

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 2 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370027

研究課題名（和文）ショウジョウバエ生殖細胞系列の運命決定機構および性差形成機構

研究課題名（英文）Mechanisms regulating developmental fate and sex differences of the germline in *Drosophila* embryos

研究代表者

小林 悟（KOBAYASHI SATORU）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90225508

研究成果の概要（和文）：

本研究は、生殖細胞系列の発生運命決定機構、および生殖細胞系列の性決定機構をショウジョウバエにおいて解明することを目的とする。これまで、個体の性を決める遺伝子はいくつかの動物で明らかになっているが、生殖細胞の中で働いて卵になるか精子になるかを決定する遺伝子はこれまで不明であった。本研究の特筆すべき成果として、生殖細胞のメス化の鍵を握る遺伝子を同定することに成功した。これにより、動物における生殖細胞の性決定機構の新たな研究の扉を開くことができる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have been trying to clarify the mechanisms regulating developmental fate and sex differences of the germ cells in *Drosophila*. What has remained a fascinating puzzle is how the germ cell decides its own sex. Here, we show that a single gene (*Sxl*) can initiate female sexual development in the primordial germ cells (PGCs). Our findings pave the way for future work that will help to establish the extent to which sex determination mechanism is conserved in germ cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：生殖細胞，性決定，運命決定

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系列は、体細胞系列とは異なり、生殖細胞（配偶子）に分化し、次代の生命を生み出すことができる特殊な能力を持つ。し

かし、生殖細胞系列が、このような発生運命を獲得する機構については十分に明らかになっていなかった。また、有性生殖を行なう動物群において、生殖細胞系列は性差を有し、卵あるいは精子といった異なる形態および

機能を持つ配偶子に分化するようにプログラムされる。この生殖細胞系列の性差がどのように生み出されるのかという点に関して、未だ十分な解明が成されていなかった。そこで、本研究では、ショウジョウバエを材料とし、生殖細胞系列の発生において重要なこれら2つの問題を解明することを目指す。この目的のために、これまでに当研究室で得られた独創的な成果を基盤として、研究1：生殖細胞系列の発生運命決定機構、研究2：生殖細胞系列の性差形成機構に関する研究を展開する。これらの研究により、ショウジョウバエの生殖細胞形成機構の新たな研究分野の基盤が形成されると期待される。

2. 研究の目的

研究1

ショウジョウバエの胚の後端部には極細胞質と呼ばれる特殊な細胞質が局在し、これを取り込む極細胞（始原生殖細胞）からのみ生殖細胞系列が生み出される。極細胞質には、始原生殖細胞の発生を制御するのに十分な分子（母性因子）が含まれていることが明らかとなっている。これまでに、始原生殖細胞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いる母性 Nanos タンパク質は、始原生殖細胞中において、始原生殖細胞の体細胞分化を抑制することが明らかとなっている。Nanos は、翻訳抑制因子であり、体細胞分化に関わる遺伝子発現を翻訳レベルで抑制することで、始原生殖細胞の体細胞分化を阻害していると考えられる。しかし、生殖細胞系列特異的な遺伝子を活性化し、始原生殖細胞を卵や精子に分化するように運命づける働きを持つ母性因子は明らかになっていなかった。私たちは、生殖細胞系列のマーカー遺伝子として知られる *vasa* の活性化に関わる母性因子として *Ovo* 転写因子を同定した。そこで、研究1では、母性 Nanos による体細胞分化抑制機構とともに母性 Ovo による生殖細胞系列分化促進機構を解明することを目的とする。

研究2

多くの動物において、生殖細胞系列の性は、体細胞の性に依存して決定されると考えられてきた。ショウジョウバエでは、雄の生殖巣を構成する体細胞からの雄化誘導シグナル分

子[JAK/STAT シグナル伝達経路のリガンド：Unpaired (Upd) タンパク質]により始原生殖細胞が雄化することが報告されている。しかし、始原生殖細胞の性は、雄化シグナルによる非自律的な機構だけでなく、始原生殖細胞自律的な機構によっても制御されていることを示唆する結果も得られていた。私たちは、これまでに、生殖巣に取り込まれる前の始原生殖細胞中にも性差が存在すること、この性差の形成に雌の始原生殖細胞で一過的に発現する *Sex lethal (Sxl)* 遺伝子が関与することを示唆する結果を得た。そこで、研究2では、生殖細胞系列の性決定における *Sxl* の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究 1-1:母性 Ovo の機能解析

- ①始原生殖細胞のみでドミナントネガティブ型の *Ovo* タンパク質を Gal4/UAS システムにより発現させ、どの発生段階で生殖細胞系列が失われるのかを明らかにする。
- ②ドミナントネガティブ型の *Ovo* タンパク質を発現させた始原生殖細胞のみをセルソーターで単離し、正常の始原生殖細胞とマイクロアレイを用いて比較することにより、*Ovo* により活性化される遺伝子を同定する。

