

シヨウジョウバエにおける生殖幹細胞と卵巣性体細胞の異種間相互作用の解析

植竹 裕・上田 早智江・仁木 雄三

Hiroshi UETAKE, Sachie UEDA and Yuzo NIKI: Analysis of Inter-specific Interaction of Germline Stem Cells and Ovarian Somatic Cells among *Drosophila* Species *

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

幹細胞は自己再生能と分化能を備えた未分化細胞であり、血球・皮膚や生殖細胞などは、古くよりそれぞれの幹細胞の存在が示唆されてきた。幹細胞の自己再生能は、生涯を通じ、これらの細胞が枯渇することなく、常に供給され続けるのを保証している。幹細胞特有の性質を明らかにすることは、現在の発生生物学の主要なテーマの一つである。キイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の生殖幹細胞 (germline stem cells; GSCs) は幹細胞研究の格好のモデルとして、種々の遺伝学的・分子生物学的手法により盛んに研究されている。

D. melanogaster には雌雄ともに GSCs が存在している。雌では卵巣小管前端部で terminal filament、cap cell、escort stem cell などが細胞外微小環境 'ニッチ' を形成し、2~3 個の GSCs を取り巻く。そして、ニッチ細胞と周辺の細胞群が GSC の分裂・維持に重要な成長因子 (Decapentaplegic (Dpp)、Glass bottom boat (Gbb)) を分泌している。特に cap cell は、DE-cadherin を介した細胞間接着によって GSC と直接的に結合し、Dpp を分泌して GSC の分裂を調節している (Xie and Spradling, 1998)。GSC は分裂の際、cap cell から離れた娘細胞はシストプラストへ分化し、将来、卵になる。一方の娘細胞は、cap cell との細胞間接着を継続したまま、GSC として維持される (Song and Xie, 2002)。

われわれは、*D. melanogaster* で得られたこれらの GSC とニッチの概念が、広く昆虫や節足動物でもみられるのかどうかを調べていきたいと考えている。しかし、シヨウジョウバエ類が種分化してきた過程で、ニッチ細胞による GSC の分裂や GSC の維持に関するメカニズムが系統的に保存されているかどうかを *in vivo* で調べるのは困難である。そこで本研究では、*D. melanogaster* の近縁種であるオナジシヨウジョウバエ *D. simulans*、アナナスシヨウジョウバエ *D. ananassae*、系統の離れたクロシヨウジョウバエ *D. virilis*、カスリシヨウジョウバエ *D. hydei* を用いて、*in vitro* で *D. melanogaster* の GSC と各種の卵巣性体細胞を共培養し、異種間相互作用を調べた。

ニッチを形成する細胞群は 3 齢後期幼虫で前駆細胞として分化を開始する。各種の 3 齢後期幼虫の卵巣を培養し、ニッチ細胞を含む卵巣性体細胞株 (Larval Gonadal

Mesoderm; LGM) を樹立した。M3 (BF) 培地 (Sigma, St Luis, MO) に 10 % fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加し、さらに *D. melanogaster* 成虫の体液抽出液 (Fly extract) を全体量の 10 % 添加した条件で培養した。培養後、3~4 ヶ月で安定的に増殖する細胞株が得られた。*D. simulans*、*D. virilis*、*D. hydei* の LGM はシートを形成する細胞と球状の細胞が混在していた。*D. ananassae* ではシートを形成する細胞と球状の細胞が混在する LGM と、球状の細胞のみの LGM の 2 種類が樹立した。各種の LGM を生殖細胞特異的な分子マーカーである抗 Vasa 抗体で染色した結果、*D. simulans*、*D. virilis*、*D. hydei* には始原生殖細胞 (PGC) の存在が確認されたが、*D. ananassae* には認められなかった。

次に、上記で樹立した各種における LGM と *D. melanogaster* の GSC を共培養した。GSC は *bag of marbles (bam)* 変異体を用いた。*bam* 変異体では GSCs がシストプラストに分化しないため、形成細胞巢内に GSC が蓄積する。共培養の結果、近縁種である *D. simulans* の LGM は GSC を 10 倍以上増殖させた。*D. melanogaster* とは系統的には離れた種である *D. virilis*、*D. hydei* の LGM も同様に GSC を増殖させたが、*D. simulans* に比べ増殖率は小さかった。また、*D. ananassae* の LGM は他種と比較し、GSC をほとんど増殖させなかった (Fig. 1)。この増殖率の差異は、GSC の分裂や GSC の維持に関するメカニズムに種特異性が存在していることを示唆している。また、GSC はシートを形成する LGM の上で広がって増殖していることが確認されたが、一方で GSC の単独培養では GSC の増殖は認められなかった。このことは、GSC と各種の LGM との間に直接的な相互作用があることを示唆している。そこで GSC と LGM との間の細胞間接着を示す抗 DE-cadherin の抗体染色を行ったところ、*D. simulans*、*D. virilis*、*D. hydei* の LGM と GSC との間には、より多くの DE-cadherin の蓄積が認められた。これは異種間でも細胞間接着することでより直接的な相互作用が生じ、GSC の分裂・GSC の維持が生じていることを示唆している。また、GSC を増殖させなかった *D. ananassae* の LGM では、DE-cadherin の蓄積がみられな

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

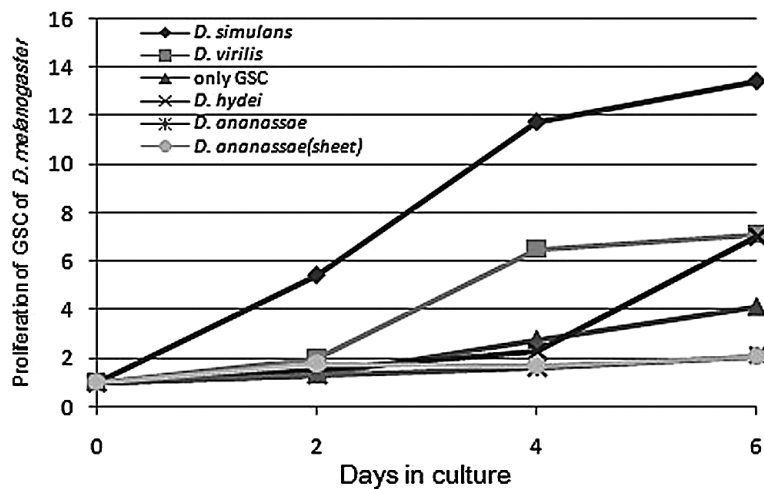


Fig. 1 Proliferation curve of GSCs of *Drosophila melanogaster* when cocultured with LGM cells of different species origin. Growth rates of GSCs much depended on LGM cells co-cultured. Basically, the growth rates reflect the evolutionary distances between species.

かった。前述したように LGM 樹立時にも *D. ananassae* の LGM には PGC が含まれていなかった。つまり、*D. ananassae* の LGM には GSC、PGC の維持・増殖に重要なニッチを形成する細胞が存在しないことが示唆された。

今後、LGM と GSC との相互作用をより詳細に調べていく予定である。

引用文献

- Xie, T. and A.C. Spradling (1998) *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell*, **94**, 251-260.
- Song, X. and T. Xie (2002) DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 14813-14818.