

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07162

研究課題名(和文) 転写因子NF-Yが制御する脂質代謝機構の解析と新規肝機能モデルの開発

研究課題名(英文) Analysis of regulation of lipid metabolism by transcription factor NF-Y on Drosophila fat body

研究代表者

吉岡 泰秀 (Yoshioka, Yasuhide)

摂南大学・理工学部・助教

研究者番号：40572839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 転写因子Nuclear Factor Y Box (NF-Y)は真核生物間で広く保存されており、三つのサブユニットNF-YA, NF-YB, NF-YCの三量体で機能する転写因子である。ショウジョウバエNF-YA(dNF-YA)と脂質分解酵素lipase4(lip4)は遺伝学的に相互作用していることが示唆されており、ルシフェラーゼアッセイ、クロマチン免疫沈降法の結果によりNF-YがLip4遺伝子の発現制御を行うことが示唆された。一方、脂肪体特異的にNF-YAをノックダウンすると蓄積されている油滴の縮小が見られた。これらの結果はNF-Yが遺伝子制御によって脂質代謝に関与する事を示唆している。

研究成果の概要(英文)： The CCAAT motif-binding factor NF-Y consists of three different subunits, NF-YA, NF-YB and NF-YC. It suggests that dNF-YA genetically interact with lipase4(lip4) gene by genetic cross. The 5' flanking region of lip4 gene has three NF-Y binding consensus sequences (YYRCCAATCAG) which play negative roles in promoter activity. In chromatin immunoprecipitation assays with anti-dNF-YA antibody, the lip4 gene 5'-flanking region containing the NF-Y consensus was effectively amplified in immunoprecipitates by real time qPCR. These results suggest that dNF-Y involved in metabolism of lipid by transcriptional regulation of lip4 gene.

The specific knockdown of dNF-YA in fat body resulted that reduction of oil drop on fatbody. These results suggest that dNF-YA involved in fat metabolism in vivo. These observations combined with other cytological, genetical and molecular biological studies indicate that dNF-Y regulates Lip4 gene expression during metabolism of fat on Drosophila.

研究分野：遺伝子工学 分子生物学 発生学

キーワード：脂肪体 NF-Y 脂質代謝 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

転写因子NF-Yは、CCAATボックス結合因子としても知られ、NF-YA、NF-YB、NF-YCの3つのサブユニットで構成される三量体として機能する。高等真核生物では組織特異的に発現する遺伝子から、ハウスキープ遺伝子まで幅広い遺伝子を制御すると言われていたが、個体内での機能についてはまだ良くわかっていない。申請者らは、DNA結合サブユニットであるNF-YA遺伝子導入ショウジョウバエ系統を樹立し、NF-Yが生体内でJNK経路とERK経路を制御することを世界に先駆けて明らかにした。また、申請者らはNF-YAをノックダウンした系統のRNA-seq解析を行った結果、特に代謝関連遺伝子の発現量が劇的に変化することを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、上述の背景とRNA-seqの結果に基づき遺伝学的な解析とショウジョウバエの脂肪体(Fat body)をモデルにした細胞生物学、発生学的な解析を行い、ショウジョウバエNF-Y (*Drosophila* NF-Y: dNF-Y)が制御する生体内の脂質代謝経路に関わる遺伝子群を同定し、それらの制御の仕組みを明らかにする。脂肪体はヒトでは肝臓に相当している。そこで本研究で得られた知見を基盤としてヒト肝機能解析のためのショウジョウバエモデルの構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究では当初、下記の3つの手法により解析を進めることとした。

- ショウジョウバエモデルを活用した個体レベルでの研究
- NF-YAが誘導する形態異常を増強または抑圧する突然変異のゲノムワイドスクリーニング
- ショウジョウバエ脂肪体をモデルにした脂質代謝関連遺伝子の制御機構の解明

a) 昆虫の脂肪体はヒトでは肝臓に相当する器官である。すでにカルフォルニア大学ロサンゼルス校のBanerjeeグループがショウジョウバエの造血組織Lymph glandを用いた解析においてショウジョウバエの3種の血球の分化の仕組みが遺伝子レベルでは哺乳動物と多くの部分が共通していることを見出しており、おそらく遺伝子のレベルでは脂肪体でも同様に共通しているのではないかと、というところに本研究は着想を得ている。ライフサイクルが10日と極めて短期間で成熟した個体が得られるショウジョウバエを使うことはこれまでよりも劇的な速度で研究を進めることを可能にする。また、ショウジョウバエの脂肪体の形成過程、関連遺伝子のネットワークの詳細はまだ研究例が初期胚、生殖幹細胞、複眼原基や翅原基の研究と比べて報告例が圧倒的に少なく、脂肪体をモデルにした遺伝子レベルでの解析はとくに高等真核生物の代謝に関する研究のブレイクスルーになる。脂肪体を用いた研究を進めるために、脂肪体における細胞、遺伝子発現マーカーを見出すことを目指した。

