

## ショウジョウバエ始原生殖細胞集団の不均一性

三上 恭平 (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】

有性生殖を行う多細胞生物において、生殖細胞は次世代を生み出すための唯一の細胞である。次世代が正常に発生するためには生殖細胞の遺伝情報が次世代に正確に受け継がれる必要がある。しかし、細胞の遺伝情報であるゲノム中には遺伝情報を破壊する脅威となる転移因子 (Transposable Elements; TEs) が存在している。そのため、生殖細胞には TEs の発現を抑制する機構である PIWI-interacting RNA (piRNA) システムが備わっており、piRNA システムは機能的な配偶子の形成に必要であることが知られている<sup>1</sup>。しかし、piRNA システムについての研究の多くは成熟した生殖細胞を対象としており、どのように piRNA システムが確立されるかについては明らかになっていない。

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、胚発生初期に生殖質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込んだ細胞のみが、生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) になる。生殖質には生殖細胞形成に必要な十分な分子が含まれていることが知られているが、PGC が取り込む生殖質の量は一律ではなく、PGC 集団は不均一な集団であることが報告されている<sup>2</sup>。

所属する研究室において、ショウジョウバエの遺伝子強制発現系として知られる Gal4/UAS システムを用いて緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を生殖細胞特異的に発現させた時、少数の PGC でのみ EGFP の発現量が顕著に高くなるという予備的な結果が得られている。UAS には配列構造の異なる UASp, UAS<sub>t</sub> および UAS<sub>z</sub> の 3 種類のバリエーションが存在しており、特に UAS<sub>t</sub> には piRNA のターゲット領域が含まれていることが知られている<sup>3</sup>。上記の現象が観察されるのは UAS<sub>t</sub> を用いた時のみであった。このことから PGC 集団には piRNA システムの機能に関与する不均一性が存在すると考えた。そこで、本研究では、この予備的な結果を確認した。さらに、piRNA システムを構成する Piwi タンパク質の発現について、PGC 間で差があるかについても解析を行った。

## 【材料と方法】

## • Gal4/UAS システムによる EGFP 発現誘導

生殖細胞特異的に発現する *nanos* 遺伝子のプロモーターで制御される Gal4 を持つ系統 (*Nanos-Gal4*) の処女メスと UAS<sub>t</sub>-EGFP を持つ系統および UAS<sub>z</sub>-EGFP を持つ系統のオスをそれぞれ交配させた。

## • タンパク質の蛍光免疫染色およびその観察

交配後 12h-15h の胚を集め、4% PFA (4% パラホルムアルデヒド / PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) で固定し、EGFP, 生殖系列のマーカーである *Vasa* タンパク質, Piwi タンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。染色した胚は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

## • タンパク質の輝度定量解析

胚表層から 20 μm 以内に生殖巣があるような胚を選び、共焦点レーザー顕微鏡のレーザー強度および検出器のゲイン、拡大率を試料間で一定にし、その生殖巣全体の蛍光画像を撮影した。取得した画像に対して画像解析ソフト Fiji を用いて、各 PGC の直径が最大となる断面におけるタンパク質の単位面積あたりの平均輝度を測定した。

## 【結果と考察】

UAS<sub>t</sub>-EGFP システムを用いた場合、胚発生ステージ 15-16 に PGC 間で EGFP の発現量が不均一になるような胚が観察された。一方、UAS<sub>z</sub>-EGFP システムを用いた場合、このような胚は観察されなかった。以上の結果は、PGC 集団に piRNA システムの機能の不均一性が存在していることを示唆している。

また、UAS<sub>t</sub> を用いて EGFP 発現を誘導した胚を用いて、胚発生ステージ 15-16 における Piwi タンパク質の発現を観察ところ、EGFP の発現が顕著に高い PGC では、同一胚内に存在する他の PGC より Piwi タンパク質の発現量が低いことが明らかになった。

以上の結果は、ショウジョウバエ胚において、一部の PGC でのみ、Piwi タンパク質の発現量が低下することで、PGC 集団では piRNA システムが不均一に機能していることを強く示唆している。

## 【展望】

今後、なぜ、一部の PGC において、Piwi タンパク質の発現が低くなるかを明らかにすることで、piRNA システムが正常に機能するために必要な因子を調べる予定である。また、生殖細胞形成では、あらかじめ異常な細胞を排除することで機能的な生殖細胞のみを生成する、品質管理機構の存在が提唱されている。今回確認した現象において、piRNA システムの機能が弱いと考えられるような PGC では TEs 抑制がうまくいかず、配偶子として正常に機能できない、あるいは排除される可能性がある。したがって、これらの細胞が排除される仕組みが存在すれば、それは生殖系列の品質管理機構の解明に迫る手がかりとなりうる。そこで、今後 EGFP 高発現 PGC における TEs 発現レベルおよびその発生運命を調べる予定である。

## 【参考文献】

1. Yamashiro, H.; Siomi, M. C. *Chem. Rev.* 2018, 118 (8), 4404-4421.
2. Slaidina, M.; Lehmann, R. *Current Biology.* 2017, 27(2), 291-297.
3. DeLuca, S. Z.; Spradling, A. C. *Genetics.* 2018, 209(2), 381-387.