

令和元年6月3日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07346

研究課題名(和文) 飢餓ストレスに応答して作動する新規エピジェネティック制御システム

研究課題名(英文) Novel epigenetic regulatory system responding to starvation stress

研究代表者

山口 政光 (Yamaguchi, Masamitsu)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：00182460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 飢餓条件下に置いた野生型ショウジョウバエとdG9a欠失変異体のRNA-seq解析とメタボローム解析により、オートファジーに関連する代謝経路と関連遺伝子の発現異常がdG9a遺伝子の欠失により誘導されることを見出した。またdG9a欠失変異体の脂肪体ではオートファジー活性が低下し、オートファジーによるエネルギーリサイクルの低下が生存率低下に寄与することがわかった。またdG9a欠失変異体では、飢餓後活動量が増加し、エネルギー低下を促進する。これらの発見は、飢餓ストレスに応答して作動する新しいエピジェネティック制御の仕組みとして重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2007年にショウジョウバエG9a突然変異系統ホモ接合体が致死にならないと言う予想外の結果が報告されてから、多くの研究者がdG9aの研究から撤退してしまった。これは生存に必須でない遺伝子は生物にとって重要では無いので、dG9aの研究を続けても大きな成果は得られないであろうと言う推測に基づくものであった。しかしながら本研究により、dG9aが飢餓ストレス下でオートファジーの誘導に関与し、また活動量の抑制にも関与することが明らかになった。このようにdG9aが中心的な役割を果たしている、飢餓ストレスに応答する新しいエピジェネティック制御の仕組みが明らかになったことは大きな学術的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)： By carrying out the RNA-seq analysis and metabolomics study of wild type *Drosophila* and dG9a mutants, we have found that metabolic pathways and expression levels of genes related to autophagy become abnormal in the dG9a mutants. In addition, in fat body of the dG9a mutants, activity of autophagy is decreased and energy recycling is failed that result in decrease of viability. Furthermore, dG9a mutants show hyperactivity under starvation conditions that further decrease the energy storage. These observations are important to understand the mechanism underlying epigenetic regulation responding to starvation stress.

研究分野：細胞生物学

キーワード： ショウジョウバエ ヒストンメチル化酵素 dG9a RNA-seq メタボローム 飢餓ストレス オートファジー エピジェネティック制御

1. 研究開始当初の背景

ヒストン H3 の N 末端から 9 番目のリジン残基 (H3K9) をメチル化する酵素である G9a は、一般的にクロマチンの構造変化を通じて遺伝子の発現抑制を行う。申請者らはこの G9a のショウジョウバエホモログ (dG9a) を同定し、その過剰発現系統やノックダウン系統を樹立した⁽¹⁾。また、dG9a に特異的な抗体を世界に先駆けて作製し⁽²⁾、これらを用いた研究により、dG9a が複眼形態形成に重要な働きを持ち、またポリコームグループ遺伝子群と遺伝学的相互作用を持つことや、dG9a が精子形成過程や胚発生過程でダイナミックな細胞内局在の変化を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、ショウジョウバエ *G9a* (*dG9a*) 突然変異ホモ接合体は致死にならないが、一方 G9a ノックアウトマウスは胚発生過程で致死となることから哺乳動物に比べてショウジョウバエでは、エピジェネティック制御が未発達であり、それゆえに G9a は個体の生存に必須でないと考えられてきた。また生存に必須でない遺伝子は生物にとって重要ではないので、*dG9a* の研究では大きな成果は得られないであろうという推測で多くの研究者が *dG9a* の研究から撤退してしまったのが、研究開始当初の国内外の現状であった。申請者らは、*dG9a* 突然変異ホモ接合体は胚発生の遅延を示し、野生型と *dG9a* 突然変異体を用いたゲノムワイドな RNA-seq 解析により、複数の体節形成遺伝子の発現レベルの亢進が胚発生遅延の主因であることを明らかにしていた⁽³⁾。一方、ショウジョウバエ胚発生過程を通じたメタボローム解析を行い、胚発生過程での異なるアミノ酸の重要性とトレハロースとグルコースの適切なバランスの重要性も明らかにしていた⁽⁴⁾。また申請者らは飢餓条件下で *dG9a* 突然変異系統の生存期間が野生型に比べて著しく低下することを発見した。さらにエネルギー貯蔵に重要な脂肪体特異的に dG9a をノックダウンしても同様の現象が起こることを確認していた。このことは平常時には dG9a は生存に必須ではないが、飢餓条件下では大いにその機能を発揮し生存に必須になることを示唆している。オートファジーが飢餓条件下で作動する事は良く知られているが、その過程で起こるクロマチン構造変化を介したエピジェネティック制御についての研究は研究開始当初ほとんど無かった。

