

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：82648
 研究種目：新学術領域研究
 研究期間：2008～2012
 課題番号：20116002
 研究課題名（和文）ショウジョウバエ卵巣／精巣における GSC／ニッチ・システムの解明
 研究課題名（英文）Mechanism regulating GSC niche system in *Drosophila* ovary and testis

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、GSC／ニッチ・システムを構成する GSC、ニッチ細胞、ニッチの場の形成機構の解明を目標とする。本研究では、1) ニッチ細胞が合成する細胞外マトリックスの主要な構成分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が、GSC 維持に必要な細胞増殖因子を保持するニッチの場を形成すること、2) ニッチ細胞の形成に Notch、Sevenless、Egfr シグナル伝達経路が関与すること、3) GSC の性差や生殖細胞としての性質を獲得するために必要な遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have been trying to clarify the mechanisms regulating "GSC Niche System" in *Drosophila*. We found that 1) heparan sulphate proteoglycans (HSPG) are deeply involved in GSC maintenance by restricting the function of growth factors in a narrow region (Niche field) around "Niche cells", 2) Notch, Sevenless and Egfr signaling are required for proper formation of "Niche cells" in the anterior region of male embryonic gonads, and that 3) maternal Ovo and Sxl are required for germline-specific gene expression and sex determination of primordial germ cells, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	36,700,000	11,010,000	47,710,000
2009 年度	30,600,000	9,180,000	39,780,000
2010 年度	33,400,000	10,020,000	43,420,000
2011 年度	30,600,000	9,180,000	39,780,000
2012 年度	30,600,000	9,180,000	39,780,000
総計	161,900,000	48,570,000	210,470,000

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：配偶子、幹細胞、生殖細胞、ニッチ

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエでは、配偶子幹細胞 (GSC)、ニッチ細胞、ニッチの場が GSC/ニッチ・システムを構成し、配偶子の連続的な産生を可能にしている。

ショウジョウバエの GSC はニッチ細胞に隣接し、ニッチ細胞からの細胞増殖因子の働きにより分化が抑制され、GSC が維持される。しかし、この細胞増殖因子が、どのような機構でニッチ細胞に隣接するわずかな空間 (ニッチの場) のみで機能するのかについては明らかではない。また、ショウジョウバエにおいて、GSC は胚発生過程で形成される始原生殖細胞 (極細胞) に由来すること、ニッチ細胞は胚生殖巣を構成する体細胞 (somatic gonadal precursors: SGPs) から生じることが知られていたものの、それらの形成機構は不明であった。さらに、GSC は、次代の生命を生み出す配偶子に分化できるという「生殖細胞としての性質」(Germness) および「雌/雄の性的二型を示す性質」(Sex) といった、体細胞性の幹細胞には見られない特徴を備えている。しかし、これらの性質を獲得するメカニズムに関しても、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、GSC/ニッチ・システムを構成する GSC、ニッチ細胞、ニッチの場の形成を制御する分子機構を明らかにすることを目的とする。

(1) ニッチの場の形成機構

ニッチの場は、GSC の維持に関わる細胞増殖因子の機能をニッチ細胞の近傍に限局させる働きを持つ。本研究では、HSPG に注目し、ニッチの場の形成機構を明らかにすることを

目的とする。HSPG はヘパラン硫酸を側鎖として持つ糖タンパク質の一種であり、細胞膜表面あるいは細胞外基質を構成する主要な因子の一つである。HSPG は、細胞外領域において、その側鎖あるいはタンパク質部位に様々な細胞増殖因子を結合することにより、増殖因子の空間的分布を制御する。そこで、HSPG が、GSC の維持に関わるか否か、GSC の維持に関わる細胞増殖因子の空間的分布を制御するか否かを明らかにする。

(2) ニッチ細胞の形成機構

ニッチ細胞が形成される時期は、雄では胚期、雌では3令幼虫期であり、形成機構も性依存的である。本研究では、雄/雌の生殖巣 (精巣/卵巣) 中において、ニッチ細胞が形成される機構を明らかにすることを目的とする。雄では、ニッチ細胞の形成に、Sevenless シグナルが関わることが明らかとなっていた。そこで、このシグナル系と相互作用をする可能性のあるシグナル経路の機能を解析することにより雄生殖巣におけるニッチ形成機構の全容を解明する。また、雌では、ニッチ細胞形成への関与が示唆される遺伝子 (FGF 受容体: Breathless など) の役割を明らかにする。

(3) GSC の特質を生み出す機構

GSC は、体細胞性幹細胞が有していない次代の生命を生み出す「生殖細胞としての性質」や、「性差」を備えている。本研究では、始原生殖細胞中において生殖細胞としての性質を生み出す遺伝子、あるいは始原生殖細胞内において自律的に性を決定する働きをもつ遺伝子を同定することで、生殖細胞としての性質や性差を決定する分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ニッチの場の形成機構

