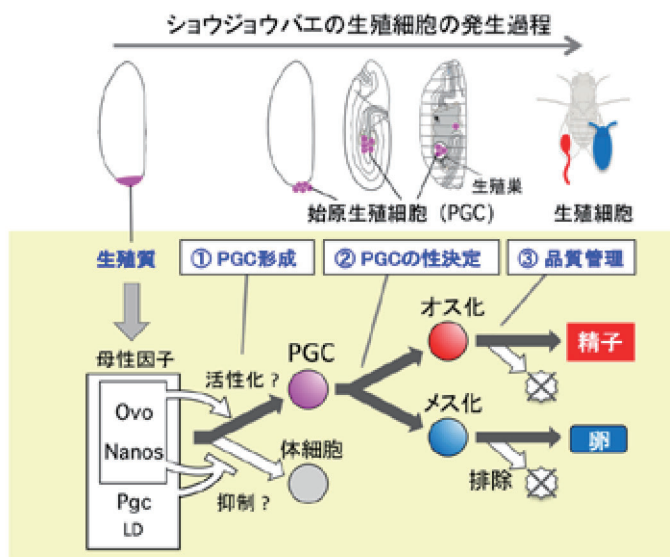


# 生殖ダイナミクス

## 「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



2020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

生物学学位プログラム

博士前期課程

萩久保 朝香

増川 柁樹

生物学類

木村 遼

小園 康広

技術補佐員

古江 衣美

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る。一方、Nanos は、転写因子の核移行に関わる Importin  $\alpha$ -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。Nanos のターゲットである Importin  $\alpha$ -2 タンパク質の過剰発現と同時に *pgc* の機能をも欠失させた胚 (*pgc*-/*Imp $\alpha$ 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ところ、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 $\alpha$ 2* OE 胚では始原生殖細胞が太い細胞突起を伸ばすことが明らかとなった。また、*pgc*-/*Imp $\alpha$ 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することも明らかになった。現在、*pgc*-/*Imp $\alpha$ 2* OE 胚の始原生殖細胞における遺伝子発現の変化、およびその始原生殖細胞の発生運命の解析を行っている。

### 【母性 Ovo タンパク質の解析】

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。そこで、生殖細胞の発生過程における母性 Ovo タンパク質の働きを明らかにするために、母性 Ovo タンパク質が転写を活性化する遺伝子についてデータベース上で調べたところ、レトロトランスポゾンの発現抑制に機能する遺伝子が enrich していることが明らかになった。そこで、生殖系列の細胞において母性 Ovo タンパク質の機能を阻害した個体でレトロトランスポゾンの発現を解析した。その結果、胚期の始原生殖細胞においてレトロトランスポゾンの発現に有意な変化はみ

られなかったが、成虫期の卵巣においてレトロトランスポゾンの発現に有意な上昇がみられた。さらに、成虫期の卵巣においてレトロトランスポゾンの発現抑制に機能する piRNA の発現量の低下がみられた。以上の結果より、母性 Ovo タンパク質は生殖系列の細胞において piRNA 産生を介してレトロトランスポゾンの発現を抑制することで、ゲノムの品質保持に機能していると考えられる。現在、母性因子として初期胚の生殖質に供給された母性 Ovo タンパク質が、時間的隔たりのある成虫期の卵巣においてレトロトランスポゾンの発現を抑制する機構について解析をすすめている。

### 【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し、論文発表した。

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、メス化することを明らかにする研究を現在行っている。

また、胚発生後期の始原生殖細胞では、メスと比べてオスの始原生殖細胞では、翻訳活性が高いことが明らかとなった（論文リバイス中）。この時期は、始原生殖細胞が性分化を開始する時期であり、この翻訳活性の差異が、始原生殖細胞の性決定に関わる遺伝子により制御されているのか、性分化に関わるか否かを明らかにする研究を進めている。

### 【生殖系列の品質管理機構】

トランスポゾンの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、トランスポゾンの一つである 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を強く示唆する結果が得られ、論文発表を行った。現在、これ以外にも生殖系列の品質管理機構が存在するか探索中である。

### 【始原生殖細胞の凍結保存法開発】

遺伝子の機能解析には、突然変異系統や強制発現系統などが不可欠である。多くのモデル生物では、これらの遺伝子改変系統は凍結保存により長期間維持されている。しかし、ショウジョウバエでは、系統を凍結保存する技術は確立されておらず、継代飼育のみによって維持され、自然突然変異の蓄積により遺伝型が変化するリスクにさらされている。そこで、始原生殖細胞を凍結保存し、融解後にホスト胚に移植して子孫を得ることで、系統を復活させる技術の開発を目指してきた。これまでに、液体窒素中で凍結したのち、すぐに融解した始原生殖細胞は、ホスト胚に移植後、生殖巣に移動し、子を産生する能力をもつことが明らかとなった。また、凍結・融解した始原生殖細胞の産子能力は、調べた限りにおいて、凍結保存期間や系統に依存しない。さらに、発生過程で始原生殖細胞が致死となる無配偶子系統をホストに用いることで、凍結・融解した始原生殖細胞由来の子をホスト始原生殖細胞由来の子から選別することなく、ドナー系統を復活させられることも明らかとなった（論文リバイス中）。

### 【生殖系列の代謝的性質とその役割】

近年のがん細胞や哺乳類多能性幹細胞の研究を通じて、細胞内代謝は“ハウスキーピング”な働きを超えて、核酸やタンパク質の働きを制御することで、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、この様な知見の多くの研究は哺乳類培養細胞より得られたものであり、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はメチル基供与体として働くことで核酸やタンパク質のメチル化修飾を制御することが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、配偶子形成過程におけるレトロトランスポゾンの発現を抑制すること、さらに配偶子形成過程の老化を抑制する働きがあることを見出した。これらの結果は、生殖系列におけるSAMの低産生状態が、レトロトランスポゾンの抑制を介して生殖系列のゲノム品質保持し、その老化を抑制することを強く示唆している。現在、他の代謝経路の働きも含め、生殖系列における細胞内代謝の意義の解明を試みている。

### 【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 SEO 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。

## 2020 年度研究業績

### 原著論文 (全て査読あり)

R. Ota, M. Hayashi, S. Morita, H. Miura and S. Kobayashi (2021)

Absence of X-chromosome dosage compensation in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. **Scientific Reports** 11, 4890.

R. Ota and S. Kobayashi (2020)

Myc plays an important role in *Drosophila* PM-hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage. **Communications Biology** 3, 185.

J. Kamiya, W. Kang, K. Yoshida, R. Takagi, S. Kanai, M. Hanai, A. Nakamura, M. Yamada, Y.

Miyamoto, M. Miyado, Y. Kuroki, Y. Hayashi, A. Umezawa, N. Kawano and K. Miyado (2020)

Suppression of non-random fertilization by MHC class I antigens. **Int. J. Mol. Sci.**, 21, 8731.

K. Ichida, Y. Matsushita, Y. Amano, M. Miwa, K. Nagasawa, M. Hayashi, H. Mizutani, M.

Takahashi, S. Boonanuntanasarn, G. Yoshizaki (2020)

Visualization and tracking of live type a spermatogonia using a fluorescence-conjugated antibody in Salmo species. **Aquaculture**, 533, 736096.

KH. Seong, T. Matsumura, Y. Shimada-Niwa, R. Niwa, S. Kang (2020)

The *Drosophila* Individual Activity Monitoring and Detection System (DIAMonDS)

**eLIFE** 9: e586630.

Y. Yoshinari, T. Ameku, S. Kondo, H. Tanimoto, T. Kuraishi, Y. Shimada-Niwa, R. Niwa (2020)

Neuronal octopamine signaling regulates mating-induced germline stem cell increase in female *Drosophila melanogaster*. **eLIFE** 9: e57101.

E. Imura, Y. Shimada-Niwa, T. Nishimura, S. Hückesfeld, P. Schlegel, Y. Ohhara, S. Kondo, H.

Tanimoto, A. Cardona, M. J Pankratz, R. Niwa (2020)

The Corazonin-PTTH Neuronal Axis Controls Systemic Body Growth by Regulating Basal Ecdysteroid Biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. **Current biology** 30, 2156.

K. Koiwai, K. Inaba, K. Morohashi, S. Enya, R. Arai, H. Kojima, T. Okabe, Y. Fujikawa, H. Inoue, R.

Yoshino, T. Hirokawa, K. Kato, K. Fukuzawa, Y. Shimada-Niwa, A. Nakamura, F. Yumoto, T. Senda,

R. Niwa (2020)



An integrated approach to unravel a crucial structural property required for the function of the insect steroidogenic Halloween protein Noppera-bo

*Journal of Biological Chemistry* 295(20) 7154.

#### 学会発表等（国際学会＊、招待講演＊＊）

古賀結花、林誠、小林悟

“ショウジョウバエ生殖細胞形成過程における母性 Ovo タンパク質下流遺伝子の解析”

第 91 回日本動物学会大会 E-62 online 2020 年 9 月

太田龍馬、林誠、森田俊平、小林悟

“ショウジョウバエ生殖系列における X 染色体の数に依存した自律的な性決定機構”

第 91 回日本動物学会大会 E-64 online 2020 年 9 月

浅岡美穂、西村香里、酒巻由梨奈、福元達也、田中大介、高野敏行、小林悟

“ショウジョウバエ系統の凍結保存技術の実用化に向けて”

Cryopreservation Conference 2020 online 2020 年 11 月

村上優介、宮崎慎一、林悠、林良樹、白木賢太郎、加納英明

“生体組織内液-液相分離のラベルフリー非線形光学イメージング”

第 6 回超高速エレクトロニクス研究会（オンライン）2021 年 2 月 22 日

島田裕子、上山拓己、田中裕之、豊田敦、伊藤武彦、丹羽隆介（演者）

“ショウジョウバエを宿主とする内部寄生蜂 *Asobara japonica* のゲノム解析”

日本応用動物昆虫学会 第 65 回大会 online 2021 年 3 月

#### 受賞

小園康広 学類長表彰

#### アウトリーチ活動

小林悟

愛知県立岡崎北高等学校 特別課外活動の講義

“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” online（8 月 20 日）

林良樹

“つくば市科学フェスティバル” 代替オンラインイベントに対する動画の作成・提供  
online (2021年1月)

### 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

熊本大学発生医学研究所運営委員会「業績評価委員会」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

研究種目名：AMED ナショナルバイオリソースプロジェクト基盤技術整備プログラム

研究課題名：ショウジョウバエ凍結保存技術の高度化と検証

課題番号：AQD02322

研究期間：2020年度～2021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～2021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～2021年度