

令和元年6月14日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07374

研究課題名(和文)細胞内小胞による生殖細胞決定因子の局在化制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)The endocytosis-mediated mechanism for the germ plasm assembly

研究代表者

田中 翼 (Tanaka, Tsubasa)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：00392027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物において、生殖細胞の形成は、生殖質とよばれる特殊な細胞質領域によって制御される。本研究では、生殖質形成の制御機構の研究の良いモデル系となっているショウジョウバエを用いて、卵黄タンパク質受容体Yolklessに注目して解析を行った。その結果、細胞極性・生殖質形成におけるYolkless受容体のリガンド依存적および非依存적エンドサイトーシス制御の重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵内に卵黄タンパク質を蓄積して、胚発生時に栄養素として利用するという機構はショウジョウバエに限らず、多くの動物種で共通している。したがって、私たちの見出した『卵黄タンパク受容体のエンドサイトーシスを介した細胞極性・生殖質形成の制御』という新規概念の分子基盤を明らかにすることで、細胞極性・生殖質形成の制御機構における種間の共通原理の解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Germ cells ensure the continuity of life through the generation. In many species, germ cells are determined by the inheritance of the germ plasm, which contains mRNAs and proteins that specify germ cell fate and promote germline development. In this study, we focused on the function of yolk protein receptor Yolkless in the germ plasm assembly in *Drosophila* and found that the ligand-dependent and independent endocytic regulation of Yolkless is important for the establishment of oocyte polarity and the germ plasm assembly.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 生殖質 細胞極性 エンドサイトーシス 卵黄タンパク ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、次世代を生み出すことのできる唯一の細胞である。多くの動物において、生殖細胞の形成は、生殖質とよばれる特定の RNA やタンパク質の局在する細胞質領域によって制御される。ショウジョウバエは、生殖質形成の制御機構の研究の良いモデル系となっている。ショウジョウバエの卵形成過程において、生殖質を構成する RNA やタンパク質は、卵母細胞の後端に逐次的に輸送・局在化される。生殖質の形成には、細胞骨格が重要な役割を担っており、微小管は卵母細胞の後端への生殖質成分の輸送、アクチンは後端での生殖質成分の係留にそれぞれ必要である。

私たちや他の研究グループによるこれまでの研究から、卵母細胞でのエンドサイトーシスが生殖質形成における微小管とアクチンの両方の制御に重要であることを明らかになっている (Vanzo et al, 2007; Tanaka and Nakamura, 2008; Tanaka et al, 2011)。具体的には、エンドサイトーシスは卵母細胞内の微小管の配向性を確立させる。そして、この配向性に依存して *oskar* (*osk*) RNA が卵母細胞の後端に輸送されることで生殖質形成が開始される。卵母細胞後端に局在化した *osk* RNA は long *Osk* を産生する。Long *Osk* は局所的なエンドサイトーシスを活性化して、アクチンの再編成 (アクチン繊維束の形成) を促進する。このエンドサイトーシス依存的なアクチン再編成によって、生殖質が安定に係留される。Long *Osk* の分子機能は未だ不明であるが、私たちは免疫沈降実験により long *Osk* と共沈する因子として *Yolkless* (*Yl*) を同定し、その機能解析を進めている。Low density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein (LRP) ファミリーに属する受容体である *Yl* は、雌の生殖系列細胞に特異的に発現して、卵母細胞に胚発生時の栄養素となる卵黄タンパクを蓄積させる (Schonbaum et al, 2000)。*yl* ノックアウト変異体を用いたこれまでの解析から、*Yl* 受容体は卵母細胞の微小管の配向性、および *Osk* を介したアクチン再編成に必要であることを見い出している。このような結果は、*Yl* 受容体には「胚発生に必要な栄養素の蓄積」という役割に加えて、「細胞極性や生殖質の形成制御」という新たな役割があることを示している。

2. 研究の目的

本研究では、極性形成、および生殖質形成における *Yl* 受容体のエンドサイトーシス制御の重要性を明確にして、その制御の分子機構を明らかにすることを目指した。また、卵母細胞での解析から得られた成果を神経細胞で展開させることで、エンドサイトーシスを介した極性制御機構の普遍性を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵黄タンパクの発現量を最小としたショウジョウバエ変異体の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した *yp1-3*、および *apolpp* の変異体系統を交配させることにより、*yp1-3^{-/-} apolpp^{+/-}* 系統を樹立した。

(2) 極性形成や生殖質形成に関する解析

極性形成や生殖質形成については、細胞極性、生殖質因子、およびエンドソームのマーカを発現するトランスジェニック系統や特異的抗体を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 極性形成と生殖質形成におけるリガンド依存的な *Yolkless* 受容体のエンドサイトーシス制御の重要性の明確化

