

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711020

研究課題名(和文) ショウジョウバエ始原生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理機構の解析

研究課題名(英文) The role of glycolysis in mitochondrial quality control in germline of *Drosophila*

研究代表者

林 良樹 (Hayashi, Yoshiki)

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：30508817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアはエネルギー産生や細胞機能を制御する重要なオルガネラである。ミトコンドリアは生殖系列を通じて次世代に継承されるが、正常なミトコンドリアをもつ生殖系列が選択される仕組みは不明である。

本研究ではPGCの選択的細胞死誘導がこの仕組みに関与するという仮説を検証した。このためにミトコンドリアの定量的画像解析法の開発を行い、PGC中のミトコンドリアの定量的比較を行った結果、選択的に排除されるPGC中ではミトコンドリア量が顕著に現象することが明らかとなった。さらにPGCの細胞死誘導には解糖系代謝酵素遺伝子の働きが必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown glycolysis acts central role for regulation of cellular character in cancer and stem cells. Although these studies strongly suggest that glycolysis has an important role in animal development, role of glycolysis in the developmental processes, such as germline development, has remained elusive.

For revealing metabolic status of germline, we performed metabolomics of primordial germ cells (PGCs) of *Drosophila*. We found that glycolysis is enhanced in PGCs in early embryos. By investigating the role of glycolysis in PGCs by RNAi, we found glycolysis regulates induction of PGC cell death during embryogenesis. In addition, through developing quantitative imaging analysis for mitochondria, we found that amount of mitochondria was significantly reduced in PGCs causing cell death. Our study strongly suggested that glycolysis dependent PGC cell death has important role to eliminate the PGCs with unwanted mitochondria.

研究分野：発生生物学、生殖生物学

キーワード：ミトコンドリア 解糖系 生殖系列 始原生殖細胞 ショウジョウバエ メタボロミクス 細胞内代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物のエネルギー産生を担うだけでなく、様々な細胞制御を行う重要なオルガネラである。ミトコンドリアの機能不全はミトコンドリア関連疾患を引き起こすことで個体の生命を脅かす。多くの多細胞生物において、個体もつミトコンドリアは生殖系列を通じて母性的に継承される。正常なミトコンドリアをもつ生殖系列を選び出す仕組みは、次世代の生命に直結するが、正常なミトコンドリアをもつ生殖系列が、いつどのような仕組みで選択されるかは不明である。

ショウジョウバエは遺伝学的操作が容易であるだけでなく、世代間隔が短いことより、生殖系列の発生についての理解が進んでいる動物である。

ショウジョウバエの生殖系列は胚発生過程の初期において胚の後極に形成される始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell、以下 PGC とする) に由来する。初期胚において形成された PGC は胚発生過程を通じてその数を減らしながら胚の中を移動し、胚発生過程後期において胚の生殖巣に取り込まれる。PGC は生殖巣中において生殖幹細胞に分化し、成虫期の生殖巣において配偶子形成過程を経て生殖細胞に分化する。

この一連の過程において、生殖系列の品質管理は二つの段階で起こると考えられてきた。一つは成虫期の配偶子形成過程におけるアポトーシスの誘導である。この過程において、DNA 2 本鎖損傷等を含むゲノムをもつ生殖系列は、DNA ダメージチェックポイントの働きによりアポトーシスにより排除される。もう一つは胚発生過程における PGC 数の減少である。PGC はその移動過程において、全体の約 30% が細胞死により排除されることが古くから知られている。この過程は、異常な生殖系列を排除する品質管理の仕組みだと考えられてきたが、細

