

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770006

研究課題名(和文)受精に依存した胚発生開始の遺伝的制御機構の解析

研究課題名(英文)Initiation of nuclear divisions and restoration of diploidy in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*

研究代表者

平井 和之(Hirai, Kazuyuki)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：70597335

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文): 有性生殖を行う生物の胚発生は受精によって引き起こされる。野生型ショウジョウバエの未受精卵でも、減数分裂完了後の雌性前核は核分裂が抑制されており、卵の受精がその抑制解除に必須である。本研究では、アナナスショウジョウバエの有性生殖系統の未受精卵と受精卵、および単為発生系統の未受精卵における核分裂を細胞学的に比較解析した。その結果、いずれの胚発生開始にも、中心体の働きが重要であることが分かった。特に、精子が関与しない単為発生胚では、卵細胞質中に複数個の中心体が新規合成されていた。これら中心体が、半数体の雌性前核の分裂と、娘核の融合による二倍体核形成に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文): Parthenogenesis is the development of an unfertilized egg into a new individual. We here examined the mechanisms by which the following problems are solved in parthenogenetic strains of *Drosophila ananassae*: Mitotic division of the female pronucleus and restoration of diploidy. We found that, in unfertilized eggs of both sexual and parthenogenetic strains, an acentrosomal spindle is assembled around the chromosomes of the female pronucleus, after completion of S phase. It is striking that eggs that were laid by parthenogenetic females assembled centrosome-like structures de novo, which were scattered in the anterior part of the egg cytoplasm. Our data suggest a role of the centrosome-like structures in stimulating the nuclear division of the female pronucleus. We also found that the first diploid nucleus is formed by fusion of two haploid chromosome sets at telophase of the second nuclear cycle of parthenogenetic embryos, resembling the gonomeric division in sexual development.

研究分野: 細胞遺伝学

キーワード: 遺伝学 二倍体 中心体 受精 単為発生 ショウジョウバエ ゲノム 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う生物の胚発生開始は受精依存的である。ショウジョウバエ野生型(有性生殖)系統の未受精卵でも、減数分裂完了後の雌性前核において細胞周期は停止しており、卵の受精がその再開に必須である。未受精卵において、雌性前核はG1期で停止している。雌性前核は、受精後、雄性前核と同調的にS期へ移行し、胚における新しい細胞周期が始まる(図1)。有性生殖系統では、この受精依存的な細胞周期の進行制御により単為発生が抑制され、その結果、有性発生が保証されると考えられる。しかし、この未受精卵の雌性前核における細胞周期進行抑制がどのような機構で制御されているか、未解明の問題として残されている。

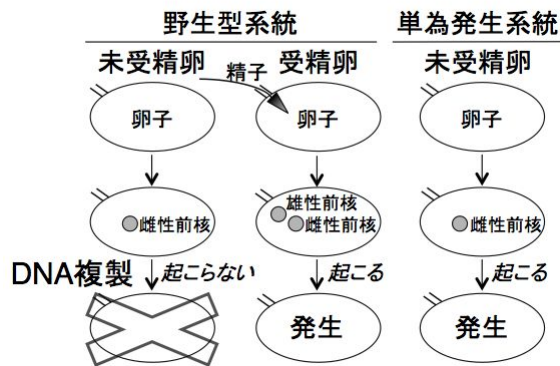


図1. ショウジョウバエにおける受精とDNA複製  
野生型系統の未受精卵において、前核のDNA複製は抑制されている。前核のDNA複製は受精依存的に引き起こされる。一方、単為発生系統では受精非依存的に雌性前核のDNA複製が開始され、胚発生が始まる。

## 2. 研究の目的

有性生殖における受精依存的な発生開始機構を解析するために、未受精卵から発生が始まる単為生殖系統が有用であると考えられる。近年、申請者の研究室において、アナナスショウジョウバエとその近縁種の単為生殖系統が確立された。これらの生物種は基本的に有性生殖を行っているが、特定の自然集団には単為生殖可能な遺伝的多型が存在する。これらから単離された単為生殖系統は、実験室において雌だけでの系統維持が可能であり、未受精卵から最終的に2倍体の成虫雌が形成される。

