

生命時空間設計研究領域

(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) カイコ生殖系列培養細胞株を用いた *vasa* 遺伝子を活性化する遺伝子ネットワークの解析
- c) 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

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により阻害しマイクロアレイ解析を行った。その結果、母性 *Ovo* タンパク質は、極細胞中において（体細胞全体と比較し）高発現する遺伝子の活性化に関与し、逆に極細胞で（体細胞と比較し）発現が低い遺伝子の抑制に関わる傾向があることが明らかとなった。今後は、下流遺伝子の機能解析を進める予定である。

b) カイコ生殖系列培養細胞株を用いた *vasa* 遺伝子を活性化する遺伝子ネットワークの解析

解析が行われているほとんど全ての動物の生殖系列において *vasa* や *nanos* さらに *piwi* 等の遺伝子が発現していることが明らかになっている。これら生殖系列遺伝子が発現活性化することが、生殖系列の確立ととらえることができる。しかし、これまでに生殖系列遺伝子の活性化機構はほとんど明らかになっていない。この問題を解決するため、生殖系列

遺伝子の活性化に関わる遺伝子ネットワークを解明することを試みている。この解析を行う上での培養細胞の優れた利点を考慮し、カイコ生殖系列培養細胞株 (BmN4-SID1) を用いてネットワーク解析を開始した。 *vasa* の活性化に関わる遺伝子を RNAi スクリーンで同定し、 *ovo* を含むそれらの遺伝子を出発点として、1) それぞれの遺伝子の機能阻害によるゲノムワイドな遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーを用いて明らかにし、2) そのデータを基にシステム生物学的解析によりネットワークを構築することを行ってきた。これまでに、ごく一部ではあるがネットワークを描くことが可能になり、今後 *vasa*, *nanos*, *piwi* 等の生殖系列遺伝子の活性化に関わるネットワークの主要部が明らかになると期待される。ネットワーク中で制御に重要な遺伝子を特定し、その *in vivo* における機能をショウジョウバエ始原生殖細胞を用いて明らかにすることにより、ネットワークの妥当性と保存性を検証する。

c) 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

ショウジョウバエの生殖幹細胞は精巣および卵巣の先端部分において、ニッチ細胞と呼ばれる特殊な生殖巣体細胞に接するように存在している。ニッチ細胞は生殖幹細胞の維持に必要な細胞増殖因子 (ニッチシグナル) を分泌することで、ニッチ細胞に接する生殖幹細胞を維持する。しかし、分泌性のニッチシグナルがなぜニッチ細胞の近傍にのみとどまり、その領域にのみ幹細胞を維持することができるのか、その分子メカニズムは明らかになっていない。ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) はヘパラン硫酸を側鎖として持つ糖タンパク質の一種であり、細胞膜表面あるいは細胞外基質を構成する主要な因子の一つであり、その側鎖あるいはタンパク質部位に様々な細胞増殖因子を結合することにより、増殖因子の空間的分布を制御する。私たちはこの HSPG の分子機能に着目して研究を行った結果、膜結合型 HSPG であるグリピカンが、それぞれ卵巣および精巣のニッチ細胞で発現すること、そしてその働きが生殖幹細胞の維持に必要であること、卵巣においてグリピカンをニッチ細胞以外で異所的に発現した場合、幹細胞の存在する領域の拡大が誘導されることを明らかにしてきた。さらに、膜貫通型 HSPG であるシンデカンおよび分泌型 HSPG であるパールカンもニッチ細胞において発現が観察され、生殖幹細胞維持に関与することを示す結果が得られた。今後は、これら HSPG の機能を阻害した卵巣におけるニッチシグナルである Dpp 分子の分布を可視化することを試み、3 種類の HSPG がニッチシグナルの分布に及ぼす影響について明らかにすることを試みる。

4) 学術論文

Hira, S., Okamoto, T., Fujiwara, M., Kita, H., Kobayashi, S. and Mukai, M. "Binding of *Drosophila* maternal Mamo protein to chromatin and specific DNA sequences" *Biochem Biophys Res Commun*, **438**, 156-160 (2013).

Dejima, K., Takemura, M., Nakato, E., Peterson, J., Hayashi, Y., Kinoshita-Toyoda, A,

Toyoda, H., Nakato, H. "Analysis of *Drosophila* glucuronyl C5-epimerase: implications for developmental roles of heparan sulfate sulfation compensation and 2-O-sulfated glucuronic acid" *J. Biol. Chem.*, **288**, 34384-34393 (2013).

Lim, R., Anand, A., Nishimiya-Fujisawa, C., Kobayashi, S. and Kai, T. "Analysis of Hydra PIWI proteins and piRNAs uncover early evolutionary origins of the piRNA pathway" *Dev. Biol.*, **386**, 237-251 (2014).

5) 著書、総説

6) 国際会議発表リスト

Hayashi, Y. "Role of Glycolysis in Primordial-Germ-Cell Development in *Drosophila* embryos" International Symposium on Transcription and Metabolism, Hyogo, Nov, 2013.

7) 招待講演

小林悟 「生物が命をつなぐメカニズム」 静岡大学附属浜松、浜松、2013年10月

林良樹 「ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における解糖系の役割」
第一回がんと代謝研究会、山形、2013年10月

林良樹 「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」
第二回発生過程におけるエネルギー代謝を考える会、愛知、2013年2月

8) 学会および社会的活動

日本動物学会中部支部代表委員

日本発生生物学会運営委員

愛知県立岡崎高校 SSH 運営指導委員

愛知県立時習館高校 SSH 評価委員

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

高知大学非常勤講師（林良樹）

10) 受賞、表彰

11) 外部獲得資金

科研費 新学術領域研究（総括班）、「動物における配偶子産生システムの制御」、小林悟（代表）（2013年-2017年）

科研費 新学術領域研究（計画）、「ショウジョウバエ PGC の形成を制御する遺伝子ネットワークの解明」、小林悟（代表）（2013 年-2017 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 A、「ショウジョウバエ始原生殖細胞におけるミトコンドリア品質管理機構の解析」林良樹（代表）（2013 年-2016 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）