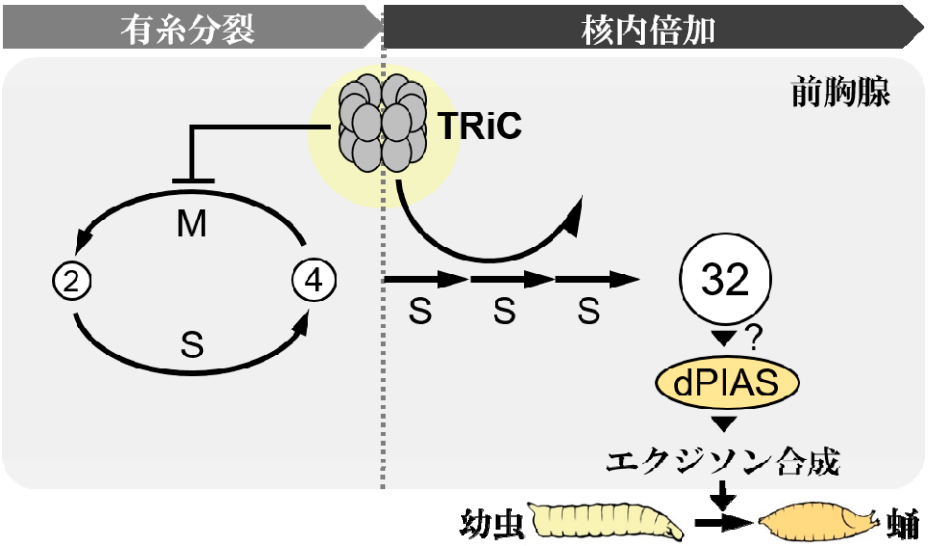
136　特殊な細胞周期「核内倍加」の分子機序の解明	大原　裕也

【目的】多細胞生物の身体がつくり上げられる過程において、一部の細胞は有糸分裂による増殖を停止し、核内倍加と呼ばれる細胞周期を開始し成長・肥大する。核内倍加は分裂期を伴わずゲノム DNA コピー数と細胞サイズを増加させる細胞周期であるが、有糸分裂から核内倍加への切り替えがどのような分子機構で達成されているのかは解明されておらず、核内倍加が進行することによって惹起される下流シグナル伝達経路も同定されていない。そこで本研究では、ショウジョウバエ内分泌組織である前胸腺を対象に、これらの疑問点に迫るべく遺伝学的解析を行った。前胸腺における核内倍加の進行はエクジソンと呼ばれるステロイドホルモンの産生に必須であり、前胸腺から分泌されたエクジソンは幼虫から蛹への変態を誘発する。前胸腺において、「有糸分裂化から核内倍加への切り替え」または「核内倍加の下流経路」を制御する因子を阻害した場合、その個体はエクジソン産生が活性化しないことが原因で幼虫期において致死となり、それぞれの前胸腺は「細胞数の増加」および「正常な DNA 量」を示すはずである。本研究ではこの判断基準をもとに前胸腺選択的な RNAi スクリーニングを行うとともに、選抜した因子の機能解析を行った。

【方法】前胸腺選択的に任意の遺伝子をノックダウンするために Gal4/UAS システムを用いた。前胸腺細胞の観察には免疫染色法を用い、遺伝子発現量を測定するために定量 RT-PCR を行った。

【結果】701 遺伝子を対象とした RNAi スクリーニングにおいて、コントロール個体の前胸腺と比較して有意に前胸腺の DNA 量が低下しない 74 遺伝子が選抜された。この遺伝子群のうち、*dPIAS*（*Drosophila Protein Inhibitor of Activated STAT*）に着目し機能解析を行い、*dPIAS* ノックダウン個体はエクジソン合成酵素の一つである *neverland*（*nvd*）の発現が低下することにより幼虫で発生を停止することを見出した。この結果は、*dPIAS* は *nvd* の発現制御を介してエクジソン産生を制御することを示している。さらに、RNAi スクリーニングではノックダウンにより前胸腺細胞数が増加する 44 遺伝子が見出され、この遺伝子群に TRiC（TCP-1 Ring Complex）と呼ばれるタンパク質複合体のサブユニットが有意にエンリッチしていたことから、TRiC が核内倍加の開始を制御する可能性を検証した。その結果、TRiC を阻害した前胸腺では細胞数が有意に増加し、有糸分裂を駆動する因子・サイクリンの抑制因子である Fzr の核内局在が低下していたことから、TRiC は Fzr の制御を介して有糸分裂から核内倍加への切り替えを促進することが示唆された。以上、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活用し、核内倍加の開始および下流経路を司る分子機構を明らかにする基盤を構築した。

