

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06240

研究課題名(和文)生殖系列のメチオニン代謝制御によるレトロトランスポソンの抑制機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for the role of methionine metabolism in retrotransposon repression during germ-line development of Drosophila.

研究代表者

林 良樹 (Hayashi, Yoshiki)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：30508817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、予備的研究において見出したショウジョウバエ卵巣の生殖系列におけるS-アデノシルメチオニン(SAM)の低産生状態が、生殖系列におけるレトロトランスポソンの発現抑制を司る仕組みを明らかにすることにある。研究の結果、ショウジョウバエ卵巣におけるSAMの低産生状態は、レトロトランスポソンの転写を司るプロモーター領域に対するメチル化修飾(N6mA修飾)を低く保つことにより、プロモーター活性を抑え、レトロトランスポソンの発現を抑制することが明らかとなった。また付加的研究を通じて、生殖系列におけるSAMの低産生状態が生殖系列の老化を遅延する細胞内環境として機能することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖系列におけるレトロトランスポソン抑制の仕組みは生命の連続性を担保する上で必須の仕組みである。本研究では、生殖系列におけるレトロトランスポソンの抑制における新規機構としてSAMの低産生状態を特定した。本研究の成果は、生殖系列を特徴づける細胞内代謝状態(SAM低産生状態)の発見、そして細胞内代謝がトランスポソン抑制の仕組みに寄与することを示した初めての例であり高い学術的意義を有する。また付加的研究により、生殖系列の老化要因として加齢に伴うSAM合成の促進を見出した。これは今後の抗老化創薬等の重要なターゲットとしてSAM合成経路を提示するものであり、社会的意義が極めて高いと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal how the suppression of S-adenosyl-methionine (SAM) biosynthesis contributes to repress the retrotransposon in germline. Since the SAM is known as major cellular donor of methyl-base for methylation modification, I hypothesized that suppressive status of SAM biosynthesis in germline regulates retrotransposon expression via regulating its epigenomic modification. Through the study, I revealed that the suppressive status of SAM biosynthesis in the germline contributes to maintaining DNA methylation (N6mA modification) of the retrotransposon promoter region in a low level. Once the N6mA modification is upregulated in the SAM-abundant condition, the activity of the retrotransposon promoter is upregulated, which causes upregulation of retrotransposon transcription. My study revealed that SAM biosynthesis's repressive status in the germline contributes to repressing transposon expression via regulating genomic DNA methylation.

研究分野：発生生物学

キーワード：S-アデノシルメチオニン トランスポソン エピゲノム N6mA修飾 生殖系列 老化 細胞内代謝 キロショウジョウバエ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生殖系列は次世代を生み出す唯一の細胞系譜であり、そのゲノムの品質を保つことは次世代を正常に生み出す上で必須である。生殖系列のゲノムの品質を保つ上でレトロトランスポソンの発現抑制は重要な仕組みである。

レトロトランスポソンは真核生物のゲノムに普遍的に存在する RNA 型のトランスポソンであり、転写による自身の RNA の増幅と、その逆転写によるゲノムへの挿入というサイクルにより複製・転移を行う。レトロトランスポソンの発現抑制については、これまで転写後の RNA を分解する仕組みについてよく研究がなされてきた。この仕組みにおいては PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる低分子 RNA を含む RNA—タンパク質複合体が転写後のレトロトランスポソンを認識し、選択的に分解する。このような知見が明らかになる一方で、レトロトランスポソンの発現を転写レベルで抑制する仕組みは不明な点が多かった。

研究開始の当初、遺伝子の転写制御における細胞内代謝の役割が注目されていた。例えば哺乳類の培養幹細胞においては、メチオニン (Met) の代謝反応により生み出される S-アデノシルメチオニン (SAM) がヒストンのメチル化修飾の際の反応基質となることでエピゲノム状態を制御し、幹細胞維持を司る遺伝子の転写を活性化することが知られていた。このような知見は生殖系列におけるメチオニン代謝をはじめとする細胞内代謝状態が、エピゲノム制御を介して、トランスポソン等の発現を転写レベルで制御する可能性を提示するが、生殖系列における細胞内代謝状態が、レトロトランスポソンの発現制御に寄与するかは全く不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者の予備的研究結果に基づき、ショウジョウバエ卵巣の生殖系列が有する抑制的な SAM 産生状態が、エピゲノム修飾 (ゲノム DNA に対する N6mA 修飾) 制御を介して、レトロトランスポソンの発現を抑制するという仮説の検証を目的に研究を行なった。さらにレトロトランスポソンの脱抑制により引き起こされると考えられる現象として、上記の SAM の産生抑制状態が生殖系列の老化遅延に寄与する可能性についても併せて解明を試みた。

