

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570233

研究課題名（和文） ショウジョウバエの減数分裂を制御する母性因子複合体の解析

研究課題名（英文） Characterization of maternal factor Mamo which is associated with the regulation of germline development and meiosis in *Drosophila*

研究代表者

向 正則（Mukai Masanori）

甲南大学・理工学部・講師

研究者番号：90281592

研究成果の概要（和文）：Mamo タンパク質はショウジョウバエの生殖細胞の分化に必要な母性因子として同定された。しかし、Mamo の作用機構は明らかになっていない。本研究により、Mamo が特定の標的遺伝子座に直接結合し、クロマチン構造を変化させることで、標的遺伝子の発現を制御する可能性が明らかになった。本研究により、生殖細胞を作り出すために始原生殖細胞中のクロマチン構造を制御することが必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Maternal factor Mamo is autonomously required in pole cells to produce functional gametes in *Drosophila*. Mamo protein is predicted to regulate the expression of downstream genes as a chromatin regulator, since Mamo shares sequence homology with chromatin regulators that contain both a BTB/POZ domain and C₂H₂ zinc finger motifs. Using *in vitro* assays and genetic analysis, we show that Mamo protein directly binds to specific DNA consensus sequences in target downstream genes in order to regulate their expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

1. 研究開始当初の背景

(1) ショウジョウバエの始原生殖細胞 (PGC) は卵の後極に局在する特殊な細胞質（生殖質）を取り込み形成される。この時に

生殖質に含まれる母性因子（RNA、タンパク質分子と予想される）が PGC の形成と配偶子への分化に必要十分であることが、

生殖質の形成に関わる遺伝子の突然変異体の解析、古典的な生殖質の移植実験から証明されている。これまでに母性因子の同定と機能解析が国内外で精力的に進められており、PGCの初期発生、特にPGCの形成、生存に関与する母性因子 (*mtlrRNA*, *Pgc*, *Nanos*, *Gcl* など) が同定されているが、PGCから配偶子への分化に関わる母性因子は明らかになっていなかった。

(2) 私たちは、遺伝学的スクリーニングを用いて、PGCの分化を制御する母性因子の同定を試みた。その結果、新規母性因子 *Mamo* の同定に成功した。*Mamo* を欠いた PGC (*mamo*⁻ PGC) 中では、生殖細胞特異的遺伝子 *vasa* 遺伝子のエンハンサーの活性化が起こらない。さらに、*mamo*⁻ PGC の発生運命を調べたところ、*mamo*⁻ PGC は卵母細胞には分化するが、その後、卵母細胞中で起こる減数分裂の過程に異常が起こり、受精可能な卵細胞に分化できないことが判明した。これまでに、減数分裂などの生殖細胞特異的な細胞内の反応が調べられているが、どのような分子機構で、減数分裂を遂行する能力が生殖細胞に付与されるのかは不明であった。母性因子 *Mamo* の結果は、初期胚の PGC 中に、すでに減数分裂などの生殖細胞の分化のための遺伝子発現の準備が作り出されている可能性を示唆する。このため、母性因子 *Mamo* の作用の標的となる遺伝子 (*Mamo* 標的遺伝子) を同定すること、*Mamo* と相互作用する因子や *Mamo* 複合体の解析を通じて、*Mamo* の作用機構を調べることで、生殖細胞中で生殖細胞特異的な遺伝子発現制御プログラムの実態に迫れると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 母性因子 *Mamo* の作用機構を調べるため

に、まず *Mamo* タンパク質自体の性質を明らかにする必要がある。そこで、*Mamo* タンパク質のもつ機能ドメイン、BTB/POZ ドメインと C₂H₂ 型 Zn フィンガードドメインに注目し、それぞれの性質の解析を試みた。BTB/POZ ドメインはタンパク質とタンパク質の間の相互作用に関与することが知られている。また C₂H₂ 型 Zn フィンガードドメインは直接 DNA に結合することが知られている。そこで *Mamo* が結合するクロマチン、DNA、さらに標的遺伝子の同定解析を試みた。また *Mamo* と相互作用するコファクターの同定し、*Mamo* を含む機能複合体の解析することを試みた。

