

ショウジョウバエの雄生殖細胞の培養

横倉 友博・川相 慶太・仁木 雄三

Tomohiro YOKOKURA, Keita KAWAI and Yuzo NIKI: *In vitro* Cultivation of Male Germline Cell of *Drosophila* *

Department of Sciences, Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan
E-mail: yuzoniki@mx.ibaraki.ac.jp (YN)

有性生殖をおこなう生物において、機能的な生殖細胞の形成は、種の保存のための根源的な機能である。多くの生物の雄では、生涯を通じ、精子が作られ続けている。これは、生殖幹細胞が自己再生能と分化能をもっていることによる。

ショウジョウバエの精巣は、左右一对の細長い袋で、らせん状にねじれている。精巣の前端にはハブと呼ばれる体細胞性のニッチ細胞が存在する。ショウジョウバエの精子形成は、ハブに接着している生殖幹細胞 (male germline stem cells; mGSCs) の分裂により行われる (Gonczy and DiNardo, 1996)。一方の娘細胞は生殖幹細胞を維持し、もう一方の娘細胞は、シスト細胞に包まれて gonialblast となる。gonialblast は 1 齢幼虫期から存在するが、3 齢幼虫になると先端部の gonialblast が 4 回の不完全分裂後、16 の細胞からなる精原細胞 (spermatogonia) を生じる (Tihen, 1946)。3 齢幼虫期の精巣の大部分で精原細胞が占められるようになる。蛹期になると、16 細胞は減数分裂を経て、64 細胞からなる精母細胞 (spermatocyte) へ分化する。精母細胞の成長、形態変化を経て、精細胞 (spermatid) を通して、精子が形成される。生殖細胞では、fusome と呼ばれる特異な細胞内構造が存在している。GSC や gonialblast では、fusome は球形をしているが、精原細胞の分裂に伴い分岐してくる。長く分枝した fusome は、細胞質連絡の ring canal を通り抜けて、シスト内の精母細胞に広がる。

本研究では、精子形成の過程を *in vitro* で再構築し、精子形成過程を詳細に調べることを目的としている。まず、幼虫期の精巣から mGSC や gonialblast などの若いステージの精原細胞を取り出し、様々な条件で培養した。これらの細胞のほとんどは培養数日後には死亡するが、一部の細胞はより進んだステージへ移行することがわかった。特に、基本培地である M3 (BF) 培地にハエの体液抽出液である fly extract (FE) を加えると、コントロールに比べ、より進んだステージの cyst cell の増加に大きな差がみられた。また、雄の成虫から取り出した male fly extract (ME) の効果を調べた。ME は、雄の細胞に特異的に効果があると考えられたが、細胞数の変化、分化率共に FE と大きな差は認められなかった。こ

の実験により、*in vitro* での培養で、若いステージの cyst cell も不完全分裂を行い、16-cyst cell まで移行することがわかった。さらに、mGSC は精巣から取り出した後でも、分化能を保持していることが示唆された。これらの培養細胞を免疫抗体染色した結果、ring canal や fusome の形態も正常であった (Kawamoto *et al.*, 2008)。

次に、3 齢後期の幼虫の精巣から 16-cyst cell を取り出し、最終的に精細胞に分化するかどうかを調べた。その結果、FE を培地に加えた場合、運動性をもつ精細胞にまで分化することがわかった。また、3 齢後期のみならず 3 齢前期の 16-cyst cell も運動性をもつ精細胞に分化することがわかった。これにより、16-cyst cell は 3 齢幼虫期にはすでに成熟した精子への自律的な分化能を保持していることが示唆された。また、興味深いことに FE を培地に加えていない条件下でも、16-cyst cell は次のステージの細胞へと分化することが確認された。さらに、ショウジョウバエの発生過程で重要な働きをしている 2 つのホルモン、幼弱ホルモン (Juvenile hormone; JH) と 20-ヒドロキシエクダイン (20-hydroxyecdysone; 20E) が 16-cyst cell 以降の分化にどのように影響しているか調べた。その結果、20E を培地に加えた場合、JH を加えたときに比べ、運動性を持つ精細胞への分化率が高いことが明らかとなった。これにより、雄生殖細胞の分化には 2 つのホルモンが何らかの影響を与えていることが示唆された。

今後は、ホルモンなどの作用や、主要な成長因子の役割を明らかにしたい。また、雄の精巣から樹立された生殖幹細胞の細胞株を用い、不等分裂やシスト形成の詳細を明らかにする予定である。

引用文献

- Gonczy, P. and S. DiNardo (1996) The germ line regulates somatic cyst cell proliferation and fate during *Drosophila* spermatogenesis. *Development*, **122**, 2437-2447.
- Kawamoto, T., K. Kawai, T. Kodama, T. Yokokura and Y. Niki (2008) Autonomous differentiation of *Drosophila* spermatogonia *in vitro*. *Development Growth and Differentiation*, **50**, 623-632.
- Tihen, J. A. (1946) An estimate of the number of cell generations preceding sperm formation in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist*, **80**, 389-393.

* Abstract of paper read at the 44th Annual Meeting of the Arthropodan Embryological Society of Japan, May 22-23, 2008 (Matsumoto, Nagano).