

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21430

研究課題名(和文)生殖顆粒の動態を制御する転写制御因子：相分離制御におけるミトコンドリア関与の検証

研究課題名(英文) Roles of a transcriptional coactivator in the assembly of germ granules: a possible link between germ granule phase separation and mitochondrial homeostasis

研究代表者

中村 輝 (NAKAMURA, AKIRA)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：90323245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は遺伝情報を次世代に伝搬する細胞種である。生殖細胞の形成・維持に必要な固有のオルガネラとして生殖顆粒が知られている。私たちはノックダウンにより生殖細胞形成に異常をきたす母性因子として、転写コアクチベーターSrlを同定した。Srlの生殖細胞形成における役割を明らかにするため、null突然変異体を作成し、表現型解析を行った。その結果、Srlは生殖顆粒の動態制御に関わる新規因子であることが分かった。一方、Srlの哺乳類ホモログPGC-1はミトコンドリアを制御する転写制御因子である。残念ながらsrl変異体におけるミトコンドリアへの影響については、助成期間中には結論を出すことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は、卵子や精子といった配偶子を産生する細胞種であり、有性生殖を通して遺伝情報を次世代に伝える役割を持つ。生殖細胞に生じた遺伝的变化のみが次世代に伝わることから、生殖細胞は生物種の連続性や進化に深く関わる重要な細胞種である。本研究では、ショウジョウバエをモデル動物として、生殖細胞形成に関わる新規因子の機能について解析を進めた。その結果、生殖細胞を特徴づけるオルガネラである生殖顆粒の動態を制御する転写制御因子Srlを同定することができた。Srlの哺乳類ホモログはミトコンドリアの機能を制御する遺伝子の発現に関わることから、生殖細胞形成とミトコンドリア動態とが関連している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Germ cells are the only cell type that transmits genetic information to the next generation. Germ cells contain a specialized organelle called germ granules, which play important roles in germ cell formation and maintenance. We have conducted a genetic screening to identify new maternal factors involved in germ cell formation, and recovered Spargel (srl), of which knockdown in oogenesis causes germ cell-less defects in the embryo. To examine how Srl is involved in germ cell development, we generated srl-null mutants. We found that Srl is a new maternal factor that plays an important role in the assembly of germ granules. The mammalian srl homolog is PGC-1, which is known to be involved in mitochondrial homeostasis. Thus far, we fail to obtain firm evidence whether or not Srl also plays a role in mitochondria homeostasis in the Drosophila ovary.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 生殖細胞 生殖顆粒 転写コアクチベーター

### 1. 研究開始当初の背景

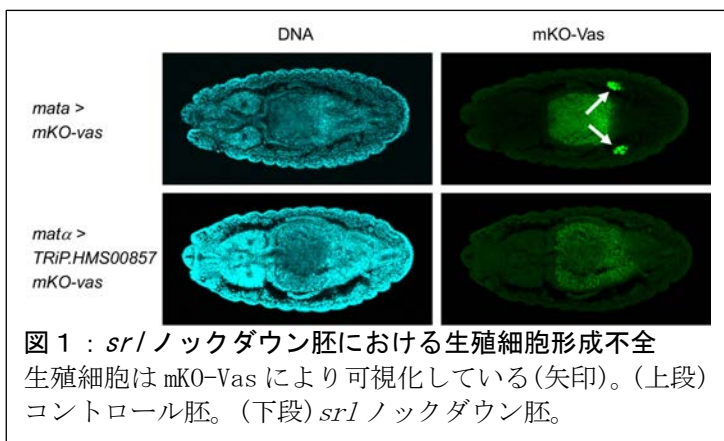
生殖細胞は、卵子や精子と言った配偶子を産生する細胞種であり、有性生殖を通して遺伝情報を次世代に伝える役割を持つ。生殖細胞に生じた遺伝的変化のみが次世代に伝達されることから、生殖細胞は生物種の連続性や進化に深く関わる重要な細胞種である。

