

## 時系列生命現象研究領域

(発生遺伝)

小林 悟 (教授)

1) 専門領域：発生生物学

2) 研究課題：

- a) 極細胞中における母性 *Ovo* タンパク質の機能
- b) *Sxl* 遺伝子による始原生殖細胞自律的な性決定機構
- c) JAK/STAT リガンド分布制御におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 極細胞中における母性 *Ovo* タンパク質の機能

ショウジョウバエの卵中には生殖質と呼ばれる特殊な細胞質が局在しており、これを取り込んだ極細胞（始原生殖細胞）のみが生殖細胞に分化する。これまで、生殖質中に局在する未知の母性因子の働きにより、生殖系列特異的な遺伝子発現が活性化され、その結果、始原生殖細胞が生殖細胞へと分化するように運命づけられると考えられてきた。この母性因子の候補として、*ovo* 遺伝子に注目して機能解析を行なってきた。母性 *Ovo* タンパク質は、特定の DNA 配列に結合し転写を活性化する転写因子として知られている。この機能を特異的に阻害することのできるリプレッサーを始原生殖細胞特異的に発現させることにより母性 *Ovo* の機能阻害をおこなった結果、始原生殖細胞は徐々に退化し、最終的に生殖細胞が形成されない不妊の表現型が観察された。このことから、母性 *Ovo* タンパク質は始原生殖細胞内で遺伝子発現を活性化することにより、生殖細胞への発生を制御する重要な母性因子であると考えられる。母性 *Ovo* タンパク質の機能をリプレッサーの発現や RNA 干渉法により阻害しマイクロアレイ解析を行うことにより、母性 *Ovo* により活性化される遺伝子を網羅的に同定する解析が進行中である。

b) *Sxl* 遺伝子による始原生殖細胞の性決定機構

これまでの研究から、始原生殖細胞特異的に *Sxl* 遺伝子の機能を抑制すると、雌の始原生殖細胞は卵形成を行うことが出来なくなること、雄の始原生殖細胞で *Sxl* を強制発現し、雌個体に移植すると、移植された始原生殖細胞は、卵を形成することが明らかとなった。以上の結果は、始原生殖細胞の雌化に *Sxl* の機能が重要かつ十分であることを示している。すなわち、*Sxl* は、始原生殖細胞の雌化を決定するためのマスター遺伝子として働いていることが明らかになった。*Sxl* は、

RNA 結合タンパク質であり、特定の RNA に結合し、スプライシングや翻訳を制御することが知られている。始原生殖細胞中において Sxl に結合する RNA を同定し、Sxl の下流で働く遺伝子を明らかにする研究が進行中である。

#### d) JAK/ STAT リガンド分布制御におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

細胞内シグナルの一種、JAK/ STAT シグナルは、幹細胞を維持や、組織の形作り、免疫応答などの様々な生命現象を制御することが知られている。JAK/ STAT シグナルを活性化するリガンドが組織内で正確な空間パターンをもって分布することは、幹細胞の維持や組織の形態形成の理解に重要である。しかし、JAK/ STAT リガンドの組織内での分布が、どのような仕組みで制御されているのかは不明であった。

私たちは、ショウジョウバエの卵巣をモデルとして用いることで、その分布を制御する分子の特定を試みた。JAK/ STAT シグナルは、ショウジョウバエの卵形成過程においてモルフォゲンとして機能すると考えられてきたが、リガンドの可視化が困難であったため、その分布の様式や、それを制御する仕組みは不明であった。そこで私たちは、JAK/ STAT リガンドの可視化の方法の確立を試み、次にリガンドの分布を制御する分子の特定を試みた。分布を制御する分子としては、細胞外環境の主要な構成因子のひとつである、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の働きに着目した。