2. 研究の目的

- a) 飢餓条件下での野生型及び *dG9a* 突然変異体を用いてゲノムワイドな RNA-seq 解析を実施して、dG9a 依存性に飢餓ストレスに応答して発現が変化する遺伝子群を同定する。
- b) 抗 dG9a 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、RNA-seq 解析で同定した dG9a 標的候補遺伝子領域に dG9a が結合していることを証明する。また同定した dG9a 標的遺伝子の突然変異系統や RNAi 系統を用いた機能解析や遺伝学的相互作用の解析から、dG9 依存的に飢餓条件に応答する遺伝子群の遺伝子間ネットワークを明らかにする。
- c) 飢餓条件下での野生型及び *dG9a* 突然変異体を用いたメタボローム解析により、dG9 依存的に飢餓ストレスに応答するこれらの遺伝子発現変化にリンクしてどの代謝経路が変動しているのかについて明らかにする。

これらの研究結果を総合して、生物個体の生死に関わる飢餓ストレスに応答して作動する新しいエピジェネティック制御の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

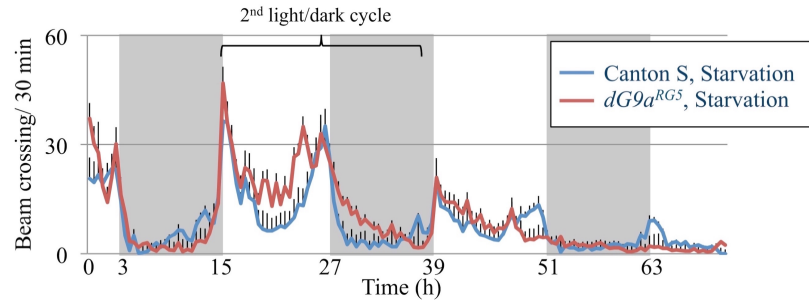
- 1) 飢餓条件下で時間経過をおって野生型及び *dG9a* 突然変異体から RNA を抽出し、ゲノムワイドな RNA-seq 解析を行った。
- 2) クロマチン免疫沈降法や免疫染色法を駆使して、dG9a 標的遺伝子として飢餓ストレスに応答して誘導されるオートファジー関連遺伝子を同定した。
- 3) GS-MS と LC-MS を使用して飢餓条件下での野生型及び *dG9a* 突然変異体成虫のメタボローム解析を行った。

4) 飢餓条件下での野生型及び *dG9a* 突然変異体成虫の概日リズムと活動量を Activity monitoring 装置を用いて調査した。また成虫のスクロース感受性を吻伸展反射法により調査した。

4. 研究成果

dG9a 突然変異体の成虫は、飢餓ストレスへの感受性が増加し、逆に *dG9a* を過剰発現すると飢餓ストレス耐性になることがわかった。この飢餓ストレス耐性には、*dG9a* の触媒活性部位は必要では無いことも明らかになった。また *dG9a* のストレス耐性への貢献は飢餓ストレス特異的であり、熱ストレスや酸化

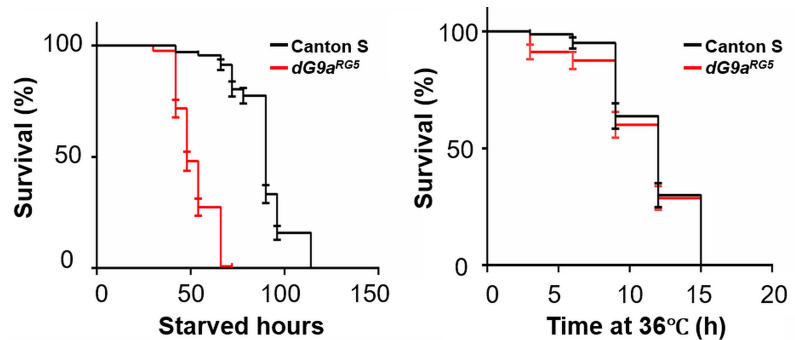
ストレスには効果を示さなかった(右図)。メタボローム解析により飢餓ストレス下での野生型及び *dG9a* 突然変異体の代謝産物や中間体を網羅的に比較することで、飢餓ストレスに対応して *dG9a* がアミ