胞死がネクローシスによるため、それを制御する仕組みおよび対象は不明であった。

研究提案者は先行研究において、生殖系列がもつ細胞内代謝状態およびその発生過程における役割の解明を目指して研究を行ってきた。申請者が研究を始める段階において、生殖系列に対する網羅的遺伝子発現解析等により生殖系列特異的に発現する遺伝子やその働きの解明は進んでいたが、細胞内代謝の働きは“ハウスキーピング”なものとして解析がなされていなかった。その一方で、ガン細胞や哺乳類培養幹細胞を用いた研究において、細胞内代謝はハウスキーピングな役割に加えて、核酸やタンパク質の働きを制御することで細胞の性質を左右することが明らかになりつつあった。このような知見をもとに、研究提案者は、生殖系列は固有な代謝状態をもち、その代謝状態が生殖系列の発生を制御すると予想し、PGC を対象とした研究を行った。

まず最初に PGC がもつ細胞内代謝の解明を試みた。このためにセルソーティングとメタボロミクスを組み合わせた生体内単一細胞種メタボロミクスを行った。その結果、初期胚の PGC は初期胚の体細胞に比べて解糖系の中間代謝産物を有意に多く含んでいること、さらに胚発生後期における PGC では解糖系代謝中間代謝産物量が減少することが明らかとなった。以上の結果は、初期胚の PGC (以下、初期 PGC とする) は解糖系の活性が亢進しており、解糖系の活性は後期胚の PGC (以下、後期 PGC とする) では減弱することを強く示唆している。そこで解糖系を構成する代謝酵素遺伝子の発現解析を行った。その結果、解糖系代謝酵素遺伝子の発現は初期 PGC では高く、後期 PGC では低下することが明らかとなった。以上の結果はメタボロミクスの結果と一致しており、また PGC における解糖系の活性

は遺伝子発現レベルで制御されていることを強く示唆している。

そこで次に PGC の発生過程における解糖系の役割の解明を試みた。このために PGC において解糖系代謝酵素遺伝子の働きを RNAi 法により機能阻害し、その影響を観察した。その結果、このような胚においては、正常胚において観察される PGC 数の減少が起きなくなることを見出した。この結果は、PGC における解糖系の亢進は PGC のネクロシス誘導に必要であることを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ショウジョウバエの生殖系列をモデルとして、生殖系列において正常なミトコンドリアを選別し、正常なミトコンドリアをもつ生殖系列を選び出す品質管理の仕組みを明らかにすることにある。

この仕組みを明らかにするにあたり、本研究では胚発生過程における PGC のネクロシスに着目して研究を行った。その際、上記の先行研究により明らかとなった PGC における解糖系の更新が、異常なミトコンドリアをもつ PGC にネクロシスを誘導することで正常なミトコンドリアをもつ PGC を選抜するという仮説の検証を行った。研究提案者が研究を開始する段階で、解糖系は異常なミトコンドリアを選択的に排除する仕組み（マイトファジー）を制御すること、また Tumor Necrosis Factor(TNF) 経路とともに働くことでネクロシス誘導を行うことが知られていた。そこで本研究ではとくに、解糖系が PGC においてマイトファジーを誘導すること、あるいは TNF 経路を制御することで異常なミトコンドリアをもつ PGC を排除するという二つの可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、以下の3点を行った。

(1) PGC における解糖系の亢進の確認

先行研究において得られている PGC における解糖系の亢進について、解糖系代謝酵素の発現の確認および解糖系の中間代謝産物の含有量が解糖系代謝酵素の働きに依存して変動するかを確認することにより、検証する。このために解糖系代謝酵素に対する抗体を作成し、免疫化学染色を行うこと、さらに解糖系代謝酵素遺伝子の機能を阻害した PGC に対するメタボロミクスを行うことにより検証する。

(2) PGC におけるミトコンドリアの定量的解析

PGC 中において異常なミトコンドリアの排除が行われるかを検証するために、ミトコンドリアの可視化の方法およびその定量的画像解析法を開発する。

(3) マイトファジーおよび TNF 経路に関与する遺伝子の遺伝学的解析

上述のように解糖系はマイトファジー、あるいは TNF 経路を制御することにより PGC の選択的なネクロシスを誘導する可能性がある。そこでこれらの仕組みに関与する因子（マイトファジー：Atg や Parkin, Pink1 等、TNF 経路：eiger, bsk 等）を対象とした遺伝学的解析を行い、これを検証する。

