

細胞老化誘導のマスター制御遺伝子 **Pointed** の同定と  
それによるがん制御機構の解明

井藤 喬夫

## 目次

1. 要旨	-----	2
2. 序論	-----	3
3. 実験材料および方法	-----	5
4. 結果	-----	14
5. まとめと考察	-----	58
6. 参考文献	-----	62
7. 補遺（詳細な遺伝子型）	-----	68
8. 略語表	-----	77
9. 謝辞	-----	79



## 1. 要旨

細胞老化は細胞周期の不可逆的な停止を引き起こす現象であり、多細胞生物がもつ主要ながん防御バリアの 1 つと考えられている。例えば、がん遺伝子 Ras が活性化すると、細胞増殖シグナルが活性化する一方で、細胞老化が誘導され細胞周期停止へと向かうという、相反する現象が引き起こされる。したがって、Ras を活性化した腫瘍が進展し悪性化するには、細胞老化を回避する必要があると考えられる。しかし、Ras 活性化細胞がどのようなメカニズムを介して細胞老化を克服するかについては、依然として不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエをモデル生物として用い、がん進展の要因の 1 つとして知られる上皮細胞極性の崩壊によって Ras 誘導性の細胞老化が阻害され、これにより Ras 活性化腫瘍の悪性化進展が引き起こされることを見いだした。まず、ショウジョウバエ上皮組織に誘導した Ras 活性化細胞クローン (Ras 活性化腫瘍) を悪性化進展させる遺伝子変異の遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、ETS 転写活性化因子 Pointed (ETS1/2 ホモログ分子) の遺伝子変異により Ras 活性化腫瘍の増殖が強く促進されることを見いだした。Pointed は Ras 活性化によって発現誘導され、その発現を Ras 活性化腫瘍の中で抑制すると細胞老化が阻害されることで腫瘍増殖が顕著に亢進することがわかった。一方、Pointed を単独で強制発現させた細胞クローンでは細胞老化が誘導された。つまり、Pointed は Ras シグナルによる細胞老化誘導に必要十分な下流因子であることがわかった。さらなる遺伝学的解析により、極性が崩壊した Ras 活性化腫瘍内で活性化する転写共役因子 Yorkie (がん抑制経路 Hippo 経路の下流の YAP ホモログ分子) の働きによって Pointed の発現が抑制され、これにより細胞老化が阻害されることがわかった。そのメカニズムとして、活性化した Yorkie により誘導される microRNA *bantam* が E3 ligase 会合タンパク質 Tribbles の mRNA を標的にしてその発現を抑制し、これにより Tribbles により発現抑制されている転写因子 FoxO の発現が上昇することがわかった。さらに、この FoxO が *pointed* mRNA を標的とする microRNA である *miR-9c* および *miR-79* の発現を誘導し、その結果 Pointed の発現が抑制されることがわかった。本研究成果は、Ras 活性化腫瘍がいかにして細胞老化を克服し、悪性腫瘍へと進展していくのかを説明する新たなメカニズムを提示するものである。本メカニズムに関わる因子群の進化的保存性の高さから、本成果が新たながん治療戦略の基盤構築につながることを期待される。

## 2. 序論

がん遺伝子 Ras の活性化は腫瘍形成初期に起こる主要なイベントの 1 つであり、Ras シグナルは細胞増殖を促進することによって腫瘍形成・増殖の駆動力となる<sup>1,2</sup>。しかし、Ras 活性化だけでは悪性腫瘍を引き起こすには至らず、増殖速度の遅い良性腫瘍が形成されることが知られている。なぜならば、逆説的に、Ras 活性化に応じて、内在性のがん防御バリアである細胞老化が生じるからである。細胞老化とは、がん原性ストレスをはじめとする様々な細胞内ストレスが引き金となり、p16 や p21 などの Cyclin-dependent kinase (CDK) 阻害因子の働きによって誘導される、不可逆的な細胞周期停止状態を指す<sup>3-7</sup>。これにより、Ras 誘導性の腫瘍増殖は制限されるのである。したがって、細胞老化を克服することは、Ras 活性化腫瘍にとって悪性化への重要なステップであると言える。実際、ヒト培養細胞やマウスを用いた過去の研究によって、p16、p53、または Rb といった細胞老化制御遺伝子における変異が、Ras 活性化細胞・腫瘍を悪性転換させることが報告されている<sup>8-12</sup>。加えて、このような遺伝子変異がヒトのがんにおいても生じることが報告されている<sup>13-16</sup>。しかしながら、必ずしも細胞老化制御遺伝子に変異が生じるわけではなく、そのような場合に Ras 活性化腫瘍がどのように細胞老化を克服するのか、またそこに普遍的なメカニズムが存在するかどうかは不明である。

上皮細胞極性の崩壊はがんの一般的な表現型として知られる<sup>17-19</sup>。注目すべきことに、この表現型自体が Ras 活性化腫瘍の悪性化を引き起こす原因であることがショウジョウバエをモデルとした研究により明らかにされた<sup>20,21</sup>。さらに、その後の哺乳類をモデルとした研究により、この現象が哺乳類においても進化的に保存されていることも示されている<sup>18,19</sup>。よって、細胞極性の崩壊は Ras 活性化腫瘍細胞にとって共通の悪性化因子であると考えられるが、極性崩壊による腫瘍の悪性化進展が細胞老化の阻害によるものかどうかは依然として明らかにされていない。

上皮細胞極性の崩壊と同様に、ヒトのがんにおいて頻繁に観察されるのが、がん原性因子 YAP の活性化である<sup>22,23</sup>。YAP は進化的に保存されたがん抑制経路 Hippo 経路のエフェクターであり、Hippo 経路は、細胞増殖の促進と細胞死の抑制をもたらす YAP を不活性化することによって組織の恒常性を維持している<sup>22</sup>。YAP の活性レベルは腫瘍悪性度および予後と相関することが知られる<sup>22,23</sup>。ただし、YAP 活性化単独では悪性腫瘍の形成には不十分であることが報告されており<sup>23-26</sup>、このことから YAP は他の因子と協調的に働くことによって腫瘍の悪性化進展を駆動すると考えられる。注目すべきこと

に、複数のマウスのがんモデルにおいて、YAP は Ras と協調的に腫瘍悪性を駆動することが報告されているが<sup>23,26-29</sup>、しかしながら、細胞老化との関係をはじめとしてそのメカニズムには不明な点が多い。

本研究において、ショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを通じて、ETS 転写活性化因子 Pointed (Pnt : ETS1/2 ホモログ) が Ras 下流で働く細胞老化誘導のマスター制御遺伝子であり、Pnt が細胞老化の誘導によって Ras 活性化腫瘍の増殖抑制をもたらすことを見いだした。ショウジョウバエにおいて、Ras 活性化によりいくつかの細胞老化の表現型が誘導されることは報告されていたが<sup>30</sup>、これまでその制御機構は未解明であった。私は、さらなる遺伝学的解析により、これまで明らかにされていなかった、上皮細胞極性の崩壊による細胞老化の阻害を介した腫瘍の悪性化進展メカニズムを明らかにした。具体的には、Ras 活性化腫瘍細胞において遺伝子変異により上皮細胞極性の崩壊を引き起こした場合に、極性崩壊に応じて活性化した Yorkie (Yki : YAP ホモログ) が複数の microRNA の誘導を介した新たなシグナル伝達ネットワーク制御によって Pnt の発現を抑制し、それにより Ras 誘導性の細胞老化を阻害、そして腫瘍増殖を駆動することがわかった。

### 3. 実験材料および方法

#### 3-1. ショウジョウバエ遺伝学

ショウジョウバエ三齢幼虫の複眼-触角成虫原基に蛍光タンパクで標識した体細胞クローンを誘導するために、Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM)法<sup>31-33</sup>を用いた。なお、このMARCM法において、Gal4/UASシステム(使用した主な系統:*TubGal80*, *FRT19A/40A*, *eyFLP5/6*, *Act>y<sup>+</sup>>Gal4*, *UAS-GFP<sup>S65T</sup>/UAS-His2Av-mRFP1*) またはQF/QUASシステム(使用した主な系統:*TubQS*, *FRT19A*, *eyFLP5*, *ET40-QF*, *QUAS-mtdTomato*)のいずれかを使用した(図1)。一方で、ショウジョウバエ三齢幼虫の翅原基の後部コンパートメントにおける*UAS-His2Av-mRFP1*を含む導入遺伝子の発現の誘導には、*hh-Gal4*を用いた。本研究で使用した他の系統は以下の通り。*UAS-Ras85D<sup>V12</sup>*(T. Xu博士より恵与)、*Df(3R)Exel9012*(Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) #7990)、*pnt<sup>488</sup>*(*Drosophila* Genetics and Genetic Resources (DGGR) #106100)、*UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup>*(BDSC #35038)、*UAS-PntP1*(BDSC #869)、*UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>*(Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC) #105390)、*pnt<sup>HS20</sup>*(*pntP1-lacZ*)(B. Z. Shilo博士より恵与)、*pnt<sup>1277</sup>*(*pntP2-lacZ*)(BDSC #837)、*dap<sup>04454</sup>*(*dap-lacZ*)(BDSC #11377)、*UAS-Fly-FUCCI*(BDSC #55122)、*UAS-dap-RNAi<sup>#1</sup>*(BDSC #36720)、*UAS-dap-RNAi<sup>#2</sup>*(BDSC #64026)、*RFP-HPI*(BDSC #30562)、*lgI<sup>4</sup>*(BDSC #36289)、*dlg<sup>m52</sup>*(S. Goode博士より恵与)、*UAS-Hpo*(BDSC #44254)、*UAS-Yki<sup>S168A</sup>*(BDSC #28836)、*UAS-bantam-SP*(S. M. Cohen博士より恵与)、*UAS-bantam-C*(BDSC #60672)、*bantam<sup>L1170a</sup>*(*bantam-lacZ*)(BDSC #10154)、*UAS-erk-RNAi<sup>#1</sup>*(VDRC #43123)、*UAS-Dcr2*(BDSC #24651)、*UAS-akt-RNAi<sup>#1</sup>*(BDSC #31701)、*UAS-FoxO*(BDSC #9575)、*UAS-foxO-RNAi<sup>#1</sup>*(National Institute of Genetics stock center (NIG) #HMS00422)、*UAS-erk-RNAi<sup>#2</sup>*(NIG #HMS00173)、*UAS-akt-RNAi<sup>#2</sup>*(NIG #HMJ21422)、*UAS-foxO-RNAi<sup>#2</sup>*(BDSC #32993)、*UAS-Trbl*(BDSC #58493)、*UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>*(BDSC #42523)、*UAS-Yki<sup>WT</sup>*(BDSC #28819)、*trbl<sup>NP3530</sup>*(*trbl-Gal4<sup>#1</sup>*)(DGGR #113328)、*trbl<sup>NP0940</sup>*(*trbl-Gal4<sup>#2</sup>*)(DGGR #112409)、*QUAS-Ras85D<sup>V12</sup>*、*UAS-miR-9c-SP*(BDSC #61376)、*UAS-miR-79-SP*(BDSC #61387)、*UAS-miR-9c*(BDSC #41139)、*UAS-miR-79*(BDSC #41145)。

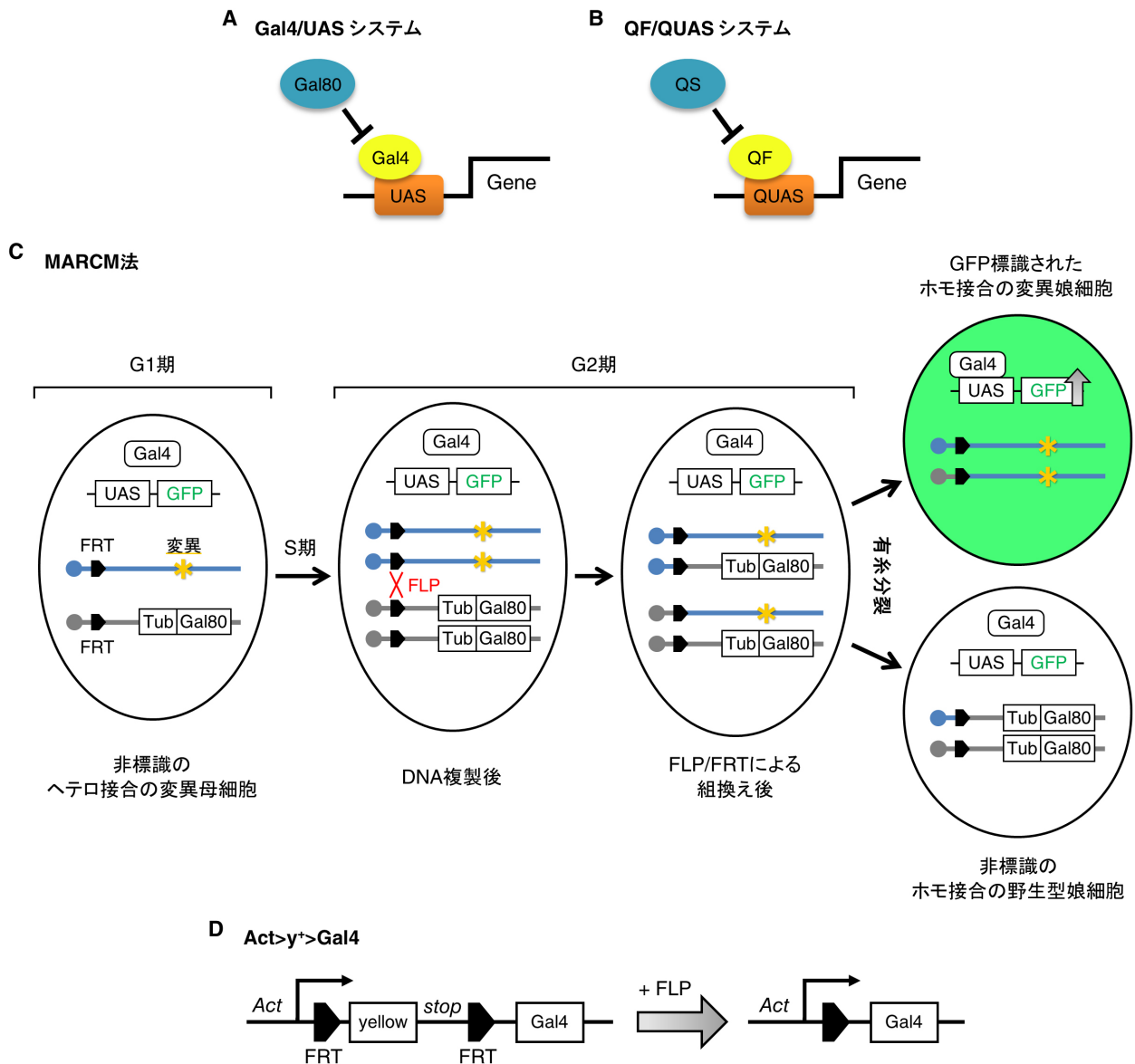


図1 ショウジョウバエ遺伝学

(A) Gal4/UAS システムとは酵母由来の転写因子 Gal4 とその標的配列 UAS (Upstream activating sequence) を利用した遺伝子発現システムである。UAS 下流に目的とする遺伝子を挿入することによって、その遺伝子を強制的に発現誘導させることができる。Gal4 の抑制因子として Gal80 が存在。(B) QF/QUAS システムとはアカパンカビ由来の転写因子 QF とその標的配列 QUAS (QF upstream activating sequence) を利用した遺伝子発現システムである。QUAS 下流に目的とする遺伝子を挿入することによって、その遺伝子の強制発現が可能。QF の抑制因子として QS が存在。QF/QUAS システムは、Gal4/UAS システムとは由来が異なるため、Gal4/UAS システムに対して干渉しない。(C) MARCM 法。体細胞組換えの原理を応用した、遺伝的背景の異なる体細胞クローンをモザイク状に組織内に誘導する方法として遺伝的モザイク法が知られるが、MARCM 法とは、この手法に Gal4/UAS システムおよび Gal80 (もしくは QF/QUAS システムおよび QS) を取り入れたシステムを指す。MARCM 法に必要な他のツールは次の通り。

(1) FLP/FRT 組換えシステム：酵母由来の組換え酵素 FLP (Flippase) とその認識配列 FRT (FLP recognition target) を利用した、部位特異的組換えを強制的に誘導できるシステム。組織特異的なプロモーターを利用した FLP の発現制御により、特定の組織にモザイククローンを誘導可能。本研究では、ショウジョウバエの複眼-触角原基特異的に活性化する *eyeless (ey)* という遺伝子のプロモーター活性を利用した (*eyFLP*)。

(2) 細胞標識マーカー：クローン細胞の可視化に必要であり、本研究では、蛍光タンパク遺伝子 GFP (もしくは RFP) を UAS 下流に挿入して使用した (UAS-GFP)。

図に、GFP 標識した、目的の遺伝子変異がホモ接合になるクローンを誘導する場合のスキームを示す。ある相同染色体の片方に FRT と変異、そしてもう片方の相同染色体には FRT (同じ位置) と TubGal80 (Tubulin(Tub)プロモーター下流に Gal80 を挿入した導入遺伝子) を有する個体を用意する。他のゲノム上には、Gal4、UAS-GFP、そして FLP (*eyFLP*) が乗っているものとする。細胞分裂前の G1 期の段階では、母細胞はヘテロ変異を有し、かつ GFP で標識されていない。UAS-GFP が機能していないのは、TubGal80 によりユビキタスに発現した Gal80 によって Gal4 の働きが抑制されているためである。しかし、DNA 複製後に FLP/FRT による体細胞組換えが起こると、TubGal80 をもたない、GFP 標識されたホモ接合の変異娘細胞と、TubGal80 を 2 コピーもつ、標識されていないホモ接合の野生型娘細胞が形成される。ただし、*eyFLP* による組換えは、複眼-触角原基中のすべての増殖細胞において起こるわけではなく、一部の細胞はヘテロ接合のままである。UAS-GFP に加えて、さらなる UAS 遺伝子 (UAS 下流に目的の遺伝子や RNAi 配列を挿入したもの) を組み合わせることによって、過剰発現やノックダウンなど様々な遺伝子操作を GFP 標識細胞に対して特異的に行うことができる。(D) *Act>y<sup>+</sup>Gal4* とは、Actin (Act) プロモーター下流に、野生型の *yellow (y)*:体色を制御する遺伝子) と終止コドン (stop) を FRT で挟んだものを挿入し、さらにその下流に Gal4 を挿入した導入遺伝子である。FLP 活性に応じて、組換えによって FRT で挟まれた部分が排除され、*ActGal4* が形成される。*eyFLP* と組み合わせることによって、複眼-触角原基という特定の組織において遺伝子操作を行うことが可能になる。

### 3-2. 免疫染色

解剖した組織を 4% Paraformaldehyde (PFA) in Phosphate buffer (PB) で固定 (氷上 5 分間、室温 20 分間) した後、0.1% Triton-X in Phosphate buffered saline (PBS) (PBT) で振とう洗浄 (室温 15 分間) を 3 回行った。そして、5% donkey serum in PBT でブロッキング処理 (振とう、室温 30 分間) を行った後、一次抗体液中で 4°C にて一晩反応させた。使用した一次抗体は以下の通り。rabbit anti-PntP1 polyclonal antibody (J. B. Skeath 博士より恵与、1000 倍希釈)、rabbit anti- $\beta$ -galactosidase polyclonal antibody (855976; MP Biomedical、1000 倍希釈)、rabbit anti-phospho-Histone H3 (Ser10) polyclonal antibody (9701; Cell Signaling Technology、100 倍希釈)、rabbit anti-Histone H3 (tri methyl K9) polyclonal antibody (ab8898; Abcam、50 倍希釈)、Alexa647-conjugated phalloidin (A22287; Invitrogen、50 倍希釈)、chicken anti- $\beta$ -galactosidase polyclonal antibody (ab9361; Abcam、1000 倍希釈)、rabbit anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) monoclonal antibody (4370; Cell Signaling

Technology、100 倍希釈、Can Get Signal Immunostain Solution A (TOYOBO) 使用)、rabbit anti-phospho-dAkt (S505) polyclonal antibody (4054; Cell Signaling Technology、200 倍希釈)、rabbit anti-dFoxO antiserum (W. J. Lee 博士より恵与、2000 倍希釈)。

次に、PBT で振とう洗浄(室温 30 分間)を 4 回行った後、5% donkey serum in PBT でブロッキング処理(振とう、室温 30 分間)を行い、二次抗体液中で室温にて 2 時間振とう反応させた。使用した二次抗体は Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (A21244; Invitrogen、250 倍希釈)または Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-chicken IgG (H+L) antibody (A21449; Invitrogen、250 倍希釈)。そして、PBT で振とう洗浄(室温 30 分間)を 4 回行った後、SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) で封入した。画像の取得には主に共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を使用したが、図 10 の画像取得に関しては共焦点レーザー顕微鏡 LSM880 (Zeiss) を使用した。

### 3-3. SA- $\beta$ -gal 染色

Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal)活性の検出において、 $\beta$ -galactosidase の基質として X-Gal または SPiDER- $\beta$ Gal (SG02; Dojindo) のいずれかを用いた。X-Gal を用いた SA- $\beta$ -gal 活性の検出には、Senescent Cells Histochemical Staining Kit (CS0030; Sigma)を使用した。まず、解剖した組織を 1x Fixation solution で固定(室温 15 分間)した後、PBS で振とう洗浄(室温 10 分間)を 3 回行った。次に、X-Gal を含む 1x Staining Mixture 中で 37°Cにて 4 日間反応させた後に、PBS で振とう洗浄(室温 10 分間)を 3 回行い、最後に SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen)で封入した。画像の取得には実体顕微鏡 DFC 310 FX (Leica) とデジタルカラーカメラ DFC 310 FX (Leica) を用いた。

一方で、SPiDER- $\beta$ Gal を用いた SA- $\beta$ -gal 活性の検出には、まず、解剖した組織を 4% PFA in PB で固定(氷上 5 分間、室温 20 分間)した後、PBS で振とう洗浄(室温 15 分間)を 3 回行った。次に、SPiDER- $\beta$ Gal working solution (SPiDER- $\beta$ Gal DMSO stock solution を 5 倍希釈 McIlvaine buffer pH 6.0(蒸留水で希釈)で 1000 倍希釈したもの) 中で 37°Cにて 2 時間振とう反応させた後、PBS で振とう洗浄(室温 10 分間)を 3 回行い、最後に SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) で封入した。画像の取得には共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を用いた。

### 3-4. EdU 染色

細胞周期 S 期の細胞の検出を目的として、Click-iT<sup>®</sup> EdU Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Imaging Kit (C10340; Invitrogen) を用いて下記の手順で EdU 染色を行った。この方法は、ヌクレオチドチミジンの類似体である 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) が S 期の DNA 合成時に取り込まれることを利用したものである。まず、Schneider's medium 中で解剖した組織を 10  $\mu$ M EdU in Schneider's medium 中で室温にて 10 分間反応させ、Schneider's medium で振とう洗浄（室温 5 分間）を 1 回行った。次に、3% bovine serum albumin (BSA) in PBS で振とう洗浄（室温 5 分間）を 2 回行った後、4% PFA in PB で固定（室温 20 分間）を行い、再度 3% BSA in PBS で振とう洗浄（室温 20 分間）を 2 回行った。そして、PBT で膜透過処理（振とう、室温 20 分間）、3% BSA in PBS で振とう洗浄（室温 15 分間）を 2 回行った後に、Click-iT<sup>™</sup> reaction cocktail 中で室温にて 30 分間振とう反応させた。さらに、3% BSA in PBS で振とう洗浄（室温 15 分間）を 3 回行った後、chicken anti-GFP polyclonal antibody (GFP-1010; AVES labs、1000 倍希釈) を用いて基本的手順で免疫染色を行った。最後に SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) で封入を行い、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を用いて画像の取得を行った。

### 3-5. 3'UTR sensor 導入ショウジョウバエ系統の作成

#### 1. *trbl* 3'UTR sensor 導入系統の作成

変異なしの *trbl* 3'UTR (*trbl* 3'UTR<sup>WT</sup>) はショウジョウバエ成虫 (w<sup>1118</sup> 系統) から採取したゲノム DNA を鋳型に下記の Primer を用いて PCR により作成した。

Forward primer: 5'-ATCGGCCGTTGGAGCTCGTGGAGTCAC-3'

Reverse primer: 5'-CCGCTCGAGCTTGGTGAGATCAAATTTCAATG-3'

一方で、microRNA *bantam* の標的サイトを欠損させた *trbl* 3'UTR (*trbl* 3'UTR<sup>*Δbantam*</sup>) の作成には、下記の Primer を用いて PCR により作成した。

Forward primer: 5'-ATCGGCCGTTGGAGCTCGTGGAGTCACC-3'

Reverse primer: 5'-CCGCTCGAGTGTATTATGTTCTTTTTTGCAATTTTCAC-3'

これら 2 種類の *trbl* 3'UTR は制限酵素 XhoI と EagI により切断後、XhoI と NotI の制限酵素サイトを介して control sensor plasmid (pCaSpeR4-tubulin promoter (tubP)-EGFP、M. Milán 博士より恵与) に導入した。これらの plasmid DNA を精製後、BestGene Inc. (Chino Hills, CA, USA) に送り、w<sup>1118</sup> 系統に対する遺伝子導入 (P 因子というトランスポ



ゾンを利用)を依頼した。

## 2. *pnt* 3'UTR sensor 導入系統の作成

変異なしの *pnt* 3'UTR (*pnt* 3'UTR<sup>WT</sup>) はショウジョウバエ成虫 (w<sup>1118</sup> 系統) から採取したゲノム DNA を鋳型に下記の Primer を用いて PCR により作成した。

Forward primer: 5'-TAAGCGGCCCGCCAGCGGAGCAGCGGAGAAG-3'

Reverse primer: 5'-CCGCTCGAGCATATTGGCTTTCTTTTATTGTTTTTATC-3'

一方で、microRNA *miR9c* または *miR-79* の標的サイトを欠損させた *pnt* 3'UTR (*pnt* 3'UTR<sup>*ΔmiR-9c*</sup> または *pnt* 3'UTR<sup>*ΔmiR-79*</sup>) の作成には、*pnt* 3'UTR<sup>WT</sup> sensor plasmid (pCaSpeR4-tubP-EGFP-*pnt* 3'UTR<sup>WT</sup>) を鋳型に下記の Primer を用いて Overlap extension PCR<sup>34</sup> により作成した。

・ *pnt* 3'UTR<sup>*ΔmiR-9c*</sup> の作成に使用した Primer

Forward flanking primer: 5'-TGCAGGTTCGACCTCGAGC-3'

Reverse flanking primer: 5'-CAAAGACCCCAACGAGAAGC-3'

Forward deletion primer: 5'-GGAGTCAGGAGTACTTAGGGGTTG-3'

Reverse deletion primer: 5'-CAACCCCTAAGTACTCCTGACTCC-3'

・ *pnt* 3'UTR<sup>*ΔmiR-79*</sup> の作成に使用した Primer

Forward flanking primer: 5'-TGCAGGTTCGACCTCGAGC-3'

Reverse flanking primer: 5'-CAAAGACCCCAACGAGAAGC-3'

Forward deletion primer: 5'-GGTAGCTGCTTAACATCACGCTTG-3'

Reverse deletion primer: 5'-CAAGCGTGATGTTAAGCAGCTACC-3'

これら 3 種類の *pnt* 3'UTR は制限酵素 XhoI と NotI により切断後、XhoI と NotI の制限酵素サイトを介して control sensor plasmid (pCaSpeR4-tubP-EGFP) に導入した。これらの plasmid DNA を精製後、BestGene Inc. (Chino Hills, CA, USA) に送り、w<sup>1118</sup> 系統に対する遺伝子導入 (P 因子を利用) を依頼した。

## 3-6. anti-Trbl 抗体の作成とウエスタンブロッティング

Polyclonal anti-Trbl antiserum は抗原ペプチド (CKKEFPNAKMLQTIREK) を使用してウサギの体内で作成した (Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan) に依頼)。

ショウジョウバエ成虫の頭部 (1 サンプルにつき、15 匹の雄個体と 15 匹の雌個体を

使用) を 2x SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 2% SDS, 0.032% bromophenol blue) 中で破碎・溶解した。この溶解液に 2-mercaptoethanol (終濃度: 5%) を添加後、95°C で 5 分間煮沸、遠心分離 (500g, 20°C, 1 min) を行った後、上清をサンプルとした。各サンプルを SDS-PAGE (分離ゲルのアクリルアミド濃度: 12.5%) した後、PVDF 膜に転写した。この PVDF 膜を 0.3% skim milk in TBS with 0.1% Tween 20 (TBST) 中でブロッキング処理 (振とう、室温 60 分間) した後、一次抗体液 (rabbit anti-Trbl antiserum (1:1000) diluted in Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO)) と 4°C にて一晩反応させた。次に、TBST で振とう洗浄 (室温 10 分間) を 1 回行った後、二次抗体液 (anti-rabbit secondary HRP-conjugated antibody (7074; Cell Signaling Technology, 1:5000) diluted in Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO)) と室温にて 60 分間反応させた。そして、TBST で振とう洗浄 (室温 10 分間) を 1 回行った後、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque; 02230-30) を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) により目的のバンドの撮影を行った。撮影後、この PVDF 膜を TBST で振とう洗浄 (室温 10 分間) を 2 回行った後、15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS と室温にて 30 分間反応させ、HRP の不活性化を行った。TBST で振とう洗浄 (室温 5 分間) を 3 回行った後、0.3% skim milk in TBST 中でブロッキング処理 (振とう、室温 60 分間) を行い、そして上記と同様の手順で、一次抗体 (mouse anti-Tubulin monoclonal antibody (T5168; Sigma-Aldrich, 1:2000) ) および二次抗体 (anti-mouse secondary HRP-conjugated antibody (7076; Cell Signaling Technology, 1:10000)) と反応させ、発光・撮影を行った。

### 3-7. Fluorescence in situ hybridization

0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理 PBS 中で解剖した組織を 4% PFA in PBS (09154-14; Nacalai Tesque) で固定 (室温 20 分間、氷上 5 分間) した後、methanol 中で -25°C にて 5 分間反応させた。ethanol で 2 回すすいだ後、xylene と ethanol の混合液 (1:1) で透徹 (氷上 1 時間) を行い、ethanol の希釈系列 (100%、80%、50%、25% ethanol) と 0.1% DEPC 処理滅菌水を用いて氷上で水和させた (各 5 分間ずつ)。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1% DEPC 処理 PBS 中で振とう反応 (室温 15 分間) を 2 回行うことにより内在性の peroxidase 活性を失活させた後、0.1% DEPC 処理 0.1% Tween-20 in PBS で振とう洗浄 (室温 10 分間) を 3 回行い、80% acetone in 0.1% DEPC 処理滅菌水で膜透過処理 (-25°C 10 分間) を行った。0.1% DEPC 処理 0.1% Tween-20 in PBS で洗浄 (氷上 5 分間) を 2 回行った

後、4% PFA in PBS で2回目の固定（室温 20 分間）を行い、再度 0.1% DEPC 処理 0.1% Tween-20 in PBS で振とう洗浄（室温 15 分間）を3回行った。そして、1x microRNA ISH buffer (Exiqon) 中で振とう反応（54°C 20 分間）を行った後、下記の miRCURY DIG-labeled LNA probe (Exiqon) (40 nM) を用いてハイブリダイゼーション（振とう、54°C 1 時間）を行った（LNA probe は 1x microRNA ISH buffer に溶解させて使用）。

- miRCURY DIG-labeled LNA probe for *dme-miR-9c-5p* (339111 YD00619512-BCG; Exiqon, 5'DIG-TCTACAGCTAGAATACCAAAGA-3'DIG)

- miRCURY DIG-labeled LNA probe for *dme-miR-79-3p* (339111 YD00619583-BCG; Exiqon, 5'DIG-ATGCTTTGGTAATCTAGCTTTA-3'DIG)

次に、5x standard saline citrate (SSC)で振とう洗浄（54°C 10 分間）を1回行った後、20 µg/ml RNase A in RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA、500 mM NaCl、0.1% Tween-20) 中で振とう反応（室温 10 分間）を行い、SSC の希釈系列（1x、0.2x SSC）で振とう洗浄（54°C 各 10 分間）を行った。そして、TNB buffer (100 mM Trizma base、150 mM NaCl, pH 7.5) でブロッキング処理（振とう、室温 30 分間）を行った後、一次抗体液中で 4°C にて一晩反応させた。使用した一次抗体は sheep anti-DIG-POD polyclonal antibody (11207733910; Roche、500 倍希釈) と chicken anti-GFP polyclonal antibody (GFP-1010; AVES labs、1000 倍希釈) であり、これらを TNB buffer に溶解させて使用した。さらに、PBT で振とう洗浄（室温 30 分間）を4回行った後に、TNB buffer でブロッキング処理（振とう、室温 30 分間）、二次抗体液中で振とう反応（室温、2 時間）させた。この二次抗体反応では、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-chicken IgG (H+L) antibody (A11039; Invitrogen, 1:500)に加え、TSA plus Cyanine 5 (PerkinElmer, 1:50) も使用し、これらを 1x Plus Amplification Diluent (PerkinElmer) (0.1% Tween-20 を添加) に溶解させた。最後に、PBT で振とう洗浄（室温 30 分間）を4回行った後、SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) で封入した。画像の取得には共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を用いた。

### 3-8. 定量化と統計解析

統計解析は Excel (Microsoft) と BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。複眼-触角原基内の GFP 標識クローンの相対体積は Imaris (Bitplane, Zurich, Switzerland) を用いて定量化したデータをもとに算出した。

複眼-触角原基内の GFP 標識クローン内における各シグナル（免疫染色, SA- $\beta$ -gal 活性 (SPiDER- $\beta$ Gal 染色)、または *miR-9c/79* 染色) の相対値は ImageJ/Fiji (National Institutes of Health) を用いて定量化したデータをもとに算出した。この過程において、蛍光標識クローン内の単位面積当たりのシグナル値から、原基外部のバックグラウンドシグナル値（単位面積当たり）を減算した。触角原基内の Fly-FUCCI 標識クローン内における各細胞周期 (G1/S/G2/M) の細胞の割合は ImageJ/Fiji を用いて定量化したデータをもとに算出した。この解析において定量化したデータの種類は次の通り。

- GFP-E2F1<sub>1-230</sub>- positive area
- RFP-NLS-CycB<sub>1-266</sub>-positive area
- GFP-E2F1<sub>1-230</sub>/RFP-NLS-CycB<sub>1-266</sub>-double positive area
- PH3-positive area in GFP-E2F1<sub>1-230</sub>/RFP-NLS-CycB<sub>1-266</sub>-double positive area
- PH3-positive area in GFP-E2F1<sub>1-230</sub>-positive but RFP-NLS-CycB<sub>1-266</sub>-negative area

複眼-触角原基内の GFP 標識クローン内における SA- $\beta$ -gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合は ImageJ/Fiji (Color Threshold を使用) を用いて定量化したデータをもとに算出した。複眼原基内の GFP 標識クローン細胞の相対サイズは ImageJ/Fiji (Volumest plugin を使用) を用いて定量化したデータをもとに算出した。ウェスタンブロッティングによる Trbl 抗体のプロットの相対的シグナル値は ImageJ/Fiji を用いて定量化したデータをもとに算出した。この過程において、バックグラウンドシグナル値で標準化した上で、Trbl 抗体のプロットのシグナル値を Tubulin 抗体のプロット (ローディングコントロール) のシグナル強度で除算した。複眼-触角原基内における、*pnt* 3'UTR sensor の GFP の蛍光強度比 (RFP 標識クローン内/ RFP 標識クローン外) は ImageJ/Fiji を用いて定量化したデータをもとに算出した。全ての結果は、少なくとも 3 回以上の独立した実験によって得られたものである。全ての棒グラフのエラーバーは標準偏差を示す。全てのデータの検定において、 $p < 0.05$  を有意水準と定め、2 標本比較の場合は Mann-Whitney *U* 検定を行い、一方で、多重比較の場合には Kruskal-Wallis 検定を実行後 Steel-Dwass 検定もしくは Steel 検定を行った。サンプル数を含むその他の情報は各図の説明文中に記載した。

## 4. 結果

### 4-1. Pnt は Ras 誘導性の腫瘍増殖を阻害するがん抑制遺伝子である

Ras 活性化腫瘍の悪性化進展メカニズムの解明を目的として、私はショウジョウバエ遺伝学を用いて、Ras 活性化と協調して腫瘍の悪性化進展を駆動する遺伝子変異のスクリーニングを行った (図 2)。

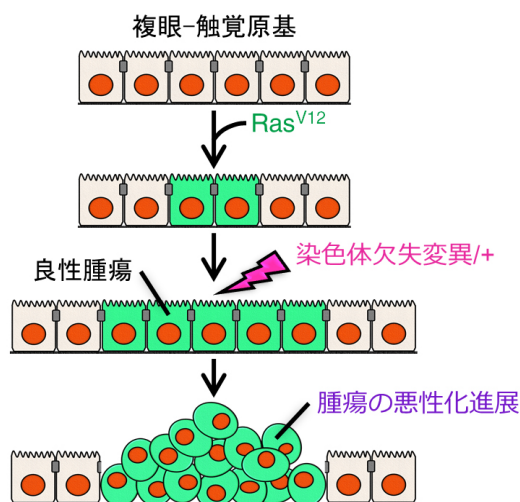
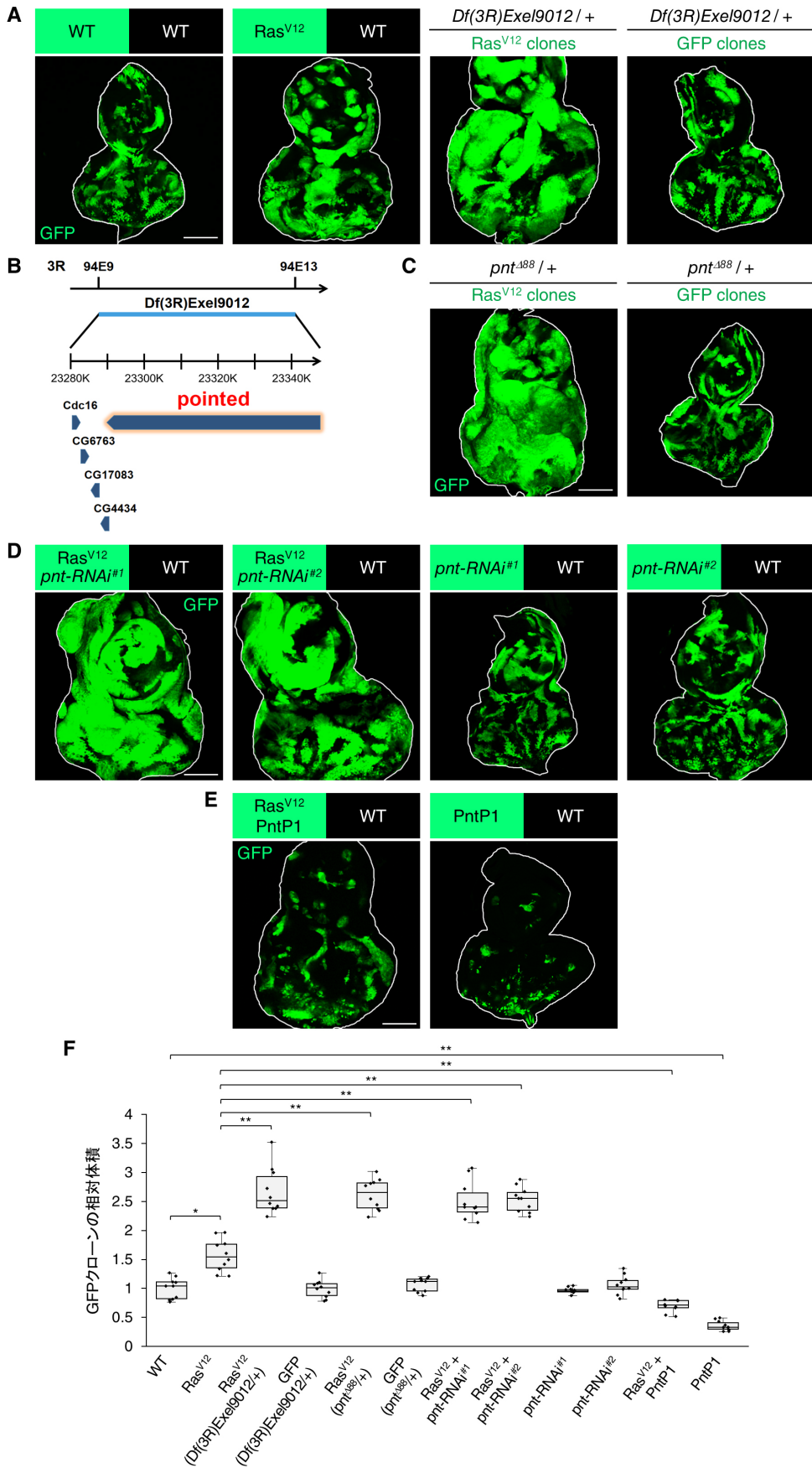


図 2 腫瘍の悪性化進展を引き起こす遺伝子変異のスクリーニング

染色体の一部が欠損した、一連の染色体欠失変異系統 (第三染色体) を利用して、Ras 活性化腫瘍を悪性化進展させる遺伝子変異を探索した。ショウジョウバエの複眼-触角原基という単層の上皮組織に、MARCM 法によって、活性化 Ras (Ras<sup>V12</sup>) を過剰発現する体細胞クローンをモザイク状に誘導した。この Ras<sup>V12</sup> クローンは良性腫瘍を形成する。この組織に染色体欠失変異をヘテロで導入し、Ras 誘導性の腫瘍増殖を促進する変異を網羅的に探索した。遺伝子変異の腫瘍増殖に対する影響の評価は三齢幼虫において行った。

具体的には、Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) 法<sup>31</sup>を用いて、ショウジョウバエ三齢幼虫の複眼-触角成虫原基の上皮組織に、GFP で標識した、がん原性 Ras (Ras<sup>V12</sup>) を過剰発現する体細胞クローンを誘導した。この体細胞クローンは野生型細胞には見られない過剰な増殖を行い、良性腫瘍を形成した (図 3A, F)。さらに、この上皮組織に、染色体の一部が欠失した一連の染色体欠失変異をヘテロで導入することにより、Ras 活性化腫瘍を悪性化進展させる変異を網羅的に探索した。その結果、図 3B に示す第 3 染色体右腕の一部の領域をヘテロで欠失させた場合 (*Df(3R)Exel9012/+*)、野生型細胞の増殖には影響しない一方で、Ras 活性化腫瘍細胞の増殖が強力に促進され

た (図 3A, F)。そこで、責任遺伝子同定を目的として、この染色体欠失領域 (*Df(3R)Exel9012*) に含まれる遺伝子の解析を行ったところ、興味深いことに、進化的に高度に保存された、ETS ファミリーに属する転写活性化因子である *pointed (pnt)*<sup>35</sup> を責任遺伝子として同定した (図 3B)。*Pnt* は *Ras* シグナルの下流エフェクターとして機能することが知られている。*pnt* の機能欠失変異をヘテロで導入した場合に、*Ras* 誘導性の腫瘍増殖が強力に促進され (図 3C, F)、さらに *Ras*<sup>V12</sup> 発現細胞クローン内で *pnt* の発現を RNAi によりノックダウンした場合にもその腫瘍増殖が強力に促進された (図 3D, F)。一方で、野生型細胞の増殖に対しては、*pnt* ヘテロ欠失もしくは *pnt* ノックダウンのいずれの場合も影響しなかった (図 3C, D, F)。逆に、*Ras*<sup>V12</sup> 発現細胞クローン内で *Pnt* の活性型アイソフォームである *PntP1*<sup>36</sup> を過剰発現させた場合には、その腫瘍増殖が強力に抑制された (図 3E, F)。したがって、これらの結果より、*Pnt* が *Ras* 誘導性の腫瘍増殖を阻害するがん抑制遺伝子であることが明らかになった。



### 図3 ETS 転写活性化因子 Pnt は Ras 誘導性の腫瘍増殖を制限するがん抑制遺伝子である

(A) 野生型の複眼-触角原基に、GFP 標識した、野生型 (wild-type : WT) または Ras<sup>V12</sup> クローンを誘導した。一方で、第三右腕染色体の一部の領域をヘテロ欠損した (*Df(3R)Exel9012/+*) 複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> クローンまたは GFP 単独クローンを誘導した。(B) *Df(3R)Exel9012* のゲノム領域には *pnt* を含む 5 つの遺伝子が含まれる。(C) *pnt* の機能欠失型変異 (図 4A 参照) をヘテロで導入した (*pnt<sup>Δ88/+</sup>*) 複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> クローンまたは GFP 単独クローンを誘導した。(D) 野生型の複眼-触角原基に、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi<sup>#1</sup>*、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi<sup>#2</sup>*、*pnt-RNAi<sup>#1</sup>*、または *pnt-RNAi<sup>#2</sup>* クローンを誘導した。(E) 野生型の複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + PntP1 または PntP1 クローンを誘導した。(F) (A)、(C)、(D)、そして (E) に示した遺伝子型の GFP 標識クローンの相対体積のボックスプロット (ドットプロットを併用)。いずれの遺伝子型も解析に 10 枚の複眼-触角原基を用いた。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*P<0.05, \*\*P<0.01, WT vs. GFP (*Df(3R)Exel9012/+* background): not significant (N.S.), WT vs. GFP (*pnt<sup>Δ88/+</sup>* background): N.S., WT vs. *pnt-RNAi<sup>#1</sup>*: N.S., WT vs. *pnt-RNAi<sup>#2</sup>*: N.S.。全スケールバー: 100 μm。

*pnt* 遺伝子は 2 種類のアリソフォームである PntP1 と PntP2 をコードしており (図 4A)<sup>35,37</sup>、PntP1 は Pnt 標的遺伝子の転写制御において中心的な役割を担うことが報告されている<sup>38</sup>。加えて、ショウジョウバエ複眼原基において、Egfr シグナルの活性化により、*pntP2* の転写発現は影響を受けない一方で、*pntP1* の転写発現だけが誘導されることも報告されている<sup>38,39</sup>。この報告と一致して、lacZ エンハンサートラップ系統 (図 4A)<sup>37,38</sup> を用いた実験により、複眼-触角原基に誘導した Ras<sup>V12</sup> 発現細胞クローンにおいて、*pntP2* の転写発現は影響を受けないが、*pntP1* の転写発現だけが強力に誘導されることがわかった (図 4B-E)。同様に、タンパクレベルでも、Ras 活性化によって PntP1 の強力な発現誘導が起こることを確認した (この PntP1 発現誘導は *pnt* ノックダウンにより阻害された) (図 4F, G および図 5)。以上の結果から、PntP1 は Ras 活性化に応じて発現上昇し、Ras 誘導性の腫瘍増殖を制限することが明らかになった (図 4H)。また、PntP1 を単独で過剰発現させた細胞クローンのサイズが非常に小さくなることも発見した (図 3E, F)。このことから、PntP1 の発現上昇は普遍的に細胞の増殖抑制をもたらすと考えられる。



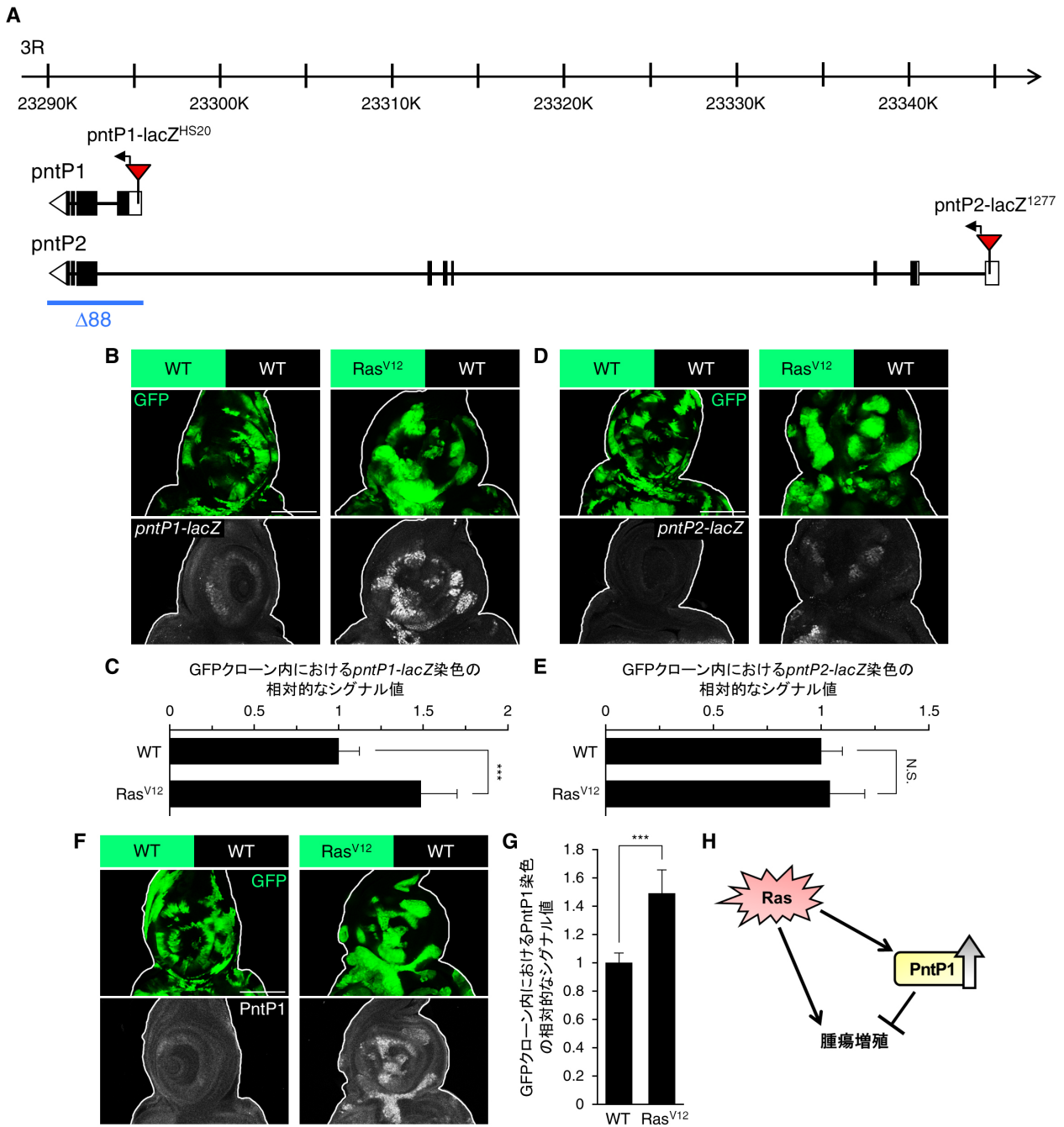
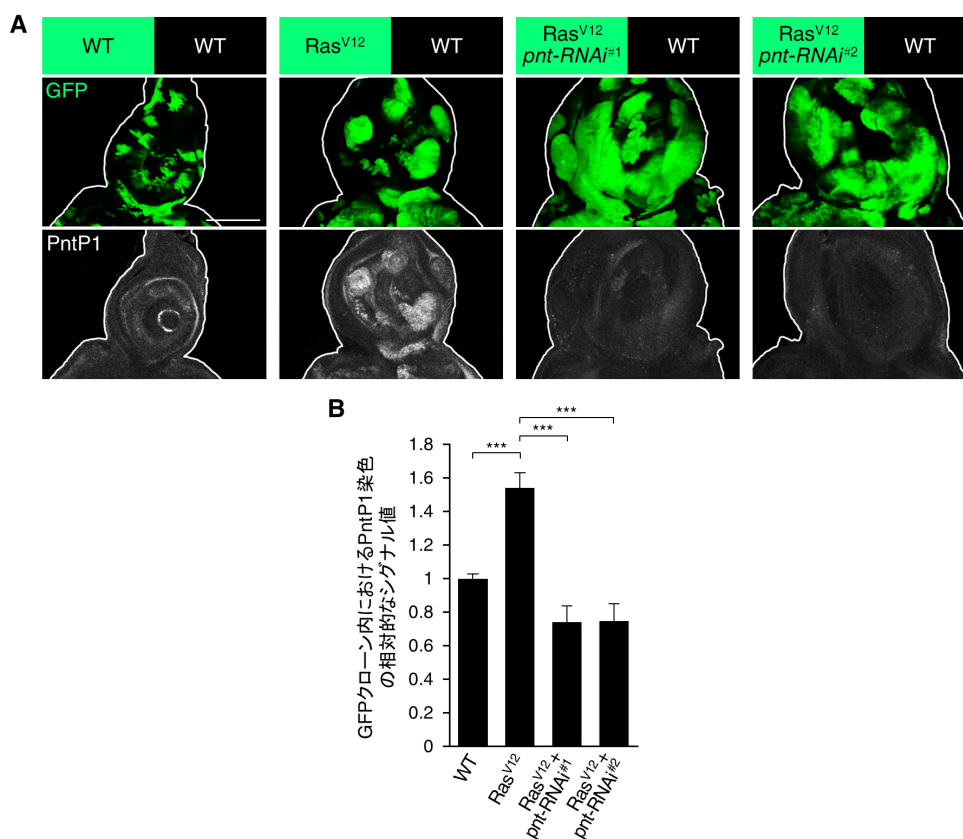


図 4 Ras 活性化は PntP1 の発現誘導を引き起こす

(A) *pnt* 遺伝子座 (94E10-94E13) 周辺のゲノム領域と 2 種類の lacZ エンハンサートラップ (赤い三角形が示す通り)。*pnt*<sup>HS20</sup> は活性型アイソフォームである *pntP1* の発現をモニター可能な lacZ エンハンサートラップ (*pntP1-lacZ*)。 *pnt*<sup>1277</sup> はもう 1 つの主要なアイソフォームである *pntP2* の発現をモニター可能な lacZ エンハンサートラップ (*pntP2-lacZ*)。 図中に *pnt* の機能欠失型変異 (*pnt*<sup>Δ88</sup>) のゲノム欠損領域を示す。(B) *pntP1-lacZ* 発現の検出。*pntP1-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した WT または Ras<sup>V12</sup> クローンを誘導後、β-galactosidase (β-gal) 染色を行った。(C) (B) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *pntP1-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : WT, n=7 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=12。 Mann-Whitney

U 検定;  $***P < 0.005$ 。(D) *pntP2-lacZ* 発現の検出。*pntP2-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した WT または  $Ras^{V12}$  クローンを誘導後、 $\beta$ -gal 染色を行った。(E) (D) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *pntP2-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値 $\pm$ 標準偏差): WT, n=8 (複眼-触角原基の数);  $Ras^{V12}$ , n=11。Mann-Whitney U 検定。(F) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した WT または  $Ras^{V12}$  クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(G) (F) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値 $\pm$ 標準偏差): WT, n=8 (複眼-触角原基の数);  $Ras^{V12}$ , n=12。Mann-Whitney U 検定;  $***P < 0.005$ 。(H) がん抑制遺伝子である PntP1 は Ras 活性化に応じて発現誘導され、Ras 誘導性の腫瘍増殖を制限していると考えられる。全スケールバー:  $100 \mu m$ 。



### 図5 *pnt-RNAi* による PntP1 の効果的な発現抑制

(A) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、WT、 $Ras^{V12}$ 、 $Ras^{V12}$  + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>、または  $Ras^{V12}$  + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(B) (A) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値 $\pm$ 標準偏差): WT, n=9 (複眼-触角原基の数);  $Ras^{V12}$ , n=12;  $Ras^{V12}$  + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=11;  $Ras^{V12}$  + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>, n=10。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較;  $***P < 0.005$ 。

#### 4-2. Pnt は Ras シグナルの下流で細胞老化を引き起こす

次に、PntがRas誘導性の腫瘍増殖を阻害するメカニズムを調べた。内在性のがん防御メカニズムとして、CDK阻害因子により誘導される不可逆的な細胞周期停止状態である細胞老化が知られている<sup>5,40</sup>。これはショウジョウバエにおいても進化的に保存された現象であり、Ras活性化に応じて、一部の細胞老化マーカーの上昇に伴い、CDK阻害因子Dacapo (Dap: p21/p27ホモログ) の発現上昇が起こることが報告されている<sup>30</sup>。重要なことに、過去のヒト培養細胞を用いた研究により、Pntの哺乳類ホモログETS1/2がRasシグナルの下流でCDK阻害因子p16の発現を直接誘導することによって、Ras活性化による細胞老化誘導に関与することがわかっている<sup>41-43</sup>。加えて、Ets1/2が細胞老化誘導に重要な、別のCDK阻害因子であるp21の発現を直接誘導することも報告されている<sup>44-47</sup>。そこで、私はPntが細胞老化を誘導するかどうか解析を行った。まず、SPiDER-βGal<sup>48</sup>とX-Galを用いて、主要な細胞老化マーカーであるsenescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) 活性<sup>49,50</sup>に対する影響を調べたところ、興味深いことに、Ras活性化によって誘導されるSA-β-galの活性上昇が*pnt*ノックダウンにより阻害され、一方でPntP1単独の過剰発現がSA-β-galの活性上昇に十分であることがわかった (図6)。さらに、lacZエンハンサートラップシステムを用いて*dap*の転写発現に対する影響を調べたところ、Ras活性化による*dap*の発現誘導が*pnt*ノックダウンにより阻害され、一方でPntP1単独の過剰発現が*dap*の発現誘導に十分であることがわかった (図7)。加えて、Ras<sup>V12</sup>発現細胞クローンにおいて*dap*をノックダウンした場合に、その腫瘍増殖が強力に促進されたことから、Pntにより発現誘導されるDapがRas活性化腫瘍の増殖抑制に寄与していると言える (図8)。これらの結果から、PntがRas活性化による細胞老化誘導に必要な働きをもつことが強く示唆された。