動物の生殖細胞を特徴づけるオルガネラとして生殖顆粒 (germ granule) が知られている。生殖顆粒は、電子顕微鏡で観察された範囲において、すべての動物の生殖細胞で見出されている。ショウジョウバエにおいて、生殖顆粒は卵形成過程において形成されるが、卵母細胞後極の生殖質に形成される極顆粒 (polar granule) と哺育細胞核膜周縁部に形成されるヌアージ (nuage) の2つの形態を取る。極顆粒は、次世代の生殖細胞の形成・分化に必要な母性因子 (mRNA タンパク質) が集積し、液-液相分離することで形成される。顆粒中の mRNA の安定性や翻訳のタイミングが制御されることにより、胚発生期における生殖細胞の形成・分化が一連の過程として制御されている。一方、ヌアージは極顆粒と多くのタンパク質が共通であるにもかかわらず、生理機能が異なる。ヌアージは、転位因子 (transposable element; TE) の発現を抑制する場として機能しており、TE サイレンシングに関わる piRNA (PIWI-interacting RNA) の生合成の場として働いている。興味深いことに、PIWI ファミリータンパク質の1つである Aubergine (Aub) は、ヌアージにおいて piRNA 生合成に関与し、極顆粒へ piRNA と共に集積する。そして、胚発生過程において、Aub は piRNA と共に生殖細胞に取り込まれ、TE の情報を piRNA に書き込まれた配列として次世代に伝えている。このように2つの生殖顆粒には機能的な連携が存在するが、これらの動態を制御するメカニズムについては、不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

私たちは、ショウジョウバエ生殖細胞形成機構に興味を持ち、生殖細胞形成に関わる新規因子の同定を試みてきた。具体的には、卵形成過程で遺伝子をノックダウンすることにより、胚発生

過程における生殖細胞の形成分化に異常を示す遺伝子をスクリーニングした。これらの過程で、転写コアクチベータ PGC-1 をコードする *spargel* (*sr1*) をノックダウンした胚では、生殖細胞数が激減することを見出した。すなわち、*Sr1* は生殖質の形成に関わる新規因子であると考えられた。*Sr1* は転写に関わる因子であるので、生殖顆粒の相分離や相転移の制御に転写レベルの制御機構が関わっていることが予想された。興味深いことに、



哺乳類細胞における PGC-1 の主要な標的はミトコンドリア (mt) 生合成に関わる遺伝子群であるが、ハエ卵巣において mt はヌアージや極顆粒に近接している。特に、卵後極において、mt は極顆粒の繫留と同じ分子機構を用いて生殖質に集積する。このような背景を元に、ショウジョウバエ生殖細胞形成における PGC-1 転写コアクチベータの分子機能の解明をめざした。特に、ミトコンドリアと生殖顆粒という2つのオルガネラが相互依存的な動態制御を行うことで、動物の生殖細胞形成とミトコンドリアの次世代への分配とが共役している可能性についても検討することにした。

### 3. 研究の方法

以下の3つの戦略のもと研究を進めた。

#### ① RNA-seq 解析による *Sr1* 標的遺伝子の同定

CRISPR-Cas9 技術により *sr1* ノックアウト系統を作成し、表現型解析を進めた。既作成の生殖顆粒タンパク質に対する蛍光タンパク質ノックイン系統 (Kina et al., 2019) を活用して、表現型解析を行うと共に、新たなノックイン系統の作成も進めた。さらに、RNA-seq による発現プロファイル解析を行った。このようなアプローチから、*Sr1* によって発現制御される遺伝子の同定を目指した。さらに、卵巣のクロマチン免疫沈降 (ChIP) -seq による *Sr1* 結合部位の解析を行い、*Sr1* が直接転写を調節している遺伝子群の同定を目指した。この目的のため、3xFLAG あるいは 3xTy1 タグを *sr1* コーディング配列中にノックインさせた系統の作出を行った。

#### ② *Sr1* と協奏的に働く転写因子の同定

哺乳類細胞において PGC-1 と共にミトコンドリア生合成に関わる転写因子をして GABPA が知られている。興味深いことに、GABPA のハエホモログである *Ets97D* は、雌性不稔を示すと報告

されている (Gajewski and Schulz, 1995; Martin et al., 2003)。そこで、CRISPR-Cas9 技術により *Ets97D* の欠失変異体を作成し、生殖顆粒の動態制御への影響を解析することにした。