b) 表現型を指標にした個体レベルでの遺伝学的なスクリーニングはショウジョウバエモデルを用いるうえで最大のメリットの一つである。遺伝子突然変異系統が多数樹立され、大規模なストックセンターからそれらを容易に入手出来るうえ、ライフサイクルが早く個体が小さいゆえ一度に小さなスペースとコストで大量に取り扱うことが出来る。dNF-YAをノックダウンし形態異常を引き起こしたうえで、その表現型を指標にF1個体での遺伝子量の変化に伴う表現型の抑圧、増強を見だし、相互関連遺伝子の同定を行う。

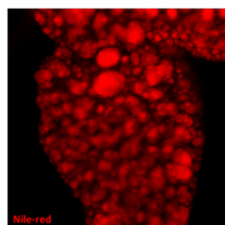
c) dNF-YAをノックダウンしたショウジョウバエ3令幼虫より抽出したRNAを用いたRNA-seq解析の結果、脂質代謝関連遺伝子の発現レベルが劇的に変化する傾向が見られている。このRNA-seqの結果と遺伝学的な交配による個体レベルでの表現型の変化を組み合わせることで標的遺伝

子を推測し脂肪体の代謝機能のメカニズムを解析するところが本研究の独創的なところである。本研究では上述のRNA-seqの結果より脂質代謝関連遺伝子の中でも遺伝子プロモーター領域に転写因子NF-Yが結合するCCAATボックスを含むコンセンサス配列(YYRCCAATCAG)をもつ遺伝子でなおかつ成虫の複眼の表現型を指標にした交配実験で相互作用が見られた*lipase 4* (*lip4*)遺伝子の発現制御メカニズムを解析する過程で、個体レベルでの解析において脂肪体を用いることで脂質代謝、ショウジョウバエ脂肪体の分子生物学的、細胞生物学的な手法を確立することを目的とした。

4. 研究成果

a) ショウジョウバエ脂肪体を用いた脂質の代謝の状態を解析するにあたって、脂質の蓄積量を調べるために Nile-Red 染色を用いて、脂肪体に蓄積されている油滴を検出した (図1)。

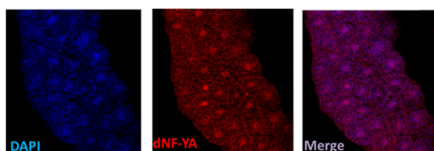
図1



脂肪体に蓄積されている脂質はNile-red染色で検出できる

脂肪体をNile-redで染色すると蓄積されている脂質が丸く油滴として検出できる

また、脂肪体における転写因子 NF-YA の局在を知るために dNF-YA を特異的に認識する抗 dNF-YA 抗体を用いて免疫染色を行った (図2)。dNF-YA は転写因子のサブユニットであり、核内への局在が予想されたが、核のみならず細胞骨格部分にも局在が見られ、転写因子としての機能以外の役割も示唆された。脂肪体は個々の細胞が大きくそれぞれが観察しやすい。また、蓄積されてる脂質の量を検出できるほか、飢餓



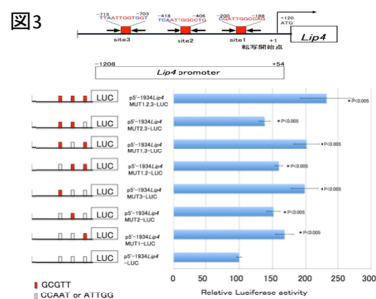
dNF-YAは脂肪体において核と細胞骨格部分に局在している

状態においての細胞の状態の変化を観察できる

ことも報告されている。脂肪体を研究モデルにした報告はショウジョウバエの成虫原基や他の組織と比べて報告例が少ないが、新たにマーカーとなる遺伝子群が同定できれば非常に興味深い研究モデルになる可能性は十分にある。

b) 遺伝学的な交配を用いた関連遺伝子のスクリーニングについては、脂肪体で dNF-YA をノックダウンすると2令幼虫で致死になることから、脂肪体特異的に dNF-YA をノックダウンした系統を樹立することはできなかった。本研究において標的として見出した *lip4* 遺伝子は *GMR-GAL4* 系統を用いた複眼原基での dNF-YA の表現型を抑圧する遺伝子として見出したことより、今後は複眼での表現型を指標にしたスクリーニングを検討している。