核内倍加の開始制御機構および下流シグナル伝達経路のモデル



136. 特殊な細胞周期「核内倍加」の分子機序の解明

大原　裕也

静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科

Key words：核内倍加、ショウジョウバエ、前胸腺、エクジソン

緒　言

私たちの身体を構成する細胞は、「増える・増殖する」能力と「大きくなる・成長する」能力を有している。身体がつくり上げられる過程において、有糸分裂により細胞が増殖し臓器や身体のサイズが増加するとともに、一部の細胞は有糸分裂による増殖を停止し、核内倍加と呼ばれる細胞周期を開始し成長・肥大する。核内倍加は分裂せずゲノム DNA コピー数と細胞サイズを増加させる細胞周期であり、細菌、植物、動物界において普遍的に存在する。ヒトでは肝臓、巨核球といった健常な臓器だけでなく癌組織などの病的な組織でも頻繁に観察される［1，2］。では、細胞はどのような分子メカニズムを用いて有糸分裂から核内倍加へと細胞周期を切り替えるのか？また、核内倍加は単に細胞のサイズ増加に寄与するだけなのか、それとも何らかの生理的意義があるのだろうか？細胞周期に関する研究が進展してきた現在においても、これらの疑問は未だ解決されていない。私たちは、これらの謎を解き明かすべく、ショウジョウバエ内分泌組織である前胸腺を核内倍加研究のモデル系として用い、以下の研究を行っている。

前胸腺は核内倍加により肥大する組織であり、エクジソンと呼ばれるステロイドホルモンを産生し、幼虫の脱皮や幼虫から蛹への変態を誘発する。私たちはこれまでに、前胸腺における核内倍加の役割を検証し、前胸腺における 3 回の核内倍加の進行はエクジソン産生ならびに蛹化の誘導に必須あることを見出している［3］。例えば、核内倍加の開始を阻害した前胸腺は有糸分裂を継続し細胞数が著しく増加するが、エクジソン産生が活性化せず幼虫から蛹へ移行できない。このことは、前胸腺の核内倍加が正常に進行しエクジソン産生が活性化したか否かは変態の有無により判別できることを意味しており、幼虫から蛹への変態という形態的に明確な判断基準により、核内倍加の開始・進行を司る因子、さらには核内倍加の下流で働く因子などを探索することができるのではないか、という着想を得た。即ち、「有糸分裂化から核内倍加への切り替え」、「核内倍加の進行」、「核内倍加の下流経路」のいずれかを制御する因子を阻害した場合、その個体は幼虫で発生を停止し、それぞれの前胸腺は「細胞数の増加」「DNA 量の低下」「正常な DNA 量（3 回もしくはそれ以上の核内倍加相当の DNA 量）」を示すはずである。

そこで本研究では、前胸腺選択的な RNA 干渉（RNAi）スクリーニングを行い、核内倍加の開始、進行、および下流経路を制御する候補因子を選抜し、それらの機能を明らかにすることを目的とした。

