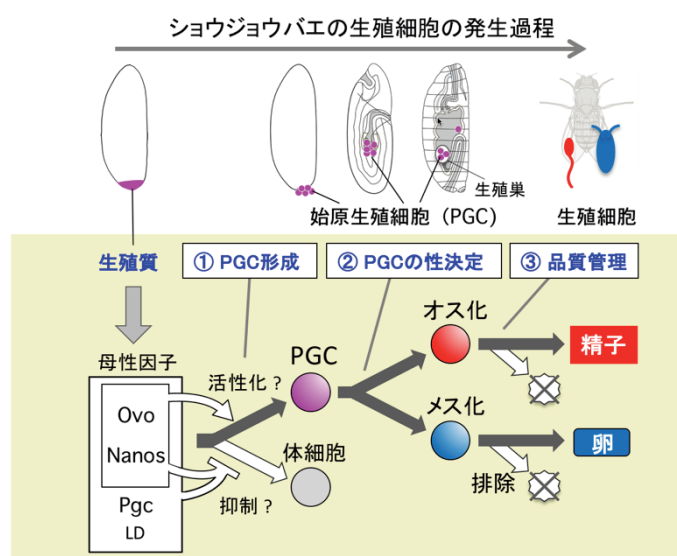


# 生殖ダイナミクス

## 「生殖細胞形成メカニズムの解明に挑む」

次代の生命を生み出すためには卵や精子である生殖細胞が必要である。一方、体細胞は、筋肉や神経などの体のパーツを作り上げ個体の生命を支えているが、やがて個体の死とともにその役割を終えてしまう。ショウジョウバエ卵の後端には生殖質と呼ばれる特殊な細胞質があり、この細胞質を取り込む始原生殖細胞のみが生殖細胞に分化する。生殖質の中には、生殖細胞の形成の引き金を引く分子がそろっていることが、生殖質の移植実験により明らかにされている。そこで、このような分子の実体を明らかにすることにより、生殖細胞形成メカニズムの全貌を解明することができると考えている。さらに、生殖系列の性の決定機構や品質管理機構に関しても研究を行っている。

Germ cells are specialized cells that can transmit genetic materials from one generation to the next in sexual reproduction. All of the other cells of the body are somatic cells. This separation of germ and somatic cells is one of the oldest problems in developmental biology. In many animal groups, a specialized portion of egg cytoplasm, or germ plasm, is inherited by the cell lineage which gives rise to germ cells. It has been demonstrated that the germ plasm contains maternal factors required and sufficient for germline development. Our laboratory aims to find the molecular mechanisms for germline development, germline sex determination and germline quality control in *Drosophila*.



ショウジョウバエにおける生殖細胞形成過程および研究のポイント



2018 年度 小林研究室集合写真

プロジェクトメンバー

教授

小林 悟

助教

島田 裕子

林 良樹

林 誠

博士研究員

浅岡 美穂

太田 龍馬

森田 俊平

生命科学研究所

博士前期課程

石崎 優木

酒巻由梨奈

添島 香苗

三浦 博樹

香山 瑞生

ARE

古賀 結花

研究マインド

萩久保朝香

技術補佐員

松川 洋美

渡邊満美子

## 研究概要

### 【始原生殖細胞の形成機構】

ショウジョウバエ卵後端の「生殖質」を、体細胞に分化する卵前端の細胞に取り込めると、その細胞は体細胞に分化することをやめ、始原生殖細胞 (PGC) となり生殖細胞に分化する。このことは、生殖質中には、体細胞分化を抑制する分子 (母性因子) と、生殖細胞への分化を活性化する母性因子が存在していることを物語っている。これまでに、PGC の運命決定に関わる母性因子として Nanos タンパク質を単離しており、この母性 Nanos タンパク質は、PGC の体細胞分化を抑制することを明らかにした。また、生殖質に含まれる母性因子である Polar granule component タンパク質は、RNA polymerase II による転写活性を一時的に低下させることにより、PGC 中で体細胞性遺伝子の発現を抑制することも明らかとなっている。一方、PGC 中で生殖細胞系列特異的な遺伝子 (生殖系列遺伝子) を活性化し、生殖細胞に分化するように運命づける働きを持つ母性因子の一つとして Ovo タンパク質を同定した。これら母性因子の機能解析により、PGC の発生運命決定機構を明らかにできると考えている。

