

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570003

研究課題名(和文) ショウジョウバエの精子形成過程における細胞の増殖と成長を制御する機構に関する研究

研究課題名(英文)

Genetic studies of cell proliferation and growth in *Drosophila* spermatogenesis

研究代表者

井上 喜博 (INOUE YOSHIHIRO)

京都市芸繊維大学・昆虫バイオメディカル教育研究センター・准教授

研究者番号：90201938

研究成果の概要(和文)：

生殖細胞の形成過程には体細胞と異なる細胞の増殖、成長が観られる。ショウジョウバエのインスリン様ペプチド、同受容体、シグナル伝達因子等の遺伝学的解析により、インスリンシグナルが精子幹細胞の分裂促進(G2期/M期)や精母細胞の成長を誘導することを明らかにした。一方、精母細胞の成長には、体細胞で同伝達系の下流因子とされるFoxoは関与しないこと、Torシグナル伝達系による制御も必須であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：

It has recently been reported that some aspects of cell division and cell growth in germ line cells are different from those in somatic cells. Our genetic analysis of insulin-like peptides, insulin receptor and its signal transducers revealed that the insulin signal induces both division of male germline stem cells and growth of premeiotic spermatocytes. On the other hand, FOXO transcription factor shown as a target of the insulin signaling in somatic cells is not involved in the cell growth but in the germline stem cell division. TOR signaling pathway is also required for the remarkable cell growth of spermatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発生遺伝学・細胞遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ショウジョウバエ、精子形成、生殖幹細胞、インスリン、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

近年、哺乳類の精子幹細胞に関する研究がとくにクローズアップされているが、生殖細胞の形成機構の解明には、生殖幹細胞から減数分裂に至るまでの発生プロセスの理解が不可欠である。ショウジョウバエを使った研究は、解析の容易さ、知見の豊富さから他をリードしている。国外では、哺乳類のモデル系

として評価も高い。ところがその多くは、生殖幹細胞の維持と分化に関する研究であり、生殖幹細胞の分裂を誘導する機構についてはわかっていない。細胞成長の制御についても不明である。生殖系列の細胞の増殖と成長について、細胞周期制御という観点から切り込む研究を立案した。研究代表者らはショウジョウバエのインスリン受容体遺伝子 *InR* を

単離し、*InR* は体細胞の増殖と成長に必須なことが示した。さらに新たな *InR* 突然変異体が雄不妊になるという予備的結果を得ている。この受容体が雄生殖系列細胞の増殖や成長に関与するか詳しく解析する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) インスリン様ペプチド、インスリン受容体、そのシグナル伝達因子が欠損した突然変異体において、精子幹細胞の分裂効率が低下していることを示す。インスリン・シグナル伝達系が精子幹細胞の分裂誘導に必須なことを明らかにする。

(2) インスリンは、哺乳類の細胞に作用して G1/S 期進行を促す。ショウジョウバエの *ilp2* が精子幹細胞に対して細胞周期のどの時期に作用し、周期を進行させるのか。この点を明らかにする。

(3) ショウジョウバエの精原細胞は、4 回有糸分裂したのち、減数分裂サイクルに移行する。この有糸分裂の回数は、生物種により一定に決まっている。4 回という分裂回数は、増殖因子による誘導の結果なのか、内在的に規定されているのか。この点を明らかにする。

(4) 精母細胞の成長に *ilp2*、同受容体、そのシグナル伝達因子が必要なことを証明する。さらに体細胞の成長に必要な ToR シグナル伝達系の関与についても明らかにする。そして 2 つのシグナル伝達系の関係について、遺伝学的相互作用に基づいて推定する。

3. 研究の方法

平成 20 年度：ショウジョウバエの精子幹細胞およびそれに由来する精原細胞の分裂について解析する。(1) インスリン様ペプチド、およびそのシグナル伝達系が欠損した突然変異体を作製して、精子幹細胞の分裂効率に異常がないか調べる。(2) インスリン・シグナルが幹細胞の細胞周期進行に及ぼす影響について各種細胞周期マーカーにより調査する。(3) 精原細胞の有糸分裂回数がインスリン・シグナルの増減により影響されるか調査する。分裂回数を規定する機構の解明を進める。

