

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06308

研究課題名(和文)母性Ovoタンパク質によって制御される生殖細胞形成機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of maternal Ovo protein during germ cell formation in Drosophila

研究代表者

林 誠 (Hayashi, Makoto)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：50714838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエにおいて、母性Ovoタンパク質は、始原生殖細胞中で生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化することが明らかになっている。しかし、母性Ovoタンパク質の機能を阻害した始原生殖細胞は、幼虫期に消失するため、生殖細胞の分化過程において母性Ovoタンパク質が果たす役割は明らかになっていない。そこで、母性Ovoタンパク質が転写を活性化する遺伝子の同定とその解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したovo遺伝子は、ショウジョウバエだけでなく、系統的に遠い関係にあるマウスにおいてもそのオルソログ(ovo12遺伝子)が生殖細胞の形成に必要であることが明らかになっている。よって、本研究で明らかになった知見は、ショウジョウバエだけでなく、マウスを含む多くの動物種において共通した生殖細胞形成機構を見出せる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Maternal Ovo protein have been shown to regulating germ-cell specific gene expression in Drosophila. However, the role of maternal Ovo protein during germ cell differentiation remains unclear, since the maternal Ovo protein knockdown induces germline loss phenotype during larval stage in both sexes. Therefore, in this study, we identified and analyzed the genes whose transcription is activated by maternal Ovo protein.

研究分野：基礎生物学・発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 始原生殖細胞 母性Ovoタンパク質 配偶子形成

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物において、生命の連続性を支える「生殖」は、重要な現象である。そのため、この現象を担うことができる唯一の細胞である生殖細胞の形成機構を明らかにすることは、生物学において重要な課題である。そこで、生殖細胞形成の分子メカニズムが詳細に解析されてきた動物種の一つであるショウジョウバエを用いて研究を行った。ショウジョウバエにおいて、生殖細胞は、卵の後端に局在する生殖質を取り込んで形成される始原生殖細胞に由来する。形成された始原生殖細胞は胚内を移動したのち、生殖巣へと取り込まれ、そこで配偶子幹細胞へと分化することで、継続して配偶子(卵、精子)を作りづつける。これまでの研究から、生殖質中には、生殖細胞の形成に必要な十分な因子が含まれていることが知られている。この生殖質に含まれ、生殖細胞の形成に必要な因子として、母性 Ovo タンパク質が同定されている。

母性 Ovo タンパク質は、生殖質に分布し始原生殖細胞に取り込まれる母性 *ovomRNA* に由来する。これまでの研究から、転写制御因子として機能する母性 Ovo タンパク質は、始原生殖細胞中で生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化することが明らかになっており、これにより、始原生殖細胞が生殖細胞へと分化することを促している可能性が考えられる。しかし、母性 Ovo タンパク質の機能を阻害した始原生殖細胞は幼虫期にその数が減少し消失するため、生殖細胞の分化過程において母性 Ovo タンパク質がどのように機能しているかは明らかになっていないのが現状であった。また、母性 Ovo タンパク質の機能を阻害した際に始原生殖細胞がなぜ消失するかも明らかになっていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、始原生殖細胞において母性 Ovo タンパク質が転写を活性化する遺伝子(母性 Ovo 下流遺伝子)を同定し、その遺伝子が生殖細胞形成においてどのように機能しているかを解析することにより、生殖細胞形成過程において母性 Ovo タンパク質が果たす役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 胚期始原生殖細胞において高発現する母性 Ovo 下流遺伝子の探索

本研究では、まず、胚発生過程後期の始原生殖細胞において高発現し、母性 Ovo タンパク質が転写を活性化する遺伝子の探索を行った。これまでに、マイクロアレイ解析により、母性 Ovo タンパク質が、胚発生過程後期の始原生殖細胞において転写を活性化するものが 401 遺伝子、同定されている(Hayashi et al., 2017)。そこで、本研究では、これらの遺伝子から *in situ* hybridization (ISH) 法により、胚発生過程後期の始原生殖細胞において発現がみられる遺伝子を選定した。401 遺伝子のうち、233 遺伝子については、発現パターンが Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) *in situ* データベース上に公開されていたため、そのデータをもとに、胚発生過程後期の始原生殖細胞で発現がみられるものを選定した。一方、残りの 168 遺伝子については記載がなかったため、ISH 法による発現解析を行った。