(2) 減数分裂などの生殖細胞の分化には、母性因子により細胞自律的に制御される分子機構とともに生殖細胞を取り囲む体細胞環境が重要な働きをもつことが示唆されている。しかし、どのような分子が体細胞から生殖細胞に働きかけるのか、そのことにより生殖細胞中のどのようなシグナル伝達が制御されるのかに関する知見は乏しい。突然変異体を用いて、生殖細胞と体細胞間の相互作用の解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) *Mamo* タンパク質がクロマチンに結合する能力をもつかどうかを解析するために、*mamo* 遺伝子を Gal4/UAS システムを用いて唾液腺で強制発現し、間期のクロマチンモデルである多糸染色体に *Mamo* タンパク質が結合するかどうかを解析した。さらに、*Mamo* が直接 DNA に結合する能力をもつかを解析するために、MZD と GST タンパク質の融合リコンビナントタンパク (*GST-MZD*) を合成、精製し、これ

を用いて、SELEX 実験を行い、GST-MZD が *in vitro* で結合する塩基配列 (Mamo 結合配列) を明らかにした。MZD が直接 DNA に結合するか、またどのような塩基配列をもつ DNA と結合するかをゲルシフト法により解析した。次に、Mamo 結合配列を用いて相同性検索を行い、*in vivo* の標的配列を解析した。遺伝子近傍に Mamo 結合配列をもつ Mamo 標的遺伝子の候補遺伝子を同定し、遺伝子発現パターンを解析した。Mamo 強制発現により候補遺伝子の発現がどのような影響を受けるかを調べた。また Mamo が標的遺伝子座に直接作用するかを、Mamo 強制発現胚を材料とした ChIP アッセイにより解析した。

Mamo と共同して作用するコファクターの候補として転写制御に関わる BIP2 に注目し、Mamo と BIP2 が *in vivo* で結合するかを免疫沈降実験により解析した。Mamo と結合する未知の因子を同定するために、Mamo の BTB/POZ ドメインに結合するタンパク質の同定を試みた。さらに Mamo と共同して作用する遺伝子を解析するために、遺伝学的スクリーニングの解析系の構築を行い、相互作用する遺伝子の解析を試みた。

(2) 劣性不妊の表現型を示す突然変異体を作成し、その原因遺伝子 *innexin2* (*inx2*) 遺伝子を同定した。*inx2* 遺伝子はギャップ結合を構成するタンパク質をコードする。ギャップ結合は細胞間の相互作用に関与する。このことから、細胞間相互作用が卵形成過程で重要な役割をもつことが示唆される。そこで、*inx2* 遺伝子が作用する細胞を明らかにするために、ショウジョウバエ成虫卵巣中における *inx2* 遺伝子の発現を解析した。さらに、卵巣を構成する体細胞、IGS 細胞と FC 細胞中における *inx2* 遺伝子の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 唾液腺で Mamo を強制発現し、Mamo タンパク質の発現および細胞内分布を免疫組織化学的に解析したところ、母性因子 Mamo がクロマチンに結合することが明らかになった。Mamo タンパク質は多糸染色体上に検出され、さらに特定の染色体バンドに Mamo が結合することが判明した。このことは Mamo が直接特定のクロマチン領域に結合することを示唆する。

(2) Selex 法によりランダムな人工オリゴヌクレオチドから GST-MZD と結合するオリゴヌクレオチドを選別し、MZD と結合するオリゴヌクレオチドをクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、特定の塩基配列をもつ DNA と MZD が結合することが分かった。この塩基配列をもつ DNA と MZD の直接の結合を確認するため、ゲルシフトアッセイを行ったところ、この DNA に MZD が直接結合し (図 1)、その結合が特異的であることが判明した。Mamo が特定の塩基配列をもつ DNA に直接結合することが判明した。

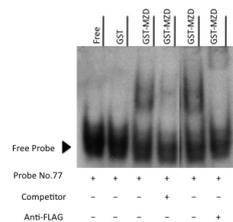


図 1 MZD と標的 DNA の結合

(3) Mamo 結合配列の塩基配列を使い、ショウジョウバエ ゲノム中の Mamo 結合配列を相同性検索したところ、いくつかの遺伝子 (*bru-3*, *RunxA*, *RunxB*, *Ets98B* など) の近傍に相同性が高い配列が検出された。ゲルシフト解析によりこれらの遺伝子の近傍の配列に MZD が直接結合することが確認