方　法

1.　ショウジョウバエ飼育、交配、および発生過程の観察

ショウジョウバエ系統は 25℃、明暗 12 時間の条件で飼育し、German food と呼ばれる富栄養餌を用い栄養条件を揃えた。前胸腺選択的に任意の遺伝子をノックダウンするために、遺伝子発現制御システムである Gal4/UAS システムおよび RNAi を用いた。前胸腺選択的な Gal4 系統として *phamtom*^{22}*-Gal4*（*phm-Gal4*）を用い、*phm-Gal4* 系統と、UAS 配列の下流で任意の遺伝子に対する二本鎖 RNA（dsRNA）を発現する系統とを交配し、得られた次世代の個体を RNAi 個体として用いた。コントロール個体として、*phm-Gal4* と正常個体を交配して得られた個体を用いた。ショウジョウバエ幼虫の発生過程は飼育バイアルで観察し、各ノックダウン系統において幼虫から蛹への移行に異常が生じるか観察した。また、組織染色および免疫染色では、前胸腺細胞の核をラベルするために、コントロールおよびノックダウン個体において核移行シグナル（nls）が付加された mCherry（mCherry.nls）を発現させた。

ふ化後の時間を揃えてサンプリングする場合は以下の方法を用いた。まず、寒天プレートを据え付けた飼育ボトルに交配した親系統を入れ採卵した。次いで、寒天プレートからふ化直後の幼虫を集め、プラスチックバイアルに移しGerman food を与え飼育した。蛹へ移行した個体の割合は、ふ化後 72 時間から 12 時間おきにカウントした。

2. 組織染色および免疫染色

染色に用いる幼虫個体をリン酸緩衝液（PBS）中で解剖し、摘出した組織を 4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定した。次いで、0.1%のトライトンを添加した PBS（PBT）を用い、固定した組織を洗浄した（10 分、3 回）。洗浄後、ブロッキング溶液（5% goat serum in PBT）を加え 30 分間室温でブロッキングした後、後述の蛍光試薬または抗体を加えた溶液を加えインキュベートした（4℃、24 時間）。

組織染色において DNA は Hoechst（1/1500 希釈）により染色し、前胸腺細胞は Gal4/UAS システムにより発現させた mCherry.nls によりラベルした。免疫染色では、GFP タグが付加された Fizzy-related（Fzr）タンパク質およびリン酸化ヒストン H3（pH3）を可視化するために、それぞれ、抗 GFP 抗体（mouse-IgG、Thermo、A11120、1／1000 希釈）および抗 pH3 抗体（rabbit-IgG、Millipore、06–570、1/500 希釈）を用いた。これらの抗体で処理した後、PBT による洗浄を行い（10 分、3 回）、Alexa488 または Alexa546 が付加された 2 次抗体を用い 4℃、24 時間の条件でインキュベートした（Thermo、A-11001 or A-11030、1/1000 希釈）。

染色後、PBT による洗浄を行い（10 分、3 回）、摘出した前胸腺をスライドグラスにマウントした。前胸腺は共焦点顕微鏡（Zeiss、LSM700）により観察した。DNA 量の測定、細胞数のカウント、およびシグナル強度の測定は Image J を用い行った。

3. 定量 RT-PCR（qPCR）

ショウジョウバエ幼虫から Total RNA を抽出し、これを鋳型として Superscript Ⅲ（Thermo、18080044）を用い cDNA を合成した。Quantifast（QIAGEN、204054）を用い cDNA をサンプルとして qPCR を行った。qPCR マシンは Rotor Gene（QIAGEN）を用いた。Total RNA の抽出、cDNA 合成、および qPCR は指定された標準的な手法に沿って行った。

結　果

1. RNAi スクリーニングによる核内倍加の開始制御因子および下流因子の探索

ショウジョウバエ全遺伝子に対する前胸腺特異的な RNAi スクリーニングを実施した先行研究において、約 700 遺伝子がエクジステロイド産生ならび変態に必須であることが報告されている［4］。本研究ではこの遺伝子群を対象として、遺伝子発現制御システムである Gal4/UAS システムおよび RNAi を用い、前胸腺特異的に対象遺伝子をノックダウンし変態過程を観察するとともに、前胸腺細胞の DNA 量および細胞数を組織染色により観察した。その結果、コントロール個体と比較して有意に前胸腺の DNA 量が低下しない 74 遺伝子が選抜され、これらを核内倍加の下流候補遺伝子群として遺伝学的解析を遂行した（結果 2 に続く）。さらに、ノックダウンにより前胸腺細胞数が増加する 44 遺伝子が見出され、この遺伝子群に TRiC（TCP-1 Ring Complex）と呼ばれるタンパク質複合体のサブユニットが有意に多く含まれていたことから、TRiC が核内倍加の開始を制御する可能性を検証した（結果 3 に続く）。

