

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710237

研究課題名(和文) 不妊を引き起こす生殖細胞発生異常のシステム解析

研究課題名(英文) A systems approach to elucidate gene regulatory network for germline development and fertility

研究代表者

佐藤 昌直 (SATO, Masanao)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞発生に関わる因子および様々な細胞内シグナル伝達因子をショウジョウバエ、カイコでの遺伝子発現情報や遺伝子間相互作用情報、進化的な保存性も加味して選抜し、カイコ培養細胞BmN4を用いてシグナル伝達ネットワークモデルを構築した。得られたモデルはショウジョウバエで生殖細胞発生に関わる遺伝子がハブとなるネットワークトポロジーを示した。また、機能未知の不妊の原因遺伝子の生殖細胞での役割、これまで体細胞では機能が知られていなかった遺伝子の生殖細胞におけるシグナル伝達制御機能をこのモデルから推定することができた。

研究成果の概要(英文)：The signaling network in a germline cell was modeled using BmN4, the cell line derived from a Bombyx mori ovary. The network model is composed of genes that are evolutionarily conserved between B. mori and Drosophila melanogaster and that have been known as regulators for signal transduction in D. melanogaster germline or somatic cell development. The model suggested a gene known as a regulator of germline development in D. melanogaster as a hub in the network. In addition, the model inferred roles of genes of which mutations caused sterility by unknown reasons. Furthermore, the model inferred roles of genes, which have been known to function in somatic cells, in germline cells.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：発生 生殖細胞 不妊

1. 研究開始当初の背景

生殖は多くの生物にとって基本的かつ不可欠な過程である。その分子メカニズムの基礎を明らかにするために、次世代が発生しない・配偶子(精子・卵)形成の異常などを指標にした遺伝学的スクリーニングが30年以上前から行われてきた。雌雄個体が完全に独立しているショウジョウバエを使った解析ではゲノムにコードされている約15000遺伝子の中で646遺伝子の変異が何らかの理由で不妊を引き起こすことが明らかとなっている。それほど多くの遺伝子が妊性に関与する1つの理由としては妊性を保つためには生殖巣などの組織の形態形成が正常である必要があり、“遺伝子-細胞-組織”という多階層の秩序だった発生過程が必要であることが考えられる。しかし、組織を形成しない生殖細胞のみが原因である異常に関して調査しても、41遺伝子が妊性に関係することが報告されている。生殖細胞の発生・妊性に関与するメカニズムはそのような細胞自律的なものだけではなく、周囲の細胞が関与する細胞非自律的な機構の存在も知られており、生殖細胞の妊性を司る分子は非常に多いことが予想される。このように生殖細胞の発生・妊性に関する遺伝学的スクリーニングは成功し、非常に多くの遺伝子が妊性に関わることを示したが、それは同時に従来型の遺伝子1つ1つを詳細に解析していくボトムアップ型アプローチで多数の遺伝子から成る妊性発達システムをどこまで明らかにできるかに疑問を投げかけた。

2. 研究の目的

2-1. 妊性発達システムを俯瞰し、生殖細胞内でのシグナル伝達の挙動について仮説を立てられるモデルの作成: 本申請研究では、次世代の個体形成の基盤となる卵を生み出す雌の妊性について焦点を当てて解析を行い、雌性妊性に関わる機能モジュール間の制御関係を推定したシグナル伝達ネットワークモデルを構築する。研究対象を絞って詳細に解析する還元主義的アプローチでは得られない、細胞特性・挙動などのマクロなダイナミクスを予想できるような情報をこのモデルから得ることを目的とする。

2-2. 生殖細胞特異的な遺伝子だけではなく、体細胞でも汎用されている遺伝子がどのような制御関係を持つかを明らかにする: 本研究では雌での妊性に関わる遺伝子の中でも、生

殖細胞特異的に機能すると考えられる遺伝子と体細胞でも機能している遺伝子の解析を同一の手法で体系的に行う。妊性、生殖細胞の発生にこれらが独立あるいは協調して機能しているかを評価し、今後の妊性、生殖細胞研究の方針を立てられるようにする。

3. 研究の方法

シグナル伝達ネットワークモデリングにはSato *et al.* (2010) *PLoS Pathogens*で報告した研究戦略を用いることを計画していた。その概略を説明すると、遺伝子の変異もしくはRNAiによるノックダウンをシグナル伝達ネットワークへの摂動として用い、ネットワークからのアウトプットとしてトランスクリプトームを取得する。得られたトランスクリプトームデータの類似性を独自のパターン認識アルゴリズムRepEdLEGGを用いて検出する。これにより摂動を受けた遺伝子のシグナル伝達ネットワークにおける相対位置・制御関係を持つ遺伝子群を推定し、その集合としてネットワークトポロジーを推定するものである。研究開始時にはショウジョウバエ胚からセルソーティングによって生殖細胞を分取して解析を進めることを予定していたが、セルソーティングによる細胞単離過程が並行してサンプリングできるサンプル数を制限してしまうため、実験バッチごとの影響(バイアス)を除くための実験デザイン・統計モデルを用いることが困難であった。バイアスが混入した場合、遺伝子型(シグナル伝達ネットワーク状態)の違いだけではなく、バイアスによってもトランスクリプトームの類似性が生まれるため、ショウジョウバエ胚由来の生殖細胞の利用は断念した。

並行サンプリングが可能で、より定量的な実験モデルを探索したところ、カイコ卵巣由来の培養細胞BmN4が*vasa*や*nanos*などの生殖細胞マーカー遺伝子を発現しており、候補として解析を進めた。RNA-seqを用いたトランスクリプトーム解析の結果からBmN4は上記の生殖細胞マーカー遺伝子以外にもショウジョウバエで生殖細胞特異的に発現していると言われている遺伝子を発現していた。また二本鎖RNAを培養培地に加えるのみでRNAiを誘導できるような形質転換細胞ラインが確立されており、並行サンプリングによってスループットよく実験を行えるため、本研究の材料として用いることに決定した。BmN4を用いてRNAiによる遺伝学的なネットワークへの障害、トランスクリプトーム解析、

RepEdLEGG によるネットワークモデリングを行った。

4. 研究成果

生殖細胞発生に関わる因子および様々な細胞内シグナル伝達因子を以下のように設定した。(1) ショウジョウバエのトランスクリプトームデータやタンパク質-タンパク質相互作用、遺伝学的相互作用の情報を元にしたベイジアンネットワークでネットワークの比較的離れたところで機能すると推定されたシグナル伝達因子、(2) カイコでの遺伝子発現情報、(3) ショウジョウバエ-カイコ間での保存性。これら基準にそって標的遺伝子を選抜し、それらをRNAiによってノックダウン後にトランスクリプトームデータを取得した。これら遺伝子ノックダウン細胞のトランスクリプトームデータからノックダウンされた各遺伝子をノードとしたシグナル伝達ネットワークモデルを構築した。得られたモデルはショウジョウバエの生殖細胞で機能することが既知である遺伝子がハブになるネットワークトポロジーを示した。このモデルから

- 変異が入ると不妊を引き起こすことが既知であったが、これまで生殖細胞での機能が全く調べられていない遺伝子の妊性における役割
- 既に報告されているそれら遺伝子の体細胞での機能とは異なるシグナル伝達制御機能

をこのモデルから推定することができた。また、このモデリングに用いた各遺伝子へのRNAi誘導後のトランスクリプトームからも各遺伝子の制御下にある遺伝子群が同定され、新たな知見を得ている。

これらを総合し、生殖細胞発生もしくは維持に関わるシグナル伝達がどのように形成されているか、体細胞で知られているそれらシグナル伝達因子の役割との対比が本研究から明らかになり、今後の研究の基礎が確立された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

佐藤昌直. カイコ培養細胞系列 BmN4-SID1 における生殖細胞様遺伝子発現制御因子の同定・シグナル伝達ネッ

トワーク解析. 生命情報科学若手の会第5回研究会 2014年2月17日-2月19日, 千葉県千葉市

Sato M., Mon H., Kusakabe T., Kobayashi S. Establishment of Resources to Elucidate Regulatory Network Governing Germline Gene Expression Using the Bombyx mori cell line BmN4-SID1. *The 58th/60th NIBB conference*. 2012年7月17日-7月21日, 愛知県岡崎市

佐藤昌直. BmN4-SID1 トランスクリプトーム解析-カイコ機能ゲノミクスの基盤形成. NGS 現場の会第二回研究会 2012年5月24日-5月25日, 大阪府吹田市

佐藤昌直、門宏明、日下部宜宏、三田和英、小林悟. 生殖細胞研究の新たなモデルとしてのカイコ細胞とカイコ-ショウジョウバエ間の機能的対応を持ったオルソログ推定. 生命情報科学若手の会第三回研究会 2011年10月15日-10月16日, 愛知県岡崎市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 昌直 (SATO, Masanao)

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：