

ショウジョウバエ始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子の探索

三浦 博樹 (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

有性生殖を行う動物では、発生の進行に伴って個体の形態や機能に雌雄差が生じ、それぞれ卵や精子である生殖細胞が作られる。生殖細胞の前駆細胞は、始原生殖細胞と呼ばれ、この細胞がオス化すれば精子に、メス化すれば卵に分化する。始原生殖細胞の性決定機構を明らかにすることは、生殖生物学や発生学分野において重要な課題であるにもかかわらず、未だ不明な点が多く残されている。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*: 以下ショウジョウバエ) では、体細胞と異なる機構によって、始原生殖細胞の性が決定する。たとえば、周囲のオス体細胞からのシグナルにより、始原生殖細胞は非自律的にオス化する[1]。また、始原生殖細胞中で発現する遺伝子の働きにより、自律的に性が決定されることも明らかになっている。そのような遺伝子として、メス化に関わる *Sxl*、オス化に関わる *Phf7* が知られている[2,3]。しかし、この 2 遺伝子以外にも始原生殖細胞自律的な性決定に関与する遺伝子が存在すると予想されている。そこで本研究では、ショウジョウバエ始原生殖細胞における発現に性差が見られる遺伝子を同定し、その機能を解析することによって始原生殖細胞の性決定に関与する新規遺伝子を同定することを目指した。

方法

・候補遺伝子の選定

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およびオス始原生殖細胞のトランスクリプトームを RNA-seq 法によって解析したデータに加え、胚全体の細胞および始原生殖細胞内で発現する遺伝子をマイクロアレイ法によって網羅的に解析したデータを利用できる。そこで、前者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 倍以上ある遺伝子を選択した。次いで、マイクロアレイデータを利用して、体細胞に比べて始原生殖細胞で 4 倍以上高発現している 33 遺伝子を選択した。また、体細胞に比べて始原生殖細胞で高発現していないが雌雄の始原生殖細胞での発現量が 4 倍以上異なる 16 遺伝子も加え、計 49 遺伝子を候補遺伝子として選定した。

・候補遺伝子の発現解析

野生型のショウジョウバエの胚 (ステージ 1~16) および成虫から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それらをテンプレートとして、PCR により候補遺伝子に特異的な遺伝子断片を増幅し、pGEM-T Easy ベクタープラスミドにクローニングを行った。このプラスミドから 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、これをテンプレートとして *in vitro* 転写を行い、ジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたアンチセンスおよびセンスプローブを合成した。その後、これらのプローブを用いて、産卵後 0~16 時間の胚に対して *in situ* hybridization を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて始原生殖細胞における発現を観察した。この際、オスとメスを区別するた

めに、メスの始原生殖細胞でのみ Ds-Red (Redstinger) を発現する胚を用いた。

・候補遺伝子のノックダウンによる機能解析

in situ hybridization によって始原生殖細胞での発現に雌雄差が認められた遺伝子に対する *UAS-RNAi* 系統を Bloomington Drosophila Stock Center および Vienna Drosophila Resource Center から入手した。それらの系統のオスと始原生殖細胞で Gal4 を発現する系統 (*nos-GAL4*) のメスを交配し、始原生殖細胞で候補遺伝子をノックダウンした個体を得た。これらの個体が羽化してから 3~6 日後に解剖し、精巣と卵巣の形態が異常な成虫個体数をカウントした。形態に異常が認められた卵巣と精巣に対しては免疫染色を行い、生殖系列のマーカーである Vasa タンパク質の発現を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

結果・考察

これまで、45 の候補遺伝子について *in situ* hybridization による発現解析を行った。その結果、12 遺伝子がオスに比べてメス始原生殖細胞で高発現すること、15 遺伝子がメスに比べてオス始原生殖細胞で高発現することが確認できた。これらの遺伝子の働きにより、始原生殖細胞の性差が生じる可能性がある。

そこで、これら 27 の遺伝子のうち、7 つの遺伝子に対して機能解析を行い、これらの遺伝子が始原生殖細胞の性決定に関与するかを検証した。そのうち、オスの始原生殖細胞で多く発現していた *La* 遺伝子および *Hsp83* 遺伝子を始原生殖細胞でノックダウンした個体では、精巣や卵巣の形態が異常になっているものが確認できた。これらの生殖巣を免疫染色した結果、精巣と卵巣の両方で Vasa タンパク質の発現が失われていた。このことは、*La* 遺伝子や *Hsp83* 遺伝子のノックダウンによって成虫生殖巣から生殖系列が失われたことを示しており、これらの遺伝子が始原生殖細胞 (生殖系列) の維持に必要であることを示唆している。しかし、この表現型は雌雄に関係なく観察されたことから、始原生殖細胞の性決定に関与しているとは考えにくい。

今後は、残りの候補遺伝子に対して発現解析と機能解析を行い、始原生殖細胞の性決定に関与する遺伝子の探索を進めていく予定である。

参考文献

- [1] Louise et al. *Nature* 405: 970-973 (2000)
- [2] Hashiyama et al. *Science* 333: 885-888 (2011)
- [3] Shu et al. *Developmental Cell* 22: 1041-1051 (2012)