

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840082

研究課題名(和文)生殖細胞の形成に必須のmRNAの局在を制御する細胞内小胞の解析

研究課題名(英文)Roles of endocytic vesicles in the assembly of Drosophila germ plasm

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は生命の連続性を維持する上で不可欠な細胞系列である。多くの動物で生殖細胞の決定は、生殖質とよばれる特殊な細胞質領域に制御される。私たちは以前、ショウジョウバエの卵母細胞後端で局所的に活性化されるエンドサイトーシスにより生じる細胞内小胞が生殖質形成に必須の役割を果たすことを明らかにした。本研究では、卵黄タンパク受容体Yolklessに注目して解析を行った。その結果、卵黄タンパクの取り込みにより生じる細胞内小胞が卵母細胞の極性形成、および生殖質形成を制御することが明らかとなった。本研究により得られた成果は、胚発生時の栄養素として卵黄タンパクを利用する幅広い動物種に適応できると予想している。

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. We have previously shown that, in Drosophila, local activation of endocytosis at the posterior end of the oocyte is critical for the assembly of germ plasm. In this study, we focused on the function of yolk protein receptor Yolkless in the germ plasm assembly and found that the endocytic vesicles generated by yolk protein uptake act as platforms for the establishment of oocyte polarity and the germ plasm assembly. As yolk positions in eggs often provide a polarity cue, this model might be adaptive to the polarity mechanism of eggs in various species.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 エンドサイトーシス 卵黄タンパク 細胞極性 RNA局在

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は生命の連続性を保証する唯一の細胞系列である。また、精子と卵子との融合により生じる受精卵は、個体を形成するあらゆる細胞に分化する能力を有している。そのため、生殖細胞の形成・維持の分子基盤を明らかにすることは発生生物学にとって最重要課題の一つとなっている。

多くの動物において、生殖細胞の決定は、卵内の特異的な位置に形成される生殖質により制御される。ショウジョウバエでは、卵形成過程に生殖質因子が逐次的に卵母細胞の後端に局在化されることで、生殖質が形成される。生殖質の形成制御の中心的役割を担う因子の一つである *oskar* (*osk*) は、その mRNA が卵母細胞の後端に局在し、局所的に翻訳される。局在化した *osk* mRNA からは、機能の異なる 2 つのアイソフォーム (S-Osk と L-Osk) が翻訳される。S-Osk が他の生殖質因子を後極へとリクルートするのに対し、L-Osk は細胞内小胞に局在して、リクルートされてきた生殖質因子を後極に係留する (Vanzo et al *Development* 2002; Vanzo et al *Dev Cell* 2007)。

私たちは以前に、生殖質の形成制御において、局所的なエンドサイトーシスの活性化により生じる細胞内小胞が重要な役割を担うことを明らかにした。具体的には、L-Osk が卵母細胞の後端で局所的にエンドサイトーシスを活性化させ、それによって促進されるアクチン骨格の再編成が生殖質因子の局在化に不可欠であること、さらには、アクチン再編成には小胞上に存在するアクチン制御因子が必要であることを明らかにしてきた (Tanaka and Nakamura *Development* 2008; Tanaka et al *Development* 2011; Reviewed in Tanaka and Nakamura *BioArchitecture* 2011)。しかし、L-Osk によるエンドサイトーシス活性化の制御機構、あるいは局所的なエンドサイトーシスにより生じる細胞内小胞の実体やその輸送の制御機構など、細胞内小胞による生殖質形成制御の分子基盤はまったく不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内小胞による生殖質形成の制御機構を明らかにすることを目的にした。特に、細胞内小胞に局在して、生殖質形成を制御する L-Osk と相互作用する因子の同定とそれらの機能解析を足がかりとして、生殖質の形成制御を担う細胞内小胞の実体とその制御機構に迫ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) L-Osk と相互作用する因子の探索

L-Osk と相互作用して生殖質の形成を制御する因子を探索するために、FLAG タグを付けた S-Osk、もしくは L-Osk を生殖系列細胞で

発現するショウジョウバエ系統を作製した。それらの系統の卵巣抽出液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。そして、特に L-Osk と主に共沈する因子を質量解析により同定した。

### (2) CRISPR/Cas9 システムによるショウジョウバエ変異体の作製

L-Osk と共沈する因子として同定した *Yolkless* (YI) の変異体をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。また、YI のリガンドである卵黄タンパク質 (Yp1、Yp2、Yp3) をコードする遺伝子を全て欠失した三重変異体も同様の手法により作製した。

### (3) 生殖質形成における YI の機能解析

生殖質形成における YI の機能を明確とするために、細胞極性、生殖質因子、およびエンドソームのマーカータンパク質に対する特異的抗体を用いて、*yl* の欠失が生殖質形成に与える影響を詳細に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) L-Osk と相互作用する因子の同定