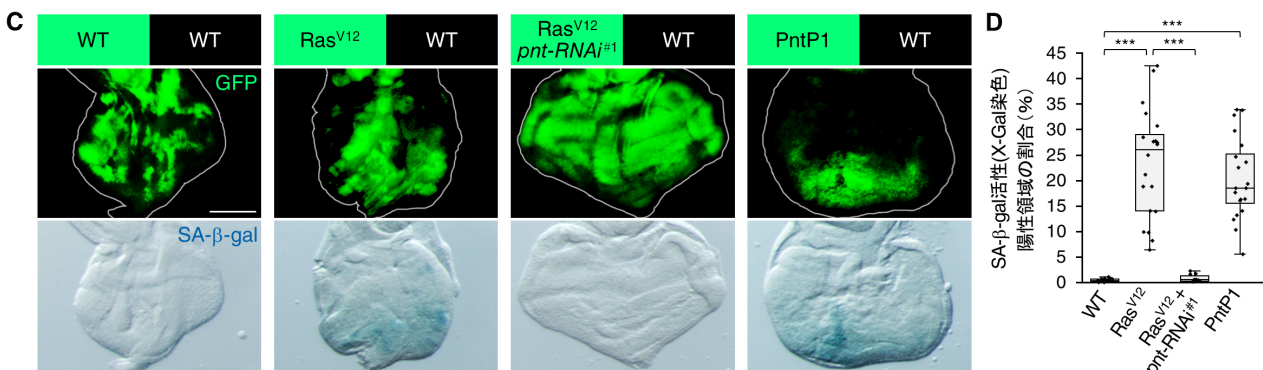
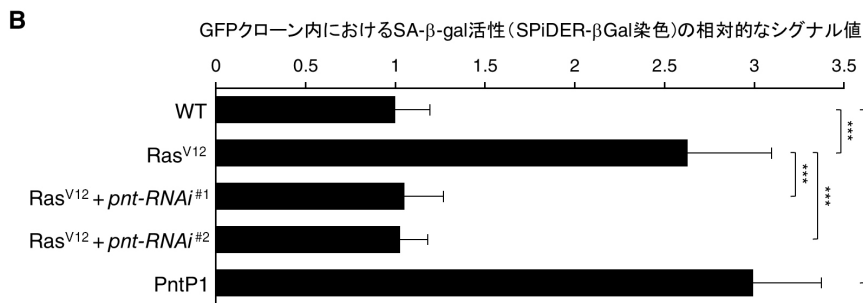
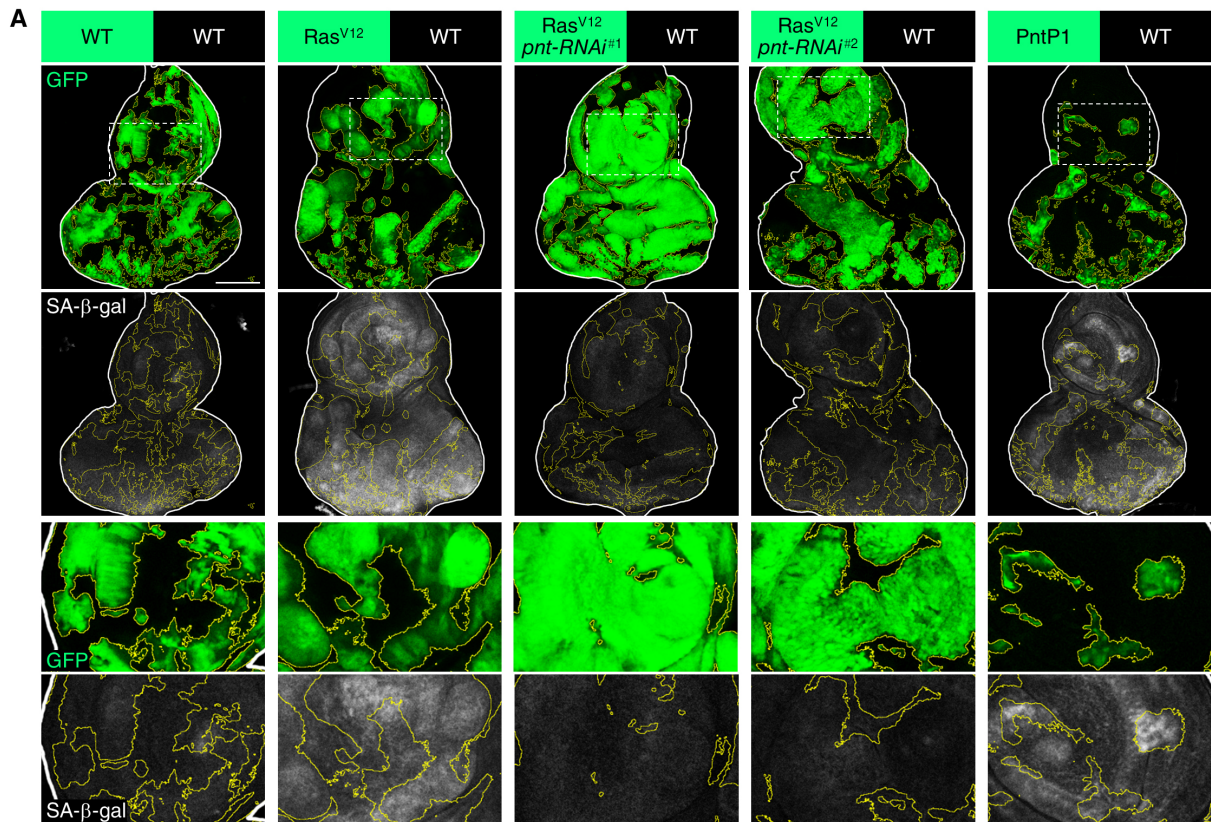


図6 PntはRasシグナル下流において細胞老化マーカーであるSA-β-gal活性を誘導する

(A) SPiDER-βGal (β-galの蛍光基質)を用いたSA-β-gal活性の検出。複眼-触角原基において、GFP標識した、WT、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>、またはPntP1クローンを誘導後、SPiDER-βGal染色を行った。(B) (A)に示した遺伝子型のGFPクローン内におけるSA-β-



gal活性 (SPiDER-βGal染色) の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : WT, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=14; Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=13; Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>, n=14; PntP1, n=14. Kruskal-Wallis検定後、Steel-Dwass検定により多重比較; \*\*\*P<0.005. (C) X-Gal (β-galの基質) を用いたSA-β-gal活性の検出。複眼-触角原基において、GFP標識した、WT、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>、またはPntP1クローンを誘導後、X-Gal染色を行った。(D) (C) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占めるSA-β-gal活性 (X-Gal染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : WT, n=18 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=20; Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=10; PntP1, n=20. Kruskal-Wallis検定後、Steel-Dwass検定により多重比較; \*\*\*P<0.005. 全スケールバー: 100 μm。

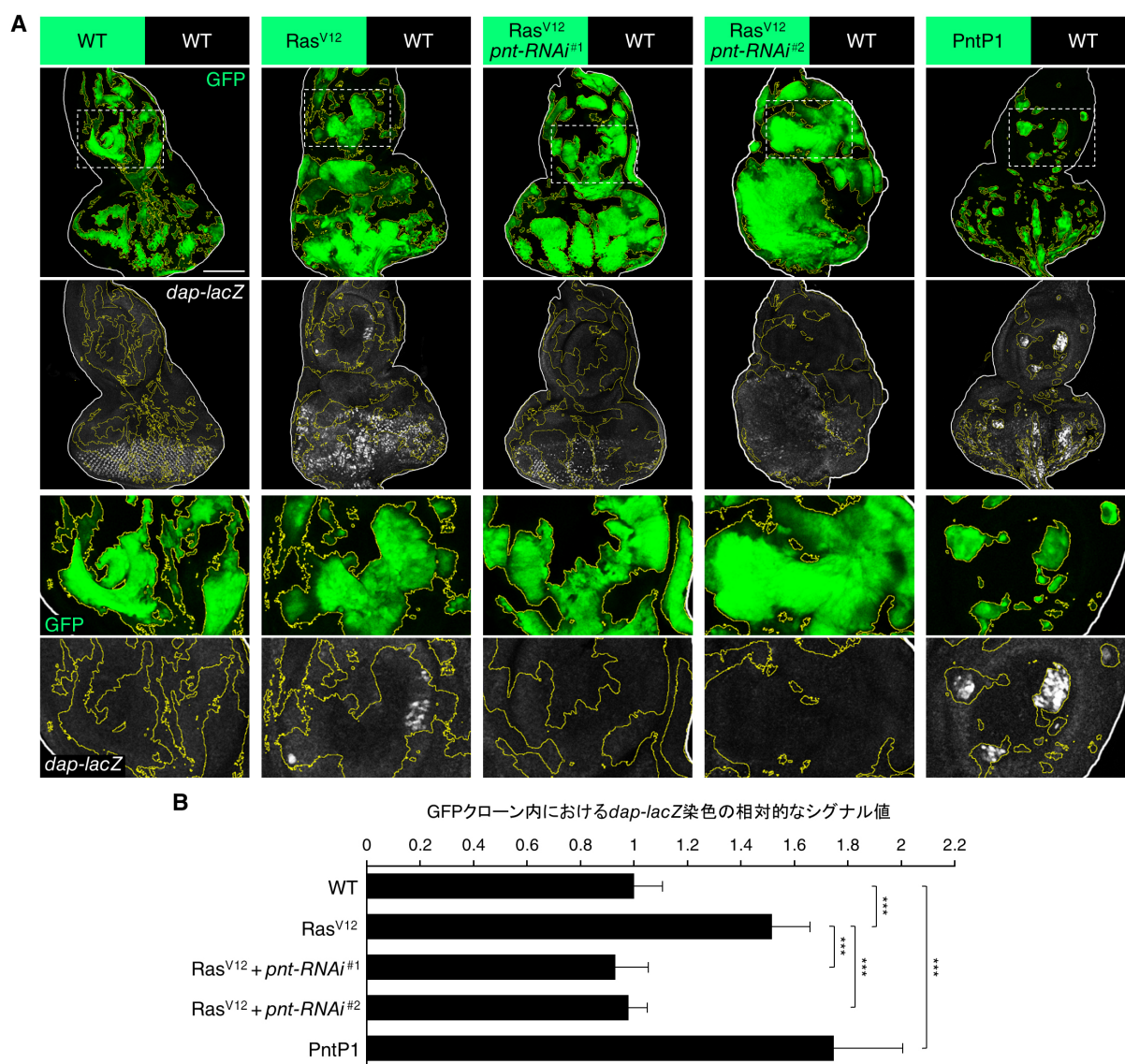


図7 Pnt は Ras シグナル下流において細胞老化マーカーである CDK 阻害因子 *dap* の発現を誘導する

(A) *dap-lacZ* 発現の検出。 *dap-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した、WT、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>、または PntP1 クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。

(B) (A) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *dap-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : WT, n=14 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=19; Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=12; Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>, n=10; PntP1, n=12。 Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。 全スケールバー: 100 μ m。

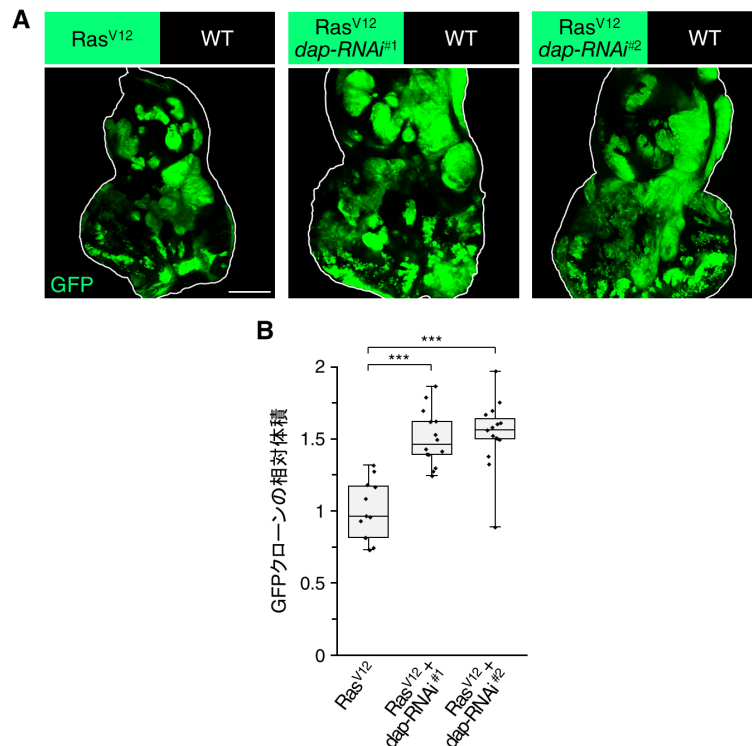


図 8 *dap* ノックダウンは Ras 活性化腫瘍の増殖促進をもたらす

(A) 複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *dap-RNAi*<sup>#1</sup>、または Ras<sup>V12</sup> + *dap-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導した。(B) (A) に示した遺伝子型の GFP クローンの相対体積を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *dap-RNAi*<sup>#1</sup>, n=14; Ras<sup>V12</sup> + *dap-RNAi*<sup>#2</sup>, n=15。 Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。 スケールバー: 100 μ m。

次に、Pntの細胞周期に対する影響を調べるため、PH3染色（M期マーカー）とFly-FUCCI<sup>51</sup>を用いた細胞周期解析を行った。Fly-FUCCIとは、*Drosophila* E2F1と*Drosophila* Cyclin B (CycB)のデグロンを利用した細胞周期検出システムである（図9）。このシステムとPH3染色を組み合わせることによって、各細胞周期（G1/S/G2/M）を検出することが可能になる。Fly-FUCCIプローブ（GFP-E2F1<sub>1-230</sub>とRFP-NLS-CycB<sub>1-266</sub>）で標識した野生型細胞のうち、限られた割合の細胞がG1期（21.7%）を示した（図10）。PntP1の過剰発現により、S期とG2期の割合が有意に減少した一方で（S期：11%から6.8%へと減少；G2期：65.8%から41.5%へと減少）、G1期の割合が有意に増加した（G1期：21.7%から49.6%へと増加）（図10）。この結果から、PntP1クローン内の大多数の細胞の細胞周期がG1期で停止していることが示唆された。その一方で、Ras<sup>V12</sup>の過剰発現は細胞周期の割合に有意な影響をもたらさなかったが、Ras<sup>V12</sup>クローン内におけるpntノックダウンにより、G2期の割合が有意に増加した一方で（pnt-RNAi<sup>#1</sup>によるG2期の変化：67%から72.7%へと増加；pnt-RNAi<sup>#2</sup>によるG1期の変化：67%から75.9%へと増加）、G1期の割合が有意に減少した（pnt-RNAi<sup>#1</sup>によるG1期の変化：18.2%から11.6%へと減少；pnt-RNAi<sup>#2</sup>によるG1期の変化：18.2%から11.8%へと減少）（図10）。このことは、Ras<sup>V12</sup>クローン内において、増殖している細胞がいる一方で、Pntの働きによりG1期停止している老化細胞が一部存在することを示唆している。逆に、PntP1過剰発現により、Ras<sup>V12</sup>クローン全体でPntが働くようにした場合には、G2期とS期の割合が有意に減少した一方で（G2期：67%から37.8%へと減少；S期：13.3%から7.9%へと減少）、G1期の割合が有意に増加した（G1期：18.2%から51.5%へと増加）（図10）。

#### Fly-FUCCI

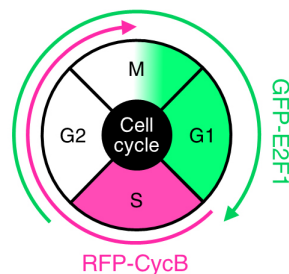


図 9 Fly-FUCCI

Fly-FUCCIとは*Drosophila* E2F1と*Drosophila* Cyclin B (CycB)のデグロン（タンパク質分解調節領域）に基づいた細胞周期検出システムである。Fly-FUCCIプローブの1つである、GFP-E2F1<sub>1-230</sub>はG2期の開始からG1期の終了まで発現し、一方で、もう1つのFly-FUCCIプローブであ

る、RFP-NLS-CycB<sub>1-266</sub> は S 期の開始から M 期中期まで発現する。よって、Fly-FUCCI システムだけでは、S 期は判別できるものの、その他の細胞周期 (G1/G2/M) の判別は難しい。この問題を克服するため、本研究では、M 期マーカーである PH3 染色を併用して行っている。また、上記 2 種類のプローブはいずれも細胞核に局在する。

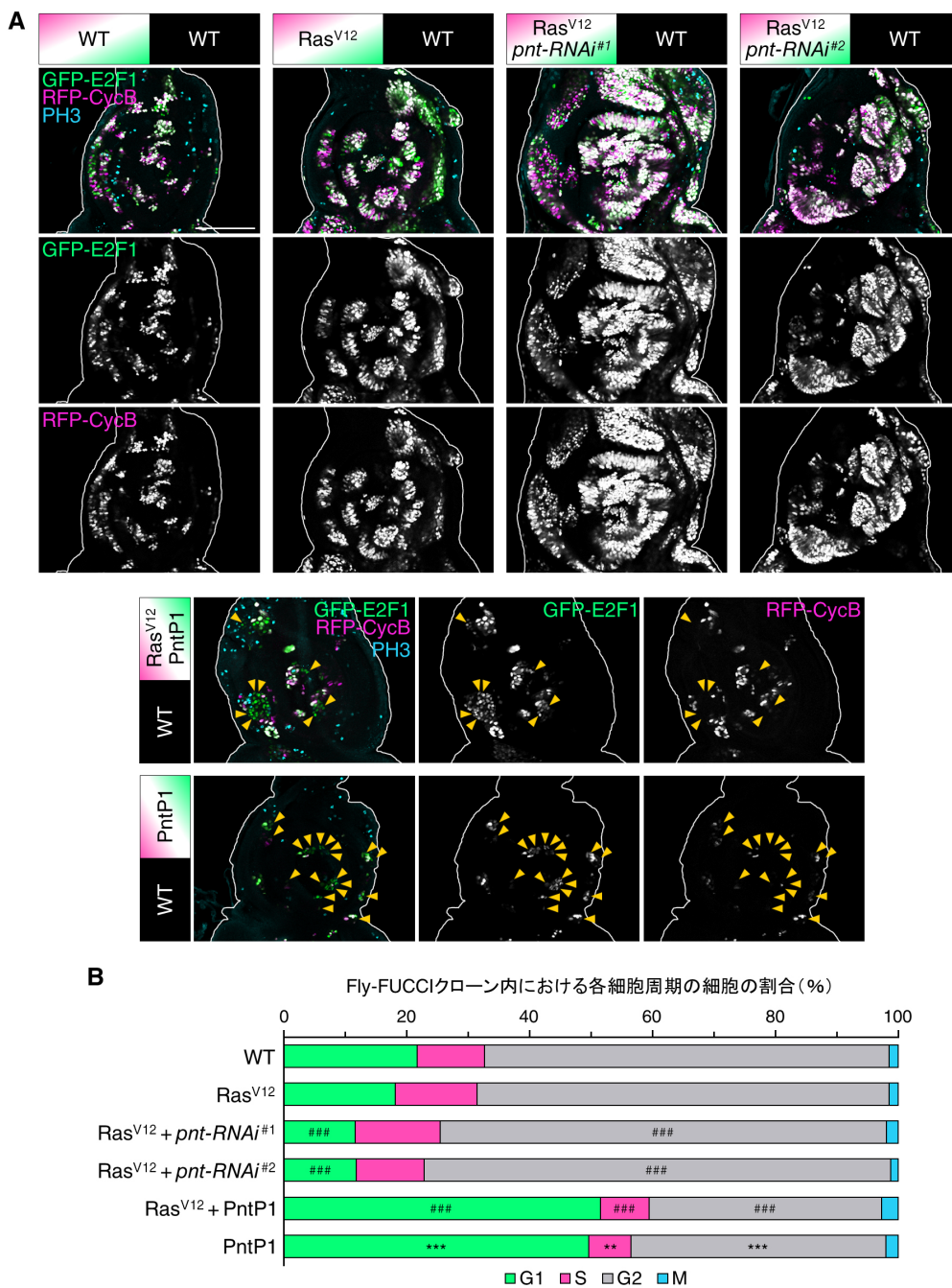


図 10 Pnt は Ras シグナル下流において細胞周期の G1 期停止を誘導する



(A) 複眼-触角原基において、Fly-FUCCIで標識した、WT、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>、Ras<sup>V12</sup> + PntP1、またはPntP1クローンを誘導後、PH3染色（M期マーカー）を行った。(B) (A) に示した遺伝子型の触角原基におけるFly-FUCCIクローン内の各細胞周期（G1/S/G2/M）を示す細胞の割合の100%積み上げ棒グラフ：WT, n=21（触角原基の数）；Ras<sup>V12</sup>, n=23；Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=21；Ras<sup>V12</sup> + *pnt-RNAi*<sup>#2</sup>, n=23；Ras<sup>V12</sup> + PntP1, n=23；PntP1, n=21。各細胞周期の割合に関して、Kruskal-Wallis検定後にSteel-Dwass検定により多重比較；WTに対する有意差：\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005；Ras<sup>V12</sup>に対する有意差：###P<0.005。スケールバー：100 μm。

さらに、PntによるG1期停止の誘導を、ショウジョウバエ複眼原基内で生じるsecond mitotic wave (SMW)<sup>52</sup>において検証した。SMWでは、正常細胞の場合、ライン上に並んだG1期停止した細胞が一斉にS期に入るが、PntP1の過剰発現によって、このS期への進行が妨げられた（図11）。この結果から、これらの細胞がPntP1の発現上昇によってG1期停止を経験したことを示すと同時に、PntによるG1期停止が不可逆であることを示唆している。

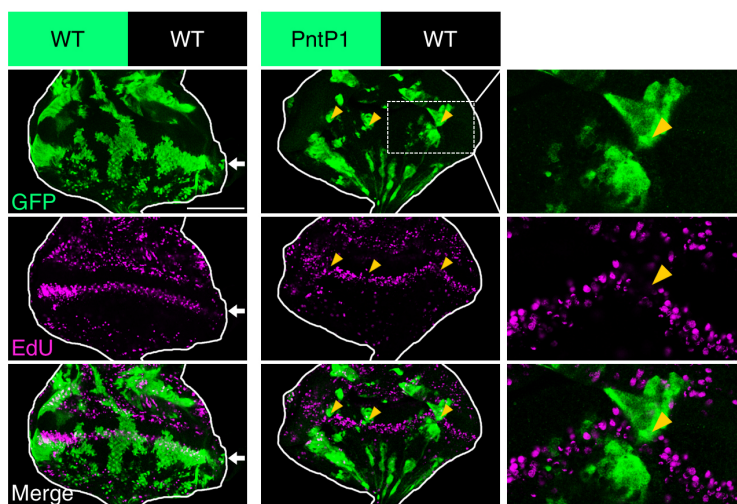


図 11 Pnt は SMW において細胞周期の G1 期停止を誘導する

Second mitotic wave (SMW)における細胞周期停止の解析。複眼-触角原基において、GFP 標識した WT または PntP1 クローンを誘導後、EdU 染色（S 期マーカー）を行った。WT 細胞は Morphogenetic furrow において細胞周期が G1 期で停止した後に、SMW において再び細胞周期が一度だけ回る（白色の矢印で示す通り）。この SMW においても、PntP1 クローン細胞は EdU 陰性であった（黄色の矢印で示す通り）。各遺伝子型における代表的画像を示す：WT, n=9（複眼-触角原基の数）；PntP1, n=10。スケールバー：100 μm。

また、さらなる解析により、PntP1過剰発現がその他の細胞老化マーカーである、細胞の肥大化<sup>49</sup>とヘテロクロマチン化<sup>53,54</sup>（マーカーである、ヒストンH3K9のトリメチル化およびHeterochromatin Protein 1 (HP1) の発現上昇により確認）の誘導に十分であることがわかった（図12）。以上の結果より、PntはRas活性化に応じて細胞老化を引き起こし、それにより腫瘍増殖を阻害すると結論づけた。

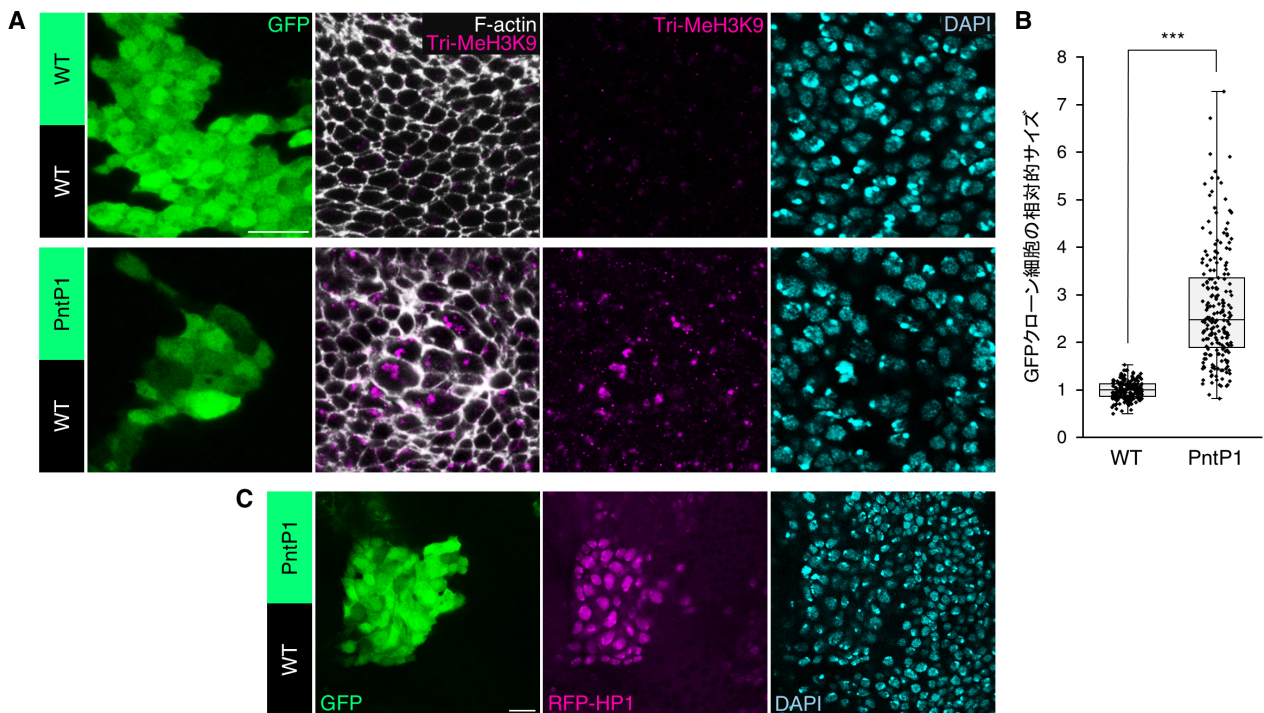


図 12 Pnt は細胞老化マーカーである、細胞の肥大化とヘテロクロマチン化を誘導する

(A) 複眼-触角原基において、GFP標識したWTまたはPntP1クローンを誘導した後、Tri-MeH3K9染色とPhalloidin染色を行った。ヒストンH3K9のトリメチル化はヘテロクロマチン化のマーカーであり、Phalloidin染色はF-actinを標識するために行った。また、細胞核は4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で標識した。細胞の肥大化とヘテロクロマチン化の評価は、複眼原基の上皮層であるdisc properの細胞において行った（ただし、Morphogenetic furrowよりも前側で）。各遺伝子型における代表的画像を示す：WT, n=8（複眼原基の数）；PntP1, n=11。(B) (A)に示した遺伝子型のGFPクローン細胞の相対的サイズを示すボックスプロット（ドットプロットを併用）：WT, n=203（細胞数）、7枚の複眼原基を使用；PntP1, n=209, 9枚の複眼原基を使用。(C) RFP-HP1（HP1遺伝子のプロモーターを利用したRFPレポーター）を導入した複眼-触角原基に、GFP標識したPntP1クローンを誘導した。細胞核はDAPIで標識した。HP1はヘテロクロマチン化のマーカーであり、この評価を複眼原基のdisc proper細胞において行った（ただし、Morphogenetic furrowよりも前側で）。観察した7枚の複眼原基の中から代表的な画像を示す。全スケールバー：10  $\mu$  m。