ノ酸、トレハロース、グリコーゲン、トリアシルグリセロールなどのエネルギー貯蔵物質の維持に必須な働きを持つことが明らかになった。さらに詳細な仕組みについて調べると、*dG9a* 突然変異体では飢餓条件下で誘導されるオートファジーが抑制されていること、またその時にオートファジーの進行に必須な ATG8a 遺伝子の発現低下が起こっていることが明らかになった。以上のように *dG9a* は飢餓条件下でのオートファジーの誘導に必須であることがわかった。

生物が飢餓ストレスに応答してその活動量を変化させることは良く知られた現象であるが、その基盤となる仕組みについては良く解っていない。飢餓条件下で時間経過をおって野生型及び *dG9a* 突然変異体から RNA を抽出し、ゲノムワイドな RNA-seq 解析を行った結果、オートファジーに関与する遺伝子の他に、味覚に関与する遺伝子の発現が変化していることがわかった。RT-qPCR 法で定量的に解析すると、スクロース感知する味覚受容体遺伝子の発現が *dG9a* 突然変異体で促進されていることがわかった。これに対応して、*dG9a* 突然変異体成虫のスクロース感受性が飢餓条件下で上がっていることが、吻伸展反射法により明らかになった。さらに、*dG9a* 突然変異体成虫の活動量が、飢餓条件下で上がっていることもわかった(右図)。またこれに対応して、飢餓条件が誘導する活動量増加を抑圧する働きのあるインスリン様ペプチド遺伝子の発現が低下していることもわかった。この様に飢餓条件下で *dG9a* 突然変異体

成虫はスクロース感受性が増加し、餌を求めて活動量が増加し、かつオートファジーによるエネルギーのリサイクルができないことからエネルギーの枯渇を招き、早期に致死に至ると考えられる。この様に *dG9a* は飢餓ストレス下でオートファジーの誘導と活動量の抑制に関与することが明らかになった。また最近、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やシャルコー・マリー・トゥース病



気 (CMT) とエピジェネティック制御因子の関連が明らかになりつつあり、新しい研究の展開

が始まりつつある。dG9a が中心的な役割を果たしている飢餓ストレスに応答する新しいエピジェネティック制御の仕組みが明らかになったことは大きな学術的意義を持つ。また本研究成果は、飢餓ストレスにより、普段眠っているエピジェネティック制御機構が作動してクロマチン構造を大きく変化させることにより、オートファジーや生命維持のために必須な遺伝子群の発現を誘導することを示唆しており、将来癌を始めとしてオートファジーが関与する様々な疾患研究に資する研究基盤も提供し、社会的意義も大きい。

<引用文献>

- (1) Kato, Y., Kato, M., Tachibana, M., Shinkai, Y. and Yamaguchi, M.: Characterization of *Drosophila* G9a *in vivo* and identification of genetic interactants. *Genes to Cells*, 13, 703-722, 2008.
- (2) Ushijima Y., Inoue, Y. H., Konishi, T., Kitazawa, D., Yoshida, H., Shimaji, K., Kimura, H. and Yamaguchi, M.: Roles of histone H3K9 methyltransferases during *Drosophila* spermatogenesis. *Chromosome Res.* 20 (3), 319-331, 2012.
- (3) Shimaji K., Konishi, T., Tanaka, S., Yoshida, H., Kato, Y., Ohkawa, Y., Sato, T., Suyama, M., Kimura, H. and Yamaguchi, M.: Genome-wide identification of target genes of histone methyltransferase dG9a during *Drosophila* embryogenesis. *Genes to Cells*, 20 (11), 902-914, doi: 10.1111/gtc.12281. 2015.
- (4) Thuy An, P. N., Yamaguchi, M., Bamba, T. and Fukusaki, E.: Metabolome analysis of *Drosophila melanogaster* during embryogenesis. *PLoS One*, 9(8): e99519. Doi: 10.1371/journal.pone.0099519. 2014.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1) Tanaka, R., Miyata, S., Yamaguchi, M. and Yoshida, H. Role of *smallish* gene during *Drosophila* eye development. *Gene* 684, 10-19, 2019. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.056>) 査読有
- 2) Jantrapirom, S., Cao, D., Wang, J., Hing, H., Tabone, C.J., Lantz, K., de Belle, J. S., Qiu, Y.T., Smid, H.M., Yamaguchi, M., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G., Potikanond, S. hDystrophin is required for normal synaptic gain in the *Drosophila* olfactory circuit. *Brain Res.*, 1712: 158-166, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.039> 査読有
- 3) Jantrapirom, S., Nimlamool, W., Temviriyankul, P., Ahmadian, S., Locke, C.J., Davis, G.W., Yamaguchi, M., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G., Potikanond, S. Dystrobrevin is required postsynaptically for homeostatic potentiation at the *Drosophila* NMJ. *Biochim. Biophys. Acta-Mol Basis Dis*, 1865(6): 1579-1591, 2019. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.03.008. 査読有
- 4) Li, J., Suda, K., Ueoka, I., Tanaka, R., Yoshida, H., Okada, Y., Okamoto, Y., Hiramatsu, Y., Takashima, H., Yamaguchi, M. Neuron-specific knockdown of *Drosophila HADHB* induces a shortened lifespan, deficient locomotive ability, abnormal motor neuron terminal morphology and learning disability. *Exp. Cell Res.* 379: 150-158, 2019. 査読有
- 5) Shimaji, K., Tomida, S. and Yamaguchi M.: Regulation of animal behavior by epigenetic regulators. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 24: 1071-1084, 2019. 査読有
- 6) Tsuji Wakisaka, K., Tanaka, R., Hirashima, T., Muraoka, Y., Azuma, Y., Yoshida, H., Tokuda, T., Asada, S., Suda, K., Ichyanagi, K., Ohno, S., Itoh, M. and Yamaguchi, M. Novel roles of *Drosophila* FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders. *Brain Res.* 1708, 207-219, 2019. doi: 10.1016/j.brainres.2018.12.028. 査読有
- 7) Muraoka, Y., Nakamura, A., Tanaka, R., Suda, K., Azuma, Y., Kushimura, Y., Lo Piccolo, L., Yoshida, H., Mizuta, I., Tokuda, T., Mizuno, T., Nakagawa, M. and Yamaguchi, M. Genetic screening of genes

- interacting with *Drosophila* FIG4 identified a novel link between CMT-causing gene and long noncoding RNAs. *Exp. Neurol.* 310, 1-13, 2018. (doi: 10.1016/j.expneurol.2018.08.009.) 査読有
- 8) Hirashima, T., Tanaka, R., Yamaguchi, M. and Yoshida, H.: The ABD on the nascent polypeptide and PH domain are required for the precise Anillin localization in *Drosophila* syncytial blastoderm. *Sci. Rep.* 8(1): 12910, 2018. (doi: 10.1038/s41598-018-31106-0. 査読有
 - 9) Yamamoto, I., Azuma, Y., Kushimura, Y., Yoshida, H., Mizuta, I., Mizuno, T., Ueyama, M., Nagai, Y., Tokuda, T. and Yamaguchi, M.: NPM-hMLF1 fusion protein suppresses defects of a *Drosophila* FTLD model expressing the human *FUS* gene. *Sci. Rep.* 8(1):11291. 2018. (doi: 10.1038/s41598-018-29716-9.) 査読有
 - 10) Jeon, H. J., Kim, Y. S., Kim, J. G., Heo, K., Pyo, J. H., Yamaguchi, M. and Yoo, M. A.: Effect of heterochromatin stability on intestinal stem cell aging in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* 173, 50-60, doi: 10.1016/j.mad.2018.04.001., 2018. 査読有
 - 11) Jantrapirom, S., Lo Piccolo, L., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Depletion of Ubiquilin induces an augmentation in soluble ubiquitinated *Drosophila* TDP-43 to drive neurotoxicity in the fly. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Basis of Disease*, 1864 (9 Pt B): 3038-3049. 2018. (doi: 10.1016/j.bbadis.2018.06.017.) 査読有
 - 12) Azuma, Y., Tokuda, T., Kushimura, Y., Yamamoto, I., Mizuta, I., Mizuno, T., Nakagawa, M., Ueyama, M., Nagai, Y., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Pan, D., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Hippo, *Drosophila* MST, is a novel modifier of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila* FUS. *Exp. Cell Res.* 371 (2) 311-321, 2018 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.08.001>). 査読有
 - 13) Suda, K., Ueoka, I., Azuma, Y., Muraoka, Y., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Novel *Drosophila* model for mitochondrial diseases by targeting of a solute carrier protein SLC25A46. *Brain Res.* 1689, 30-44, 2018. (doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.028). 査読有
 - 14) Dung, V. M., Suong, D. N. A., Okamaoto, Y., Hiramatsu, Y., Thao, D. T. P., Yoshida, H., Takashima, H., and Yamaguchi, M.: Neuron-specific knockdown of *Drosophila* PDHB induces reduction of lifespan, deficient locomotive ability, abnormal morphology of motor neuron terminals and photoreceptor axon targeting. *Exp. Cell Res.*, 366 (2), 92-102, 2018. (doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.035). 査読有
 - 15) Ueoka, I., Kawashima, H., Konishi, A., Aoki, M., Tanaka, R., Yoshida, H., Maeda, T., Ozaki, M. and Yamaguchi, M.: Novel *Drosophila* model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A. *Exp. Neurol.* 300, 51-59, 2018. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.027>) 査読有
 - 16) Suong, D. N. A., Shimaji, K., Pyo, J.-H., Park, J.-S., Yoshida, H., Yoo, M. and Yamaguchi, M.: Overexpression of dJmj differentially affects intestinal stem cells and differentiated enterocytes. *Cellular Signalling* 42, 194-210, 2018. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.017>) 査読有
 - 17) Shimaji, K., Tanaka, R., Maeda, T., Ozaki, M., Yoshida, H., Ohkawa, Y., Sato, T., Suyama, M. and Yamaguchi, M.: Histone methyltransferase G9a is a key regulator of the starvation-induced behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.* 7(1), 14763, doi: 10.1038/s41598-017-15344-2, 2017. 査読有
 - 18) Thuy An, P. N.*, Shimaji, K.*, Tanaka, R., Yoshida, H., Kimura, H., Fukusaki, E. and Yamaguchi, M.: Epigenetic regulation of starvation-induced autophagy in *Drosophila* by histone methyltransferase G9a. *Sci. Rep.* 7(1):7343. doi: 10.1038/s41598-017-07566-1., 2017. *Equal contribution. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- 1) Yoshida H., Umegawachi T., Koshida H., Yamada M., Ohkawa Y., Sato T., Suyama M., Krause H.M., Yamaguchi M. Regulation of *yorkie* gene expression through its own non-coding region. Workshop in Cell and Developmental Biology Meeting 2018 2018
- 2) Jantapirom S., Lo Piccolo L., Yoshida H., Yamaguchi M. *Drosophila Ubiquilin* depletion reveals the impact of proteostasis impairment on locomotive and learning abilities. Workshop in Cell and Developmental Biology Meeting 2018 2018
- 3) Suda K., Yoshida H., Yamaguchi M. Subcellular localization and functional analyses of *Drosophila SLC25A46*, mitochondrial disease-causing gene. Workshop in Cell and Developmental Biology Meeting 2018 2018
- 4) Yamaguchi M. Challenging the rare intractable neurological diseases by *Drosophila* models. Symposium in Cell and Developmental Biology Meeting 2018 (招待講演) 2018
- 5) Yamaguchi M. Challenging the autism spectrum disorder by *Drosophila* model targeting of ABCA. 日本生化学会・シンポジウム (招待講演) 2018
- 6) Yamaguchi M. Challenging the rare intractable neurological disease such as ALS and CMT by *Drosophila* models. International Joint Conference on Genetics & Medicine 2018 (招待講演) (国際学会) 2018
- 7) 村岡夕香、吉田英樹、山口政光 他 ショウジョウバエ CMT 原因遺伝子 dFIG4 の新規遺伝学的相互作用因子としての長鎖非コード RNA, CR18854 の同定 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 2017
- 8) 浅田賢志、吉田英樹、山口政光 他 ALS 原因遺伝子 FUS のショウジョウバエホモログ Cabeza と遺伝学的相互作用するエピジェネティック制御因子の同定 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 2017
- 9) 冨田早紀、吉田英樹、山口政光 他 飢餓ストレスに応答するエピジェネティック制御因子の研究 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 2017
- 10) Yoshida, H., Yamaguchi, M. et al. The subcellular localization of *yorkie* mRNA regulates its functional expression. EMBO Conference on RNA Localization and Local Translation (国際学会) 2017
- 11) Yamaguchi, M. How does *Drosophila* overcome the starvation stress? The 15th Vietnam-Japan Joint Symposium (国際学会) 2017

[図書] (計 1 件)

Masamitsu Yamaguchi ed., Springer, *Drosophila Models for Human Diseases*, 2018, 308

[産業財産権] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉田英樹

ローマ字氏名：Yoshida Hideki

所属研究機関名：京都工芸繊維大学

部局名：応用生物学系

職名：准教授

研究者番号：30570600