

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770207

研究課題名（和文）始原生殖細胞の比較システムズバイオロジー

研究課題名（英文）Comparative systems biology of primordial germ cells

研究代表者

重信 秀治（SHIGENOBU SHUJI）

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・特別訪問研究員

研究者番号：30399555

研究成果の概要：

生殖細胞の形成機構の普遍性と多様性—すなわちその進化—を理解するために、モデル生物ショウジョウバエでこの過程に働く遺伝子をゲノムワイドに同定し、他の生物種との比較を行った。まず、マイクロアレイを利用してショウジョウバエ生殖細胞の詳細な遺伝子発現プロファイルを得た。次に生殖細胞形成に関わる遺伝子群を他の昆虫と比較したところ、その多くは昆虫の間で保存されているが、ショウジョウバエ特異的な遺伝子(*oskar* など)や *nanos*, *vasa* の種特異的な遺伝子重複(*アブラムシ*, *カイコ*)が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生進化

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は個体を形成する無数の細胞の中で唯一次世代に伝えられる重要かつ特殊な細胞であり、多細胞生物の進化の過程でまず必要となった細胞である。従って、生殖系列の形成やその機能を支える分子基盤が、多くの

動物種で保存されていると考えられる。また、生殖系列は遺伝や進化など種の形成・維持に深く関わっていることから、その多様性を理解することも重要である。しかし、生殖細胞の形成や分化の機構は一部のモデル生物で調べられているに過ぎなかった。

## 2. 研究の目的

生殖系列の形成機構の普遍性と多様性、進化を理解するために、

- (1) キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 始原生殖細胞のトランスクリプトーム情報を収集する。
- (2) 昆虫ゲノムデータベースを活用して、ショウジョウバエで知られている生殖細胞の発生過程に機能する遺伝子の保存性を調べる

## 3. 研究の方法

- (1) ショウジョウバエ始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析

生殖系列特異的に GFP 蛍光を呈する vasa-GFP 系統のショウジョウバエ胚をホモジナイズし、FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter)により GFP 蛍光を指標に細胞をソーティングした。それらの細胞プールから RNA を精製し、マイクロアレイを用いて極細胞 (=始原生殖細胞)のトランスクリプトームを時系列的に解析した (11 のタイムポイント x4 回)。データ解析には、GeneSpring (Agilent)と、BioConductor (Open source software)を利用した。

- (2) 生殖細胞発生遺伝子の昆虫間比較

ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で、生殖細胞形成に関わる 13 遺伝子のオーソログを次の 5 つの昆虫で同定した。比較対象：エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum*、キョウソヤドリコバチ *Nasonia vitripennis*、セイヨウミツバチ *Apis mellifera*、カイコ *Bombyx mori*、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum*。オーソログの同定は複数の方法で行った。euGene/Arthropods database (<http://insects.eugenesis.org/arthropods/>), phylomeDB (<http://phylomedb.org>) の公共データベース、InParanoid (Remm et al., 2001)を利用した独自のデータベースを利用した。詳細な同定は分子系統樹によった。MUSCLE でタンパク質のアミノ酸配列をアライメントし MEGA (NJ tree), PhyML (Maximal likelihood tree) また MrBayes (Bayesian tree)で系統樹を

作成した。

## 4. 研究成果

- (1) ショウジョウバエ始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析

トランスクリプトームの経時的変化のアウトラインを把握するために、11 区間分のアレイデータを階層的クラスタリングした (図 1)。その結果、前半と後半の大きな 2 つのグループに分かれた。この 2 つのグループの転換点、すなわち発生ステージ 9-10 は、ちょうど極細胞 (=始原生殖細胞)の転写抑制が解除される時期と一致する。これは、極細胞中で母性から胚性遺伝子発現プログラムへ切り替わりをゲノムワイドなレベルで捉えることに成功した初めての成果である。

### Hierarchical Clustering on Conditions

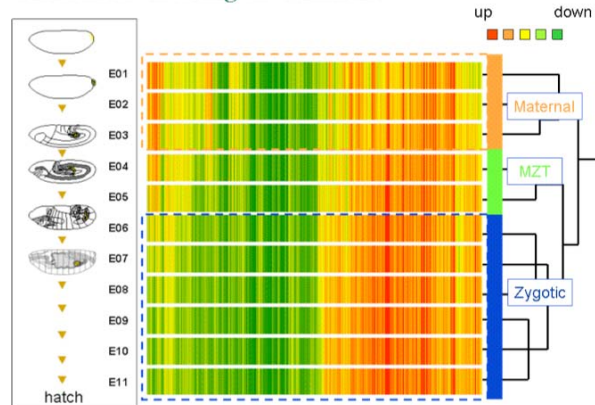


図 1. ショウジョウバエ始原生殖細胞トランスクリプトームの階層的クラスタリング

胚全体の細胞と比較して極細胞中で発現が特に高い約 500 遺伝子を新規に同定した。これらを上記クラスタリングの結果に基づいて、前半に発現の高い母性因子グループ (以下グループ M) の遺伝子約 200, 後半に発現の高い遺伝子群 (グループ Z) 約 300 に分類することが出来た。

さらに、成虫卵巣内の生殖幹細胞のトランスクリプトーム情報も同様に収集することができた。興味深いことに胚発生後半の遺伝子発現パターンと成虫の生殖幹細胞のそれは非

常によく似ていることが明らかになった。極細胞と生殖幹細胞の近似性は移植実験などから予想されてきたが、遺伝子発現レベルで明らかにしたのはこの研究が初めてである。

## (2) 生殖細胞発生遺伝子の昆虫間比較

昆虫の生殖細胞形成に関わる遺伝子レパートリーを比較した。表 1 に、アブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の生殖細胞形成遺伝子のレパートリーを例示する。

表 1 アブラムシの生殖細胞形成遺伝子レパートリー

name	ID	description
<i>nos1</i>	ACYPI43056	nanos-1, Apnanos1, Apnanos
<i>nos2</i>	ACYPI24752	nanos-2, Apnanos2
<i>nos3</i>	ACYPI27888	nanos-3, Apnanos3
<i>nos4</i>	ACYPI20951	nanos-4, Apnanos4
<i>pum</i>	XP_001950648.1	pumilio
<i>piwi</i>	XP_001949977.1	piwi
<i>vas1</i>	XP_001948608	vasa 1, Apvasa, Apvasa1
<i>vas2</i>	XP_001948649.1	vasa 2, Apvasa2
<i>vas3</i>	XP_001946134.1	vasa 3, Apvasa3
<i>vas4</i>	XP_001947971.1	vasa 4, Apvasa4
<i>tud</i>	ACYPI46022	tudor
<i>Hmgcr</i>	XP_001951894.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
<i>Hmgcr2</i>	ACYPI006413	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 2
<i>wun</i>	XP_001942868.1	wunen
<i>wun2</i>	ACYPI23897	wunen 2
(absence confirmed)		( <i>pgc, gcl, osk, vls, zpg</i> )

いくつかの例外を除いてショウジョウバエで生殖細胞形成に関わることが分かっている遺伝子の多くは昆虫の間で保存されていることがわかった。しかし、*oskar* や *polar granule component (pgc)* は、ショウジョウバエ属のみが持っている。生殖細胞形成に関わる遺伝子の種特異的な遺伝子重複はまれであるが、ア

ブラムシにおいては、*vasa*, *nanos* ホモログともに 4 つ持っていることが明らかになった (Shigenobu et al., 査読中)。アブラムシ *vasa* ホモログの発現を *in situ hybridization* で調べたところ、*vasa1* のみが生殖細胞で発現していることを見いだした。アブラムシは季節によって有性生殖と単為生殖を切り替える、*polyphenism* を呈することが知られている。*vasa*, *nanos* の遺伝子重複が *polyphenism* と関わっているかどうかを検討することは、これからの興味深い研究テーマの一つである。

