

## ショウジョウバエ始原生殖細胞における Nanos 依存的 mRNA 安定化

小園 康広 (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・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) を含めた多くの動物では、初期胚発生過程において、生殖質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込んだ細胞が始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) となる。生殖質には、母性 mRNA が存在し、これら mRNA から翻訳されたタンパク質のはたらきにより、PGC は生殖細胞へと分化する。ショウジョウバエでは、生殖細胞への分化に必要な母性 mRNA が、PGC 中において安定化されていると考えられているが、その mRNA の安定化機構の詳細は明らかとなっていない。

所属する研究室において、母性 Nanos タンパク質に依存して母性 *CG32425* mRNA が PGC 中で安定化していることが、報告されている<sup>1</sup>。また *ovo* 遺伝子の splicing isoform の 1 つである、母性 *ovoB* mRNA も Nanos 依存的に安定化しているという予備的な結果も得られている<sup>2</sup>。母性 *OvoB* タンパク質は、転写因子であり、PGC で高発現する遺伝子の活性化に必要である<sup>3</sup>。以上のことから、母性 Nanos タンパク質が母性 *ovoB* mRNA を安定化させて、安定化した *ovoB* mRNA から *OvoB* タンパク質が発現し、そのタンパク質のはたらきによって、生殖細胞への分化に必要な遺伝子が活性化されると考えられる。そこでまず、母性 Nanos が *OvoB* タンパク質を高発現させることに必要であることを確認することにした。

## 【方法】

• EGFP-*OvoB* タンパク質に対する蛍光免疫染色

母性 Nanos タンパク質がつくられない *nanos* 遺伝子の変異があり、*OvoB* の N 末端に EGFP を挿入された系統が所属研究室で作製されている (*ovoB-Nterm-egfp* ; *nanos<sup>BN</sup>/TM3*)。 *ovoB-Nterm-egfp* ; *nanos<sup>BN</sup>/TM3* 間での交尾により、 *ovoB-Nterm-egfp* ; *nanos<sup>BN</sup>/TM3* (コントロール) と *ovoB-Nterm-egfp* ; *nanos<sup>BN</sup>/nanos<sup>BN</sup>* (母性 *nanos* 変異体) のバージン雌を採取した。これら雌を *yw* と交尾させ、17 時間採卵した。採取した胚を 4%PFA で固定し、EGFP に対する抗体と *Vasa* タンパク質 (PGC のマーカー) に対する抗体、DAPI を用いて、免疫染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、胚を観察した。レーザー強度および検出器のゲイン、対物レンズをコントロールと変異体間で統一し、ステージ 14 から 16 の胚の PGC を撮影した。ステージングは胚の形態により行った。

• *OvoB* タンパク質の輝度定量解析

取得画像から EGFP をノックインした *OvoB* タンパク質の輝度を定量するのに Fiji を用いた。PGC のマーカーである *Vasa* タンパク質の発現が見られ、形態が正常であり、表層から一定の深さの範囲内 (0~19  $\mu\text{m}$ ) にある細胞において、細胞の直径が最大となる部分で、細胞全体の *OvoB* タンパク質の単位面積あたりの平均輝度を測定した。PGC において *OvoB* の輝度が低いものは、*Vasa* タンパク質の輝度も低く、同じ胚の腸におけるバ

ックグラウンドの輝度も低かった。そこで腸におけるバックグラウンドの輝度に一定の基準を設けて、その基準値よりも輝度が低い胚は、抗体が胚内に浸透しなかったと考えて、解析対象から外した。

また、測定した *OvoB* タンパク質の輝度はバックグラウンドの輝度が加算されたものであるため、バックグラウンドの値を取得画像から差し引くこととした。取得画像からローリングボール法を用いてバックグラウンド画像を生成し、取得画像からバックグラウンド画像を減算した。このとき、ボールの半径は、PGC の半径よりも十分大きいものとし、サンプル間で半径は統一した。

## 【結果・展望】

胚発生ステージ 14 から 16 の PGC において、コントロールと母性 *nanos* 変異体の *OvoB* タンパク質の発現量を比較すると、母性 *nanos* 変異体で有意に発現量が低いことが明らかとなった。この結果は、母性 *nanos* 遺伝子は、PGC において *OvoB* タンパク質が高発現するために必要であることを示している。おそらく、母性 *ovoB* mRNA が Nanos タンパク質によって PGC 中で安定化されていると考える。今後このことを早急に確認する。また、Nanos タンパク質が *ovoB* mRNA に直接結合するか等を明らかにすることで母性 Nanos タンパク質による母性 mRNA の安定化機構を明らかにしたいと考えている。

*nanos* 遺伝子や *ovo* 遺伝子は、マウスにおいても保存されており、このうち *nanos2*, *nanos3*, *ovol1*, *ovol2* 遺伝子は、胚期 PGC において発現が観察されている<sup>3,4</sup>。マウスにおける *nanos* 遺伝子群と *ovol* 遺伝子群の関係は明らかとなっておらず、これらの遺伝子が機能レベルでも進化的保存性を有意しているのかという点に関して、本研究は重要な知見を与えるものである。

## 【参考文献】

1. Sugimori, S. *et al. Dev Growth Differ.* **60**, 63-75 (2018).
2. 杉森 聖子. 博士論文. (2018).
3. Hayashi, M. *et al. Sci Rep.* **7**, 1-10 (2017).
4. Tsuda, M. *et al. Science.* **301**, 1239-1241 (2003).