

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06187

研究課題名（和文）マイクロバイオーームが制御するショウジョウバエ卵形成の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of microbe-induced *Drosophila* oogenesis

研究代表者

須山 律子 (SUYAMA, Ritsuko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：30574652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境因子である微生物叢及びその分泌物質が生体雌での生殖幹細胞の増殖促進と細胞死の抑制、成熟卵の分裂速度の上昇に寄与し、これらの相加的な作用が卵形成を促進することを明らかにした。また、メタゲノム解析で同定した微生物株の培養液でも同様に卵形成が促進できることを見出した。微生物叢により活性化される卵形成亢進は、昆虫の変態ホルモンとして知られているエクジソン、幼若ホルモンが関与することを明らかにし、さらにこれらのホルモン経路による卵形成の亢進は、体細胞に発現している受容体からのシグナルが生殖幹細胞に伝達されることによる非自律的な細胞間相互作用によることが解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の皮膚や粘膜面に存在する数百種類の常在細菌は数十および数百兆個からなる細菌叢（マイクロバイオーーム）を形成し、宿主の免疫、代謝、生殖機能などの生理作用に影響を与えている。ヒトを含む哺乳類だけでなく、ショウジョウバエなどの無脊椎動物でも微生物叢の生殖機能に関する影響についての報告があるが、その分子基盤やそれを制御するシグナル経路は解明されていなかった。本研究では、マイクロバイオーーム及びその分泌物質の影響を受けて亢進する生殖機能の分子基盤を解明した。我々の知見は、ヒトにも適用できる普遍的な分子経路の解明に繋がり、生殖機能の亢進をもたらす手立てを提供できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated that environmental factors from microbiome and their secreted substances contribute to the acceleration of proliferation in female germline stem cells, inhibition of cell death, as well as the acceleration of division rate of mature eggs, and these additive effects are crucial for promoting egg maturation. Furthermore, we found that egg maturation can also be promoted by cultured microbial strains identified by metagenome analysis. The egg maturation by microbes revealed the involvement of ecdysone and juvenile hormones, known as insect metamorphic hormones. Additionally, we clarified that the enhancement of egg maturation through these hormone pathways occurs via non-autonomous cellular interactions, whereby signals from receptors expressed in somatic cells are transmitted to the germline stem cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 微生物叢 生殖幹細胞 卵形成 ホルモン経路

1. 研究開始当初の背景

本申請課題は、「個体(ドナー)からの分泌物質などによる化学的刺激や環境因子により他個体の卵形成が制御される」という仮説から着想した。申請者は予備実験を行い、貧栄養状態で個体(ドナー)の分泌物質が他個体の雌の卵形成を亢進することを確認した(図1)。さらに微生物叢の作用を受けて変化する卵形成過程に関する実験を遂行し、以下の予備的結果を得ていた。(1)卵形成を亢進する微生物を同定し、(2)微生物感作により雌の卵成熟の各過程が相加的に促進され、卵形成亢進が誘導されるという結果を導いた(図2)。

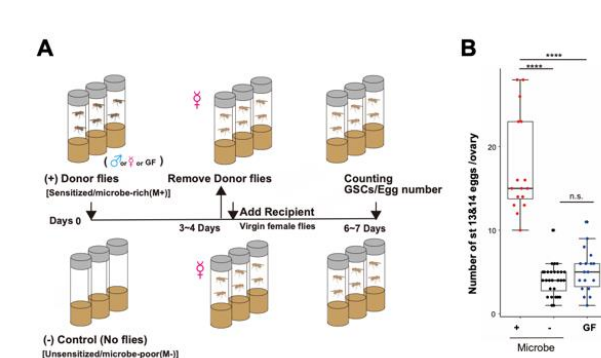


図1. A:微生物叢に感作される雌成体の卵形成の評価系:野生型のハエをバイアルに入れ微生物叢を付着させた後除去し、雌を入れる。微生物あり(上段 M+)では、微生物無し(下段 M-)より卵形成は亢進する。B: 微生物叢による成熟卵の増加:微生物あり(M+)では卵形成が亢進され、微生物なし(M-)および GF 株より成熟卵の数が増加している。**** $P \leq 0.001$.

