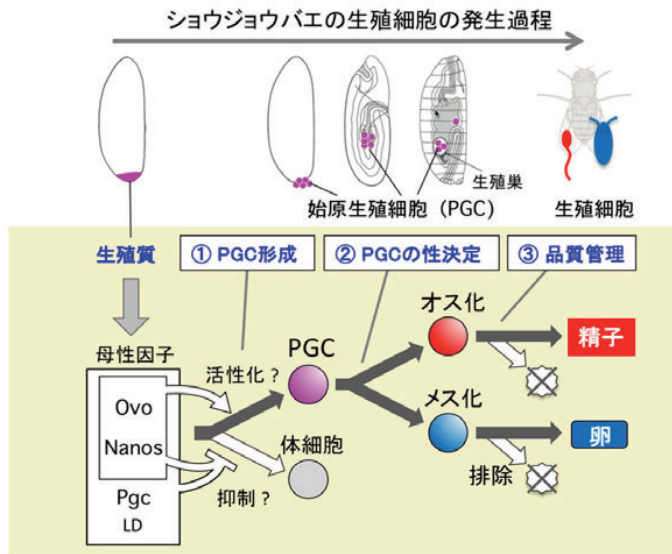


生殖ダイナミクス

「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



2019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

香山 瑞生

三浦 博樹

生物学類

海野 太一

古賀 結花

萩久保 朝香

増川 柁樹

ARE

小園 康広

技術補佐員

松川 洋美

渡邊 満美子

研究概要

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ませると、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、体細胞分化を抑制する母性因子として Nanos タンパク質と Polar granule component(Pgc) ペプチドが同定されている。一方、始原生殖細胞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を中心として、始原生殖細胞の発生運命決定機構を明らかにすることを試みている。

【体細胞性遺伝子の発現を抑制する機構】

体細胞性遺伝子の発現抑制に関わる母性因子として、Nanos タンパク質と Pgc ペプチドが知られている。Pgc は、初期胚の始原生殖細胞で一過的に RNA polymerase II 依存的な転写を抑制することで、体細胞性遺伝子の転写を低く抑えている。一方、Nanos は、転写因子の核移行に関わる Importin α -2 の産生を翻訳レベルで抑制することで、体細胞性遺伝子の転写を抑えている。しかし、これら2つの母性因子による体細胞性遺伝子の発現抑制機構を解除した場合に、始原生殖細胞にどのような変化が見られるのかは解析されていなかった。そこで本研究では、Nanos のターゲットである Importin α -2 タンパク質の過剰発現 (Imp α 2 OE) と同時に *pgc* の機能も欠失 (*pgc*-) させた胚 (*pgc*- / Imp α 2 OE) の始原生殖細胞にどのような形態学的変化が見られるのかを解析した。その結果、正常胚では、すべての始原生殖細胞が丸い形態を示すのに対し、*pgc*- / Imp α 2 OE 胚では始原生殖細胞が太い細胞突起を伸ばすことを見出した。この表現型は胚発生ステージ 5~6 という短い間でのみ観察された。また、この異常な形態を示す始原生殖細胞の割合は、Imp α 2 OE や *pgc*-胚と比較して、*pgc*- / Imp α 2 OE 胚で有意に高かった。この細胞突起を有する始原生殖細胞の形態は、休眠神経幹細胞の形態とよく類似している。以上の結果から、休眠神経幹細胞の形成に関わる体細胞性遺伝子が *pgc*- / Imp α 2 OE 胚の始原生殖細胞中で脱抑制されたのではないかと考えている。実際に、*pgc*- / Imp α 2 OE 胚の始原生殖細胞において、神経で発現する体細胞性遺伝子が脱抑制され、その機能阻害により、細胞突起を有する始原生殖細胞の割合が減少した。今後、*pgc*- / Imp α 2 OE 胚の始原生殖細胞の発生運命を解析する予定である。

【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お

り、始原生殖細胞で高発現する遺伝子群の転写活性化に機能することを見出していた。しかし、母性 Ovo タンパク質の機能を阻害した始原生殖細胞は発生過程で消失してしまうため、生殖細胞分化過程における母性 Ovo タンパク質の機能は明らかになっていない。そこで、マイクロアレイ解析により、母性 Ovo タンパク質が始原生殖細胞中で転写を活性化することが明らかになっている 401 遺伝子に着目して解析を行った。まず、*in situ* ハイブリダイゼーション法により後期胚の始原生殖細胞において高発現する遺伝子を 38 個同定した。次に、これらの遺伝子の機能を RNA 干渉法を用いて始原生殖細胞中でノックダウンしたところ、卵巣と精巣の退縮が観察される遺伝子を 8 遺伝子同定した。また、卵巣特異的に成熟卵の形成が阻害される遺伝子を 2 遺伝子同定した。これら 10 遺伝子は生殖系列の細胞の維持や、卵成熟に機能していることが示唆された。さらに、遺伝子の機能を阻害することにより次世代の孵化率が有意に低下する遺伝子を 9 遺伝子同定した。これら 9 遺伝子は、機能的な卵や精子の産生に機能していることが明らかになった。現在、これら遺伝子の機能解析を継続している。

【始原生殖細胞の性差形成機構】

ショウジョウバエは X 染色体が一本ならばオス、二本ならばメスとなる。ショウジョウバエ体細胞系列では、オス特異的に形成される、Male-Specific Lethal (MSL) と呼ばれる複合体が、ヒストン H4K16 のアセチル化を行うことで、X 染色体遺伝子の発現が倍加され、オス/メス間における X 染色体遺伝子の発現の性差が補償される。この現象を、遺伝子量補償と呼ぶ。本研究では、この遺伝子量補償の機構が始原生殖細胞において欠如していることを初めて示すことができた。これまでの研究から、ショウジョウバエ始原生殖細胞は、X 染色体の数に依存して性が決定されると考えられてきたが、未だその機構は不明である。上記解析から明らかとなった、始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如は、オスとメスの始原生殖細胞間における X 染色体遺伝子の発現の性差を生み出すことから、これにより生殖系列の性が決定されるのではないかと考えた。この点を明らかにするため、XY 型のオス始原生殖細胞に遺伝子量補償を付与し、X 染色体遺伝子の発現を倍加させた XY 型のオス始原生殖細胞が、メス化するのかを明らかにする研究を現在行っている。

【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。これまでの研究から、DNA 型のトランスポゾンである P 因子の転移が起きた生殖系列は、発生過程においてその細胞数が著しく減少することが知られていた。本研究では、1) P 因子の転移を起こした生殖系列において Myc タンパク質の発現が低下すること、2) Myc をノックダウンした生殖系列は、P 因子の転移が起きた場合と同様に細胞数が減少すること、3) P 因子

の転移による細胞数の減少は、生殖系列における *Myc* の強制発現によりレスキューされることを見出した。さらに、*Myc* 強制発現のレスキューにより形成された配偶子では、P 因子の転移を起こした個体の配偶子に比べ、変異率が上昇することもわかった。以上の結果から、P 因子の転移が起きた生殖系列では、*Myc* の発現が低下し、それによりゲノム DNA に損傷を有する生殖系列が排除されることが強く示唆される（2020 年度論文発表）。

【生殖系列の代謝的性質とその役割】

細胞内代謝は全ての細胞が均一にもつ“ハウスキーピング”な役割を果たすと考えられてきた。一方、近年のがん細胞や哺乳類多能生幹細胞の研究を通じて、細胞内代謝は細胞種ごとに異なり、細胞固有の代謝状態が細胞の性質を左右し得るという知見が得られつつある。しかし、これまでの多くの研究は哺乳類培養細胞より得られた知見がもとになっており、生体内の各組織を構築する細胞の代謝状態およびその役割の多くは不明であった。そこでショウジョウバエ生殖系列をモデルとして、生殖系列が固有の代謝状態をもつかを検証した。生殖系列を対象としたメタボロミクスおよび遺伝子発現解析の結果、生殖系列の代謝的特徴の一つとして、S-アデノシルメチオニン（SAM）の低産生状態を見出した。SAM は細胞内の主要なメチル基供与体として知られる重要な代謝物質である。生殖系列における SAM の低産生状態の意義の解明を試みた結果、SAM の低産生状態はゲノム DNA のメチル化（N6mA 修飾）を低く保つことで、レトロトランスポゾンの発現を抑制することを見出した。この結果は、細胞内代謝の制御によりレトロトランスポゾンを抑制し、生殖系列のゲノム損傷を抑制するという、生殖系列の新規品質保持機構の一端を明らかにしたものであると考える。現在、他の代謝経路の働きも含め、SAM の低産生状態の意義をさらに深く研究している。