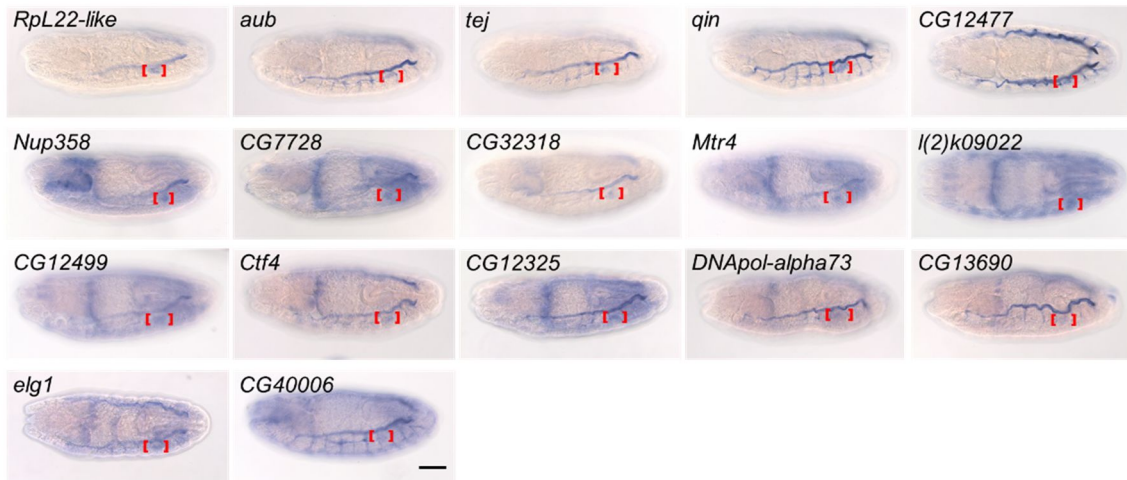
### (2) RNAi 法を用いた、母性 Ovo 下流遺伝子の機能解析

Gal4/UAS システムにより、(1) で同定した母性 Ovo 下流遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現することができる系統を用いて機能阻害実験を行った。具体的には、生殖細胞特異的に Gal4 タンパク質を発現する *nos-Gal4-VP16* 系統のメスに、母性 Ovo 下流遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現することができる系統のオスを交配することで、生殖系列特異的に母性 Ovo 下流遺伝子の機能をノックダウンした個体を得た。ノックダウン個体の表現型は、以下の点に着目して解析を行った。まず、成虫を解剖し、生殖巣の形態を解析した。さらに、ノックダウン個体に由来する卵や精子が機能的か否かを解析するために、ノックダウン個体に正常系統である *yw* 系統を交配することで、産生された卵の孵化率を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) 胚期始原生殖細胞において高発現する母性 Ovo 下流遺伝子の探索

母性 Ovo 下流遺伝子 401 遺伝子のうち、発現パターンが BDGP *in situ* データベース上に公開されている 233 遺伝子については、「gonad」もしくは「germ cell」の記載がある遺伝子を選定した。その結果、21 遺伝子が胚発生過程後期の始原生殖細胞において発現していることが明らかになった。残りの 168 遺伝子については、ISH 法により発現パターンの解析を試みた。まず、マイクロアレイ解析のデータを用いて、始原生殖細胞において発現量が高い 54 遺伝子を選定した。このうち、クローニングができた 37 遺伝子について、ISH 法により発現パターンを解析した。その結果、17 遺伝子が胚発生過程後期の始原生殖細胞において発現することが明らかになった(図1)

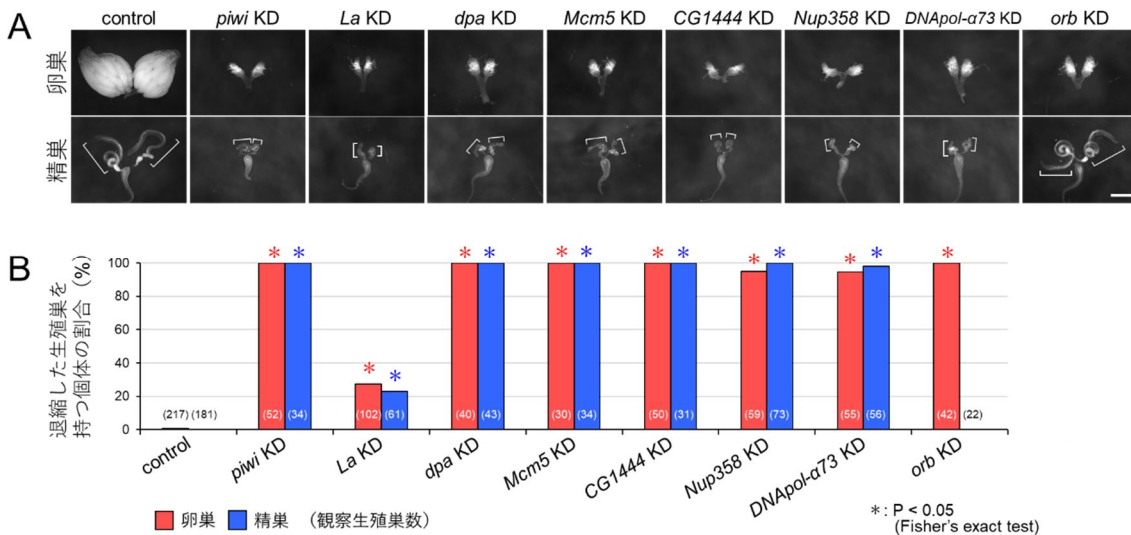


**図1 母性 Ovo 下流遺伝子の発現パターン**

ISH を行った 38 遺伝子のうち、始原生殖細胞において発現が観察された 17 遺伝子の発現パターン。青い染色は mRNA の発現を示す。カッコは胚内の始原生殖細胞を示す。スケールバー：50  $\mu\text{m}$ 。

(2) 胚期始原生殖細胞において高発現する母性 Ovo 下流遺伝子の探索

胚発生過程後期の始原生殖細胞において発現がみられた、38 個の母性 Ovo 下流遺伝子を対象として、生殖系列特異的なノックダウンを行い、その機能を解析した。その結果、ノックダウンにより成虫の卵巣、精巣の退縮が観察されるものを 8 遺伝子同定した(図 2)。これらについて、免疫染色により、退縮した卵巣や精巣をより詳細に観察することで、生殖系列の細胞がほとんど消失していることを明らかにした。以上の結果より、これら 8 遺伝子は生殖系列の細胞の維持に機能していることが明らかになった。また、卵巣特異的に成熟卵の形成が阻害されるものを 2 遺伝子同定した(図 3)。



**図2 Ovo 下流遺伝子をノックダウン (KD) した生殖巣**

(A) Ovo 下流遺伝子をノックダウンした時の退縮した生殖巣。スケールバー：500  $\mu\text{m}$ 。  
 (B) 退縮した卵巣 (赤) または精巣 (青) を持つ個体の割合。カッコ内は観察した生殖巣の数。\*:  $P < 0.05$  (Fisher's exact test)。

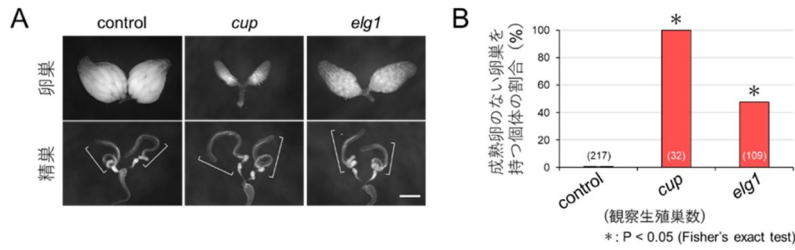


図3 Ovo 下流遺伝子をノックダウン (KD) した生殖巣

(A) Ovo 下流遺伝子をノックダウンした時、成熟卵が観察されなかった生殖巣。スケールバー：500  $\mu\text{m}$ 。(B) 成熟卵のない卵巣を持つ個体の割合。カッコ内は観察した生殖巣の数。\*:  $P < 0.05$  (Fisher's exact test)。

一方、その他の 17 遺伝子のノックダウンでは、卵巣や精巣に異常がみられなかった。そこで、これらの遺伝子のノックダウン個体を対象として、それらの個体が生み出す卵や精子が機能的か否かを調べた。その結果、ノックダウンにより機能的な卵を産生できなくなる遺伝子を 6 遺伝子(図 4) 機能的な精子を産生できなくなる遺伝子を 6 遺伝子(図 5) 同定した。以上より、母性 Ovo タンパク質は、これらの遺伝子の転写を活性化することで、始原生殖細胞が正常な卵や精子へと分化するのに機能していると考えられる。本研究は、母性 Ovo タンパク質が生殖細胞の発生過程において果たす役割を明らかにするための基礎となると考えている。