2. 核内倍加の下流因子候補・PIAS の機能解析

上記の前胸腺特異的なRNAiスクリーニングにおいて同定した核内倍加の下流候補遺伝子群のうち、SUMO（Small ubiquitin related modifier）付加酵素である*dPIAS*（*Drosophila Protein Inhibitor of Activated STAT*）［5］に着目し機能解析を行い、以下の結果を得た。

まず、*dPIAS*を前胸腺特異的にノックダウンした個体の前胸腺を観察し、*dPIAS*ノックダウン個体は前胸腺における核内倍加の進行に異常を示さないことを確認した（図1A～C）。次に、qPCRを用いてエクジソン合成酵素の遺伝子発現量を測定したところ、エクジソン合成経路の初発段階であるコレステロールから7-デヒドロコレステロールへの変換を担う*neverland*（*nvd*）の発現が*dPIAS*ノックダウン個体において低下していることがわかった（図1D）。さらに、*dPIAS*ノックダウン個体において*nvd*を過剰発現させた場合、その個体は蛹へと移行した（図1E）。以上の結果は、*dPIAS*は*nvd*遺伝子の選択的な発現制御を介してエクジソン産生を制御することを示している。現在、前胸腺においてdPIASタ

ンパク質の発現が核内倍加の進行に伴いどのように変化するのかについて解析を行うとともに、*nvd*遺伝子領域が*dPIAS*依存的にSUMO修飾を受けるのか否かについて解析する準備を進めている。

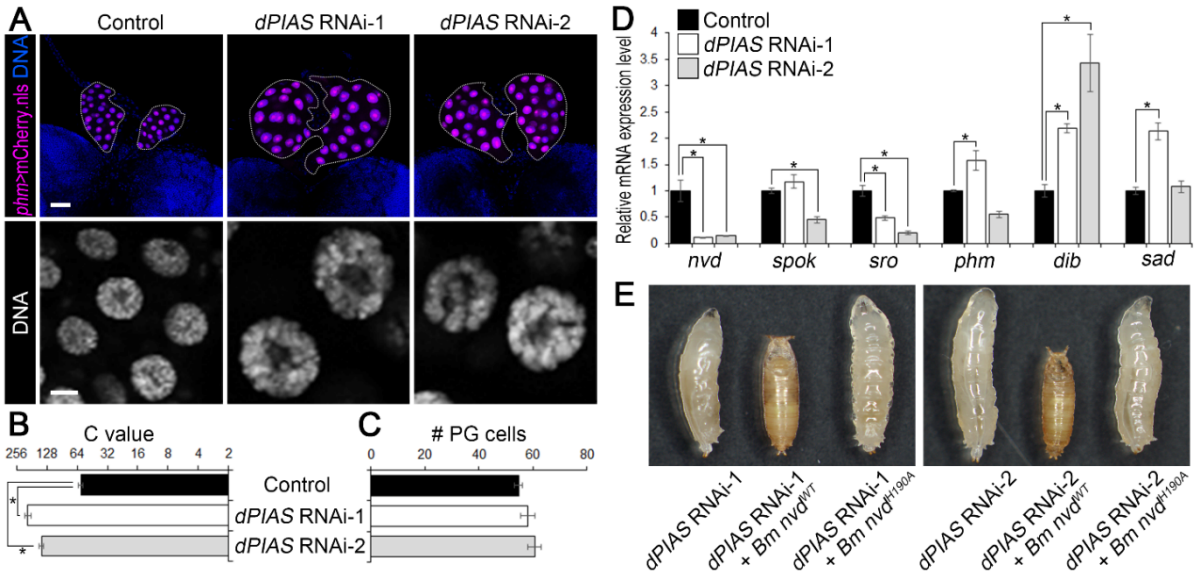


図 1. *dPIAS* ノックダウン個体の表現型

A) ふ化後 96 時間におけるコントロールおよび *dPIAS* ノックダウン個体（*dPIAS* RNAi-1 および *dPIAS* RNAi-2）の前胸腺を示す。上段のマゼンタは mCherry.nls、青色は DNA を示す。下段はズームアップした前胸腺細胞を示し、白色は DNA を示す。スケールバー：50 μm（上段）および 10 μm（下段）。

B、C) ふ化後 96 時間におけるコントロールおよび *dPIAS* ノックダウン個体の前胸腺における DNA 量（C value）（B）および細胞数（C）を示す。n = 12（コントロール）、14（*dPIAS* RNAi-1）、13（*dPIAS* RNAi-2）。
* $P < 0.05$ （Dunnett's test）。

D) ふ化後 96 時間のコントロールおよび *dPIAS* ノックダウン個体におけるエクジソン合成酵素群の遺相対的伝子発現量を示す。各遺伝子発現量は *ribosomal protein 49* の発現量で補正した。各群すべて n = 3。
* $P < 0.05$ （Dunnett's test）。

E) *dPIAS* ノックダウン個体（各写真左）および nvd を過剰発現させた *dPIAS* ノックダウン個体（各写真中央：野生型 nvd、各写真右：機能阻害型 nvd）を示す。左および右の写真は、それぞれ、*dPIAS* RNAi1 および 2 をバックグラウンドとして用いた個体群を示す。

3. 核内倍加の開始は分子シャペロニン・TRiC によって制御される

結果1で述べた通り、RNAiスクリーニングにおいて核内倍加の開始（有糸分裂から核内倍加への切り替え）を制御する可能性がある因子としてTRiCを見出した。TRiCは8つのサブユニット（cct1～8）から成る複合体であり、様々なタンパク質の立体構造と機能を正常にする役割を有している［6］。TRiCが核内倍加の開始を制御する可能性を検証するために、免疫染色によりコントロールおよびTRiCサブユニットをノックダウンした個体の前胸腺を観察した。その結果、TRiCサブユニットをノックダウンした前胸腺では、DNA量の低下および細胞数の増加が確認され、有糸分裂のマーカーであるpH3の発現が上昇する傾向が見受けられた（図2）。さらに、TRiCサブユニット（*cct4*および*cct8*）をノックダウンした前胸腺では、有糸分裂を駆動する因子・サイクリンの抑制因子であるFzrの核内局在が低下していたことから（図2）、TRiCはFzrの制御を介して有糸分裂から核内倍加への切り替えを促進することが示唆された。この研究成果はPLoS Genetics誌に投稿し、受理された［7］。

