Maternal Nanos represses hid/skl-dependent apoptosis to maintain the germ line in Drosophila embryos

ショウジョウバエ胚の生殖系列を維持するための母性ナノスによるhid/skl依存性アポトーシスの抑制機構

Nanos (Nos) は、進化的に保存された、始原生殖細胞の生存に不可欠なタンパク質である。ショウジョウバエでは、母方のNosが極細胞に分配され、アポトーシスを抑制することで、生殖細胞の正常な発生を可能にしている。しかし、この重要なイベントがNosによってどのように制御されているかは、これまで不明であった。我々は、Nosが極細胞のアポトーシスを抑制するのは、カスパーゼの活性化に必要なRHG遺伝子ファミリーの一員であるhead involution defective (hid) の翻訳を抑制するためであることを報告する。さらに、hidはもう一つのRHG遺伝子であるsklと協調してアポトーシスを誘導することを明らかにした。sklの発現は、ste20様セリン・スレオニンキナーゼであるmaternaltao-1によって極細胞で誘導される。hidの活性を増強するためには、Tao-1依存的なsklの発現が必要である。しかし、正常な極細胞ではsklの発現はほとんど抑制されている。これらの知見は、生殖細胞がRHG遺伝子の発現制御によって維持されていることを示す最初の証拠である。

多くの後生動物では、生殖細胞は発生初期に形成され、成体生殖腺で配偶子が分化するまでの間、維持される。ショウジョウバエでは、胚盤胞胚の後極で発生した生殖細胞前駆細胞（極細胞）が、中腸上皮を経て血球に移動し、体性生殖細胞前駆細胞と凝縮して胚性生殖器を形成し、その後胚葉の発生過程で配偶子へと分化する。遺伝学的解析により、極細胞を消失させる変異がいくつか同定されているが（3-7）、極細胞が発生過程でどのように維持されるかは不明である。

極細胞は、生殖細胞の発生に必要かつ十分な母性因子を含む特殊なオープラズム、すなわち生殖原基を受け継ぐ。生殖質にはいくつかの構成要素が同定されている。これらの構成要素の1つが母性nos RNAであり、卵形成中に生殖質に濃縮され、受精後にその場で翻訳されてNosタンパク質を産生する。Nosは胚葉前期の胚の後半分に一過性に存在し、腹部のパターニングに必要であるが、生殖質中のNosは胚葉期にポール細胞に遺伝し、胚発生を通じてこれらの細胞で検出されるようになる。母方のNosが存在しない場合、極細胞は胚性器への移動中にアポトーシスを起こす。Nosは極細胞の有糸分裂、体細胞遺伝子発現、体細胞運命の抑制にも重要な役割を果たしているが、Nosは生殖細胞の生存に必要な進化的に保存されたタンパク質であることから、Nosの主役は生殖細胞におけるアポトーシスの抑制だと思われる。

Nosは、Nos response element (NRE)と呼ばれる離散的な配列を持つ特定のRNAの翻訳を抑制することが知られている。腹部パターン形成において、Nosは母方のhunchback（hb）RNAの翻訳を抑制している。この抑制にはNREの配列が必要である。極細胞では、Nosは母方のサイクリンB RNAの翻訳を抑制している。この抑制により、生殖腺への移動中の極細胞は有糸分裂を静止している。

アポトーシスは、カスパーゼというシステインプロテアーゼファミリーによって媒介され、多様な基質を切断して細胞の構造と完全性を破壊する。アポトーシスの重要な制御因子は、カスパーゼの作用を直接阻害するアポトーシス抑制タンパク質（IAP）に拮抗することで機能する。ショウジョウバエでは、4つのプロアポトーシス遺伝子、reaper (rpr), head involution defective (hid), grim, and sickle (skl) が、IAPに結合して不活性化する関連タンパク質ファミリーのメンバーをコードしている (42-49)。これらはRHG遺伝子とも呼ばれる。これらのRHG遺伝子のうち、rpr、hid、grimの3つは第3染色体上のゲノム領域、H99に包含されている。我々は、H99領域の欠失、Df(3L)H99がNosを欠く極細胞のアポトーシスを抑制することを報告しており、これはH99領域のRHG遺伝子が関与するアポトーシス経路においてNosが役割を果たすことと一致している。