HSPG はヘパラン硫酸鎖 (HS 鎖) を側鎖としてもつ糖タンパク質の一種である。細胞外環境における HSPG の重要な働きの一つは、その側鎖あるいはタンパク質部位に様々なリガンド結合することで、リガンドの分布を制御することである。特に GPI アンカーを介して細胞膜表面に結合するタイプの HSPG (グリピカン) は、細胞増殖シグナルのリガンド制御における機能解析が進んでおり、これまでに BMP、Wnt, Hh などの分布を制御することが知られていた。しかし、グリピカンが JAK/ STAT シグナルのリガンドを制御するかどうかは不明であった。

研究の第一歩として、卵巣において JAK/ STAT リガンド (Upd) を可視化することにより、その分布を観察した。その結果、Upd は産生細胞を起点として、濃度勾配をつくって分布することが明らかになった。この卵巣の一部の細胞において、グリピカンの働きを阻害したところ、細胞の表面から Upd の分布は消失した。反対に、一部の細胞でグリピカンを過剰発現した場合、その細胞表面において Upd は異所的に分布することが明らかとなった。以上の結果は、Upd の分布は、細部表面のグリピカンと結合することにより制御されることを示唆している。これは JAK/ STAT シグナルのリガンド分布を制御する仕組みを明らかにした初めて例であり、組織内における JAK/ STAT リガンドの分布制御が重要な、幹細胞維持、組織の形態形成などの全ての生命現象を理解する上で基礎となるものである。

#### 4) 学術論文

**Hayashi, Y., Sexton, T. R., Dejima, K., Perry, D. W., Takemura, M., Kobayashi, S., Nakato,**

**H., Harrison, D. A.**, "Glypicans regulate JAK/ STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen" *Development*, **139**, 4162-4171 (2012).

**Ohhara, Y., Kayashima, Y., Hayashi, Y., Kobayashi, S., Yamakawa-Kobayashi, K.** "Expression of  $\beta$ -adrenergic-like octopamine receptors during *Drosophila* development" *Zoological Science*, **29**, 83-89 (2012).

5) 著書、総説

**Nishimiya-Fujisawa, C., Kobayashi, S.** "Germline stem cells and sex determination in Hydra" *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, 499-508 (2012).

6) 国際会議発表リスト

**Kobayashi, S.** "Mechanism regulating germline sexual identity in *Drosophila* embryos" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

**Nishimiya-Fujisawa, C., Kobayashi, S.** "Generation of sperm stem cells from multipotent stem cells in *Hydra*" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

**Hayashi, Y., Noda, C., Kobayashi, S.** "Role of Glycolysis in Primordial-Germ-Cell Development in *Drosophila* Embryos" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

**Sato, M., Mon, H., Kusakabe, T., Kobayashi, S.** "Establishment of resources to elucidate regulatory network governing germline gene expressinn using *Bombyx mori* cell line BmN4-SID1" Germline, Specification, Sex and Stem Cells, The 58/ 60th NIBB Conference, Okazaki, July, 2012.

7) 招待講演

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、大阪、2012 年 9 月

林良樹 「ショウジョウバエ配偶子形成過程におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割」 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月

8) 学会および社会的活動

第35回 日本分子生物学会年会 ワークショップ オーガナイザー (林良樹)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

藤田保健衛生大学医学部客員教授

筑波大学非常勤講師

10) 受賞、表彰

11) 外部獲得資金

科研費 新学術領域研究 (計画)、「ショウジョウバエ卵巣／精巣における GSC／ニッチ・システムの解明」、小林悟 (代表) (2008 年-2012 年)

科研費 基盤 A、「ショウジョウバエ生殖細胞系列の性決定機構の解明」、小林悟 (代表) (2012 年-2015 年)

科研費 新学術領域研究 (公募)、「ショウジョウバエ生殖系列における転写制御機構における細胞内代謝状態の役割」林良樹 (代表) (2012 年-2013 年)

科研費 若手 B、「不妊を引き起こす生殖細胞発生異常のシステム解析」、佐藤昌直 (代表) (2011-2013 年)

科研費 基盤 A、「システムバキュロウイルス学の幕開け-タンパク質超発現システムの解明と再構築-」、佐藤昌直 (分担) (2010-2013 年)

12) 特許