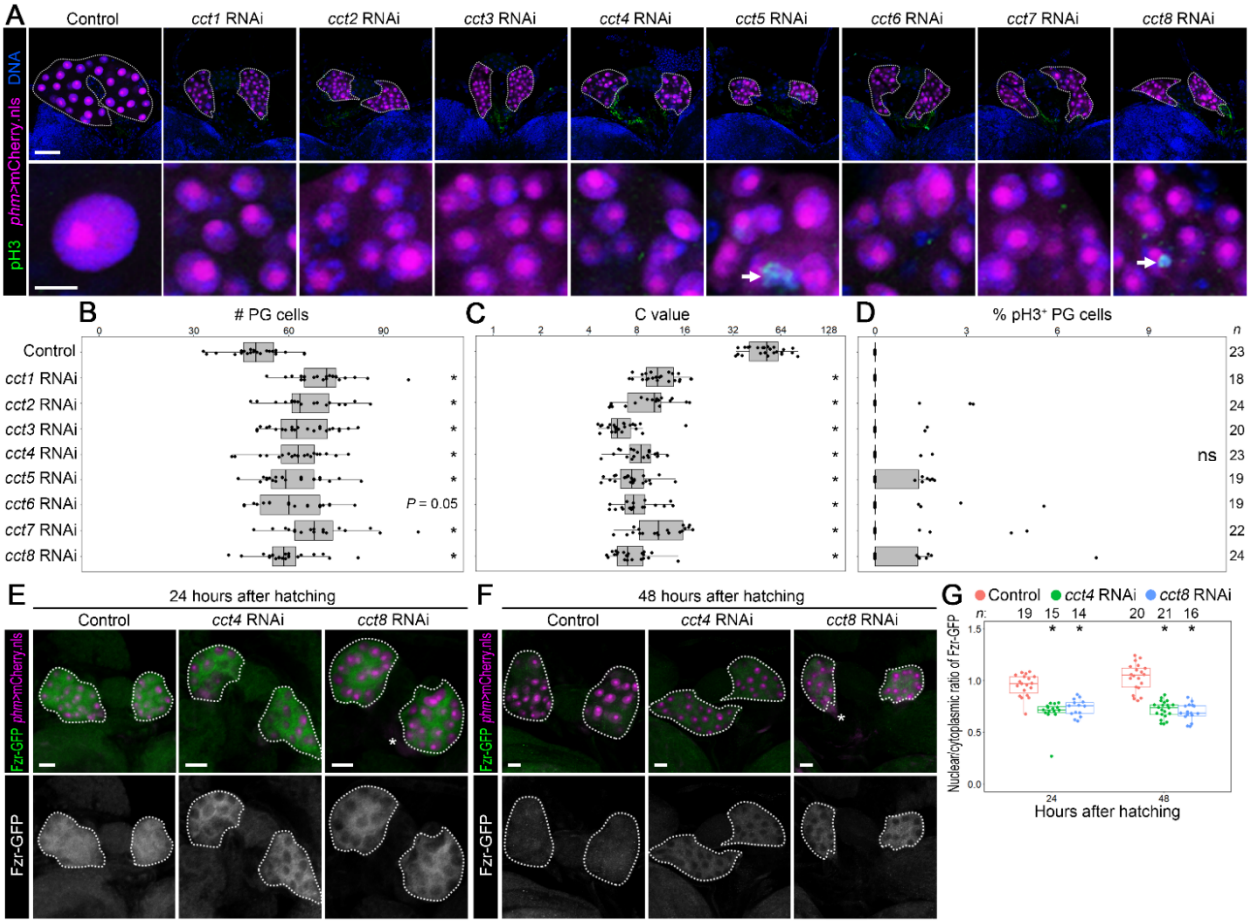


図 2. TRiC サブユニットのノックダウン個体の表現型

A) ふ化後 96 時間におけるコントロールおよび TRiC サブユニットのノックダウン個体（*cct1-8*RNAi）の前胸腺を示す。緑色は pH3、マゼンタは mCherry。nls、青色は DNA を示す。下段はズームアップした前胸腺細胞を示す。スケールバー：50 μm（上段）および 10 μm（下段）。

B～D) ふ化後 96 時間におけるコントロールおよび TRiC サブユニットのノックダウン個体の前胸腺における細胞数（B）、DNA 量（C value）（C）、および pH3 陽性細胞の割合（D）を示す。サンプルサイズは右端に示す。* $P < 0.05$ （Dunnett's test）、ns：not significant。

E、F) ふ化後 24（E）および 48 時間（F）におけるコントロールおよび *cct4* および *8* ノックダウン個体（*cct4*RNAi および *cct8*RNAi）の前胸腺を示す。上段の緑色は Fzr-GFP、マゼンタは mCherry。nls、青色は DNA を示す。下段の白色は Fzr-GFP の発現を示す。スケールバー：10 μm。

G) コントロールおよび *cct4* および *8* ノックダウン個体の前胸腺細胞における、核内と細胞質との間の Fzr-GFP 発現比を示す。サンプルサイズはグラフの上端に示す。* $P < 0.05$ （Dunnett's test）。

