

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770253

研究課題名（和文）ショウジョウバエ生殖幹細胞の「ニッチの場」形成の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）The molecular mechanisms regulating niche signal distribution in *Drosophila* germline stem cell niche.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：幹細胞は組織内においてニッチと呼ばれる細胞外微小環境内に維持されることが明らかとなっている。ニッチは、ニッチ細胞より分泌される細胞増殖因子（ニッチシグナル分子）の分布する範囲によって規定されると考えられているが、ニッチシグナル分子の分布をニッチ細胞近傍にのみとどめる機構は明らかになっていない。本研究では、ショウジョウバエの生殖幹細胞（GSC）のニッチをモデルとして、ニッチシグナル分子がとどまる領域（ニッチの場）を規定する分子メカニズムを明らかにすることを試みた。その結果、糖タンパク質の一種であるヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が GSC ニッチにおいてニッチシグナル分子の空間分布を制御することによりニッチの場を形成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Stem cell possesses the remarkable characteristics to produce its daughter cell that retain a stem-cell identity and the other that differentiates. Stem cells reside in dedicated cellular microenvironments termed stem-cell niches. These niches dictate a stem-cell identity, maintain the stem cell population, and coordinate proper homeostatic production of differentiated cells. *Drosophila* germline stem cells (GSCs) are one of the ideal models for stem cell study *in vivo*. In apical tips of both male and female gonads, GSCs associate with specially differentiated somatic gonadal cells, the niche cells. These niche cells generate niches for GSCs by secreting signaling molecules. Although these facts indicate that region of niche is defined by the spatial distribution of these ligands, molecular mechanisms that regulate ligand distribution within the niche is not characterized.

In this study, we showed that *Drosophila* Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) are essential components of GSC niche. *Drosophila* two glypicans, a subfamily of HSPGs, were expressed in niche cells of female and male gonads and were required for GSC maintenance. Conversely, when glypican was ectopically expressed in ovaries, we observed expansion of GSC niche. These results showed that these glypicans define niche region molecularly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：生殖幹細胞、ニッチ、ショウジョウバエ、プロテオグリカン、HSPG

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、自己複製をするとともに、分化する細胞を継続的に供給することができる細胞であり、個体の恒常性、組織の維持に対して極めて重要な細胞である。近年、多くの動物種において、様々な組織を構成する幹細胞が同定されつつある。例えば、ショウジョウバエ、マウスにおいては、生殖細胞幹細胞、造血幹細胞、消化管上皮幹細胞などの同定、維持機構の解明が試みられている (Morrison, S.J. and Spradling, A. C., 2008)。これらの系において、幹細胞の維持には、幹細胞の居場所となる細胞外環境、ニッチが重要であると考えられている。ニッチを構成する主要な因子は、ニッチ細胞より分泌される細胞増殖因子 (ニッチシグナル分子) であると考えられているが、多くの場合、形態学的な特定の難しさ、あるいは分子遺伝学的手法の導入の困難さにより、明確なニッチ細胞の特定、そしてニッチを構成する細胞増殖因子の同定は進んでいない。

ショウジョウバエの雌雄の成虫生殖巣に存在する生殖幹細胞 (GSC) のニッチは、その形態学的な特定の容易さ、および分子遺伝学的手法の導入の容易さにより、もっとも研究が進んでいる幹細胞ニッチの一つである (Xie, T. et al., 2005)。この系において、ニッ

チ細胞は雌雄の生殖巣の前端に存在する生殖巣体細胞 (雌：キャップ細胞、雄：ハブ細胞) であることが明らかになっている。またニッチシグナル分子として、TGF- $\beta$  シグナルのリガンドである Decapentaplegic (Dpp:雌)、Glassbottomboat (Gbb:雄)、そして JAK/STAT シグナルのリガンドである Upd (雄) が特定されている。例えば、卵巣のニッチ細胞において Dpp の産生を阻害した場合、GSC は維持されない。反対に、卵巣において Dpp の発現領域を拡大した場合、GSC の過剰な形成を引き起こし卵形成過程は正常に進行しない。これらの結果は、卵巣の GSC ニッチの主要構成因子はニッチ細胞より分泌される Dpp であり、GSC が安定して形成/維持されるには Dpp の分布とそのシグナル伝達は厳密に制御されなくてはならないことを示している。しかし、ニッチシグナル分子を保持し、幹細胞に安定したシグナルを供給する領域 (ニッチの場) を形成する分子メカニズムは全く明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) はヘパラン硫酸(HS)を側鎖にもつ糖タンパク質ファミリーであり、細胞膜や細胞外マトリックスの主要な構成因子である。HSPG はそのタンパク質部位の性質の違いによって、グ

