

は、まずセロトニンおよびセロトニントランスポーターについて解説している。セロトニンは精神安定に寄与する神経伝達物質の一つである。末梢組織でのセロトニンはホルモンとして機能することが知られているが、その機能は完全には解明されていない。セロトニントランスポーターはセロトニンの機能を調節する因子の一つであり、放出されたセロトニンを再取り込みすることによって神経伝達を終了させる機能を担い、多くの抗うつ薬の作用点としても知られている。末梢組織でのセロトニントランスポーターの機能として、食欲調節、内分泌調節、血小板でのセロトニンの貯蔵等が知られているが、発生過程での機能は明らかにされていない。さらにショウジョウバエ複眼の発生機構を概説し、細胞増殖やエネルギー代謝に関与する **phosphatidylinositol 3-kinase/プロテインキナーゼ B (PI3K/Akt)** がショウジョウバエ複眼の形成に関与している可能性が報告されていることを述べている。これらを背景に、本章がショウジョウバエの複眼形成過程におけるセロトニントランスポーターの機能解明を目的としていることが記述されている。

ショウジョウバエの複眼特異的にセロトニントランスポーターをノックダウンすると、個眼が変形し、剛毛が消失するラフアイ表現型を呈した。これは、セロトニントランスポーターが複眼形成に関与していることを示している。複眼形成過程におけるセロトニントランスポーターの機能を解明するため、ノックダウンによる異常な複眼形成機構を解析した。3 齢幼虫の複眼原基を採取し、免疫染色、定量的逆転写 PCR 等による解析を行った。セロトニントランスポーターの複眼原基特異的ノックダウン系統では野生型と比較して、複眼原基後極側でアポトーシス細胞死が有意に増加していた。アポトーシス亢進機構として可能性が考えられた DNA 損傷は、ノックダウン系統においてその亢進は認められなかった。後極側で S 期の細胞数が増加していたが、M 期の細胞数には変化がなかった。抗リン酸化 Akt 抗体による免疫染色の結果、セロトニントランスポーターのノックダウンによって Akt の活性化が抑制されていることを明らかにした。ノックダウン系統に PI3K を過剰発現させると、ラフアイ表現型が回復した。これらの結果に基づいて、申請者は複眼の形成過程におけるセロトニントランスポーターの機能は、PI3K / Akt 経路の活性化を調整することによってアポトーシス細胞死を抑制することであると結論づけた。

結論では、発生過程におけるリピンおよびセロトニントランスポーターの機能を総括している。また、本研究成果はセロトニントランスポーターを標的とする抗うつ薬の副作用の説明につながる可能性があることを記述している。

## 論文審査の結果の要旨

本申請論文は、ショウジョウバエの発生過程における 2 つの遺伝子リピンおよびセロトニントランスポーターの機能を明らかにしたものである。

リピンはホスファチジン酸をジアシルグリセロールに変換する酵素ホスファチジン酸ホスファターゼとしての機能、および脂肪酸  $\beta$  酸化関連遺伝子の転写コアクチベーターとしての 2 つの機能を持つタンパク質である。申請者は、翅原基特異的にリピンをノックダウンした系統の翅が有意に小さく、カールし、先端が欠けた notch 型であることを見出した。これは、リピンが翅の形態形成に関与していることを示唆している。翅形成におけるリピンの機能を解明するために、ノックダウン系統 3 齢幼虫の翅原基を採取し、免疫染色や定量的逆転写 PCR による解析を行った。得られた結果に基づき申請者は、翅形成過程において DNA 損傷を抑制することにより、正常な

細胞周期を維持し、アポトーシス細胞死を抑制することが、リピンの機能であると結論づけた。これは、発生過程における脂質代謝関連遺伝子の機能を明らかにしたもので、独創的で新規性の高い知見である。

セロトニンは精神安定に寄与する神経伝達物質の一種である。セロトニントランスポーターはセロトニンの機能を調節する因子であり、放出されたセロトニンを再取り込みすることによって神経伝達を終了させる機能を担う。抹消組織でのセロトニンはホルモンとして機能することが知られているが、その機能は完全には解明されていない。申請者は、ショウジョウバエを用いて発生過程でのセロトニントランスポーターの機能を解析した。ショウジョウバエ複眼特異的にセロトニントランスポーターをノックダウンすると、個眼が変形、剛毛が消失したラフアイ表現型となることから、セロトニントランスポーターが正常な複眼形成に関与していることを明らかにした。セロトニントランスポーターの複眼原基特異的ノックダウン系統では、複眼原基後極側でアポトーシス細胞死が有意に増加しており、その機構としてプロテインキナーゼ B (Akt)の活性化抑制を見出した。ノックダウン系統に phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)を発現させると、ラフアイ表現型が回復することも示した。これらの結果に基づき、申請者は複眼の形成過程におけるセロトニントランスポーターの機能が、PI3K / Akt 経路の活性化を調整することによってアポトーシス細胞死を抑制することであると結論した。本研究成果はセロトニントランスポーターを標的とする抗うつ薬の副作用の機構解明につながる可能性があり、社会的意義の大きい知見である。

本論文の内容は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みの下記論文2編を基礎としている。

1. Tran Duy Binh, Tuan L.A. Pham, Taisei Nishihara, Tran Thanh Men and Kaeko Kamei. The Function of Lipin in the Wing Development of *Drosophila melanogaster*. International Journal of Molecular Sciences, 20, 3288, 2019; doi. 10.3390/ijms20133288 (18 pages)
2. Tuan L.A. Pham, Tran Duy Binh, Guanchen Liu, Thanh Q.C. Nguyen, Yen D.H. Nguyen, Ritsuko Sahashi, Tran Thanh Men and Kaeko Kamei. Role of Serotonin Transporter in Eye Development of *Drosophila melanogaster*. International Journal of Molecular Sciences, 21, 4086, 2020; doi. 10.3390/ijms21114086 (11 pages)