

平成 2 8 年 6 月 1 6 日現在

機関番号： 1 2 1 0 2

研究種目： 基盤研究(A) ( 一般 )

研究期間： 2012 ~ 2015

課題番号： 2 4 2 4 7 0 1 1

研究課題名 ( 和文 ) ショウジョウバエ生殖細胞系列の性決定機構の解明

研究課題名 ( 英文 ) Mechanism regulating germline sex determination in Drosophila

研究代表者

小林 悟 ( KOBAYASHI, Satoru )

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号： 9 0 2 2 5 5 0 8

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 35,000,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : 本研究は、生殖細胞系列の性決定機構を解明することを目的としている。これまでに、始原生殖細胞中において細胞自律的にメス化を誘導できるSxlに制御される候補遺伝子を同定するとともに、始原生殖細胞の性差に依存して発現する遺伝子の網羅的な同定、中胚葉を持たない原始的な動物であるヒドラにおいて、生殖幹細胞の性差に依存して発現する遺伝子の網羅的な同定を行うことに成功した。以上の成果は、生殖細胞系列における普遍的な性決定機構を明らかにする上での基盤となる。

研究成果の概要 ( 英文 ) : In this study, we have been trying to clarify the mechanism regulating sex determination of the germline. Here, we report the identification of the candidate genes downstream of Sxl, which can autonomously initiate female development in primordial germ cells. Furthermore, we have performed a genomewide identification of the genes differentially expressed between male and female germline in Drosophila and Hydra. These results provide the basis for clarifying the conserved mechanism of germline sex determination in animals.

研究分野： 基礎生物学・発生生物学

キーワード： 生殖細胞 性決定 ショウジョウバエ ヒドラ 始原生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物において、生殖細胞系列(始原生殖細胞)は、卵巣や精巣の原基である生殖巣とは離れた場所に形成され、胚内を移動した後に生殖巣に取り込まれる。この移動中の始原生殖細胞には機能的あるいは形態的に顕著な性差は観察されず、性差が観察されるのは生殖巣に取り込まれた後である。このことから、始原生殖細胞の性は、生殖巣に取り込まれた後に、生殖巣(体細胞)の性に依存して非自律的に決定されるという考えが広く受け入れられてきた。たとえば、ショウジョウバエでは、オスの生殖巣を構成する体細胞からのオス化誘導シグナル分子[JAK/STAT シグナル伝達経路のリガンド: Unpaired (Upd) タンパク質]により始原生殖細胞がオス化することが報告されている。一方、始原生殖細胞の性は、オス化シグナルによる非自律的な機構だけでなく、始原生殖細胞自律的な機構によっても制御されていることが予想されてきた。

私たちは、この点に焦点を当て研究をおこなってきた結果、以下の成果を得た。まず、生殖巣に取り込まれる前の始原生殖細胞においてメス特異的に *Sex lethal (Sxl)* 遺伝子が一過的に発現することを見いだした(Hashiyama et al., Science, 2011)。次いで、私たちは、*Sxl* 遺伝子が始原生殖細胞のメス化のマスター遺伝子であることを明らかにした(Hashiyama et al., Science, 2011)。

## 2. 研究の目的

以上の独創的な成果を基盤として、生殖細胞系列の性決定機構を明らかにする以下の研究を行う。

研究 1: 始原生殖細胞中で *Sxl* により制御されるメス化の遺伝子経路を解明する。体細胞の性決定経路において *Sxl* 下流に位置する *tra* や *dsx* 等の遺伝子の機能は、始原生殖細胞中では性決定に必要な。そこで、始原生殖細胞中において *Sxl* により直接制御される遺伝子、さらにその下流で働く遺伝子群を同定する。

研究 2: メス始原生殖細胞中で *Sxl* が活性化される機構を明らかにする。これまでの予備的な結果から、体細胞と始原生殖細胞ではメス特異的に *Sxl* を活性化する機能を持つ遺伝子群は同じではないという結果が得られている。そこで、始原生殖細胞において、この機能を持つ遺伝子群を明らかにする。

研究 3: 始原生殖細胞自律的なメス化遺伝子系路の普遍性を明らかにする。研究 1 で明らかになった遺伝子を含めて、他の動物群において始原生殖細胞で性特異的発現を示すか否かを明らかにした上で、その機能を解析する研究に発展させる。

