

生殖幹細胞の増殖を制御する因子の探索—ショウジョウバエを用いた解析—

吉成 祐人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

次世代に生命を継承するためには、卵が安定的に供給されることが必要である。卵をつくる大本となる細胞は生殖幹細胞と呼ばれ、この幹細胞の自己増殖と分化のバランスが適切に制御されることが卵の安定的な供給に必須である。生殖幹細胞の自己増殖と分化のバランスを制御する微小環境を「ニッチ」と呼び、ニッチから生殖幹細胞へと送られる局所因子に関する研究がこれまでに多く行われてきた²。一方、多くの動物において、個体を取り巻く周囲の外環境によって卵形成過程が影響を受ける事例が報告されている³。卵形成の出発点が生殖幹細胞であることを考えると、外環境のシグナルはニッチに伝えられ、生殖幹細胞の増殖や分化のバランスを調節することが予想される。しかしながら、外環境が、卵形成過程の中でも生殖幹細胞の増殖や維持に影響を与えるのかについては、現在まで報告が少ない。

このような背景の中で、当研究室の天久らが、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、交尾の刺激が生殖幹細胞の増殖を促すことを発見した。また、その交尾依存的な生殖幹細胞の増殖には、オスの精液中の因子がメスの神経系で受容されることで起こる性ペプチドシグナリングの活性化と、それに引き続く卵巣におけるステロイドホルモン生合成の活性化が必要であることを明らかにした⁴。しかし、交尾刺激の情報がどのように卵巣のニッチへと伝えられているか、その分子メカニズムの全容解明にはほど遠い。

この問題にアプローチするために私は、神経細胞、あるいは卵巣内のニッチ構成細胞や生殖幹細胞で機能する膜受容体タンパク質群に着目した。刺激などの外環境の情報が神経で受容され、最終的に生殖幹細胞へ伝達されるということから、何らかのシグナルを受容する膜受容体が重要な機能を持つと予測できたからである。本研究において私は、キイロショウジョウバエのゲノムにコードされた膜受容体遺伝子 266 種のノックダウンを卵巣内体細胞と神経細胞特異的に行い、交尾前後での生殖幹細胞の数を比較することで、生殖幹細胞の増殖に関わる膜受容体とリガンドを特定することを目指した。

方法

(1) 膜受容体遺伝子ノックダウンの方法

膜受容体遺伝子のノックダウンを組織特異的に行うために、異所的遺伝子発現系である GAL4-UAS システムを用いた。これは、酵母由来の転写因子 GAL4 をショウジョウバエの特定のエンハンサーの制御下で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS の下流に配置した遺伝子を誘導させるシステムである。本研究では、神経と卵巣のニッチ特異的 GAL4 ドライバーである *c587-GAL4* システムと、266 種の膜受容体遺伝子それぞれの UAS-RNAi システムをかけ合わせることで、膜受容体遺伝子がノックダウンされたメス個体を得た。

(2) 個体の飼育と交尾・解剖

メス個体は 25°C で飼育した。羽化後 3 日目から 4 日目の間の 24 時間、野生型オス個体と共にプラスチックバイアルに入れ、交

配させたメス個体を「交尾後メス」とした。一方、オス個体を存在させずに同等の時間を経過させたメス個体を「未交尾メス」とした。交尾後メスと未交尾メスのそれぞれを羽化後 4 日目で解剖し、取り出した卵巣を固定した。

(3) 生殖幹細胞とニッチの免疫組織化学染色法

ニッチと生殖幹細胞は免疫組織化学染色によって可視化した。4%パラホルムアルデヒド/PBS で卵巣組織を固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBS でブロッキング処理した。生殖幹細胞とニッチ構成細胞を可視化するために、1 次抗体として抗 1B1 抗体⁵と抗 DE-カドヘリン抗体をそれぞれ用いた⁶。その後、Alexa 蛍光標識 2 次抗体を加え、染色した。

(4) 生殖幹細胞数の計測と評価

1 つの卵巣小管 (卵巣を構成している小さな管) 内にいくつの生殖幹細胞が存在するかを、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss AxioPlan) を用いて計測した。計測は、1 種類の膜受容体遺伝子ノックダウンシステムについて、未交尾メスと交尾後メスのそれぞれ 50 卵巣小管ずつに対して行った。マンホイットニーの *U* 検定を用いて交尾前後の生殖幹細胞数に有意差があるかどうかを検定し、交尾依存的な生殖幹細胞の増殖の有無を評価した。

結果・考察

266 種の膜受容体遺伝子それぞれのノックダウンメス個体の交尾前後での生殖幹細胞の数を計測した。その結果、100 種以上の膜受容体ノックダウン個体において、生殖幹細胞の増殖に異常がみられ、その表現型は「交尾後の生殖幹細胞の増殖が起らないもの」と「交尾前に生殖幹細胞が増殖するもの」の 2 つに大別することができた。さらに、ノックダウンによって異常な表現型を示した膜受容体の内、約 30 種が神経ペプチド受容体であった。交尾依存的な生殖幹細胞の増殖が神経系を介することから、これら約 30 種の神経ペプチド受容体が生殖幹細胞の増殖を制御する神経系のシグナリングに関与すると考えられる。また、ノックダウンによって異常な表現型を示した膜受容体の中には、リポタンパク質受容体などの神経ペプチド受容体以外の膜受容体も多数存在した。このことから、生殖幹細胞の増殖には、非神経性の液性因子のシグナルも関わりと考えられる。

本研究によって、生殖幹細胞の増殖の制御にリポタンパク質受容体をはじめとする様々な因子に関わり、中でも多数の神経伝達物質による制御が存在することが初めて示唆された。本研究は、交尾をはじめとする外環境の情報と生殖幹細胞の増殖制御機構とを繋ぐ、新たな経路を明らかにする可能性を秘めている。

参考文献

- Schofield, R. *Blood Cells* **4**, 7-25 (1978).
- Fuller, M. T. & Spradling, A. C. *Science* **316**, 402-404 (2007).
- Davies, S. & Deviche, P. *Horm. Behav.* **66**, 41-55 (2014).
- Ameku, T. & Niwa R. submitted.
- Zaccari, M. & Lipshitz, H. D. *Zygote* **4**, 159-166 (1996).
- Oda, H. et al. *Dev. Biol.* **165**, 716-726 (1994).