### 体細胞性遺伝子の発現を抑制する機構

母性 Nanos は RNA 結合タンパク質であり、コファクターである RNA 結合タンパク質 Pumilio と共に、ターゲット RNA に結合し、その翻訳を抑制する機能を持つことが知られていた。本研究では、母性 Nanos タンパク質が、PGC 中において、Pumilio と共に、核移行リセプターをコードする *importin- $\alpha$ 2* (*imp $\alpha$ 2*) mRNA の 3'UTR 上に結合し、その翻訳を抑制することを示唆する結果が得られた。また、Imp $\alpha$ 2 の産生抑制により、体細胞性遺伝子である *fushi tarazu* (*ftz*) 遺伝子の発現に必要な転写活性化因子 Ftz-F1 の核移行を抑えることを明らかにした。しかし、母性 Nanos を有する正常な PGC において Imp $\alpha$ 2 を強制発現させても *ftz* などの体細胞性遺伝子は強く活性化しない。このことは、この経路以外にも体細胞性遺伝子の発現抑制に関わる母性因子があることを示唆している。そこで、そのような母性因子の候補として Polar granule component に注目し、Polar granule component を欠く PGC 中で Imp $\alpha$ 2 を強制発現させたところ、*ftz* や *even-skipped* (*eve*) などの体細胞性遺伝子が異所的に発現することを見出した。また、この PGC は卵や精子に分化できないことも明らかにした。以上の結果は、PGC 中で、Polar granule component とともに、母性 Nanos タンパク質による転写因子の核移行抑制が体細胞性遺伝子の発現抑制に関与することを示している。今後、上記の結果を確認し、論文投稿を速やかに行う予定である。

また、上記の体細胞性遺伝子の発現抑制に加えて、母性 Nanos タンパク質は、PGC 中において、母性 *CG32425* mRNA の安定化に関わるという新たな機能を見出した。この RNA 以外にも安定化される母性 mRNA が存在すると考えられ、Nanos を欠く PGC で発現量が低下する

mRNAの探索を行うとともに、RNAの安定化に関わるRNA結合タンパク質の探索を開始する予定である。

### 生殖系列遺伝子の発現を活性化する機構

母性 *Ovo* タンパク質は、Zn フィンガードメインを有する転写制御因子として知られている。本研究では以下の諸点を明らかにした。第1に、母性 *ovo* mRNA は生殖質に分布し PGC に取り込まれるが、その mRNA にコードされる母性 *Ovo* タンパク質は、PGC の核に *enrich* することが明らかとなった。第2に、母性 *Ovo* の機能を阻害した PGC における遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析した結果、母性 *Ovo* は PGC で高発現する遺伝子群を活性化し、逆に体細胞で高発現する遺伝子群を抑制することが明らかとなった。このことは、母性 *Ovo* が PGC と体細胞の遺伝子発現の違いを生み出す重要な因子であることを強く示唆する。第3に、母性 *Ovo* の機能阻害を行ったところ、PGC から配偶子への発生過程において、生殖系列細胞数が激減することが明らかとなった。このことは、母性 *Ovo* が PGC の発生過程に必須であることを示している。さらに、ショウジョウバエと同様に、マウスにおいても、*ovo* ホモログ (*ovol2*) が、PGC 特異的な遺伝子発現の活性化に関わり、PGC の発生過程に重要な働きを持つことを明らかにする研究を継続中である。

また、母性 *Nanos* タンパク質が、母性 *ovo* mRNA の安定化に関わることを示唆する結果も得られている。このことは、母性 *Nanos* タンパク質が *Ovo* タンパク質の機能を介して、生殖系列遺伝子の活性化にも寄与することを示唆している。