#### 4-3. 上皮細胞極性の崩壊に伴う *Yki-bantam* の活性化は、*Pnt* の発現抑制により *Ras* 誘導性の細胞老化を阻害し、腫瘍の悪性化進展を駆動する

*Ras* 活性化腫瘍はどのようなメカニズムによって *Pnt* 誘導性の細胞老化を克服し、悪性化へと至るのだろうか？重要なことに、*Ras* 活性化腫瘍を悪性化する代表的ながん原性変化として、上皮細胞極性の崩壊が知られている。細胞極性の崩壊はがん細胞に共通する現象であることは元々知られていたが、過去のショウジョウバエ研究により、この現象自体が *Ras* 活性化腫瘍を、激しい増殖活性と浸潤・転移を示す悪性腫瘍へと転換させる原因であることが明らかにされていた<sup>20,21,55</sup>。これまでの結果を踏まえれば、*Pnt* による細胞老化を誘導する働きが、細胞極性の崩壊による腫瘍悪性化において抑制されると予想される。そこで、極性の崩壊した *Ras* 活性化悪性腫瘍における *Pnt* の活性を調べた。主要な極性遺伝子である *lethal giant larvae (lgl)*、*discs large (dlg)*、または *scribble (scrib)* の欠失変異を導入した *Ras<sup>V12</sup>* 細胞クローン (*Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>-/-</sup>*、*Ras<sup>V12</sup>/dlg<sup>-/-</sup>*、または *Ras<sup>V12</sup>/scrib<sup>-/-</sup>*) は悪性腫瘍を形成するが、非常に興味深いことに、これら悪性腫瘍において *PntP1* の発現が強力に抑制されていることがわかった (図 13A, B)。さらに、*Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>-/-</sup>* 悪性腫瘍または *Ras<sup>V12</sup>/dlg<sup>-/-</sup>* 悪性腫瘍において、過剰発現により *PntP1* の発現をレスキューした場合、驚くべきことに、それら悪性腫瘍の大過剰な腫瘍増殖が著しく抑制された (図 13C, D)。これらの結果から、極性崩壊により *Pnt* の発現抑制が生じることによって腫瘍の悪性化が引き起こされることが強く示唆された。

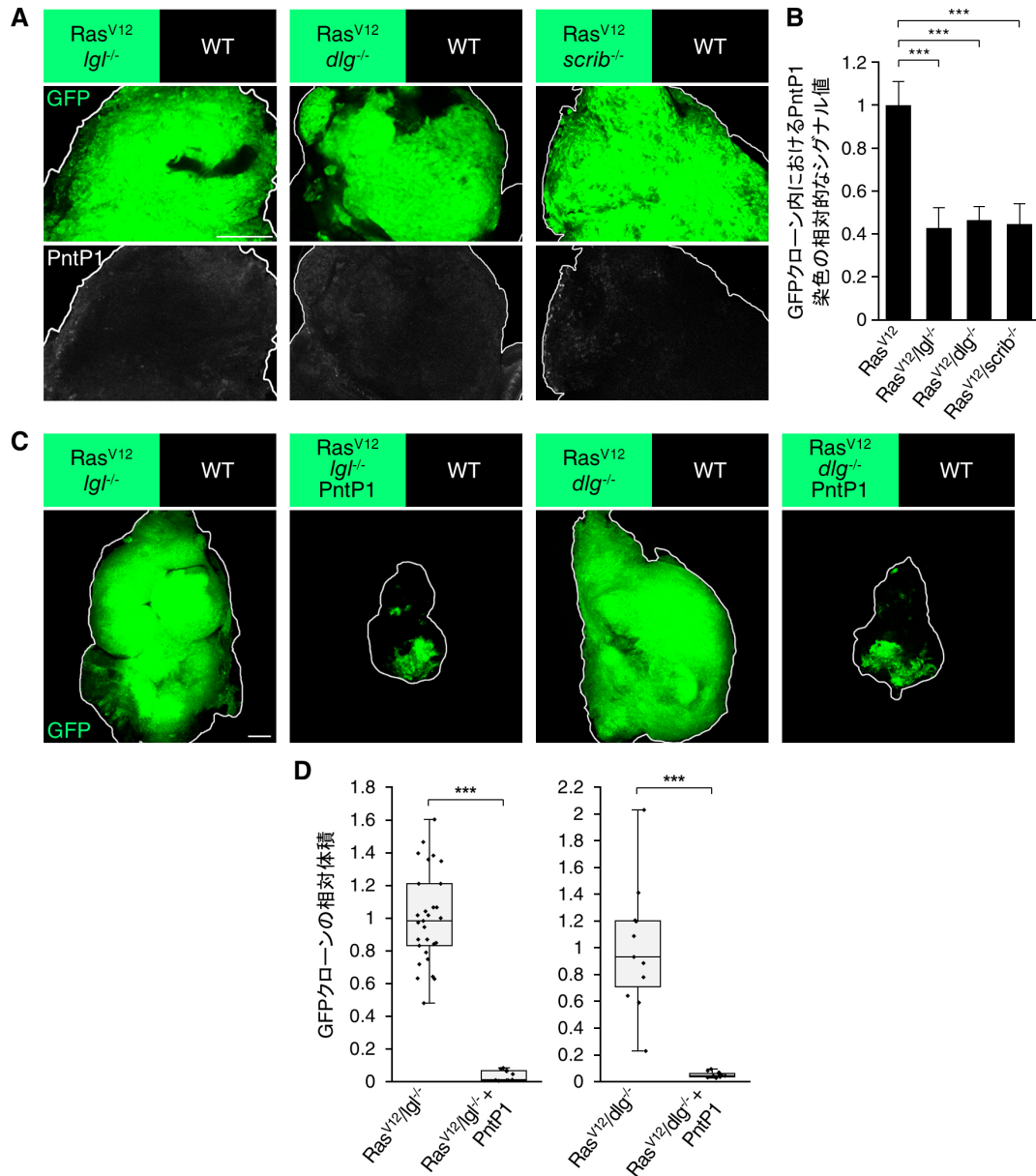


図 13 上皮細胞極性の崩壊は PntP1 の発現抑制を介して Ras 活性化腫瘍の増殖を著しく亢進させる

(A) 複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup>、Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>、または Ras<sup>V12</sup>/*scrib*<sup>-/-</sup> クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(B) (A) と (図 4F, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数); Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>, n=11; Ras<sup>V12</sup>/*scrib*<sup>-/-</sup>, n=10。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(C) 複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup>、Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup> + PntP1、Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>、または Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup> + PntP1 クローンを誘導した。(D) (C) に示した遺伝子型の GFP クローンの相対体積を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup>, n=29 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup> + PntP1, n=11; Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>, n=11; Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup> + PntP1, n=12。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μ m。

次に、極性崩壊によって Pnt の発現がどのように抑制されるのか、そのメカニズムを解析した。重要なことに、過去の報告により、極性崩壊と Ras 活性化が協調的に働くことによって、主要ながん抑制経路である Hippo 経路が強力に抑制され、そのエフェクターである転写共役因子 Yorkie (Yki: YAP ホモログ) が過剰に活性化することが分かっている<sup>56-58</sup>。そこで、Hippo 経路ならびに Yki の Pnt の発現に対する影響を調べた。興味深いことに、Hippo 経路の主要な構成因子である Hippo の過剰発現によって Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>悪性腫瘍における PntP1 の発現が回復し、加えて、活性型 Yki (Yki<sup>S168A</sup>)の過剰発現によって Ras 誘導性の PntP1 の発現が強力に抑制された (図 14A, C)。さらに、Yki の標的遺伝子を解析した結果、Yki がその標的である microRNA *bantam*<sup>59-61</sup> を介して Pnt の発現を抑制することを突き止めた。*bantam* に対する特異的なインヒビターである *bantam-sponge* (*bantam-SP*: *bantam* の標的サイトを 10 個もつ導入遺伝子であり、これにより *bantam* を捕捉・抑制する) の過剰発現によって、Yki<sup>S168A</sup> による PntP1 の発現抑制が阻害された (図 14A, C)。同様に、*bantam-SP* の過剰発現は *lgl*<sup>-/-</sup>による PntP1 の発現抑制も阻害した (図 14B, C)。実際に、*lacZ* エンハンサートラップシステムを用いて *bantam* の転写発現レベルを調べたところ、Ras<sup>V12</sup> と Yki<sup>S168A</sup> を発現する細胞クローンでは、Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>または Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>クローンと同様に、*bantam* の過剰な発現誘導が観察された (図 14D)。このような *bantam* の発現誘導は Ras<sup>V12</sup> 細胞クローンでは観察されなかった (図 14D)。加えて、*bantam* の過剰発現によって Ras 誘導性の PntP1 の発現が強力に抑制されることがわかった (図 13A, C)。これらの結果と一致して、Yki<sup>S168A</sup> または *bantam* の過剰発現によって Ras 誘導性の SA-β-gal 活性化と *dap* 発現上昇が阻害された (図 15)。同様に、極性崩壊によっても、Ras 誘導性の細胞老化マーカーが抑制された (図 16)。さらに、Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>悪性腫瘍において *bantam-SP* を過剰発現させた場合に、極性崩壊により阻害されていた SA-β-gal 活性が回復し、同時にその腫瘍増殖が著しく抑制された (図 17)。以上の結果より、極性崩壊に応じて活性化した Yki-*bantam* は Pnt の発現抑制により Ras 誘導性の細胞老化を阻害し、これにより腫瘍の悪性化進展を駆動すると結論づけた。



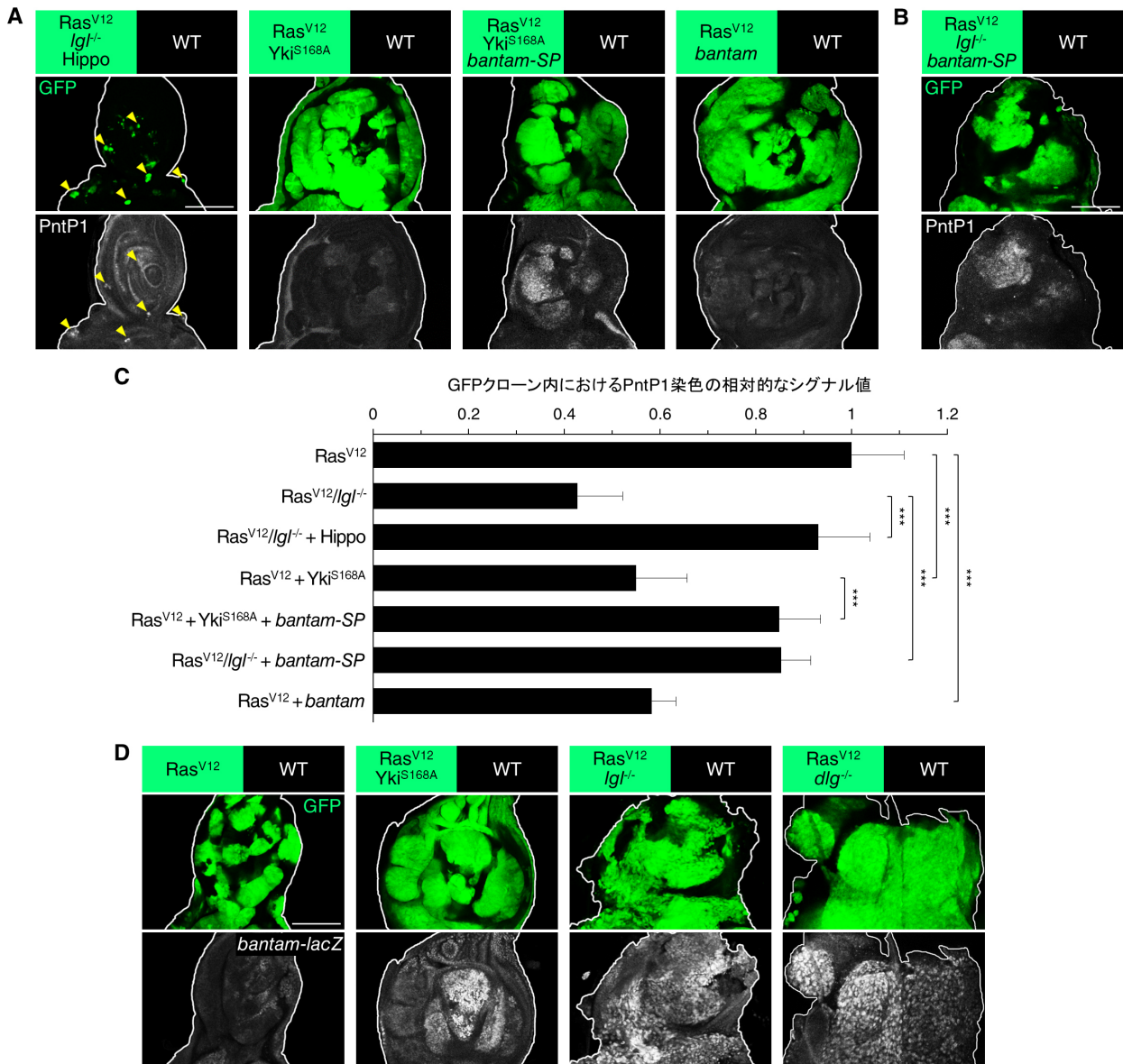


図 14 上皮細胞極性の崩壊に伴う *Yki-bantam* の活性化は Ras 誘導性の PntP1 の発現を抑制する (A-B) 複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup> + Hippo (A)、Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup> (A)、Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup> + *bantam-SP* (*bantam* inhibitor) (A)、Ras<sup>V12</sup> + *bantam* (A)、または Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup> + *bantam-SP* (B) クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(C) (A)、(B)、(図 4F, Ras<sup>V12</sup>)、そして (図 13A, Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数); Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup> + Hippo, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup>, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup> + *bantam-SP*, n=11; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup> + *bantam-SP*, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=11. Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(D) *bantam-lacZ* 発現の検出。*bantam-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup>、Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>、または Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup> クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。各遺伝子型における代表的画像を示す: Ras<sup>V12</sup>, n=13 (複眼-触角原基の数); Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>, n=8; Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>, n=12。全スケールバー: 100 μm。

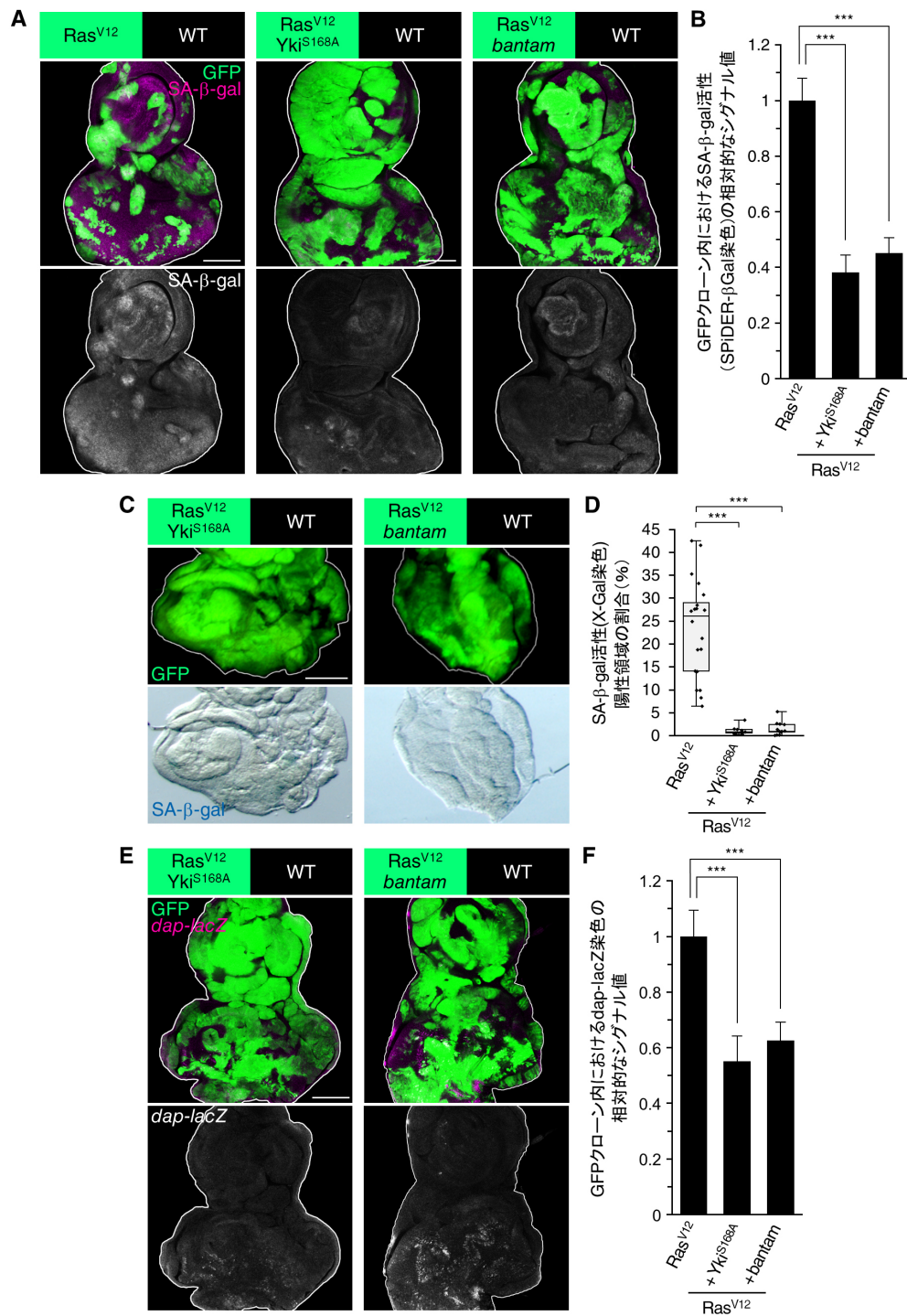


図 15 Yki-*bantam* シグナルは Ras 誘導性の細胞老化を阻害する

(A) SPiDER-βGal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>、または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* クローンを誘導後、SPiDER-βGal 染色を行った。(B) (A) に示した遺伝子型の GFP クローン内における SA-β-gal 活性 (SPiDER-βGal 染色) の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=13 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>, n=15; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=15。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。

(C) X-Gal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* クローンを誘導後、X-Gal 染色を行った。(D) (C) と (図 6C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占める SA-β-gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>, n=20 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=13。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。

(E) *dap-lacZ* 発現の検出。*dap-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。(F) (E) と (図 7A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *dap-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=19 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>, n=11; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=11。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μm。

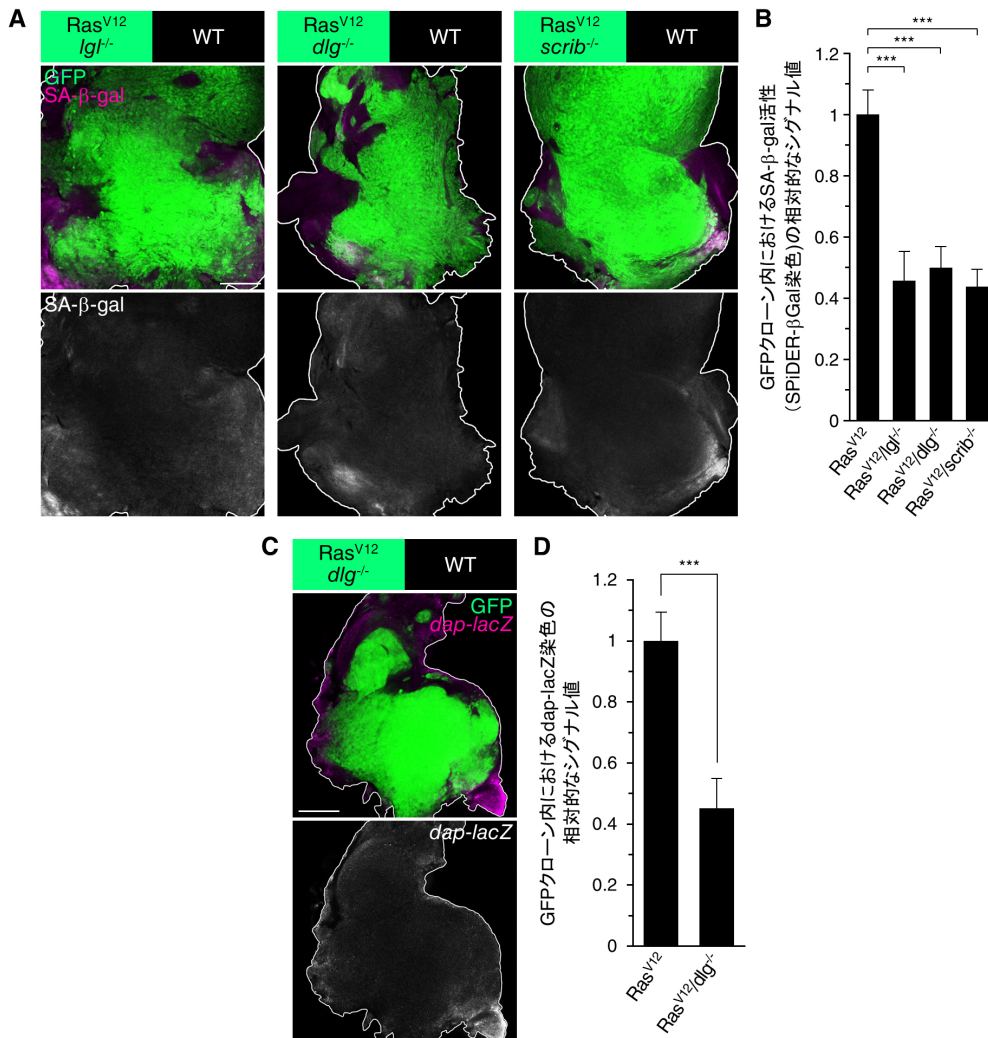


図 16 上皮細胞極性の崩壊は Ras 誘導性の細胞老化を阻害する

(A) SPiDER-βGal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>、Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>-/-</sup>、Ras<sup>V12</sup>/dlg<sup>-/-</sup>、または Ras<sup>V12</sup>/scrib<sup>-/-</sup> クローンを誘導後、SPiDER-βGal 染色を行った。



(B) (A) と (図 15A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における SA-β-gal 活性 (SPiDER-βGal 染色) の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=13 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>, n=19; Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>, n=11; Ras<sup>V12</sup>/*scrib*<sup>-/-</sup>, n=14。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(C) *dap-lacZ* 発現の検出。*dap-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup> クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。(D) (C) と (図 7A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *dap-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=19 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>/*dlg*<sup>-/-</sup>, n=13。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μ m。

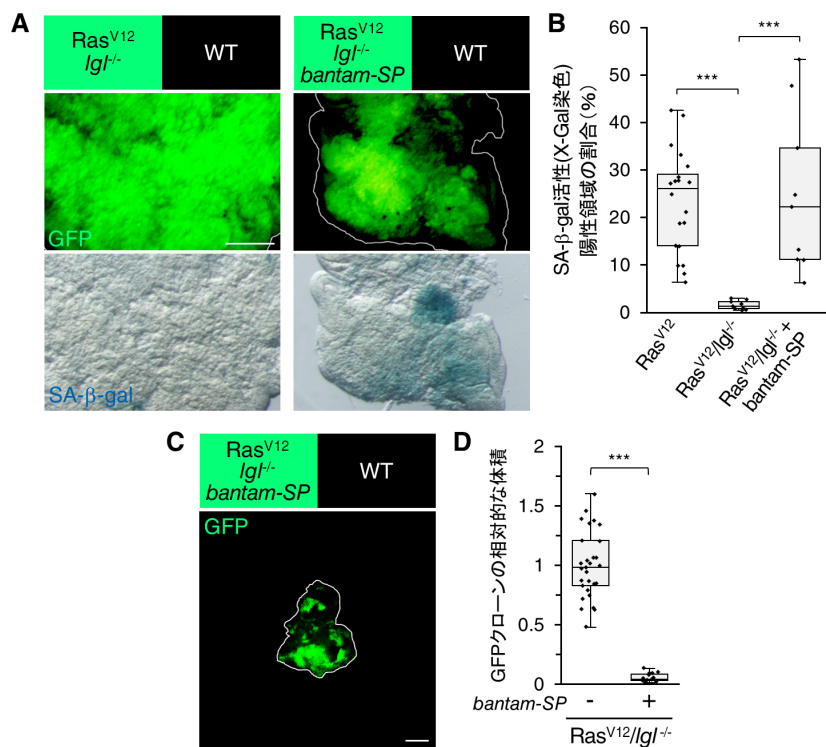


図 17 microRNA *bantam* の抑制は Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup> 悪性腫瘍において SA-β-gal 活性を回復させ、腫瘍増殖を著しく抑制する

(A) X-Gal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup> または Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/+</sup> + *bantam-SP* クローンを誘導後、X-Gal 染色を行った。(B) (A) と (図 6C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占める SA-β-gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>, n=20 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>, n=9; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/+</sup> + *bantam-SP*, n=9。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(C) 複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/+</sup> + *bantam-SP* クローンを誘導した。(D) (C) と (図 13C, Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローンの相対体積を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/-</sup>, n=29 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>/*lgl*<sup>-/+</sup> + *bantam-SP*, n=13。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μ m。

#### 4-4. microRNA *bantam* は転写因子 FoxO の発現を回復させることによって Pnt 誘導性の細胞老化を阻害する

次に、microRNA *bantam* が Pnt の発現を抑制するメカニズムを調べた。microRNA は一般的に標的遺伝子の 3'UTR 上の標的サイトに結合することによって、mRNA の不安定化や翻訳阻害により、その遺伝子の発現抑制をもたらすことが知られる<sup>62</sup>。このことから、Ras 活性化腫瘍において *bantam* が PntP1 の発現を直接的に抑制する可能性を考えたが、microRNA の標的候補遺伝子に関するデータベース<sup>63-65</sup>を調べた結果、予想に反して、*pnt* の 3'UTR には *bantam* の標的サイトが存在しないことがわかった。そこで、*bantam* が Ras 下流因子の発現制御を介して間接的に PntP1 の発現を抑制しているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、まず Ras 活性化によってどのように PntP1 の発現が誘導されるか解析を行った。興味深いことに、Ras 下流の主要なキナーゼである、*erk* または *akt* をノックダウンすることにより、Ras 誘導性の PntP1 の発現が強力に抑制されることがわかった (図 18; ノックダウン効率は図 21 において確認)。さらに、Akt によって直接的に負に制御される、転写因子 FoxO を過剰発現させた場合にも、Ras 誘導性の PntP1 の発現が同様に抑制された (図 18)。Akt は Ras 活性化に応じて FoxO をリン酸化し、それにより FoxO の核外排出、さらにはユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解をもたらすことが報告されている<sup>66</sup>。これらの結果より、Ras 活性化による PntP1 の発現上昇は下流の Erk と Akt-FoxO を介して起こることがわかった。

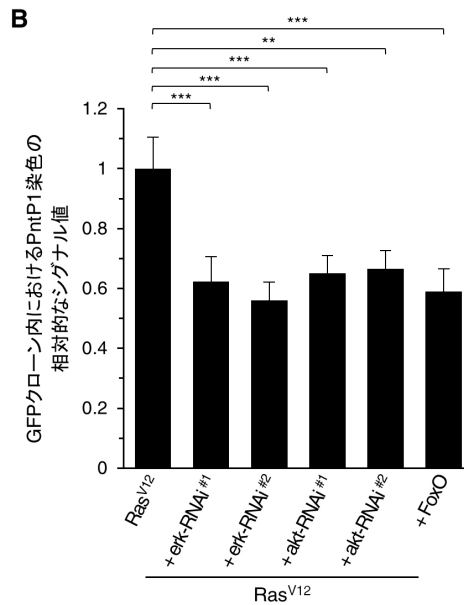
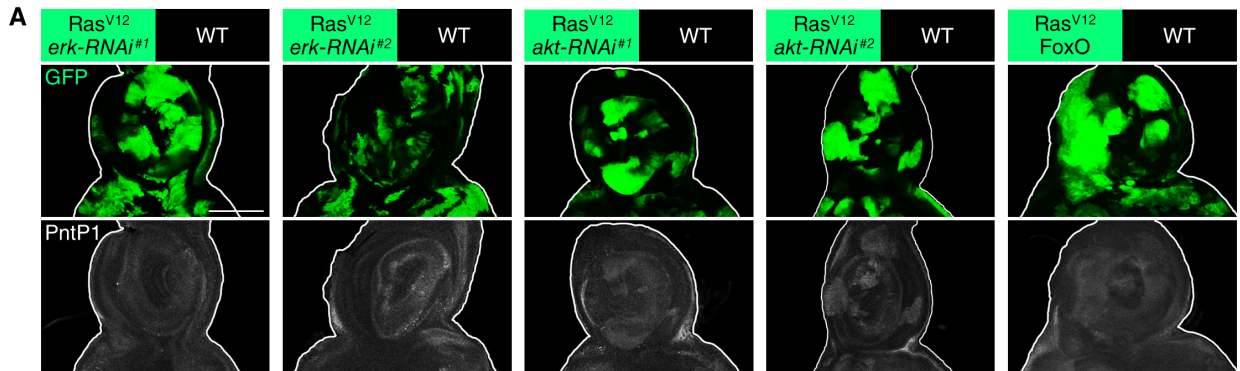