2. 研究の目的

本研究では、微生物叢と生殖能力の関連性に着目し、微生物叢による卵形成亢進作用の分子基盤の解明を目指す。申請者は微生物叢とその分泌物質の同定を試み、生殖幹細胞の自己増殖能がどのように制御され、その後の卵形成過程が促進されるかを細胞及び分子レベルで解明する。ヒト同様に味覚や嗅覚などの感覚器を持つキロショウジョウバエを対象とし、組織ごとの遺伝子発現制御などの遺伝学的手法に優れた利点を活用し、数多くの特定遺伝子や分子経路を組織特異的に個体レベルで評価する。微生物が関与する卵形成亢進の分子メカニズムについて、無脊椎動物での特異的な分子経路を見出し、哺乳類での解析に展開可能である普遍的な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)卵形成を亢進する微生物叢とその分泌物質の同定:

ショウジョウバエ成体から抽出したゲノムから微生物の 16SrRNA 遺伝子領域についてのメタゲノム解析を行った。その結果から、ドナーの微生物叢の種類ではなく、微生物の量やその代謝物が卵形成を亢進していると考えられたため、ドナー個体の血リンパ及び排泄代謝物中のホルモンレベルおよび脂質、アミノ酸の直接質量分析による定量を試みることにした。

(2)微生物叢によって活性化される卵成熟過程の同定:

微生物叢の影響を受けて、生殖幹細胞数が増加し、生殖細胞での細胞死の頻度が減少し、卵の成熟速度が加速しており、これらが卵成熟の各過程で相加的に作用し卵形成を増進することがわかった。生殖幹細胞増殖には微小空間・ニッチ環境内の体細胞からの DPP リガンドによる BMP シグナル伝達の増幅系が必要である。BMP 経路の下流にある微小管蛋白の動態が生殖幹細胞の自己増殖を制御することがわかってきており、微生物叢感作を受けて増殖する生殖幹細胞で、*ex vivo* ライブイメージングにより、DPP リガンドと微小管蛋白の動態変化の相関性を明らかにする。

(3)微生物叢およびその分泌物質が制御する分子基盤の解明:

①候補遺伝子探索による分子経路の同定:

卵形成に関わると考えられている候補遺伝子について、RNA 干渉法により機能抑制した雌成体を

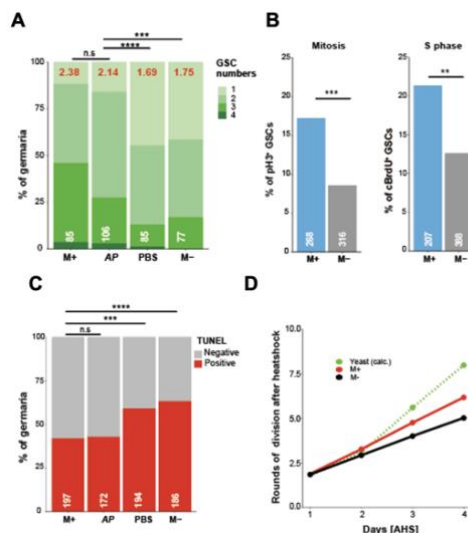


図2.微生物叢による卵形成過程の制御機構の定量的解析
A: 生体雄由来の腸内微生物(M+)および単離した微生物叢存在下(AP)では生殖幹細胞数が有意に増加している(M-:コントロール)、B:PH3 および BrdU ラベルによる細胞周期の可視化、生体雄由来の腸内微生物(M+)では有意に M 期、S 期で細胞分裂が促進される。C: germarium での TUNEL ラベルによる細胞死の検出。腸内微生物存在下(M+)、単離微生物叢 (AP) ではコントロール群 (M-)に比べて細胞死が減少。D: 卵細胞の成熟速度の定量。M+では酵母含量の多い富栄養条件には劣るが、M-より成熟速度は速い。**** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.005$.

作成し、その卵形成亢進作用を評価する。候補遺伝子は、生殖幹細胞の増殖および卵細胞の成熟に必要であることが知られているホルモン（エクジソン、インスリン、幼若ホルモン）の受容体及びそのリガンド遺伝子である。申請者はすでにこれらの遺伝子について RNA 干渉法を行い、評価を進めている。さらに申請者はマイクロバイームを形成する微生物が自然免疫経路に作用して卵形成を亢進する予備的な結果を得た。従って、現在、自然免疫系によって活性化される Toll、Imd 経路の各経路を制御する遺伝子についても同様に解析を進め、これらの経路の卵形成への関与を調べる。

②ケミカルライブラリのスクリーニングによる生殖幹細胞における分子経路の同定:

