

## ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における解糖系によるヒストンアセチル化制御

木村 遼 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 良樹 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

近年、がん細胞や哺乳類多能性幹細胞の研究を通じて、細胞内代謝は細胞の生存を司る“ハウスキーピング”な役割を超えて、細胞の性質を制御していることが注目されている。しかし、このような知見は主に培養細胞を用いた研究が主流であるため、生体内細胞における代謝の役割については理解が十分に進んでいない。

ショウジョウバエの始原生殖細胞(PGC)は未分化性の高い幹細胞様の細胞であることが知られている。ショウジョウバエ PGC の発生は次の様に進行する。PGC は初期胚の後極に形成される。その後、PGC は胚内を移動し、後期胚において生殖巣に取り込まれ、生殖細胞に分化する。

この一連の発生過程において、PGC がもつ代謝状態およびその役割の解明が所属研究室の先行研究において試みられた。その結果、初期胚の PGC は体細胞に比べて高い解糖系活性を持つこと、PGC における高い解糖系活性は発生が進行するに伴い減弱することが明らかになった。さらに、後期胚の PGC において遺伝学的操作により解糖系を亢進したところ、PGC の分化過程が阻害されることが明らかになった。以上のことは、解糖系は PGC の未分化性の維持において重要な役割を果たしていることを示しているが、解糖系が PGC の未分化性を維持する仕組みは不明である。

本研究では、PGC の未分化性を維持する仕組みについて明らかにすることを目的とする。その際、以下に述べる知見に基づいて、解糖系が PGC のエピゲノム状態を制御することでこの過程を制御するという可能性を検証する。

解糖系はエネルギー産生において中心的な役割を果たす代謝経路である。これに加えて、解糖系はその代謝産物としてタンパク質のアセチル化修飾の反応基質であるアセチル CoA の産生を通じて、ヒストンのアセチル化修飾を制御することが知られている。そこで本研究では、解糖系が PGC におけるヒストンアセチル化修飾を制御することで PGC の未分化性を維持するという仮説を検証する。

## 【方法】

• PGC におけるヒストン H3 および H4 アセチル化修飾の観察  
野生型系統(Oregon-R)の産卵後 0~16 時間の胚に以下の抗体を用いた免疫化学染色を行った。PGC における各種ヒストンアセチル化修飾を観察するために、一次抗体として rabbit anti-Acetyl-HistoneH3(K9/K14/K18/K23/K27) 抗体または rabbit anti-Acetyl-HistoneH4(K5/K8/12/K16)抗体を用いた。PGC は chick anti-Vasa 抗体で標識した。二次抗体には Alexa488 標識 anti-rabbit IgG 抗体、Alexa546 標識 anti-chick IgY 抗体をそれぞれ用いた。核は ToPro3 で標識した。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行った。

• 解糖系代謝酵素のノックダウン (KD)

解糖系阻害のために、解糖系上流で機能し、律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ(Pfk)をターゲットとした KD を行った。Gal4/UAS システムにより、Pfk 遺伝子に対する shRNA を発現

する UAS-RNAi 系統のオスに、生殖細胞特異的に Gal4 を発現する nos-Gal4 系統のメスを交配させた。このようにして得たメス個体が産み出した初期胚(産卵後 0~3 時間:以下、この様な胚を解糖系 KD 胚と呼ぶ)に前述の免疫化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。取得した画像に対して ImageJ を用いた定量的な解析を行った。

• 解糖系代謝酵素の強制発現

Gal4/UAS システムにより、Pfk およびその上流で機能するグルコースリン酸イソメラーゼ(Pgi)を発現する UAS-Pgi-Pfk 系統のオスに nos-Gal4 系統のメスを交配した。このメス個体より得られた後期胚(stage 14)に前述の免疫化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。取得した画像から ImageJ を用いた定量的な解析を行った。

## 【結果・考察】

研究の第一歩として、発生過程の PGC におけるヒストンアセチル化修飾を免疫化学染色により観察した。その結果、初期胚の PGC は H3 および H4 アセチル化修飾がともに高く、この PGC におけるヒストン高アセチル化状態は発生が進行するに伴い低下するということが明らかとなった。このようなアセチル化の変化は先行研究において明らかとなっている PGC における解糖系活性の変化と一致しており、解糖系が PGC におけるアセチル化修飾を制御する主要な要因であるということを示唆している。

次に PGC のヒストンアセチル化修飾が解糖系によって制御されているのかを検証するために解糖系の阻害が PGC におけるアセチル化修飾へ与える影響を観察した。このために解糖系 KD 胚の PGC において免疫化学染色によりヒストンアセチル化を観察した。その結果、解糖系 KD 胚の初期 PGC においてアセチル化修飾を示すシグナルの有意な減弱が確認された。この結果は、解糖系が PGC におけるヒストンアセチル化修飾に必要であることを示している。

最後に、解糖系の活性が PGC のアセチル化状態を決めるのに十分な要因であるか明らかにするためにアセチル化修飾が減少する後期 PGC で Pgi と Pfk を強制発現し、その影響を観察した。その結果、このような PGC においてヒストンアセチル化修飾が有意に増加することが確認された。この結果は、解糖系代謝が PGC におけるヒストンアセチル化修飾の亢進に十分な役割を有していることを示している。

以上の結果は PGC 発生過程における解糖系を介したヒストンアセチル化修飾の制御の存在を示している。ヒストンアセチル化修飾は遺伝子発現を制御する主要な要因である。そこで今後は、解糖系代謝依存的なヒストンアセチル化修飾が制御するターゲット遺伝子を ChIP-Seq 解析、Cut&Run 解析等で明らかにし、さらに RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム解析も行うことで、解糖系が PGC の未分化性を維持する仕組みを解明する予定である。