

機関番号：63801

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570213

研究課題名 (和文) ショウジョウバエの生殖系列における幹細胞への発生運命決定機構

研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms underlying stem cell fate determination in *Drosophila* germline

研究代表者

浅岡 美穂 (ASAOKA MIHO)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：40370118

研究成果の概要 (和文)：

幹細胞は、多くの高等動物で組織の修復や維持に中心的な役割を担っているが、その形成機構は未だ不明な点が多い。幹細胞は、発生過程で一部の細胞が選択され未分化状態に保たれることにより形成される。本研究では、ショウジョウバエの幼虫卵巣において、生殖幹細胞形成予定域では体細胞の細胞膜上で膜タンパク質 Pap が高く発現し、直下にある始原生殖細胞の未分化状態を維持しそれらが生殖幹細胞になるのを保証することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Stem cells play a central role in maintenance and repair of the adult tissues in many higher organisms. However, it remains largely unknown how stem cells are formed during tissue development. In *Drosophila* developing ovary (larval ovary), only a subset of primordial germ cells (PGCs) are selected and maintained in an undifferentiated state to become germline stem cells (GSCs), while others start to differentiate towards oogenesis. Here, we found that the subset of PGCs are surrounded by a specific somatic cells which can be defined with a high expression of a immunoglobulin superfamily protein, Patch paste/Dpr17 (Pap), on the cell membrane. We showed that Pap is required for the maintenance of these PGCs in undifferentiated state, ensuring their potential to become GSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、生殖幹細胞、幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞は組織を構築する細胞を生み出す未分化な細胞で多くの高等動物組織においてその維持と修復に中心的な役割を果たしている。成体組織中では幹細胞は周辺にあるニッチ細胞により維持されているが、発生過程での幹細胞の形成機構については未だ不明な点が多い。我々はこれまでに、ショウジョウバエ卵巣にある生殖幹細胞は胚卵巣の前半部にある始原生殖細胞のみに由来することを明らかにした。これらの始原生殖細胞はニッチ細胞形成以前の幼虫期に卵巣前方で未分化状態のまま維持され、蛹期に形成直後のニッチ細胞に接着して生殖幹細胞となる。一方、胚卵巣後半部の始原生殖細胞は幼虫期に卵巣後方で配偶子形成過程を開始し、幹細胞を経ることなく卵細胞に分化する。以上のことは、ニッチ細胞形成以前の卵巣において前半部の始原生殖細胞を未分化な状態に維持しておくことが生殖幹細胞の形成に重要なことを示唆する。

(2) 始原生殖細胞から生殖幹細胞への分化機構の解明への足がかりを得るため、我々はこれまでに始原生殖細胞を取り巻く体細胞に焦点を当て、これらの細胞で発現し生殖幹細胞の形成に関わる遺伝子を RNAi による遺伝子機能阻害系を用いてスクリーンしてきた。胚卵巣もしくは幼虫卵巣の体細胞で RNAi を発現させて特定の遺伝子の機能を阻害した場合に、成虫卵巣中の生殖幹細胞数が減少する遺伝子を探索した。このスクリーンにより、胚卵巣もしくは幼虫卵巣の体細胞で発現し生殖幹細胞の形成を調節する遺伝子の候補として、*pap* を含む数個の遺伝子を同定している。

(3) 胚卵巣前半部の始原生殖細胞で特異的に発現し、生殖幹細胞への発生運命の決定に働く遺伝子を探索する準備も進めて来た。その一つとして、胚卵巣前半部の始原生殖細胞に特異的な分子マーカーとして、P 因子の第3イントロンを同定している。P 因子の第3イントロンは胚卵巣中で前半部にある始原生殖細胞の一部で高頻度にスプライシングされる。胚卵巣中の始原生殖細胞の一部は幼虫期までに致死となり、生殖幹細胞や卵形成には貢献しないことが知られていることを考慮すると、この第3イントロンをスプライシングする活性を持つ始原生殖細胞が生殖幹細胞の前駆細胞

胞である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ卵巣における生殖幹細胞形成機構を分子レベルで理解するため、以下の2つのことを目的として研究を行った。

(1) *pap* の機能解析により、卵巣中の体細胞の生殖幹細胞形成過程での役割を明らかにする。

(2) P 因子の第3イントロンをスプライシングした始原生殖細胞とその子孫の lineage を明らかにするとともに、それらを単離・精製する方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) *pap* 遺伝子の機能解析

