

シヨウジョウバエ生殖系列における ovo 遺伝子の連続的発現制御機構

石橋 楓 (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】

有性生殖を行う生物において、生殖細胞は次世代を生み出す唯一の細胞である。生命の連続性はこの生殖細胞によって維持される。シヨウジョウバエでは、胚の後極に局在する特殊な細胞質を取り込んだ細胞が、将来生殖細胞へと分化する始原生殖細胞となる。この細胞質は生殖質と呼ばれ、生殖細胞を形成するために必要十分な母性因子が局在する。

Ovo タンパク質は、生殖質中に含まれる母性因子の一つであり、Zn フィンガーモチーフを有する転写活性化因子として知られている。始原生殖細胞に母性供給される Maternal Ovo と、始原生殖細胞 (生殖系列：生殖細胞を生み出す細胞系譜) 内で産生される Zygotic Ovo により、生殖系列中において Ovo タンパク質は途切れなく連続的に発現する。このような連続的な Ovo の発現が、生殖細胞の形成には必要である。では、Zygotic Ovo は、始原生殖細胞内でどのような機構により発現を開始するのであろうか？これまでに、*in vitro* の実験により、Ovo タンパク質は自身のプロモーターに結合することが明らかにされている。また、Ovo タンパク質は、卵巣の生殖系列において、*ovo* 遺伝子の発現に必要であることも明らかになっている。以上のことから、始原生殖細胞に供給される Maternal Ovo タンパク質が、始原生殖細胞内の *ovo* 遺伝子のプロモーターに結合し、*ovo* 遺伝子を活性化することにより、Zygotic Ovo が発現すると考えた。実際に、先行研究によって Maternal Ovo タンパク質をノックダウンすると、始原生殖細胞中の *ovo* 遺伝子から転写される mRNA 量が減少する。しかし、Maternal Ovo タンパク質が、始原生殖細胞中において *ovo* 遺伝子のプロモーターに結合しているかは明らかになっていない。そこで、本研究では、始原生殖細胞を用いて、この点を明らかにするための第一段階として、CUT&RUN (Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease) の実験系の確立を行った。

CUT&RUN は、タンパク質-DNA 間の相互作用を明らかにする手法である。この手法では、目的のタンパク質に対する抗体とそれに結合するヌクレアーゼを用いて、タンパク質が結合している DNA 断片を回収し、塩基配列を決定することができる。CUT&RUN を行うためには多くの細胞が必要となるが、胚から多量の始原生殖細胞を得るのは困難であるため、始原生殖細胞を用いて実験系を確立させるのは適切でないと考えた。そこで、始原生殖細胞よりも多くの生殖系列の細胞が比較的簡単に得られる、卵巣を用いて実験系を確立することを試みた。

卵巣内で、始原生殖細胞と同様のサイズの細胞は、生殖幹細胞である。しかし、野生型の卵巣は、生殖幹細胞以外に、卵形成が進行したサイズが大きい生殖系列の細胞も含まれる。そこで、生殖幹細胞の分化 (卵形成) に関わる *bag of marbles (bam)* 遺伝子の機能が失われた *bam* 変異体の卵巣を用いて、生殖幹細胞を集めることとした。

【材料と方法】

本研究では、生殖系列で Ovo タンパク質と EGFP の融合タンパク質を発現し、*bam* 遺伝子に変異がある系統 (*ovoB-Nterm-egfp::bam^{Δsg}/Df (3R) FDD-0089346*) を用いた。この系統の羽化後約 10 日のメス成虫の卵巣から、生殖系列の細胞 (生殖幹細胞) を単離し、CUT&RUN を行った。CUT&RUN では、コントロールとして IgG 抗体を、実験群として EGFP に対する抗体を用いた。これらの抗体を用いて、Ovo タンパク質が結合する DNA 断片を回収し、得られた DNA 断片に対するライブラリー調製を行い、次世代シーケンシングを行った。次世代シーケンシングによって得られたデータは CLC genomic work bench を用いて解析を行った。

【結果・考察】

CUT&RUN により、転写因子に結合する DNA 断片を解析するには、約 10 万個の細胞が必要となる。また、この方法で解析するには、細胞が生きていることが必要である。条件検討の結果、メス成虫 10 匹の卵巣から、死細胞率が 10% 程度の約 6 万個の生殖系列の細胞を回収することができた。そこで、卵巣数を増やし、同様の条件で細胞を回収し、以下の実験を行った。

約 20 万個の生殖系列の細胞を用いて CUT&RUN を行い、Ovo-EGFP 融合タンパク質が結合する DNA 配列を解析した。その結果、Ovo タンパク質をコードする mRNA の転写開始点の上流 DNA 配列に Ovo-EGFP タンパク質が結合することを強く示唆する結果が得られた。*in vitro* で実験を行った先行研究により明らかにされた Ovo 結合配列は、上記 DNA 配列に含まれていた。以上のことから、CUT&RUN を用いた実験系を確立できたと判断した。

本研究により、卵巣の生殖系列の細胞において、Ovo タンパク質が、*ovo* 遺伝子のプロモーターに結合することを初めて示した。今後は、同様に実験を行い、Maternal Ovo タンパク質が、始原生殖細胞中において *ovo* 遺伝子のプロモーターに結合しているかを検証したい。これにより、*ovo* が世代を超えて連続的に発現するための機構を明らかにできると考えている。