

ショウジョウバエ始原生殖細胞における母性 Ovo タンパク質下流遺伝子の解析

古賀 結花 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 誠 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景と目的】

世代を超えて命をつなぐために次世代を生み出すことは、多くの動物に共通した特質であり、これを担う唯一の細胞が生殖細胞である。このため、生殖細胞の形成機構は、進化的に保存されていると考えられてきた。実際に、Ovo タンパク質 (Ovo) と呼ばれる転写因子が、ショウジョウバエとマウスという進化的に異なる 2 種において、共通して生殖細胞の形成に必要であることが明らかになっている[1]。このことから、Ovo は動物間で共通した生殖細胞形成機構を解明するためのカギとなる分子だと考えられる。しかし、Ovo の機能を阻害すると、ショウジョウバエ、マウスともに生殖細胞が消失するため、その詳細な役割は明らかになっていない。そこで本研究では、ショウジョウバエを用いて、生殖細胞形成過程における Ovo の役割を明らかにすることを目指した。

ショウジョウバエでは、受精卵後極の特殊な細胞質 (生殖質) を取り込んだ細胞が始原生殖細胞 (PGC) となり、これが生殖細胞へ分化する。これまでに、生殖質中には、生殖細胞の形成に必要な十分な分子が含まれることが示唆されている[2]。Ovo は、生殖質に偏在し、胚期 PGC で高発現する遺伝子の転写を活性化することが明らかにされている[1]。したがって、Ovo は、生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化することで、PGC から卵や精子である生殖細胞への分化を引き起こしている可能性が考えられる。しかし、前述したように、Ovo の機能を阻害すると幼虫期に生殖細胞が消失するため[1]、Ovo が生殖細胞の分化過程においてどのような機能を果たしているかは明らかになっていない。そこで、本研究では、PGC において Ovo が転写を活性化する遺伝子 (Ovo 下流遺伝子) を同定し、その機能を解析することで、生殖細胞形成過程における Ovo の役割を明らかにすることを目指した。

【方法】

・胚期 PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子の同定

これまでに、マイクロアレイ解析により、Ovo が転写を活性化する遺伝子として 401 個の遺伝子が同定されている[1]。そこで本研究では、これらの遺伝子の発現パターンを解析することで、胚期 PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子を同定した。401 個の遺伝子のうち、233 個については、発現パターンがデータベース [BDGP *in situ* hybridization (ISH) database] 上に公開されていたため、この記載に基づき、後期胚の PGC で発現するものを選別した。一方、残りの 168 個については記載がなかったため、ISH 法による発現解析を試みた。ISH は、DIG ラベルした RNA プローブを使用し、yw 系統の後期胚で行った。プローブの検出は、anti-DIG-AP 抗体を用い、NBT/BCIP により発色させることで行った。

・RNAi 法を用いた、Ovo 下流遺伝子の機能解析

Gal4/UAS システムにより、Ovo 下流遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現することができる系統 (UAS-dsRNA 系統) を、Bloomington Drosophila Stock Center から譲り受けた。これら

の系統のオスに、生殖細胞特異的に Gal4 を発現する *nos-Gal4-VPI6* 系統のメスを交配し、生殖系列特異的に Ovo 下流遺伝子をノックダウン (KD) した個体を得た。KD 個体の表現型は、以下の点に着目して解析した。まず、羽化後 4 日の成虫を解剖し、生殖巣の形態を解析した。さらに、KD 個体に由来する卵や精子が機能的か否かを明らかにするために、KD 個体と正常個体である *yw* 系統を交配し、生み出された次世代の孵化率を計測した。

【結果と考察】

1. 胚期 PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子の同定

401 個の Ovo 下流遺伝子[1]のうち、発現パターンがデータベースに記載されている 233 個の遺伝子については、「gonad」もしくは「germ cell」の記載がある遺伝子を選別した。その結果、21 遺伝子が後期胚の PGC において発現しており、うち 5 遺伝子は PGC 特異的に発現していた。一方、発現パターンの解析が行われていない 168 個の遺伝子については、ISH 法による発現パターンの解析を試みた。発現解析にあたり、本研究室のマイクロアレイ解析のデータを用いて、PGC における発現量が高い (シグナル値が 8 以上) 54 個の遺伝子を選定した。このうちクローニングができた 37 遺伝子について、ISH 法により発現パターンを解析した。その結果、後期胚の PGC において 17 遺伝子が発現しており、うち 5 遺伝子は PGC 特異的に発現していた。

以上の結果より、後期胚の PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子を 38 個同定した。そのうちの 10 遺伝子は PGC 特異的に発現していた。

2. Ovo 下流遺伝子の機能解析

後期胚の PGC において高発現する Ovo 下流遺伝子の機能を明らかにするために、これまでに、17 遺伝子の機能を生殖系列特異的に KD し表現型を解析した。その結果、KD することにより成虫の卵巣と精巣の退縮が観察される遺伝子を 4 遺伝子同定した。また、卵巣特異的に成熟卵の形成が阻害される遺伝子を 2 遺伝子同定した。これら 6 遺伝子は生殖系列の細胞の維持や、卵成熟に機能していることが示唆された。さらに、KD することにより次世代の孵化率が有意に低下する遺伝子を 9 遺伝子同定した。これら 9 遺伝子は、機能的な卵や精子の産生に機能していることが明らかになった。

以上より、Ovo は、これらの遺伝子の転写の活性化を介して、正常な卵や精子への分化に関与していると考えられる。今後、KD により表現型が観察された Ovo 下流遺伝子の機能をより詳細に解析するとともに、それらのオルソログがマウスの生殖細胞形成過程においても機能しているかを調べることで、進化的に保存された生殖細胞形成メカニズムの一端が明らかになると考えている。

【参考文献】

- Hayashi et al. 2017. Sci Rep. 7(1):40056.
- Illmensee and Mahowald. 1974. PNAS 71(4):1016-1020.