【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 SE0 や性腺刺激ホルモン放出ホルモン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、個体の発育段階によって変化す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。

2019 年度研究業績

原著論文 (全て査読あり)

- M. Asaoka, K. Hanyu-Nakamura, A. Nakamura, and S. Kobayashi (2019)
Maternal Nanos inhibits Importin- α 2/Pendulin-dependent nuclear import to prevent somatic gene expression in the *Drosophila* germline. *PLoS Genetics*, 15, e1008090.
- M. Kutsukake, M. Moriyama, S. Shigenobu, X-Y Meng, N. Nikoh, C. Noda, S. Kobayashi, and T. Fukatsu (2019)
Exaggeration and co-option of innate immunity for social defence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 116, 8950-8959.
- S. Nakamura, S. Hira, M. Fujiwara, N. Miyagata, T. Tsuji, A. Kondo, H. Kimura, Y. Shinozuka, M. Hayashi, S. Kobayashi, and M. Mukai (2019)
A truncated form of a transcription factor Mamo activates vasa in *Drosophila* embryos. *Communications biology*, 2: 422.
- K. Ichida, W. Kawamura, M. Miwa, Y. Iwasaki, T. Kubokawa, M. Hayashi, R. Yazawa, and G. Yoshizaki (2019)
Specific visualization of live type A spermatogonia of Pacific bluefin tuna using fluorescent dye-conjugated antibodies. *Biology of Reproduction*, 100, 1637-1647.
- M. Hayashi, K. Ichida, S. Sadaie, M. Miwa, R. Fujihara, Y. Nagasaka, and G. Yoshizaki (2019)
Establishment of novel monoclonal antibodies for identification of type A spermatogonia in teleosts. *Biology of Reproduction*, 101, 478-491.
- K. Ichida, M. Hayashi, M. Miwa, R. Kitada, M. Takahashi, R. Fujihara, S. Boonanuntanasarn, and G. Yoshizaki (2019)
Enrichment of transplantable germ cells in salmonids using a novel monoclonal antibody by magnetic-activated cell sorting. *Mol. Reprod. Dev.*, 86, 1810-1821.
- S. Morita, R. Ota, M. Hayashi and S. Kobayash (2020)
Repression of G1/S transition by transient inhibition of miR-10404 expression in *Drosophila* primordial germ cells. *iScience*, 23, 100950.
- W. Kang, Y. Harada, K. Yamatoya, N. Kawano, S. Kanai, Y. Miyamoto, A. Nakamura, M. Miyado, Y. Hayashi, Y. Kuroki, H. Saito, A. Umezawa, K. Miyado (2020)

Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent dysfunction. *Lab. Invest.*, 100, 583-595.

総説

Y. Hayashi, Y. Yoshinari, S. Kobayashi, R. Niwa (2020)
The regulation of *Drosophila* ovarian stem cell niches by signaling crosstalk.
Current Opinion in Insect Science, 37, 23-29.

学会発表等（国際学会*、招待講演**）

** 小林悟

“ショウジョウバエ遺伝学に関する講演”

静岡大学附属浜松中学校（浜松）2019年6月

** 太田龍馬、小林悟（演者）

“ショウジョウバエ生殖系列の品質管理機構”

遺伝学会・新学術「配偶子インテグリティ」共催シンポ：「個体を潜り抜けるための遺伝戦略」

日本遺伝学会第91回大会（福井）2019年9月

浅岡美穂、香山瑞生、羽生-中村賀津子、中村輝、小林悟

“ショウジョウバエ始原生殖細胞における Nanos と Pgc タンパク質による体細胞性遺伝子抑制機構”

日本動物学会第90回大阪大会（大阪）2019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90回大阪大会（大阪）2019年9月

太田龍馬、小林悟

“ショウジョウバエにおける Myc を介した生殖系列の品質管理機構”

日本動物学会第90回大阪大会（大阪）2019年9月

林良樹、小林悟

“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”

日本動物学会第90回大阪大会（大阪）2019年9月

中村翔一、近藤茜、平誠司、小林悟、小島麻琴、鈴木みのり、政所重智、向正則

“ショウジョウバエ生殖細胞性遺伝子 *vasa* 遺伝子の異所的発現が体細胞に与える影響”

日本動物学会第90回大阪大会（大阪）2019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90回大阪大会（大阪）2019年9月

* Makoto Hayashi, Yoshiko Iwasaki, Tetsutaro Hayashi, Masashi Ebisawa, Yohei Sasagawa, Mika Yoshimura, Kensuke Ichida, Itoshi Nikaido, Goro Yoshizaki

“Identification of the molecular markers preferentially expressed in spermatogonial stem cells in fish.”

Marine Biotechnology Conference 2019 (Shizuoka, JAPAN) 2019年9月

* Kensuke Ichida, Makoto Hayashi, Surintorn Boonanuntanasarn, Goro Yoshizaki

“Specific visualization of type A spermatogonia using a fluorescence-conjugated antibody in *Salmo* species.”

Marine Biotechnology Conference 2019 (Shizuoka, JAPAN) 2019年9月

* Yoshiki Hayashi, Arisa Sugiyama, Keisuke Kamimura, Satoru Kobayashi

“The role of heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila* germline stem cell niche”

Proteoglycans 2019 – New frontiers in the biology of proteoglycan research (Kanazawa, JAPAN)
2019年9月

** 林良樹

“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”

首都大学東京・教室セミナー（八王子）2019年9月

** 小林悟

“ショウジョウバエの生殖細胞の発生を制御する遺伝子群”

山口県高等学校教育研究会生物教育研究大会（下松）2019年10月

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

“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”

第13回メタボロームシンポジウム（つくば）2019年10月

浅岡美穂、酒巻由梨奈、福元達也、田中大介、小林悟
“ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術”

Cryopreservation Conference 2019（つくば）2019年11月

林良樹

“始原生殖細胞の発生過程における細胞内代謝の役割”

第3回がんと代謝研究会・若手の会（熊本）2019年11月

林良樹、日野信次朗、櫻尾宗志朗、齋藤都暁、三浦正幸、中尾光善、小林悟

“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ゾンの抑制”

第42回日本分子生物学会年会（福岡）2019年12月

林良樹（シンポジウム選定演者）

“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ゾンの抑制”

第42回日本分子生物学会年会（福岡）2019年12月

中村翔一、近藤茜、平誠司、小林悟、小島真琴、鈴木みのり、政所重智、向正則

“ショウジョウバエ生殖細胞生遺伝子 *vasa* 遺伝子の異所的発現が体細胞に与える影響” 第42回日本分子生物学会年会（福岡）2019年12月

＊＊小林悟

“ショウジョウバエの生殖細胞形成機構と生殖細胞の利用”

農学生命科学部研究推進セミナー 弘前大学（弘前）2019年12月

＊＊林良樹

“メタボロミクスから見え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”

九州大学理学研究院・生物科学部門セミナー（福岡）2019年12月

林良樹

“ショウジョウバエ生殖系列の発生過程における細胞内代謝の役割”

第7回メタボローム勉強会（鶴岡）2020年2月

海野太一、藤原亮、水谷波南香、吉崎悟朗、小林悟、林誠

“宿主生殖腺への高い生着能を有する精原細胞濃縮法の開発”

令和2年度日本水産学会春季大会（品川）2020年3月

受賞

小園康広

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20日）

小林悟

2019 Best Faculty Member 表彰

筑波大学（2月10日）

Yuko Shimada-Niwa

第36回 World Cultural Council (2019) Special Recognition

海野太一

筑波大学 生物学類長表彰（3月25日）

古賀結花

筑波大学 生物学類長表彰（3月25日）

アウトリーチ活動

小林悟、林良樹、林誠

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24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日および8月6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27日）

林良樹

“つくば市科学フェスティバル”における「生物広場」の企画・運営

つくばカピオ（11月16-17日）

学会および社会的活動

小林悟

茗溪学園中学校高等学校SSH運営指導委員

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 理事（キャリア支援担当）

科学技術・学術政策研究所 科学技術動向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

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

公益財団法人武田科学振興財団「ライフサイエンス研究助成」

研究課題名：「セロトニン生合成不全が個体発育と老化に与える影響の遺伝学的追究」

研究期間：2019年度～2022年度

科学技術振興機構 さきがけ「生体における微粒子の機能と制御」領域

研究課題名：「宿主内環境を支配する寄生蜂由来生体微粒子の機能解析」

研究期間：2019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

助成制度：TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」

課題名：抗老化製薬を目指した組織老化における S-アデノシルメチオニンの役割の解明

課題番号：TK19-023

研究期間：2019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