

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06351

研究課題名(和文) 過剰栄養(肥満)による妊性低下機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of reduced fecundity due to obesity

研究代表者

中越 英樹(Nakagoshi, Hideki)

岡山大学・自然科学学域・教授

研究者番号：50314662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのオス生殖器官である附属腺は精液をつくる。過剰栄養ストレスは、転写制御因子 Dve の分解阻害を介した遺伝子発現の変化を誘導し、妊性を低下させる。分解阻害によって安定化した Dve の標的遺伝子候補をマイクロアレイ解析によって同定した。また、Dve の安定化を誘導する強いストレスは、初期ストレス応答遺伝子群(分子シャペロン、小胞体ストレスセンサー Xbp1) の発現を抑制するフィードバック機構によって、ストレス応答モードを切り替えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
過剰栄養ストレスが妊性低下を招く原因として精液成分の変化が大きく影響していることを示し、精液成分を変化させる経路において介在する候補遺伝子群を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：The male reproductive organ accessory gland in *Drosophila* produces components of seminal fluid. Excess nutrient signaling reduces fecundity through changes in gene expression that are mediated by inhibition of degradation of the transcriptional regulator Dve. Microarray analysis identified Dve target gene candidates. In addition, a novel feedback mechanism is proposed that the strong stress induces accumulation of Dve proteins and suppresses the expression of the initial stress response genes (molecular chaperon, ER stress sensor Xbp1).

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ 妊性 精液 栄養シグナル ストレス応答 ステロイドホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は多くの生活習慣病の発症リスクを高めるだけでなく、妊性も低下させることが報告されており、少子高齢化社会における極めて重要な問題である。胎児期や授乳期の母性栄養環境がエピゲノム変化などによって記憶され、その後の肥満症、生活習慣病などに影響するという概念（メタボリックメモリー）が提唱されている。さらに、このような母性環境因子によるエピゲノム変化は、その子孫にまで影響する。つまり、アンバランスな栄養環境に暴露された親から生まれた子や孫は、代謝に何らかの異常をきたすことが想定される。このような子孫への影響を減らすため、アンバランスな栄養環境を感知した場合、妊性を可逆的に低下させる（子孫を残さないようにする）ことは極めて合理的である。

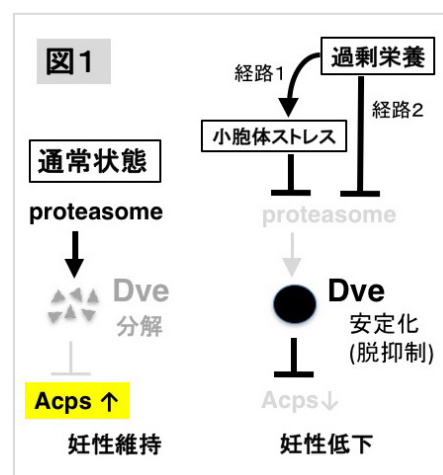
このような制御は、母性栄養環境だけでなく父性栄養環境下においても起こる。高脂肪食などによって肥満となった父親に由来する精子は、運動性が低く、妊性も低下している。この時には酸化ストレスが上昇し、精子ミトコンドリアの機能が障害されているとの報告もあるが詳しい機構は不明である（reviewed in Oliveira et al., **Reproduction** 2017）。

男性（オス）の妊性は精子の状態だけでなく、精液成分によっても大きく影響を受ける。ショウジョウバエの精液は附属腺の外分泌細胞（主細胞と第二細胞）でつくられる。転写制御因子 Dve はオスの妊性維持に必要であり、附属腺の発生段階（蛹期）では主細胞と第二細胞で発現し、成虫においては第二細胞で強く発現する（Minami et al., **PLoS One** 2012）。成虫期主細胞においては、Dve タンパク質は恒常的に分解されていて、小胞体ストレスなどに応答した分解阻害によって安定化することを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