リピカン（細胞膜結合型）、シンデカン（細胞膜貫通型）、パールカン（分泌型）の3種類に大別される。近年の研究により、HSPGは細胞外領域において、HS鎖あるいはタンパク質部位に細胞増殖因子を結合させ、それら因子の空間的分布、安定性を制御していることが明らかになっている。例えば、ショウジョウバエのグリピカンの一つ、*dally* (*division abnormally delayed*) は、成虫翅原基において、Dppと結合することにより、Dppの空間的分布を制御していることが知られている (Fujise, et al., 2003)。このことは *dally* が GSC ニッチにおいてニッチシグナル分子の空間的分布を制御する可能性を予想させるが、ニッチにおける HSPG の機能については全く不明であった。

本研究ではこのような HSPG の分子的特性に注目し、HSPG がニッチにおいて細胞増殖因子の分布を制御することにより、ニッチの場を形成しているという可能性を明らかにすることを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ニッチにおけるグリピカンの発現解析

本研究では HSPG のうち、細胞増殖因子の制御について最も研究が進んでいるグリピカン（ショウジョウバエオルソログ：*dally*、*dally-like*）のニッチにおける機能に着目して研究を行った。ニッチにおけるグリピカンの機能を明らかにする第一歩として、ニッチにおけるグリピカンの発現をグリピカンに対する免疫化学染色、エンハンサートラップ法を用いた発現解析を行ったところ、卵巣ニッチ細胞において *dally* が特異的に発現すること、そして精巣ニッチ細胞において *dally* および *dally-like* が発現することが明らかとなった。

(2) 卵巣 GSC ニッチにおける *dally* 突然変異系統の表現型解析

卵巣ニッチ細胞における *dally* の機能を解析するために、*dally* 突然変異系統を用いた表現型解析を行った。その結果、*dally* 突然変異系統では野生型にくらべて有為に GSC 数が減少していることが明らかとなった。このことは *dally* の卵巣ニッチ細胞における機能が GSC 維持に必要であることを示している。

(3) 卵巣 GSC 維持における *dally* の分子機能解析

卵巣 GSC の維持において *dally* が果たす分子機能を明らかにするために、*dally* が卵巣ニッチシグナルである Dpp シグナルの活性を制御するかどうか検証した。そのために Dpp シグナルの活性マーカーである Dad-LacZ を用いて、活性マーカーが *dally* 突然変異体の卵巣 GSC において減少するかどうか検証した。その結果、*dally* 突然変異体 GSC においては野生型に比べて有為に Dad-lacZ の発現が減少することが明らかとなった。この結果は、*dally* は Dpp シグナルを制御することにより、卵巣 GSC を維持することを示している。

(4) 卵巣 GSC ニッチの場における *dally* の強制発現による表現型解析

上記の結果より、*dally* がニッチ細胞において発現していること、そして *dally* は Dpp シグナルの制御を介して GSC の維持を司っていることが明らかとなった。そこで次に、*dally* がニッチの場の範囲を分子的に規定するのに寄与するかどうか、*dally* をニッチ細胞以外のより遠位に存在する卵巣体細胞において強制発現することで検証した。この実験においてはショウジョウバエの GAL4/ UAS システムを用い、*dally* を異所的に発現した場合にニッチの場の範囲が拡大するかどうかを検証した。その結果、*dally* 強制発現個体の卵巣において、*dally* の強制発現領域にまで GSC 様細胞が存在することを確認した。さらにこれらの GSC 様細胞においては Dpp シグ