図 18 Ras 活性化は下流の Erk と Akt-FoxO を介して PntP1 の発現誘導をもたらす

(A) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#1</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#2</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#1</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#2</sup>、または Ras<sup>V12</sup> + FoxO クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(B) (A) と (図 5A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#1</sup>, n=12; Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#2</sup>, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#2</sup>, n=5; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=13。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005。スケールバー: 100 μm。

そこで次に、解析により明らかになった、PntP1 の発現制御に関わる Ras 下流因子に対して、*bantam* がもたらす影響を調べた。興味深いことに、*bantam* 過剰発現は Ras 活性化による Erk または Akt のリン酸化には影響しない一方で、Ras 活性化による FoxO の発現抑制を阻害することがわかった (図 19A-F)。同様に、Ras 誘導性の FoxO 発現抑制は *lgl* 欠失 (*lgl*<sup>-/-</sup>) または Yki<sup>S168A</sup> 過剰発現によっても阻害された (図 20)。これらの

結果は、*bantam* が FoxO の発現を回復させることによって Ras 誘導性の PntP1 の発現を抑制する可能性を強く示唆している。実際にこの可能性を検証した結果、*bantam* による PntP1 の発現抑制が *foxO* ノックダウンによってキャンセルされることがわかった(図 19G, H; ノックダウン効率は図 21 において確認)。さらに、FoxO 過剰発現によって Ras 誘導性の SA-β-gal 活性化と *dap* 発現上昇が阻害された (図 22A-F)。以上の結果より、*bantam* は Ras 活性化細胞において FoxO の発現を回復させ、これにより Ras 誘導性の Pnt の発現上昇とそれに続く細胞老化誘導を阻害することが明らかになった (図 22G)。

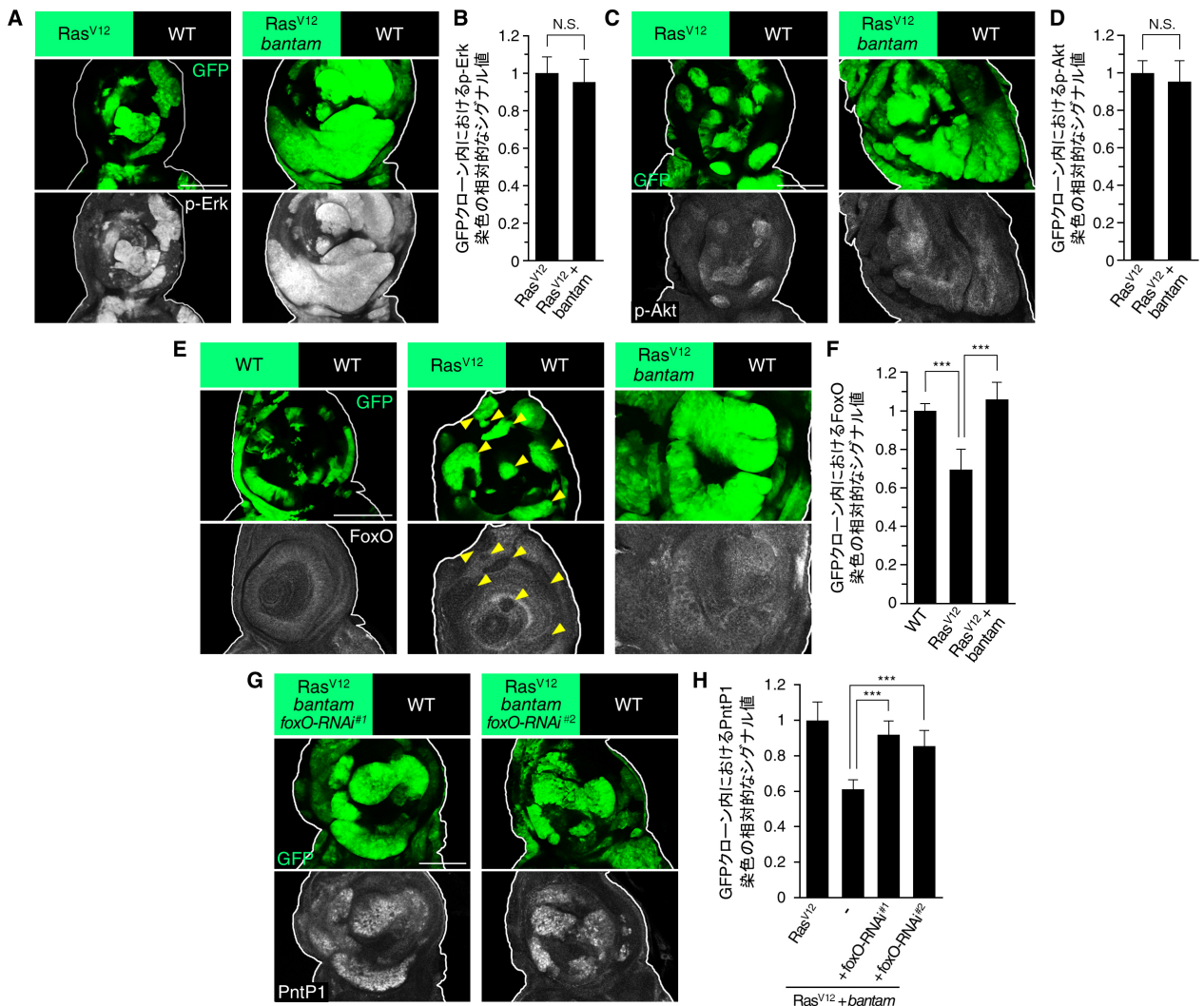


図 19 microRNA *bantam* は FoxO の発現回復を介して Ras 誘導性の PntP1 の発現を抑制する

(A) リン酸化 Erk の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* クロネを誘導後、p-Erk 染色を行った。(B) (A) に示した遺伝子型の GFP クローン内における p-Erk 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=6 (複眼-触角原基

の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=9. Mann-Whitney *U* 検定。(C) リン酸化 Akt の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* クローンを誘導後、p-Akt 染色を行った。

(D) (C) に示した遺伝子型の GFP クローン内における p-Akt 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=7 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=9. Mann-Whitney *U* 検定。(E) FoxO タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、WT、Ras<sup>V12</sup>、

または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* クローンを誘導後、FoxO 染色を行った。(F) (E) に示した遺伝子型の GFP クローン内における FoxO 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : WT, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=8; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=12. Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass

検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(G) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + *foxO-RNAi*<sup>#1</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + *foxO-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(H) (G)、(図 5A, Ras<sup>V12</sup>)、と (図 14A, Ras<sup>V12</sup> + *bantam*) に示した

遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=11; Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + *foxO-RNAi*<sup>#1</sup>, n=11; Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + *foxO-RNAi*<sup>#2</sup>, n=9. Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により

多重比較; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μm。

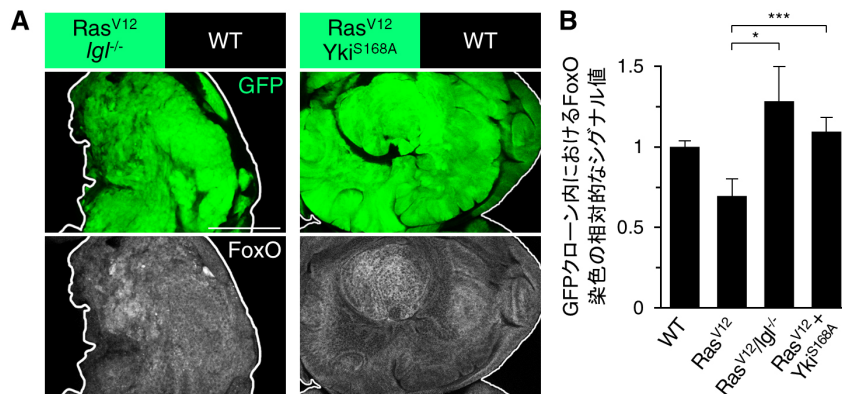


図 20 *Igl* 欠失 (*Igl*<sup>-/-</sup>) または *Yki*<sup>S168A</sup> 過剰発現は Ras 活性化細胞において FoxO の発現回復をもたらす

(A) FoxO タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup> クローンを誘導後、FoxO 染色を行った。(B) (A) と (図 19E, WT と Ras<sup>V12</sup>) に示した

遺伝子型の GFP クローン内における FoxO 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : WT, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=8; Ras<sup>V12</sup>/*Igl*<sup>-/-</sup>, n=5; Ras<sup>V12</sup> + *Yki*<sup>S168A</sup>, n=11. Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*P<0.05, \*\*\*P<0.005。スケールバー: 100

μm。



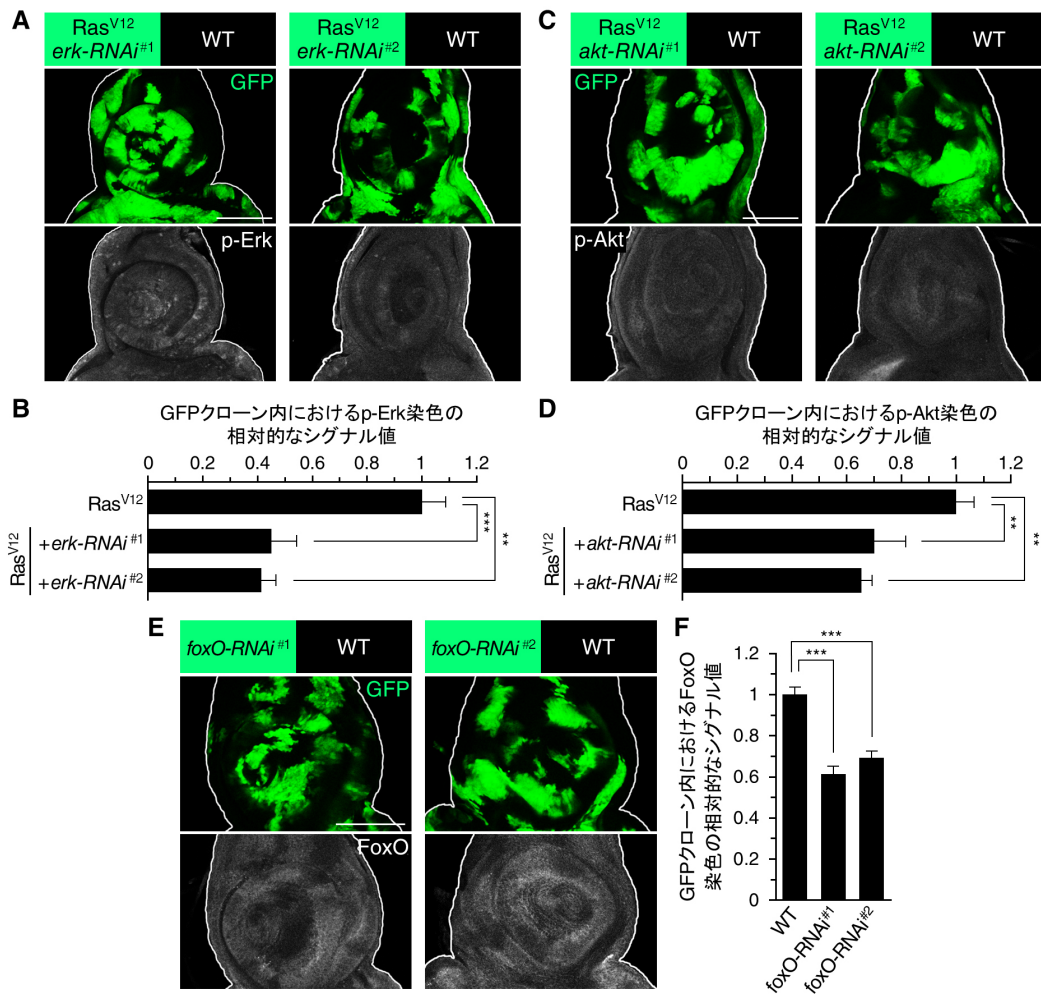
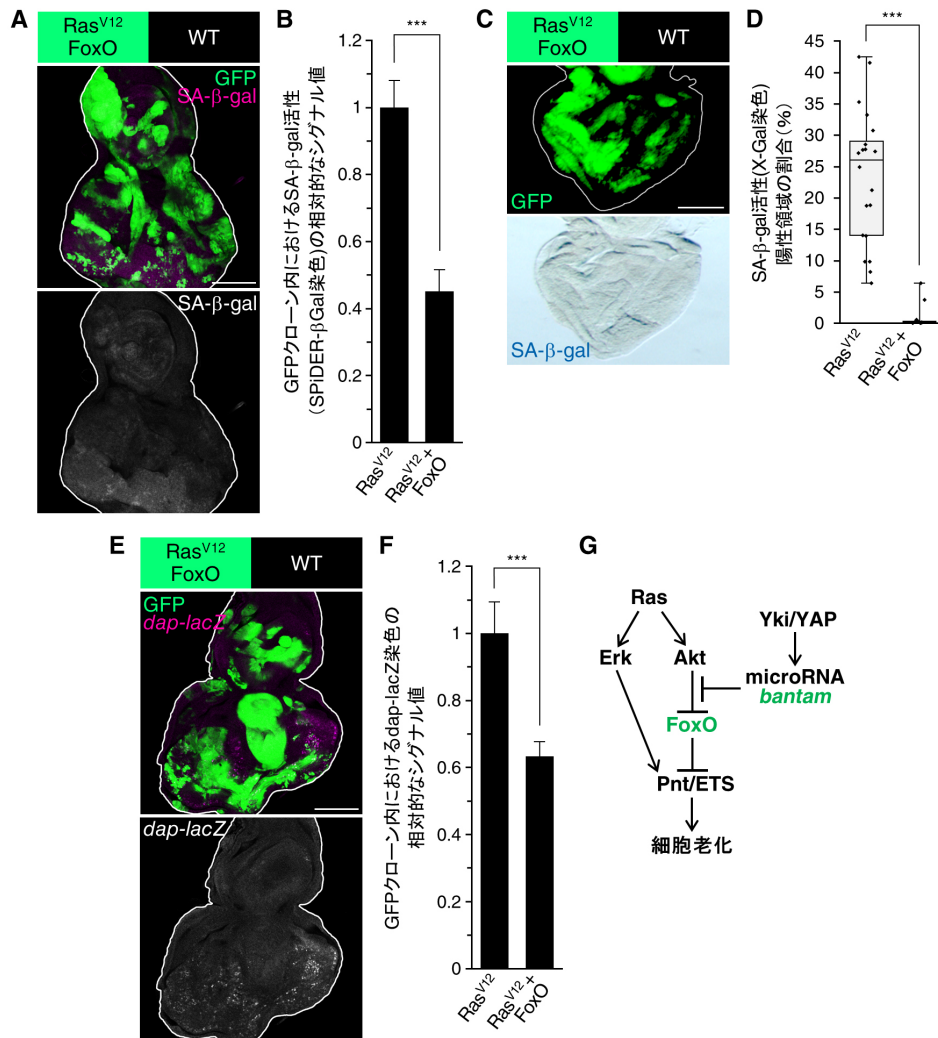


図 21 *erk-RNAi*, *akt-RNAi*, *foxO-RNAi* のノックダウン効果の確認

(A) リン酸化 Erk の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#1</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、p-Erk 染色を行った。(B) (A) と (図 19A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における p-Erk 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=6 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#1</sup>, n=8; Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#2</sup>, n=7。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005。(C) リン酸化 Akt の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#1</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、p-Akt 染色を行った。(D) (C) と (図 19C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における p-Akt 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=7 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#1</sup>, n=6; Ras<sup>V12</sup> + *akt-RNAi*<sup>#2</sup>, n=5。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*P<0.01。(E) FoxO タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した *foxO-RNAi*<sup>#1</sup> または *foxO-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、FoxO 染色を行った。(F) (E) と (図 19E, WT) に示した遺伝子型の GFP クローン内における FoxO 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : WT, n=8 (複眼-触角原基の数) ; *foxO-RNAi*<sup>#1</sup>, n=6; *foxO-RNAi*<sup>#2</sup>, n=6。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μ m。



## 図 22 FoxO は Ras 誘導性の細胞老化を阻害する

(A) SPiDER-βGal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + FoxO クローンを誘導後、SPiDER-βGal 染色を行った。(B) (A) と (図 15A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における SA-β-gal 活性 (SPiDER-βGal 染色) の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=13 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=15。Mann-Whitney *U* 検定; \*\*\*P<0.005。(C) X-Gal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + FoxO クローンを誘導後、X-Gal 染色を行った。(D) (C) と (図 6C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占める SA-β-gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>, n=20 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=12。Mann-Whitney *U* 検定; \*\*\*P<0.005。(E) *dap-lacZ* 発現の検出。*dap-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + FoxO クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。(F) (E) と (図 7A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *dap-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=19 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=11。Mann-Whitney *U* 検定; \*\*\*P<0.005。(G) Ras は下流の Erk 活性化と Akt を介した FoxO の発現抑制を介して PntP1 の発現を誘導する。FoxO は PntP1 発現の抑制因子であり、*bantam* は FoxO の発現回復によって、PntP1 の発現抑制をもたらす。全スケールバー: 100 μm。

#### 4-5. microRNA *bantam* の標的である *Trbl* は Ras 活性化に応じて FoxO の発現を抑制する

次に、*bantam* が Ras 活性化細胞において FoxO の発現回復をもたらすメカニズムを調べた。microRNA のデータベースをもとに解析を行ったところ、興味深いことに、3'UTR 内に *bantam* の標的サイトを 1 つ有する、進化的に高度に保存された偽性キナーゼ Tribbles (*Trbl*)<sup>67</sup> の過剰発現によって、*bantam* による FoxO の発現回復がキャンセルされることを見いだした (図 23A-C)。さらに、*bantam* 過剰発現 (図 19E, F) と同様に、*trbl* ノックダウンも Ras 活性化細胞において FoxO の発現回復をもたらした (図 23B, C; ノックダウン効率図 23D, E において確認)。この結果は Ras 活性化による FoxO の発現抑制に *Trbl* が必要であることを示しているが、過去の報告より、*Trbl* はユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解の足場として機能することがわかっており<sup>67</sup>、*Trbl* はこの働きによって FoxO の発現を抑制すると予想される。同時に、Ras 活性化により *Trbl* の活性が亢進する可能性も示唆されるが、私は異なる 2 種類の Gal4 エンハンサートラップシステムを用いた解析を行い、Ras 活性化によって *trbl* の転写発現が誘導されることを発見した (図 24)。したがって、これらの結果から、*bantam* による FoxO の発現回復は、*Trbl* の発現抑制によって生じることが強く示唆された。

そこで、*bantam* が *trbl* mRNA の 3'UTR を直接標的とするかどうか調べた。この目的のために、*trbl* 3'UTR sensor の作成を行った (図 23F)。作成したのは、無傷の *trbl* 3'UTR (*trbl* 3'UTR<sup>WT</sup>) もしくは *bantam* の標的サイトを欠失させた *trbl* 3'UTR (*trbl* 3'UTR<sup>Δ*bantam*</sup>) を挿入した、tubulin promoter (*tubP*)-EGFP reporter であり、EGFP の発現量を評価することによって *trbl* 3'UTR に対する制御の有無を判断できる。これら *trbl* 3'UTR sensor を用いて、ショウジョウバエ翅原基において解析した結果、野生型 *Yki* (*Yki*<sup>WT</sup>) の過剰発現によって *trbl* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> のシグナルが消失し、このシグナル抑制は *bantam-SP* の過剰発現によってブロックされることがわかった (図 23G)。一方で、*Yki*<sup>WT</sup> を過剰発現しても *trbl* 3'UTR sensor<sup>Δ*bantam*</sup> のシグナルは抑制されなかった (図 23H)。よって、これらの結果から、*bantam* は *trbl* mRNA を直接標的とすることが示された (最近、別の研究グループによっても同様の報告があった<sup>68</sup>)。



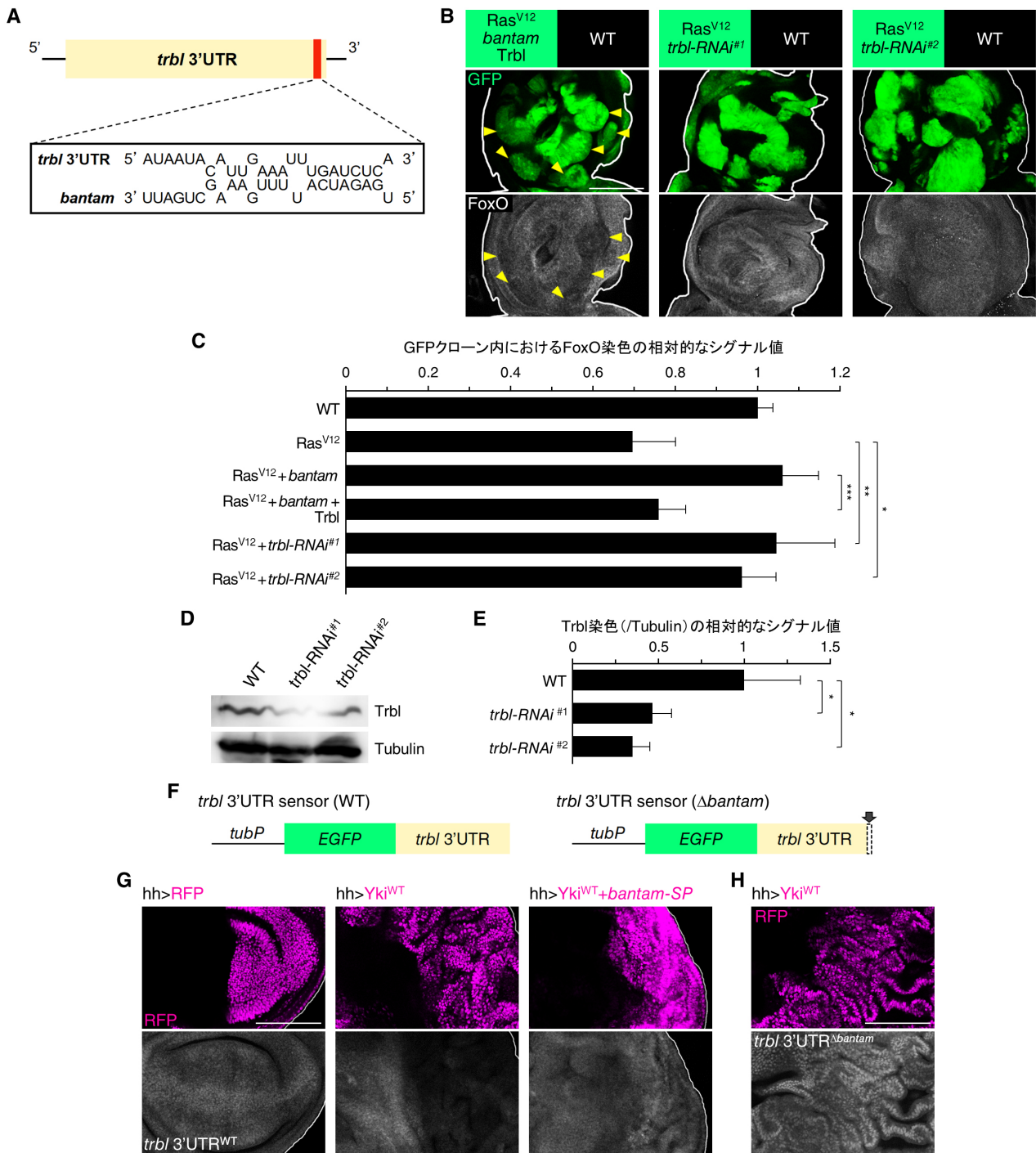
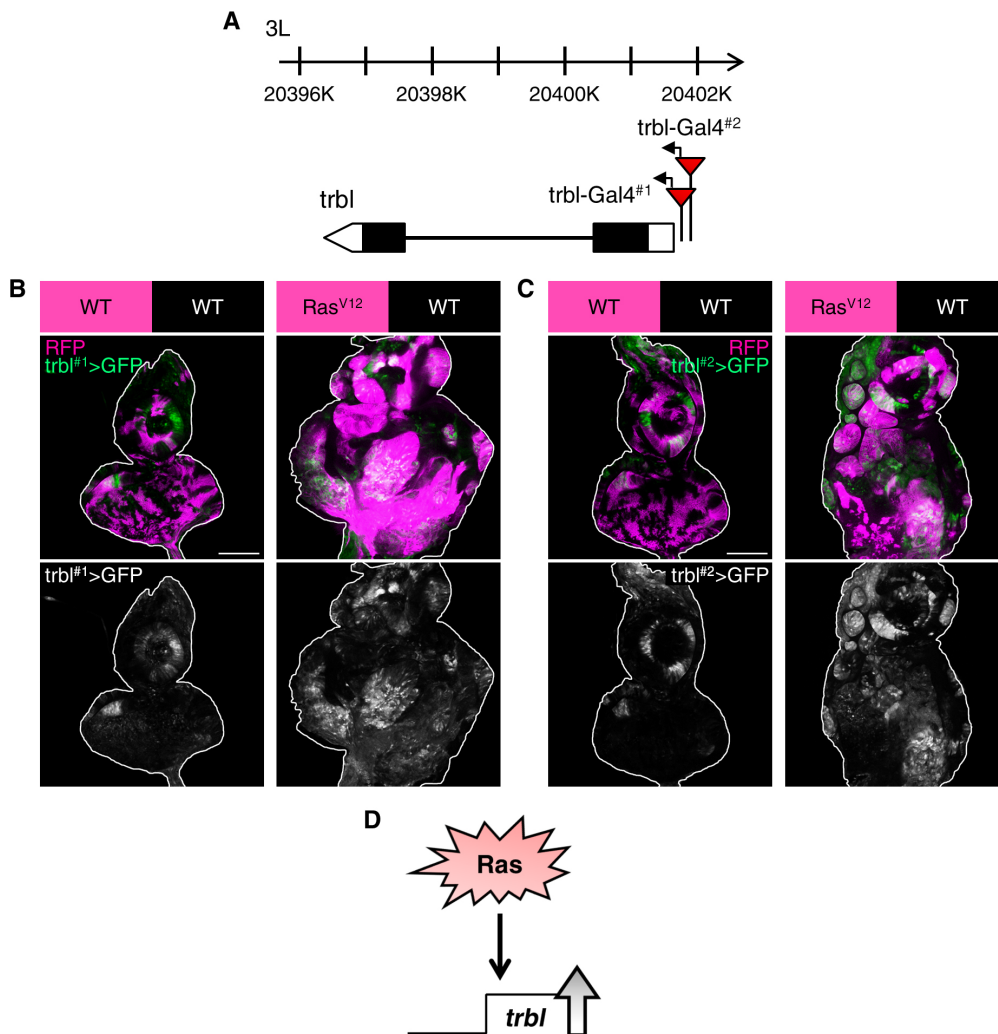


図 23 Trbl は Ras 誘導性の FoxO 発現抑制に必要であり、bantam は trbl mRNA を直接抑制することによって FoxO の発現回復をもたらす

(A) *trbl* 3'UTR は microRNA *bantam* の標的候補サイトを有する。(B) FoxO タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + Trbl、Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>、または Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、FoxO 染色を行った。(C) (B) と (図 19E) に示した遺伝子型の GFP クローン内における FoxO 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏

差) : WT, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup>, n=8; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=12; Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + Trbl, n=10; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup>, n=7. Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005. (D) Trbl タンパク発現の検出。Act>y+>Gal4 と eyFLP により、複眼-触角原基全体に、GFP 単独 (WT)、*trbl-RNAi*<sup>#1</sup>、または *trbl-RNAi*<sup>#2</sup> を誘導後、成虫頭部の抽出液を採取し、Trbl 抗体と Tubulin 抗体 (ローディングコントロール) を用いてウエスタンブロッティングを行った。(E) (D) に示した遺伝子型における Trbl 抗体のプロットのシグナル値 (Tubulin 抗体のプロットのシグナル値で除算) の相対値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差)。独立して 3 回の実験を行った。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*P<0.05. (F) 2 種類の *trbl* 3'UTR sensor。 *trbl* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> は変異のない *trbl* 3'UTR を有する tubP-EGFP レポーターであり、一方で、 *trbl* 3'UTR sensor<sup>Δbantam</sup> は *bantam* の標的候補サイトを欠損させた *trbl* 3'UTR を有する tubP-EGFP レポーターである (欠損部分は矢印が示す通り)。(G) *trbl* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> を導入した翅原基の後側部分に、 *hedgehog* (*hh*)-Gal4 により、RFP 単独 (WT)、Yki<sup>WT</sup>、または Yki<sup>WT</sup> + *bantam-SP* を誘導した。各遺伝子型における代表的画像を示す : WT, n=11 (翅原基の数) ; Yki<sup>WT</sup>, n=11; Yki<sup>WT</sup> + *bantam-SP*, n=11. (H) *trbl* 3'UTR sensor<sup>Δbantam</sup> を導入した翅原基の後側部分に、 *hh*-Gal4 により Yki<sup>WT</sup> を誘導した。観察した 10 枚の翅原基の中から代表的な画像を示す。全スケールバー: 100 μm。



#### 図 24 Ras 活性化は *trbl* の転写発現を誘導する

(A) *trbl* 遺伝子座 (77C1) 周辺のゲノム領域と 2 種類の Gal4 エンハンサートラップ (*trbl-Gal4<sup>#1</sup>* (*trbl<sup>NP3530</sup>*)と *trbl-Gal4<sup>#2</sup>* (*trbl<sup>NP0940</sup>*), 赤い三角形が示す通り)。(B) *trbl-Gal4<sup>#1</sup>* による *trbl* 発現の検出。*trbl-Gal4<sup>#1</sup>* と *UAS-GFP* を導入した複眼-触角原基において、QF/QUAS システムを用いて、RFP 標識した WT または Ras<sup>V12</sup> クローンを誘導した。いずれの遺伝子型においても、観察した 6 枚の翅原基の中から代表的な画像を示す。(C) *trbl-Gal4<sup>#2</sup>* による *trbl* 発現の検出。*trbl-Gal4<sup>#2</sup>* と *UAS-GFP* を導入した複眼-触角原基において、QF/QUAS システムを用いて、RFP 標識した WT または Ras<sup>V12</sup> クローンを誘導した。各遺伝子型における代表的画像を示す: WT, n=5 (複眼-触角原基の数); Ras<sup>V12</sup>, n=8。(D) *trbl* の転写発現は Ras 活性化に応じて誘導される。全スケールバー: 100  $\mu$  m。

ここまでの結果と一致して、Trbl 過剰発現によって、*bantam* による PntP1 の発現抑制がキャンセルされることがわかった (図 25)。一方で、*trbl* ノックダウンにより Ras 誘導性の PntP1 の発現が抑制され、その上、この発現抑制は *foxO* ノックダウンによりキャンセルされた (図 25)。そしてさらに、*trbl* ノックダウンにより、Ras 誘導性の SA- $\beta$ -gal 活性化と *dap* の発現上昇が阻害された (図 26A-F)。以上の結果から、*bantam* の標的である Trbl は Ras 活性化に応じて FoxO の発現を抑制し、これにより Pnt の発現上昇をもたらすことが明らかになった。よって、*bantam* により Trbl の発現が直接抑制されると FoxO の発現回復が起こり、Pnt の発現は抑制される (図 26G)。

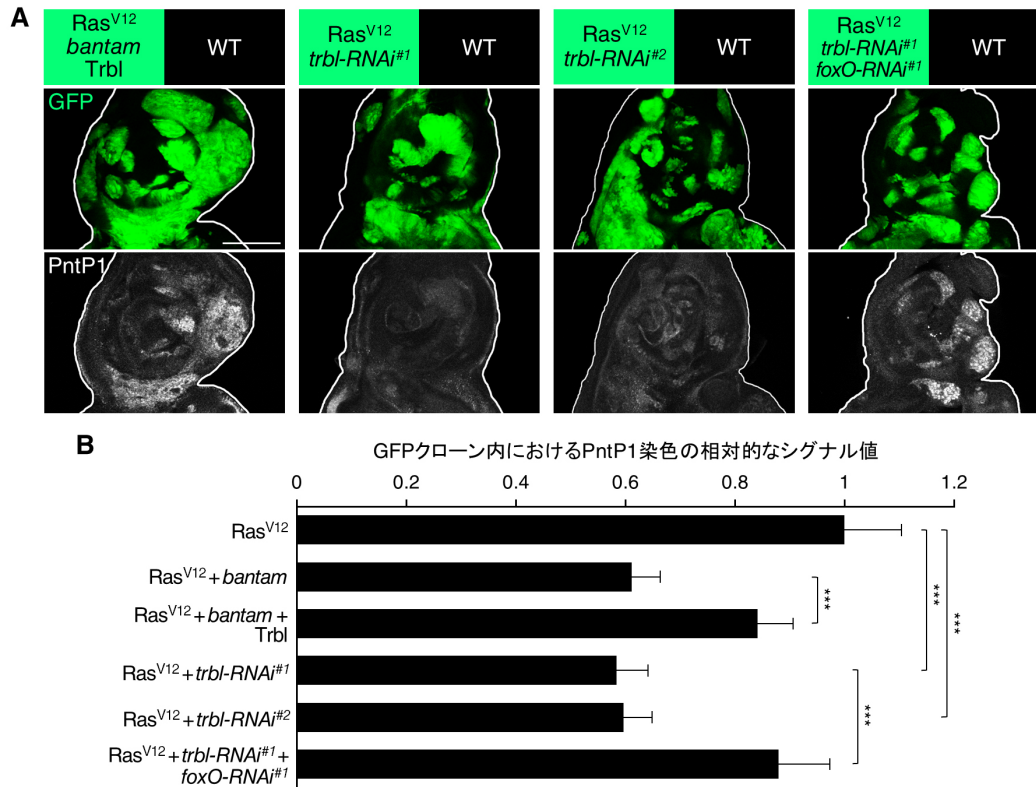


図 25 *bantam* による *trbl* 発現抑制は FoxO を介して PntP1 の発現抑制をもたらす

(A) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + *Trbl*、Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup>、または Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup> + *foxO-RNAi*<sup>#1</sup> クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(B) (A)、(図 5A, Ras<sup>V12</sup>)、そして (図 14A, Ras<sup>V12</sup> + *bantam*) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=11; Ras<sup>V12</sup> + *bantam* + *Trbl*, n=9; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup> + *foxO-RNAi*<sup>#1</sup>, n=11。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。スケールバー: 100 μm。

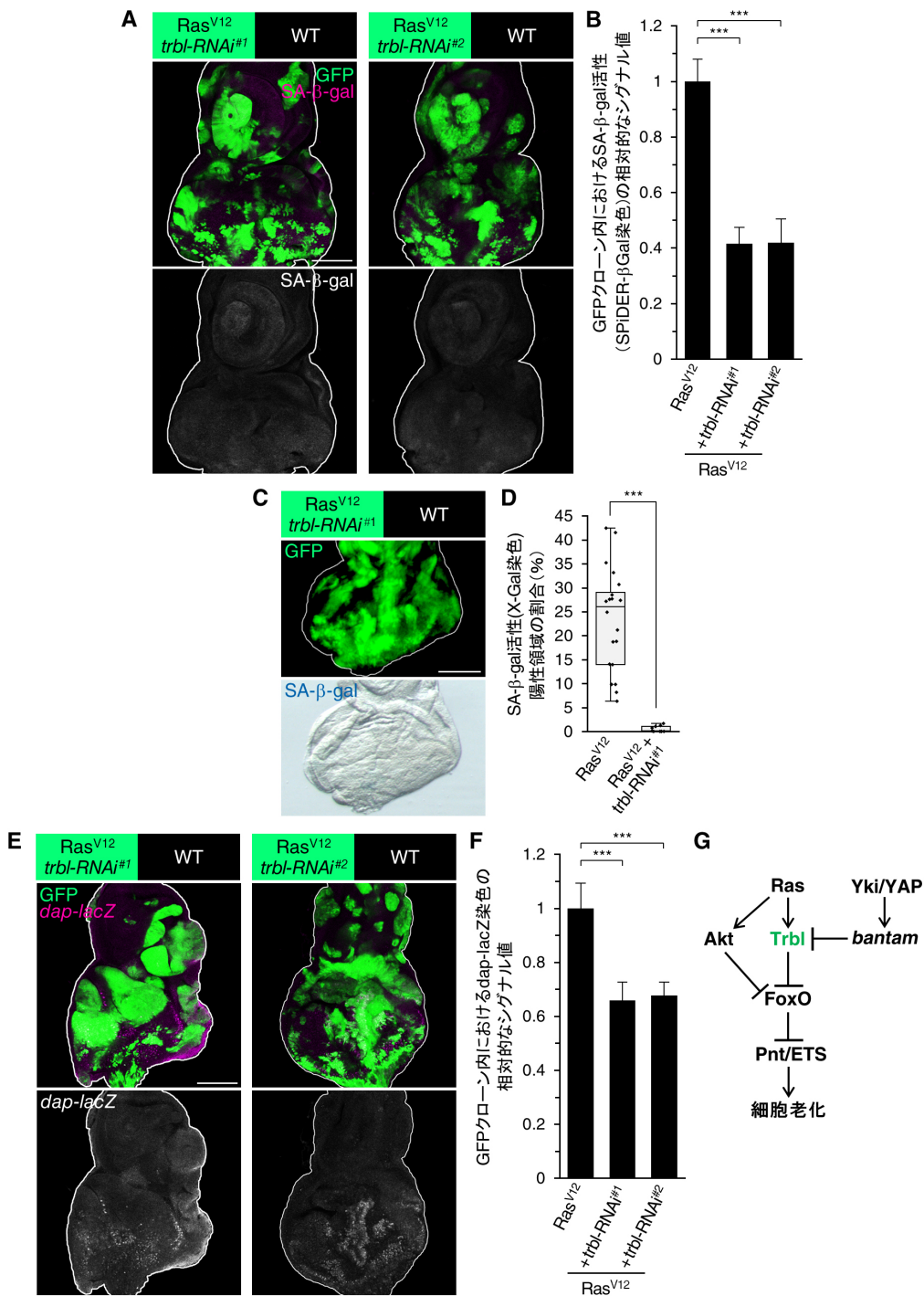


図 26 *trbl* ノックダウンは Ras 誘導性の細胞老化を阻害する

(A) SPiDER-βGal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、SPiDER-βGal 染色を行った。(B) (A) と (図 15A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における SA-β-gal 活性 (SPiDER-βGal 染色) の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=13 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>, n=14; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup>, n=12. Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重

比較; \*\*\*P<0.005。(C) X-Gal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup> クローンを誘導後、X-Gal 染色を行った。(D) (C) と (図 6C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占める SA-β-gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>, n=20 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>, n=9。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。(E) *dap-lacZ* 発現の検出。*dap-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup> クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。(F) (E) と (図 7A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *dap-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=19 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>, n=13; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#2</sup>, n=9。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(G) *Trbl* は Ras 活性化による FoxO の発現抑制に必要であり、*bantam* は *trbl* mRNA を直接抑制することによって FoxO の発現を回復させ、*Pnt* の発現抑制および細胞老化の阻害をもたらす。全スケールバー: 100 μ m。

#### 4-6. FoxO は *miR-9c* と *miR-79* を発現誘導することによって *Pnt* の発現を抑制する

ではいったい FoxO はどのようにして *Pnt* の発現を抑制するのだろうか? このメカニズムを調べるにあたり、まず最初に、興味深い事実に気づいた。先に示した通り、FoxO 過剰発現は Ras 誘導性の *PntP1* の発現上昇を抑制したが (図 18)、これはタンパクレベルでの発現抑制であった。しかし対照的に、FoxO 過剰発現は Ras 活性化による *pntP1* の転写発現誘導は抑制しなかった (*pntP1* の *lacZ* エンハンサートラップ系統により検出) (図 27A, B)。同様に、*Yki*<sup>S168A</sup> 過剰発現、*bantam* 過剰発現、もしくは *trbl* ノックダウンのいずれの場合においても、*pntP1* の転写発現誘導は抑制されなかった (図 27A, B)。これらの結果から、*Yki-bantam-Trbl-FoxO* シグナル軸による *PntP1* の発現抑制は転写後調節による可能性が高いと考えられる (図 27C)。一方で、*erk* ノックダウンによっては、Ras 活性化による *pntP1* の転写発現誘導が抑制された (図 27A, B)。このことは、*Erk* が Ras よる *pntP1* の転写発現に必要なことを示していると言える (図 27C)。



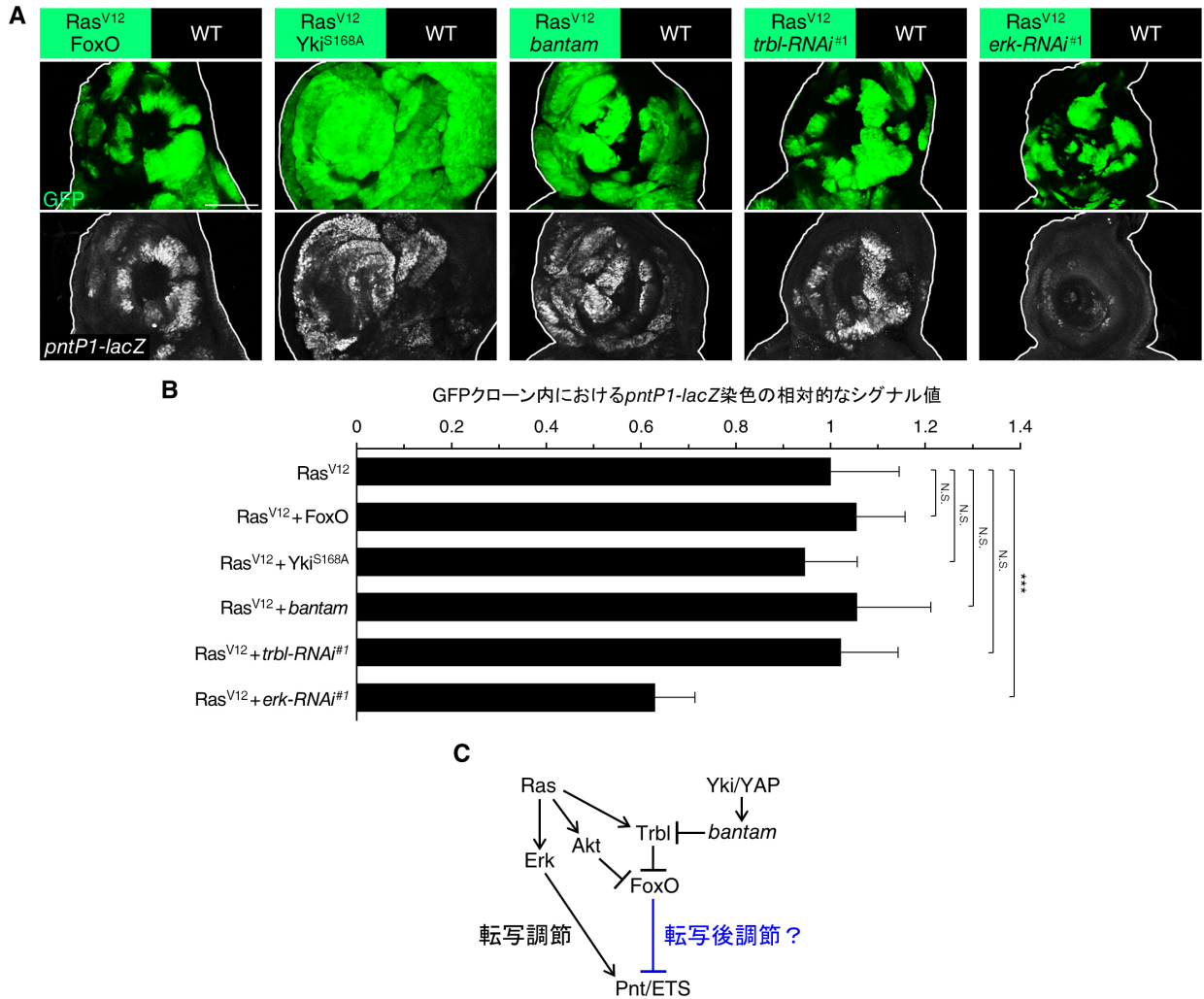


図 27 FoxO は転写レベルでは PntP1 の発現を抑制しない

(A) *pntP1-lacZ* 発現の検出。 *pntP1-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + FoxO、Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>、Ras<sup>V12</sup> + *bantam*、Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup> または Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#1</sup> クローンを誘導後、 $\beta$ -gal 染色を行った。(B) (A) と (図 4B, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *pntP1-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値 $\pm$ 標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=10; Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>, n=12; Ras<sup>V12</sup> + *bantam*, n=13; Ras<sup>V12</sup> + *trbl-RNAi*<sup>#1</sup>, n=10; Ras<sup>V12</sup> + *erk-RNAi*<sup>#1</sup>, n=8. Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(C) Pnt の発現は、Ras 下流において、Erk により転写レベルで誘導される一方で、FoxO により転写後レベルで抑制されると考えられる。スケールバー: 100  $\mu$  m。

次に、FoxO が転写後調節により PntP1 の発現を抑制する可能性を検討した結果、非常に興味深いことに、FoxO が microRNA を介して PntP1 の発現を抑制することを見出した。microRNA データベースによって、*pnt* 3'UTR には *miR-9c* と *miR-79* の標的サイトが存在することが判明した (図 28A)。注目すべきことに、この 2 種類の microRNA の

遺伝子座はゲノム上のほぼ同じ場所に存在し、しかも、周辺のゲノム領域には FoxO の結合サイト (5'-GTAAA(T/C)AA-3'または 5'-TT(A/G)TTTAC-3')<sup>69</sup> が多数存在した (図 28B)。これらの知見は FoxO が *miR-9c/79* を発現誘導することによって PntP1 の発現を抑制することを示唆している。この可能性を検証したところ、FoxO による PntP1 の発現抑制が *miR-9c-SP* または *miR-79-SP* (*miR-9c* または *miR-79* に対するインヒビター) の過剰発現によってキャンセルされたことに加え、*miR-9c* もしくは *miR-79* の過剰発現によって Ras 誘導性の PntP1 の発現上昇が抑制されることがわかった (図 29A, B)。その上、Fluorescence in situ hybridization により、Ras 活性化細胞において FoxO (もしくは Yki<sup>S168A</sup>) を過剰発現した際に、*miR-9c* と *miR-79* の発現が強力に誘導されることを見いだした (図 29C-F および図 30)。

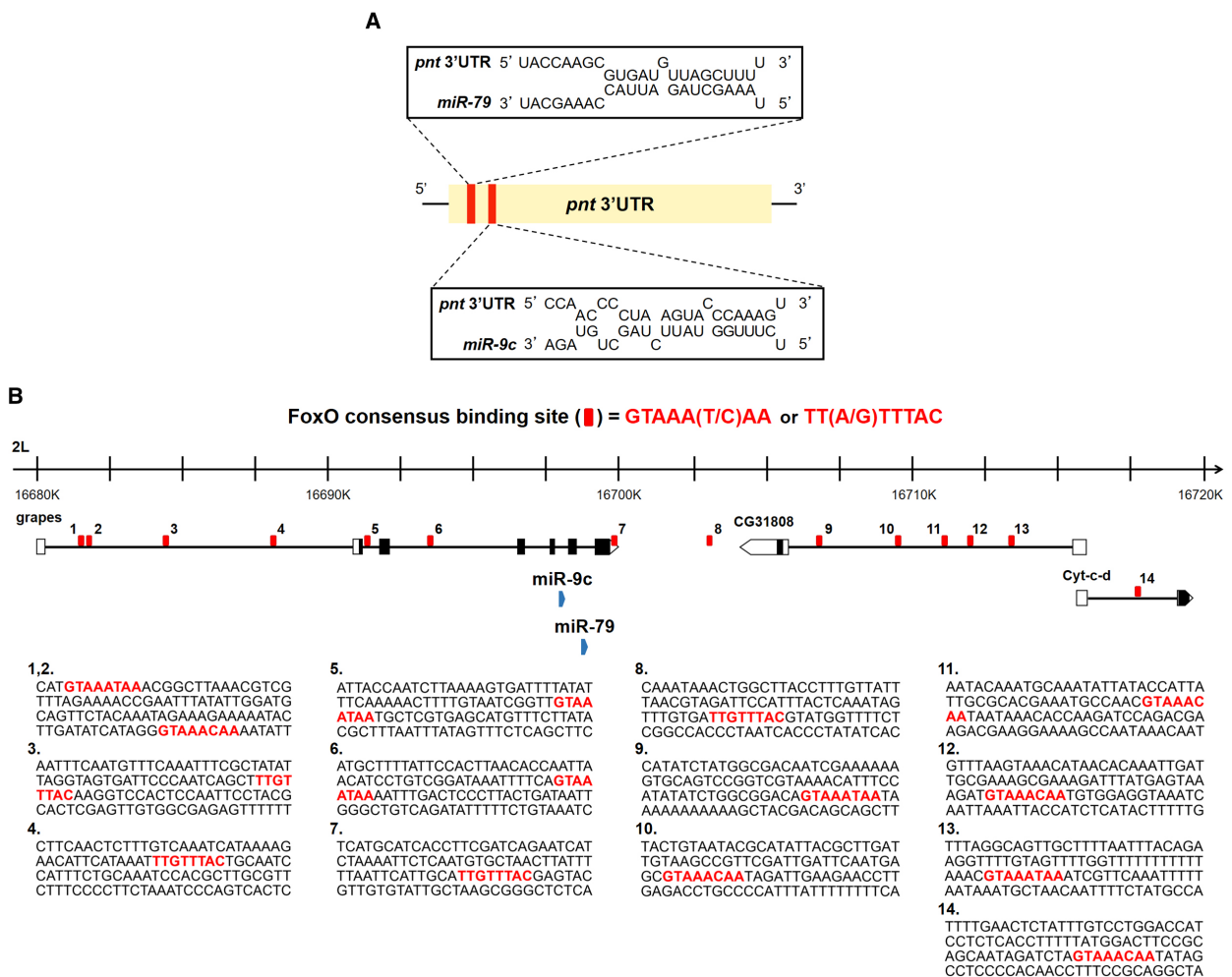




図 28 *pnt* 3'UTR を標的とする可能性のある *miR-9c* と *miR-79* の遺伝子座の周辺には多数の FoxO 結合サイトが存在する

(A) *pnt* 3'UTR は *miR-9c* と *miR-79* の標的候補サイトを有する。(B) *miR-9c* と *miR-79* の遺伝子座 (36A10) 周辺 20kbp 以内のゲノム領域における FoxO 結合サイト (GTAAA(T/C)AA または TT(A/G)TTTAC) (赤い四角で示す通り)。

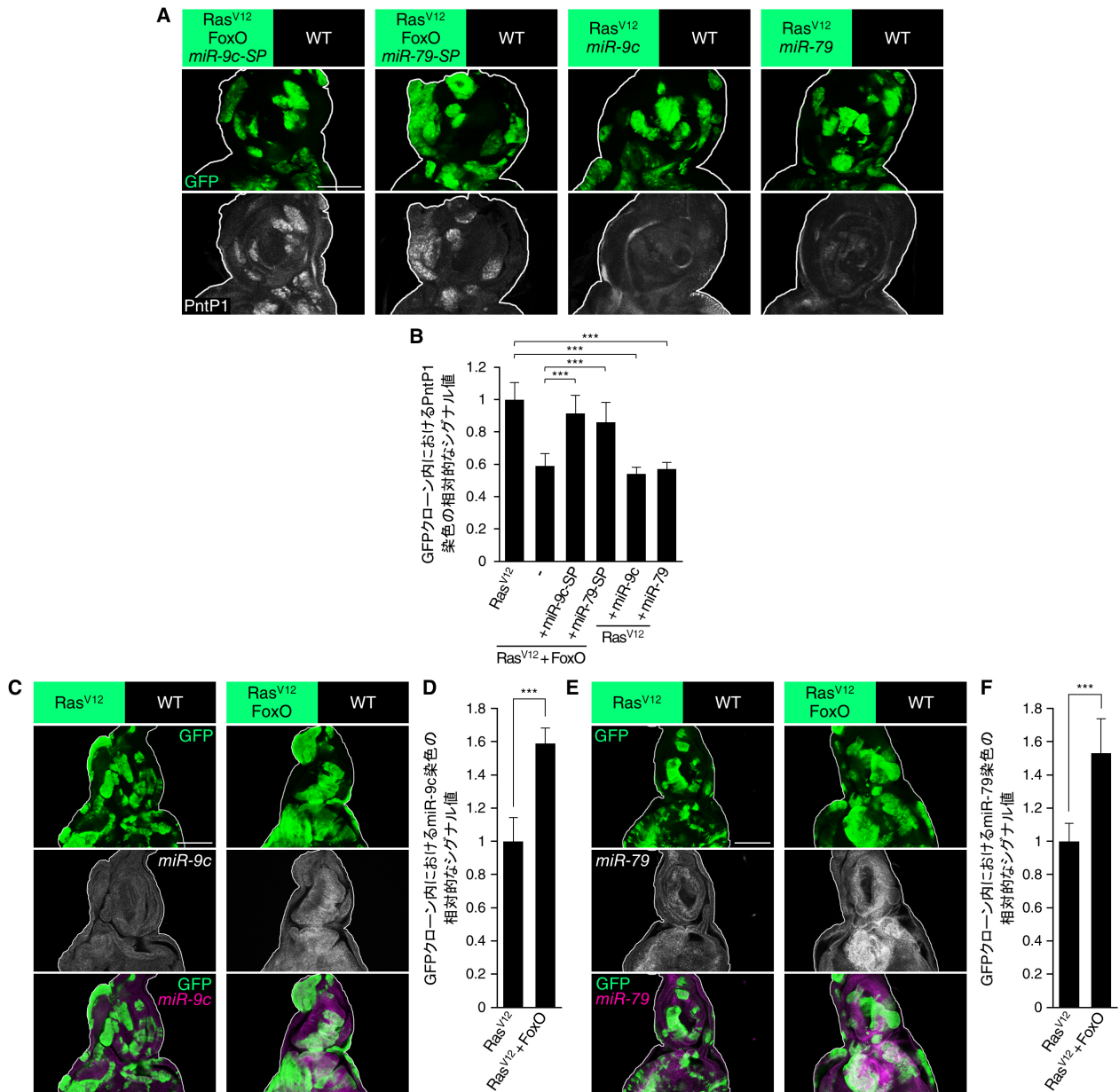


図 29 FoxO は *miR-9c* と *miR-79* の発現を誘導することにより PntP1 の発現を抑制する

(A) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した、Ras<sup>V12</sup> + FoxO + *miR-9c-SP* (*miR-9c* inhibitor)、Ras<sup>V12</sup> + FoxO + *miR-79-SP* (*miR-79* inhibitor)、Ras<sup>V12</sup> + *miR-9c*、または Ras<sup>V12</sup>

+ *miR-79* クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(B) (A)、(図 5A, Ras<sup>V12</sup>)、そして (図 18A, Ras<sup>V12</sup> + FoxO) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=12 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=13; Ras<sup>V12</sup> + FoxO + *miR-9c-SP*, n=9; Ras<sup>V12</sup> + FoxO + *miR-79-SP*, n=10; Ras<sup>V12</sup> + *miR-9c*, n=11; Ras<sup>V12</sup> + *miR-79*, n=11。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(C) *miR-9c* 発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> または Ras<sup>V12</sup> + FoxO クローンを誘導後、fluorescence in situ hybridization により *miR-9c* 染色を行った。(D) (C) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *miR-9c* 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=10。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。(E) *miR-79* 発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> または Ras<sup>V12</sup> + FoxO クローンを誘導後、fluorescence in situ hybridization により *miR-79* 染色を行った。(F) (E) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *miR-79* 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + FoxO, n=11。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μm。

