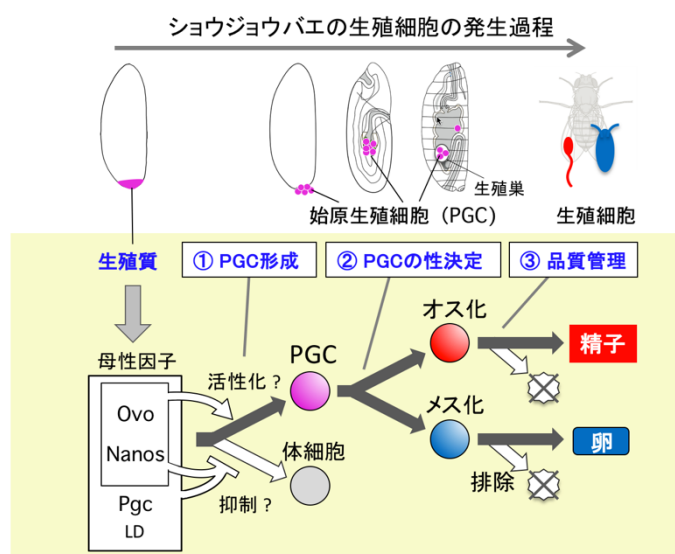


生殖ダイナミクス

「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、生殖系列の品質管理機構や性の決定・分化機構につい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 and germline sex determination.



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



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

生命地球科学研究群

生物学学位プログラム

博士後期課程

増川 柁樹

小園 康広

博士前期課程

石橋 楓

佐藤 隆奈

三上 恭平

技術補佐員

渡邊 満美子

秘書

古江 衣美

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的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** と **Polar granule component (Pgc)** タンパク質が同定されている。また、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ている。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。また、生殖系列の品質管理機構や性の決定・分化機構についても研究を展開している。

【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** と **Pgc** タンパク質が知られている。**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 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。これらタンパク質は、生殖質の取り込み量が少ない始原生殖細胞中において、体細胞性遺伝子の発現を強固に抑制している。このような始原生殖細胞において、**Nanos** と **Pgc** による体細胞性遺伝子の発現抑制が解除されると、始原生殖細胞は細胞突起を形成し、体細胞層へと進入する。すなわち、**Nanos** と **Pgc** は、体細胞性遺伝子の発現を抑制することで、始原生殖細胞と体細胞の物理的な分離を促していると考えられる。

セリン・スレオニン・キナーゼである母性 **Tao1** タンパク質をコードする *tao1* mRNA は、生殖質に局在するが、胚後極に始原生殖細胞を形成する過程には関わらない。しかし、この RNA を胚の前極に人為的に局在させると、そこに始原生殖細胞と形態的によく似た細胞（PGC 様細胞）が形成される。PGC 様細胞は、生殖質のコンポーネントを含まず、前極の体細胞と同じ性質を持つ。PGC 様細胞に、体細胞性遺伝子の抑制に関わる **Nanos**、**Pgc** タンパク質をコードする mRNA を供給すると、この細胞がどのような発生運命を辿るのかについて解析を行なっている。

【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であり、始原生殖細胞で高発現する遺伝子群の転写活性化に関与する。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** タンパク質が胚期の始原生殖

細胞中で転写を活性化する遺伝子（母性 **Ovo** 下流遺伝子）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関与する遺伝子が **enrich** していた。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すると、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、母性 **Ovo** 下流遺伝子の機能を胚期において特異的に阻害した場合においても、成虫期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。以上の結果より、母性 **Ovo** タンパク質は、胚期から生殖系列中でレトロトランスポゾンの発現を抑える遺伝子群を活性化することで、レトロトランスポゾンの発現を抑制していることが明らかになった。すなわち、母性 **Ovo** タンパク質は、生殖系列のゲノムの品質保持に関わると考えられる。

【**Ovo** タンパク質下流遺伝子の同定】

Ovo タンパク質は、ショウジョウバエにおいて生殖系列特異的に発現する転写因子であり、卵形成の進行に関与することが知られている。これまでの研究から、卵形成過程において、**Ovo** タンパク質は *ovo* と *ovarian tumor (otu)* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を活性化させることが明らかになっている。しかし、卵形成過程において、**Ovo** タンパク質が発現を直接制御する遺伝子の全容は明らかになっていない。そこで、本研究ではまず、卵巣の生殖幹細胞において、**Ovo** タンパク質が転写を制御する遺伝子を明らかにすることを目的として、CUT&RUN (Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease) を用いた解析を行った。その結果、**Ovo** タンパク質下流遺伝子の候補として、398 遺伝子が同定された。これらの遺伝子中には、卵形成に機能する遺伝子が濃縮されていたことから、この研究は生殖系列における **Ovo** タンパク質の役割を明らかにするための重要な知見となることが期待される。

【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。これまでの研究から、ショウジョウバエの始原生殖細胞は、X染色体の数と体細胞の性に依存して、性が決定し、その決定した性に従って卵や精子に分化する。しかし、始原生殖細胞の性決定・分化機構の全貌は不明である。私たちは、メスと比べてオスの始原生殖細胞において翻訳活性が高いことを見出した。翻訳活性に性差が見られる時期は、始原生殖細胞が性分化を開始する時期と重なることから、翻訳活性の性差が、始原生殖細胞の性分化に関与と考えている。また、現在、翻訳活性の性差が、始原生殖細胞の性決定に関与する遺伝子により制御されていることを示唆する結果も得られている。現在、この翻訳活性の性差の役割を明らかにする研

究を進めている。

【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、細胞の性質を左右するという知見が得られつつある。しかし、このよう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、配偶子形成過程の老化を抑制する働きがあることを見出した。さらに、哺乳類の生殖組織および脳組織においても、加齢に伴う SAM 含有量の増加が引き起こされることを明らかにした。これらの結果は、生殖系列における SAM の低産生が、配偶子形成過程の老化を抑制する働きがあること、SAM が動物種・組織種を超えた組織老化の要因であ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、様々なホルモンの働きによって生殖器が発達することが知られている。特に、卵巣や精巣でステロイドホルモン生合成が促進されるためには、栄養環境に応じて脳からホルモンが分泌されることが必須である。しかし、栄養環境に応じたステロイドホルモン生合成の調節機構には不明な点が多く残されている。

本研究では、幼虫が、成熟に必要最低限の栄養を獲得した後に飢餓に曝されることによって、成熟（蛹化）のタイミングが早まる現象に着目し、その分子機構の解明を目指している。興味深いことに、飢餓シグナルによって、ステロイドホルモンを活性型分子に変換する酵素遺伝子 *shade*、ならびにステロイドホルモンに応答するシグナル伝達経路の遺伝子群の発現が顕著に増加することを見出した。さらに、脂肪組織で発現するインスリン様分子 *Dilp6* も関与することが示唆された。一連の実験結果から、飢餓シグナルは、ホルモン生合成器官に作用するのではなく、ホルモンを受容する末梢の脂肪組織の感受性を高めることによって、成熟を加速させること示唆された。このように、本研究では、個体の成長から成熟への変遷が、栄養環境によって柔軟に変化する分子機構によって支えられていることがわかりつつ

ある。

2023 年度研究業績

原著論文（全て査読あり）

R. Ota, H. Miura, M. Masukawa, M. Hayashi and S. Kobayashi (2023)

Identification of novel candidate genes leading to sex differentiation in primordial germ cells of *Drosophila*. *Gene Expression Patterns*, 48, 119321. doi: 10.1016/j.gep.2023.119321

C. Nishimiya-Fujisawa, H. Petersen, T. CT. Koubková-Yu, C. Noda, S. Shigenobu, J. Bageritz, T. Fujisawa, O. Simakov, S. Kobayashi, T. W. Holstein (2023)

An ancient split of germline and somatic stem cell lineages in Hydra.

bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.07.04.546637>.

M. Sato, R. Ota, S. Kobayashi, K. Yamakawa-Kobayashi, T. Miura, A. Ido and Y. Ohhara (2023) Bioproduction of n-3 polyunsaturated fatty acids by nematode fatty acid desaturases and elongase in *Drosophila melanogaster*. *Transgenic Research*, 32, 411-421. doi: 10.1007/s11248-023-00363-9

K. Nishimura, M. Asaoka, Y. Sakamaki, T. Fukumoto, D. Tanaka, S. Kobayashi, T. Takano-Shimizu-Kouno (2023)

Primordial germ cell cryopreservation and revival of *Drosophila* strains. *Journal of Visualized Experiments*, doi: 10.3791/65985.

総説

田中大介、小林悟、松村和明（2023）

超低温保存技術の向上を目指す、*細胞*、55、1036-1038.

学会発表等

林誠、八幡志央美、海野太一、藤原亮、小林悟、吉崎悟朗、八幡穰

自家蛍光シグナルを利用した精原細胞のラベルフリー分取法、第 23 回マリンバイオテクノロジー学会大会、金沢、2023 年 5 月

島田裕子

寄生蜂ニホンアソバラコマユバチの生存戦略の解明に向けたマルチオミクス解析、創基 151 年筑波大学開学 50 周年記念 TARA シンポジウム、筑波大学、2023 年 6 月

Miho Asaoka, Mizuki Kayama, Tomoki Kawagoe, Makoto Hayashi, Satoru Kobayashi
“Repression of somatic gene expression in primordial germ cells is required to maintain germline/soma separation in *Drosophila*”, The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 仙台、2023 年 7 月

西村香里、浅岡美穂、小林悟、高野敏行
ショウジョウバエにおける生殖系列と体細胞系列の分離機構、日本遺伝学会 第 95 回大会、熊本、2023 年 9 月

太田龍馬、前田隼佑、印南花奈、金沢幹太、村田悠太、脇田峻太郎、林誠、小林悟
ショウジョウバエ始原生殖細胞における新規メス化遺伝子の同定、第 94 回日本動物学会大会、山形、2023 年 9 月