細胞内小胞による生殖質形成の分子基盤を明らかにするために、L-Osk と相互作用する因子の探索を行った。そのために、L-Osk、もしくは S-Osk を発現するショウジョウバエ系統から卵巣抽出液を調整し、免疫沈降実験と質量解析を行った。その結果、2 つのアイソフォームのうち、特に L-Osk とともに共沈する因子として *Yolkless* (YI) を同定した (図 1)。YI は、胚発生時の栄養源となる卵黄タンパク (Yp) の受容体として機能することが知られている (Schonbaum et al *Mol Biol Cell* 2000)。卵形成過程において、YI は卵母細胞の細胞膜に局在して、エンドサイトーシスにより Yp を取り込み、卵母細胞内の特殊な小

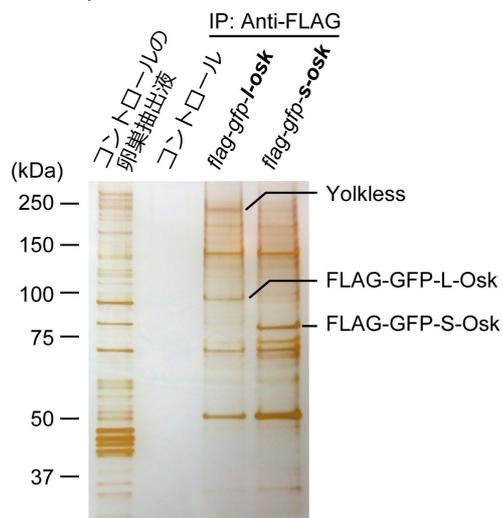


図 1. L-Osk と共沈する *Yolkless* 受容体の同定

Flag タグ付きの L-Osk、もしくは S-Osk を生殖系列細胞に発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降後、銀染色し、質量分析で解析した。その結果、L-Osk と主に共沈する *Yolkless* (250 kDa 付近のバンド) を同定した。

胞（卵黄顆粒）に蓄積させる。しかし、生殖質の形成制御における役割は全く分かっていなかった。

### (2) *yl* の *null* 変異体の単離

生殖質形成における YI の役割を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いて *yl* の *null* 変異体の単離を試みた。その結果、翻訳開始点の直後にフレームシフト変異が導入された複数の変異体を単離した。これら変異体の卵巣抽出液から YI に対する特異的抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、YI のバンドが消失することを確認した。また、卵母細胞内に蓄積された卵黄タンパクは卵黄顆粒に蓄積され、自家蛍光として観察される。しかし、*yl* 変異体では、そのような自家蛍光はほとんど観察されなかった。これらの結果から、得られた変異体は *null* であると考えられた。

### (3) *yl* の生殖質形成への関与

次に、単離した *yl* の *null* 変異体を用いて、生殖質形成に YI が必要であるかどうかを検討した。生殖質形成の過程は、*osk* mRNA が前後軸に沿って配向された微小管に依存して卵母細胞の後端へと輸送され、局所的な翻訳が活性化されることにより開始される。しかし、*yl* 変異体では、微小管が正常に配向せず、*osk* mRNA は卵母細胞の後端付近に拡散していた（図 2）。

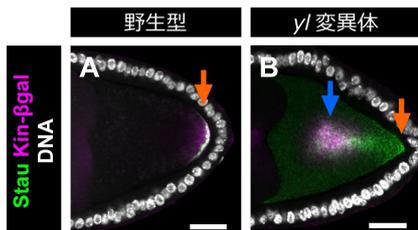


図 2. *yl* 変異体における微小管の配向性と *osk* mRNA の局在化の異常

野生型 (A) と *yl* 変異体 (B) における *osk* mRNA と RNP 複合体を形成する Stau (緑) と微小管のプラス端のマーカである Kin-βgal (マゼンタ) の局在。野生型では、卵母細胞の後端 (橙色の矢印) に Stau と Kin-βgal は局在する。一方、*yl* 変異体では Stau と Kin-βgal は後端付近に拡散していた (水色の矢印)。スケールバー：20 μm。

一方、YI は L-*Osk* と相互作用する因子として同定したことから、L-*Osk* による生殖質因子の係留に関与する可能性についても検討を行った。*yl* を欠失した卵母細胞では、微小管の配向性が異常となり、*osk* mRNA が正常に後極に局在化しないため、YI が生殖質因子の係留に必要なかどうかを検討することは不可能であった。そこで、微小管の配向性の異常の影響を受けない卵母細胞の前端で *Osk* を発現させ、その後の生殖質の形成過程への *yl* 欠失の影響を検討した。野生型で *Osk* を卵母細胞の前端に発現させた場合、異所的に生殖質が形成される。しかし、*yl* 変異体の場合、*Osk* や他の生殖質因子は卵母細胞の前端付近

の細胞質に拡散していた。

私たちは以前に、L-*Osk* は局所的なエンドサイトーシスの活性化とアクチン骨格の再編成 (F-アクチン繊維束の形成) を誘導することで、生殖質の係留を制御することを見出している (Tanaka and Nakamura *Development* 2008)。そこで、これらの過程への YI の関与を検討した。その結果、*yl* 変異体では、F-アクチンの繊維束が形成されず、異常な凝集塊が観察された (図 3)。