## 3. 研究の方法

### 研究 1: 始原生殖細胞中で *Sxl* により制御されるメス化遺伝子経路の解明

始原生殖細胞における *Sxl* 下流遺伝子カスケードを明らかにするために、以下の研究を行なう。

研究 1-1: 体細胞の性決定機構において、*Sxl* タンパク質はターゲット RNA に結合し、その選択的スプライシングや翻訳を制御することが明らかとなっている。そこで、始原生殖細胞内で *Sxl* タンパク質が結合している RNA を同定することを試みる。この目的のため、*Sxl* タンパク質に抗体認識タグ(GFP)を融合させた融合遺伝子を始原生殖細胞で発現させ、抗 GFP 抗体または抗 *Sxl* 抗体を用いて pre-mRNA と *Sxl* タンパク質を含む複合体を免疫沈降させ、*Sxl* タンパク質に結合している RNA を次世代シーケンサーあるいはマイクロアレイにより同定する(RIP 解析)。

研究 1-2: *Sxl* の下流候補遺伝子の網羅的探索を行う。*Sxl* を強制発現させたオスの始原生殖細胞と *Sxl* を発現しない正常なオス始原生殖細胞をセル・ソーターで単離し、マイクロアレイで発現遺伝子の比較を行なう。もしくは、*Sxl* が発現するメス始原生殖細胞と発現しないオス始原生殖細胞を単離して RNA 発現解析を行い、メス特異的あるいはオス特異的に始原生殖細胞で発現する遺伝子を網羅する。前者は、*Sxl* により活性化される遺伝子、後者は逆に抑制される下流遺伝子の候補となる。その後、それら遺伝子のノックダウンを RNAi などを用いて行ない、始原生殖細胞のメス化に異常が観察されるかを解析する。

### 研究 2: メス始原生殖細胞中で *Sxl* が活性化される機構の解明

始原生殖細胞中においても、体細胞と同様に X 染色体の数に依存して発現が制御されている。これまでの予備的な結果から、母性供給される bHLH タンパク質 Daughterless (Da) は、体細胞と同様に始原生殖細胞中においても *Sxl* の発現に関与する。そこで、X 染色体にコードされる bHLH 遺伝子のうち *Sxl* が活性化される時期に始原生殖細胞内で発現するものをマイクロアレイ解析の結果をもとに選択する。その後、*in situ* hybridization 等による発現解析の後、突然変異を用いた解析等により始原生殖細胞内で *Sxl* の活性化に関与するか否かを明らかにする。

### 研究 3: 始原生殖細胞自律的なメス化遺伝子系路の普遍性

上記の研究から明らかになるショウジョウバエの始原生殖細胞のメス化に関わる遺伝子群のうちヒドラにおいてオルソログを単離し、発現や機能解析を行う。原始的な動物(腔腸動物)ヒドラは、生殖細胞系列のみに性差が存在し、体細胞には性差が報告されていない。このことから、生殖細胞系列自律的な性決定機構は進化的に古く、進化の過程で中胚葉

を獲得し、性差を持つ生殖巣を形成して始めて、非自律的な制御が誕生したと考えられる。この考えを基にすると、ショウジョウバエの生殖細胞系列自律的な性決定機構に関わる遺伝子の少なくとも一部は、この動物に保存されていると考えられる。

#### 4. 研究成果

##### 研究1-1

生殖細胞系列の性差が生み出される機構は未だ十分な解明がなされていない。私たちは、ショウジョウバエの生殖系列で機能し、メス化を誘導することができる遺伝子として*Sxl*を同定した。*Sxl*タンパク質は、ターゲットRNAに結合し、そのスプライシングや翻訳を調節するRNA結合タンパク質である。そこで、*Sxl*とGFPの融合タンパク質を作成し、それを始原生殖細胞のみで発現させ、このタンパク質と結合するRNAをGFPに対する抗体を用いて免疫沈降させることを試みた。*Sxl*/GFP融合遺伝子をGal4/UASシステムを用いて、始原生殖細胞でのみ発現させた。この胚全体から抗GFP抗体を用いて免疫沈降させることにより、始原生殖細胞のみを単離しなくても、この細胞内に存在する*Sxl*タンパク質を含むRNA複合体を沈降させることができる。