図3

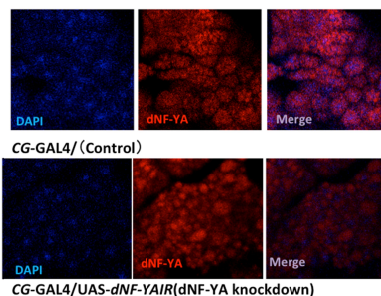


Lip4の上流にあるNF-Yコンセンサス配列に変異をいれると転写レベルが上昇する

Lip4遺伝子の上流にはNF-Yコンセンサス配列が3箇所存在する。Lip4上流のNF-Yコンセンサス配列に変異を導入してLuciferase Transient Assayを行なったところ転写活性が増大した。

c) dNF-YA を全身でノックダウンしたショウジョウバエを用いた RNA-seq の結果に基づき、ショウジョウバエの脂質代謝関連遺伝子の中で *lipase family* 遺伝子に着目した。4つある *lipase family* 遺伝子のうち *lip4* 遺伝子の上流域に

図4



CG-GAL4/ (Control)

CG-GAL4/UAS-dNF-YAIR(dNF-YA knockdown)

dNF-YAをKnockdownすると、油滴が小さくなる

dNF-YAをKnockdownした3令幼虫の脂肪体においては全体的に油滴の縮小がみられる

NF-Y が結合する可能性があるコンセンサス (YYRCCAATCAG) に類似した配列を 3 箇所見出した。これらの NF-Y 結合配列に変異を導入し、Luciferase transient assay によるプロモーター活性の測定を行ったところプロモーター活性が上昇することが分かった (図 3)。また、クロマチン免疫沈降法 (ChIP Assay) を用いて *lip4* 遺伝子上流域に NF-Y が結合しているかどうかを qPCR 法で定量的に解析した結果、この領域に結合していることを示す DNA の増幅はコンセンサスが存在しない領域と比べておよそ 6 倍強く見られた。

一方、GAL4-UAS 標的遺伝子発現システムを用いて、脂肪体特異的に NF-YA をノックダウンすると蓄積されている脂質が減少することがわかった (図 4)。

Luciferase transient assay によるプロモーター活性の測定の結果、および ChIP Assay の結果から、dNF-YA のノックダウンによる *lip4* 遺伝子の増強が脂質の代謝を促進している原因の一つと考えられる。現在行っている内在性の *lip4* 遺伝子の mRNA の発現量の解析結果を加えて、学術論文としての発表を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. NF-Y in invertebrates.

Yamaguchi, M., Ali, MS., Yoshioka, Y., Ly, LL.,

Yoshida, H.: *Biochim Biophys Acta*. 2017

May;1860(5):630-635. 2016. Review.

2. DREF plays multiple roles during *Drosophila* development.

Tue, NT., Yoshioka, Y., Mizoguchi, M., Yoshida,

H., Zurita M., Yamaguchi M.: *Biochim Biophys Acta*.

1860(6):705-712. 2017 Review.

[学会発表](計 4 件)

2015 年 日本分子生物学会年会 (神戸)

1. ショウジョウバエ転写因子 NF - Y による脂質代謝機構の解析

安西啓亮 吉岡 泰秀 平塚 賢 平藪 哲平

山口 政光

2. ショウジョウバエ転写因子 DREF による *Discs Large* 遺伝子の転写制御機構の解析

吉岡 泰秀 嶋路 耕平 山口 政光

2016 年 日本分子生物学会年会 (横浜)

1. ショウジョウバエ転写因子 NF - Y による脂質代謝機構の解析

吉岡 泰秀 安西 啓亮 平塚 賢 平藪 哲平

山口 政光

2017 年 日本分子生物学会年会 (神戸)

1. ショウジョウバエ転写因子 DREF による *Discs Large* 遺伝子の転写制御機構の解析

吉岡 泰秀 嶋路 耕平 山口 政光

[図書](計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

吉岡 泰秀 (YOSHIOKA, Yasuhide)

摂南大学・理工学部・生命科学科・助教

研究者番号：40572839

(2)研究分担者

山口 政光 (YAMAGUCHI, Masamitsu)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：00182460

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()