

## ショウジョウバエ生殖系列の発生過程におけるヒストンラクチル化修飾の観察

影山 りお (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 良樹 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

## 【背景・目的】

主要なエピジェネティック修飾であるヒストンリジン残基の翻訳後修飾は、クロマチンの構造や転写因子の動態に影響を与えることで広範な遺伝子発現を制御する。これまでに、アセチル化やメチル化といった主要なヒストン修飾の制御機構およびその遺伝子発現制御における役割について解析が進んできた一方、近年、新たなヒストン修飾としてヒストンラクチル化修飾が特定され注目を集めている。

ラクチル化修飾は解糖系の代謝産物の一つである乳酸を基質とする新規翻訳後修飾である。現時点において、遺伝子発現の亢進に寄与するとされているものの、その遺伝子発現制御における働きの詳細や組織発生過程での役割については全く不明である。そこで本研究では、ショウジョウバエの卵形成過程をモデルとし、ヒストンラクチル化修飾の役割を明らかにすることを試みた。

ショウジョウバエの卵形成過程は次の様に進行する。まず卵巣先端部分の形成細胞巢に存在する生殖幹細胞 (GSC) の不等分裂によりシストブラスト (Cb) が生じる。Cb は4回の同調した不完全な細胞分裂を経て16細胞よりなるシストを形成する。シストを構成する細胞のうち1つは卵母細胞へ、残りの15細胞は哺育細胞へと細胞運命が決定する。細胞運命の決定後、シストは卵巣を構成する体細胞に包まれて卵室を形成し、形成細胞巢を出る。その後、哺育細胞は最終的に退縮するのに対し、卵母細胞では減数分裂が進行し、次世代を生み出す成熟卵となる。この様に、卵形成過程には幹細胞の維持および分化、減数分裂やインプリンテイングといった、クロマチン制御の重要性が高いプロセスが含まれる。したがって、ヒストンラクチル化修飾の機能解析をするにあたり、理想的な検証モデルを提供する。

本研究では、卵形成過程におけるヒストンラクチル化修飾の機能解明の第一歩として、特にヒストンラクチル化修飾が卵形成過程のどの細胞でどの様な時期に生じるかを特定することを試みた。

## 【材料と方法】

本研究では野生型 (Oregon-R 系統) の卵巣を用いて、以下の抗体で免疫組織化学染色を行った。生殖系列の発生過程におけるラクチル化修飾を観察するために、一次抗体として、全てのラクチル化リジンを認識する抗体 (抗 Klac 抗体) (ウサギ)、およびヒストン中のラクチル化リジンを認識する抗体である抗ヒストン H3K18 ラクチル化抗体 (抗 H3K18Lac 抗体) (ウサギ)、抗ヒストン H4K8 ラクチル化抗体 (抗 H4K8Lac 抗体) (ウサギ) を使用した。また乳酸の代謝に関わる酵素の発現を観察するために、乳酸脱水素酵素 (Ldh) およびピルビン酸キナーゼ (PyK) に対する抗体 (抗 Ldh 抗体および抗 PyK 抗体) (ウサギ) を使用した。生殖系列の標識には抗 Vasa 抗体 (ニワトリ) を用いた。これら一次抗体を蛍光標識する二次抗体には、Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa546 標識抗ニワトリ IgY 抗体を用いた。また核は TO-PRO-3 を用いて標識した。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

## 【結果・考察】

卵形成過程でのラクチル化修飾を観察するため、抗 Klac 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、初期卵室から後期卵室の卵母細胞の核において抗 Klac 抗体のシグナルが強く観察された。その一方で、GSC や哺育細胞等の卵母細胞以外の生殖系列および卵巣を構成する体細胞ではラクチル化シグナルは観察されなかった。本結果は、卵形成過程におけるラクチル化修飾が卵母細胞の核において重要な役割をもつことを示唆している。

そこで次に、卵母細胞の核でのラクチル化修飾がヒストン中のリジンに起きているのか検証した。検証にあたっては、ヌクレオソームを構成するヒストンのうち、翻訳後修飾が重要な働きをもつことが知られるヒストン H3 および H4 のリジンに注目し、これらリジンのラクチル化修飾を認識する抗体 (それぞれ抗 H3K18Lac 抗体、抗 H4K8Lac 抗体) を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、いずれの抗体も初期卵室から後期卵室の卵母細胞の核において強いシグナルを示した。以上の結果は、ヒストンラクチル化修飾が初期卵室から後期卵室の卵母細胞において重要な働きをもつことを強く示唆している。

さらに、卵母細胞においてヒストンラクチル化修飾を誘導する要因についても解析を行った。これまでの研究により、乳酸を基質とするラクチル化修飾は、乳酸産生が活発な状況下で誘導されることが知られている。そこで卵形成過程における乳酸産生状態を明らかにすることを試みた。このため、卵形成過程において、解糖系の最終反応を触媒するピルビン酸キナーゼ (PyK) および PyK により産生されたピルビン酸より乳酸を産生する酵素 (Ldh) の発現を観察した。その結果、PyK は全ての生殖系列で均一に発現していたのに対し、Ldh は初期卵室から中期卵室の卵母細胞の細胞質において他の細胞に比べて特に高く発現していることが明らかとなった。以上の結果は、初期卵室から中期卵室にかけての卵母細胞が高い乳酸産生状態をもつことを強く示唆している。

本研究の結果、初期卵室から中期卵室という限られた発生時期において、卵母細胞特異的に増加する乳酸産生がヒストンラクチル化修飾を亢進することにより、卵母細胞の核特異的に起きる現象を制御することが示唆された。この時期の卵母細胞の核は減数第一分裂の前期にあることから、現在、私は卵形成過程において、ヒストンラクチル化修飾は減数分裂期の染色体制御に寄与すると予想している。

加えて本研究では、ヒストンラクチル化修飾が、転写が不活性であることが知られる減数分裂中の卵母細胞の核において高いことを見出した。この観察結果はこれまでに考えられてきたヒストンラクチル化修飾の働きと相反する。したがって、本研究の成果は、未だ十分に解明されていないヒストンラクチル化修飾の新規機能を特定するための重要な途端となると考える。

今後は、Ldh に対する遺伝学的操作が、卵母細胞のヒストンラクチル化修飾や減数分裂等の卵母細胞特異的な生命現象に影響を与えるかを解析することで、ヒストンラクチル化修飾の役割を解明していく予定である。