抗GFP抗体を用いて*Sxl*/GFP融合タンパク質を含むRNP複合体を免疫沈降させ、そこに含まれるRNAを次世代シーケンサーで解析した(RIP解析)。コントロール(GFPのみを始原生殖細胞で発現させ、抗GFP抗体で免疫沈降させた標品)と比較し実験群(*Sxl*/GFP融合タンパク質を始原生殖細胞で発現させ、同様に免疫沈降させた標品)で32倍以上enrichするRNAを選別し、そのうち*Sxl*タンパク質の結合モチーフを持つものを309種類同定した。さらに、既に得られている始原生殖細胞のみを単離し得られた時系列トランスクリプトームデータから始原生殖細胞において発現が認められるものを119種類に絞った。

次いで、これら遺伝子(RNA)の機能阻害実験を行い、*Sxl*下流候補遺伝子(RNA)を絞り込むことを試みた。これらRNAに対するdsRNAを生殖系列で発現させそれぞれの機能阻害を行った。まず、*Sxl*の機能を始原生殖細胞において阻害すると、メス化が不完全となり卵巣中で腫瘍化する。同様に、同定した119種類の遺伝子の機能阻害を行ったところ、唯一*Su(var)2-10*の機能阻害を行うと*Sxl*の機能阻害と同様の表現型を生じた。このことは、この遺伝子が*Sxl*の下流で働くことを強く示唆する。現在、*Sxl*タンパク質が、*Su(var)2-10*の選択的スプライシングに関与するのかについて解析中である(論文未発表)。

上記のスクリーニングにより、*Sxl*の下流候補遺伝子として*NHP2*も同定した。*Sxl*は卵形成過程においても機能を有しており、*NHP2*は、以下のように卵形成過程において*Sxl*の下流で働くと考えられる。

ショウジョウバエ成虫卵巣において、生殖幹細胞の分裂により生み出される2つの娘細胞のうち一方は生殖幹細胞として維持される。もう一方の

娘細胞は4回の不完全分裂によって、2-cell cyst、4-cell cyst、8-cell cystを経て、16-cell cystに分化し、16細胞のうち1細胞から卵母細胞が生じる。まず*NHP2*の生殖系列特異的なノックダウン(*NHP2 GS-KD*)により、4-cell および8-cell cystへの分化が促進されるが、16-cell cystへの分化は抑制されることが明らかとなった。また、*Sxl GS-KD*により4-cellおよび8-cell cystへの分化が抑制されるが、*NHP2 GS-KD*をさらに導入すると、4-cell および8-cell cystへの分化抑制がレスキューされることを明らかにした。最後に、*NHP2*ホモログは、酵母においてrRNAをシュードウリジン化する複合体の構成分子であり、ショウジョウバエでシュードウリジン合成酵素として知られる*Nop60B*の*GS-KD*は*NHP2 GS-KD*と非常に類似した表現型を示すことを明らかにした。以上の結果は、卵形成過程において*Sxl*により*NHP2*の機能が一時的に抑制されることが初期卵形成過程の進行に必要であることを示唆している(論文未発表)。

以上の成果は、rRNAのシュードウリジン化が卵形成過程に関与することを示唆する初めての例であり、rRNAのシュードウリジン化の発生過程における役割を明らかにする上での基盤になり得る。

##### 研究1-2

*Sxl*の下流候補遺伝子の網羅的探索を行った。2つの計画のうち、*Sxl*が発現するメス始原生殖細胞と発現しないオス始原生殖細胞を単離してRNA発現解析を行い、メス特異的あるいはオス特異的に始原生殖細胞で発現する遺伝子を網羅する研究を行った。オス/メスを問わず始原生殖細胞でGFPタンパク質を発現する*vas-EGFP*と始原生殖細胞でGal4タンパク質を発現する*nos-Gal4*を持つメス成虫に、X染色体に*UAS-DsRed*を持つオス成虫を交配させ得られた胚では、オスの始原生殖細胞においてGFPタンパク質のみが、メス始原生殖細胞においてGFPタンパク質とDsREDタンパク質が発現する。これら蛍光タンパク質の発現を利用してオス及びメスの始原生殖細胞を別々にセルソーターにより単離し、次世代シーケンサーを用いてRNA-seq解析を行った。その結果、ゲノム上の約16,000遺伝子のうち、約100程度がメス及びオスの間でdifferentialに発現していることが明らかとなった(論文未発表)。これら遺伝子の機能、および*Sxl*により制御されるのかについては現在解析中である。