平成 21、22 年度：ショウジョウバエの減数分裂開始前の精母細胞の著しい細胞成長に焦点をあてる。精母細胞の成長誘導にもインスリン・シグナル伝達系および TOR 伝達系が必須なことを明らかにする。このため各因子をノックアウト、あるいはノックダウンした成虫雄を遺伝学的に作製して、それぞれの精母細胞のサイズを測定することにより調査する。

4. 研究成果

H20年度

生殖細胞形成過程には、減数分裂前に通常の体細胞とは異なる細胞の増殖、成長がプログラムされている。これら生殖系列の細胞増殖と成長を制御する機構については不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエの精子幹細胞の分裂を誘導する分子機構、精母細胞の成長を制御する機構について解析を進めている。ショウジョウバエの Gal4/UAS 遺伝子強制発現系を用いて、インスリン様ペプチド *ilp2* を産生する細胞にのみ細胞死タンパク *Reaper* を発現させ、*ilp2* ペプチドの産生できない個体を作製した。加えてインスリン受容体、および同シグナル伝達因子 *Chico* の雄不妊型突然変異体も作製した。これらの精子幹細胞を観察したところ、変異体では加齢に伴い精子幹細胞の減少が顕著になっていることがわかった。さらに以下の方法により精巣内の精子幹細胞が一定時間内に分裂する効率を推定した。GFP を融合した中心体タンパク PACT を精子幹細胞内で発現させると、この細胞が S 期を 1 回通過すると中心小体の半分が、2 回通過するとその両方が GFP 標識される。S 期を経っていない細胞は中心小体が標識されない。これを指標に精巣内の各生殖幹細胞が一定時間内に S 期を何回通過したかを判定し、分裂効率とした。上記変異体では精子幹細胞の分裂効率が低下していることが明らかになった。つぎに精子幹細胞の細胞周期進行におよぼすインスリン・シグナル伝達系の影響について調査した。上記の突然変異体が持つ精子幹細胞に対して、抗リン酸化 H3 抗体染色、抗サイクリン E 抗体染色、抗サイクリン B 抗体染色をおこなったところ、G2 期の細胞数が増加するとともに、他の時期の細胞数が減少していることがわかった。この結果から、同シグナルが精子幹細胞の G2

期に作用し、M期への進行を促していることが明らかになった。

H21年度

本年度は、とくに精母細胞の成長機構に重点をおいた。減数分裂開始前の成長期において精母細胞はその容積を最大2.5倍増加させる。これはショウジョウバエの2倍体細胞においては最大の細胞成長である。これを誘導する分子機構はわかっていない。*InR*突然変異体 (*InR^{E19}/InR³³⁹*) では、細胞サイズが最大になるS6期の精母細胞の直径が野生型の68%しかない。I1p2産生細胞を欠く変異体でも野生型の83%に減少していた。この結果は精母細胞の細胞成長もインスリンシグナル伝達系で誘導されていることを示唆している。体細胞では栄養状態が悪く、インスリンが誘導されない場合は転写因子Foxoが翻訳因子e1F4を抑制することにより、代謝を負に制御する。そこで*InR*とFoxoの2重変異体を作製し、精子幹細胞の分裂効率と精母細胞の成長を観察した。前者には有意な有意な抑圧がみられたが、後者にはそれがみられなかった。したがって、Foxoは精子幹細胞の分裂には負の調節因子として働いているが、精母細胞の成長の調節には関与しない可能性が考えられる。*InR*の下流にはFoxoに依存しないRAS-MAPK経路も活性化しているため、細胞の種類によりシグナル伝達経路が異なる可能性も考えられる。また*InR*変異体において精母細胞の成長が顕著に抑制されたわけではないので、他の経路の関与も示唆された。

H22年度

前年度の結果を受けて、Torシグナル伝達経路の構成因子であるTor、Tsc1、Tsc2、Rhebの突然変異、ノックダウン個体により細胞成長が影響を受けるかについて検討した。生殖