(2) 研究 1-2 : 母性 Nanos の機能解析

- ① *Nanos* は、体細胞分化に関わる遺伝子発現を翻訳レベルで抑制することで、始原生殖細胞の体細胞分化を阻害していると考えられるが、このようなターゲット RNA は同定されていない。そこで、このようなターゲットを同定し、機能解析を行なうことで、*Nanos* による体細胞分化抑制機構を明らかにすることを以下のように試みる。これまでに、*Nanos* のコファクターである *Pumilio* タンパク質と結合する RNA 配列が同定され、この配列を持つ RNA が明らかとなっている。そこで、私たちは、これらの RNA から始原生殖細胞で発現するものを 44 種類選択し、それらのタンパク質コード領域に GFP タグを挿入したのち始原生殖細胞中で発現させ、*Nanos* 依存的に翻訳抑制されるものをスクリーンし、*Nanos* 依存的に翻訳抑制される RNA を同定する。

(3) 研究 2 : 生殖系列の性決定における *Sxl* の役割

- ① *Sxl* が始原生殖細胞の性差形成のマスター遺伝子であることを明らかにする。これまでに、雌の生殖細胞系列で *Sxl* の機能を突然変異により失わせると、生殖細胞系列の雄化が引き起こされることが明らかとなっている。そこで、雄の始原生殖細胞において強制的に *Sxl* を活性化した場合に雌化するかを調べる。具体的には、雌個体（生殖巣からの雄化シグナルを欠いている）に移植された雄の始原生殖細胞は精子形成過程に入るが、この雄始原生殖細胞中で *Sxl* を強制発現することで卵形成が誘導されるかを調べる。
- ② 始原生殖細胞における *Sxl* の発現活性化機構を明らかにする。始原生殖細胞中においても、体細胞と同様に X 染色体の数に依存して発現が制御されていると考えられる。そこで、X 染色体にコードされる上記転写因子の働きが *Sxl* の活性化に必須かどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) 研究 1-1 : 母性 *Ovo* の機能解析

- ① 母性 *Ovo* タンパク質は、特定の DNA 配列に結合し転写を活性化する転写因子として知られている。この機能を特異的に阻害することのできるリプレッサー（ドミナントネガティブ型の *Ovo* タンパク質）を始原生殖細胞特異的に発現させることにより母性 *Ovo* の機能阻害をおこなった結果、幼虫期から始原生殖細胞は徐々に退化し、最終的に生殖細胞が失われる不妊の表現型が観察された。これまでの知見を総合すると、母性 *Ovo* タンパク質は始原生殖細胞内で遺伝子発現を活性化することにより、生殖細胞への発生を制御する重要な母性因子であることが強く示唆される。
- ② 母性 *Ovo* により活性化される遺伝子を網羅的に同定する研究は現在進行中である。現在までに、マイクロアレイに供するドミナントネガティブ型の *Ovo* タンパク質を発現させた始原生殖細胞をセルソーターで大量に単離することに成功した。

(2) 研究 1-2 : 母性 *Nanos* の機能解析

- ① *Nanos* タンパク質は、RNA 結合タンパク

質である *Pumilio* タンパク質とともに、特異的な mRNA の翻訳制御に関与する。極細胞中において *Nanos* タンパク質が翻訳制御するターゲット mRNA を網羅的に同定することを試みた。*Pumilio* タンパク質と結合することが知られている 165 種類の mRNA から、極細胞で高発現する 44 種類を選択し、正常および *nanos* 突然変異胚の極細胞中におけるそれら RNA の翻訳をレポーターを用いて解析した。その結果、6 種類の mRNA が極細胞中において *Nanos* により翻訳抑制を受けることが明らかとなった。その他、2 種類に関しては、*Nanos* により翻訳が活性化されることが明らかとなった。この結果は、*Nanos* が翻訳抑制だけでなく翻訳の活性化をも行なうことを示した初めての例である。現在、これらターゲット mRNA の機能解析を行なっている。