### ③ *Srl* 変異体におけるミトコンドリア動態

*srl* 変異体におけるミトコンドリアの分布や活性を検討することにより、生殖顆粒形成とミトコンドリア機能との相関を検討した。

## 4. 研究成果

CRISPR-Cas9 技術により *srl* ノックアウト (フレームシフト変異、及びコーディング配列の大部分を欠失させた変異) 系統を作成し、卵形成過程におけるヌアージ・極顆粒の動態を観察した。興味深いことに、*srl*-null 変異体において、生殖顆粒を構成する *Vasa*, *Tudor*, *Aub* タンパク質は卵形成初期の哺育細胞核膜周縁部に局在した。しかし、その後シグナルが激減し、生殖質へのシグナルはほとんど観察されなかった (図 2)。貯蔵 RNA を大量に含む、成熟卵を含まないように注意して調整した卵巣より抽出した RNA を用いて RNA-seq 解析を行った結果、*vasa* mRNA レベルが低下していることが判明した。一方、*tudor*, *aub* の mRNA レベルの低下は観察されなかった。そこで、*srl*-null 卵巣において *vasa* 遺伝子を過剰発現し、*srl*-null 卵巣における生殖顆粒の動態以上がレスキューされるかを検討した。その結果、*Vasa* や *Tudor* タンパク質のヌアージへの局在は回復したが、生殖質のシグナルは回復しなかった。これらの結果から、*Srl* はヌアージと極顆粒という 2 つの生殖顆粒の形成に異なった経路で関わっていることが示唆された。

生殖質における極顆粒形成は、*oskar* mRNA の卵母細胞後極への局在と局所的な *Oskar* タンパク質への翻訳によって開始される。*srl*-null における *oskar* mRNA および *Oskar* タンパク質の挙動を smFISH と抗体染色により検討した結果、*oskar* mRNA の局在量が減少し *Oskar* タンパク質がごく少量しか検出されなかった。一方、*srl*-null 卵巣において卵母細胞前極に *oskar* mRNA を異所的に発現させると、卵母細胞前極に生殖顆粒タンパク質が集積した。これらの結果より、*srl* は、*vas* の発現制御を介した生殖顆粒 (ヌアージ) の形成と共に、*oskar* mRNA の卵母細胞後極への輸送・局在・係留を介した極顆粒の形成にも関わっていると予想された。*Srl* は転写に関わる因子であるので、*Srl* は *oskar* mRNA 輸送に関わる因子の発現を制御しているのかもしれない。

mRNA-seq 解析に加えて、ChIP-seq 解析を行うために、3xFLAG および 3xTy1 タグを GSS リンカーを介してノックインした系統を作成した。抗 FLAG 抗体及び抗 Ty1 抗体を用いたウエスタン解析により、卵巣ライゼートでこれらタンパク質の発現を確認することができた。一方、*srl* コーディング配列に EGFP をノックインした系統についても作成し、核への局在を確認することができた (図 3)。現在、卵巣組織全体から調整したクロマチン画分に対する ChIP の条件について検討しているところであり、再現性のある条件を確立次第、ChIP-seq 解析を進める予定である。

*Ets97D* は転写因子 GABPA/NRF2A のショウジョウバエホモログである。哺乳動物において、GABPA/NRF2A は、PGC1 $\alpha$  とともにミトコンドリア生合成を活性化する。ショウジョウバエでは、*fat body* において、*Srl* と *Ets97D* とは、多くの標的遺伝子を共有することが報告されていることから、*Ets97D* は *Srl* を共役因子としている可能性が考えられた (Tiefenböck et. al, 2010)。そこで、*ets97D* の null (フレームシフト変異、及びコーディング配列の大部分を欠失させた変異) 変異体を作成した。*ets97D*-null 変異体はすべてのアリルが劣勢致死であった。そこで、*Ets*

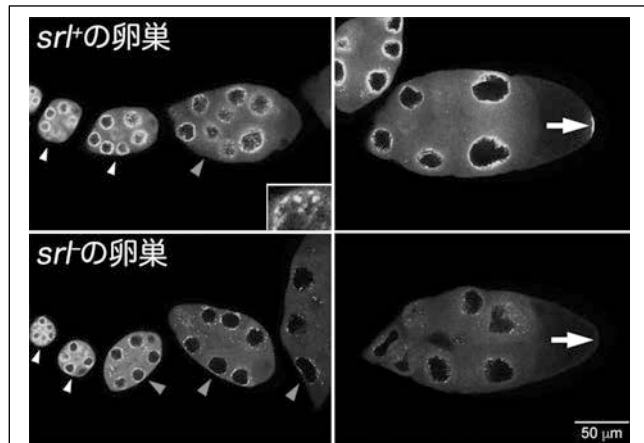


図 2 : ショウジョウバエ PGC-1 (*Srl*) は生殖顆粒の動態制御に関わる

生殖顆粒 (inset) は *Vas::EGFP<sup>M1</sup>* により可視化した。*PGC-1* (*Srl*) を欠く卵巣では、生殖顆粒 (ヌアージ) は卵形成初期には正常に形成される (白色矢尻)。しかし、中期以降安定に維持されず (灰色矢尻)、卵母細胞後極の極顆粒に集積しなかった (矢印)。