① *pap* 遺伝子領域のゲノム DNA を欠失した突然変異系統を作製し、その卵巣の表現型を観察することにより、生殖幹細胞の減少の原因となる表現型を決定する。

② *pap* 遺伝子を卵巣中の特定の体細胞または始原生殖細胞で特異的に発現させる系統を作製し、rescue 実験により、*pap* 遺伝子が機能する細胞種を特定する。

③ *in situ* hybridization 法により *pap* mRNA の時空間的発現パターンを決定する。Pap タンパク質を抗原とした抗体を作製し、それを用いて、Pap タンパク質の時空間的発現パターンや細胞内局在パターンを明らかにする。

④ これまでに、幼虫期の卵巣中では、始原生殖細胞の早期の分化が Decapentaplegic (Dpp) により抑制されていることが知られている。Pap が Dpp シグナルと関連して生殖幹細胞形成や始原生殖細胞の未分化状態の維持に働く可能性について調べる。

(2) 胚卵巣前半部の始原生殖細胞とその子孫細胞を精製・単離する方法の開発

① P 因子第3イントロンのスプライシング活性を可視化する系統の作成：*heat shock* 遺伝子の promoter の下流に P 因子のエクソンとイントロンをつなぎ、第3イントロンの下流

に *GAL4* 遺伝子の coding region を挿入した融合遺伝子 (*PGH*) を作成し、transgenic 系統を得る。P 因子の第3イントロン中には stop codon が存在するため、この系統では第3イントロンが splicing を受けた場合にのみ *GAL4* 蛋白質が翻訳される。*PGH* 系統を *UAS-RFP* 系統や生殖細胞系列で特異的に EGFP (Enhanced GreenFluorescent Protein) を発現する *vasa-EGFP* 系統と掛け合わせ、3つの transgene を併せ持つ系統を得る。得られた系統の胚に heat shock をかけて *PGH* 融合遺伝子を転写させると、第3イントロンが splicing された細胞でのみ *GAL4* 蛋白質が翻訳され、Gal4-UAS システムにより RFP (RedFluorescent Protein) が産生される。

② 胚卵巣前半部と後半部の始原生殖細胞の分離・精製：①で作製した *PGH*, *vasa-EGFP*, *UAS-RFP* を併せ持つ胚の細胞をバラバラに解離させた後、FACS を用いて GFP と RFP の発現を指標にして、生殖巣前半部の始原生殖細胞 (GFP と RFP を発現) と後半部の始原生殖細胞 (GFP のみを発現) を分離・精製し、マイクロアレイにより遺伝子発現を比較する。

③ P 因子第3イントロンのスプライシング活性を持つ始原生殖細胞の lineage 解析：*PGH*, *vasa-EGFP*, *UAS-RFP* を持つ系統に、*UAS-gal4* 系統を掛け合わせ、4つの transgene を併せ持つ系統を得る。この系統では、第3イントロンが splicing されて *gal4* mRNA が翻訳されると、Gal4-UAS システムにより *GAL4* 蛋白質を半永久的に産生し続けるため、その細胞の子孫は全て RFP で標識される。成虫期の卵巣を観察し、生殖幹細胞がすべて RFP を発現しているかを調べる。

④ ③で作製した系統の様々なステージの卵巣において、②と同様の方法により、生殖巣前半部の始原生殖細胞の子孫 (GFP と RFP を発現) と後半部の始原生殖細胞の子孫 (GFP のみを発現) の分離・精製を試みる。

4. 研究成果

(1) *pap* mRNA 及び Pap 蛋白質は胚卵巣形成時から卵巣前半部の始原生殖細胞と直接接している体細胞で発現し始め、幼虫期にもその発現パターンは維持されることが明らかとな

った。これらの細胞中で Pap 蛋白質は細胞膜上に局在し、特に、幼虫期にはこれら体細胞が始原生殖細胞間に入り込むように伸ばす細かい細胞突起の細胞膜上で強く発現する。この Pap の発現は生殖幹細胞の出現後には消失し、成虫卵巣においても発現は見られない。以上の結果は、Pap が生殖幹細胞の前駆細胞である胚卵巣前半部の始原生殖細胞とその子孫を取り囲む体細胞で特異的に発現すること、その発現は生殖幹細胞形成過程にのみ限られ一過的であることが明らかとなった。