生殖幹細胞で機能する既知の分子経路の阻害剤からなる低分子化合物群を用い、微生物叢により影響を受ける生殖幹細胞の分子経路を特定する。本方法は、遺伝子機能抑制で個体致死になる場合を補填する方法にもなる。申請者はすでに基礎となる評価系を確立しており、今後スクリーニングを開始する。得られた結果について、卵形成を阻害する分子経路に関わる遺伝子について、遺伝子欠損、過剰発現などの遺伝学的手法により個体レベルで卵形成機能を評価する。

4. 研究成果

我々は、上記研究方法によって得られた結果をまとめ、論文発表を行った（出版論文参照）。これまで、栄養、受精刺激による分子メカニズムに関する詳細な解析はあったが、微生物叢による解析はなく、生物学的観点からこれら環境因子の違いや類似性を比較、検討することの重要性に加えて、不妊のメカニズムを解明する上で、意義を持つと考える。

(1) 卵形成を亢進する微生物叢とその分泌物質の同定:

ショウジョウバエ成体から抽出した微生物の 16SrRNA 遺伝子領域についてのメタゲノム解析を行い、その結果を再解析し、ドナー微生物叢が別個体の生体雌の微生物叢および生殖機能に影響することを明らかにした（図 3）。また微生物叢は主に *Acetobacter* 属からなることが分かった。この結果と同様、単離した *Acetobacter* 微生物培養液でも生殖機能の増進が観測されることを確認している。

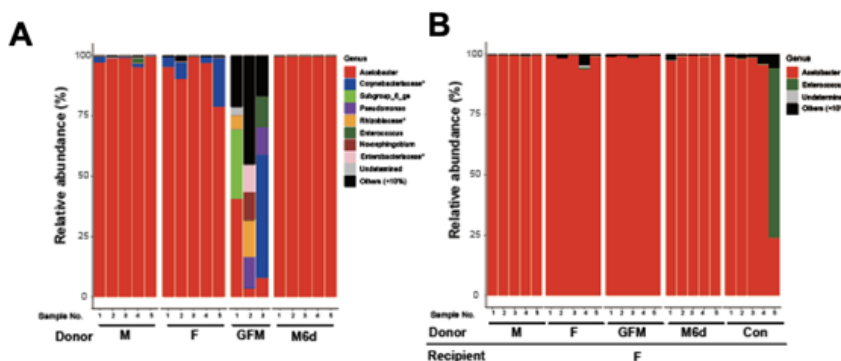


図 3. 16SrRNAseq による微生物叢の多様性の解析: A:ドナーでの雄(GF:微生物非存在下、M:野生型雄、F:野生型雌)の微生物叢の割合、B:GF 株、雄、雌の成体で感作された雌(F)の微生物叢の多様性（コントロールを含む）。

(2) 微生物叢によって活性化される卵成熟過程の同定:

微生物叢の影響を受けて、生殖幹細胞数が増加、生殖細胞の細胞死の頻度が減少し、卵の成熟速度が加速していた。また、これらが卵成熟の各過程で相加的に作用し卵形成を増進することを確認した。申請者は生殖幹細胞でのこの結果をサポートする新たな実験結果を加え（図 2B）、微生物叢感作を受けて増殖する生殖幹細胞のメカニズム、および成熟卵形性能を明らかにした。ex vivo ライブイメージングにより、DPP リガンドと微小管蛋白の動態変化の相関性については、入手したショウジョウバエ株の蛍光シグナルが弱く、観察には至らなかった。

(3) 微生物叢およびその分泌物質が制御する分子基盤の解明:

①候補遺伝子探索による分子経路の同定:

卵形成に関わると考えられている候補遺伝子について、RNA 干渉法により機能抑制した雌成体を作成し、微生物叢存在下での生殖幹細胞増殖、卵形成亢進作用を評価した。候補遺伝子のうち、ホルモン経路に関わるエクジソン、幼若ホルモン受容体の機能抑制により、微生物叢存在下でも生殖幹細胞増殖が抑制された。従ってこれらの経路が微生物叢によって引き起こされる生殖機能に重要であることが明らかになった（図 4）。エクジソン、幼若ホルモンが生殖幹細胞増殖に影響する一方で、エクジソンのみが成熟卵形成に関与していた。また、栄養条件で影響を受ける