できた。これらの Mamo 結合配列は、遺伝子上流よりむしろ、イントロン領域や、コーディング領域に含まれることが分かった。このことから、Mamo がプロモーターやエンハンサーの制御を介して標的遺伝子の転写に関与するのではなく、標的遺伝子座のクロマチン構造を制御することで遺伝子発現に影響を与える可能性が示唆された。

(4) Mamo 標的遺伝子の候補遺伝子のうち *bru-3* 遺伝子の発現を解析した結果、*bru-3* 遺伝子は野生型の初期胚の神経細胞中で強く発現するが、PGC 中では発現しないことが分かった。Mamo は初期胚の体細胞中にはほとんど検出されず、PGC 中に検出されることから、Mamo が PGC 中で *bru-3* 遺伝子の発現を抑制する可能性が示唆された。Mamo を欠いた PGC 中で *bru-3* 遺伝子の発現を解析したところ、一部の PGC 中で異所的な *bru-3* の発現が検出された。また、逆に Mamo を胚全体に強制発現させることにより *bru-3* の神経細胞中での発現が著しく低下することが判明した (図 2)。これらの結果から、Mamo が体細胞性遺伝子 *bru-3* の発現を PGC 中で抑制する作用をもつことが新たに明らかになった。ChIP アッセイを行った結果、in vivo で Mamo が *bru-3* 遺伝子座に結合することが確認できたことから、Mamo がクロマチン制御因子として *bru-3* 遺伝子の発現制御に関与することが示唆される。

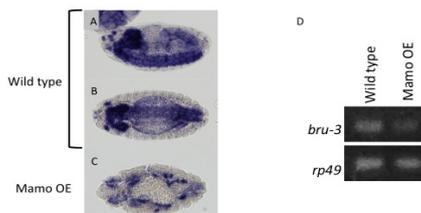


図 2 *bru-3* 遺伝子の Mamo 強制発現胚における発現

(5) Mamo 強制発現胚を用いて、遺伝子発現に対する Mamo の影響を解析したところ、興味深い結果が得られた。Mamo 強制発現胚中で、生殖細胞特異的遺伝子である *vas* 遺伝子の発現を解析したところ、PGC 以外の体細胞中で異所的に *vas* 遺伝子の発現が誘導されることが分かった。また、ゲルシフト解析から、*vas* 遺伝子座にも Mamo 結合配列が存在することが明らかになった。この結果は、Mamo が *vas* 遺伝子の活性化に直接関与する可能性を示唆する。

(6) Mamo と共同して作用するコファクターを明らかにするために、転写制御に関わる BIP2 に注目し、Mamo と BIP2 が in vivo で結合するかを免疫沈降実験により解析した。しかし、Mamo と BIP2 が複合体を形成することを示す結果は得られなかった。(3, 4)の結果からも Mamo がクロマチン制御因子として作用する可能性が示唆されるため、Mamo の BTB/POZ ドメインと結合するタンパク質因子の同定を試みた。GST-BTB/POZ 融合タンパク質を作成し、胚抽出物と混合し、BTB/POZ と結合するタンパク質を pull-down 実験により検出した。BTB/POZ に結合するタンパク質を質量分析解析により解析したところ、ピルビン酸キナーゼ、チューブリン、EF1A1 が同定された。これらのタンパク質は細胞質に含まれ、核内での機能は考えにくい。Mamo が細胞質で新たな機能をもつ可能性が示唆された。これまでにピルビン酸キナーゼ、チューブリン、EF1A1 が Vas タンパク質と結合することが知られている。そこで、BTB/POZ ドメインが Vas タンパク質と間接的に複合体を形成するか解析したところ、ユビキチン化した Vas タンパク質と BTB/POZ ドメインが結合することが判明した。Mamo が Vas タンパク

質の制御に関与する可能性が示唆される。**Mamo** の相互作用因子を明らかにするために、遺伝学的スクリーニングを行ったところ、ヒストン修飾酵素をコードする **CBP** 遺伝子と **Mamo** が相互作用する可能性が明らかになってきた。この結果は、**Mamo** が特定の遺伝子座に結合し、ヒストン修飾の制御を介してクロマチン構造を変化させ、標的遺伝子の発現を制御する考え方を支持する。