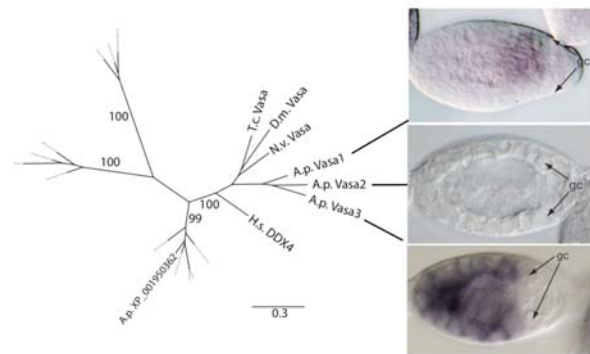


図 2 昆虫の *vasa* オーソログの進化系統樹。A. p.: *Acyrtosiphon pisum*, N. v.: *Nasonia vitripennis*, D. m.: *Drosophila melanogaster*, T. c.: *Tribolium castaneum*. 右の写真はアブラムシの *vasa* パラログの発現。gc は生殖細胞を示す。*vasa1* のみが生殖細胞に発現している。

## 結語

本研究では、昆虫の生殖細胞の形成に関わる遺伝子について 2 つの研究を行った。様々な発生遺伝学的技術と情報が利用できるショウジョウバエでは始原生殖細胞の詳細なトランスクリプトームを解析し、これまでこのモデル生物で分かっていた生殖細胞形成に関する知見をさらに拡充させることができた。また、近年のゲノムプロジェクトの急速な進展により可能になった 5 種の昆虫のゲノム情報を利用し、生殖細胞遺伝子レパートリーの比較を行った。特に、私がゲノムプロジェクトの国際コンソーシアムにグループリーダーとして参加しているアブラムシについては詳細な解析を行い、種特異的な遺伝子重複、欠失を見だし、遺伝子発現についても明らかに

した。これらは昆虫の生殖細胞形成遺伝子の進化を明らかにするための基礎となる成果である。

なお、当初の計画で課題の一つに挙げていた、マウスとショウジョウバエの発現プロファイルの比較は、2年間の研究期間では完了に至らなかった。しかし、今回の昆虫に焦点を絞った研究の過程で開発した比較ゲノミクス技術の多く（オーソログ同定など）は、昆虫とほ乳類間のような進化距離の遠い種間の比較にも応用可能であり、実際、この技術を利用して解析を継続しているところである。ほ乳類を含めた、生殖細胞形成の遺伝子レパートリーとその発現様式の進化の解明が期待される。

## 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4件)

- ① Hashiyama K, Shigenobu S, Kobayashi S.  
Expression of genes involved in sumoylation in the *Drosophila* germline. *Gene Expr Patterns* (2009) vol. 9 (1) pp. 50-3  
査読有り
- ② Maezawa T, Arita K, Shigenobu S, Kobayashi S. Expression of the apoptosis inducer gene *head involution defective* in primordial germ cells of the *Drosophila* embryo requires *eiger*, *p53*, and *loki* function. *Dev Growth Differ* (2009) vol. 51 (4) pp. 453-61  
査読有り
- ③ Yatsu J, Hayashi M, Mukai M, Arita K, Shigenobu S, Kobayashi S. Maternal RNAs encoding transcription factors for germline-specific gene expression in *Drosophila* embryos. *Int J Dev Biol* (2008) vol. 52 (7) pp. 913-23  
査読有り
- ④ Kitadate Y, Shigenobu S, Arita K, Kobayashi S. Boss/Sev signaling from germline to soma restricts germline-stem-cell-niche formation in the anterior region of *Drosophila* male gonads. *Dev Cell* (2007) vol. 13 (1) pp. 151-9  
査読有り

[その他]

ホームページ

<http://germcell.nibb.ac.jp/wp/index.php/db/> (ショウジョウバエ生殖細胞関連データベース:本研究で用いたマイクロアレイの情報など)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

重信 秀治 (SHIGENOBU SHUJI)  
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・特別訪問研究員  
研究者番号: 30399555

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし