

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16180

研究課題名（和文）核内倍加周期によるエクジソン産生制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of endocycle in ecdysteroidogenesis in *Drosophila*

研究代表者

大原 裕也 (Ohhara, Yuya)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80771956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ショウジョウバエ内分泌組織である前胸腺を対象に、分裂を伴わない細胞周期である「核内倍加」によるエクジソン産生制御機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、クロマチン制御因子であるPIAS (protein inhibitor of activated STAT) と、ヘテロクロマチンの正常な構造の形成に必要な因子であるHeterochromatic protein 1 (HP1) に着目し遺伝学的解析を行い、PIASとHP1はエクジソン合成酵素の一つであるneverlandの遺伝子発現を制御することを明らかにし、これらの因子が核内倍加の下流で機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内倍加は生物界に広く認められる細胞周期の一種であり、ヒトでは肝臓等の健常組織のみならず癌組織においても観察されるが、その下流で働く分子や生理的意義は明らかとなっていない。本研究は、核内倍加による機能分化制御機構の一端を明らかにするための基盤となるものであり、本研究成果を足掛かりとして、様々なショウジョウバエ組織や他の生物種における核内倍加の下流経路やその役割を明らかにできると考えられる。また、本研究で得られた成果は、これまで殆ど明らかとなっていなかったクロマチン制御因子によるエクジソン産生制御機構の一端を示すものであり、昆虫内分泌学的にも重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the endocycle-dependent regulatory mechanisms of ecdysteroid biosynthesis in *Drosophila* endocrine organ, prothoracic gland. We focused on a chromatin regulator, PIAS (protein inhibitor of activated STAT) and heterochromatic protein 1 (HP1) as possible endocycle-associated factors regulating ecdysteroid biosynthesis and carried out genetic analyses to elucidate their functions. We found that PIAS and HP1 selectively promote the expression of neverland gene, which encodes an ecdysteroidogenic enzyme catalyzing the initial step of ecdysone biosynthesis, in the prothoracic gland. Given that inhibition of PIAS and HP1 did not cause a halt of endocycling in the prothoracic gland, we propose that PIAS and HP1 act as the downstream factors of endocycle to upregulate Neverland expression and subsequent ecdysone biosynthesis.

研究分野：昆虫内分泌

キーワード：核内倍加 エクジソン 前胸腺 Neverland PIAS HP1

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は多種多様な形質を持つ細胞から成り立っており、個体が形作られるためには、しかるべき数にまで細胞が増殖することと、細胞が固有の形質に分化することが必要である。有糸分裂による増殖を終了・停止した組織は分化過程を経て特殊化した機能を発現するに至るが、ある種の組織は分化の過程で核内倍加と呼ばれる細胞周期に移行する。核内倍加は分裂期がスキップされた細胞周期であり、DNA複製期とギ

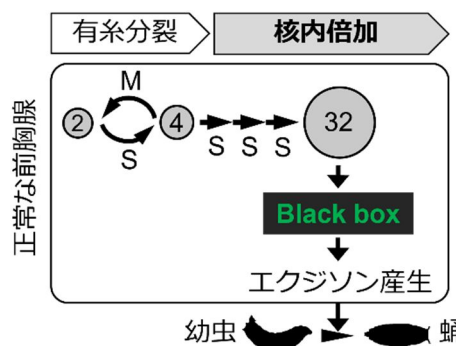


図1. 核内倍加によるエクジソン産生の制御  
 数値は核相を示す  
 S: DNA複製期 M: 分裂期

ャップ期が繰り返されることでゲノム DNA コピー数ならびに細胞サイズが増大する。核内倍加は生物界に広く認められており、ヒトでは健康組織のみならず多くの癌細胞において見受けられる。しかしながら、核内倍加の下流因子やその生理的意義は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、核内倍加を遂行するショウジョウバエ内分泌組織・前胸腺に着目し、核内倍加の下流経路とその役割の解明に挑んだ。

前胸腺は幼虫から蛹への変態を誘発するエクジソンの産生組織であり、一連のエクジソン合成酵素群の働きによってエクジソンが合成され、前胸腺から分泌されたエクジソンは全身に作用し、変態に必要な形態形成等が惹起される。申請者はこれまでに、前胸腺における核内倍加がエクジソン産生に及ぼす影響を解析し、有糸分裂から核内倍加への切り替えと核内倍加の進行はエクジソン産生の活性化ならびに蛹への変態に必須であることを明らかにした [ Ohhara et al, PLOS Genetics (2017) ] ( 図 1 )。前胸腺において核内倍加の開始を阻害し、有糸分裂を継続させた場合、エクジソン産生および蛹化が惹起されない ( 図 1 )。このことから、前胸腺は核内倍加の下流経路および役割を解析するモデルとして有用であると考え、前胸腺において核内倍加の下流でエクジソン産生を制御する因子を探索する研究を展開するに至った。