インスリン経路は関与しない、という興味深い結果得た。

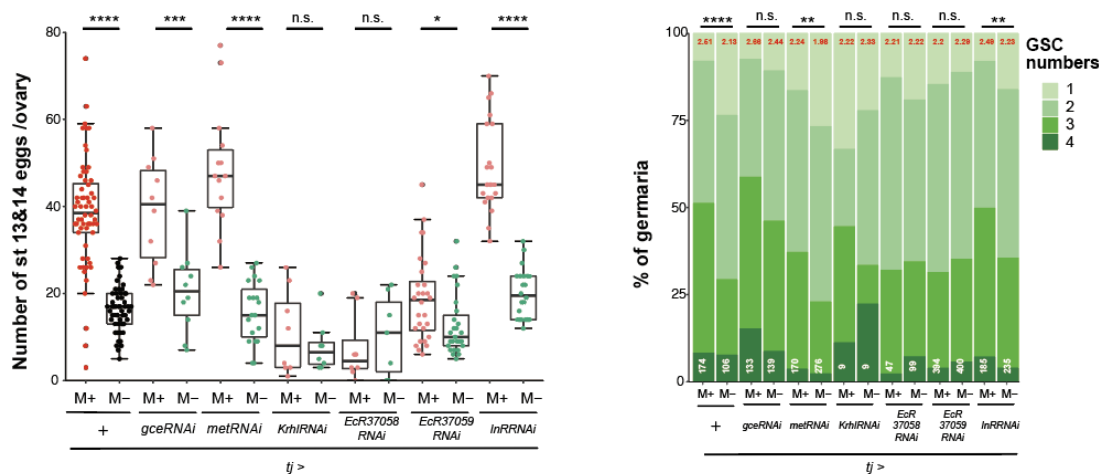


図 4.候補遺伝子の RNA 干渉法による機能抑制 A:成熟卵の数の評価 B:生殖幹細胞数での評価。WT: 野生型(+)gce,met: 幼若ホルモン受容体, EcR: エクジソン受容体, InR: インスリン受容体。(M+微生物あり, M-微生物なし) **** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.005$, ** $P \leq 0.05$, * $P \leq 0.01$.

次に LacZ システムを有するショウジョウバエ株を用いてホルモンリガンドによるホルモン受容体の活性化を検討した。微生物叢存在下ではエクダイソン受容体が初期卵細胞での体細胞および後期体細胞で、コントロールに比べて活性化された(図 5)。一方、幼若ホルモンは生殖幹細胞増殖を制御するが、後期体細胞の受容体の活性化は見られなかった。このことは、エクジソン経路のみが成熟卵形成に寄与しているという先の結果と一致する(図 4, 5)。

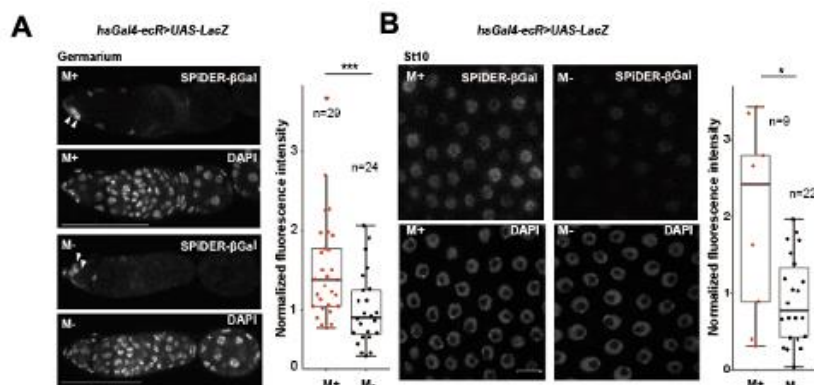


図 5.ホルモン受容体-LacZ システムによるホルモンリガンドの可視化.A: 微生物叢存在下 (M+) では *hsGal4-ecR>UAS-LacZ* による初期卵細胞のエクジソン受容体活性化が有意に上昇する。B: 微生物叢存在下 (M+) では *hsGal4-ecR>UAS-LacZ* による後期濾胞細胞でのエクジソン受容体活性化が有意に上昇する。*** $P \leq 0.005$, * $P \leq 0.01$.