これらのことから、YI は、微小管の配向性のみならず、*Osk* を介したアクチンの再編成にも必要であることが明らかとなった。

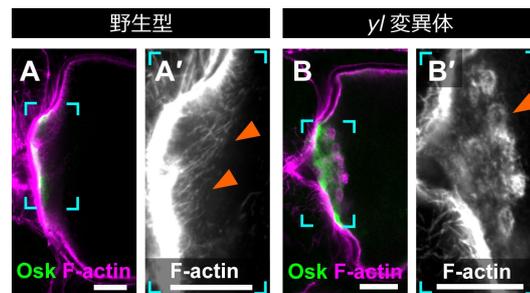


図 3. *yl* 変異体でのアクチン再編成の異常

野生型 (A) の卵母細胞の前端に *Osk* を異所的に発現させると、アクチンの再編成が誘導され、F-アクチンの繊維束が形成される (A'の矢じり)。しかし、*yl* 変異体 (B) では、*Osk* は前端付近に拡散して存在しており、F-アクチンの異常な凝集塊が観察された (B'の矢じり)。スケールバー：20 μm。

### (4) YI のエンドサイトーシス制御の重要性

YI 受容体は、リガンドである Yp と結合すると、エンドサイトーシスによりエンドソームへと移行する。エンドソームで YI と Yp は解離し、Yp はリソソーム関連オルガネラの卵黄顆粒に蓄積する。一方、YI はリサイクリングエンドソームにより細胞膜に戻されて再利用される。このような YI のエンドサイトーシス制御が生殖質の形成において重要であるかどうかを次に検討した。

ショウジョウバエでは、Yp をコードする遺伝子は、*yp1*、*yp2*、および *yp3* の 3 つが存在する。私たちは、CRISPR/Cas9 システムを用いてこれら 3 つの *yp* 遺伝子を全て欠失した三重変異体を作製した。そして、*yp* 三重変異体で正常に生殖質が形成されるかどうかを検討した。その結果、*yl* 変異体の場合と同様に、*yp* 三重変異体の卵母細胞では、微小管の配向性と *Osk* を介したアクチン再編成に異常が認められた (図 4)。一方、YI の卵母細胞辺縁部への局在化には影響が認められなかった。これらの結果は、YI のエンドサイトーシス制御が正常な生殖質形成に必要なことを示している。

私たちは以前に、局所的なエンドサイトーシスの活性化により生じる細胞内小胞が生殖質形成において不可欠の役割を果たすことを示した (Tanaka and Nakamura *Development* 2008; Tanaka et al *Development* 2011)。本研究により得られた成果は、Yp と

の結合によりYIがエンドサイトーシスされ、それにより生じる小胞こそが生殖質形成を制御する細胞内小胞の実体であることを強く示唆している。

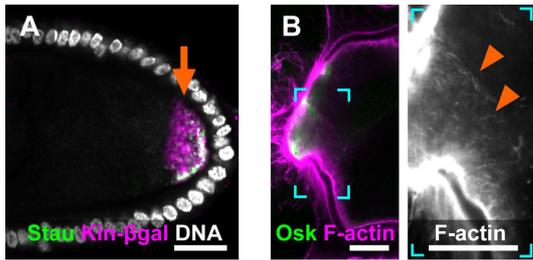


図 4. *yp* 三重変異体における微小管の配向性とアクチン再編成の異常

(A) *yp* 三重変異体の卵母細胞における Stau (緑) と Kin-βgal (マゼンタ) の局在。Stau と Kin-βgal は後端に局在化せず、後端付近の細胞質に拡散していた(矢印)。(B) *yp* 三重変異体の卵母細胞の前端に Osk を異所的に発現させた場合の Osk と F-アクチンの染色像。Osk は前端付近に拡散しており、正常なアクチンの繊維束は観察されなかった(矢じり)。スケールバー：20 μm。

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、私たちが本研究により見出した、『卵黄タンパク質の取り込みで生じる細胞内小胞による細胞極性・生殖質形成の制御』という概念は卵黄タンパク質を利用する幅広い動物種に適応できると予想している。

これら一連の成果を取りまとめ、論文として公表する準備を現在進めている。

#### <引用文献>

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. (2011) Oskar-induced endocytic activation and actin remodeling for anchorage of the *Drosophila* germ plasm. *BioArchitecture* 1, 122-126.

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

Vanzo, N.F., and Ephrussi, A. (2002) Oskar anchoring restricts pole plasm formation

to the posterior of the *Drosophila* oocyte. *Development* 129, 3705-3714.

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.

#### 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)

[学会発表](計2件)

田中翼、谷直紀、中川晴香、中村輝

The germ plasm assembly is controlled by Yolkless-coated endocytic vesicles. 第11回日本ショウジョウバエ研究会、金沢歌劇座(石川県金沢市)、2014年6月4日-6日

田中翼、谷直紀、中村輝

The assembly of *Drosophila* germ plasm is controlled by the vitellogenin receptor-mediated endocytosis. 第48回日本発生物学会大会、つくば国際会議場(茨城県つくば市)、2015年6月2日-5日

[その他]

ホームページ等

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)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