以上のように、始原生殖細胞においてオスとメスでdifferentialに発現する遺伝子の網羅的解析は初めてであり、始原生殖細胞の性決定機構解明に向けた大きな進歩となる。

##### 研究2

性染色体(X染色体)上のbHLHをコードする遺伝子にターゲットを絞って、*Sxl*遺伝子の始原生殖細胞における発現を活性化するか否かを指標にスクリーニングを試みた。しかし、メス始原生殖細胞において発現する*Sxl*を*in situ*

hybridizationやPCRなどでも検出することができなかった。オス／メスの始原生殖細胞において differential に発現する遺伝子を網羅した研究1-2の成果から、*Sxl*はメスの始原生殖細胞においてオスの3倍程度発現が亢進していることが確認された。そこで、この情報を元にPCRなどのプライマー設計を見直し、再度実験を行う予定である。

### 研究3

ヒドラは、体細胞には性差が観察されず、生殖細胞にのみ雌雄差が見られる。そこで、この動物において、生殖幹細胞の雌雄性を特徴付ける遺伝子を同定し、ショウジョウバエとの共通性を探る研究をおこなった。ヒドラの雌性生殖幹細胞はポリプ中に散在する多能性幹細胞に由来し、雄性生殖幹細胞は雌性生殖幹細胞に由来することが明らかとなっている。そこで、多能性幹細胞、雌性生殖幹細胞、雄性幹細胞をセルソーターで分取するため、それぞれの細胞で異なる蛍光タンパク質を発現する形質転換体を作成し、それぞれの細胞群をセルソーターで単離した。その後、次世代シーケンサーによるRNA-seqを行い、発現するRNA種の比較を行っている。残念ながら、未だ解析途中であるが、それぞれの細胞種で differential に発現する遺伝子のオーソログ解析により、ショウジョウバエの雌雄性との共通点を探り出すことができると考えている。

本研究の成果は、ショウジョウバエの生殖細胞系列において自律的に働く性決定機構を明らかにする上で大きく貢献すると考えられる。さらに、この研究期間中に、魚においても生殖細胞系列自律的な性決定機構の存在が明らかとなり、ヒドラも含めて、生殖細胞系列の性決定機構の普遍性を明らかにする研究にも発展することが予想できる。本研究は、これら基礎生物学における未解決の大きな問題を解く基盤となると考えられる。

### 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 11 件) 全て査読あり

- ① T. Nishimura, T. Sato, Y. Yamamoto, I. Watakabe, Y. Ohkawa, M. Suyama, S. Kobayashi and M. Tanaka (2015) *foxl3* is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. **Science**, 349, 328-331. doi: 10.1126/science.aaa2657.
- ② K. Ikami, M. Tokue, R. Sugimoto, C. Noda, S. Kobayashi, K. Hara and S. Yoshida (2015) Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. **Development**, 142, 1582-1592. doi: 10.1242/dev.118695.

- ③ Y. Ohhara, Y. Shimada-Niwa, R. Niwa, Y. Kayashima, Y. Hayashi, K. Akagi, H. Ueda, K. Yamakawa-Kobayashi and S. Kobayashi (2015) Autocrine regulation of ecdysone synthesis by  $\beta 3$ -octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 112, 1452-1457. doi: 10.1073/pnas.1414966112.
- ④ M. Mukai, S. Hira, K. Nakamura, S. Nakamura, H. Kimura, M. Sato and S. Kobayashi (2014) H3K36 trimethylation-mediated epigenetic regulation is activated by Bam and promotes germ cell differentiation during early oogenesis in *Drosophila*. **Biol. Open**, 4, 119-124. doi: 10.1242/bio.201410850.
- ⑤ M. Hayashi, M. Sato, Y. Iwasaki, T. Onozawa, N. Katayama, Y. Nagasaka, S. Sadaie, S. Kobayashi and G. Yoshizaki (2014) Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. **Biol. Reprod.**, 91, 1-8. doi: 10.1095/biolreprod.113.114140.
- ⑥ T. Nishimura, A. Herpin, T. Kimura, I. Hara, T. Kawasaki, S. Nakamura, Y. Yamamoto, T. Saito, J. Yoshimura, S. Morishita, T. Tsukahara, S. Kobayashi, K. Naruse, S. Shigenobu, N. Sakai, M. Scharf and M. Tanaka (2014) Analysis of a novel gene, *Sdgc*, reveals sex chromosome-dependent differences of medaka germ cells prior to gonad formation. **Development**, 141, 3363-3369. doi: 10.1242/dev.106864.
- ⑦ H. Chanut-Delalande, Y. Hashimoto, A. Pélissier-Monier, R. Spokony, A. Dib, T. Kondo, J. Bohère, K. Niimi, Y. Latapie, S. Inagaki, L. Dubois, P. Valenti, C. Polesello, S. Kobayashi, B. Moussian, K. White, S. Plaza, Y. Kageyama and F. Payre (2014) Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. **Nat. Cell Biol.**, 16, 1035-1044. doi: 10.1038/ncb3052.
- ⑧ R. SM Lim, A. Anand, C. Nishimiya-Fujisawa, S. Kobayashi and T. Kai (2014) Analysis of Hydra PIWI proteins and piRNAs uncover early evolutionary origins of the piRNA pathway. **Dev. Biol.**, 386, 237-251. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.12.007.

