

キイロショウジョウバエのメス生殖幹細胞に対する腸内細菌の影響

林 良祐 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景・目的】

卵形成は、多くの生物にとって子孫を残すために重要な過程である。卵形成の活性は、季節や個体の栄養状態といった様々な外的・内的要因によって制御され、生物の生存と生殖のバランスを調節している。卵形成の制御機構の詳細を知ることが、生物の生存戦略を深く理解する上で重要である。その一方で、卵形成の制御に関わる分子経路や、経路同士の相互関係については未解明の部分も少なくない。

本研究ではキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) の卵巣に存在し、卵形成に必須である生殖幹細胞 (germline stem cell : GSC) に着目した。そして、GSC 制御に影響する新規因子の特定を試みた。ショウジョウバエのメス成虫において、GSC は卵巣を構成する管状の構造 (卵巣小管) の頭部側先端付近に存在し、非対称分裂によって将来卵に発達する娘細胞を産み出す。GSC の分裂頻度は、栄養状態によって変化する¹。また、交尾後に生じる GSC の増加は、腸由来のペプチドホルモンの作用を介する²。これらの報告から、私は GSC 制御に際して、腸のはたらきが重要であると考えた。他方、ショウジョウバエの腸内には宿主に様々な影響を与える腸内細菌が共生している。以上のことから、私は腸内細菌が宿主の GSC 制御に与える影響を明らかにしようと試みた。

【方法】

(1) 実験個体の飼育と腸内細菌の除去

ショウジョウバエの飼育に用いる餌に、抗生物質の amoxicillin (終濃度 100 µg/ml) および gentamicin (終濃度 50 µg/ml) の混合溶液を加えた。抗生物質添加あるいは未添加の餌を含むバイアルに、実験対象系統の未交尾のメス成虫 10~15 匹を移して、25°C で 4~7 日間飼育した。飼育期間の終了後にこれらのメス成虫を解剖して、卵巣を取り出し、GSC 数の計測や比較に用いた。

(2) 卵巣の免疫組織化学染色

各処理区で飼育したメス成虫の GSC 数を計測・比較するために、卵巣の免疫組織化学染色を行った。まず、1xPBS 中でショウジョウバエを解剖し、取り出した卵巣を 4%パラホルムアルデヒド in 1xPBS に加えて固定した。次に、1次抗体として抗 Hts 抗体、抗 Lamin-C 抗体、および抗 pMad 抗体を用いて、1次抗体反応を行った。さらに、Alexa 蛍光標識 2次抗体を用いて 2次抗体反応を行い、卵巣小管の頭部側先端の構造を可視化した。

(3) GSC 数の計測と比較

GSC 数の計測は、免疫組織化学染色を行ったサンプルを、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Axioplan2) 下で観察することで行った。抗 Hts 抗体、抗 Lamin-C 抗体、および抗 pMad 抗体は、それぞれ、生殖細胞特異的な細胞内構造体 (スペクトロソーム)、GSC に隣接する体細胞の一種 (キャップ細胞)、GSC の維持にはたらくシグナル経路中のタンパク質に結合する抗体である。これらの 1次抗体に対応した 2次抗体の蛍光を利用して、卵巣小管 1本ごとに

GSC を数え上げ、各処理区における GSC の平均個数を算出した。そして、ウィルコクソンの順位和検定によって処理区ごとの GSC 数の比較を行った。

【結果・考察】

まず、ショウジョウバエを用いた実験においてコントロール系統としてよく利用される *w¹¹¹⁸* について、実験を行った。一貫して抗生物質非処理の餌で飼育した群 (conventional : conv.)、幼虫期から解剖直前まで抗生物質処理した餌で飼育した群 (Antibiotics from Larva : ABL)、および幼虫期~蛹期は抗生物質非処理の餌で飼育し、羽化直後から 20 時間以内に抗生物質処理した餌に移して飼育した群 (Antibiotics from Adult : ABA) における GSC 数を比較した。その結果、conv. 群に対し、ABL、ABA 両群で GSC 数が有意に増加することが分かった。他方、ABL 群と ABA 群の間に GSC 数の有意な差は無かった。以上から、ショウジョウバエのメス成虫から腸内細菌を除去すると、何らかの経路を介して GSC が増加する、裏を返せば通常の餌による飼育条件下では、腸内細菌の存在が GSC を減少させる方向に影響していることが示された。また、成虫期以降のみの抗生物質処理でも GSC 数に影響することが分かったため、以降は conv. 群と ABA 群の比較を中心とした。

続いて、ABA 群における GSC 増加の原因となる宿主側因子の特定を目指し、交尾後の GSC 増加に必須である NPF (ペプチドホルモン) と OA (神経伝達物質) の受容体遺伝子変異系統について実験を行った。これらの分子が ABA 群における GSC 増加に関わっていれば、そのシグナルが機能しない系統では ABA 群における GSC 増加はキャンセルされる、という仮説のもと実験を行った結果、これらの系統においても ABA 群における GSC 増加は一貫して観察できた。したがって、交尾後の GSC 増加に関わるこれらの因子が、GSC に対する腸内細菌の影響の制御にも関わる可能性は低いと結論づけられる。

【展望】

現在、ショウジョウバエの神経ペプチド遺伝子変異系統を対象として、ABA 群における GSC 増加がキャンセルされる系統をとらえることを目的としたスクリーニングを進めている。一方で、ショウジョウバエの卵巣に共生する細胞内共生細菌である *Wolbachia pipientis* や、その感染除去に用いられる抗生物質のテトラサイクリンといった要因がショウジョウバエに与える影響を排せざにいる。そのため、今後はこれらの因子の影響を一つ一つ理解できる実験系の構築を目指したい。

【参考文献】

- [1] Lafever and Drummond-Barbosa (2005) *Science*, **309**, 1071-1073.
- [2] Ameku et al. (2018) *PLoS Biol.*, **16**, e2005004.