細胞の形成過程には、通常の体細胞とは異なる細胞の増殖、成長が観察される。本研究では、ショウジョウバエの生殖系列細胞に特異的な細胞増殖と成長を制御する機構を制御する機構を明らかにする研究を進めてきた。今年度は、とくに精母細胞の成長を誘導する機構を解析した。減数分裂開始前の成長期において精母細胞は容積を2.5倍増加させる。これまでにインスリン様ペプチドの産生細胞を欠く個体およびインスリン受容体の突然変異体では精母細胞の成長が阻害されることをみいだした。そこでこの細胞成長を誘導するシグナル伝達因子の遺伝学的同定を試みた。同受容体の下流因子IRS/Chicoの機能欠損型突然変異体では精母細胞の有意な成長阻害が見られた。一方、シグナル伝達因子PI3キナーゼの活性型変異*Dp110-CAAX*、RAS87Dの活性型変異*RAS85D¹⁶*をそれぞれ精母細胞で発現させると、精母細胞の過度な成長がみとめられた。この結果は精母細胞の成長を促すインスリン様ペプチドのシグナルはRas/MAPK経路およびPI3キナーゼ/Akt経路の両方を介して伝達されることを示唆している。Aktは細胞成長を負に制御する転写因子Foxoをリン酸化することにより抑制する。Aktリン酸化サイトを改変したFoxo変異体はAktによる抑制を受けない。この変異体を精母細胞で発現させたところ、細胞成長への影響は認められなかった。Foxoは精子幹細胞の分裂には負の調節因子として働くが、精母細胞の成長には関与しない可能性が考えられる。さらにインスリン経路と平行するTorシグナル伝達経路の関与を検討するため、Tor機能欠損型変異、その活性化因子Rhebならびに抑制因子Tsc1、Tsc2の機能欠損変異体において精母細胞の成長を調べた。その結果、これらの制御因子を介したTorシグナル伝達系も精母細胞の成長誘導に必要なことが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 32 件)

1. Tu Anh, N. T., Nishitani, M., Harada, S., Yamaguchi, M. and Kamei, K. A Drosophila model for the screening of bioavailable NADPH oxidase inhibitors and antioxidants. Mol. Cell. Biochem. 査読有り In press 2011
2. Park, J.-S., Kim, Y.-S., Kim, J.-G., Lee, S.-H., Park, S.-Y., Yamaguchi, M. and Yoo, M.-A Regulation of the Drosophila p38b gene by the transcription factor DREF in adult midgut. Biochim. Biophys. Acta. 査読有り 1799:510-519. 2010
3. Nagai, R., Hashimoto, R., Tanaka, Y., Taguchi, O., Sato, M., Matsukage, A. and Yamaguchi, M. Syntrophin-2 is required for eye development in Drosophila. Exp. Cell Res. 査読有り 316 2010 272-285
4. Umehara, M., Ichikawa, A., Sakamoto, H., Yamada, A., Yoshioka, Y., Yamaguchi, M. and Ikura, K. Over-expression of transglutaminase in the Drosophila eye imaginal disc induces a rough eye phenotype. Mol. Cell. Biochem 査読有り 342 2010 223-232
5. Nagai, R., Hashimoto, R. and Yamaguchi, M. Drosophila Syntrophins are involved in locomotion and regulation of synaptic morphology. Exp. Cell Res 査読有り 316 2010 2313-2321
6. Ichikawa, A., Yamada, A., Sakamoto, H., Umehara, M., Yoshioka, Y., Yamaguchi, M. and Ikura, K. Overexpression of transglutaminase in the Drosophila wing disc induced an extra wing crossvein phenotype. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有り 74 2010 2494-2496.
7. Tue, N. T., Yoshioka, Y. and Yamaguchi, M. NF- κ B transcriptionally regulates the Drosophila p53 gene. Gene 査読有り 47 2010 1-7
8. Yamaguchi, M., Suyari, O., Nagai, R. and Takahashi, M. dGirdin a new player of Akt /PKB signaling in Drosophila melanogaster. Front. Biosci. 査読有り 15 2010 1164-1171
9. Ida, H., Suzusho, N., Suyari, O., Yoshida, H., Ohno, K., Hirose, F., Itoh, M., Yamaguchi, M. Genetic screening for modifiers of the DREF pathway in Drosophila melanogaster: Identification and characterization of HP6 as a novel target of DREF. Nucleic Acids Res. 査読有り 37 2009 1423-1437
10. Suyari, O., Ida, H., Yoshioka, Y., Kato, Y., Hashimoto, R., Yamaguchi, M. Identification of the Drosophila Mes4 gene as a novel target of the transcription factor DREF. Exp. Cell Res. 査読有り 2009 1403-1437
11. Blagden, S., Gatt, M., Ichihara, K., Archambault, K., Lilley, S., Inoue, Y. H., and Glover, D. M. Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. Dev Biol 査読有り 334:2009 186-197
12. Puseenam A., Yoshioka Y., Nagai, R., Hashimoto R., Suyari, O., Itoh, M., Enomoto, A., Takahashi, M. and Yamaguchi, M. A novel Drosophila Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size. Exp. Cell Res. 査読有り 315 2009 3370-3380
13. Kuraishi, T., Nakagawa, Y., Nagaosa, K., Hashimoto, Y., Ishimoto, T., Moki, T., Fujita, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., Shiratsuchi, A., Yamamoto, N., Ueda, K., Yamaguchi, M., Awasaki, T. and Nakanishi, Y. Pretaporter, a Drosophila protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. EMBO J. 査読有り 28 2009 3868-3878
14. Tue, N. T., Thao, D. T. P. and Yamaguchi, M. Role of DREF in transcriptional regulation of the Drosophila p53 gene. Oncogene 査読有り 29 2009 2060-2069
15. Matsukage, A., Hirose, F., Yoo, Mi-Ae, Yamaguchi, M. The DRE/DREF transcriptional regulatory system: a master key for cell