(3) 研究 2 : 生殖細胞系列の性決定における *Sxl* の役割

- ① *Sxl* 遺伝子が、雌の始原生殖細胞中で発現すること、その発現時期は始原生殖細胞が生殖巣へと移動する短い期間に限られることが明らかとなった。また、ショウジョウバエの始原生殖細胞の雌化に *Sxl* が必須であることを明らかにした。さらに、雄の始原生殖細胞で *Sxl* を強制発現させ、雌個体に移植すると、機能的な卵に分化することから、*Sxl* が始原生殖細胞の雌化に十分な機能を果たすことを証明することができた。これまでに、生殖細胞自律的な性決定機構の存在は予想されていたにもかかわらず、その実体は明らかではなかった。本研究は、生殖細胞自律的な性決定機構のマスター遺伝子を同定した初めての例である。
- ② 雌特異的な *Sxl* の活性化に関わる遺伝子について調べたところ、母性供給される bHLH タンパク質 *Daughterless (Da)* は、体細胞と同様に始原生殖細胞中においても *Sxl* の発現に関与するが、X 染色体上にコードされる *Sc* や *Sis-A* タンパク質は始原生殖細胞内では *Sxl* の発現に関与しないことが明らかとなった。このことは、体細胞と始原生殖細胞では *Sxl* 遺伝子の活性化、すなわち雌化の機構が異なる事を示しており、*Sxl* 活性化に関わる X 染色体上の

新規遺伝子の単離を開始している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① K. Hashiyama, Y. Hayashi and S. Kobayashi (2011) *Drosophila Sex lethal* gene initiates female development in germline progenitors. **Science** 333, 885-888. 査読有り
- ② M. Mukai, K. Kato, S. Hira, K. Nakamura, H. Kita and S. Kobayashi (2011) Innexin2 gap junctions in somatic support cells are required for cyst formation and for egg chamber formation in *Drosophila*. **Mech. Dev.**, 128, 510-523. 査読有り
- ③ Y. Kitadate and S. Kobayashi (2010) Notch and Egfr signaling act antagonistically to regulate germline stem cell niche formation in *Drosophila* male embryonic gonads. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.** 107, 14241-14246. 査読有り
- ④ T. Kondo, S. Plaza, J. Zanet, E. Benrabah, P. Valenti, Y. Hashimoto, S. Kobayashi, F. Payre, Y. Kageyama (2010) Small Peptides Switch the Transcriptional Activity of Shavenbaby During *Drosophila* Embryogenesis. **Science** 39, 336-339. 査読有り
- ⑤ R. Niwa, K. Ito, T. Namiki, Y. Shimada-Niwa, M. Kiuchi, S. Kawaoka, T. Kayukawa, Y. Banno, Y. Fujimoto, S. Shigenobu, S. Kobayashi, T. Shimada, S. Katsuma, and T. Shinoda (2010) *Non-molting glossy/shroud* encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the "Black Box" of the ecdysteroid biosynthesis pathway. **Development** 137, 1991-1999. 査読有り
- ⑥ Y. Hayashi, S. Kobayashi and H. Nakato (2009) *Drosophila* glypicans regulate the germline stem cell niche. **J. Cell Biol.** 187, 473-480. 査読有り
- ⑦ T. Maezawa, K. Arita, S. Shigenobu and S. Kobayashi (2009) Expression of the

apoptosis inducer gene *head involution defective* in primordial germ cells of the *Drosophila* embryo requires *eiger*, *p53* and *loki* function. **Develop, Growth and Differ.** 51, 453-461. 査読有り

- ⑧ K. Hashiyama and S. Kobayashi (2009) Expression of genes involved in sumoylation in the *Drosophila* germline. **Gene Expression Patterns**, 9, 50-53. 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

- ① 小林悟 「ショウジョウバエ胚における生殖細胞系列の性決定機構」シンポジウム「脊椎動物の性決定及び性分化機構—生殖幹細胞及び生殖細胞の最先端研究」第82回日本動物学会大会、大雪クリスタルホール、北海道、2011年9月23日
- ② Y. Kitadate and S. Kobayashi "Notch and Egfr signaling act antagonistically to regulate germline stem cell niche formation in *Drosophila* embryos" 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology, 京都国際会議場 京都府, 2010年6月21日
- ③ 小林悟 「ショウジョウバエにおける配偶子幹細胞の形成を制御するメカニズム」 「配偶子幹細胞制御に関する研究の新展開」シンポジウムオーガナイザー、第80回日本動物学会大会、静岡県コンベンションセンター グランシップ、静岡県、2009年9月17日

[図書] (計 1 件)

- ① 浅岡美穂、小林悟 (2011) ショウジョウバエの卵子幹細胞、「卵子学」森崇英 総編集、京都大学学術出版会、p13-24

[その他]

報道関係

Hashiyama, K., Hayashi, Y. and Kobayashi, S. (2011) *Drosophila Sex lethal* gene initiates female development in germline progenitors. *Science* 333, 885-888. の発表論文に関して、以下のように新聞等で報道された。7.8 (2011年 月・日) 朝日新聞 37面、7.8 中日新聞 1面、7.8 毎日新聞 24面、7.8 日本経済新聞 34面、7.8 日刊工業新聞 21面、7.8 日経産業新聞 9面、7.8 東海愛知新聞 1面、7.8 読売新聞

25 面、7.22 科学新聞 1 面。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 悟 (KOBAYASHI SATORU)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ
エンスセンター・教授
研究者番号：90225508