(1) そこで本研究では、アナナスショウジョウバエの単為発生における二倍体化機構を明らかにすることを目的に、この単為生殖系統と有性生殖系統の卵形成過程および初期

胚の発生について詳細な細胞学的解析を行うことにした。単為発生と有性発生を比較し、有性生殖の成立に重要な、単為発生を抑制している機構を明らかにする。

(2) また、有性生殖と単為生殖の2種類の生殖様式を決定づける遺伝子の特定を目的として、比較ゲノム解析と、単為生殖系統の有性生殖系統への戻し交配による単為生殖の原因となっている遺伝子のマッピングを行った。

本研究では、有性生殖が成立するために重要な、受精卵が、両親からの遺伝情報を合わせ持ち、二倍体としての発生を開始することを保証する機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 雌の減数分裂における不分離率は遺伝学的手法により測定した。

(2) 雌の減数分裂を細胞学的に解析するために、卵巣を解剖し、ステージ14の卵母細胞を集めた。また、単為発生の初期胚における単為発生での核分裂を解析するために、未交尾雌から産卵後短時間の卵を集めた。それらの固定後、中心体構成因子に対する抗体、微小管に対する抗体を用いて免疫染色した。あわせてDNA染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

(3) 国立遺伝学研究所の豊田敦博士との共同研究により、単為生殖系統と有性生殖系統の比較ゲノム解析を行った。ゲノムDNAを未交尾雌から抽出した。イルミナシーケンサーで短いリードの塩基配列を決定し、公開されているアナナスショウジョウバエのゲノム情報(UCSC droAna3)に照らしあわせ、各系統における一塩基多型、小さな挿入欠失多型を検出した。

## 4. 研究成果

(1) 単為発生胚の細胞学的解析

アナナスショウジョウバエ単為生殖系統雌が産む未受精卵のうち8%から、成虫が得られた。残りの92%は胚期から蛹期の間で致死となるが、ほとんど全ては胚期致死であることが分かった。このことは、単為発生の成功に、胚期の過程が重要であることを示唆する。

様々な生物における単為発生において、減数分裂の抑制によって形成された二倍体卵

に由来する場合と、正常な減数分裂により半数体の卵を形成した後に二倍体の胚が形成される場合が知られている。アナナスショウジョウバエ単為生殖系統雌では、減数分裂は細胞学的にも遺伝学的にも正常であった。染色体の不分離率も、単為生殖系統は有性生殖系統同様に低く、正常な半数体の卵を形成していることを確認した。

単為生殖系統において、産卵後 2-3 時間の胚の倍数性を調べたところ、多くは半数体での核分裂の進行が認められた。これらは胚発生の過程で致死になると考えられる。しかし、10%の胚は二倍体であった。これらは単為発生により成虫となる可能性をもつ。

以上より、アナナスショウジョウバエにおける単為発生は、ひとつの減数分裂産物である半数体核をもとに、胚発生の早い時期に二倍体核を形成し、二倍体としての発生を行っていることがわかった。

ひとつの半数体核を倍加して二倍体核が形成される様式として、3つの可能性が考えられた。第1に、半数体核が endomitosis と呼ばれる、核分裂のない2度の連続した DNA 複製を行って二倍体核を形成した可能性が考えられる。第2に、半数体核の第1回目の核分裂の際、全ての染色体に不分離が生じ、二倍体核が形成された可能性がある。第3に、はじめに半数体核の核分裂を行った後、半数体の娘核が融合することで二倍核が形成された可能性が考えられた。

これらを検証するために、初期胚における核分裂を細胞学的に解析した。その結果、アナナスショウジョウバエの単為発生では、第3の可能性、娘核の融合による二倍体化が引き起こされていることが分かった。

核分裂は紡錘体を介して行われる。有性生殖において、胚の紡錘体は、一般的に中心体から放出される微小管によって形成される。卵には中心体がなく、胚における中心体は精子由来の中心小体に依存して形成される。しかし、単為発生において精子の関与はない。単為発生胚を、中心体の構成タンパク質である Centrosomin と Asterless に対する抗体で調べたところ、それらの因子をあわせ持ち、さらに微小管の形成を行っている中心体様の構造が、卵細胞質で複数個形成され、存在していることが分かった。有性生殖系統の未受精卵において、そのような構造体は決して

認められなかった。

産卵後 30 分以内の初期胚を、詳細に解析したところ、この中心体様の構造体は、雌性前核の核分裂と、それに続く娘核の融合に重要な役割を持つことが分かった。アナナスショウジョウバエでは、有性生殖系統と単為生殖系統の両方で、雌性前核のまわりに中心体非依存的な紡錘体が形成されている。有性生殖系統の未受精卵では、その雌性前核が分裂することはない。しかし、単為生殖系統において新規合成された中心体が、事前に形成されている中心体を持たない紡錘体の極へ結合している場合のみ、染色体の分離が認められた。さらに次のサイクルで、ひとつの中心体から放出された紡錘系により、新たに形成された2つの娘核が捕らえられ、その結果、二倍体核が形成されていることが分かった。