小胞体ストレスを感知して安定化（脱抑制）した Dve タンパク質は、主細胞の附属腺タンパク質（Accessory gland proteins; **Acps**）の発現を抑制して、妊性を低下させる。また、小胞体ストレス以外に、Dve 脱抑制を誘導する生理的刺激を探索した結果、成虫期の過剰栄養シグナルが Dve 脱抑制を誘導し、著しい妊性低下をきたすことが明らかとなった（図1）。

本研究では、転写制御因子 Dve に注目し、過剰栄養（肥満）によって妊性低下が誘導される分子メカニズムを明らかにする。



## 3. 研究の方法

### 【妊性低下の主要因となる Dve 標的遺伝子の同定】

主細胞における Dve 脱抑制は、(1) タンパク質分解系（プロテアソームサブユニット  $\beta 6$ ）の阻害、(2) 小胞体ストレス、(3) 過剰栄養、によって誘導される。これら (1)-(3) の条件は、いずれも著しい妊性低下を招く（図1）。Dve 脱抑制状態は附属腺タンパク質 Acp70A (SP) の量を激減させるが、SP 完全欠失変異体よりも非常に強い異常（不妊）を誘導する。この原因は精子運動性の著しい低下にあると考えられる。Dve 脱抑制状態は、妊性維持に必要な他の多くの

遺伝子も同時に抑制することで、附属腺を「休止モード」に導いていると考えられ、その最も顕著な表現型が精子運動性低下である。そこで、本研究計画では精子運動性を亢進させる精液因子に注目しつつ、Dve 標的遺伝子の同定を目指す。

- 上記(1)-(3)のDve脱抑制個体および対照群個体の附属腺からmRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行う。Dve脱抑制個体で共通して発現が抑制されている遺伝子群を絞り込み、「Dve標的遺伝子」の候補とする。
- マイクロアレイ解析から得られた候補遺伝子群について、定量的RT-PCR法による確認を行い、*in vivo*機能解析を行う遺伝子群を絞り込む。

#### 【過剰栄養(肥満)が妊性低下を招く経路の解析】

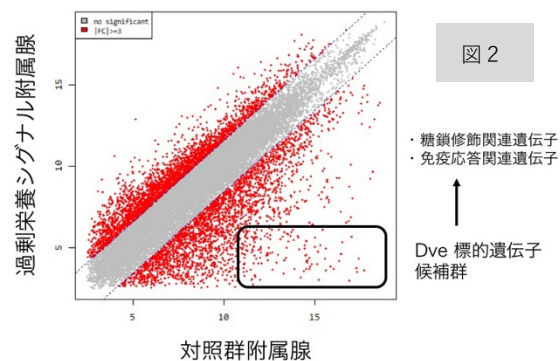
上記(1)-(3)の条件が妊性低下を招くことから、過剰栄養が小胞体ストレスを誘導する「経路1」、あるいは小胞体ストレス非依存的な「経路2」によってDve脱抑制が誘導されていると考えられる(図1)。一方、肥満による肝臓プロテアソーム系の機能低下が原因となって、小胞体ストレスとインシュリン抵抗性が誘導されるとの報告もある(Otoda et al., **Diabetes** 2013)。過剰栄養と妊性低下の関係を明らかにするため、以下の実験を行う。

- 小胞体ストレスセンサーXbp1の転写活性をモニターできる系統xbp1p-DsRed(Ryoo et al., **PLoS One**, 2013)、活性化型タンパク質の発現量をモニターできる系統UAS-Xbp1::EGFP(Sone et al., **Cell Stress and Chaperons**, 2013)を用いて、附属腺全体を過剰栄養環境にした際の小胞体ストレス活性とDve脱抑制の関係性を調べる。
- 過剰栄養環境の細胞が細胞自律的にDve脱抑制、Acp発現抑制を誘導できるのか、何らかの細胞非自律的影響が存在するのかを検証するため、AyGAL4システムを用いて過剰栄養細胞をモザイク状に誘導して、Dve脱抑制、Acp発現への影響を調べる。
- Dve脱抑制が妊性低下の主要因であるのか否かを確認するため、*dve*変異バックグラウンドにおいて、附属腺全体をDve脱抑制誘導条件にした際の附属腺タンパク質Acp70A(SP)の量的変化を調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 妊性低下の主要因となるDve標的遺伝子の同定

キイロショウジョウバエのオス生殖器官(附属腺)で合成される附属腺タンパク質(Accessory gland proteins; Acps)は精液中に分泌され、交尾・射精によってメス子宮内に移行して、メスにさまざまな交尾後応答(産卵、交尾拒否など)を引き起こす。附属腺は二種類の外分泌性上皮細胞(～1,000個の主細胞、～60個の第二細胞)から構成されており、交尾後応答の主要な作用を担うAcp70A(別名sex peptide; SP)は主細胞から分泌される。附属腺における*dve*遺伝子の発現は蛹期から開始するが、成虫期には第二細胞のみで発現が維持され、主細胞での発現は蛹期後期から抑制される。成虫期主細胞においては、Dveタンパク質が恒常的に分解されており、小胞体ストレスや過剰栄養環境を感知することで分解阻害が生じ、安定化(脱抑制)したDveがSP発現を低下させることで妊性低下を誘導する。



Dve 脱抑制条件下で発現抑制を受ける標的遺伝子をマイクロアレイ解析によって探索した結果、糖鎖修飾関連遺伝子や免疫応答関連遺伝子が候補遺伝子として同定された (図 2)。

## (2) 過剰栄養 (肥満) が妊性低下を招く経路の解析

### <細胞自律性の検証>

主細胞における Dve 脱抑制は、タンパク質分解系 (プロテアソームサブユニット  $\beta 6$ ) の阻害、小胞体ストレス、過剰栄養、によって誘導される。これらの Dve 脱抑制条件をモザイク状に誘導した場合、タンパク質分解系の阻害による Dve 脱抑制は細胞自律的に起きた。一方、小胞体ストレスや過剰栄養シグナルを誘導したモザイク細胞クローンでは Dve 脱抑制は誘導されなかったため、何らかの細胞非自律的な効果が介在している可能性が示唆された。

Dve 脱抑制条件 (タンパク質分解系の阻害) を誘導したモザイク細胞クローンでは細胞自律的に Acp70A (SP) の発現低下が観察され、*dve* 変異バックグラウンドにおいてタンパク質分解系の阻害を誘導したモザイク細胞クローンでは SP 発現の低下は起きなかったことから、脱抑制した Dve の活性が SP 発現抑制に必要であり、Dve 脱抑制が妊性低下の主要因であることが示された。

### <ストレス応答におけるフィードバック制御>

脱抑制した Dve が SP 発現を抑制することで妊性低下を誘導する過程において、Dve は SP の転写を抑制するが、Dve 脱抑制前の残存 mRNA が存在している。それにも関わらず、SP タンパク質はほぼ完全に消失する。そこで、分子シャペロンの関与を検討するため、RNAi スクリーニングを行い、SP の安定化に関わる候補分子を同定することができた。Dve 脱抑制条件 (タンパク質分解系の阻害) を誘導したモザイク細胞クローンでは、分子シャペロンの転写抑制に加えて小胞体ストレスセンサー Xbp1 の転写抑制が起きていることも明らかとなった。つまり、Dve 脱抑制を誘導する強いストレスは、初期ストレス応答遺伝子群 (分子シャペロン、小胞体ストレスセンサー Xbp1) の発現を抑制するフィードバック機構によって、ストレス応答モードを切り替えている可能性が示唆された。