(7) *inx2* 遺伝子の劣性不妊アリの解析から、*inx2* 遺伝子が生殖細胞を取り囲む体細胞中で発現し、生殖細胞の分化に必要であることが判明した。IGS 細胞中の *inx2* がシストの分化促進に関与すること、FC 細胞中の *inx2* が生殖細胞と FC 細胞間の細胞接着の制御に関与し、卵室形成に必要であることが判明した。これらの結果は、生殖細胞と体細胞の間のギャップ結合を介した細胞間相互作用が生殖細胞の分化に重要な役割をもつことを示す。

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 M. Mukai, H. Kato, S. Hira, K. Nakamura, H. Kita, S. Kobayashi, Innexin2 gap junctions in somatic support cells are required for cyst formation and for egg chamber formation in *Drosophila*, *Mech. Dev.* 査読有り、128, 2011, 510-523.
DOI:10.1016/j.mod.2011.09.005 (2011)
- ② M. Mukai, H. Honda, N. Ajimura, H. Imai, D. Honda, S. Kobayashi, RpL22-like gene is autonomously expressed in primordial germ cells in *Drosophila* embryos, *Mem. Konan Univ., Sci & Eng. Ser.* 査読無し、57, 2010, 17-28.

[学会発表] (計 16 件)

- ①宮永 奈津紀、木村 宏、向 正則、ショウジョウバエの精巣における精原細胞の分

化にともなうヒストン修飾のダイナミックな変化、第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

②平 誠司、岡本 昂大、小林 悟、向 正則、ショウジョウバエ母性因子 **Mamo** による極細胞中の遺伝子発現制御、第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

③向 正則、中村 克博、平 誠司、小林 悟、木村 宏、Global changes in histone modifications associated with differentiation of cystoblast in *Drosophila* ovary, 第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

④北 大晃、加藤 大貴、平 誠司、向 正則、ショウジョウバエの卵巣における *innexin2* 遺伝子の発現調節の解析、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、旭川市大雪クリスタルホール

⑤中村 克博、向 正則、ショウジョウバエの成虫卵巣における EGFR シグナルの役割、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、旭川市大雪クリスタルホール

⑥平 誠司、北 大晃、岡本 昂大、向 正則、ショウジョウバエの **Mamo** タンパク質による遺伝子の発現調節、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、旭川市大雪クリスタルホール

⑦向 正則、吉田 郁美、宮永 奈津紀、平 誠司、木村 宏、ショウジョウバエ雌性生殖幹細胞分化過程におけるヒストン修飾酵素の役割、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川市大雪クリスタルホール

⑧岡本 昂大、平 誠司、向 正則、小林 悟、ショウジョウバエにおける **Mamo** BTB/POZ ドメインに結合するタンパク因子

の解析、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川市大雪クリスタルホール

⑨向 正則、加藤大貴、平 誠司、中村克博、
Innexin2 gap junctions are essential for the interaction between the germ cells and somatic support cells in early steps of oogenesis in *Drosophila*, BMB2010, 2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

⑩樋之口 由貴子、向 正則、園部治之、エクジステロイド脱リン酸化酵素ホモログの cDNA クローニング、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 25 日、東京大学教養学部

⑪宮永奈津紀、向 正則、木村 宏、ショウジョウバエの精原細胞分化過程におけるヒストン修飾のダイナミックな変化、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学教養学部

⑫向 正則、吉田郁美、宮永奈津紀、平 誠司、木村 宏、ショウジョウバエ雌性生殖幹細胞分化過程におけるヒストン修飾の変化、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学教養学部

⑬平 誠司、岡本昂大、向 正則、Mamo タンパク質の C2H2 型 Zn-finger ドメインの解析、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学教養学部

⑭山内祐子、山本さくら、向 正則、ショウジョウバエ *Dred1* 遺伝子の精巣における機能、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 19 日、静岡県コンベンションアーツセンター

⑮加藤大貴、向 正則、ショウジョウバエの *innexin2* 遺伝子による卵形成過程の制御、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 19 日、静岡県コンベンションアーツセンター

⑯向 正則、吉田郁美、宮永奈津紀、平 誠司、ショウジョウバエ卵形成過程におけるヒストン修飾のダイナミックな変化、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 17 日、静岡

県コンベンションアーツセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 正則 (MUKAI MASANORI)
甲南大学・理工学部・講師
研究者番号：90281592

(3) 連携研究者

小林 悟 (KOBAYASHI SATORU)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構・教授
研究者番号：90225508