本研究では、母性Nosがhid RNAの翻訳を抑制することにより、極細胞のアポトーシスを抑制することを明らかにした。Nos活性がない場合、hid mRNAの翻訳により、アポトーシスを誘導するタンパク質産物が生成される。さらに、nos極細胞のアポトーシスを誘導するためには、母方から提供されたプロテインキナーゼであるTao-1が必要であることを証明する。母方のTao-1 RNAは生殖質に濃縮され、ポール細胞に受け継がれる。Tao-1依存的なsklの発現は、hidの活性を増強し、nos極細胞のアポトーシスを誘導する。しかし、正常な極細胞ではsklの発現はほとんど抑制されている。このことは、Nosがsklの発現も制限していることを示唆している。極細胞は正常な発生過程においてアポトーシスを起こす能力があり、Nosの活性を下げることでプログラム細胞死を促進する経路を効果的に引き起こしていることが示唆された。

**結果**

**Fig1**

hidは極細胞で発現している。(A) 雌のnosBNホモ接合体（nos/nos）またはヘテロ接合体（nos/+）に由来する胚を、生殖細胞マーカーであるVasa（Vas）タンパク質とhid mRNAの二重染色をした。hid RNAを発現している極細胞の割合を発生段階に対してプロットした。各ステージで調べた胚と極細胞の数は、nos/nosとnos/+でそれぞれ3-14と2-10であった。(B) 13期胚の極細胞をVas（緑）およびhid mRNA（マゼンタ）で染色した。矢印はhid mRNAのシグナルを持つ極細胞を示す。(スケールバー：10 nm）。

Table1

\*胚（12-14 期）は抗 Vas 抗体と TUNEL 標識で二重染色した。有意性はフィッシャーの正確確率検定により算出した。

‡胚は nosBN/nosBN の雌に由来するものである。

§胚は Df(3L)H99 nosBN/nosBN の雌と hid05014/+ の雄との交配に由来する。頭葉などの体細胞領域に TUNEL シグナルがない胚は Df(3L)H99 nosBN/hid と判定した。

hidは、極細胞における母性Nosの制御標的である。nosホモ接合体雌由来の胚（nos胚）では、極細胞（nos極細胞）は生殖腺への移動の過程でアポトーシスを起こす(6)。nos極細胞のアポトーシスは、3つのプロアポトーシス遺伝子hid、reaper、grimを含むゲノム領域H99の欠失によって完全に抑制される（6, 42-44）。これらの遺伝子のうち、hidをコードするmRNAだけが、その3-UTR領域にNRE様配列を含んでいる［参考文献（SI）Fig.2］。また、hidのmRNAは、正常胚およびnos胚において、9/10期から少なくとも胚発生の終わりまで極細胞で検出される（Fig.1）。これらのことから、Nosはhid mRNAの翻訳を抑制することにより、極細胞のアポトーシスを抑制していると推測された。

この仮説を検証するために、まず、接合体hidの活性を除去することで、nos極細胞のアポトーシスが抑制されるかどうかを検討した。母方のNosと接合体のhidの両方を欠損した胚（nos-hid胚）では、アポトーシス極細胞の割合がNosだけを欠損した胚に比べて有意に減少した（表1）。したがって、nos極細胞のアポトーシスはhid遺伝子の活性を必要とする。

Table2

\*胚（14-16 期）を抗 Vas 抗体および抗 Cleaved Caspase 3 (Drice)抗体で二重染色した。

胚は nosGal4:VP16/nosGal4:VP16 (nos+) の雌と UAS-hid (独立形質転換体 04 および 07) または UAS-hid (△NRE) (独立形質転換体 04 および 30) のホモ接合雄を交配したものであった。