- ⑨ S. Hira, T. Okamoto, M. Fujiwara, H. Kita, S. Kobayashi and M. Mukai (2013) Binding of *Drosophila* maternal Mamo protein to chromatin and specific DNA sequences. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 438, 156-160.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.045.
- ⑩ C. Nishimiya-Fujisawa and S. Kobayashi (2012) Germline stem cells and sex determination in *Hydra*. **Int. J. Dev. Biol.**, 56, 499-508. doi: 10.1387/ijdb.123509cf
- ⑪ Y. Hayashi, T. R. Sexton, K. Dejima, D. W. Perry, M. Takemura, S. Kobayashi, H. Nakato, and D. A. Harrison (2012) Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. **Development**, 139, 4162-4171.  
doi: 10.1242/dev.078055

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① S. Morita, R. Ota, S. Kobayashi "Functional analysis of *NHP2*, a candidate gene downstream of *Sex lethal* in *Drosophila*" 48th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015 年 06 月 03 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)
- ② 太田龍馬、佐藤昌直、小林悟 「ショウジョウバエ生殖系列における性決定遺伝子 *Sxl* およびその標的遺伝子の機能」第 86 回日本動物学会大会、2015 年 09 月 17 日、朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
- ③ 小林悟 「ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機能の新展開」第 86 回日本動物学会大会(招待講演)、2015 年 09 月 17 日、朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
- ④ 小林悟 「生殖細胞の特質とその形成機構」第 60 回日本生殖医学会講演会(招待講演)、2015 年 04 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- ⑤ S. Kobayashi "Germline formation by maternal factors in *Drosophila* embryos" 7th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演)、2014 年 05 月 27 日～2014 年 05 月 30 日、WINC Aichi (愛知県・名古屋市)
- ⑥ C. Fujisawa, S. Kobayashi "Germline formation from multipotent stem cells in *Hydra*" 7th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演)、2014 年 05 月 27 日～2014 年 05 月 30 日、WINC AICHI (愛知県・名古屋市)
- ⑦ C. Nishimiya-Fujisawa, S. Kobayashi "Generation of sperm stem cells from multipotent stem cells in *Hydra*" The 58/ 60th NIBB Conference, 2012 年 07 月 17 日～2012 年 07 月 21 日、岡崎カンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)
- ⑧ S. Kobayashi "Mechanism regulating germline sexual identity in *Drosophila* embryos" The 58/ 60th NIBB Conference (招待講演)、2012 年 07 月 17 日～2012 年 07 月 21 日、岡崎カンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)
- ⑨ 太田龍馬、小林悟 「ショウジョウバエ始原生殖細胞における性決定遺伝子 *Sxl* の発現制御機構の解析」日本動物学会 第 83 回大会、2012 年 09 月 13 日～2012 年 09 月 15 日、大阪大学豊中キャンパス (大阪府・豊中市)
- ⑩ 小林悟 「ショウジョウバエの生殖系列の形成とその雌雄を決定するメカニズム」日本動物学会 第 83 回大会 (招待講演)、2012 年 09 月 13 日～2012 年 09 月 15 日、大阪大学豊中キャンパス (大阪府・豊中市)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ:

<http://skob.tara.tsukuba.ac.jp/Top/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 悟 (KOBAYASHI, Satoru)

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号:90225508