

第23回麻布環境科学研究会 講演 A7

ショウジョウバエ生殖細胞の分化を制御する新規遺伝子の同定と、その遺伝子の突然変異が生殖細胞分化に及ぼす影響の解析

三浦希久枝¹, 秋山 孝洋²

¹(株)ビックカメラ, ²麻布大学細胞生物学

1. はじめに

多細胞動物では、生殖細胞の分化がそれを取りまく体細胞との密接な細胞間相互作用によって制御されている。この機構を遺伝子レベルで解明することは、生殖細胞の分化全能性の維持・消失や、生殖幹細胞システムの形成・維持などに関わってくるという点で興味深い問題である。本研究ではこの問題に対して、生殖細胞と体細胞の細胞間相互作用に関わる現象に、病理学的異常が現れる突然変異体の単離・解析を行うという方法でアプローチを行い、これまで報告のない新規の遺伝子を同定した。

2. 方法・結果

以前の研究で単離しておいた、トランスポゾン P 因子がゲノムに1コピー挿入したことによって、雌の生殖細胞分化が異常になる突然変異体 # 261505 について研究を行った。

1) 突然変異体 # 261505 の変異遺伝子の塩基配列決定

P 因子に隣接したゲノム DNA の塩基配列が判明すれば、相同性検索により何の遺伝子が P 因子の挿入により破壊されているか分かるはずである。突然変異体 # 261505 からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *ECORI* で断片化したのち、個々の断片をリガーゼでセルフライゲーションして環状にした。これを大腸菌に形質転換し、P 因子を含むゲノム断片をプラスミドとして増幅した。増幅したプラスミドを DNA シークエンサーで塩基配列を調べ、P 因子に隣接した



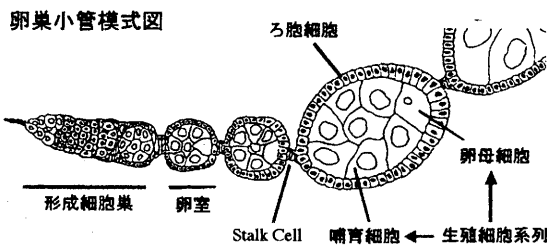
ゲノム DNA の塩基配列を確定した。

2) データベースを用いた相同性検索

上記で確定した塩基配列を用いて、インターネット上のゲノムデータベース内で相同性検索を行った。この塩基配列は、コンピューターにより存在が予測されている第2染色体の CG8929 遺伝子の一部であることが分かった。予測されている CG8929 遺伝子の構造から、突然変異体 # 261505 のゲノムでは P 因子が CG8929 遺伝子の第1エクソン中に挿入されており、これが突然変異の原因であることがわかった。CG8929 遺伝子はこれまで突然変異体が単離されておらず論文報告もないので、本研究がこの遺伝子が卵巣を構成する細胞の分化に関わることを示す最初の解析である。

3) 間接蛍光抗体法による突然変異体 # 261505 の病理学的解析

突然変異体 # 261505 の羽化後 24 時間以内の成虫を双眼実体顕微鏡下で解剖して取り出し、ホルマリン固定した。次にこの卵巣を、生殖細胞と特異的に結合する抗 vasa 抗体、および卵巣内の一部の体細胞と特異的に結合する抗 Fasciclin III 抗体とを用いて間

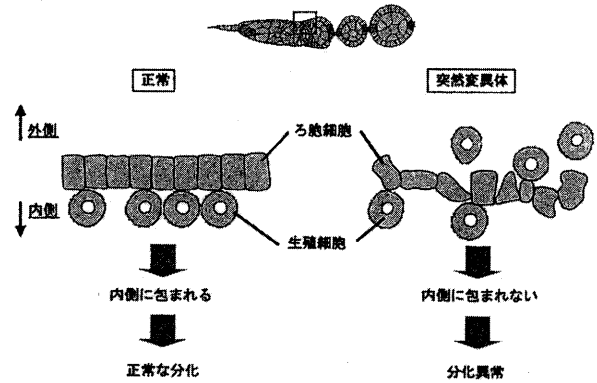


接蛍光抗体法で二重染色した。これをスライドガラスにマウントして、走査型レーザー共焦点顕微鏡で卵巣内の生殖細胞と一部体細胞の分布を確認したところ、1) ろ胞細胞の一種である Stalk Cell が形成されておらず、形成細胞巢から卵室が正常に分離できていない。2) ろ胞細胞の大きさや形状が不揃いである。3) 生殖細胞がろ胞細胞に包まれずに卵巣中で散乱している。4) 生殖細胞の大きさや形状が不揃いである。5) 形成細胞巢中で部分的にろ胞細胞が存在しない箇所がある。6) 形成細胞巢中に生殖細胞が存在しない場合がある。などの病理学的異常が認められた。このように突然変異体 # 261505 ではろ胞細胞の存在状態に異常が生じ、それが生殖細胞にも波及しているような所見が認められた。

3. 考察

正常個体の卵巣では、ろ胞細胞が生殖細胞を取り囲んでいる。生殖細胞に接している側と接していない側とでろ胞細胞の細胞内の性質が異なっており、1つの細胞内に極性があることが知られている。正常な卵室の各ろ胞細胞は六角柱状の形状を持って規則

異常のメカニズムの推測



正しく整然と並んでいるが、突然変異体 # 261505 ではろ胞細胞の大きさや形状が不揃いになっていることから、ろ胞細胞の極性に乱れが生じていると思われる。生殖細胞がろ胞細胞の極性の違いを認識して分布するため、生殖細胞の卵巣内における分布も異常になると考えられる。また、本来分布すべき場所に生殖細胞が分布しないため、生殖細胞の分化そのものにも異常が生じ、生殖細胞の大きさや形状が不規則になっていると思われる。

突然変異体 # 261505 で変異の原因になっている CG8929 遺伝子は、コンピュータによってゲノムの塩基配列から1つの遺伝子であろうと予測されていたものである。これまで突然変異体の報告がなく、機能も不明であった。本研究によって CG8929 が実際に遺伝子として機能していること、およびろ胞細胞の分化に関わっており、その突然変異が生殖細胞と細胞間相互作用に影響をおよぼすものであることを示唆する結果が得られた。