### 【始原生殖細胞の性差形成機構】

PGC は、体細胞と同様に X 染色体を 2 本有する場合にメスとなり (XX 型)、X 染色体が 1 本の場合にはオスとなり (XY 型)、それぞれ卵 (卵母細胞) と精子に分化する。*Sxl* 遺伝子が高発現するとメス化を誘導できることを見出していた。そこで、*Sxl* 遺伝子の下流遺伝子を同定するために、*Sxl* タンパク質と結合し、かつ PGC で高発現する RNA をコードする 7 遺伝子を同定した。これら遺伝子の機能を RNA 干渉法を用いて PGC 中でノックダウンしたところ、*Su(var)2-10* ノックダウンにより卵巣中で生殖系列が腫瘍化している表現型が観察された。この表現型は、*Sxl* ノックダウンでも観察され、生殖系列がオス化する場合に観察される。以上の結果は、*Su(var)2-10* が *Sxl* の下流でメス化に働くことを強く示唆している。

これまでの研究から、*Sxl* 遺伝子以外にもメス化を誘導することができる遺伝子が存在することが予想されていた。そこで、オス PGC とメス PGC をセルソーターで分取する方法を開発し、PGC における発現に性差がある遺伝子を同定した。その後、それら候補遺伝子のうち、体細胞と比較して PGC で高発現する遺伝子などを選択し、その発現を *in situ* hybridization 法により確認した。その結果、オスに比べてメス PGC で高発現する 11 遺伝子

を、メスに比べてオス PGC で高発現する 17 遺伝子を得ることに成功した。現在、これら遺伝子の機能解析を継続して行っている。

上記の研究の過程において、体細胞で見られる遺伝子量補償機構が PGC では観察できないことを見出した。ショウジョウバエにおける遺伝子量補償とは、オスの X 染色体上の遺伝子発現を倍加させることで、X 染色体を 2 本持つメスにおける遺伝子発現量と一致させる機構である。Sxl 遺伝子は X 染色体上にコードされていることから、この遺伝子量補償の欠如により、オスに比べてメスの PGC において Sxl 遺伝子の発現量が増加しメス化すると考えられる。これを確かめる実験を継続中である。

### 【生殖系列の品質管理機構】

トランスポゾン的人為的活性化などによりゲノムに損傷が生じた生殖系列の細胞を排除する品質管理機構が存在するかは、生殖生物学分野において重要な問題である。現在、このような品質管理機構に関わる遺伝子を探索中である。

### 【個体の発育と成熟を司る神経内分泌機構】

個体が「こども（幼若期）」から「おとな（成熟期）」へ成長する過程において、脳神経系機能と代謝・内分泌環境が協調的に調節される必要がある。ヒトを含む哺乳類では、思春期に脳の視床下部から生腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin releasing hormone, GnRH) が放出され、卵巣や精巣でステロイドホルモン生合成が促進されることにより、生殖機能が発達することが知られている。しかし、適切なタイミングでステロイドホルモン生合成を促す神経支配の分子機構には、不明な点が多く残されている。

本研究では、昆虫ステロイドホルモンであるエクジステロイドの生合成調節において、セロトニン産生神経や GnRH superfamily に属する神経ペプチド Corazonin (Crz) を分泌する神経の機能解析を行っている。本研究により、幼虫の発育段階によって異なる神経支配機構が明らかになりつつあり、個体の成長から成熟への変遷過程を分子レベルで理解することを目指している。

## 2018 年度研究業績

### 原著論文（全て査読あり）

T. Ameku, Y. Yoshinari, M. Texada, S. Kondo, K. Amezawa, G. Yoshizaki, Y. Shimada-Niwa, and R. Niwa (2018)

Midgut-derived neuropeptide F controls germline stem cell proliferation in a mating-dependent manner. **PLOS Biology**, 16(9): e2005004.

Y. Ohhara, S. Kobayashi, K. Yamakawa-Kobayashi, and N. Yamanaka (2018)

Adult-specific insulin-producing neurons in *Drosophila melanogaster*. **J. Comp. Neurol.**, 526, 1351-1367.