インスリン受容体活性化型 InR[act] による過剰栄養シグナルは小胞体ストレスを介して Dve 脱抑制と附属腺の萎縮を招くが、PI3K 活性化型 PI3K[act] による栄養シグナル亢進は Dve 脱抑制を誘導せず、附属腺が肥大した。ここで、InR[act] と PI3K[act] の共発現を行うと、Dve 脱抑制は起きるが附属腺の萎縮は解消され、正常よりも大きな附属腺となった。つまり、過剰栄養ストレスによって誘導される Dve 脱抑制は PI3K あるいはその上流因子に対してネガティブ・フィードバックをかけることで、附属腺の成長阻害と妊性低下を引き起こしていることが明らかになった。

## (3) 第二細胞による妊性制御機構

成虫期においても Dve 発現が維持される第二細胞は、生育時の栄養環境にตอบสนองして細胞の数や大きさを変化させることで適切な妊性獲得に貢献しており、栄養シグナル依存的な Dve 発現レベルによる制御を受けていることを明らかにした。この栄養依存的な妊性制御が成虫期においても機能している可能性について検証を行った。温度感受性 GAL80 (GAL80<sup>ts</sup>) を用いて、蛹期の栄養環境を低下させた後、成虫期は通常の栄養環境で飼育した。羽化後 7 日目の個体では、第二細胞は依然として縮小したままであったが、羽化後 14 日目以降には正常な大き

さに回復した。つまり、第二細胞は、成虫期の栄養環境にも応答して可塑的に妊性を変化させ得ることが明らかとなった。

ステロイドホルモン（エクジソン）シグナルは栄養状態や妊性と密接に関連しており、附属腺におけるエクジソン受容体の発現も栄養シグナルに依存し、Dve 活性によって維持されることが明らかとなった。Dve 発現は、臨界期以降は栄養シグナル非依存的に維持されるため、臨界期の *dve* 強制発現は第二細胞の数を大幅に増加させた。つまり、臨界期の栄養素シグナル依存性 Dve 発現のレベルが第二細胞の数を決定し、エクジソンシグナル伝達が栄養シグナル依存性の第二細胞の生存と成熟を通じてオスの妊性を最適な状態に微調整していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubo, A., Matsuka, M., Minami, R., Kimura, F., Sakata-Niitsu, R., Kokuryo, A., Taniguchi, K., Adachi-Yamada, T., Nakagoshi, H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Nutrient conditions sensed by the reproductive organ during development optimize male fecundity in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 557-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Nakagoshi, H., Adachi-Yamada, T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Binucleation of accessory gland lobe contributes to effective ejection of seminal fluid in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 446-458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs170188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴江陽一郎, 松家未来, 中越英樹
2. 発表標題 ショウジョウバエのオス附属腺における過剰栄養へのストレス応答
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松家未来, 上田均, 中越英樹
2. 発表標題 ショウジョウバエのオスの妊性は附属腺における栄養依存的な Dve と EcR 発現レベルによって最適化される
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴江陽一郎, 松家未来, 中越英樹
2. 発表標題 ショウジョウバエ附属腺におけるオスの妊性を制御するストレス応答
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松家未来, 上田均, 中越英樹
2. 発表標題 オスのショウジョウバエにおける栄養依存的な妊性の調節はエクダイソングナルによって微調整される
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松家未来, 上田均, 中越英樹
2. 発表標題 ショウジョウバエ附属腺の栄養依存的な分化制御シグナル
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野裕人, 中越英樹
2. 発表標題 ストレス応答における転写制御因子 Dveの機能
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松家未来, 上田均, 中越英樹
2. 発表標題 栄養依存的な附属腺第二細胞の分化制御シグナル
3. 学会等名 日本分子生物学会第41回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsuka, M. and Nakagoshi, H.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 243
3. 書名 Advances in Medicine and Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 大学院自然科学研究科 (理) 中越研究室  <a href="https://sites.google.com/view/nakagoshi-lab-hp">https://sites.google.com/view/nakagoshi-lab-hp</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松家 未来  (Matsuka Mirai)		



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴江 陽一郎  (Suzue Yoichiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関