

ショウジョウバエの始原生殖細胞における体細胞分化抑制遺伝子(*nanos*, *pgc*)の機能解析

香山 瑞生 (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

ショウジョウバエ胚の後極に局在する生殖質と呼ばれる卵細胞質中には、生殖細胞の形成に必要な十分な母性因子が含まれており、生殖質を取り込む細胞が始原生殖細胞(極細胞)となる。極細胞は、生殖巣へと移動し、次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞である生殖細胞(配偶子)へと分化する。極細胞が正常に生殖細胞に分化するためには、極細胞の体細胞分化を抑制すること、生殖細胞への分化を促進すること、が必要と考えられてきた。本研究では、このうち体細胞分化の抑制に着目して研究を行った。体細胞分化の抑制に関わる母性因子として、Nanos タンパク質と Pgc ペプチドが知られている。Pgc は、初期胚の極細胞で一過的に RNA polymerase II による転写を抑制することで、体細胞性遺伝子の転写を低く抑えている。一方、Nanos は、翻訳抑制タンパク質として知られ、複数のターゲット mRNA が同定されている。Nanos は、そのターゲットの1つである *importin α-2* mRNA の翻訳を抑制し、核移行レセプターである Importin α-2 の産生を妨げることで、体細胞性遺伝子の転写に関わるタンパク質の核移行を抑制する。これまで、Nanos と Pgc それぞれが体細胞分化の抑制に関わるということが明らかになってきたが、両者による抑制が解除された場合に、極細胞にどのような変化が見られるのかは解析されていなかった。そこで本研究では、Nanos のターゲットである Importin α-2 タンパク質の過剰発現 (Imp α 2 OE) と同時に *pgc* の機能も欠失 (*pgc*⁻) させた胚 (*pgc*⁻/Imp α 2 OE) の極細胞にどのような形態学的変化が見られるのかを解析した。

方法

・免疫染色

産卵後 2~4 時間のショウジョウバエの胚で抗体染色を行った。1 次抗体として chick anti-Vasa 抗体を、2 次抗体として Alexa488 標識 goat anti-chick IgY 抗体を用いた。

・RNA seq

産卵後2~3時間のショウジョウバエの胚から極細胞を100細胞分取し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kitを用いて cDNA の合成・増幅を行い、Bioanalyzer でサンプルの品質を確認した。今後、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行っていく。

結果

Vasa タンパク質は、極細胞にのみ発現が観察されるため、極細胞のマーカーとして用いられている。そこで、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚、正常胚として *y w* 胚における極細胞の形態を Vasa 免疫染色により観察した。その結果、正常胚では極細胞のほぼ全ては丸い形態を示すのに対し、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚では細胞突起を伸ばすことを見出した(図1)。この表現型は胚発生ステージ 5~6 という短い間で観察され、その前後のステージではこのような形態的変

化は観察されなかった。次いで、この表現型をより詳細に観察するため、共焦点顕微鏡で撮影した画像を画像解析ソフトで解析し、異常な極細胞の割合をスコアした。その結果、正常胚と比較し、Imp α 2 OE、*pgc*⁻、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚では有意に細胞突起を持つ極細胞の割合が増加していた。この異常な極細胞の割合は、Imp α 2 OE、*pgc*⁻ 胚と比較して、*pgc*⁻/Imp α 2 胚で有意に高かった。

次に、*nanos* と *pgc* の double mutant (*nanos*⁻/*pgc*⁻) 胚について観察を行った。その結果、*nanos*⁻/*pgc*⁻ では、*pgc*⁻/Imp α 2 OE で観察された細胞突起を有する極細胞はほとんど観察されず、多くの極細胞は、核が不明瞭になり、膨潤し、空胞が形成されるという表現型を示した。この極細胞の形態異常を引き起こす要因を調べるため、RNA seq 法を用いて遺伝子発現の解析を現在行っている。



図1 左: 正常胚、右: *pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚

考察と展望

本研究では、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚の極細胞に細胞突起が生じることが明らかとなった。この表現型は、体細胞分化抑制の解除による極細胞の体細胞化によるものと予想している。この極細胞と同様の形態をもつ体細胞を探索したところ、休眠神経幹細胞の形態と類似していることが分かった。また、RNA seq の結果から、*nanos* や *pgc* の機能を欠失した胚では、休眠神経幹細胞で発現する遺伝子 (*mira*, *dpn*, *cas*, *pros* など) の発現が正常な極細胞と比べて上昇していることも明らかになっている。したがって、体細胞分化抑制が失われたことで、神経への分化が生じているのではないかという仮説を立てている。また、*nanos*⁻/*pgc*⁻ 胚において同様の表現型が見られなかった原因として、*nanos* の機能欠失により Importin α-2 が関わる経路以外にも異常が生じ、それによって細胞突起を持つという表現型とは異なる異常が観察されたのではないかと考えている。今後は、RNA-seq による *pgc*⁻/Imp α 2 OE 胚の極細胞における遺伝子発現の解析や、*in situ* hybridization によって、*pgc*⁻/Imp α 2 OE 極細胞における神経化の指標となる遺伝子の発現を解析するとともに、*nanos*⁻/*pgc*⁻ 胚の極細胞における遺伝子発現解析も行う予定である。