浅岡美穂、香山瑞生、川越智貴、林誠、小林悟
始原生殖細胞における体細胞性遺伝子発現の抑制は生殖系列と体細胞の分離の維持に必要である、第 94 回日本動物学会大会、山形、2023 年 9 月

島田裕子、上山拓己、森一葉、丹羽隆介
寄生蜂ニホンアソバラコマユバチの毒腺遺伝子の同定と作用機序の追究、
第 69 回トキシシンポジウム、京都産業大学、2023 年 9 月

(招待講演) 小林悟
始原生殖細胞凍結によるショウジョウバエ系統の保存、Cryopreservation Conference 2023、
つくば研究交流センター、2023 年 11 月

林良樹、木村遼、影山りお、小林悟
ショウジョウバエ生殖系列の代謝的特徴とその役割、第 96 回日本生化学会、福岡国際
会議場、2023 年 11 月

小園康広、浅岡美穂、林誠、小林悟
キイロショウジョウバエ初期胚において始原生殖細胞と体細胞間の母性 mRNA 含有量
の差異を生み出す機構の解析、第 46 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、
2023 年 12 月

三上恭平、増川柁樹、小林悟
ショウジョウバエ始原生殖細胞集団において一部の細胞は piRNA machinery の機能が低

下している、第 46 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2023 年 12 月

林良樹、木村遼、影山りお、小林悟

ショウジョウバエ生殖系列の代謝的特徴とその役割、第 46 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2023 年 12 月

Qingyin Qian, Makoto Hayashi, Ken-ichi Kimura, Hiromi Yanagisawa, Ryusuke Niwa

“Maintaining differentiated cell identify during aging – insights from *Drosophila* enteroendocrine cells”

第 45 回日本分子生物学会年会、神戸、2023 年 12 月

増川 柁樹、小林 悟

ショウジョウバエ始原生殖細胞において翻訳活性の性差を形成する遺伝子の同定、第 46 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2023 年 12 月

印南花奈、前田隼佑、金沢幹太、村田悠太、脇田峻太郎、林誠、小林悟、太田龍馬

始原生殖細胞のメス化に関わる *CG1677* の同定とその役割、日本動物学会関東支部大会、2024 年 3 月

津田真咲、林誠、三輪美砂子、藤原亮、守谷奈津子、吉崎悟朗

濾胞刺激ホルモン受容体をノックアウトしたニジマスは雌雄ともに不妊になる、令和 6 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学、2024 年 3 月

アウトリーチ活動

小林悟

愛知県立岡崎高等学校 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” (2023 年 8 月)

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” (2024 年 3 月)

島田裕子

JT 生命誌研究館、生命誌レクチャー

“寄生蜂の宿主乗っ取り大作戦” (2023 年 2 月)

林 誠、島田裕子
和歌山県立向陽高等学校
SSH サイエンスツアー模擬授業（研究体験）講師
2023 年 7 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
財団法人大隅基礎科学創成財団 理事
読売新聞 全日本科学教育振興委員会委員・日本学生科学賞中央審査員

科学研究費補助金・外部資金獲得状況

島田裕子
研究種目名：基盤研究（C）
研究課題名：成長から成熟への変遷を司るコラゾニン神経の上流探索と機能解析
課題番号：21K06197
研究期間：2021 年度～2023 年度

公益財団法人 大隅基礎科学創成財団 第 6 回研究助成
研究課題名：寄生蜂の生存戦略を支える分子機構の解明
研究期間：2022 年度～2024 年度

科学技術振興機構 創発的研究支援事業
研究課題名：寄生蜂毒研究に基づく上皮選択的な細胞死誘導の解明
研究期間：2023 年度～2025 年度

林良樹
研究種目名：基盤研究（C）
研究課題名：始原生殖細胞の未分化性維持における解糖系の役割の解明
課題番号：23K05777
研究期間：2023 年度～2026 年度

林誠

研究種目名：挑戦的研究（萌芽）

研究課題名：光スイッチを用いた次世代型不妊魚作出法の開発

課題番号：21K19133

研究期間：2021 年度～2023 年度

研究種目名：基盤研究（B）

研究課題名：未成熟期生殖腺の発達段階に着目した次世代型魚類人為催熟法の開発

課題番号：23H02304

研究期間：2023 年度～2026 年度

研究種目名：基盤研究（A） 分担

研究課題名：魚類生殖幹細胞の予見的同定：魚類生殖細胞操作技術の高効率化を目指して

課題番号：23H00344

研究期間：2023 年度～2026 年度

浅岡美穂

研究種目名：基盤研究（C）

研究課題名：ショウジョウバエ生殖幹細胞の形成に関わる新規間質細胞の機能解析

課題番号：23K05778

研究期間：2023 年度～2026 年度