proliferation. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有り 1779 2008 81-89.

16. Cui, L., Yoshioka, Y., Suyari, O., Kohno, Y., Zhang, X., Adachi, Y., Ikehara, S., Yoshida, T., Yamaguchi, M., Taketani, S. Relevant expression of *Drosophila* Heme oxygenase is necessary for the normal development of insect tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り 377:2008 1156-1161

17. Park, J. S., Kim, S. R., Park, S. Y., Yang, D. J., Lee, S. H., Choi, Y. J., Bae, M. K., Yamaguchi, M., Kim, Y. S., Yoo, M. A. Big brain, a *Drosophila* homologue of mammalian aquaporin, is regulated by the DRE/DREF system. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有り 1779 2008 789-796

18. Fujikake, N., Nagai, Y., Popiel, A., Okamoto, Y., Yamaguchi, M., Toda, T. Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 査読有り 283 2008 26188-26197

19. Mahalingam, M., Arvind, R., Ida, H., Murugan, A. K., Yamaguchi, M., Tsuchida, N. ERK2 CD domain mutation from human cancer cell line enhanced anchorage-independent cell growth and abnormality in *Drosophila*. *Oncology Rep.* 査読有り 20 2008 957-962.

20. Nakamura, K., Ida, H., Yamaguchi, M. Transcriptional regulation of the *Drosophila* moira and osa genes by the DREF pathway. *Nucleic Acids Res.* 査読有り 36 2008 3905-3915

21. Kato, Y., Kato, M., Tachibana, M., Shinkai, Y. and Yamaguchi, M. Characterization of *Drosophila* G9a in vivo and identification of genetic interactants. *Genes Cells* 査読有り 13 2008 703-722

22. Yoshioka, Y., Suyari, O., Yamaguchi, M. Transcription factor NF-Y is involved in regulation of the JNK pathway during

Drosophila thorax development. *Genes Cells* 査読有り 13 2008 117-130

23. Thao, D. T. P., Seto, H., Yamaguchi, M. *Drosophila* Myc is required for normal DREF gene expression. *Exp. Cell Res.* 有り 314 2008 184-192

24. Sugano, W., Ohno, K., Yoneda-Kato, N., Kato, J., Yamaguchi, M. The myeloid leukemia factor interacts with COP9 signalosome subunit 3 in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* 査読有り 275 2008 588-600

[学会発表] (計 76 件)