考　察

本研究では、核内倍加の開始制御因子および下流シグナルを解明するために、ショウジョウバエの前胸腺をモデル系として遺伝学的解析を行った。その結果、核内倍加の下流候補として74遺伝子を同定し、そのうち*dPIAS*について遺伝学的解析を進め、*dPIAS*が*nvd*遺伝子を選択的に制御することで前胸腺の機能発現＝エクジソン産生を誘発することを見出した。dPIASはSUMO付加酵素の性質を持つだけでなく、DNA二本鎖切断（DSB）に応答する性質を有しており、DSBが生じた領域周辺をSUMO修飾する［5］。核内倍加の進行によりヘテロクロマチン領域にDSBが生じやすいこと［8］、dPIASは特にヘテロクロマチン領域のDSB領域周辺をSUMO修飾すること［9］、*nvd*遺伝子はヘテロクロマチン

領域に位置することを考え合わせると［10］、「核内倍加の進行に伴い*nvd*遺伝子領域にDSBが蓄積することでdPIASのリクルートおよびSUMO修飾が引き起こされ、*nvd*遺伝子領域がユークロマチン状態へと移行しその発現が上昇する」という可能性が考えられる（図3）。今後、遺伝学的手法および生化学的手法を用い、この可能性を検証していく予定である。核内倍加細胞はDSBの修復機構が抑制されており、その進行とともにDSBが不可逆的に蓄積する。核内倍加細胞はこの性質を利用し、不可逆的な機能発現・分化プログラムを誘導しているのかもしれない。現在、*dPIAS*および他の下流候補因子の遺伝学的解析および遺伝子発現解析を進めている。

また、本研究のスクリーニングでは、核内倍加の開始（＝有糸分裂から核内倍加への切り替え）に関与する44遺伝子を同定し、そのうち分子シャペロニンであるTRiCのサブユニットに着目し遺伝学的解析を行った。その結果、TRiCはFzrの局在制御を介して核内倍加の開始を促進することを見出した。TRiCはFzr以外にも様々なタンパク質の正常な機能発現に関与することから［6］、TRiCは標的タンパク質の品質を担保し、滞りない核内倍加の開始と進行を支えていると考えられる（図3）。TRiCおよびFzrは生物界に保存された因子であり、TRiCによるFzrの制御は他の生物種でも報告されていることから、TRiCならびにFzrによる核内倍加の制御機構は他の生物においても保存されている可能性が考えられる。

以上、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活用し、核内倍加の開始および下流シグナルに関与する因子の選抜および機能解析を行い、その分子機構の全貌を明らかにする基盤を構築した。核内倍加は生物界に広く保存されており、腫瘍組織でも見受けられることから、核内倍加の分子機序を理解することは、発生過程のみならず癌の発生・進行における核内倍加の役割を理解するためにも重要である。

