

ショウジョウバエ胚前極に異所的に供給された母性因子群の機能解析

佐藤 隆奈 (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

ショウジョウバエの胚の後極には、生殖質と呼ばれる細胞質が局在している。生殖質を取り込んだ細胞は始原生殖細胞 (PGC) となり、卵や精子に分化する。生殖質を胚の前極に移植すると、その生殖質を取り込んだ細胞は PGC となり、生殖細胞に分化する (1)。このことは、生殖質中には生殖細胞の分化に必要な母性因子が含まれていることを強く示唆している。生殖質に含まれる母性因子は、体細胞への分化を抑制することで、生殖細胞への分化を許容すると考えられている。体細胞分化に必要な遺伝子 (体細胞性遺伝子) の発現を抑制する母性因子として、Nanos (Nos)、Polar granule component (Pgc)、Germ cell-less (Gcl) タンパク質が同定されている (2、3、4)。しかし、これら3つの母性因子の働きにより、どのような体細胞性遺伝子の発現が抑制されているのかは網羅的に解析されていない。また、これら3つの母性因子を取り込んだ体細胞が、PGC と同様の発生過程をどこまで辿ることができるのかについても明らかではない。そこで、本研究では、これらの点を明らかにすることを大きな目的としている。

tao1 mRNA を胚の前極に局在させると、胚の前極に PGC と同様の形態を示す細胞 (PGC 様細胞) が形成される (5)。この PGC 様細胞は体細胞の性質を持つこと、生殖質に局在する母性因子を欠くことが研究室の先行研究により明らかになっている (6)。本研究では、Nos、Pgc、Gcl タンパク質を PGC 様細胞に供給し、それぞれのタンパク質が機能的であることを明らかにすることを目的とする。将来的には、これら3種類のタンパク質を含む PGC 様細胞において抑制される体細胞性遺伝子を網羅的に明らかにするとともに、その細胞の発生運命も追跡する予定である。

方法

胚前極に mRNA を局在させることができる *bicoid* (*bcd*) 3'UTR を *tao1* mRNA の 3'UTR と置き換え (*tao1-bcd3'UTR*)、この RNA を卵形成過程で Gal4-UAS システムを用いて発現させると、胚 (*tao1* 強制発現胚) の前極に PGC とよく似た形態の細胞 (PGC 様細胞) が形成される (5)。先行研究よりも効率よく PGC 様細胞を形成させるために、Gal4 遺伝子のコピー数を2倍にした (6)。さらに、*tao1* mRNA と同様の方法により、胚前極に Nos、Pgc、Gcl タンパク質をコードする mRNA を局在させ、PGC 様細胞に取り込ませた。この胚をステージ3-5まで発生させ、*in situ hybridization* 法や蛍光免疫染色法により、これらタンパク質が PGC 様細胞中で機能的かを調べた。

結果

Nos、Pgc、Gcl をコードする mRNA を、*tao1* mRNA と同様の方法で前極に局在させた胚 (*nos-tao1* 強制発現胚、*pgc-tao1* 強制発現胚、*gcl-tao1* 強制発現胚) において、それぞれのタンパク質が PGC 様細胞中で機能するのかについて調べた。

nos-tao1 強制発現胚

Nos タンパク質は、胚の前極の体細胞の分化に必要な Bicoid (Bcd) タンパク質をコードする *bcd* mRNA の翻訳を阻害することが知られている (7)。PGC 様細胞において、Nos が Bcd タンパク質の発現を抑制するかは現在確認中である。また、*nos-tao1* 強制発現胚では、PGC 様細胞以外の胚の前半部に *nos* mRNA が分布していた。おそらくこれが原因となり、*nos-tao1* 強制発現胚は正常に発生できずに致死となることが明らかとなった。

pgc-tao1 強制発現胚

Pgc タンパク質は、RNA ポリメラーゼ II の活性を低下させる (8)。*pgc-tao1* 強制発現胚において、活性型 RNA ポリメラーゼ II の分布を調べたところ、PGC 様細胞だけでなく、胚の前半部で活性型 RNA ポリメラーゼ II が減少していることがわかった。

gcl-tao1 強制発現胚

Gcl タンパク質は、胚両端の体細胞の分化を進める *huckebein* (*hkb*) 遺伝子の発現を抑制する (9、10、11)。*gcl-tao1* 強制発現胚において、Gcl が PGC 様細胞中で *hkb* mRNA の発現を抑制しているかは現在解析中である。

考察・展望

現在、Nos、Pgc、Gcl の3つの母性因子を同時に胚前極に局在させ、それら mRNA を PGC 様細胞に供給する系統 (*nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現系統) を作成中である。*nos-tao1* 強制発現胚は正常に発生することなく致死となるため、*nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現胚も正常に発生しないと考えられる。したがって、*nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現胚の PGC 様細胞の発生運命を解析するためには、その PGC 様細胞を正常胚の後極に移植する必要があると考えられる。今後は *nos/pgc/gcl-tao1* 強制発現胚の PGC 様細胞において抑制される体細胞性遺伝子を網羅的に調べるとともに、その発生運命を解析する予定である。

参考文献

1. Illmensee and Mahowald. *Science*, 71, 1016-1020 (1974).
2. Nakamura *et al.* *Science*, 274, 2075 (1996).
3. Robertson *et al.* *Developmental Biology*, 215, 288 (1999).
4. Asaoka *et al.* *Nature Cell Biology*, 1, 431 (1999).
5. Pflanz *et al.* *Open biology*, 5, 140161 (2014).
6. 萩久保朝香. 修士論文. (2022).
7. Wreden *et al.* *Development*, 124, 3015 (1997).
8. Hanyu-Nakamura *et al.* *Nature*, 451, 730 (2008).
9. Pignoni *et al.* *Cell*, 62, 151 (1990).
10. Weigel *et al.* *Science*, 248, 495 (1990).
11. Pae *et al.* *Developmental Cell*, 42, 130 (2017).