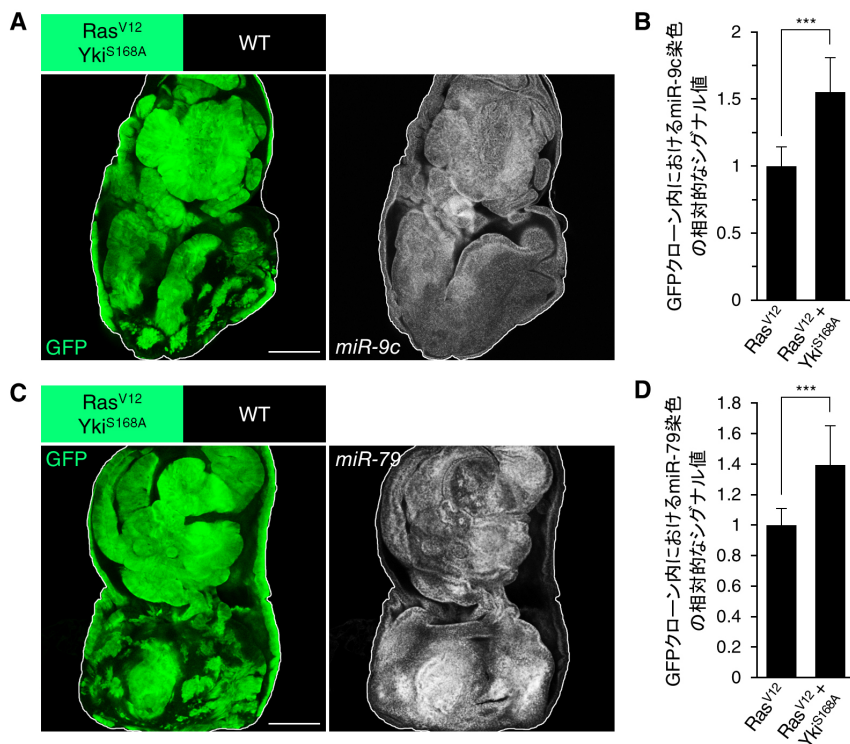
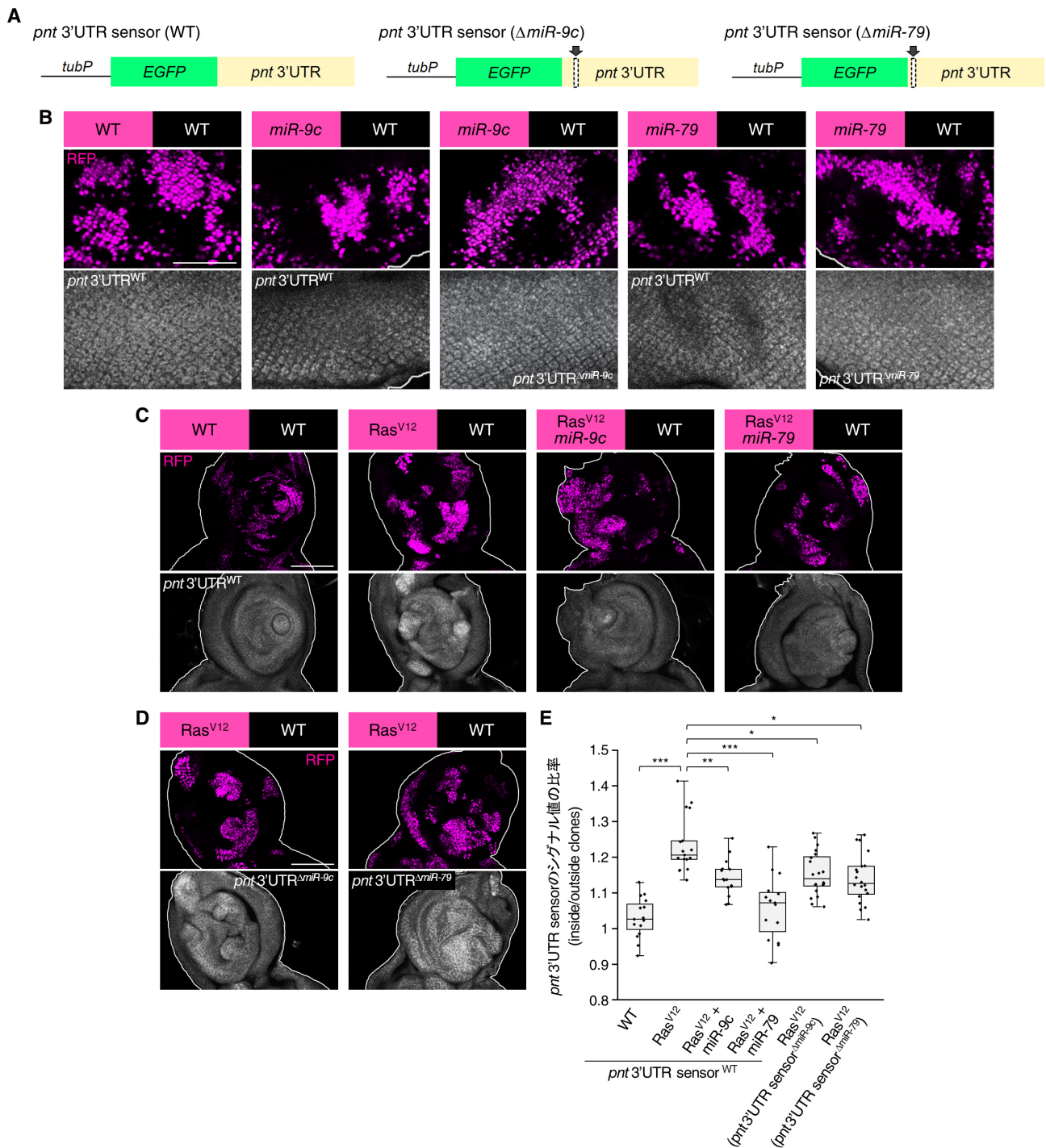


図 30 Yki は Ras 活性化細胞において *miR-9c* と *miR-79* の発現誘導をもたらす

(A) *miR-9c* 発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup> クローンを誘導後、fluorescence in situ hybridization により *miR-9c* 染色を行った。(B) (A) と (図 29C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *miR-9c* 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>, n=7。Mann-Whitney U 検定; \*\*\*P<0.005。(C) *miR-79* 発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> または Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup> クローンを誘導後、fluorescence in situ hybridization により *miR-79* 染色を行っ

た。(D) (C) と (図 29E, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *miR-79* 染色の相対的なシグナル値を示す棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=8 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + Yki<sup>S168A</sup>, n=7. Mann-Whitney *U* 検定; \*\*\*P<0.005. 全スケールバー: 100 μ m。

そこでさらに、*pnt* 3'UTR sensor (図 31A) を作成し、*miR-9c* と *miR-79* が *pnt* 3'UTR を直接標的とするかどうか調べた。ここで作成した *pnt* 3'UTR sensor は、無傷の *pnt* 3'UTR (*pnt* 3'UTR<sup>WT</sup>)、もしくは *miR-9c* または *miR-79* の標的サイトを欠失させた *pnt* 3'UTR (*pnt* 3'UTR<sup>Δ*miR-9c*</sup> または *pnt* 3'UTR<sup>Δ*miR-79*</sup>) を挿入した tubP-EGFP reporter である。解析の結果、*miR-9c* または *miR-79* を過剰発現するクローンでは、*pnt* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> のシグナル抑制が観察されたが、一方で、それぞれの標的サイトを欠失させた *pnt* 3'UTR sensor<sup>Δ*miR-9c*</sup> もしくは *pnt* 3'UTR sensor<sup>Δ*miR-79*</sup> のシグナルは抑制されないことがわかった (図 31B)。このことから、*miR-9c* と *miR-79* が *pntP1* mRNA を直接標的とすることが示唆された。さらに、*pnt* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> のシグナルが Ras 活性化細胞クローンにおいて上昇し、そしてこのシグナル上昇が *miR-9c* もしくは *miR-79* の過剰発現によって抑制されることがわかった (図 31C, E)。その上、対照的に、Ras 活性化がもたらす *pnt* 3'UTR sensor<sup>Δ*miR-9c*</sup> もしくは *pnt* 3'UTR sensor<sup>Δ*miR-79*</sup> に対する影響は小さかった (図 31D, E)。これらの結果から、Ras 誘導性の *pntP1* mRNA の発現上昇が *miR-9c* と *miR-79* によっておそらく直接的に抑制されることが示唆された。



**図 31 *miR-9c* と *miR-79* は *pnt* 3'UTR を直接標的とする**

(A) 3種類の *pnt* 3'UTR sensor。 *pnt* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> は変異のない *pnt* 3'UTR を有する tubP-EGFP レポーターであり、一方で、 *pnt* 3'UTR sensor <sup>$\Delta miR-9c$</sup>  と *pnt* 3'UTR sensor <sup>$\Delta miR-79$</sup>  はそれぞれ *miR-9c* または *miR-79* の標的候補サイトを欠損させた *pnt* 3'UTR を有する tubP-EGFP レポーターである (欠損部分は矢印が示す通り)。(B) *pnt* 3'UTR sensor<sup>WT</sup> を導入した複眼-触角原基に、RFP 標識した、WT、*miR-9c*、または *miR-79* クローンを誘導した。*pnt* 3'UTR sensor <sup>$\Delta miR-9c$</sup>  を導入した複

眼-触角原基に、RFP 標識した *miR-9c* クローンを誘導した。さらに、*pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup>* を導入した複眼-触角原基に、RFP 標識した *miR-79* クローンを誘導した。各遺伝子型における代表的な画像を示す：WT (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=15 (複眼-触角原基の数) ; *miR-9c* (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=18; *miR-9c* (*pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-9c</sup>*), n=18; *miR-79* (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=16; *miR-79* (*pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup>*), n=19。(C) *pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>* を導入した複眼-触角原基に、RFP 標識した、WT、*Ras<sup>V12</sup>*、*Ras<sup>V12</sup> + miR-9c*、または *Ras<sup>V12</sup> + miR-79* クローンを誘導した。(D) *pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-9c</sup>* または *pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup>* を導入した複眼-触角原基に、RFP 標識した *Ras<sup>V12</sup>* を誘導した。(E) (C) と (D) に示した遺伝子型における、RFP クローン外の *pnt 3'UTR sensor* のシグナル値に対する、RFP クローン内の *pnt 3'UTR sensor* のシグナル値の比率を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : WT (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=15 (複眼-触角原基の数) ; *Ras<sup>V12</sup>* (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=17; *Ras<sup>V12</sup> + miR-9c* (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=15; *Ras<sup>V12</sup> + miR-79* (*pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>*), n=15; *Ras<sup>V12</sup>* (*pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-9c</sup>*), n=20; *Ras<sup>V12</sup>* (*pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup>*), n=20。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005。スケールバー: 50 μm (B) と 100 μm (C と D)。

さらなる解析により、*miR-9c* または *miR-79* の過剰発現によって、*Ras* 誘導性の SA-β-gal 活性化と *dap* の発現上昇がいずれも阻害されることがわかった (図 32)。その上、*Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>-</sup>* 悪性腫瘍において *miR-9c-SP* もしくは *miR-79-SP* を過剰発現した場合には、PntP1 の発現と SA-β-gal 活性が回復したことに加え、その腫瘍増殖が制限された (図 33)。したがって、以上の結果から、FoxO は *miR-9c* と *miR-79* を発現誘導することによって PntP1 の発現を抑制し、これにより細胞老化を阻害、腫瘍増殖を促進すると結論づけた。



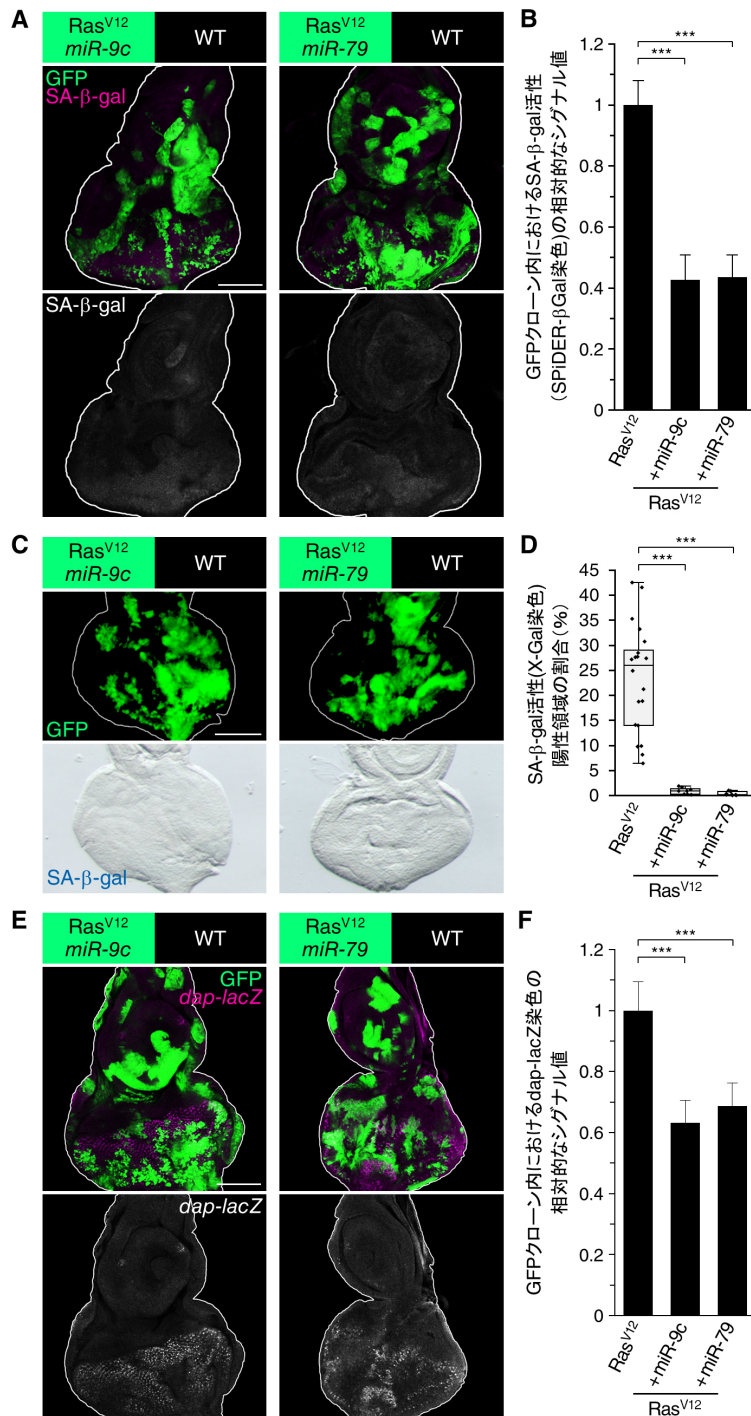
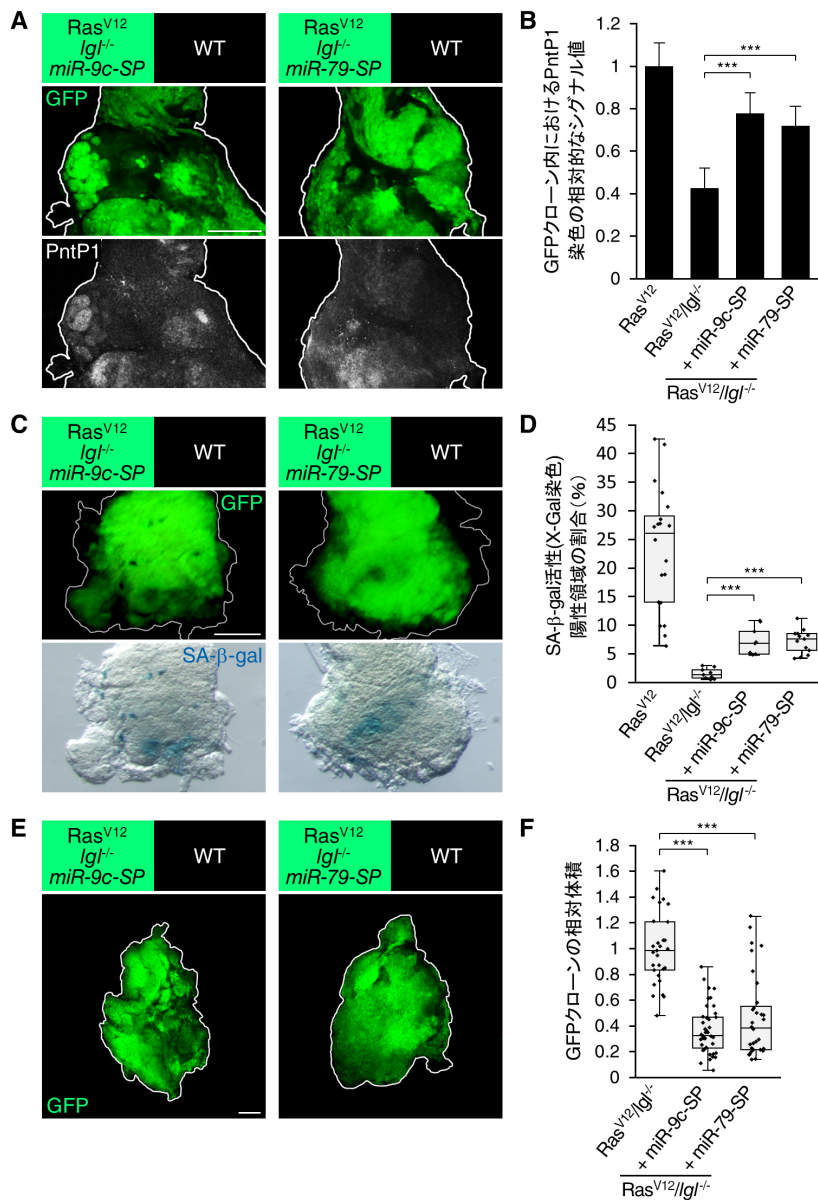


図 32 *miR-9c* と *miR-79* は Ras 誘導性の細胞老化を阻害する

(A) SPiDER-βGal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + *miR-9c* または Ras<sup>V12</sup> + *miR-79* クローンを誘導後、SPiDER-βGal 染色を行った。(B) (A) と (図 15A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における SA-β-gal 活性 (SPiDER-βGal 染色) の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=13 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + *miR-9c*, n=13; Ras<sup>V12</sup> + *miR-79*, n=12。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。

(C) X-Gal を用いた SA-β-gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + miR-9c または Ras<sup>V12</sup> + miR-79 クローンを誘導後、X-Gal 染色を行った。(D) (C) と (図 6C, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占める SA-β-gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) : Ras<sup>V12</sup>, n=20 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + miR-9c, n=8; Ras<sup>V12</sup> + miR-79, n=9。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。

(E) *dap-lacZ* 発現の検出。*dap-lacZ* を導入した複眼-触角原基に、GFP 標識した Ras<sup>V12</sup> + miR-9c または Ras<sup>V12</sup> + miR-79 クローンを誘導後、β-gal 染色を行った。(F) (E) と (図 7A, Ras<sup>V12</sup>) に示した遺伝子型の GFP クローン内における *dap-lacZ* 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値±標準偏差) : Ras<sup>V12</sup>, n=19 (複眼-触角原基の数) ; Ras<sup>V12</sup> + miR-9c, n=10; Ras<sup>V12</sup> + miR-79, n=10。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100 μ m。





**図 33 *miR-9c* または *miR-79* の抑制は  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$  悪性腫瘍において PntP1 発現と SA- $\beta$ -gal 活性を回復させ、腫瘍増殖を制限する**

(A) PntP1 タンパク発現の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-9c-SP$  または  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-79-SP$  クローンを誘導後、PntP1 染色を行った。(B) (A)、(図 4 F,  $Ras^{V12}$ )、そして (図 13A,  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$ ) に示した遺伝子型の GFP クローン内における PntP1 染色の相対的なシグナル値の棒グラフ (平均値 $\pm$ 標準偏差) :  $Ras^{V12}$ , n=12 (複眼-触角原基の数);  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$ , n=10;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-9c-SP$ , n=16;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-79-SP$ , n=16。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(C) X-Gal を用いた SA- $\beta$ -gal 活性の検出。複眼-触角原基において、GFP 標識した  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-9c-SP$  または  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-79-SP$  クローンを誘導後、X-Gal 染色を行った。(D) (C)、(図 6C,  $Ras^{V12}$ )、そして (図 17A,  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$ ) に示した遺伝子型の複眼-触角原基全体に占める SA- $\beta$ -gal 活性 (X-Gal 染色) 陽性領域の割合を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) :  $Ras^{V12}$ , n=20 (複眼-触角原基の数) ;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$ , n=9;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-9c-SP$ , n=9;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-79-SP$ , n=13。Kruskal-Wallis 検定後、Steel-Dwass 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。(E) 複眼-触角原基において、GFP 標識した  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-9c-SP$  または  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-79-SP$  クローンを誘導した。(F) (E) と (図 13C,  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$ ) に示した遺伝子型の GFP クローンの相対体積を示すボックスプロット (ドットプロットを併用) :  $Ras^{V12}/lgl^{-/-}$ , n=29 (複眼-触角原基の数) ;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-9c-SP$ , n=40;  $Ras^{V12}/lgl^{-/-} + miR-79-SP$ , n=32。Kruskal-Wallis 検定後、Steel 検定により多重比較; \*\*\*P<0.005。全スケールバー: 100  $\mu$  m。

## 5. まとめと考察

本研究により、上皮細胞極性の崩壊による Ras 活性化腫瘍の悪性化進展において、Yki が複数の microRNA を介したシグナル伝達ネットワーク制御によって細胞老化を阻害することが明らかになった。極性の崩壊した Ras 活性化腫瘍において、活性化した Yki により誘導された microRNA *bantam* は *Trbl* の発現を直接抑制し、Ras 活性化による FoxO の発現抑制をブロックした。そして、発現の回復した FoxO は *pnt* mRNA を標的とする *miR-9c* と *miR-79* の誘導によって Pnt の発現を抑制し、それにより細胞老化を阻害することによって腫瘍の悪性化進展をもたらした (図 34)。

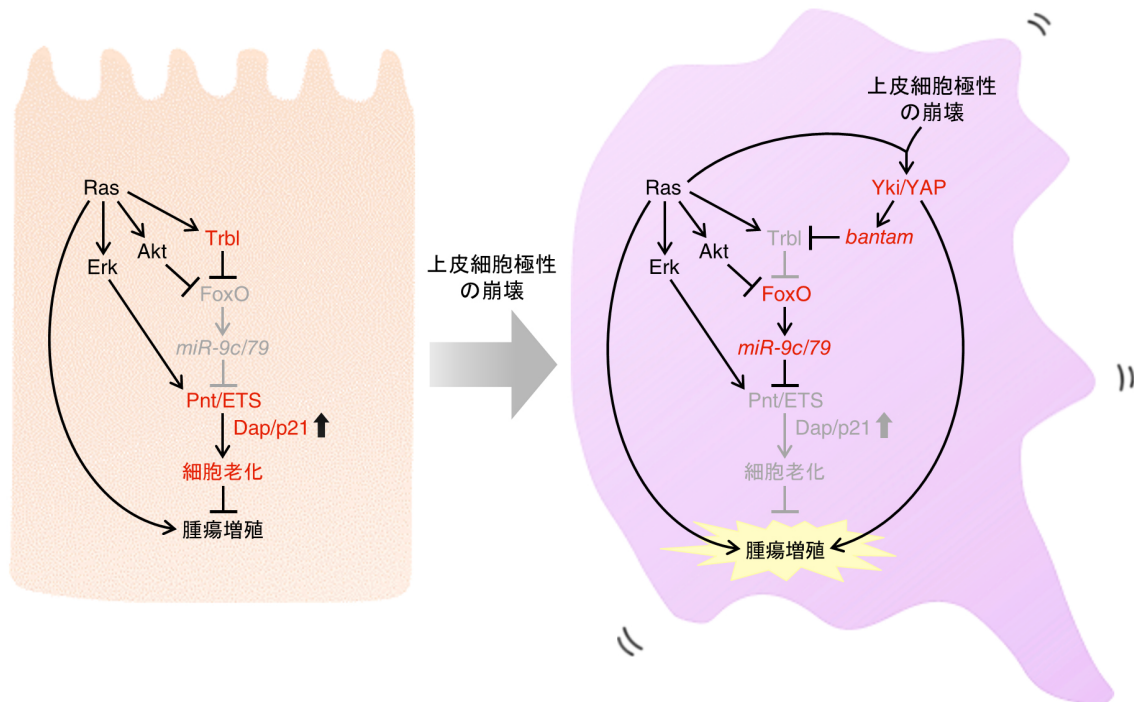


図 34 Ras 活性化腫瘍が細胞老化を克服するメカニズムのモデル

Ras 活性化単独では良性腫瘍が形成される。これは、Ras 活性化によって細胞の増殖促進シグナルが誘導されるのと同時に、細胞老化誘導のマスター制御遺伝子 Pnt/ETS を介して細胞老化が誘導されるからである。Ras シグナルは下流における、Erk の活性化と Trbl および Akt を介した FoxO の発現抑制によって、Pnt の発現量を増加させ、細胞老化を誘導する。しかし、Ras 活性化腫瘍において上皮細胞極性が崩壊した場合には、この腫瘍は Yki/YAP の活性化を獲得することによって細胞老化を克服し、悪性腫瘍へと進展する。Yki により誘導される microRNA *bantam* は *trbl* mRNA を直接分解することによって、FoxO の発現抑制をブロックする。結果的に、発現量の回復した FoxO は *pnt* mRNA を標的とする *miR-9c* と *miR-79* を誘導することによって Pnt の発現量を減少させ、細胞老化を阻害する。

今回、ショウジョウバエ遺伝学により明らかになったメカニズムを構成する遺伝子は、いずれも進化的に高度に保存されている。このことから、同様のメカニズムが哺乳類においても機能していると予想される。実際、哺乳類において、断片的な情報ではあるものの、この考えをサポートする興味深い報告がいくつかある。Pnt のホモログである、ETS1 と ETS2 が細胞老化の誘導に関与することが報告されている一方で、Yki のホモログである YAP は、ヒト培養細胞において、複製ストレスにより誘導される SA- $\beta$ -gal 活性を負に制御することが報告されている<sup>25,70</sup>。加えて、TRIB2 (ショウジョウバエ Trbl に最も相同性の高い哺乳類ホモログ) はプロテアソームによるタンパク分解の足場として機能することが知られるが<sup>67</sup>、ヒト胎児腎細胞において FOXO3A (ショウジョウバエ FoxO のホモログ) の核移行と転写活性を負に制御することが報告されている<sup>71</sup>。その一方で、マウス胎児繊維芽細胞において、FOXO3A は複製ストレスもしくは Ras 活性化による SA- $\beta$ -gal 活性を負に制御し、細胞増殖を促進することが報告されている<sup>72</sup>。また、ヒト胃がん培養細胞において、*miR-9* (ショウジョウバエ *miR-9c* のホモログ) が *ETS1* mRNA の発現を直接抑制することが報告されている<sup>73</sup>。さらに、これらの報告に加えて、ヒトのがん組織においても、興味深い報告がいくつかある。ETS1 の発現はヒトの正常な膵臓の組織ではほとんど観察されない一方で、分化度が高いもしくは中程度の、ヒトの膵臓の腫瘍組織では ETS1 が高発現することが報告されている<sup>74,75</sup>。ヒトの膵臓の腺腫・腺がんの 90%以上で Ras が活性化していることから、この ETS1 の発現上昇は Ras 活性化によって誘導されたものである可能性が高いと考えられる。しかし、対照的に、分化度の低い、ヒトの膵臓のがん組織では ETS1 の発現レベルが低いことが報告されている<sup>74,75</sup>。このことから、ETS1 が Ras 活性化腫瘍の悪性化に対して抑制的に働いていると予想される。加えて、上皮細胞極性の崩壊および YAP 活性化がヒトのがんの一般的な表現型であるのと同様に、*miR-9* は、膵臓がんを含め、ヒトの様々ながんで高発現し、その発現レベルが腫瘍の悪性度や予後と相関することが報告されている<sup>76-82</sup>。よって、本研究により明らかになった腫瘍制御メカニズムが、ヒトの膵臓においても機能している可能性が高いと考えられる。今後、本研究成果を様々なタイプのマウスのがんモデルやヒトのがん組織において検証を行うことによって、新たながん治療戦略の開発につながることができると期待される。

近年の van Deursen らによるマウスをモデルとした研究により、加齢した個体の組織中から老化様細胞を除去することによって、寿命の延長が起こることに加え、さらには

様々な個体の老化に関連した表現型の緩和、つまり健康寿命の延長が起こることが示された<sup>83-85</sup>。すなわち、細胞老化が個体老化の原因であることが実験的に明らかにされたわけである。しかしながら、細胞老化がどのようにして個体老化を駆動するのか、そのメカニズムは依然として明らかにされていない。本研究において、細胞老化誘導のマスター制御遺伝子として *Pnt* を同定したが、重要なことに、近年のショウジョウバエをモデルとした研究により、*Pnt* には寿命を負に制御する働きがあることが報告されている<sup>86-88</sup>。例えば、成虫個体の全身で中程度に *Pnt* を発現させると、その個体の寿命が著しく短くなることがわかっている一方で、成虫個体の腸特異的な *pnt* ノックダウンにより、その個体の寿命の延長が起こることがわかっている。しかし、どのようなメカニズムを介して *Pnt* が寿命を負に制御するのかは依然として明らかにされていない。一方で、本研究において、*Pnt* の発現抑制により細胞老化を抑制する因子として *FoxO* を同定したが、*FoxO* は代表的な長寿遺伝子として知られ、酵母、線虫、ハエ、マウスを含む幅広い種において、*FoxO* が個体の寿命を延伸させることがわかっている<sup>89-91</sup>。加えて、ヒトにおいても、*FOXO3A* の遺伝子多型が長寿と関連することが報告されていることから<sup>92</sup>、*FOXO3A* がヒトの寿命制御にも関わっていると予想されている。*FoxO* による寿命延長効果は、ROS スカベンジャー遺伝子の発現誘導による酸化ストレスの軽減によるものだという考え方はあるが、現時点では、どのようなメカニズムによって寿命延長がもたらされているかは明確ではない。というのも、酸化ストレスには寿命延長につながるホルミシス効果（ミトホルミシス）もあり、事実、抗酸化サプリメントによる酸化ストレスの軽減が個体老化に対して効果を示さないことが明らかになっているからである<sup>93</sup>。そこで、本研究成果を踏まえると、上記の未解明な問題を解決に導く可能性が浮かび上がってくる。すなわち、*Pnt*（哺乳類では *ETS1/2*）が細胞老化の誘導によって個体老化を促進し、一方で、*FoxO*（哺乳類では主に *FOXO3A*）が *Pnt*（哺乳類では *ETS1/2*）の発現抑制により細胞老化を阻害することによって個体老化を抑制するという可能性である。また、個体老化制御において *FoxO* を活性化する要素として、一般的に栄養制限が知られるが<sup>89,90</sup>、この点も踏まえると、個体老化制御において、栄養制限と細胞老化が *FoxO*（哺乳類では主に *FOXO3A*）と *Pnt*（哺乳類では *ETS1/2*）を介してリンクしている可能性も考えられる。ショウジョウバエ以外の無脊椎動物（例えば線虫など）では細胞老化が保存されていることを示す明確なエビデンスはまだないが、異なる寿命をもつ各モデル生物において細胞老化が保存されているかどうかを調べることは、個体老化研

究において重要な意味をもつと思われる。今後、本研究成果をもとにして、ショウジョウバエを中心に、細胞老化という観点から個体老化を解析することによって、個体老化制御メカニズムの理解が大きく進展することが期待される。

## 6. 参考文献

- 1 Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682-4689 (1989).
- 2 Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 517-531, doi:10.1038/nrm2438 (2008).
- 3 Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602 (1997).
- 4 Lin, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**, 3008-3019 (1998).
- 5 Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **11**, S27-31 (2001).
- 6 Collado, M. *et al.* Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642, doi:10.1038/436642a (2005).
- 7 Martinez-Zamudio, R. I., Robinson, L., Roux, P. F. & Bischof, O. SnapShot: Cellular Senescence Pathways. *Cell* **170**, 816-816 e811, doi:10.1016/j.cell.2017.07.049 (2017).
- 8 Fisher, G. H. *et al.* Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* **15**, 3249-3262, doi:10.1101/gad.947701 (2001).
- 9 Johnson, L. *et al.* Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* **410**, 1111-1116, doi:10.1038/35074129 (2001).
- 10 Voorhoeve, P. M. & Agami, R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* **4**, 311-319 (2003).
- 11 Wei, W., Jobling, W. A., Chen, W., Hahn, W. C. & Sedivy, J. M. Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **23**, 2859-2870 (2003).
- 12 Jackson, E. L. *et al.* The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer Res* **65**, 10280-10288, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2193 (2005).
- 13 Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53 (1991).
- 14 Foulkes, W. D., Flanders, T. Y., Pollock, P. M. & Hayward, N. K. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med* **3**, 5-20 (1997).
- 15 Futreal, P. A. *et al.* A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**, 177-183, doi:10.1038/nrc1299 (2004).
- 16 Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* **8**, 671-682, doi:10.1038/nrc2399 (2008).

