

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870030

研究課題名（和文） ショウジョウバエ生殖幹細胞ニッチ形成機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism for *Drosophila* germline-stem-cell-niche formation

研究代表者

北館 祐 (KITADATE YU)

基礎生物学研究所・発生遺伝学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：10455214

研究成果の概要:本研究の目的は、ショウジョウバエの生殖幹細胞を維持する幹細胞ニッチの形成機構を解明することである。これにより、幹細胞システムの成立機構を理解することができると考えられる。そこで本研究では、現在までに私たちが同定したニッチ形成に関与する遺伝子 (*sevenless* (*sev*)、*Notch* および *Egfr*) 等の機能解析を行ってきた。その結果、*Notch* はニッチ形成を誘導していること、さらに、*sev* および *Egfr* がニッチ形成を阻害していることが明らかとなった。このように、ニッチ形成は拮抗した性質をもつ遺伝子の働きにより、一定した数になるようコントロールされていることが明らかとなってきた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

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・分化、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞の臨床応用という観点から、幹細胞システムの研究が精力的に行われている。ショウジョウバエ雄の生殖幹細胞システムは細胞レベル・分子レベルでの解明が進んでおり、幹細胞研究のモデルシステムとして用いられている。この系において、生殖幹細胞は体細胞性のニッチ(ハブ細胞)により維持されることが知られている。ハブ細胞が生殖幹細胞を維持する機構は分子レベルで明らかにされつつあるが、ハブ細胞が発生過程において形成される機構は不明で

あった。私は、これまで以下の2つの研究を行うことで、ハブ細胞の形成機構の一端を明らかにしてきた。

- (1) ショウジョウバエ胚生殖巣で発現する遺伝子の網羅的同定
- (2) *sev* のハブ細胞形成における機能の解析

ハブ細胞は精巣の原基である雄胚生殖巣の前端部に形成されるハブ前駆細胞に由来する。胚生殖巣は始源生殖細胞(極細胞)と体細胞(SGCs)から構成される。私たちは、胚生殖巣に

発現する遺伝子を網羅的に同定し、それら遺伝子の発現パターンを調べていく過程で、胚生殖巣内で領域特異的に発現する遺伝子を同定した。これらは、おそらくハブ細胞のように胚生殖巣内の一部の SGCs から生じる細胞種の形成に関与するものと考えられる。そこで、このような遺伝子の機能解析により、胚生殖巣の領域特異的分化に関わる機構を明らかにすることができると考えた。私はこの中で *sev* 遺伝子に注目し、機能解析を行ったところ、ハブ細胞の形成に関与することが明らかとなった。*sev* は、雄胚生殖巣の SGCs のうち、ハブ細胞に分化することのない後半部の SGCs でのみ発現が観察された。また、*sev* の機能を欠いた胚では、ハブ前駆細胞が胚生殖巣の前半部だけでなく後半部にも異所的に形成されていた。したがって、*sev* は雄胚生殖巣の後半部 SGCs において、ハブ細胞分化を抑制していると結論づけられる。では、*sev* の活性化はハブ細胞の形成を抑制するのに十分なのであろうか。これまでの結果より、胚生殖巣の前半部 SGCs において、*sev* を強制発現させてもハブ細胞の形成を阻害することはできなかった。おそらく、ハブ細胞が形成される胚生殖巣前半部には、*sev* 下流のシグナル伝達を阻害する機構が備わっているものと考えられる。

そのような阻害に関わる分子の候補として、*Notch* を挙げることができる。*sev* 下流の *Ras/MAPK* カスケードは、様々な発生過程において、*Notch* シグナル伝達と互いに拮抗するように働くことが知られているからである。また、*Notch* シグナル伝達は多くの器官において、幹細胞システムの維持に必須であることも知られている。これまでの私の解析から、*Notch* タンパク質が胚生殖巣の SGCs で発現していることが明らかとなっている。このことから、*Notch* は雄胚生殖巣中で *sev* シグナル伝達と拮抗して働くことと予想できる。実際に、*Notch* 突然変異胚において、ハブ細胞の数が減少し、さらに全ての SGCs 中で恒常的活性化型 *Notch* を強制発現すると、*sev* の機能が失われた場合と同様に、ハブ細胞が異所的に形成されるという予備的な結果が得られている。おそらく、*Notch* は胚生殖巣前半部 SGCs で活性化し、*sev* シグナル伝達と拮抗的に働くことで、ハブ細胞の形成を保証していると考えられる。しかしながら、その機能・役割は未だ解明されていない。そこで、本研究では、ハブ形成における *Notch* シグナル伝達の役割を明らかにするとともに、*Notch* シグナル伝達と *sev* シグナル伝達の遺伝学的関係を明らかにすることで、ハブ形成の制御機構およびその遺伝学的経路を明らかにする。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ雄生殖幹細胞ニッチ(ハブ細胞)の形成機構を解明するために、*Notch* シグナ

ル伝達の雄胚生殖巣における発現および機能を解析する。多くの幹細胞システムの間では、形態や性質に多様性はみられるものの、多数の幹細胞システムで *Notch* シグナル伝達が共通して重要な働きをしているなど遺伝子レベルでの共通性が報告されている。このことから、本研究で得られる知見は生殖幹細胞システムのみならず、多くの幹細胞システムの形成・維持の分子機構を明らかにする上での重要な基盤となると考えられる。

この他、ハブ細胞の形成に影響を示す遺伝子の機能解析を行うことで、ハブ細胞の形成を制御する遺伝学的経路の全体像構築を目指す。

3. 研究の方法

(1)ハブ細胞の形成における *Notch* シグナル伝達の機能解析

① *Notch* シグナル伝達活性化の時空間的位置の解明: *Notch* シグナル伝達が胚生殖巣内のどこで、いつ活性化されるのかを詳細に調べる。*Notch* シグナル伝達の活性化を調べるために、その活性化を追跡するレポーター遺伝子が導入された系統を用いて調べる。

② *Notch* シグナル伝達のリガンドの特定およびその時空間的位置の解明: *Notch* シグナル伝達のリガンドとして *Delta* および *Serrate* が知られている。まず、これらの発現を解析する。

③ *Notch* シグナル伝達のハブ細胞の形成における機能の解析: ハブ細胞の形成における *Notch* シグナル伝達の役割を明らかにする。*Notch* シグナル伝達構成因子の突然変異系統を用い、ハブ細胞の形成に及ぼす影響を調べる。

(2)ハブ細胞の形成における *Egfr* シグナル伝達の機能解析

sev および *Notch* シグナル伝達に加えて、*Egfr* シグナル伝達経路がハブ細胞の形成に関与していると考えられる。*Egfr* シグナル伝達は、ショウジョウバエ網膜発生過程において、*sev* シグナル伝達による *Ras/MAPK* カスケードの活性化を増強する働きをすることが知られている。さらに、*Egfr* シグナル伝達の構成因子である *stet* および *Egfr* 突然変異胚では、*sev* と同様にハブ細胞の数が増加するという予備的な結果を得ている。以上のことから、*Egfr* シグナル伝達は *sev* シグナル伝達と協調してハブ細胞の形成を抑制していることが示唆される。このように、ハブ細胞の形成に *Egfr* シグナル伝達に関与していると考えられるが、その機能・役割は未だ解明されていない。そこで、*Egfr* シグナル伝達構成分子の突然変異体を用いて、ハブ細胞の形成における *Egfr*

シグナル伝達の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ハブ細胞の形成における *Notch* シグナル伝達の機能解析

① *Notch* シグナル伝達活性化の時空間的位置の解明: *Notch* シグナル伝達の活性化を追跡するレポーターを指標に調べたところ、*Notch* シグナル伝達は、形成されて間もない胚生殖巣中の SGCs 全体において活性化していることが明らかとなった。

② *Notch* シグナル伝達のリガンドの特定およびその時空間的位置の解明: リガンドの一つである *Serrate* は、形成されて間もない胚生殖巣中の SGCs 全体において発現が観察された。

③ *Notch* シグナル伝達のハブ細胞の形成における機能の解析: *Notch* の機能欠損型突然変異胚において、ハブ前駆細胞の数を調べたところ、ハブ前駆細胞の数が減少していた。一方、恒常的活性化型の *Notch* を過剰発現させた *Notch* Gain-of-function 胚では、ハブ前駆細胞が異所的に形成され、その数が増加していた。以上の結果から、*Notch* は胚生殖巣全体で、ハブ前駆細胞の形成を正に制御すると結論づけられる。また、*Serrate* の機能欠損型突然変異胚および Gain-of-function 胚においても、*Notch* と同様に、ハブ前駆細胞の減少および増加が観察された。

①～③の結果を総合すると、*Notch* は SGCs 間の相互作用により、胚生殖巣全体で、ハブ前駆細胞の形成を正に制御すると結論づけられる。

(2) ハブ細胞の形成における *Egfr* シグナル伝達の機能解析

Egfr シグナル伝達を受容体である *Egfr* は胚生殖巣中の SGCs 全体で発現していた。一方、リガンドである *spitz* およびリガンドをプロセッシングし分泌させる役割を担う *stet* が極細胞で高発現していることが明らかとなった。以上の結果から、SGCs で発現する *Egfr* は、極細胞で発現するリガンドにより活性化されることが示唆された。

次に、胚生殖巣内のどこで、*Egfr* シグナル伝達が活性化しているかを調べた。このために、*Egfr* シグナル伝達のターゲット遺伝子である *kek1* の発現を調べた。*kek1* は胚生殖巣中の後半部の SGCs で発現していた。このことから、*Egfr* シグナル伝達は、胚生殖巣後半部の SGCs、すなわち、ハブ前駆細胞以外の SGCs で活性化していることが明らかとなった。

では、*Egfr* は *sev* と同様、後半部 SGCs で、ハブ前駆細胞の形成を抑制しているのだろうか。

Egfr の機能欠損型突然変異胚において、ハブ細胞の形成を調べたところ、ハブ前駆細胞が胚生殖巣後半部で異所的に形成され、その数が増加していることが明らかとなった。このような表現型はリガンドの *spitz* あるいは *stet* でも観察された。

以上の結果から、極細胞で発現する *spitz* および *stet* により、*Egfr* が胚生殖巣の後半部 SGCs で活性化されること、そして、このシグナルは後半部の SGCs がハブ前駆細胞へと分化するのを抑制していることが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、*Notch* シグナル伝達が、形成されて間もない胚生殖巣において、ハブ細胞の形成を胚生殖巣全体で誘導していることが明らかとなった。一方、*sev* および *Egfr* シグナル伝達が、胚生殖巣の後半部において、ハブ細胞の形成を阻害していることが明らかとなった。このように、ハブ細胞は拮抗した性質をもつシグナル伝達の働きにより、一定した数になるようコントロールされていると結論づけられる。ハブ細胞の数が適正に制御されることで、適切な数の生殖幹細胞が規定されるものと考えられる。

本研究の特色は、極細胞から SGCs へのシグナルの受け渡しが、正常なハブ形成に必須であることを明らかにした点にある。これは、ショウジョウバエ胚において生殖系列から体細胞系列へのシグナルの受け渡しを明らかにした初めての例であり、胚生殖巣内における細胞間の相互作用が生殖幹細胞ニッチの形成に重要な役割を持つことを示している。

本研究のもうひとつの特色は、「生殖幹細胞ニッチの形成機構」を世界に先駆けて明らかにした点にある。本研究以外に幹細胞ニッチが個体の発生過程で形成される機構を明らかにした例は現在までに報告がなく、本研究は幹細胞ニッチの形成機構を明らかにした初めての例である。本研究で得られた知見は、将来的には、幹細胞ニッチのサイズを人為的に変えることで、幹細胞数を操作することも可能であり、生殖・再生医療分野への貢献も期待される。

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2件)

① Kitadate, Y., Shigenobu, S., Arita, K. and Kobayashi, S.

Boss/Sev signaling from germline to soma restricts germline-stem-cell-niche formation in the anterior region of *Drosophila* male gonad.

Developmental Cell. 13. 151-159. 2007.

査読有り

② Mukai, M., Hayashi, Y., Kitadate, Y., Arita, K., Shigenobu, S. and Kobayashi, S. MAMO, a maternal BTB/POZ-Zn-finger protein enriched in germ line progenitors is required for the production of functional eggs in *Drosophila*. Mechanisms of Development. 124. 570-583. 2007.

査読有り

[学会発表](計2件)

① Yu Kitadate and Satoru Kobayashi. *Drosophila* male germline-stem-cell-niche formation is antagonistically regulated by Notch and Egfr signaling. GERM CELLS meeting in Cold Spring Harbor Laboratory. 2008年10月2日、Cold Spring Harbor, New York, The United States of America.

② Yu Kitadate, Satoru Kobayashi. Germline-stem-cell-niche formation in *Drosophila* male gonads. 第41回 日本発生生物学会 (ISDB 共催)、2008年5月30日、徳島県

[図書](計1件)

① 北舘祐、小林悟、共立出版、ショウジョウバエ生殖細胞形成機構に関する最近のトピックス『蛋白質核酸酵素』12月号増刊、2007年、7ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北舘 祐 (KITADATE YU)

基礎生物学研究所・発生遺伝学研究部門・

特別協力研究員

研究者番号: 10455214

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者