‡アポトーシス極細胞の割合は、2つの形質転換系統間で有意に異なっていた。この差は、hid（△NRE）の発現レベルの差に起因すると考えられ、導入遺伝子のゲノム挿入部位によって変化している可能性がある。

§hid遺伝子を導入したnos+胚に対して、フィッシャーの正確確率検定を用いて有意性を算出した。

胚は、nosGal4:VP16 nosing/nosBN (nos-) 雌と yw 雄 (-) または UAS-hid ホモ接合雄 (line 04 および 07) との交配に由来する。

有意性はフィッシャーの正確確率検定を用いて、トランスジーンのないnos＋胚との比較で算出した。

次に、hid mRNA の NRE 様配列の除去が正常な極細胞のアポトーシスを促進するかどうかを検討した。NRE様配列を含む、あるいは欠失したhid mRNAを、nosプロモーターの制御下で極細胞で発現させた。NRE様配列の欠失はhid mRNAの転写に影響を与えなかった（データは示さず）。無傷の hid mRNA を発現する極細胞では、アポトーシスはほとんど観察されなかった（表 2）。一方、NRE様配列を欠いたhid mRNA（hid-NRE）はアポトーシスを誘導した（表2）。さらに、母性Nosが存在しない場合、無傷のhidを発現させると、極細胞でのアポトーシスが有意に促進された（表2）。従って、NosはNRE様配列依存的にhidの活性を抑制していると結論した。

Table3

\*胚（ステージ11/12）は抗Vas抗体と抗GFP抗体で二重染色した。

胚は nosGal4:VP16/nosGal4:VP16 雌 (nos+) と UAS-egfp-hid3'UTR ホモ接合体 (独立形質転換体 07 および 12) または UAS-egfp-hid3'UTR(ΔNRE) (独立形質転換体 04 および 11) 雄を交配したものであった。

‡胚は、nosGal4:VP16 nosBN/nosBN雌（nos-）とUAS-egfp-hid3ΔUTRホモ接合雄（ライン07および12）との交配に由来するものである。

§有意性はフィッシャーの正確確率検定を用いて、egfp-hid3ΔUTRを導入したnos+胚との比較で算出した。

hid mRNAの翻訳がNRE様配列依存的に極細胞で抑制されているかどうかを調べるために、hid mRNAのORFをegfpに置換したトランスジェニックフライ（egfp-hid 3-UTR）を作成し、極細胞でnosプロモーター制御下に発現させて調べた。得られたRNAの翻訳はGFPの産生によってモニターすることができる。egfp-hid3- UTR RNAを発現させた正常な極細胞では、胚発生中にGFPはほとんど検出されなかった（SI Fig.3 A, BおよびTable 3）。一方、egfp-hid3- UTR RNAからNRE様配列を欠失させた場合［egfp-hid3- UTR(NRE) ］、対応するGFPの産生が強固になった（SI図3C、表3）。また、nos極細胞では、egfp-hid3- UTR RNAからのGFPの発現が抑制されていた（SI図3D、表3）。これらの結果から、NosはNRE様配列依存的にhidの翻訳を抑制していると結論づけた。

我々は、hidが極細胞における母性Nosのアポトーシスを抑制する調節標的であると結論づけた。

Table4

\*2つの独立した形質転換体（SI表6参照）で得られたデータを合算した。

胚（ステージ 13-16） を抗 Vas 抗体および抗 Claspase 3（Drice）抗体で二重染色した。

胚は、nosGal4:VP16 nosBN/nosBN (nos-) または nosGal4:VP16 nosBN/+ (nos+) 雌で UAS-tao-1 (D168A) または UAS-tao-1 (D168D) を1つも持っておらず、yw 雄と交配して得られたものであった。

§有意性は，フィッシャーの正確確率検定を用いて，トランスジーンのないnos-胚との比較で算出した．nosGal4:VP16 nosBN/nosBN (nos-) または nosGal4:VP16 nosBN/+ (nos+) 雌と UAS-skl ホモ接合体の雄を交配した胚である。

有意性はフィッシャーの正確確率検定を用いて、トランスジーンのないnos+胚との比較で算出した。\*\*胚は、UAS-tao-1(D168D)を1コピー持つnosGal4:VP16 nosBN/Df(3L)H99 nosBN雌に由来し、hid05014/+雄と交配されたものであった。

頭葉などの体細胞領域にactive-Driceシグナルを持たない胚をhidホモ接合体（nos- hid-）と判定した。

tao-1(D168D) を導入した nos- 胚との有意差をフィッシャーの正確確率検定により算出した。

§§nosGal4:VP16 nosBN/Df(3L)H99 nosBN 雌と UAS-skl; hid05014/+ 雄の交配から得られた胚である。

¶¶有意性は、フィッシャーの正確確率検定を用いて、skl遺伝子を導入したnos-胚との比較で算出した。

nos極細胞におけるアポトーシスには母方のtao-1が必要である。アポトーシスに至る経路に関与する遺伝子は、Nos活性の有無にかかわらず極細胞で活性化されているようである。しかし、Hidは極細胞においてNosによって抑制され、アポトーシスを防いでいる。極細胞はどのようにしてアポトーシス遺伝子を発現しているのだろうか？tao-1は、胚発生時に極細胞で発現し（下記参照）、アポトーシスを含む基本的な細胞プロセスを制御するste20関連のセリン/スレオニンキナーゼの進化的に保存されたファミリーのメンバーであることから、この疑問に対して、候補であるtao-1を調べた（51、52） (FlyBase: http://flybase.net). 我々は、母性mRNAの分布を解析する過程で、生殖質および極細胞に濃縮された母性RNAをコードする遺伝子としてtao-1を同定した（Y.N., unpublished observations）。Tao-1は、少なくとも2つのmRNAをコードしており、それぞれ4.8 kbと2.5 kbの長さである（GenBank accession nos. AB277547 and AB277548）（SI Fig. 4A)。どちらのmRNAも母方で転写され、生殖質中に濃縮されていた（SI図4BおよびG）。2.5-kb RNAは極細胞形成直後に分解されたが、より長いRNAは極細胞に分配され、極細胞が中腸上皮を通り、その上の中胚葉に移動する（12/13期）まで検出可能なままだった（SI図4B-I）。これらの2つのmRNAに対応するcDNAの配列を決定したところ、4.8kbの転写産物はste20と相同なキナーゼドメインを含むタンパク質をコードしており、一方、2.5kbのmRNAはこのキナーゼドメインを欠いた切断型タンパク質を生成すると予測された（SI図4A）。したがって、より長い転写産物は、機能的なキナーゼであるTao-1をコードしている。

次に、母方の tao-1 活性が nos 極細胞のアポトーシスに必要であるかどうかを検討した。tao-1遺伝子座を欠失させたヌル突然変異体が同定されているが、これは雌性不妊を引き起こすため、tao-1突然変異体の母性表現型を調べることができなかった（データは示していない）。この問題を克服するために、Tao-1のドミナントネガティブ型（D168A）をコードするRNAを、卵生時にnosプロモーターの制御下で発現させるトランスジェニックフライを作製した。得られたRNAは生殖質に蓄積し、そのタンパク質産物は極細胞に濃縮された(SI Fig. 4 J and K)。Tao-1（D168A）タンパク質では、アスパラギン酸168がアラニンに置換されている。このアミノ酸置換により、キナーゼドメインは機能しなくなり(53)、結果としてキナーゼ欠損タンパク質はドミナントネガティブとして働くことが予測される(54)。幸い、tao-1(D168A)を持つ雌は卵を産むことができた。ドミナントネガティブ型の発現により、ヌル突然変異体の不妊を表現するほど深刻ではないtao-1 hypomorphが生じたと推測される。tao-1(D168A) を導入した nos-homozygous 雌由来の胚では、アポトーシス極細胞の割合が nos 胚と比較して有意に減少した (Table 4)。さらに、tao-1に特異的な二本鎖RNAをnos胚に注入すると、アポトーシス極細胞の割合がわずかではあるが統計的に有意に減少した（SI Table 7）。このように、tao-1活性を低下させると、nos極細胞のアポトーシスを防ぐことができる。逆に、野生型tao-1(D168D)を過剰発現させると、nos極細胞のアポトーシスが促進された(Table 4)。このことから、母性型tao-1がnos極細胞のアポトーシスに関与していると結論づけた。

sickle Acts Downstream of Tao-1 in Pole Cells. 極細胞のTao-1下流で働くsickle。

極細胞のアポトーシスに至る経路で tao-1 の下流に作用する遺伝子を同定するために、Tao-1(D168A) と Tao-1(D168D) を発現する極細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析により比較した (Materials and Methods)。FlyBaseのGene Ontology (GO) category ''細胞死''に含まれる2,143遺伝子のうち、sklはTao-1(D168A) トランスジェニックフライで発現低下、Tao-1(D168D) トランスジェニックフライで発現上昇をそれぞれ示した唯一の遺伝子だった（詳細は、材料と方法を参照のこと）。sklの発現の変化は、定量的RT-PCRによって確認された。ドミナントネガティブTao-1(D168A)または野生型Tao-1(D168D)を発現する極細胞では、sklの発現はそれぞれ対照の39%または173%レベルであった（P < 0.001, Studentのt test, 詳細は材料と方法を参照のこと）。hidの発現もTao-1活性によって変化すると予想されたが、マイクロアレイ解析の結果、hid mRNAレベルはTao-1のキナーゼ活性に影響されないことが明らかになった。Tao-1(D168A)あるいはTao-1(D168D)極細胞では、hid mRNAレベルはそれぞれコントロールの80%および95%レベルであった（P > 0.2, Studentのt test）。

Table5

\*2つの独立した形質転換系統で得られたデータ（SI表8参照）を合算した。胚（9-11 期）を抗 Vas と skl mRNA で二重染色した。

胚は nosGal4:VP16 nosBN/nosBN (nos-) または nosGal4:VP16 nosBN/+ (nos+) 雌で UAS-tao-1 (D168A) または UAS-tao-1 (D168D) を含まないか1コピー持ち、yw 雄と交配したものである。

§有意性はフィッシャーの正確確率検定を用いて、トランスジーンのないnos-胚との比較で算出した。有意性はフィッシャーの正確確率検定を用いて、トランスジーンのないnos+胚との比較で算出した。

次に、in situ hybridizationにより、極細胞におけるsklの発現を調べた。マイクロアレイおよびRT-PCR解析により、正常（nos＋）極細胞ではTao-1依存的なsklの発現が確認されたが（上図）、in situ hybridizationではほとんど検出できなかった（表5、SI図5）。Sklシグナルはnos極細胞の15.5%で検出され、nos＋極細胞で観察された0.4%から有意に増加した（表5）。さらに、Tao-1(D168A)の発現（表5）またはtao-1 dsRNAの注入（SI表9）により、nos極細胞のskl発現陽性割合は減少した。逆に、Tao-1(D168D)を過剰発現させると、nos極細胞でsklの発現が増強された（表5）。このように、極細胞では母性Tao-1によってsklの発現が誘導されるが、nos+極細胞ではskl発現の完全誘導は抑制される。極細胞がNos活性を失うと、Tao-1依存的なsklの発現は抑制されなくなる

skl と hid は共に RHG 遺伝子であり、体組織において IAP というタンパク質の機能に拮抗することから (47-49)、skl は hid と共に nos 極細胞においてアポトーシスを誘導すると予想された。この仮説を検証するために、nos極細胞でsklをnosプロモーターの制御下で発現させた。sklの過剰発現は、nos極細胞のアポトーシスを促進した（表4）。この増加は、Tao-1(D168D)を発現させたnos極細胞で観察されたアポトーシスの割合と同程度であった（表4）。しかし、sklもtao-1（D168D）の発現も、hid活性を欠くnos極細胞で観察された程度のアポトーシスを誘導しなかった（表4）。このように、Tao-1依存的なsklの発現は、Hidのアポトーシス誘導活性を増強することがわかった。