- 17 Fish, E. M. & Molitoris, B. A. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N Engl J Med* **330**, 1580-1588, doi:10.1056/NEJM199406023302207 (1994).
- 18 Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 23-38, doi:10.1038/nrc3169 (2011).
- 19 Halaoui, R. & McCaffrey, L. Rewiring cell polarity signaling in cancer. *Oncogene* **34**, 939-950, doi:10.1038/onc.2014.59 (2015).
- 20 Pagliarini, R. A. & Xu, T. A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* **302**, 1227-1231, doi:10.1126/science.1088474 (2003).
- 21 Brumby, A. M. & Richardson, H. E. scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J* **22**, 5769-5779, doi:10.1093/emboj/cdg548 (2003).
- 22 Yu, F. X., Zhao, B. & Guan, K. L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811-828, doi:10.1016/j.cell.2015.10.044 (2015).
- 23 Zanconato, F., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* **29**, 783-803, doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005 (2016).
- 24 Barry, E. R. *et al.* Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* **493**, 106-110, doi:10.1038/nature11693 (2013).
- 25 Slemmons, K. K., Crose, L. E., Rudzinski, E., Bentley, R. C. & Linardic, C. M. Role of the YAP Oncoprotein in Priming Ras-Driven Rhabdomyosarcoma. *PLoS One* **10**, e0140781, doi:10.1371/journal.pone.0140781 (2015).
- 26 Zhang, W. *et al.* YAP promotes malignant progression of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through downstream regulation of survivin. *Cancer Res* **75**, 4450-4457, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3396 (2015).
- 27 Lau, A. N. *et al.* Tumor-propagating cells and Yap/Taz activity contribute to lung tumor progression and metastasis. *EMBO J* **33**, 468-481, doi:10.1002/embj.201386082 (2014).
- 28 Mohseni, M. *et al.* A genetic screen identifies an LKB1-MARK signalling axis controlling the Hippo-YAP pathway. *Nat Cell Biol* **16**, 108-117, doi:10.1038/ncb2884 (2014).
- 29 Zhang, W. *et al.* Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Signal* **7**, ra42, doi:10.1126/scisignal.2005049 (2014).
- 30 Nakamura, M., Ohsawa, S. & Igaki, T. Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nat Commun* **5**, 5264, doi:10.1038/ncomms6264 (2014).
- 31 Wu, J. S. & Luo, L. A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nat Protoc* **1**, 2583-2589, doi:10.1038/nprot.2006.320 (2006).
- 32 Potter, C. J. & Luo, L. Using the Q system in *Drosophila melanogaster*. *Nat Protoc* **6**, 1105-1120,



- doi:10.1038/nprot.2011.347 (2011).
- 33 Xu, T. & Rubin, G. M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237 (1993).
- 34 Heckman, K. L. & Pease, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* **2**, 924-932, doi:10.1038/nprot.2007.132 (2007).
- 35 Klambt, C. The *Drosophila* gene *pointed* encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**, 163-176 (1993).
- 36 O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. & Rubin, G. M. The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* **78**, 137-147 (1994).
- 37 Scholz, H., Deatrick, J., Klaes, A. & Klambt, C. Genetic dissection of *pointed*, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics* **135**, 455-468 (1993).
- 38 Shwartz, A., Yogev, S., Schejter, E. D. & Shilo, B. Z. Sequential activation of ETS proteins provides a sustained transcriptional response to EGFR signaling. *Development* **140**, 2746-2754, doi:10.1242/dev.093138 (2013).
- 39 Gabay, L. *et al.* EGF receptor signaling induces *pointed* P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* **122**, 3355-3362 (1996).
- 40 Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315, doi:10.1038/nature03098 (2004).
- 41 Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070, doi:10.1038/35059131 (2001).
- 42 Huot, T. J. *et al.* Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* **22**, 8135-8143 (2002).
- 43 O'Hara, S. P. *et al.* ETS Proto-oncogene 1 Transcriptionally Up-regulates the Cholangiocyte Senescence-associated Protein Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A. *J Biol Chem* **292**, 4833-4846, doi:10.1074/jbc.M117.777409 (2017).
- 44 Macleod, K. F. *et al.* p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* **9**, 935-944 (1995).
- 45 Beier, F., Taylor, A. C. & LuValle, P. The Raf-1/MEK/ERK pathway regulates the expression of the p21(Cip1/Waf1) gene in chondrocytes. *J Biol Chem* **274**, 30273-30279 (1999).
- 46 Park, J. S. *et al.* A role for both Ets and C/EBP transcription factors and mRNA stabilization in the MAPK-dependent increase in p21 (Cip-1/WAF1/mda6) protein levels in primary hepatocytes. *Mol Biol Cell* **11**, 2915-2932, doi:10.1091/mbc.11.9.2915 (2000).
- 47 Park, U. S., Park, S. K., Lee, Y. I., Park, J. G. & Lee, Y. I. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1-->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* **19**, 3384-3394, doi:10.1038/sj.onc.1203674 (2000).

- 48 Doura, T. *et al.* Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 9620-9624, doi:10.1002/anie.201603328 (2016).
- 49 Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367 (1995).
- 50 Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195, doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x (2006).
- 51 Zielke, N. *et al.* Fly-FUCCI: A versatile tool for studying cell proliferation in complex tissues. *Cell Rep* **7**, 588-598, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.020 (2014).
- 52 Baker, N. E. Cell proliferation, survival, and death in the *Drosophila* eye. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 499-507, doi:10.1006/scdb.2001.0274 (2001).
- 53 Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716 (2003).
- 54 Narita, M. *et al.* A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* **126**, 503-514, doi:10.1016/j.cell.2006.05.052 (2006).
- 55 Igaki, T., Pagliarini, R. A. & Xu, T. Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1139-1146, doi:10.1016/j.cub.2006.04.042 (2006).
- 56 Enomoto, M. & Igaki, T. Deciphering tumor-suppressor signaling in flies: genetic link between Scribble/Dlg/Lgl and the Hippo pathways. *J Genet Genomics* **38**, 461-470, doi:10.1016/j.jgg.2011.09.005 (2011).
- 57 Menendez, J., Perez-Garijo, A., Calleja, M. & Morata, G. A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14651-14656, doi:10.1073/pnas.1009376107 (2010).
- 58 Yamamoto, M., Ohsawa, S., Kunimasa, K. & Igaki, T. The ligand Sas and its receptor PTP10D drive tumour-suppressive cell competition. *Nature* **542**, 246-250, doi:10.1038/nature21033 (2017).
- 59 Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36 (2003).
- 60 Nolo, R., Morrison, C. M., Tao, C., Zhang, X. & Halder, G. The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Curr Biol* **16**, 1895-1904, doi:10.1016/j.cub.2006.08.057 (2006).
- 61 Thompson, B. J. & Cohen, S. M. The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell* **126**, 767-774, doi:10.1016/j.cell.2006.07.013 (2006).
- 62 Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**, 421-433, doi:10.1038/nrg3965 (2015).
- 63 Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. & Sander, C. The microRNA.org resource: targets

- and expression. *Nucleic Acids Res* **36**, D149-153, doi:10.1093/nar/gkm995 (2008).
- 64 Kruger, J. & Rehmsmeier, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* **34**, W451-454, doi:10.1093/nar/gkl243 (2006).
- 65 Ruby, J. G. *et al.* Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res* **17**, 1850-1864, doi:10.1101/gr.6597907 (2007).
- 66 Huang, H. & Tindall, D. J. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* **120**, 2479-2487, doi:10.1242/jcs.001222 (2007).
- 67 Eyers, P. A., Keeshan, K. & Kannan, N. Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease. *Trends Cell Biol* **27**, 284-298, doi:10.1016/j.tcb.2016.11.002 (2017).
- 68 Gerlach, S. U., Sander, M., Song, S. & Herranz, H. The miRNA bantam regulates growth and tumorigenesis by repressing the cell cycle regulator tribbles. *Life Sci Alliance* **2**, doi:10.26508/lsa.201900381 (2019).
- 69 Hedrick, S. M., Hess Michelini, R., Doedens, A. L., Goldrath, A. W. & Stone, E. L. FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol* **12**, 649-661, doi:10.1038/nri3278 (2012).
- 70 Xie, Q. *et al.* YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence. *Cancer Res* **73**, 3615-3624, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3793 (2013).
- 71 Zanella, F. *et al.* Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene* **29**, 2973-2982, doi:10.1038/onc.2010.58 (2010).
- 72 Nogueira, V. *et al.* Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* **14**, 458-470, doi:10.1016/j.ccr.2008.11.003 (2008).
- 73 Zheng, L. *et al.* microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. *PLoS One* **8**, e55719, doi:10.1371/journal.pone.0055719 (2013).
- 74 Lefter, L. P. *et al.* Transcriptional silencing of ETS-1 efficiently suppresses angiogenesis of pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* **16**, 137-148, doi:10.1038/cgt.2008.65 (2009).
- 75 Ito, T. *et al.* Expression of the ets-1 proto-oncogene in human pancreatic carcinoma. *Mod Pathol* **11**, 209-215 (1998).
- 76 Zhu, L. *et al.* MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility. *Med Oncol* **29**, 1037-1043, doi:10.1007/s12032-011-9975-z (2012).
- 77 Zhang, Y. *et al.* Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* **33**, 698-709, doi:10.1007/s00268-008-9833-0 (2009).
- 78 Cai, L. & Cai, X. Up-regulation of miR-9 expression predicate advanced clinicopathological

- features and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol* **9**, 1000, doi:10.1186/s13000-014-0228-2 (2014).
- 79 Gwak, J. M. *et al.* MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **147**, 39-49, doi:10.1007/s10549-014-3069-5 (2014).
- 80 Xu, T. *et al.* Up-regulation of miR-9 expression as a poor prognostic biomarker in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* **16**, 469-475, doi:10.1007/s12094-013-1106-1 (2014).
- 81 Chen, X. *et al.* Oncogenic miR-9 is a target of erlotinib in NSCLCs. *Sci Rep* **5**, 17031, doi:10.1038/srep17031 (2015).
- 82 Azizmohammadi, S. *et al.* Molecular identification of miR-145 and miR-9 expression level as prognostic biomarkers for early-stage cervical cancer detection. *QJM* **110**, 11-15, doi:10.1093/qjmed/hcw101 (2017).
- 83 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932 (2016).
- 84 Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236, doi:10.1038/nature10600 (2011).
- 85 He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000-1011, doi:10.1016/j.cell.2017.05.015 (2017).
- 86 Alic, N. *et al.* Interplay of dFOXO and two ETS-family transcription factors determines lifespan in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* **10**, e1004619, doi:10.1371/journal.pgen.1004619 (2014).
- 87 Dobson, A. J. *et al.* Longevity is determined by ETS transcription factors in multiple tissues and diverse species. *PLoS Genet* **15**, e1008212, doi:10.1371/journal.pgen.1008212 (2019).
- 88 Slack, C. *et al.* The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. *Cell* **162**, 72-83, doi:10.1016/j.cell.2015.06.023 (2015).
- 89 Fontana, L., Partridge, L. & Longo, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* **328**, 321-326, doi:10.1126/science.1172539 (2010).
- 90 Martins, R., Lithgow, G. J. & Link, W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* **15**, 196-207, doi:10.1111/accel.12427 (2016).
- 91 Postnikoff, S. D., Malo, M. E., Wong, B. & Harkness, T. A. The yeast forkhead transcription factors fkh1 and fkh2 regulate lifespan and stress response together with the anaphase-promoting complex. *PLoS Genet* **8**, e1002583, doi:10.1371/journal.pgen.1002583 (2012).
- 92 Willcox, B. J. *et al.* FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13987-13992, doi:10.1073/pnas.0801030105 (2008).
- 93 Ristow, M. Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med* **20**, 709-711, doi:10.1038/nm.3624 (2014).

## 7. 補遺 (詳細な遺伝子型)

図 3	名前	詳細な遺伝子型
A	WT クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>Df(3R)Exel9012/+</i> background)	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/Df(3R)Exel9012</i>
	GFP クローン ( <i>Df(3R)Exel9012/+</i> background)	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/Df(3R)Exel9012</i>
C	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>pnt<sup>A88</sup>/+</i> background)	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/pnt<sup>A88</sup></i>
	GFP クローン ( <i>pnt<sup>A88</sup>/+</i> background)	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/pnt<sup>A88</sup></i>
D	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi<sup>#1</sup></i> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi<sup>#2</sup></i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	<i>pnt-RNAi<sup>#1</sup></i> クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	<i>pnt-RNAi<sup>#2</sup></i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
E	Ras <sup>V12</sup> + PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>
	PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>

図 4	名前	詳細な遺伝子型
B	WT クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; +; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP1-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP1-lacZ</i>
D	WT クローン ( <i>pntP2-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; +; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP2-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>pntP2-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP2-lacZ</i>
F	WT クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 5	名前	詳細な遺伝子型
A	WT クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; +; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 6	名前	詳細な遺伝子型
A	WT クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>
C	WT クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>

図 7	名前	詳細な遺伝子型
A	WT クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup></i>
	PntP1 クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>

図 8	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>dap-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-dap-RNAi<sup>#1</sup>/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>dap-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-dap-RNAi<sup>#2</sup>; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 10	名前	詳細な遺伝子型
------	----	---------

A	WT クローン (Fly-FUCCI-labeled)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4/+; UAS-Fly-FUCCI/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン (Fly-FUCCI-labeled)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4/UAS-Ras<sup>V12</sup>; UAS-Fly-FUCCI/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン (Fly-FUCCI-labeled)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4/UAS-Ras<sup>V12</sup>; UAS-Fly-FUCCI/UAS-pnt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>pnt-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン (Fly-FUCCI-labeled)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4/UAS-pnt-RNAi<sup>#2</sup>; UAS-Fly-FUCCI/UAS-Ras<sup>V12</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> +PntP1 クローン (Fly-FUCCI-labeled)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4/UAS-Ras<sup>V12</sup>; UAS-Fly-FUCCI/UAS-PntP1</i>
	PntP1 クローン (Fly-FUCCI-labeled)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4/+; UAS-Fly-FUCCI/UAS-PntP1</i>

図 11	名前	詳細な遺伝子型
A	WT クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>

図 12	名前	詳細な遺伝子型
A	WT クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>
C	PntP1 クローン (RFP-HP1)	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+; UAS-PntP1/RFP-HP1</i>

図 13	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> / <i>lgl</i> <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/<i>lgl</i><sup>-/-</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> / <i>dlg</i> <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/<i>dlg</i><sup>m52</sup>, FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> / <i>scrib</i> <sup>-/-</sup> クローン	<i>eyFLP1/+ or Y; Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup>; FRT82B, TubGal80/FRT82B, scrib<sup>1</sup></i>
C	Ras <sup>V12</sup> / <i>lgl</i> <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/<i>lgl</i><sup>-/-</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> / <i>lgl</i> <sup>-/-</sup> +PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/<i>lgl</i><sup>-/-</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-PntP1</i>
	Ras <sup>V12</sup> / <i>dlg</i> <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/<i>dlg</i><sup>m52</sup>, FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup>; +</i>
	Ras <sup>V12</sup> / <i>dlg</i> <sup>-/-</sup> +PntP1 クローン	<i>TubGal80, FRT19A/<i>dlg</i><sup>m52</sup>, FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y+&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup>; UAS-PntP1/+</i>



図 14	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> + Hippo クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>f</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Hippo</i>
	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> + <i>bantam-SP</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>, UAS-Yki<sup>S168A</sup>/UAS- bantam-SP; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-bantam-SP</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/+</i>
B	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> + <i>bantam-SP</i> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>f</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-bantam-SP</i>
D	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>bantam-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/bantam-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン ( <i>bantam-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/bantam-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> クローン ( <i>bantam-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>f</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; bantam-lacZ/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> /dlg <sup>-/-</sup> クローン ( <i>bantam-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/dlg<sup>m52</sup>, FRT19A; eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup>; bantam-lacZ/+</i>

図 15	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/+</i>
C	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/+</i>
E	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-bantam-C</i>

図 16	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>f</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> /dlg <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/dlg<sup>m52</sup>, FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> /scrib <sup>-/-</sup> クローン	<i>eyFLP1/+ or Y; Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup>; FRT82B, TubGal80/FRT82B, scrib<sup>1</sup></i>
C	Ras <sup>V12</sup> /dlg <sup>-/-</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/dlg<sup>m52</sup>, FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 17	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>fl</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> + <i>bantam-SP</i> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>fl</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-bantam-SP</i>
C	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> + <i>bantam-SP</i> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>fl</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-bantam-SP</i>

図 18	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + <i>erk-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-erk-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Dcr2</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>erk-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-erk-RNAi<sup>#2</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>akt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-Dcr2/UAS-akt-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>akt-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-akt-RNAi<sup>#2</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-FoxO; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 19	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/+</i>
C	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/+</i>
E	WT クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; +; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/+</i>
G	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> + <i>foxO-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/UAS-foxO-RNAi<sup>#1</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> + <i>foxO-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/UAS-foxO-RNAi<sup>#2</sup></i>

図 20	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>-/-</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>fl</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 21	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + <i>erk-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-erk-RNAi<sup>#1</sup>;</i> <i>eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>erk-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-erk-RNAi<sup>#2</sup></i>
C	Ras <sup>V12</sup> + <i>akt-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-akt-RNAi<sup>#1</sup>/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>akt-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-akt-RNAi<sup>#2</sup>;</i> <i>eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
E	<i>foxO-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; +; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-</i> <i>GFP/UAS-foxO-RNAi<sup>#1</sup></i>
	<i>foxO-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; +; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-</i> <i>GFP/UAS-foxO-RNAi<sup>#2</sup></i>

図 22	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-FoxO; eyFLP6,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
C	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-FoxO; eyFLP6,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
E	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-FoxO; eyFLP6,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup></i>

図 23	名前	詳細な遺伝子型
B	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> + <i>Trbl</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/UAS-Trbl</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>;</i> <i>eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6,</i> <i>Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-trbl-RNAi<sup>#2</sup></i>
D	<i>eyFLP, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4&gt;</i> <i>GFP</i>	<i>eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	<i>eyFLP, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4&gt;</i> <i>trbl-RNAi<sup>#1</sup></i>	<i>UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	<i>eyFLP, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4&gt;</i> <i>trbl-RNAi<sup>#2</sup></i>	<i>eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-trbl-RNAi<sup>#2</sup></i>
G	<i>hh &gt; RFP</i> ( <i>trbl 3'UTR sensor<sup>WT</sup></i> )	<i>trbl 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/+; hh-Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/+</i>
	<i>hh &gt; Yki<sup>WT</sup></i> ( <i>trbl 3'UTR sensor<sup>WT</sup></i> )	<i>trbl 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/+; hh-Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-</i> <i>Yki<sup>WT</sup></i>
	<i>hh &gt; Yki<sup>S168A</sup> +</i> <i>bantam-SP</i> ( <i>trbl 3'UTR sensor<sup>WT</sup></i> )	<i>trbl 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/UAS-bantam-SP; hh-Gal4, UAS-His2Av-</i> <i>mRFP1/UAS-Yki<sup>WT</sup></i>
H	<i>hh &gt; Yki<sup>WT</sup> (trbl 3'UTR</i> <i>sensor<sup>Δbantam</sup>)</i>	<i>trbl 3'UTR sensor<sup>Δbantam</sup>/+; hh-Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-</i> <i>Yki<sup>WT</sup></i>

図 24	名前	詳細な遺伝子型
B	WT クローン	<i>TubQS, FRT19A/FRT19A; ET40-QF, QUAS-mtdTomato/eyFLP5,</i>

	( <i>trbl</i> <sup>#1</sup> > GFP)	<i>UAS-GFP; trbl-Gal4</i> <sup>#1/+</sup>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>trbl</i> <sup>#1</sup> > GFP)	<i>TubQS, FRT19A/FRT19A; ET40-QF, QUAS-mtdTomato/eyFLP5, UAS-GFP; trbl-Gal4</i> <sup>#1/QUAS-Ras<sup>V12</sup></sup>
C	WT クローン ( <i>trbl</i> <sup>#2</sup> > GFP)	<i>TubQS, FRT19A/FRT19A; ET40-QF, QUAS-mtdTomato/eyFLP5, UAS-GFP; trbl-Gal4</i> <sup>#2/+</sup>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>trbl</i> <sup>#2</sup> > GFP)	<i>TubQS, FRT19A/FRT19A; ET40-QF, QUAS-mtdTomato/eyFLP5, UAS-GFP; trbl-Gal4</i> <sup>#2/QUAS-Ras<sup>V12</sup></sup>

図 25	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> + <i>Trbl</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-bantam-C/UAS-Trbl</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-trbl-RNAi<sup>#2</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> + <i>foxO-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-foxO-RNAi<sup>#1</sup></i>

図 26	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-trbl-RNAi<sup>#2</sup></i>
C	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
E	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-Ras<sup>V12</sup></i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#2</sup> クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-trbl-RNAi<sup>#2</sup></i>

図 27	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-FoxO; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP1-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP1-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>bantam</i> クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; pntP1-lacZ/UAS-bantam-C</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>trbl-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-trbl-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP1-lacZ</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>erk-RNAi</i> <sup>#1</sup> クローン ( <i>pntP1-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-erk-RNAi<sup>#1</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/pntP1-lacZ</i>

図 29	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + FoxO + <i>miR-9c-SP</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>, UAS-FoxO/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-miR-9c-SP/+</i>

	Ras <sup>V12</sup> + FoxO + <i>miR-79-SP</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>, UAS-FoxO/eyFLP5, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP; UAS-miR-79-SP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>miR-9c</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>miR-79</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79</i>
C	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-FoxO; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
E	Ras <sup>V12</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + FoxO クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-FoxO; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 30	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>
C	Ras <sup>V12</sup> + Yki <sup>S168A</sup> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/UAS-Yki<sup>S168A</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/+</i>

図 31	名前	詳細な遺伝子型
B	WT クローン ( <i>pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/+</i>
	<i>miR-9c</i> クローン ( <i>pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-miR-9c</i>
	<i>miR-9c</i> クローン ( <i>pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-9c</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-9c</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-miR-9c</i>
	<i>miR-79</i> クローン ( <i>pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-miR-79</i>
	<i>miR-79</i> クローン ( <i>pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-miR-79</i>
C	WT クローン ( <i>pnt 3'UTR<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>pnt 3'UTR<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>miR-9c</i> クローン ( <i>pnt 3'UTR<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-miR-9c</i>
	Ras <sup>V12</sup> + <i>miR-79</i> クローン ( <i>pnt 3'UTR<sup>WT</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>WT</sup>/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/UAS-miR-79</i>
D	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>pnt 3'UTR<sup>ΔmiR-9c</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-9c</sup>/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/+</i>
	Ras <sup>V12</sup> クローン ( <i>pnt 3'UTR<sup>ΔmiR-79</sup></i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; pnt 3'UTR sensor<sup>ΔmiR-79</sup>/UAS-Ras<sup>V12</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-His2Av-mRFP1/+</i>

図 32	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> + <i>miR-9c</i> クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12</sup>/+; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c</i>

	Ras <sup>V12</sup> + miR-79 クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12/+</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79</i>
C	Ras <sup>V12</sup> + miR-9c クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12/+</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c</i>
	Ras <sup>V12</sup> + miR-79 クローン	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; UAS-Ras<sup>V12/+</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79</i>
E	Ras <sup>V12</sup> + miR-9c クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12/+</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c</i>
	Ras <sup>V12</sup> + miR-79 クローン ( <i>dap-lacZ</i> )	<i>TubGal80, FRT19A/FRT19A; dap-lacZ/UAS-Ras<sup>V12/+</sup>; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79</i>

図 33	名前	詳細な遺伝子型
A	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>l/+</sup> miR-9c-SP クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>l</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c-SP</i>
	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>l/+</sup> miR-79-SP クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>l</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79-SP</i>
C	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>l/+</sup> miR-9c-SP クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>l</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c-SP</i>
	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>l/+</sup> miR-79-SP クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>l</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79-SP</i>
E	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>l/+</sup> miR-9c-SP クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>l</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-9c-SP</i>
	Ras <sup>V12</sup> /lgl <sup>l/+</sup> miR-79-SP クローン	<i>TubGal80, FRT40A, UAS-Ras<sup>V12</sup>/lgl<sup>l</sup>, FRT40A; eyFLP6, Act&gt;y<sup>+</sup>&gt;Gal4, UAS-GFP/UAS-miR-79-SP</i>

## 8. 略語表

Act	Actin
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase
BSA	bovine serum albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CycB	Cyclin B
Dap	Dacapo
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	diethylpyrocarbonate
DGGR	<i>Drosophila</i> Genetics and Genetic Resources
<i>dlg</i>	<i>discs large</i>
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
ey	eyeless
FLP	Flippase
FRT	FLP recognition target
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
HP1	Heterochromatin Protein 1
<i>lgl</i>	<i>lethal giant larvae</i>
MARCM	Mosaic analysis with a repressible cell marker
miR	microRNA
NIG	National Institute of Genetics stock center
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
TBST	TBS with 0.1% Tween 20
PBT	0.1% Triton-X in Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
Pnt	Pointed
QUAS	QF upstream activating sequence
RNAi	RNA interference
SA- $\beta$ -gal	senescence-associated $\beta$ -galactosidase



<i>scrib</i>	<i>scribble</i>
SMW	second mitotic wave
SP	sponge
Trbl	Tribbles
Tub	Tubulin
tubP	tubulin promoter
UAS	Upstream activating sequence
VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center
y	yellow
Yki	Yorkie
w	white
WT	Wild-type

## 9. 謝辞

本研究を行うにあたり、京都大学大学院生命科学研究科 井垣達吏教授、榎本将人助教、谷口喜一郎特定助教、山銅ゆかり教務職員、本田直樹准教授に多くのご指導をいただいた。名古屋大学大学院理学研究科 大澤志津江教授には Imaris を使わせていただいた。国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 竹本大策特別研究員には *QUAS-Ras85D<sup>1/2</sup>* 遺伝子導入ショウジョウバエ系統の作成していただいた。Dr. James B. Skeath (Washington University)、Dr. Won-Jae Lee (Seoul National University)、Dr. Ben-Zion Shilo (Weizmann Institute of Science)、Dr. Stephen M. Cohen (University of Copenhagen)、Marco Milán (The Barcelona Institute of Science and Technology)、Bloomington *Drosophila* Stock Center、Vienna *Drosophila* RNAi Center、National Institute of Genetics Stock Center、そして *Drosophila* Genomics and Genetic Resources にはショウジョウバエ系統やプラスミド DNA、抗体などの研究材料を分与していただいた。また、所属した井垣研究室の他のメンバーにも大変お世話になりました。上記の皆様に深謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Takao Ito and Tatsushi Igaki

Yorkie drives Ras-induced tumor progression by microRNA-mediated inhibition of cellular senescence

Science Signaling, 14(685), eaaz3578, 2021