さらに採取した卵細胞に、ex vivo でリガンドを供与したところ、両ホルモン共にリガンドの濃度に応じて生殖幹細胞の増殖が見られた(図 6)。このことから、微生物叢による生殖機能の亢進は、これらホルモンリガンドが上昇し、体細胞に発現している受容体を介して経路を活性化することによるものであることが分かった。特に、ホルモン受容体を生殖細胞で機能抑制しても微生物叢による機能は阻害されなかったことから、体細胞で機能する受容体と生殖幹細胞の非自律的な細胞間相互作用が微生物叢による増殖に重要であることが示唆された。Toll, Imd 経路などの自然免疫経路に作用して亢進される機能についても同様に解析を進めたが、Toll 経路での関与が不明瞭であったためこの経路の卵形成への関与については、まだ明らかになっていない。

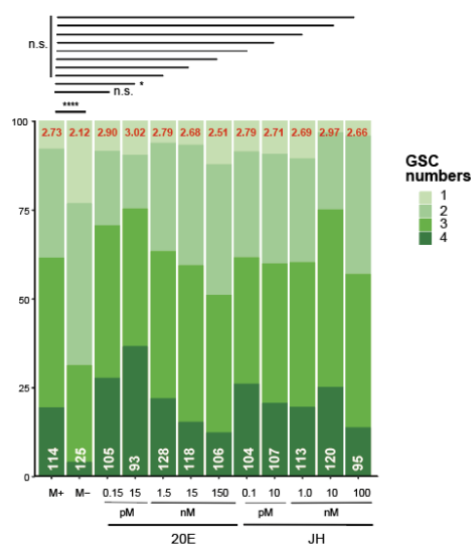


図 6.ホルモンリガンド投与による生殖幹細胞数の変化.異なる濃度のホルモンリガンド、エクジソン(20E)、幼若ホルモン(JH)を添加した場合の生殖幹細胞数の変化、両ホルモンリガンド投与で生殖幹細胞は微生物叢あり (M+) と同等に増加する。**** $P \leq 0.001$.

③ケミカルライブラリのスクリーニングによる生殖幹細胞における分子経路の同定： 生殖幹細胞で機能する既知の分子経路の阻害剤からなる低分子化合物群を入手し、微生物叢により影響を受ける生殖幹細胞の分子経路をスクリーニングした。まずパイロット実験で基礎となる評価系を確立した。このスクリーニングでは、バイアルあたり3匹のショウジョウバエで評価できることを確認した。その後、88個の生殖幹細胞の機能に関わる化合物存在下、微生物叢による生殖幹細胞増殖が影響されるかをテストした。その結果、27個が微生物存在下でもその効果を抑制、もしくは増強することを明らかにした。

以上より、微生物叢の影響を受けて、別個体の生体雌体内でエクジソン、幼若ホルモン経路が活性化され、その生殖機能が増進することが明らかになった。また生殖幹細胞はエクジソン特異的な経路によってその増殖が制御されることが分かった。このことは栄養条件によって制御されるインスリン経路の活性化とは独立しており、環境因子によって異なる経路が活性化されることを示すものである。微生物による個体レベルでの解析は未だ報告がなく、飼育バイアル内での環境というマクロの影響がミクロの生殖幹細胞の分子基盤制御機構を解明することで、これらが担う個体の生殖機能に関する知見を得ることができた。

今後、計画していたドナー個体の血リンパ及び排泄代謝物中のホルモンレベルおよび脂質、アミノ酸の直接質量分析による定量解析が技術的に困難であったことを補填する実験を行い、微生物叢が供給する‘栄養’による生殖機能を増進する分子基盤を解明する。このような理解は非常に興味深く、不妊を含む生殖機能疾患の予防や、治療薬の開発につながることを期待するものである。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 須山律子	4. 巻 39
2. 論文標題 生殖細胞の運命を制御する非膜性RNAP凝集体	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 78-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 —

1. 著者名 Suyama Ritsuko, Cetraro Nicolas, Yew Joanne Y., Kai Toshie	4. 巻 6
2. 論文標題 Microbes control Drosophila germline stem cell increase and egg maturation through hormonal pathways	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05660-x	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Microbes control Drosophila oogenesis
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Microbes control Drosophila oogenesis
3. 学会等名 先進ゲノム支援 2022年度拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Microbes control Drosophila oogenesis
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会プログラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Tejas functions in piRNA Biogenesis via Nuage Assembly in Drosophila
3. 学会等名 学術変革会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Microbes control the germline development in Drosophila
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Microbes control the Drosophila oogenesis
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Molecular dynamics of microbe-induced Drosophila oogenesis
3. 学会等名 先進ゲノム支援 2023年度拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須山律子
2. 発表標題 Tejas functions in piRNA Biogenesis via Nuage Assembly in Drosophila
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

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			
米国	ハワイ大学	マノア校	太平洋生命科学研究センター	