1. Inoue, Y. H., and Ichihara, K. Genetic interaction between LARP family proteins and multiple roles of LARP1 in meiotic divisions in *Drosophila* males. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、12 月 12 日、2010 年 神戸国際会議場、兵庫県神戸市

2. Miyauchi, C., Ando, I., Kitazawa, D. and Inoue, Y. H. Dynamic localization of the Orbit/CLASP during meiotic divisions in *Drosophila* males and elucidation of its regulatory mechanism. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、12 月 12 日、2010 年、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

3. 緒方翼、上石暁、井上喜博 インスリンならびに TOR シグナル伝達系によるショウジョウバエ精母細胞の細胞成長の誘導、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、12 月 12 日、2010 年、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

4. Kitazawa, D., Miyauchi, C., Inoue, Y. H. Orbit/CLASP, a possible direct linker between central spindle and contractile ring in *Drosophila* male meiosis. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、12 月 12 日、2010 年、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

5. 牛島悠太、北澤大志、井上喜博、木村宏、山口政光 ショウジョウバエの精子形成過程における G9a の機能及びヒストン修飾の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、12 月 11 日、2010 年、

神戸国際会議場、兵庫県神戸市

6. Inoue, Y. H., Ichihara K. Kitazawa D., and M. Yamaguchi., Novel RNA binding protein families, LARPs are required for male meiotic divisions in Drosophila and show an interaction with Polycomb group proteins. International symposium on "Epigenome network, development and reprogramming of germ cells" November 22, 2010, Centinental Hall, Fukuoka, Japan

7. Ichihara, K., Shimizu, H. and Inoue, Y. H., A loss of LARPI results in multiple phenotypes of spermatogenesis in Drosophila. 1st Ann. Meeting of the LARP society. 1st International meeting of the LARP Society 2010 2nd September, Imperial College, UK

8. Kitazawa, D. and Inoue, Y. H. The COPI complex is required for spindle formation and cytokinesis during meiotic cell division in Drosophila. 第62回日本細胞生物学会大会、2010. May. 19、大阪国際会議場、大阪市

9. Inoue Y. H. Male germline stem cell division and spermatocyte growth require insulin signaling in Drosophila. 2009 Recent Bio-research Works. 2009年9月11日 Pusan National University, Korea

10. Kitazawa D., and Inoue Y. H. AlphaCOP subunit of the COPI complex is required for chromosome segregation and cytokinesis during male meiotic divisions in Drosophila. 2009 Recent Bio-research Works. 2009年9月11日 Pusan National University, Korea

11. Ueishi S., Shimizu H., and Inoue Y. H. Male germline stem cell division and spermatocyte growth require insulin signaling in Drosophila. 2009 Recent Bio-research Works. 2009年9月11日 Pusan National University, Korea

12. Yamaguchi M., Studies on Drosophila histone methyltransferase G9a in vivo. 2009 Recent Bio-research Works. 2009年9月11日 Pusan National University, Korea

13. Ueishi S., Shimizu H., and Inoue Y. H.

Male germline stem cell division and spermatocyte growth require insulin signaling in Drosophila. The 9th Japanese Drosophila Research Conference. 2009年7月6日 Yamaha Resort Tsumagoi

14. Miyauchi C., Kitazawa D., Ando I. and Inoue Y. H. Mapping of functional domains in the Orbit protein required for cellular localization in Drosophila male meiosis. The 9th Japanese Drosophila Research Conference. 2009年7月6日 Yamaha Resort Tsumagoi

15. 北澤大志、井上喜博 AlphaCOP subunit of the COPI complex is required for chromosome segregation and cytokinesis during male meiotic divisions in Drosophila. 日本分子生物学会第9回春期シンポジウム 2009年5月11日 宮崎シーガイア ワールドコンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

<http://sites.google.com/site/ibmrcdrosophila/akusesu-1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 喜博 (INOUE YOSHIHIRO)
京都工芸繊維大学・昆虫バイオメディカル
教育研究センター・准教授
研究者番号：90201938

(2) 研究分担者

山口 政光 (YAMAGUCHI MASAMITSU)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：00182460

(3) 連携研究者

()

研究者番号：