S. Morita, R. Ota, and S. Kobayashi (2018)

Downregulation of NHP2 promotes proper cyst formation in *Drosophila* ovary. **Develop. Growth Differ.**, 60, 248-259.

Y. Kitadate, D. Jörg, M. Tokue, A. Maruyama, R. Ichikawa, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Nakagawa, A. Uchida, C. Kimura-Yoshida, S. Mizuno, F. Sugiyama, T. Azami, M. Ema, C. Noda, S. Kobayashi, I. Matsuo, Y. Kanai, T. Nagasawa, Y. Sugimoto, S. Takahashi, B. Simons, and S. Yoshida (2019)

Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche. **Cell Stem Cell**, 24, 79-92.e6.

### 分担著書

浅岡美穂、小林悟（2018）

項目 6-6 生殖幹細胞 「動物学の百科事典」、丸善出版株式会社、pp281-281.

Y. Hayashi and S. Kobayashi (2018)

Regulatory mechanism of the germline stem cell niche in *Drosophila melanogaster*. In **"Reproductive and Developmental Strategies"**, Edited by K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao and M. Kondoh, Springer, pp19-35.

C. Nishimiya-Fujisawa and S. Kobayashi (2018)

Roles of germline stem cells and somatic multipotent stem cells in *Hydra* sexual reproduction. In **"Reproductive and Developmental Strategies"**, Edited by K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao and M. Kondoh, Springer, pp123-155.

**学会発表等（国際学会＊、招待講演＊＊）**

＊＊小林悟

“次代に生命をつなぐ生殖細胞の作られる仕組み”

一般財団法人 大隅基礎科学創成財団 第2回創発セミナー「命の継承-その仕組みから学び、考える」（東京）2018年4月

Yoshiki Hayashi, Shinjiro Hino, Soshiro Kashio, Tetsuya Sato, Chiyo Noda, Masayuki Miura, Mitsuyoshi Nakao, Satoru Kobayashi

“Role of Methionine Metabolism during Germ-line Development of *Drosophila melanogaster*.”

第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会（東京）2018年6月

小林悟

“不死の生殖細胞が作られるメカニズムの解明”

生存ダイナミクス研究センターキックオフシンポジウム 筑波大学大学会館（つくば）2018年7月

太田龍馬、林誠、森田俊平、小林悟

“ショウジョウバエ始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如による生殖系列の性決定機構”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月

中村翔一、近藤茜、平誠司、小林悟、向正則

“生殖細胞生遺伝子の発現に関わる母性因子 Mamo を中心とした遺伝子発現制御ネットワーク”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月

林良樹、日野信次朗、樫尾宗志朗、佐藤哲也、野田千代、三浦正幸、中尾光善、小林悟

“ショウジョウバエ生殖系列におけるメチオニン代謝制御によるレトロトランスポゾン抑制の仕組み”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月

酒巻由梨奈、福元達也、田中大介、浅岡美穂、小林悟

“ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術の開発”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月

三浦博樹、太田龍馬、林誠、小林悟

“ショウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子の探索”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月



香山瑞生、浅岡美穂、森田俊平、林誠、小林悟

“ショウジョウバエ始原生殖細胞における体細胞性遺伝子抑制機構の役割”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月

近藤茜、向正則、中村翔一、小林悟

“ショウジョウバエの雌性内部生殖器官の形成に関わる新規突然変異体の性質”

日本動物学会第89回札幌大会（札幌）2018年9月

\* Yoshiki Hayashi, Shinjiro Hino, Soshiro Kashio, Tetsuya Sato, Chiyo Noda, Masayuki Miura, Mitsuyoshi Nakao, Satoru Kobayashi

“Role of Methionine Metabolism during Germ-line Development of *Drosophila melanogaster*.”