正常発生過程では幼虫期に卵巣後半部の始原生殖細胞は分化過程に入るが、卵巣前半部 (生殖幹細胞形成予定域の近傍) の始原生殖細胞は未分化状態のまま維持される。Pap を欠く突然変異系統では、幼虫期にこれら卵巣前半部にある始原生殖細胞が未分化状態を維持できずに卵細胞への分化過程に入ることが明らかとなった。そのような卵巣では、幼虫-蛹移行期に形成直後の生殖幹細胞数が減少しており、その数は成虫期になっても回復しないことが明らかとなった。このように Pap は幼虫卵巣の生殖幹細胞形成予定域にある体細胞で発現し、直下の始原生殖細胞の未分化状態を維持するために必要な微小環境を作り、十分な数の生殖幹細胞の形成を補償するのに必要であることが明らかとなった。Pap の発現は生殖幹細胞形成過程に限定されるので、この微小環境は成体で見られる幹細胞の維持に必要な“幹細胞ニッチ”とは区別される。本研究は、そのような微小環境を“幹細胞前駆体のためのニッチ”と名付け、新たな概念として提唱した。

さらに、本研究では、Pap が Dpp シグナルの作用範囲を幼虫卵巣前半部全体で維持することにより、この領域の始原生殖細胞の未分化状態を維持することも明らかにした。

(2) P 因子の第3イントロンのスプライシングの有無を *GAL4* 蛋白質の産生に置き換えて検出できる *PGH* 系統の作成を試みた。*GAL4* 遺伝子の coding region の一部もしくは DNA 結合ドメインに VP16 の活性化ドメインをつなげた断片で *PGH* 系統作成を試みたが、スプライシング活性を再現できる系統は得られなかった。VP16 蛋白質や *GAL4* 蛋白質はやや毒性を示すため、発現レベルが弱い系統しか確立できず、それらではスプライシング活性を検出することができなかった。

代替策として、GAL4 蛋白質の代わりに第 3 イントロン後ろに Flipase (染色体組換え酵素)をつないだ系統を作製した。これらの系統ではスプライシングが生じた細胞で染色体組換え酵素が発現するため、一定の頻度で染色体組換えを誘発し、クローンを作製し検出することが可能と予想された。しかしながら、染色体組換えを起こす頻度が低すぎて、解析に十分な量の細胞を標識することができなかった。

以上のように、現在まだ P 因子の第 3 イントロンのスプライシング活性を持つ細胞のみを蛍光色素で標識する系統の作成は成功に至っていないが、現在もコンストラクトの内容を吟味し、系統の樹立を目指して続行している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 浅岡美穂、ショウジョウバエ配偶子幹細胞とニッチ、細胞工学、査読無、29 巻、2010、pp.638-644
- ② 浅岡美穂、幹細胞の局在を決めるのは何か、Surgery Frontier、査読無、16 巻、2009、pp.339-342

[学会発表] (計 8 件)

- ① Shinya Matsuoka、Maintenance of undifferentiated state of stem cell precursors in the *Drosophila* ovary、52nd Annual Drosophila Conference、2011 年 3 月 30 日-4 月 3 日、San Diego
- ② Miho Asaoka、A transient niche in the *Drosophila* ovary maintains germline stem cell precursors in an undifferentiated state、2010 年 10 月 6 日、Cold Spring Harbor, NY
- ③ Shinya Matsuoka、gone early maintains stem-cell precursors in undifferentiated state to establish adequate number of germline stem cells in *Drosophila* ovary、The 32nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan、2009 年 12 月 9 日、横浜

- ④ Miho Asaoka、The maintenance of undifferentiated state of stem-cell precursors in *Drosophila* germline、42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists、2009 年 5 月 29 日、新潟
- ⑤ Shinya Matsuoka、Gone early maintains undifferentiated state of primordial germ cells and regulates establishment of germline stem cells、42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists、2009 年 5 月 30 日、新潟
- ⑥ Miho Asaoka、The maintenance of undifferentiated state of stem-cell precursors in *Drosophila* germline、The 7th Stem Cell Reserach Symposium、2009 年 5 月 16 日、東京
- ⑦ Shinya Matsuoka、Gone early maintains undifferentiated state of primordial germ cells and regulates establishment of germline stem cells、The 7th Stem Cell Reserach Symposium、2009 年 5 月 16 日、東京
- ⑧ Miho Asaoka、Germline stem cell formation in *Drosophila* ovary、41st annual meeting of JSDB (co-sponsored by ISDB)、2008 年 5 月 30 日、徳島

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/hiromi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅岡 美穂 (ASAOKA MIHO)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号：40370118

(2) 研究分担者

広海 健 (HIROMI YASUSHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授
研究者番号：70291888