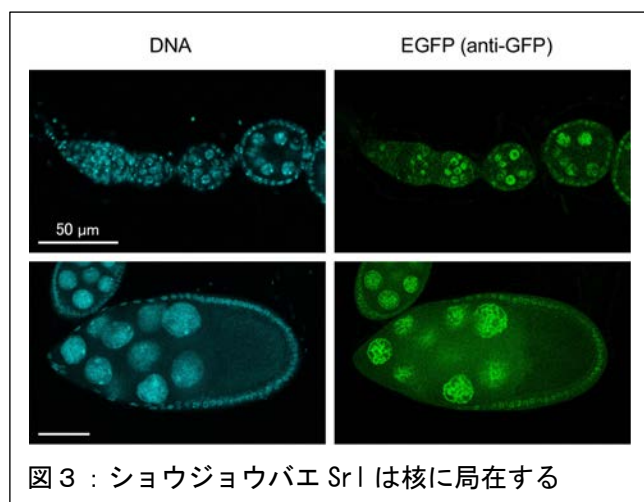


図 3 : ショウジョウバエ *Srl* は核に局在する



ドメインに Y397F 変異が入った hypomorphic アリルである *ets97D*[tne4] とのトランスヘテロ体について解析を進めた。その結果、*ets97D*[tne4]/*etd97DΔ* は *sr1*-null 変異体と良く似た表現型を示した。すなわち、生殖顆粒タンパク質のヌアージへの局在は、卵形生殖には観察されるがその後低下し、生殖質への集積は見られなかった。さらに、*vasa* mRNA レベルの低下が観察された。以上の結果から、*Sr1* と *Ets97D* は、卵形成過程においても協奏的に働いていると考えられた。既に 3xFLAG および 3xTy1 ノックイン系統を作成した。今後、*ets97D*[tne4]/*etd97DΔ* 卵巣における mRNA-seq 解析と共に、*Ets97D*-*Sr1* の相互作用や *Ets97D* に対する ChIP-seq 解析を進める予定である。

一方、*sr1*-null 卵巣において、ミトコンドリア機能が影響を受けているのかについては不明なままである。*sr1*-null 卵巣における mRNA-seq 解析では、ミトコンドリア生合成因子の発現レベルに大きな変化は観察されなかった。また、*sr1*-null 卵巣におけるミトコンドリアの分布パターンを抗 ATP5A 抗体 (mitochondrial ATP synthase  $\alpha$  に対する抗体) で染色した結果、明確な以上は観察されなかった (図 4)。mito-tracker による生体染色によるミトコンドリア活性の可視化を試みたが、残念ながら卵室内部の生殖系列細胞まで浸透せず、明確な結論は得られなかった。現在、正常な膜電位を持つミトコンドリアでは速やかに分解されるミトコンドリア外膜タンパク質である PINK1 を利用したミトコンドリアセンサーの報告を参考 (Usugi et al, 2021) に、UASp-PINK1-EGFP-T2A-TOMM20-mScarletI 系統を作成しており、ミトコンドリア活性をショウジョウバエ S2 細胞ならびに *in vivo* で検討できるか確認中である。