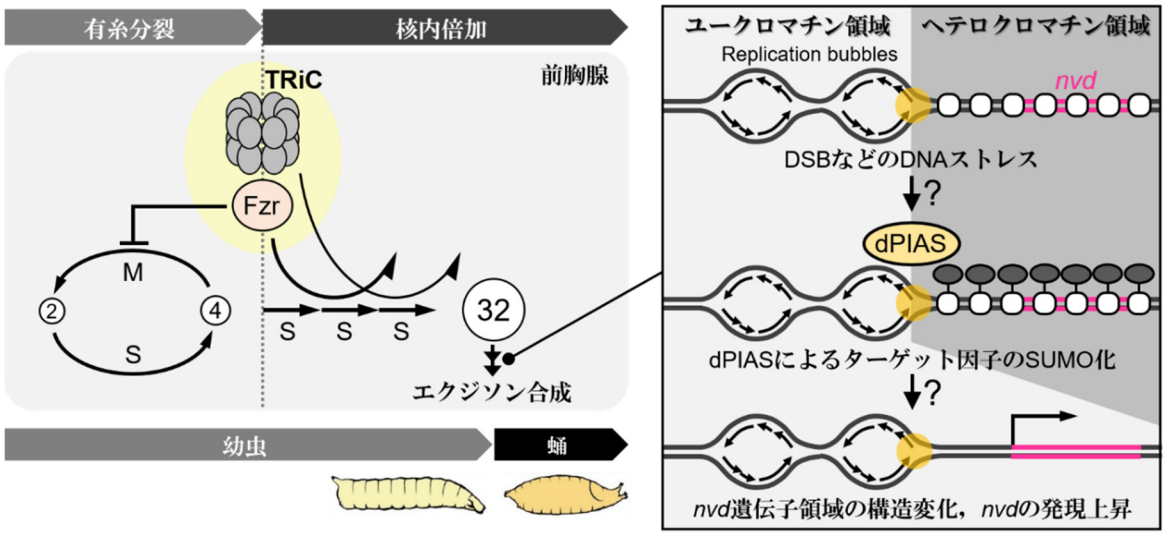


図 3. 前胸腺における核内倍加の制御機構および核内倍加の下流経路のモデル図

共同研究者・謝辞

本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

1) Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Mar;15(3):197-210. doi: 10.1038/nrm3756. Review. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Apr;15(4):294. PubMed PMID: 24556841.

2) Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. Trends Cell Biol. 2013 Nov;23(11):556-66. doi: 10.1016/j.tcb.2013.06.002. Epub 2013 Jul 10. Review. PubMed PMID: 23849927.

3) Ohhara Y, Kobayashi S, Yamanaka N. Nutrient-Dependent Endocycling in Steroidogenic Tissue Dictates Timing of Metamorphosis in Drosophila melanogaster. PLoS Genet. 2017 Jan 25;13(1):e1006583. doi: 10.1371/journal.pgen.1006583. eCollection 2017 Jan. PubMed PMID: 28121986.

4) Danielsen ET, Moeller ME, Yamanaka N, Ou Q, Laursen JM, Soenderholm C, Zhuo R, Phelps B, Tang K, Zeng J, Kondo S, Nielsen CH, Harvald EB, Faergeman NJ, Haley MJ, O'Connor KA, King-Jones K, O'Connor MB, Rewitz KF. A Drosophila Genome-Wide Screen Identifies Regulators of Steroid Hormone Production and Developmental Timing. Dev Cell. 2016 Jun 20;37(6):558-70. doi: 10.1016/j.devcel.2016.05.015. PubMed PMID: 27326933.

5) Rabellino A, Andreani C, Scaglioni PP. The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. Cancer Res. 2017 Apr 1;77(7):1542-1547. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2958. Epub 2017 Mar 22. Review. PubMed PMID: 28330929.

6) Lundin VF, Leroux MR, Stirling PC. Quality control of cytoskeletal proteins and human disease. Trends Biochem Sci. 2010 May;35(5):288-97. doi: 10.1016/j.tibs.2009.12.007. Epub 2010 Jan 28. Review. PubMed PMID: 20116259.

7) Ohhara Y, Nakamura A, Kato Y, Yamakawa-Kobayashi K. Chaperonin TRiC/CCT supports mitotic exit and entry into endocycle in Drosophila. PLoS Genet. 2019 Apr 29;15(4):e1008121. doi: 10.1371/journal.pgen. 1008121. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31034473.

8) Mehrotra S, Maqbool SB, Kolpakas A, Murnen K, Calvi BR. Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplication genotoxic stress. Genes Dev. 2008 Nov 15;22(22):3158-71. doi: 10.1101/gad.1710208. PubMed PMID: 19056894.

9) Ryu T, Spatola B, Delabaere L, Bowlin K, Hopp H, Kunitake R, Karpen GH, Chiolo I. Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. Nat Cell Biol. 2015 Nov;17(11):1401-11. doi: 10.1038/ncb3258. Epub 2015 Oct 26. PubMed PMID: 26502056.

10) Lang M, Murat S, Clark AG, Gouppil G, Blais C, Matzkin LM, Guittard E, Yoshiyama-Yanagawa T, Kataoka H, Niwa R, Lafont R, Dauphin-Villemant C, Orgogozo V. Mutations in the neverland gene turned Drosophila pachea into an obligate specialist species. Science. 2012 Sep 28;337(6102):1658-61. PubMed PMID: 23019649.