Discussion

Nosと始原生殖細胞（PGC）のアポトーシスとの関連は、マウス、ゼブラフィッシュ、線虫、ミバエなど様々な種でNos活性を欠くPGCがアポトーシスによって排除されることから、特別な意味を持つ（6, 34-36）。ショウジョウバエでは、母性Nosを欠く極細胞はアポトーシス経路に入り、胚性腺に正しく移動できない(6, 29, 30)。この移動障害は、アポトーシスを阻害することで回復する(6)。Nosは極細胞のアポトーシスを抑制し、生殖腺への適切な移動を可能にする。このように、NosがどのようにしてPGCのアポトーシスを抑制しているのかを明らかにすることは、進化的に保存された生殖細胞維持のメカニズムを理解する上で非常に重要である。ここでは、Nosがhid RNAの翻訳を抑制することによって、極細胞のアポトーシスを抑制していることを示すいくつかの証拠を紹介する。

HidはRHG遺伝子ファミリーのメンバーである。これらのタンパク質はそのN末端に共通のモチーフを持っている(55)。このモチーフはRHGモチーフと呼ばれ、RHGタンパク質がアポトーシスを誘導する能力にとって必須である(49)。RHGモチーフはDiap1 (Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1) のBIR (baculovirus IAP repeat) ドメインと相互作用し、BIRによるカスパーゼ阻害に対抗している (56)。Hidと他の2つのRHG遺伝子、reaperとgrimは、ゲノム遺伝子座H99から発現している。この領域を欠失させると、nos極細胞のアポトーシスは完全に阻害される(6)。我々のin situハイブリダイゼーション解析により、hidは極細胞で接合性に発現していることが明らかになったが、他の2つのRHG遺伝子は全く転写されていないとしても微量である（データは示されていない）。このことは、H99に存在するRHG遺伝子のうち、この遺伝子がnos極細胞のアポトーシスを制御する上で主要な役割を担っていることと矛盾しない。さらに、我々は母性Nosが極細胞においてhid mRNAの翻訳を抑制していることを明らかにした。hidの3’UTRのNRE様配列を欠失させると、Nos依存的な翻訳抑制が解除され、正常な極細胞のアポトーシスが効果的に誘導されることを明らかにした。このことから、Nosはhidの翻訳を抑制し、極細胞のアポトーシスを抑制していると結論づけた。

Nosを欠く極細胞では、hidは4番目のRHG遺伝子であるsklと共働して、アポトーシスを誘導する。Sklの発現は、母体のtao-1によって極細胞で活性化される。sklまたはtao-1を過剰発現させると、nos極細胞のアポトーシスが促進される。逆に、Tao-1活性を低下させると、sklの発現がダウンレギュレートされ、nos極細胞のアポトーシスが防止される。sklの変異体は現在入手できないので、sklの発現を低下させることだけでnos極細胞のアポトーシス欠陥を救済できるかどうかについては、さらなる実験が必要である。hid活性がない場合、sklの過剰発現は極細胞のアポトーシスを促進することができない。同様の知見は、胚や発達中の眼球でも報告されている(47-49)。正常胚では、skl RNAはアポトーシスを起こす運命にあるすべての体細胞で発現しているわけではなく、rpr、hid、grimがない場合、生理的レベルのskl発現だけではアポトーシスを誘導するには十分でない(47)。さらに、発達中の眼球では、sklの発現はアポトーシスを効果的に誘導しないが、grimとrprの効果を増強する（48, 49）。このように、sklは他のRHG遺伝子の活性を増強し、体細胞だけでなく極細胞においても最大のアポトーシス効果をもたらすのである。

我々は、母性Tao-1によって極細胞でsklの発現が誘導されるが、正常な極細胞ではその発現が大きく抑制されることを示した。しかし、正常な極細胞では、sklの発現はほとんど抑制されている。これらの結果は、Nosが極細胞においてTao-1依存的なsklの発現を制限していることを示唆している。しかし、Nosが直接Tao-1の産生を抑制しているわけではないと思われる。なぜなら、3' UTRがそのままのtao-1(D168D)とtao-1(D168A) mRNAはNos存在下でも極細胞で翻訳されていたからである（SI図4 JとK、データ示さず）。従って、NosはTao-1の下流にあるエフェクターの発現を抑制していると推測される。哺乳類では、Tao-1とその関連タンパク質は、MKK3を活性化することにより、p38 MAPK経路を介してシグナルを送る(53, 57, 58)。p38 MAPK経路は、遺伝子発現を調節することにより、アポトーシスを含む様々な細胞プロセスに寄与している（59, 60）。したがって、Tao-1はMKK3およびp38 MAPK経路を介して極細胞のskl発現を誘導している可能性がある。このモデルは、MKK3/6のショウジョウバエホモログであるlicorn (lic) が、移動する極細胞で発現しているという我々の観察からも支持される（M.M.、未発表）。あるいは、ヒトのTao-1関連キナーゼであるPSKがMKK4、MKK7、JNK MAPK経路を刺激することから、ショウジョウバエのTao-1はJNK MAPK経路を通してsklの発現を促進するのかもしれない(61)。licは、Nos依存的な翻訳抑制の補因子であるPumilioと関連するmRNAとして同定されていることは興味深い(62)。従って、Nosは極細胞のLic産生を抑制することにより、sklの発現を低下させている可能性がある。今後、この可能性を検証し、ポール細胞のTao-1活性の下流にあるアポトーシスにおけるMKKタンパク質の役割を調べることが必要であろう。

hidはNosの活性とは無関係に極細胞で発現するが、その翻訳はNosによって抑制されることを示した。母方のtao-1 RNAは生殖質で濃縮され、極細胞で受け継がれる。しかし、正常な極細胞では、Tao-1依存的なsklの発現は抑制される。Nosが機能しない場合、Tao-1依存性のsklの発現とhidの翻訳がともに抑制され、これらのタンパク質産物が一緒に作用してアポトーシスを誘導することが明らかになった。極細胞でhidの転写が活性化されるメカニズムはまだ解明されていないが、極細胞はアポトーシスを起こす能力があり、Nosの活性を下げるとプログラムされた細胞死を効果的に引き起こすことができる。また、母性Nosは極細胞の体細胞運命を抑制し、生殖細胞の適切な発生を可能にすることにも関与していることから(6)、アポトーシスによりNos活性が低下した極細胞は排除され、生殖細胞の完全性が保たれると考えられる。同様に、マウスでは、遺伝的・環境的擾乱に応答して生殖系列の運命を離れたPGCでアポトーシスが起こる(63-65)。さらに、Nosは様々な動物種において、PGCのアポトーシスの抑制に関与している(34-36)。今回のデータは、生殖細胞におけるアポトーシスを制御する進化的に保存されたメカニズムを理解するための重要な第一歩を提供するものである。

方法

フライストック。

使用したnos alleleはnosBN 。使用したhid alleleはhid05014 。Df(3L)H99 が記載されています。

Transgenes.

See SI Materials and Methods.

In Situ Hybridization.

胚のホールマウントin situハイブリダイゼーションは、記述したように行った。ジゴキシゲニン（DIG）標識RNAプローブは、全長3,902bpのhid cDNA、2.5kbのtao-1転写産物（tao-1の1-197、アクセッション番号AB277548）（SI 図4）に特異的な197bp cDNA断片から合成された。 ) 、4.8kbのtao-1転写産物に特異的な2,186bpのcDNA断片 (4.8-kb tao-1 cDNAの1-2186、アクセッション番号AB277547) (SI Fig. 3) および完全長の1,382bp skl cDNAが含まれていた。シグナルは、アルカリホスファターゼ結合抗DIG抗体（Roche, Indianapolis, IN）または西洋わさびペルオキシダーゼ結合抗DIG抗体（Roche）を用いて検出した。シグナルはTSA Biotin Systemとストレプトアビジン-FITCまたは-Texas redコンジュゲート（PerkinElmer, Wellesley, MA）で増幅された。二重染色は記述したように行った。