雌のニッチ細胞においてショウジョウバエの HSPG 遺伝子である *dally* が、雄のニッチ細胞においては *dally-like* が発現していることが明らかになっている。そこで、これらの突然変異やノックアウト、あるいは異所的な発現により、GSC 維持に異常がみられるかを明らかにする。

また、GSC 維持に関わる細胞増殖因子の可視化を試み、HSPG により細胞増殖因子の空間的分布が制御されているか否かについても明らかにする。

(2) ニッチ細胞の形成機構

これまでの発現解析から、雄胚生殖巣において、Notch がすべての SGP ्सで発現すること、後半部の SGP ्सでは *Sevenless* と *Egfr* が発現することが明らかとなっている。そこで、まず雄胚生殖巣における Notch、*Egfr*、さらにそれらのリガンド分子 (*Delta*、*Serrate*、*Spitz*) の発現を詳細に解析するとともに、Notch および *Egfr* の機能欠損型の突然変異、あるいは Notch および *Egfr* の constitutive active 型変異のニッチ細胞形成に及ぼす影響を調べる。

雌では、FGF 受容体 (*Breathless*) 等が、ニッチ細胞形成や GSC の維持に関わることを明らかにしている。そこで、これら遺伝子の発現解析や突然変異を用いた機能解析を行なうことにより、雌におけるニッチ細胞形成機構を明らかにする。

(3) GSC の特質を生み出す機構

これまでに、始原生殖細胞に取り込まれる転写因子として、母性 *Ovo* を同定している。このような転写因子は報告がなく、生殖細胞特異的な遺伝子発現制御機構に関する研究は、これまで進展が見られなかった。そこで、*Ovo* の詳細な機能解析を行なう。

また、始原生殖細胞の性差は、生殖巣を構成する体細胞からのシグナルにより決定されると考えられてきた。しかし、始原生殖細胞が、細胞自律的に性差を獲得することを示唆する結果を得ている。そこで、始原生殖細胞において性特異的に発現する遺伝子を特定し、詳細な機能解析を行なう。

4. 研究成果

(1) ニッチの場の形成機構

細胞増殖因子を保持し、GSC に安定したシグナルを伝える領域として、「ニッチの場」という新たな概念を提唱し、それを構成する分子の特定を試みた。その結果、HSPG がニッチの場を構成する重要な因子であることを明らかにした。

まず、HSPG の一種であるグリピカン分子の *Dally* および *Dally-like* が、それぞれ卵巣および精巣のニッチ細胞で発現すること、その働きが GSC の維持に必要なであることを明らかにした。さらに、それらグリピカン分子の働きは GSC 維持に必要な増殖因子シグナルの活性化に必要なことを明らかにした。また、卵巣において *Dally* をニッチ細胞以外で異所的に発現した場合、GSC の存在する領域の拡大が誘導されることを明らかにした。これらの結果は、グリピカンがニッチの場を構成する重要な因子であり、細胞増殖因子シグナルの及ぶ範囲を制御することによりニッチの場を規定していることを示している。

また、GSC 維持に関わる細胞増殖因子 (*Dpp* や *Upd*) の可視化にも成功し、*Upd* の空間的分布制御にグリピカンが関与することも明らかにした。さらに、グリピカン以外の HSPG であるシンデカン (*dSyndecan*) やパールカン (*Trol*) の機能も GSC の維持に関わることを示唆する結果も得られており、HSPG によるニッチの場の形成機構を分子レベルで詳細に

解析する基礎を築いた。

(2) ニッチ細胞の形成機構

ニッチ細胞は、生殖巣を構成する体細胞 (SGPs) のうち、前端に位置するものから生じ、隣接する始原生殖細胞を GSC としてリクルートする。

本研究では、雄の胚生殖巣において、受容体型膜タンパク質 Notch を介した体細胞間の相互作用によりニッチ細胞の形成が活性化されることを明らかにした。また、受容体型膜蛋白質である Sevenless および Egfr が胚生殖巣の後半部の体細胞で活性化し、その領域にニッチ細胞が形成されるのを阻害することも明らかにした。これら受容体のリガンドは、極細胞で発現することから、極細胞の減少に伴い生殖幹細胞ニッチ領域が胚生殖巣の後半部へと拡大することが予想できる。実際に、極細胞数が減少した場合であっても、ニッチ細胞の拡大により、GSC が確保されることが明らかとなった。また、雌では FGF 受容体 (Breathless) が、生殖巣の後半部で発現しニッチ細胞の形成を抑制することが明らかとなり、卵巣/精巣において、ニッチ細胞形成が類似の機構で制御されることが予想される。

さらに、雌の生殖巣において、ニッチ細胞が形成された後に GSC としてリクルートされるためには、始原生殖細胞が未分化状態に維持されることが必要であり、この過程に体細胞で発現する Patch paste と Egfr が関わることを明らかにした。

以上のように、本研究では、これまで不明であった、ニッチ細胞の形成機構および始原生殖細胞を未分化に保つ機構を初めて明らかにすることができた。

(3) GSC の特質を生み出す機構

GSC の持つ「生殖細胞としての性質」や「性差」を生み出す機構の一端を以下のように明

らかにした。

まず、GSC の生殖細胞としての性質は、生殖細胞特異的遺伝子の活性化により支えられていると考え、この遺伝子活性化に関わる分子を探索した。その結果、Ovo 転写因子を同定することができた。Ovo は母性因子として卵に供給され、始原生殖細胞に取り込まれる。始原生殖細胞中において、Ovo は生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化するとともに、生殖細胞の発生過程に必要な不可欠である。さらに、Ovo はマウスの始原生殖細胞においても発現が見られ、その発生に必要なことを示唆する結果も得られた。以上のことは、動物間で保存されたメカニズムにより生殖細胞特異的な遺伝子発現が活性化、すなわち「生殖細胞としての性質」が制御されていることを強く示唆している。

また、生殖巣への移動過程にある始原生殖細胞において一過的に雌のみで発現する遺伝子として、RNA 結合タンパク質 Sex lethal (Sxl) を同定し、これが始原生殖細胞の雌化に必要なかつ十分な機能を持つことを示した。すなわち、Sxl は、始原生殖細胞の雌化を決定するためのマスター遺伝子であり、Sxl の下流で働く遺伝子等を同定することで、他の動物を含めた生殖細胞の性差の決定機構の全貌が明らかになると期待される。

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 16 件)

- ① M. Matsuoka, Y. Hiromi and M. Asaoka: Egfr signaling controls the size of the stem cell precursor pool in the *Drosophila* ovary. **Mech. Dev.** 4-5: 241-251 (2013) 査読あり
- ② C. Nishimiya-Fujisawa and S. Kobayashi (2012) Germline stem cells and sex determination in *Hydra*. **Int. J. Dev.**

- Biol.**, 56, 499-508. 査読有り
- ③ Y. Hayashi, T. R. Sexton, K. Dejima, D. W. Perry, M. Takemura, S. Kobayashi, H. Nakato, and D. A. Harrison (2012) Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. **Development**, 139, 4162-71. 査読有り
- ④ Y. Ohhara, Y. Kayashima, Y. Hayashi, S. Kobayashi and K. Yamakawa-Kobayashi (2012) Expression of β -adrenergic-like octopamine receptors during *Drosophila* development. **Zoological Science**, 29, 83-89. 査読有り
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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
- ⑨ 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
- ⑩ 浅岡美穂 (2010) ショウジョウバエ配偶子幹細胞とニッチ. **細胞工学** 29、638-644. 査読なし
- ⑪ 林良樹、小林悟、中藤博志 (2010) ショウジョウバエ生殖幹細胞システムにおけるニッチの場構築の分子機構 **細胞工学** 29、645-651. 査読なし
- ⑫ 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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
- ⑮ 浅岡美穂 (2009) 幹細胞の局在を決めるのは何か **Surgery Frontier** 16、81-84. 査読なし
- ⑯ J. Yatsu, M. Hayashi, M. Mukai, K. Arita, S. Shigenobu and S. Kobayashi (2008) Identification of maternal RNAs encoding transcription factors required for germline-specific gene expression in *Drosophila* embryos. **Int. J. Dev. Biol.**, 52, 913-923. 査読あり
- [学会発表] (計 69 件)
- ① 小林悟「ショウジョウバエの生殖系列の形成とその雌雄を決定するメカニズム」日本動物学会 第 83 回大会、大阪大学豊中キャンパス、大阪、2012 年 9 月 13-15 日
- ② S. Kobayashi "Mechanism regulating germline sexual identity in *Drosophila* embryos" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, 17-21 July, 2012.
- ③ K. Hashiyama and S. Kobayashi "Mechanism regulating sex determination of the germline

progenitors in *Drosophila* embryos”
Satellite symposium to the SDB and JSDB
joint meeting, Germ Cells, New Mexico,
USA., 5 August, 2010

- ④ 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、2009年9月17-20
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) 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。
その他の新聞報道：4件

アウトリーチ活動

愛知県内の高校 (岡崎高校、時習館高校、
一宮高校、岡崎北高校) におけるスーパー
サイエンス関連講演会：12件

ホームページ等

研究室ホームページ：
http://www.nibb.ac.jp/sections/developmental_biology/kobayashi/

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

(2) 研究分担者

浅岡 美穂 (ASAOKA MIHO)
国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号：40370118

(3) 連携研究者

林 良樹 (HAYASHI YOSHIKI)
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・助教
研究者番号：30508817

佐藤 昌直 (SATO MASANA0)
基礎生物学研究所・発生遺伝学研究部門・
助教
研究者番号：20517693

北舘 祐 (KITADATE YU)
基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・
助教
研究者番号：10455214

阿部 訓也 (ABE KUNIYA)
独立行政法人理化学研究所・動物変異動態
解析技術開発チーム・チームリーダー
研究者番号：40240915