### 2. 研究の目的

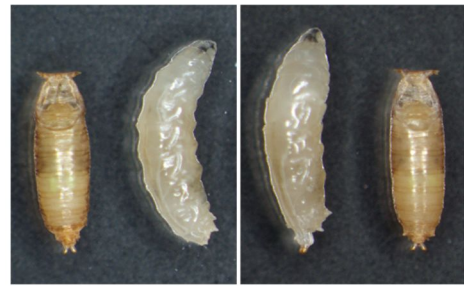
上記の成果を基盤として申請者は、核内倍加の下流因子を探索するために RNAi スクリーニングを行い、「前胸腺におけるノックダウン時に核内倍加の進行に影響はない一方で、エクジソン産生が低下し蛹への変態が不全となる」という、下流因子に見合う表現型を示す 44 遺伝子を見出した [ Ohhara et al, PLOS Genetics (2019) ]。本研究では、この下流候補因子群のうち、SUMO ( Small ubiquitin related modifier ) 付加酵素活性を有するクロマチン制御因子である PIAS ( Protein Inhibitor of Activated STAT ) に着目し、PIAS によるエクジソン産生制御機構、および、核内倍加と PIAS との相互作用を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

遺伝子発現制御システムである GAL4-UAS システムを用い、前胸腺選択的に PIAS 等のターゲット遺伝子をノックダウンまたは過剰発現させ、発育過程における表現型や遺伝子発現等を解析した。遺伝子発現の解析には定量 RT-PCR (qPCR) を用い、タンパク質の局在・発現解析は免疫染色により行った。また、上記のノックダウン系統に加え、PIAS 等の変異体系統も併せて用い、ノックダウン個体と同様の表現型が観察されるか否か調べた。

#### 4. 研究成果

**【PIAS の遺伝学的解析】**本研究開始前の予備的な研究において、前胸腺選択的な PIAS ノックダウン個体では、ヘテロクロマチン領域に位置するエクジソン合成酵素遺伝子である *neverland* の発現が低下し、PIAS ノックダウン個体では蛹化が起きないことが明らかとなっていた。PIAS が *neverland* 遺伝子を介して蛹化を制御する可能性を検証するために、PIAS ノックダウン個体の前胸腺において *neverland* を過剰発現させ、



Control PIAS RNAi PIAS RNAi PIAS RNAi + *neverland*

図2. *neverland*過剰発現による PIASノックダウン個体のレスキュー

表現型がレスキューされるか否か観察した。その結果、*neverland* 遺伝子の強制発現により PIAS ノックダウン個体において蛹化が誘発された(図2)。この結果は、PIAS は *neverland* 遺伝子の制御を介して蛹化を促進することを示している。また、PIAS 変異体においても *neverland* 遺伝子の発現が低下しており、蛹への変態が不全であることが確認できた。これらの結果から、PIAS は *neverland* 遺伝子の発現と蛹化に必須であると結論付けた。次に、免疫染色により PIAS タンパク質の局在を解析したところ、PIAS タンパク質はヘテロクロマチン領域で foci を形成することから、PIAS はヘテロクロマチン領域の *neverland* 遺伝子に直接結合する可能性が考えられた。

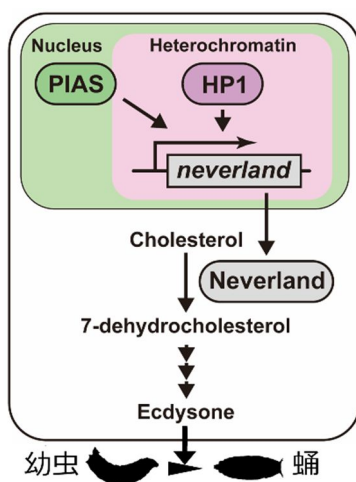
**【SUMO 修飾経路因子の遺伝学的解析】**PIAS は SUMO 付加酵素活性を有することから、SUMO 修飾経路を担う因子 (Aos1、Uba2、Ubc9、および SUMO) もまた *neverland* 遺伝子の発現と蛹化を制御すると予想された。この可能性を検証するために、*Aos1*、*Uba2*、*Ubc9*、および *SUMO* をそれぞれ前胸腺選択的にノックダウンし、表現型と遺伝子発現を解析した。その結果、*Aos1*、*Uba2*、*Ubc9*、および *SUMO* ノックダウン個体において幼虫から蛹への移行が不全となり、これらのノックダウン個体において *neverland* 遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。さらに、*Aos1* ノックダウン個体の表現型は *neverland* 遺伝子の過剰発現によりレスキューされたことから、*Aos1* は *neverland* 遺伝子の発現制御を介して蛹化を促進することが示された。その他の因子に関しては、*neverland* 過剰発現により表現型が回復しなかったことから、これらの因子は *neverland* 以外のエクジソン合成酵素も制御すると考えられる。