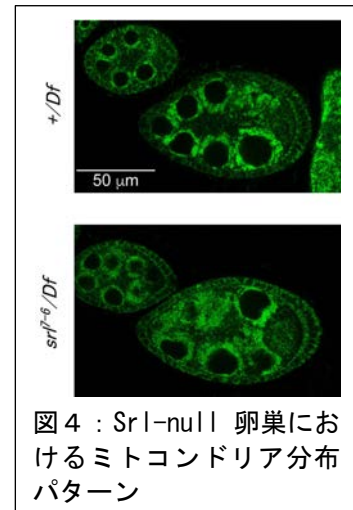


図 4 : *Sr1*-null 卵巣におけるミトコンドリア分布パターン

#### <引用文献>

- Gajewski, K.M. and Schulz, R.A. Requirement of the ETS domain transcription factor D-ELG for egg chamber patterning and development during *Drosophila* oogenesis. *Oncogene* 11, 1033-1040 (1995).
- Kina et al. Rapid and efficient generation of GFP-knocked-in *Drosophila* by the CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Develop. Growth Differ.* 61, 265-275 (2019).
- Martin S. G. et al. The identification of novel genes required for *Drosophila* anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. *Development* 130, 4201-4215 (2003).
- Tiefenböck, S. K. et al. The *Drosophila* PGC-1 homologue Spargel coordinates mitochondrial activity to insulin signalling. *EMBO J.* 29, 171-183 (2010).
- Usugi et al. Labeling and measuring stressed mitochondria using a PINK1-based ratiometric fluorescent sensor. *J. Biol. Chem.* 297, 101279 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Koiwai Kotaro, Inaba Kazue, Morohashi Kana, Enya Sora, Arai Reina, Kojima Hirotsu, Okabe Takayoshi, Fujikawa Yuuta, Inoue Hideshi, Yoshino Ryunosuke, Hirokawa Takatsugu, Kato Koichiro, Fukuzawa Kaori, Shimada-Niwa Yuko, Nakamura Akira, Yumoto Fumiaki, Senda Toshiya, Niwa Ryusuke	4. 巻 295
2. 論文標題 An integrated approach to unravel a crucial structural property required for the function of the insect steroidogenic Halloween protein Noppera-bo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7154 ~ 7167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011463	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 Kamiyama Takumi, Sun Wei, Tani Naoki, Nakamura Akira, Niwa Ryusuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Poly(A) Binding Protein Is Required for Nuclear Localization of the Ecdysteroidogenic Transcription Factor Molting Defective in the Prothoracic Gland of <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2020.00636	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 Yamamoto Maiko, Suwa Yoshiaki, Sugiyama Kohta, Okashita Naoki, Kawaguchi Masanori, Tani Naoki, Matsubara Kazumi, Nakamura Akira, Seki Yoshiyuki	4. 巻 133
2. 論文標題 PRDM14-CtBP1/2-PRC2 complex regulates transcriptional repression during transition from primed to naive pluripotency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs240176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.240176	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 Tanaka Tsubasa, Tani Naoki, Nakamura Akira	4. 巻 19
2. 論文標題 Receptor-mediated yolk uptake is required for oskar mRNA localization and cortical anchorage of germ plasm components in the <i>Drosophila</i> oocyte	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001183	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 Formicola Nadia, Heim Marjorie, Dufourt Jeremy, Lancelot Anne-Sophie, Nakamura Akira, Lagha Mounia, Besse Florence	4. 巻 10
2. 論文標題 Tyramine induces dynamic RNP granule remodeling and translation activation in the Drosophila brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e65742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.65742	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 該当する

1. 著者名 Singh Chingakham Ranjit, Glineburg M. Rebecca, Moore Chelsea, Tani Naoki, Jaiswal Rahul, Zou Ye, Aube Eric, Gillaspie Sarah, Thornton Mackenzie, Cecil Ariana, Hilgers Madelyn, Takasu Azuma, Asano Izumi, Asano Masayo, Escalante Carlos R., Nakamura Akira, Todd Peter K., Asano Katsura	4. 巻 36
2. 論文標題 Human oncoprotein 5MP suppresses general and repeat-associated non-AUG translation via eIF3 by a common mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109376 ~ 109376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109376	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 該当する

1. 著者名 Yoshinari Yuto, Kosakamoto Hina, Kamiyama Takumi, Hoshino Ryo, Matsuoka Rena, Kondo Shu, Tanimoto Hiromu, Nakamura Akira, Obata Fumiaki, Niwa Ryusuke	4. 巻 12
2. 論文標題 The sugar-responsive enteroendocrine neuropeptide F regulates lipid metabolism through glucagon-like and insulin-like hormones in Drosophila melanogaster	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25146-w	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 Buddika Kasun, Huang Yi-Ting, Ariyapala Ishara S., Butrum-Griffith Alex, Norrell Sam A., O' Connor Alex M., Patel Viraj K., Rector Samuel A., Slovan Mark, Sokolowski Mallory, Kato Yasuko, Nakamura Akira, Sokol Nicholas S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Coordinated repression of pro-differentiation genes via P-bodies and transcription maintains Drosophila intestinal stem cell identity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 397.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.11.032	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 K. Hanyu-Nakamura, K. Aimi and A. Nakamura
2. 発表標題 The Drosophila PGC-1 homolog, Spargel, is required for proper germ granule assembly during oogenesis
3. 学会等名 JSDB Online Trial Meeting 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Hanyu-Nakamura, K. Aimi, T. Kurogi and A. Nakamura
2. 発表標題 The Drosophila PGC-1 homolog, Spargel, is required for germ granule assembly during oogenesis
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会年会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

発生医学研究所生殖発生分野ホームページ <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/germline_development/">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/germline_development/</a> 卵黄の常識が変わる：卵母細胞の機能における卵黄タンパク質の取り込みの重要性を発見 <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np120/">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np120/</a>
---

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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			