### 3. 研究の方法

申請者の予備的研究において、ショウジョウバエ卵巣の生殖系列においては、SAM 合成酵素 (Sam-S) の発現が抑制されているため、SAM が低産生状態にあること、生殖系列において Sam-S を強制発現した場合 (Sam-S OE) SAM 含有量の顕著な増加およびレトロトランスポソンの発現上昇が起きることが明らかとなっていた。そこで本研究では、基本的に野生型卵巣と Sam-S OE 卵巣を RNA-Seq, MedIP-Seq 等で比較することで、上述の仮説について検証することを試みた。方法の詳細等については研究成果の欄に記載する。

### 4. 研究成果

#### (1) 生殖系列における SAM 低産生状態がレトロトランスポソンの発現を抑制する仕組みの解明

上述の様に、生殖系列における SAM の低産生状態はレトロトランスポソンの発現抑制に寄与することが、予備的研究により示唆されていた。SAM の低産生状態がレトロトランスポソンの発現抑制に寄与する仕組みを解明する第一歩として、SAM の増加が既知のレトロトランスポソン抑制の仕組みに影響を与えるかを検証した。上述の様に、これまでレトロトランスポソンの発現抑制においては piRNA を介したレトロトランスポソン RNA の分解が中心的な役割を果たすことが知られていた。そこで野生型および Sam-S OE 卵巣を対象に、piRNA 産生に関わる中心的な因子 (Piwi, Aub, Ago3) の発現や分布、piRNA の産生状態を解析した。その結果、野生型および Sam-S OE 卵巣において、piRNA の産生の仕組みは影響を受けないことが明らかとなった。この結果は、SAM が増加したことによるレトロトランスポソンの発現上昇は、転写レベルで制御されることを強く示唆している。

レトロトランスポソンの転写活性の仕組みにおいて、ショウジョウバエゲノム DNA のメチル化修飾 (N6mA 修飾) の増加が重要な役割を果たすことが知られていた (Zhang et al., *Cell*, 2015)。SAM が細胞内の主要なメチル基供与体であること考え合わせ、SAM の増加が N6mA 修飾の増加を招くことが、レトロトランスポソンの発現上昇を引き起こす原因であると予想し、研究を行なった。

N6mA 修飾を認識する抗体を用いた MedIP-Seq により、野生型および Sam-S OE の卵巣ゲノム中に存在する N6mA 修飾領域を網羅的に特定し比較した。その結果、N6mA 修飾は Sam-S OE 卵巣ゲノムにおいて顕著に増加すること、さらに SAM 依存的な N6mA 修飾の増加は染色体の末端領域など、レトロトランスポソンが集積する領域において特に顕著であることが明らかとなった。そこで予備的研究において SAM 依存的に発現が上昇することが明らかとなっているレトロトランスポソンの配列を対象に、N6mA 修飾の変化を比較した。その結果、SAM 依存的な発現上昇が特に顕著であったレトロトランスポソン (Het-A) の配列において、SAM 依存的な N6mA 修飾の顕著な増加が起きることを見出した。興味深いことに、Het-A 配列における SAM 依存的

な N6mA 修飾の増加は、Het-A のプロモータ配列付近に特に集中していた。以上の結果は、Sam-S OE 卵巣における SAM の増加は N6mA 修飾を介して、Het-A プロモーターの活性化を誘導していることを示唆していた。そこで次に、Het-A プロモーターのレポーター (Het-A lacZ) を用いて、SAM の増加が Het-A プロモーターの活性化を誘導するかを検証した。野生型および Sam-S OE 卵巣において Het-A lacZ の発現を qRT-PCR を用いて比較したところ、Sam-S OE 卵巣においてはこのレポーターの発現が顕著に増加することを見出した。以上の結果に基づき、Sam-S OE 卵巣におけるレトロトランスポソンの発現上昇は、このような SAM の増加が N6mA 修飾の増加を引き起こすことで、レトロトランスポソンの転写を活性化することにより引き起こされると結論づけた。すなわち、卵巣生殖系列における SAM の低産生状態は、N6mA 修飾を低く保つことにより、レトロトランスポソンの発現抑制状態を構築していると考えられる (Hayashi et al., in preparation)。

本研究の成果は、生殖系列におけるたった一つの代謝反応 (メチオニンから SAM への変換) を制御することが、生殖系列におけるレトロトランスポソンの発現を抑制し、ひいては生殖系列のゲノム損傷を予防するという、生殖系列の品質維持において新たな仕組みの一端を示すものであると考える。piRNA 産生は全ての真核生物がもつ仕組みではないのに対し、メチオニン-SAM の合成反応は全ての真核生物がもつ細胞内代謝反応である。本研究により明らかとなった新規レトロトランスポソン抑制の仕組みは、生命の連続性を担う生殖系列の品質維持の仕組みにおいて、生物が普遍的にもつ祖先的な仕組みの一端なのではないかと考えている。

## (2) 生殖系列における SAM 低産生状態が生殖系列の老化に与える影響の解明

上述の様に、本研究課題提案の段階では生殖系列における SAM の低産生状態が生殖系列のゲノム品質の保持に寄与するという可能性について検証を行うことを目的に研究を開始した。しかしその過程で、ゲノム品質の低下が主要な要因の一つであると考えられる、生殖系列の老化に対し、SAM が影響を与える可能性があるのではないかとということに気づき、この可能性についても検証を行うことにした。これまでの研究において線虫やショウジョウバエの個体寿命に対し、SAM の増加が負的作用を持つことは明らかとなっていた (Obata et al., *Nat. Commun.*, 2015)。その一方で、生体内各組織の老化において SAM が与える影響は、技術的な困難さや組織老化の指標化の難しさから不明であった。そこで、ショウジョウバエ卵巣生殖系列をモデルとして、SAM 低産生状態が生殖系列の老化に与える影響を検証し、以下のことを見出した。

- (i) 生殖系列の老化に伴い Sam-S の発現および SAM 含有量が増加することが確認された(図 1)。
- (ii) 生殖系列において Sam-S の発現を抑制あるいは増加した場合、Sam-S の発現に応じて生殖系列の老化指標 (生殖幹細胞の維持能の低下、異常卵室の出現頻度の増加) が変化した(図 2)。
- (iii) 哺乳類 (マウス) の脳組織および生殖組織において加齢に伴う SAM 含有量の変化を検証したところ、各組織において SAM の含有量が加齢に伴い増加することが明らかとなった。
- (iv) 哺乳類培養細胞 (ヒト) を用いた検証により、各細胞の老化指標 (分裂能および分化能の低下) が SAM 合成酵素の阻害により低下することを見出した。

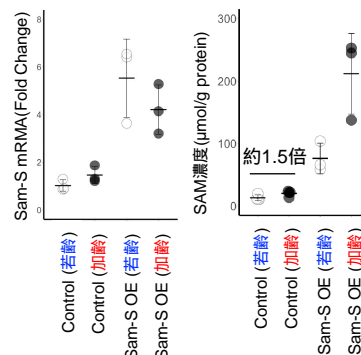
以上の結果は、SAM の増加はショウジョウバエ生殖系列の老化を引き起こす主要な要因であることを示しており、さらに SAM の増加は動物種および組織種を超えた組織老化要因であることを強く示唆している (Hayashi et al., *Sci. Rep.*, 2022, Hayashi et al., unpublished, 特願：特願 2021-112261)。

SAM の増加がどのようにして老化を誘導するのか、老化の過程にトランスポソン依存的なゲノム DNA 損傷が影響するのかは今後の検証の課題である。しかしながら、本研究の成果はこれまで不明であった生体内組織の老化要因として SAM の増加を明らかにした初めての例であり、今後の抗老化創薬等、医療分野に至る広い分野に対して重要な基礎的知見を供出するものであると考える (Hayashi et al., *Sci. Rep.*, 2022, 特願：特願 2021-112261)。

## <引用文献>

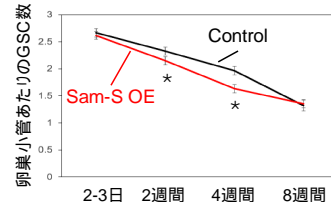
- Zhang et al., N6-Methyladenine DNA modification in *Drosophila*, *Cell*, 161, 2015, pp893-906
- Obata & Miura., Enhancing S-adenosyl-methionine catabolism extends life span of *Drosophila*, *Nat. Commun.*, 2015, 6-8332
- Hayashi et al., Biosynthesis of S-adenosyl-methionine enhances aging-related defects in *Drosophila* oogenesis, *Sci. Rep.*, 2022, 12:5593,

図1:加齢に伴うSAM合成の変化



(Hayashi et al., *Sci. Rep.*, 2022)

図2:加齢に伴うGSC維持能の低下



(Hayashi et al., *Sci. Rep.*, 2022)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamakawa Shumpei, Hayashi Yoshiki, Kako Koichiro, Sasakura Yasunori, Morino Yoshiaki, Wada Hiroshi	4. 巻 492
2. 論文標題 Mechanism underlying retinoic acid-dependent metamorphosis in the starfish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 119 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.10.002	査読の有無 有
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 Hayashi Yoshiki, Shibata Arisa, Kamimura Keisuke, Kobayashi Satoru	4. 巻 63
2. 論文標題 Heparan sulfate proteoglycan molecules, syndecan and perlecan, have distinct roles in the maintenance of <i>Drosophila</i> germline stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 295 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12741	査読の有無 有
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 Hayashi Yoshiki, Kashio Soshiro, Murotomi Kazutoshi, Hino Shinjiro, Kang Woojin, Miyado Kenji, Nakao Mitsuyoshi, Miura Masayuki, Kobayashi Satoru, Namihira Masakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Biosynthesis of S-adenosyl-methionine enhances aging-related defects in <i>Drosophila</i> oogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-022-09424-1	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 Kamiya Junki, Kang Woojin, Yoshida Keiichi, Takagi Ryota, Kanai Seiya, Hanai Maito, Nakamura Akihiro, Yamada Mitsutoshi, Miyamoto Yoshitaka, Miyado Mami, Kuroki Yoko, Hayashi Yoshiki, Umezawa Akihiro, Kawano Natsuko, Miyado Kenji	4. 巻 21
2. 論文標題 Suppression of Non-Random Fertilization by MHC Class I Antigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8731 ~ 8731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228731	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 Hayashi Yoshiki, Yoshinari Yuto, Kobayashi Satoru, Niwa Ryusuke	4. 巻 37
2. 論文標題 The regulation of Drosophila ovarian stem cell niches by signaling crosstalk	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 23 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cois.2019.10.006	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 Kang Woojin, Harada Yuichirou, Yamatoya Kenji, Kawano Natsuko, Kanai Seiya, Miyamoto Yoshitaka, Nakamura Akihiro, Miyado Mami, Hayashi Yoshiki, Kuroki Yoko, Saito Hidekazu, Iwao Yasuhiro, Umezawa Akihiro, Miyado Kenji	4. 巻 100
2. 論文標題 Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent sperm dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 583 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0353-3	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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 林 良樹、木村 遼、影山 りお、小林 悟
2. 発表標題 解糖系によるショウジョウバエ生殖系列の発生制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 影山 りお、林 良樹、小林 悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ生殖系列の発生過程におけるヒストンラクチル化修飾の観察
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 遼、林 良樹、小林 悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における解糖系によるヒストンアセチル化制御とクロマチン構造への影響評価に向けて
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi, Soshiro Kashio, Kazutoshi Murotomi, Shinjiro Hino, Woojin Kang, Kenji Miyado, Mitsuyoshi Nakao, Masayuki Miura, Satoru Kobayashi, Masakazu Namihira
2. 発表標題 Biosynthesis of S-adenosyl-methionine enhances aging-related defects in Drosophila oogenesis
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi, Ryo Kimura, Satoru Kobayashi
2. 発表標題 Glycolysis regulates primordial germ cell development of Drosophila
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi, Ryo Kimura, Satoru Kobayashi
2. 発表標題 Glycolysis inhibits primordial germ-cell development of Drosophila
3. 学会等名 日本発生物学会第54回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi, Ryo Kimura, Satoru Kobayashi
2. 発表標題 Glycolysis inhibits primordial germ-cell development of <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 良樹、木村 遼、小林 悟
2. 発表標題 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役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi, Ryo Kimura, Satoru Kobayashi
2. 発表標題 Glycolysis inhibits primordial germ-cell development of <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Kimura, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi
2. 発表標題 Glycolysis regulates Histone Acetylation during Primordial Germ Cell Development of <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 良樹
2. 発表標題 メチオニン代謝制御による生殖系列におけるレトロトランスポソンの抑制
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi, Arisa Sugiyama, Keisuke Kamimura, Satoru Kobayshi
2. 発表標題 The role of heparan sulfate proteoglycans in Drosophila germline stem cell niche
3. 学会等名 Proteoglycans 2019 ; New frontiers in the biology of proteoglycan research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 良樹
2. 発表標題 始原生殖細胞の発生過程における細胞内代謝の役割
3. 学会等名 第3回がんと代謝研究会・若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 良樹、日野 信次郎、櫻尾 宗志郎、佐藤 哲也、野田 千代、三浦 正幸、中尾 光善、小林 悟
2. 発表標題 メタボロミクスから見てきたショウジョウバエ生殖系列の代謝的性質とその役割
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 林 良樹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi
2. 発表標題 Role of Methionine Metabolism during Germ-line Development of <i>Drosophila melanogaster</i> .
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cell 2018, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 良樹
2. 発表標題 生殖系列の代謝とその役割 -メチオニン代謝制御によるトランスポゾンの発現制御-
3. 学会等名 日本発生生物学会秋季シンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiki Hayashi
2. 発表標題 Methionine metabolism regulates retrotransposon expression in germline of <i>Drosophila melanogaster</i> .
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

## 〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hayashi Y., Kobayashi S.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Japan KK	5. 総ページ数 789
3. 書名 Reproductive & Developmental Strategies for Life Continuity. Chapter 2. Regulatory Mechanisms of the Germline Stem Cell Niche in <i>Drosophila melanogaster</i> .	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 組織の老化を予防または治療するための組成物	発明者 林 良樹、波平 昌 —	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-112261	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔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
---------	---------