私たちは、免疫沈降実験により long *Osk* と共沈する因子として、*Yolkless* (*Yl*) 受容体を同定して、その機能解析を進めている。そして、これまでに *Yl* 受容体は微小管の配向性の確立や *Osk* 依存的なアクチンの再編成の制御を介して生殖質形成に必須の役割を果たすことを明らかにしている。本研究では、まず *Yl* 受容体のエンドサイトーシス制御の重要性を明確にするために、*Yl* 受容体のリガンドである卵黄タンパクの発現量を減少させた変異体系統を作製した。ショウジョウバエは、既知の *Yp1*、*Yp2*、*Yp3*、および本研究で同定した *Apolipophorin* (*Apolpp*) の4つの卵黄タンパクを持つ。これらの卵黄タンパクのノックアウト変異体を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。*yp1-3* のトリプル変異体は生存可能であったが、*apolpp* のホモ変異体は致死であったため、*yp1-3* トリプル変異体バックグラウンドで *apolpp* をヘテロとした多重変異体 (*yp1-3^{-/-} apolpp^{+/-}*) を樹立した。この卵黄タンパクの発現量を最小とした変異体を用いて、極性形成と生殖質形成への影響を検討した。その結果、*yl* 変異体の場合と同様に、*yp1-3 apolpp* 多重変異体では卵母細胞の微小管の配向性の確立が異常となることが確認された (図1)。一方、

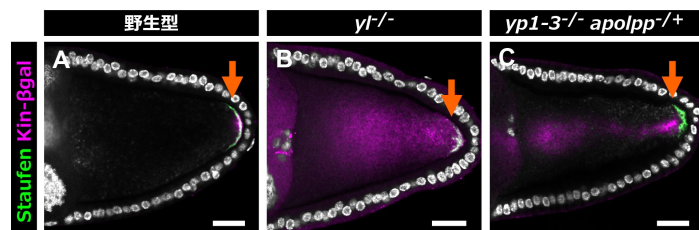


図1. *Yl* 受容体、および卵黄タンパクは細胞極性の確立に必要である。野生型 (A)、*yl* 変異体 (*yl^{-/-}*; B)、*yp1-3* と *apolpp* の多重変異体 (*yp1-3^{-/-} apolpp^{+/-}*; C) での *Staufen* (*osk* RNA のマーカー) と *Kin-βgal* (微小管のプラス端のマーカー) との共染色像。野生型では、*Staufen* と *Kin-βgal* は卵母細胞の後端 (矢印) に局在しているが、*yl* 変異体、および *yp1-3* と *apolpp* の多重変異体ではそれらの局在化に異常が認められた。スケールバー: 20 μm。

Osk を卵母細胞の前端に異所的に発現させて、Osk 依存的なアクチンの再編成への影響についても検討を行った。野生型での異所的な Osk の発現は、アクチン繊維束の形成を促進する。しかし、*yl* 変異体、および *yp1-3 apolpp* 多重変異体では異所的な Osk の発現によって F-アクチンの異常な凝集塊が形成された (図 2)。また、Osk や生殖質成分は細胞質に拡散していた。これらの結果は、卵黄タンパクは Osk 依存的なアクチンの再編成、および生殖質係留に必要であることを示すとともに、リガンド依存的な YI 受容体のエンドサイトーシス制御が細胞極性、および生殖質の形成に必須であることを強く示唆している。

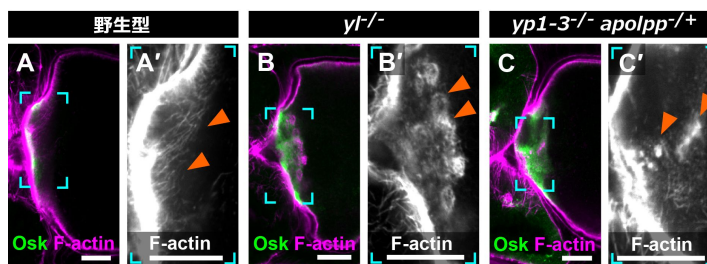


図 2. YI 受容体、および卵黄タンパクは Osk 依存的なアクチンの再編成に必要である。野生型 (A)、*yl* 変異体 (*yl*^{-/-}; B)、*yp1-3* と *apolpp* の多重変異体 (*yp1-3*^{-/-} *apolpp*^{+/+}; C) の卵母細胞の前端での Osk と F-アクチンとの共染色像。野生型で Osk を卵母細胞の前端に異所的に発現させると F-アクチンの線維束の形成が誘導される (A'の矢じり)。一方、*yl* 変異体、および *yp1-3* と *apolpp* の多重変異体での異所的な Osk の発現は F-アクチンの異常な凝集塊の形成を誘導した (B'と C'の矢じり)。スケールバー: 20 μm。