4. 研究成果

(1) 解糖系の発現解析およびメタボローム解析

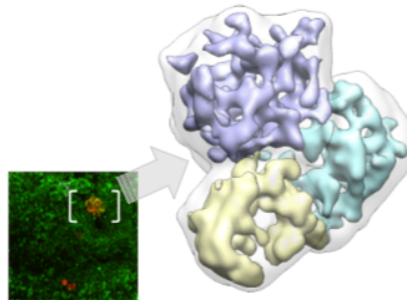
解糖系を構成する代謝酵素のほぼ全てについて、抗体の作成を試みた。この結果、このような代謝酵素の半分程度に対して、免疫化学染色が可能な抗体を得た。これらの抗体 (PyK, Gapdh1 等) を用いて免疫化学染色を行った結果、初期 PGC においてはこれら酵素が高いレベルで発現していることを確認した。これらの結果は、遺伝子発現解析の結果と一致しており、PGC における高い解糖系の活性を支持する結果である。

一方、解糖系阻害胚の PGC を対象としたメタボロミクスからは良好な結果を得ることができなかった。これは解糖系の機能阻害より、解糖系中間代謝産物量が減少したために、正常胚を対象としたメタボロミクスにおいて用いたサンプル量では不足であったためと考えられる。この点については、解析に用いるサンプル量を増やす等の対策が必要である。

(2) ミトコンドリアの定量的画像解析法の開発

ミトコンドリアの可視化について、当初はマイトトラッカー等のミトコンドリアマーカーを用いた解析を試みていた。しかし結果は良好ではなかった。そこでミトコンドリアに特異的に局在する因子（電子伝達系構成因子等）についての免疫化学染色やミトコンドリア局在シグナルをもつ蛍光タンパク質を用いた解析を行った。その結果、PGC 中においてミトコンドリアを可視化する方法を確立した。そこで次にこの方法により得られる取得画像より PGC 中のミトコンドリアを定量的に解析することを試みた。当初、IMALIS 等の定量画像解析ソフトを用いた解析を行ったが、其々の PGC を画像より分離し、シグナル強度の補正を行うことでミトコンドリアを定量することは困難であった。そこで画像定量を専門とする研究者（研究参加者参照のこと）と共同研究を行い、PGC 中のミトコンドリア量を画像より定量的に測定する方法を開発した（論文作成中）。この方法を用いて PGC 中のミトコンドリア量を定量したところ、胚発生過程において選択的に排除されている PGC 中ではミトコンドリア量が有意に減少するという結果を得た。このことは胚発生過程における PGC の選択が、ミトコンドリアの品質管理と密接な関係があることを強く示唆している（論文作成中）。

図：ミトコンドリアの定量的画像解析



(3) TNF シグナル経路の遺伝学的解析

解糖系の場合と同様に、TNF 経路およびマイトファジー誘導に関与する因子について、PGC 中において遺伝学的に阻害し、その影響を観察した。その結果、TNF 経路構成因子 (bsk) の働きを阻害した場合、解糖系と同様に胚発生過程における PGC 数の減少が減弱することが明らかとなった。このことは TNF 経路が PGC の選択的な細胞死誘導において重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Autocrine regulation of ecdysone synthesis by beta3-octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis.

Oohara, Y., Shimada-Niwa, Y., Niwa, R., Kayashima, Y., Hayashi, Y., Akagi, K., Ueda, H., Yamakawa-Kobayashi, K., Kobayashi, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol.141, pp.1452-1457 (2015)

Analysys of *Drosophila* glucuronyl C-5 epimerase: implication of developmental roles of heparan sulfate sulfation compensation and 2-O sulfated glucuronic acid.

Dejima, K., Takemura, M., Nakato, E., Peterson, J., Hayashi, Y., Toyoda, A., Toyoda, H., Nakato, H.,

J. Biol. Chem. vol. 288, pp.34384-34393
(2013)

[学会発表](計 16 件) (招待講演:7 件)

1. Characteristics of Drosophila Germ-line from Metabolic Aspects.-The role of methionine metabolism during germ-line development of Drosophila -,

Hayashi Y.