**【ヘテロクロマチン因子・HP1 の遺伝学的解析】**本研究では、PIAS と相互作用することが知られているヘテロクロマチン因子である heterochromatic protein 1 (HP1) に着目し、HP1 が *neverland* の発現を制御する可能性を検証した。その結果、前胸腺選択的な *HP1* ノックダウン個体では幼虫から蛹への変態が遅延し、*neverland* 遺伝子の発現が低下していることが判明した。さらに、

HP1 ノックダウン個体の表現型は *PIAS* ノックダウン個体同様 *neverland* の強制発現によりレスキューされたことから、*HP1* は *neverland* 遺伝子の制御を介して蛹化を促進すると結論付けた。また、*HP1* タンパク質は *PIAS* と同様にヘテロクロマチン領域に局在しており、一部 *PIAS* タンパク質とマージすることから、*PIAS* と *HP1* は *neverland* 遺伝子領域周辺に局在している可能性が示唆された。

**【核内倍加と *PIAS* および *HP1* との相互作用】**ヘテロクロマチン領域において *PIAS* は DNA 損傷部位にリクルートされる性質を有すること、核内倍加の進行に伴いヘテロクロマチン領域に DNA 損傷が生じることから、核内倍加の進行に伴い DNA 損傷が生じたヘテロクロマチン領域に *PIAS* がリクルートされ、SUMO 修飾を介してその領域の遺伝子発現を制御する可能性が予想された。この可能性を検証するために、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-Seq) を用いて DNA 損傷および *PIAS* の局在が引き起こされる遺伝子領域の同定を試みた。しかし、前胸腺は非常に小さな組織であり、周囲に様々な組織が存在していることから、RNA 抽出に十分な量の前胸腺を解剖により精度よく摘出・回収することが困難であった。現在、前胸腺を効率的に回収するために実験条件の改善に取り組んでいる。

次に、*PIAS* および *HP1* ノックダウン個体の前胸腺を免疫染色により観察したところ、*Neverland* タンパク質のレベルが低下していることが確認され、核内倍加の進行も正常であることが明らかとなった。さらに、前胸腺選択的なインスリンシグナルの活性化による蛹化の早発は *PIAS* および *HP1* のノックダウンによりキャンセルされた一方で、インスリンシグナルによる核内倍加の昂進は阻害されなかったことから、*PIAS* および *HP1* は核内倍加の下流で機能している可能性が示唆された。



**図3. *PIAS* および *HP1* によるエクジソン産生の制御**

以上の結果から、*PIAS* および *HP1* は *neverland* の選択的発現制御を介してエクジソン産生ならびに蛹化を制御すると結論付けた (図3)。本研究は、核内倍加による機能分化制御機構の一端を明らかにするための基盤となるものであり、本研究成果を足掛かりとして、様々なショウジョウバエ組織や他の生物種における核内倍加の下流経路やその役割を明らかにしていきたい。また、本研究で得られた成果は、これまで殆ど明らかとなっていなかったクロマチン制御因子によるエクジソン産生制御機構の一端を示すものであり、昆虫内分泌学の分野においても重要な知見である。これらの研究成果は原著論文として投稿し、現在、再投稿に向け修正を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大原裕也
2. 発表標題 ショウジョウバエ発育過程を制御する栄養シグナル
3. 学会等名 第10回TOR研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大原裕也、小林公子
2. 発表標題 SUMO化経路によるエクジステロイド産生制御機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大原裕也
2. 発表標題 遺伝学的手法で紐解く栄養応答的な個体発育の仕組み
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学 食品栄養科学部 人類遺伝学研究室HP  
<https://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/cellphys/>  
人類遺伝学研究室HP  
<https://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/cellphys/index.html>

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
研究協力者	山中 直岐  (Yamanaka Naoki)	カリフォルニア大学リバーサイド校・昆虫学科・准教授	
研究協力者	佐藤 昌直  (Sato Masanao)	北海道大学大学院・農学研究院・助教	

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