

ショウジョウバエ始原生殖細胞において性特異的発現を示す遺伝子の同定

渡邊 隆寛 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 悟 (筑波大学 TARA センター)

【背景・目的】

有性生殖をおこなう動物では、個体の形態や機能にオスとメスの性差が生じ、それぞれ精子や卵という生殖細胞が作られる。いくつかの動物種において、個体（体細胞）の性決定機構は明らかになっているが、生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞の性決定機構に関しては不明な点が多い。そのような動物の中でもよく研究されているショウジョウバエでは、体細胞とは異なる機構によって、始原生殖細胞の性が決定することが知られている。たとえば、オスの始原生殖細胞では、*Phf7* と呼ばれる遺伝子が発現し、オス化に関わる。一方、メスの始原生殖細胞では *Sxl* と呼ばれる遺伝子が発現しメス化に関わる。しかし、この2種類の遺伝子以外にも始原生殖細胞の性決定に関わる遺伝子が存在すると予想されている。このような遺伝子を明らかにするためには、始原生殖細胞において性特異的発現する遺伝子を同定すること、その機能を解析し始原生殖細胞の性決定に関わるかを明らかにすることが必要である。

本研究では、その第1段階として、ショウジョウバエの始原生殖細胞において性特異的発現（あるいは性差を示す発現）がみられる遺伝子を同定することを試みた。本研究室では、胚発生後期の胚からセルソーターを用いて単離したメス及びオスの始原生殖細胞のトランスクリプトームを RNA-seq 法で解析した先行研究のデータが利用できる。そこで、このデータを利用して、始原生殖細胞で発現している遺伝子のうち、雌雄の始原生殖細胞での発現量の差が2倍以上ある遺伝子に着目した。オスと比較して、メスの始原生殖細胞での発現比が最も高かった遺伝子として、CR40469 を選択した。この遺伝子は、タンパク質に翻訳されない Long non-coding RNA をコードしている。最近、Long non-coding RNA は遺伝子発現調節に関わることが明らかになりつつあり、ショウジョウバエの体細胞では性特異的な遺伝子発現調節に Long non-coding RNA が関与していることが知られている。一方、メスと比較してオスの始原生殖細胞において高発現する Long non-coding RNA をコードする遺伝子として、CR43967 に注目した。本研究では、これらの遺伝子のオス・メス始原生殖細胞における発現を解析した。

【材料・方法】

野生型のショウジョウバエの胚(ステージ1-16)から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それをテンプレートとし、PCR により、CR40469 と CR43967 に特異的な断片(それぞれ 204kbp、209kbp)を増幅し、pGEM-T Easy ベクタープラスミドにクローニングを行った。プラスミドから RNA ポリメラーゼプロモーターを含む遺伝子断片を PCR で増幅し、それをテンプレートとして、*in vitro* 転写により、ジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたアンチセンスとセンスプローブを合成した。

CR40469 と CR43967 に対するアンチセンスプローブとセンスプローブを用いて、産卵後 0~16 時間の胚に対して *in situ* hybridization を行った。

上記遺伝子発現を解析するための胚として、メスの始原生殖細胞では、GFP と Ds-Red を発現し、オス始原生殖細胞では、GFP のみを発現する系統を用いた。

【結果】

現在 CR40469 と CR43967 のアンチセンス及びセンスプローブを用いて、*in situ* hybridization を行なっている。現在までに、少なくとも CR40469 RNA が、オスと比較してメスの始原生殖細胞で高発現することを示唆する予備的な結果が得られている。卒業研究発表会までには CR40469 および CR43967 RNA の始原生殖細胞における発現解析を行う予定である。