## (2) 単為発生遺伝子のマッピング

有性生殖系統と単為生殖系統の比較ゲノム解析において、単為生殖の原因の候補となる、有性生殖系統には存在せず、複数の単為生殖系統が共通して保有する一塩基多型と小さな挿入または欠失の多型は、ゲノム全体に約 100,000 ヶ所も存在することが分かった。この結果はイルミナシーケンサーを用いた短いリードのデータに基づいており、各シーケンスを、2005年に公開されたゲノム情報に照合し、抽出されたものである。しかし、リードがマップできない領域も多数存在し、現在のところ単為生殖の原因遺伝子の特定には至っていない。

また、単為生殖系統の有性生殖系統への9回の戻し交配により、独立した染色体置換が施された、新たな単為生殖系統を多数作製した。それらのうち単為生殖により安定して系統維持ができた6系統について、共通する単為生殖由来のゲノム領域を調べたところ、それらの系統は、第2染色体左腕の一部と第3染色体左腕の一部を保持していることが分かった。これらの領域に単為発生の成立に必要な多型が存在していると考えられる。

本研究において、父性中心体が存在しない単為発生胚では、中心体様の構造体が卵細胞質中で新規合成され、この働きが、単為発生開始期における雌性前核の核分裂進行と、その後の娘核融合による二倍体化に重要であ

ることを明らかにした。新規合成された中心体様の構造の、単為発生開始期における役割を具体的に示すことができた。

有性発生では、精子由来の中心小体をもとに受精卵の細胞質中で中心体が形成される。したがって、有性生殖の成立に、単為発生胚で見られる中心体様構造の新規合成は抑制されている。アナナスショウジョウバエの有性生殖の進化の過程で現れた単為生殖の遺伝的多型は、少なくとも、卵細胞質における中心体様構造の新規合成を引き起こしていることが示唆された。

現在、本研究結果についての投稿論文を準備している。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

Hirai, K., Shima, Y., Minakuchi, Y., Toyoda, A., and Muneo Matsuda. *De novo* synthesis of centrosome-like structures and diploidization in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells. Cold Spring Harbor, USA. 2014 年 10 月 7-11 日.

平井和之, 島幸夫, 水口洋平, 豊田敦, 松田宗男. アナナスショウジョウバエの単為発生における二倍体核形成機構. 日本遺伝学会第 86 回大会. 長浜. 2014 年 9 月 17-19 日.

Hirai, K., Kudo, A., Shima, Y., Minakuchi, Y., Toyoda, A., and Muneo Matsuda. *De novo* centrosome synthesis and diploidization in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*-complex species. The 11th Japanese *Drosophila* Research Conference. 金沢. 2014 年 6 月 4-6 日.

Hirai, K., and Matsuda, M. *De novo* centrosome synthesis and diploidization in parthenogenetic embryos of *Drosophila*

*ananassae*-complex species. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月 3-6 日.

平井和之, 松田宗男. アナナスショウジョウバエにおける単為発生開始機構の解析. 国立遺伝学研究所共同研究会 ショウジョウバエ多様性研究会, 三島. 2013 年 9 月 28-30 日.

Hirai, K., Kudo, A., and Matsuda, M. *De novo* synthesis of centrosomes and diploidization in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*. EMBO workshop *Drosophila* cell division cycle. Totnes, UK, 2013 年 9 月 12-16 日.

Hirai, K., Kudo, A., and Matsuda, M. *de novo* centrosome synthesis in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*-complex species. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2013 年 6 月 19-21 日.

平井和之, 宮東昭彦, 松田宗男. アナナスショウジョウバエ単為発生系統における 2 倍体化機構の解析. 日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡, 2012 年 9 月 24-26 日.

Hirai, K., Kudo, A., and Matsuda, M. Cytological investigation of the mechanism of parthenogenesis in *Drosophila ananassae*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells. Cold Spring Harbor, USA. 2012 年 10 月 2-6 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 和之 (HIRAI, Kazuyuki)  
杏林大学・医学部・講師  
研究者番号: 7 0 5 9 7 3 3 5

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし