

生殖幹細胞の増殖を制御する因子の探索—ショウジョウバエを用いた解析—

吉成 祐人 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系/医学医療系)

背景・目的

次世代に生命を継承するためには、卵が安定的に供給されることが必要である。卵をつくる大本となる細胞は生殖幹細胞と呼ばれ、この幹細胞の自己増殖と分化のバランスが適切に制御されることが卵の安定的な供給に必須である。生殖幹細胞の自己増殖と分化のバランスを制御する微小環境を「ニッチ」と呼び、ニッチから生殖幹細胞へと送られる局所因子に関する研究がこれまでに多く行われてきた²。一方、多くの動物において、個体を取り巻く周囲の外環境によって卵形成過程が影響を受ける事例が報告されている³。卵形成の出発点が生殖幹細胞であることを考えると、外環境のシグナルはニッチに伝えられ、生殖幹細胞の増殖や分化のバランスを調節することが予想される。しかしながら、外環境が、卵形成過程の中でも生殖幹細胞の増殖や維持に影響を与えるのかについては、現在まで報告が少ない。

このような背景の中で、当研究室の大学院生が、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、交尾の刺激が生殖幹細胞の増殖を促すことを発見した。また、その交尾依存的な生殖幹細胞の増殖には、オスの精液中の因子がメスの神経系で受容されることで起こる性ペプチドシグナリングの活性化と、それに引き続く卵巣におけるステロイドホルモン生合成の活性化が必要であることを明らかにした⁴。しかし、交尾刺激の情報がどのように卵巣のニッチへと伝えられているか、その分子メカニズムの全容解明にはほど遠い。

この問題にアプローチするために私は、神経やニッチ、生殖幹細胞を含む卵巣組織で発現する膜受容体タンパク質群に着目した。刺激などの外環境の情報が神経で受容され、最終的に生殖幹細胞へ伝達されるということから、何らかのシグナルを受容する膜受容体が重要な機能を持つと予測できたからである。本研究において私は、ニッチに属し、生殖幹細胞にシグナルを送っている細胞と神経細胞特異的に、266種の膜受容体のノックダウンを行い、交尾前後での生殖幹細胞の数を比較することで、生殖幹細胞の増殖に関わる膜受容体とリガンドを特定することを目指した。

方法

(1) 膜受容体ノックダウンの方法

ニッチ特異的に膜受容体遺伝子のノックダウンを行うために、異所的遺伝子発現系である GAL4-UAS 遺伝子発現システムを用いた。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下で発現させることで、GAL4 特異的な酵母由来の DNA 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、神経と卵巣のニッチ特異的 GAL4 ドライバーである c587-GAL4 系統と、266種の膜受容体それぞれの UAS-膜受容体 RNAi 系統をかけ合わせることで、神経と卵巣のニッチ特異的に膜受容体がノックダウンされたメス個体を得た。

(2) 個体の飼育と交尾・解剖

メス個体は 25°C で飼育した。羽化後 3 日目から 4 日目の間の 24 時間、オス野生型ショウジョウバエと共に小さなバイアルに入れ、交配させた個体を交尾後、交配させなかった個体を未交尾とした。交尾後、未交尾の個体それぞれを羽化後 4 日目で解剖し、取り出した卵巣を固定した。

(3) 生殖幹細胞とニッチの免疫組織化学染色法

ニッチと生殖幹細胞を可視化するために、生殖幹細胞とニッチの免疫組織化学染色を行った。固定後の卵巣を洗った後にブロッキングし、生殖幹細胞を抗 1B1 抗体、ニッチを抗 E-カドヘリン抗体で一次免疫染色した。その後、蛍光標識二次抗体を加え、染色した。

(4) 生殖幹細胞数の計測と評価

1 つの卵巣小管 (卵巣を構成している小さな管) 内にいくつの生殖幹細胞が存在するかを、蛍光顕微鏡を用いて計測した。計測は 1 種類の受容体ノックダウン系統について、未交尾メス・交尾後メスそれぞれ 50 卵巣小管ずつ行った。マンホイットニーの U 検定を用いて交尾前後の生殖幹細胞数に有意差があるかどうかを決定し、交尾依存的な生殖幹細胞の増殖の有無を評価した。

結果・考察

266 種それぞれの膜受容体ノックダウンメスの交尾前後での生殖幹細胞の数を計測した。その結果、100 種以上の膜受容体ノックダウン個体において、生殖幹細胞の増殖に異常がみられ、その表現型は「交尾後の生殖幹細胞の増殖が起こらないもの」と「交尾前に生殖幹細胞が増殖するもの」の 2 つに大別することができた。さらに、ノックダウンによって異常な表現型を示した膜受容体の内、約 30 種が神経ペプチド受容体であった。交尾依存的な生殖幹細胞の増殖が神経系を介することから、これら約 30 種の神経ペプチド受容体が生殖幹細胞の増殖を制御する神経系のシグナリングに関与すると考えられる。また、ノックダウンによって異常な表現型を示した膜受容体の中には、リポタンパク質受容体などの神経ペプチド受容体以外の膜受容体も多数存在した。このことから、生殖幹細胞の増殖には、神経系のシグナリングだけでなく、液性因子のシグナルも関わっていると考えられる。

本研究によって、生殖幹細胞の増殖の制御にリポタンパク質受容体をはじめとする様々な因子が関わり、中でも多数の神経伝達物質による制御が存在することが初めて示唆された。そのため、本研究は交尾をはじめとする外環境の情報と生殖幹細胞の増殖制御機構とを繋ぐ、新たな経路を明らかにする可能性を秘めている。

参考文献

1. Schofield, R. *Blood Cells* 4, 7–25 (1978).
2. Fuller, M. T. & Spradling, A. C. *Science* 316, 402–404 (2007).
3. Davies, S. & Deviche, P. *Horm. Behav.* 66, 41–55 (2014).
4. Ameku & Niwa, 投稿準備中