

ショウジョウバエ始原生殖細胞における Gal4/UAS を用いた遺伝子強制発現の性差

増川 柁樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 悟 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景と目的

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, 以下ショウジョウバエ) において組織・細胞特異的な遺伝子強制発現系として、Gal4/UAS システムが広く用いられている。このシステムは、特定のプロモーター下に Gal4 配列を導入した系統と、Gal4 タンパク質の結合配列である UAS (Upstream Activation Sequence) の下流に遺伝子を導入した系統を用いる (図 1)。この二つの系統を交配することにより、次世代において組織・細胞特異的に Gal4 タンパク質が発現し、UAS 配列に結合することで UAS 配列下流の遺伝子を強制発現することができる。

これまでに UAS システムを作製するためのコンストラクトとして、3 種の UAS コンストラクト (UAS_t, UAS_p, UAS_z) が知られており、これらの違いはプロモーター/5'UTR と 3'UTR である (図 1、表 1)。これらのうち、UAS_p を用いて EGFP をショウジョウバエ始原生殖細胞 (PGC) で強制発現させた場合、胚発生期後期 (St. 16-17) のメス PGC に比べオス PGC で EGFP タンパク質の発現が高いことを示唆する結果が得られている¹。そこで本研究では、この結果を確認するとともに、他 2 種類の UAS コンストラクトを用いて生殖系列特異的に EGFP を発現させた場合に、発現の性差が観察されるかを明らかにする。

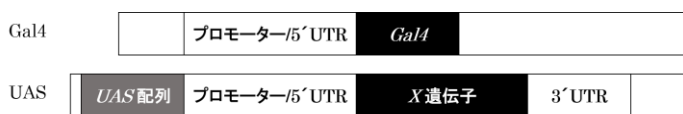


図 1 Gal4 コンストラクトと UAS コンストラクト

表 1 各コンストラクトの比較

| コンストラクト | プロモーター/5'UTR | 3'UTR |
|------------------|------------------|-------|
| UAS _p | P因子 | K10 |
| UAS _t | <i>Hsp70</i> | SV40 |
| UAS _z | <i>Hsp70</i> の一部 | P10 |

方法

・ UAS_t-EGFP 及び UAS_z-EGFP 系統の作製

UAS_p-EGFP は特定の染色体上の位置 (86Fa) に挿入されている既存の系統を用いた。これと同様な位置に UAS_t-EGFP と UAS_z-EGFP を挿入した 2 系統を以下のように作製した。UAS_t-attB 及び UAS_z 1.0 ベクターを制限酵素処理し、PCR で増幅した EGFP 全長配列を挿入することで UAS_t-EGFP 及び UAS_z-EGFP コンストラクトを作製した。これらコンストラクトをショウジョウバエ初期胚 (86Fa 系統) にマイクロインジェクションし、attP-attB 間における部位特異的組換え反応により、特定の遺伝子座 (86Fa) に導入した。

・ Gal4/UAS システムによる EGFP 強制発現及び観察

UAS_p-EGFP、UAS_t-EGFP、UAS_z-EGFP 系統および 86Fa

に挿入されていない既存の UAS_t-EGFP 系統 (既存 UAS_t-EGFP) のショウジョウバエオスと、生殖系列特異的に発現する Nanos 遺伝子のプロモーターで制御される Gal4 を持つ系統 (Nanos-Gal4 系統) のメスを交配し、次世代の生殖系列において EGFP を発現させた。胚は、4%PFA で固定し、EGFP タンパク質、生殖系列マーカーの Vasa タンパク質、及びメスマーカーの Sxl タンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

結果

各コンストラクトを用いた場合の PGC における EGFP タンパク質の発現量を調べた。その結果、UAS_p-EGFP と UAS_z-EGFP 系統を用いた場合、胚発生ステージ 15-16 (St. 15-16) において、メスに比べてオス PGC で EGFP 発現が有意に高く観察された。一方、既存 UAS_t-EGFP 系統を用いた場合では、St. 15-16 において EGFP 発現の性差は観察されなかった。

これに対し、St. 14 では逆に、既存 UAS_t-EGFP 系統を用いた場合、メスに比べてオス PGC で EGFP 発現が有意に高いのに対し、UAS_p-EGFP と UAS_z-EGFP 系統では、その性差が観察されなかった。

現在、UAS_t-EGFP からの EGFP 発現解析を行っており、既存 UAS_t-EGFP 系統からの発現と同様であるか確認する予定である。

考察と展望

本研究で、UAS_p と UAS_z を用いて EGFP を強制発現させた場合、St. 15-16 の PGC において EGFP の発現に性差が観察されることが明らかになった。この性差は UAS_t を用いた強制発現では観察されないことから、各コンストラクト間で異なるプロモーター/5'UTR と 3'UTR 内の配列が性差に寄与すると考えられる (表 1)。一方、UAS_t を用いて EGFP を強制発現させた場合、St. 14 では、PGC における EGFP 発現の性差が観察されることが明らかになった。この性差は UAS_p および UAS_z を用いた強制発現では観察されなかったことから、St. 14 と St. 15-16 では、性差を生み出す機構が異なり、St. 15-16 と St. 14 で観察された性差に寄与する配列は異なると考えている。今後は、これらの性差に寄与する配列を特定するために、プロモーター/5'UTR と 3'UTR を各コンストラクト間で入れ替えた改変コンストラクト系統を作製し、今回と同様の解析を行う予定である。また性差を生み出す配列を特定した後、その領域に既存の発現制御配列が存在するかを解析する予定である。

参考文献

1. 石崎優木. (2019). ショウジョウバエの始原生殖細胞における性特異的な遺伝子発現制御機構の解明. 修士論文.