(2) 生殖質形成におけるリガンド非依存的な YI 受容体の役割

私たちは、細胞外ドメインを欠く YI 受容体の過剰発現はドミナントネガティブな作用を持つと予想した。そこで、膜局在化シグナルをつけた YI 受容体の細胞内ドメインを雌の生殖系列細胞特異的に発現させた。その結果、予想に反して、野生型での YI 受容体の細胞内ドメインの過剰発現による生殖質形成への影響は認められなかった。その一方、*yl* 変異体での YI 受容体の細胞内ドメインの過剰発現は、生殖質形成の異常を回復させることが確認された。このことは、リガンドに依存しない YI 受容体の機能も生殖質形成に重要であることを示唆している。

(3) Yolkless のエンドサイトーシス制御に必要な機能ドメインの特定

次に、YI 受容体の細胞内ドメインのどの部位がエンドサイトーシス制御に関わるのかを検討した。YI は 1 回膜貫通型受容体で、C 末端側の約 150 アミノ酸残基からなる細胞内ドメインをもつ。細胞内ドメインには、エンドサイトーシス誘起に関与することが知られる複数のモチーフが存在している。それぞれのモチーフを欠損した YI 受容体をショウジョウバエの S2 培養細胞で発現させ、局在性を検討した結果、エンドサイトーシスに必要な細胞内ドメインの部位を特定した。今後、その部位に結合する因子の探索と機能解析を進めることで YI 受容体のエンドサイトーシス制御の分子機構を明らかにする予定である。

(4) 神経細胞の極性形成におけるエンドサイトーシス制御の役割

卵母細胞での解析から得られた成果の普遍性を検証する目的で、神経細胞の極性形成におけるエンドサイトーシス制御の役割について検討を行った。Osk は神経細胞においても、細胞極性制御に関与する (Xu et al *J Neurosci* 2013)。一方、*yl* は雌の生殖系列細胞でのみ発現することから、私たちは、YI と同じく LRP ファミリーに属する受容体が神経細胞の極性形成に重要であると予想した。そこで、LRP ファミリーに属する受容体を神経細胞特異的にノックダウンした結果、樹状突起の形状に影響の認められる LRP 受容体を複数特定した。今後、解析をさらに進めることで、神経細胞の極性形成における Osk 依存的なエンドサイトーシス制御の役割を明らかにする。

<引用論文>

Schonbaum, C.P., Perrino, J.J., and Mahowald, A.P. (2000) Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Mol. Biol. Cell* 11, 511-521

Tanaka, T., Kato, Y., Hanyu-Nakamura, K., Matsuda, K., and Nakamura, A. (2011) *Drosophila* Mon2 couples Oskar-induced endocytosis with actin remodeling for cortical anchorage of the germ plasm. *Development* 138, 2523-2532.

Tanaka, T., and Nakamura, A. (2008) The endocytic pathway acts downstream of Oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. *Development* 135, 1107-1117.

Vanzo, N., Oprins, A., Xanthakis, D., Ephrussi, A., and Rabouille, C. (2007) Stimulation of endocytosis and actin dynamics by Oskar polarizes the *Drosophila* oocyte. *Dev. Cell* 12, 543-555.

Xu, X., Brechbiel, J.L., and Gavis, E.R. (2013) Dynein-dependent transport of *nanos* RNA in *Drosophila* sensory neurons requires Rumpelstiltskin and the germ plasm organizer Oskar. *J. Neurosci.* 33, 14791-14800.

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

Tanaka, T., Otsu, S., Tani, N., and Nakamura, A. Roles of yolk uptake in the *Drosophila* oocyte polarization and germ plasm assembly. The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems. January 11-12, 2018 (Kumamoto).

Tanaka, T., Otsu, S., Tani, N., and Nakamura, A. Ligand-induced endocytosis of the yolk-protein receptor *Yolkless* is required for the oocyte polarization and germ plasm assembly in *Drosophila*. The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro. July 26-28, 2017 (Fukuoka).

田中翼、大津佐千子、谷直紀、中村輝 . ショウジョウバエにおいて卵黄タンパク受容体 *Yolkless* のエンドサイトーシス制御は卵母細胞の極性形成と生殖質形成に必要である . 第 50 回日本発発生物学会大会、タワーホール船堀 (東京都) 平成 29 年 5 月 10-13 日 .

田中翼、大津佐千子、谷直紀、中村輝 . 卵黄タンパク質受容体 *Yolkless* のエンドサイトーシス制御は細胞極性と生殖質の形成に必要である . 発発生物学会秋季シンポジウム 2016、三島市民文化会館 (静岡県三島市) 平成 28 年 10 月 19-21 日

田中翼、大津佐千子、谷直紀、中村輝 . Oocyte polarity establishment and germ plasm assembly require the endocytic regulation of the yolk protein receptor *Yolkless*. 第 12 回日本ショウジョウバエ研究会、立教大学 (東京都) 平成 28 年 9 月 9-11 日

〔その他〕

熊本大学発発生医学研究所ホームページ
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。