ナルが活性化されていることを明らかにした。これらの結果は、*dally* はニッチの場を構成するにあたって必要かつ十分な機能をもっていること、そして *dally* は Dpp シグナルの活性範囲を制御することによりニッチの場の範囲を分子的に規定していることを示している (Hayashi, et al., 2009)。

#### (5) ニッチの場における Dpp タンパク質の空間分布制御における *dally* の機能解析

ニッチの場において *dally* が Dpp タンパク質の空間分布を制御するかどうかを検証することを試みた。このためにニッチにおける Dpp タンパク質に対する免疫化学染色法の改良を行い、その可視化を世界に先駆けて可能にした。さらに野生型、*dally* 強制発現個体において Dpp タンパク質の分布を比較した。その結果、*dally* 強制発現個体においてはニッチ細胞から離れた遠位な領域においても Dpp タンパク質が存在することを明らかにした。この結果は、*dally* はニッチにおいて Dpp タンパク質の空間分布を制御することにより、ニッチの場の範囲を分子的に規定することを示している (林ら、未発表)。

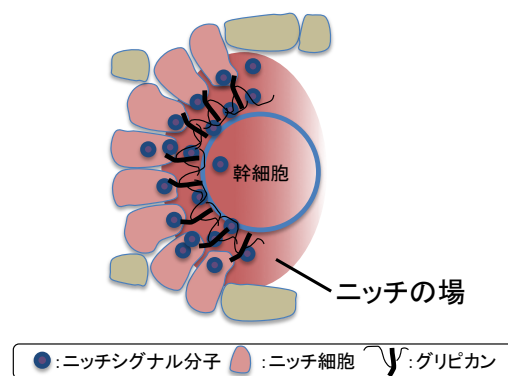
#### (6) 精巣 GSC ニッチにおけるグリピカンの機能解析

既に述べたように、精巣 GSC ニッチのニッチ細胞においてはショウジョウバエの二つのグリピカン、*dally* および *dally-like* が発現することを明らかにした。そこでこれらの機能が精巣 GSC の維持に必要なかどうか、突然変異系統を用いた表現型解析を行うことで検証した。その結果、*dally* および *dally-like* の突然変異系統の精巣において、有為な GSC 数の減少が観察された。これらの結果は、卵巣の場合と同様に、精巣 GSC ニッチにおいてもグリピカンはニッチの場の構成因子として重要な役割を担っていることを示している (Hayashi, et al., 2009)。

## 4. 研究成果

本研究によって、ショウジョウバエ GSC ニッチの重要な構成因子として、細胞外環境の主要因子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン (グリピカン) が特定された。グリピカンは雌雄の GSC ニッチにおいて機能することにより、GSC の維持を司る。特に卵巣 GSC ニッチの場合、グリピカンの一つ *dally* がニッチ細胞において機能することにより、Dpp タンパク質の空間分布をニッチ細胞近傍にのみとどめ、その領域にニッチの場を形成するということが明らかとなった (Hayashi, et al., 2009, 林ら、未発表)。*dally* はショウジョウバエの成虫翅原器の発生過程において、Dpp タンパク質の細胞外領域での安定化を司ることにより、Dpp タンパク質のモルフォゲン濃度勾配形成を制御することが知られている。*dally* は卵巣 GSC ニッチにおいても同様に、ニッチ細胞の細胞膜上で Dpp タンパク質と結合しこれを安定化することにより、ニッチ細胞近傍にのみニッチの場を形成すると考える (図)。

図:ニッチの場を構成する分子機構のモデル



本研究を開始する以前において、幹細胞が生体内において維持される仕組みは、ニッチ細胞とニッチシグナル分子によって理解されてきた。本研究ではこれらに加え、ニッチ細胞近傍においてのみ、ニッチシグナル分子

をとどめるための細胞外環境として、ニッチの場という新たな概念を提唱することに成功した。生体内において適切な個数の幹細胞が安定に維持されるためにはニッチシグナル分子の空間分布の厳密な制御は不可欠である。この点において、ニッチの場はショウジョウバエ GSC ニッチのみならず、多くの動物の様々な幹細胞ニッチを理解する上で重要な知見を供出するものである。