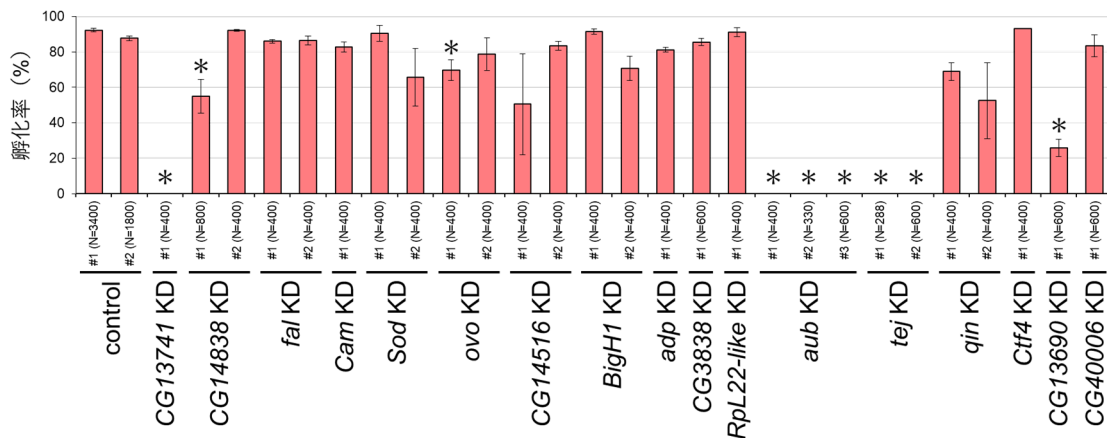


図4 Ovo 下流遺伝子をノックダウン (KD) したメス個体が生み出した卵の孵化率

カッコ内は観察した卵の数。\*:  $P < 0.05$  (Student's t-test)。

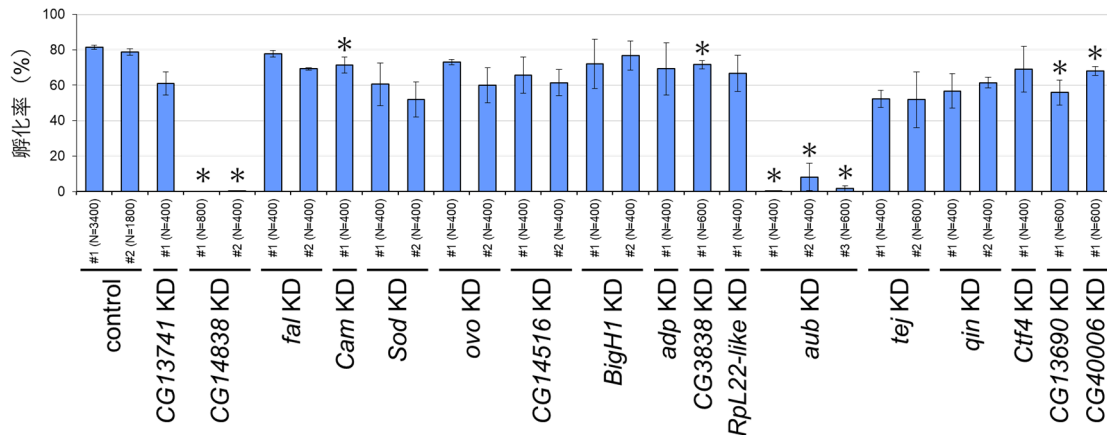


図5 Ovo 下流遺伝子をノックダウン (KD) したオス精子と受精した卵の孵化率

カッコ内は観察した卵の数。\*:  $P < 0.05$  (Student's t-test)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita Shumpei, Ota Ryoma, Hayashi Makoto, Kobayashi Satoru	4. 巻 23
2. 論文標題 Repression of G1/S Transition by Transient Inhibition of miR-10404 Expression in Drosophila Primordial Germ Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100950 ~ 100950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Shoichi, Hira Seiji, Fujiwara Masato, Miyagata Nasa, Tsuji Takuma, Kondo Akane, Kimura Hiroshi, Shinozuka Yuko, Hayashi Makoto, Kobayashi Satoru, Mukai Masanori	4. 巻 2:422
2. 論文標題 A truncated form of a transcription factor Mamo activates vasa in Drosophila embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0663-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Makoto, Ichida Kensuke, Sadaie Sakiko, Miwa Misako, Fujihara Ryo, Nagasaka Yasuhiko, Yoshizaki Goro	4. 巻 101
2. 論文標題 Establishment of novel monoclonal antibodies for identification of type A spermatogonia in teleosts†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 478 ~ 491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古賀結花, 林誠, 小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ生殖細胞形成過程における母性Ovoタンパク質下流遺伝子の解析
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宿主生殖腺への高い生着能を有する精原細胞濃縮法の開発
2. 発表標題 海野太一, 藤原亮, 水谷波南香, 吉崎悟朗, 小林悟, 林誠
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayashi, M., Iwasaki, Y., Hayashi, T., Ebisawa, M., Sasagawa, Y., Yoshimura, M., Ichida, K., Nikaido, I., Yoshizaki, G.
2. 発表標題 Identification of the molecular markers preferentially expressed in spermatogonial stem cells in fish
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 香山瑞生, 浅岡美穂, 森田俊平, 林誠, 小林悟
2. 発表標題 シヨウジョウバエ始原生殖細胞における体細胞性遺伝子抑制機構の役割
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦博樹, 太田龍馬, 林誠, 小林悟
2. 発表標題 シヨウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子の探索
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田龍馬, 林誠, 森田俊平, 小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における遺伝子量補償の欠如による生食系列の性決定機構
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦博樹, 太田龍馬, 林誠, 小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子の探索
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香山瑞生, 浅岡美穂, 森田俊平, 林誠, 小林悟
2. 発表標題 ショウジョウバエ始原生殖細胞における体細胞性遺伝子抑制機構の役割
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------