

ショウジョウバエ精子幹細胞およびニッチ細胞の培養

大内 寿洋・遠藤 秋一・仁木 雄三

Toshihiro OOUCHI, Syuichi ENDO and Yuzo NIKI: Establishment of Stable Cell Lines of Male Germline Stem Cells and Niche Cells in *Drosophila**

Department of Science, 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の両方を持つ未分化細胞である。血球や皮膚だけでなく、生殖細胞においても、それぞれの幹細胞の存在が示唆されている。配偶子は遺伝情報を次世代に伝える唯一の細胞であり、恒常的な精子の生産は、配偶子幹細胞の自己再生能と分化能により保障されている。幹細胞の維持と分裂は、周辺の細胞が特別な細胞外微小環境（ニッチ）を形成し、シグナル伝達や細胞間接着により調節されていると考えられている。キイロショウジョウバエは、雄配偶子幹細胞（germline stem cells; GSCs）のニッチ形成や成長因子のシグナル伝達系を調べる格好のモデルとして、発生生物学や分子生物学的手法により精力的に研究されている。配偶子幹細胞の性質やそのニッチについての研究は、発生生物学の重要なテーマであるだけでなく、将来的に不妊治療や種の保存等への応用が期待されている。キイロショウジョウバエには雌雄共に GSC が存在し、雄では精巣前端部で hub cell, cyst stem cell がニッチを形成している。hub cell から JAK-STAT シグナル経路のリガンドである Unpaired (Upd) が分泌され、GSC, cyst stem cell が維持されている (Yamashita *et al.*, 2005; Fuller and Spradling, 2007)。Upd はショウジョウバエ JAK (Hopscotch; Hop) と下流因子の STAT (Stat92E) を活性化し、GSC の未分化性

維持に関与している。Hop あるいは Stat92E がいない場合、配偶子幹細胞は自己再生をせずに精子へと分化する (Tulina and Matunis, 2001)。また、hub cell と配偶子幹細胞が接している細胞接着面では、DE-cadherin 等の細胞接着因子が発現し、未分化性の維持に重要な役割を果たしていると考えられている (Yamashita *et al.*, 2005)。

本研究では、GSC がニッチ内で維持されるメカニズムを *in vitro* で解析する実験系を構築するため、雄配偶子幹細胞とニッチ細胞を含む安定的な細胞株の樹立を試みた。hub cell や生殖細胞を識別するため下記の2つの系統を用いて3齢幼虫精巣を培養した。

(1) hub cell, cyst stem cell を X-gal 染色で標識できるエンハンサートラップ系統 AN256

(2) hub cell と GSC で蛍光標識を持つ CB03410 / nanos-Gal4 UASp-DsRed S197Y(Sr3)

培養条件を検討した結果、50%の成虫抽出液 (Fly extract; FE) を含む培地で、生殖細胞と体細胞が増殖し、最終的に配偶子幹細胞とニッチ細胞を含む安定的な細胞株の樹立に成功した。今回樹立した細胞株では、生殖細胞は、継代を繰り返しても、未分化状態で維持されている GSC と不完全分裂を行う精原細胞が共存していた (Fig. 1)。さらに、体細胞には、*in vivo*

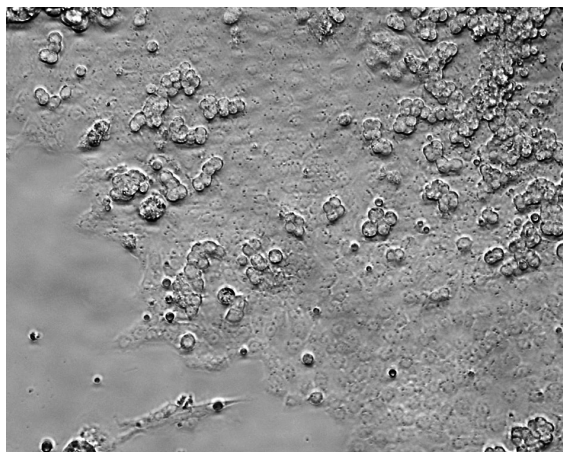


Fig. 1 Round single germ cells and interconnected cystocytes in a newly established AN256 cell lines.

* Abstract of paper read at the 47th Annual Meeting of the Arthropodan Embryological Society of Japan, June 10–11, 2011 (Biwako, Shiga).

でニッチを形成している hub cell とそれ以外の細胞が含まれていることが、X-gal 染色や抗体染色から明らかになった。また体細胞と生殖細胞は、細胞間接着に必要なカドヘリンが蓄積しており、接着結合していることが確認できた。これらの事から、樹立した細胞株は *in vitro* で GSC/niche を再現していると言えることができる。

シグナル伝達や細胞接着を含むこれらの細胞間相互作用を *in vitro* で調べるためには可視化マーカーを用いたライブイメージングが有効である。初代培養によ

り、細胞特異的なマーカーを持つ系統から配偶子幹細胞やニッチ細胞を含む細胞株を得た事で、細胞の振る舞いを詳細に観察することが出来ると考えている。

引用文献

- Fuller, M. T. and A. C. Spradling (2007). Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. *Science*, **316**, 402–404.
- Tulina, N. and E. Matunis (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science*, **294**, 2546–2549.
- Yamashita, Y. M., M. T. Fuller and D. L. Jones (2005). Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J. Cell Sci.*, **118**, 665–672.