本研究で対象としているグリピカンは線虫から、ハエ、マウスに至るまで広く進化的に保存された分子である。ヒトにおいても6種類のグリピカン (GPC1~GPC6) が存在し、GPC3 は組織の過成長を伴う Simpson-Golabi-Behmel 症候群 (SGBS) の原因遺伝子であることが知られている (28: Hudson, 2006, 29: Cano-Gauci, 1999, 30: Paine-Saunders 1999, 31: Pilia, 1996)。この症例にみられる組織の過成長は、幹細胞の過剰形成が一因である可能性が考えられる。今後、様々な動物の様々な幹細胞ニッチシステムにおいて、このような細胞外環境の構成因子の役割が解明されるにつれ、ニッチの場の普遍的な意義が見いだされていくと期待する。また、近い将来に期待が高まる幹細胞医療に必要とされる移植幹細胞の生体内制御等においてもニッチの場を構成する分子機構の解明は重要な基礎的知見となるものと期待している。

#### 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5件)

①Ohhara, Y., Kayashima, Y., Hayashi, Y., Kobayashi, S., Yamakawa-Kobayashi, K., Expression of  $\beta$ -adrenergic-like octopamine receptors during *Drosophila* development. *Zool. Sci.*, 査読あり, vol. 29, 2012, pp. 83-39,

②Hashiyama, K., Hayashi, Y., Kobayashi, S,

*Drosophila* Sex lethal gene initiates female development in germline progenitors. *Science*, 査読あり, vol. 333, 2011, pp. 885-888,

③Kleinschmit A, Koyama, T., Dejima, K., Hayashi, Y., Kamimura, K., Nakato, H., *Drosophila* heparan sulfate 6-O endosulfatase regulates Wingless morphogen gradient formation, *Dev. Biol.*, 査読あり, vol. 333, 2010, pp. 203-214,

④林 良樹、小林 悟、中藤 博志、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、査読なし、29巻、2010、645-651

⑤Hayashi, Y., Kobayashi, S., Nakato, H., *Drosophila* glypicans regulate germline stem cell niche, *J. Cell Biol.*, 査読あり, vol. 187, 2009, pp. 473-480,

[学会発表] (計9件)

①林 良樹、野田 千代、小林 悟、ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における細胞内代謝の新規役割、日本発生物学会秋季シンポジウム2011、2011年12月20日、岡崎コンファレンスセンター (愛知県)

②林 良樹、野田 千代、小林 悟、ショウジョウバエ始原生殖細胞における代謝状態の解析、日本動物学会第82回大会、2011年9月21日、大雪アリーナ (北海道)

③林 良樹、小林 悟、中藤 博志、The role of Heparan Sulfate Proteoglycan in *Drosophila* gametogenesis, 第44回日本発生物学会大会、2011年5月19日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

④林 良樹、小林 悟、中藤 博志、The Role of Heparan Sulfate Proteoglycans in *Drosophila* Germ Line Stem Cell Niche, 第34回日本分子生物学会年会、2010年12月9日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

⑤Hayashi, Y., Nakato, H., Kobayashi, S., The Role of Heparan Sulfate Proteoglycans in *Drosophila* Germ Line Stem Cell Niche, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 2010 on Germ Cells. 2010年10月6日、Cold Spring Harbor Laboratory (NY, U. S. A.)

⑥林 良樹、小林 悟、中藤 博志、ショウジョウバエ生殖幹細胞ニッチの場における

ヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割、日本動物学会第81回大会、2010年9月23日、東京大学（東京都）

⑦林 良樹、小林 悟、中藤 博志、ショウジョウバエ生殖幹細胞ニッチにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割、第33回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜（神奈川県）

⑧林 良樹、小林 悟、中藤 博志、ショウジョウバエ生殖幹細胞ニッチにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割、日本動物学会第80回大会、2009年9月19日、静岡コンベンションアーツセンター（静岡県）

⑨林 良樹、小林 悟、中藤 博志、ショウジョウバエ生殖幹細胞ニッチにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割、第42回日本発生物学会大会、2009年5月29日、朱鷺メッセ（静岡県）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/press/091120/091120.html>

報道情報

①科学新聞、2009年12月18日（4面）

②日経産業新聞、2009年12月7日（12面）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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