The International Research Symposium on Germness and Pluripotency of the Planarians in comparison with Fly and Mouse systems.

2018 年 3 月, 弘前大学 (青森) *招待講演

2. The role of methionine metabolism during germline development in Drosophila melanogaster.

Hayashi, Y., Hino S., Kashio S., Sato, T., Noda, C., Miura, M., Nakao, M., Kobayashi, S., KEY Forum: The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems,

2018 年 1 月, 熊本市国際交流会館 (熊本)

3. メチオニン代謝制御による生殖系列におけるトランスポゾン抑制機構、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、日本動物学会第 88 回大会, 2017 年 9 月, 富山県民会館 (富山)

4. The role of methionine metabolism during germline development in Drosophila melanogaster.

Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S., 第 50 回日本発生生物学会大会, 2017 年 5 月, タワーホール船堀 (東京)

5. ショウジョウバエ始原生殖細胞の代謝的性質とその役割-生殖系列の品質管理におけるメチオニン代謝の役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月, パシフィコ横浜 (神奈川) *招待講演

6. The role of methionine metabolism during germline development in Drosophila melanogaster.

Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S., Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, 2016 年 11 月, 沖縄コンベンションセンター (沖縄)

7. メタボロミクスから見えてきた始原生殖細胞の代謝的性質とその役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月, パシフィコ横浜 (神奈川) *招待講演

8. The role of glycolysis in primordial-germ-cell development of fruit fly, Drosophila melanogaster.

Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S., 日米先端科学 (JaFos) 2014 シンポジウム, 2014 年 12 月, ホテルニューオータニ (東京)

*招待発表

9. メタボロミクスから見えてきた始原生殖細胞の代謝的性質とその役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月, 国立京都国際会館 (京都) *招待講演

10. The role of glycolysis in primordial-germ-cell development in Drosophila embryos.

Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S., Cold Spring Harbor Meeting on Germ Cells, 2014 年 10 月, Cold Spring Harbor laboratory (Cold Spring Harbor, NY, USA)

11. ショウジョウバエ始原生殖細胞におけるメチオニン代謝の役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、日本動物学会第 85 回大会, 2014 年 9 月, 東北大学 (宮城)

12. The role of Heparan sulfate proteoglycans in Drosophila germline stem cell niche.

Hayashi, Y., Sugiyama, A., Kobayashi, S., 第
47回日本発生生物学会大会, 2014年5月,
ウヰンク愛知(愛知) *招待講演

13. ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生
過程における解糖系の新規役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、発生生
物学会秋季シンポジウム2013, 2013年11月,
神戸しあわせの村(兵庫)

14. ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生
過程における解糖系の新規役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、第1回
がんと代謝研究会, 2013年10月, 慶應義塾
大学先端生命科学研究所センター(山形)

***招待講演**

15. ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生
過程における解糖系の新規役割、

林 良樹、野田 千代、小林 悟、日本動
物学会第84回大会, 2013年9月, 岡山大学
(岡山)

16. The role of glycolysis in
primordial-germ-cell development in
Drosophila embryos.

Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S., 第46
回日本発生生物学会大会, 2013年5月, く
びきメッセ(島根)

〔図書〕(計 1件)

書籍タイトル: “Reproductive &
Developmental Strategies for Life Continuity”,
出版社: Springer Japan KK, in press,
分担項タイトル: “Regulatory mechanisms of
the germline stem cell niche in *Drosophila*
melanogaster.” (査読あり)

著者: **Hayashi, Y.***, Kobayashi, S. *責任著者

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良樹 (HAYASHI, Yoshiki)
筑波大学・生命領域学際研究センター・助
教
研究者番号: 30508817

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

木森 義隆 (KIMORI Yoshitaka)
福井工業大学・環境情報学部・准教授
研究者番号: 10585277