

ショウジョウバエメス生殖幹細胞ニッチの制御に関わるペプチドホルモンの解析

頼 郁佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景・目的】

生物は安定して次世代に子孫を残すため、基盤となる配偶子を適切に形成する必要がある。配偶子をつくる大本となる細胞は「生殖幹細胞」と呼ばれ、分化能と自己増殖能を併せ持つ。この生殖幹細胞の性質は、生殖幹細胞の周囲に存在する「ニッチ」により制御される¹。これまでのメスのショウジョウバエを用いた研究により、個体の外的・内的環境が生殖幹細胞ニッチの動態に影響を与えることが報告されている。生殖幹細胞ニッチに影響を与える要因としては、栄養状態や加齢、交尾の有無がすでに挙げられている^{2,3,4}が、他にも様々な環境要因が関与していると考えられる。

本研究では私は、メスのショウジョウバエの卵巣が羽化後数日かけて急激に発達する現象に着目し、個体の成熟の状態が生殖幹細胞ニッチに何らかの影響を及ぼすのではないかと推測した。また、その分子メカニズム解明に際して、生殖幹細胞ニッチ周辺で発現しているペプチドホルモンに着目した。先行研究により、個体の成熟の過程においては複数のホルモンが関与することがすでに報告されている⁵。加えて、ニッチは外的・内的環境の変化をホルモンの受容を介して生殖幹細胞に反映させる^{2,3,4}。これを踏まえて私は、羽化後の成熟に伴う生殖幹細胞ニッチの制御にホルモンの授受が関わると推測し、このホルモンおよび受容体の特定を目指して研究を行った。

【方法】

(1) ショウジョウバエの飼育と解剖

未交尾のメス個体を 25°C で飼育した。羽化直後から羽化後 5 日目にかけて 1 日おきにメス個体を解剖し、卵巣を取り出した。

(2) 生殖幹細胞とニッチ細胞の免疫組織化学染色

免疫組織化学染色によって生殖幹細胞とニッチ細胞を可視化した。卵巣を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定した後、2% 仔牛血清アルブミン/PBS でブロッキング処理した。生殖幹細胞とニッチ構成細胞を可視化するために、1 次抗体としてマウス抗 Hu-li tai shao 抗体 1B1 (Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]) とラット抗 DE-カドヘリン抗体 DCAD2 (DSHB) をそれぞれ用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2 次抗体 (Thermo Fisher Scientific) を加え、染色した。

(3) 生殖幹細胞とニッチ細胞の計測と評価

卵巣小管 (卵巣を構成している小さな管) 内に存在する生殖幹細胞およびニッチ細胞の数を、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss AxioPlan) を用いて計測した。計測は、1 つの観察条件につき約 100 卵巣小管ずつに対して行った。マン-ホイットニーの U 検定を用いて生殖幹細胞の数に有意差があるかどうかを検定し、羽化後の生殖幹細胞の数の増減の有無を評価した。

(4) 生殖幹細胞ニッチにおけるホルモン受容体の可視化

生殖幹細胞ニッチにおけるホルモン受容体の発現を確認するために、異所的遺伝子発現系である GAL4-UAS システムを用いた。これは、酵母由来の転写因子 GAL4 をショウジョウバエの特定のエンハンサーの制御化で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS の下流に配置した遺伝子を誘導させるシステムである。

本研究では、ホルモン受容体遺伝子領域の終始コドン手前に GAL4 配列の挿入された GAL4 システムを用いて、GFP を強制発現させた。GFP を明瞭に可視化するために 1 次抗体としてニトリ抗 GFP 抗体 ab13970 (Abcam) を用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2 次抗体を加え、染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM700) を用いて撮影した。

(5) ホルモン遺伝子とホルモン受容体遺伝子のノックダウン

ペプチドホルモン遺伝子のノックダウンを組織特異的に行うために、標的のペプチドホルモン産生神経で特異的な GAL4 システムを、標的のペプチドホルモン遺伝子に RNAi 干渉をするための UAS-RNAi システムと掛け合わせた。

【結果・考察】

羽化直後から羽化後 5 日目にかけて 1 日ごとに生殖幹細胞の数およびニッチの数を計測した。その結果、いずれの細胞数も羽化後 1~2 日目にかけて上昇し、その後 5 日目にかけて徐々に減少することが分かった。

次に、この現象を制御している因子を特定するため、25 種のペプチドホルモン受容体遺伝子を GAL4-UAS システムにより可視化し、生殖幹細胞ニッチにおけるペプチドホルモン受容体の発現の有無を観察した。その結果、あるペプチドホルモン (仮称 Niche-regulating Hormone 1、以下 NRH1) の受容体の発現が生殖幹細胞ニッチで認められた。また NRH1 受容体の発現を調べたところ、羽化直後が最も高く、徐々に減少していた。このことから、NRH1 受容体は羽化直後の生殖幹細胞ニッチに何らかの影響を与えることが推測された。これを受けて、NRH1 およびその受容体遺伝子をノックダウンした個体において、羽化後の生殖幹細胞の数とそのニッチ細胞の数を計測した結果、いずれも羽化後に細胞数が上昇した。このことから、NRH1 およびその受容体が羽化後の生殖幹細胞ニッチの数を制御している可能性が示唆された。

どの組織で産生された NRH1 が生殖幹細胞の数の制御に関わるのかを調べるために、特定の組織特異的に NRH1 遺伝子をノックダウンした個体における生殖幹細胞の数の計測を行った。その結果、神経で特異的に NRH1 遺伝子をノックダウンした個体ではコントロールと比べて生殖幹細胞の数が増加した。このことから、神経系から放出される NRH1 が生殖幹細胞ニッチの制御に関与している可能性が示唆された。

本研究によって、ペプチドホルモン NRH1 およびその受容体が、羽化後の個体の発達成熟を生殖幹細胞ニッチに反映させている可能性が示唆された。今後、個体の発達成熟がどのように生殖幹細胞ニッチに伝えられているか、その分子メカニズムを解明し、この制御の生物学的な意義を明らかにしていく予定である。

【参考文献】

- Schofield. (1978). *Blood Cells* 4, 7-25.
- Hsu et al. (2009). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1117-1121.
- Kao et al. (2015). *Aging Cell* 14, 25-34.
- Ameku & Niwa. (2016). *PLoS Genet* 12, e1006123
- Henrich et al. (1999). *Vitam Horm* 55, 73-125