Germ Cells (New York, U.S.A) 2018年10月

林良樹

“生殖系列の代謝とその役割ーメチオニン代謝制御によるトランスポソンの発現抑制”

日本発生生物学会秋季シンポジウム 2018（岡崎）2018年11月

（オーガナイザー）

中村翔一、近藤茜、平誠司、小林悟、向正則

“ショウジョウバエ母性因子 Mamo の強制発現による異所的 *vasa* 遺伝子発現と細胞分裂誘導”

第41回日本分子生物学会年会（横浜）2018年11月

Yoshiki Hayashi, Shinjiro Hino, Tetsuya Sato, Soshiro Kashio, Chiyo Noda, Masayuki Miura, Mitsuyoshi Nakao, Satoru Kobayashi

“Methionine metabolism regulates retrotransposon expression in germline of *Drosophila melanogaster*.”

第41回日本分子生物学会年会（横浜）2018年11月

浅岡美穂、香山瑞生、羽生-中村賀津子、中村輝、小林悟

“ショウジョウバエ生殖系列における体細胞性遺伝子の二重抑制機構”

第41回日本分子生物学会年会（横浜）2018年11月

\*\*小林悟

“ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構”

基礎生物学研究所 公開セミナー（岡崎）2018年11月

＊ ＊ 小林 悟

“動物における生殖細胞形成機構”

農学生命科学部第 19 回研究推進セミナー 弘前大学（弘前） 2018 年 12 月

Yoshiki Hayashi

“Characteristics of *Drosophila* germ-line from metabolic aspects.”

TARA International Symposium, Satellite Meeting （つくば）2019 年 3 月

Yuko Shimada-Niwa

“The neuro-endocrine system for maturation in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.”

TARA International Symposium, Satellite Meeting （つくば）2019 年 3 月

## 受賞

古賀結花

優秀賞

筑波大学 先導的研究者体験プログラム研究発表会（1 月 21 日）

小林 悟

顕著な研究活動に対する表彰

筑波大学（3 月 4 日）

酒巻由梨菜

専攻長表彰

筑波大学（3 月 25 日）

## アウトリーチ活動

小林 悟、林良樹

愛知県立岡崎北高等学校 コスモサイエンスツアー「Tsukuba Science Tour」での講義および見学

TARA センター（7 月 25 日）

小林 悟

茨城県立竹園高等学校 筑波大学研究室体験学習での講義

TARA センター（7 月 26 日）



小林悟、林誠

愛知県立岡崎高等学校 SSH 特別課外活動 研究施設・企業訪問研修での講義および見学  
TARA センター（8 月 24 日）

小林悟

茨城県立竹園高等学校 先端科学講座「動物における生殖細胞形成メカニズム」講師  
竹園高校（12 月 5 日）

### 学会および社会的活動

小林悟

愛知県立時習館高等学校 SSH 評価委員

愛知県立岡崎高等学校 SSH 運営指導委員

公益財団法人大隅基礎科学創成財団 理事

自然科学研究機構 生命創成探求センター 運営委員会委員

林良樹

日本発生生物学会 男女共同参画・キャリア支援委員

科学技術・学術政策研究所 科学技術同行研究センター専門調査委員

生化学誌 企画協力委員

### 科学研究費補助金・外部資金獲得状況

小林悟

研究種目名：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究課題名：生殖細胞発生過程における選択機構の解明

課題番号：18H05552

研究期間：2018 年度～2022 年度

林良樹

研究種目名：基盤研究（C）

研究課題名：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ゾンの抑制機構の解明

課題番号：18K06240

研究期間：2018 年度～2020 年度

林誠

研究種目名：基盤研究（C）

研究課題名：母性 Ovo タンパク質によって制御される生殖細胞形成機構の解析

課題番号：18K06308

研究期間：2018 年度～2020 年度

太田龍馬

研究種目名：若手研究

研究課題名：ショウジョウバエ生殖系列における遺伝子量補償の欠如による自律的な性決定機構の解明

課題番号：18K14739

研究期間：2018 年度～2020 年度

島田裕子

研究種目名：基盤研究（C）

研究課題名：内部寄生蜂が宿主ショウジョウバエ幼虫に誘導する組織特異的細胞死シグナル経路の解析

課題番号：18K05670

研究期間：2018 年度～2020 年度