免疫染色とTUNEL。

免疫染色は記述したように行った。以下の一次抗体を使用した。ラットおよびウサギ抗Vasa（Vas）（それぞれ1：2000および1：200希釈；A. Nakamuraからのギフト）、マウス抗GFP（1：300希釈、3E6；Wako Pure Chemical Industries、大阪、日本）およびマウス抗FLAG M2（1：200希釈；Sigma、セントルイス、ミズーリ州）。アポトーシス細胞の検出には、ウサギ抗壊れカスパーゼ3（Asp-175）抗体（Lot No.15）（1:50 希釈；Cell Signaling Technology, Beverly, MA）を使用した。この抗血清は、ショウジョウバエのカスパーゼの切断型であるIce（Drice）と反応することが示されており、in situでアポトーシス細胞を標識する。抗体の検出は、Alexa Fluor 488および568コンジュゲート二次抗体（Molecular Probes、Eugene、OR）を用いて実施した。TUNEL は、記述したように実施した。染色した胚を Vectashield（Vector Laboratories, Burlingame, CA）にマウントし，レーザー走査型共焦点顕微鏡（Leica Microsystems, Wetzlar, Germany）で画像化した．

マイクロアレイ解析と定量的RT-PCR。

極細胞を単離するために、以下の胚をソースとして用いた。E1およびR1、nosGal4:VP16/nosGal4:VP16雌（E1）およびyw雌（R1）に由来する8-14期胚とUAS-tao-1（D168A）; EGFP-Vas 雄；E2およびR2、nosGal4 に由来する 8-14 期胚をソースとして使用した。 VP16/nosGal4:VP16雌（E2）およびyw雌（R2）とUAS-tao-1（D168D）; EGFP-Vas雄を交配した8-14期胚。これらの胚から極細胞を分離し、各極細胞画分から総RNAを抽出した(2)。

E1極細胞とR1極細胞の間、およびE2極細胞とR2極細胞の間で遺伝子発現プロファイルを比較した。これらの極細胞画分から抽出した 100 ng の total RNA から、Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いて cyanine-3 CTP (Cy3) および cyanine-5 CTP (Cy5) でラベルした cRNA を増幅させた。Drosophila melanogaster ゲノム (GPL4336) の予測される転写物のほぼすべてを表す 21,925 個のプローブを含む 22K 60-mer oligonucleotide microarray (Agilent) をカスタムメイドで分析した。各アレイは、1 mg の Cy3 標識および Cy5 標識 cRNA でプローブされ、Agilent のプロトコルにしたがって洗浄された。その後、G2565BA Microarray Scanner System (Agilent)を用いてアレイをスキャンした。データは、Feature Extraction 7.1 software (Agilent)を用いて解析した。データはGEOにアクセッション番号で寄託される予定である。GSE7318 に寄託する。

E1/R1とE2/R2のシグナル比は、独立した2つの実験から求め、その平均値を算出した。2,143個の「細胞死」遺伝子のうち、Tao-1(D168A)とTao-1(D168D)を発現する極細胞でそれぞれ発現が増加、減少した遺伝子はskl（skle）のみであった。skl発現のE1/R1およびE2/R2比は、それぞれ1.51および0.78であった。

定量的RT-PCRは、(2)に記載されているように行った。sklの増幅に用いたプライマーのセットは以下の通りである：skl-1：5'-GTGGCTAAGATTCCATGCGAAATAAATCG-3'、skl-2：5'-AGAATGTGTAGTTTGGAGTATTTATGTGTG-3'。値は、内因性対照（rp49）に対して正規化した。3つの独立した実験からの正規化された値を平均し、E1/R1およびE2/R2のパーセンテージを算出した。

tao-1に対するdsRNAのマイクロインジェクション。

tao-1の全長cDNAからプライマーT7\_STK\_FW3およびT7\_STK\_RV3を用いてPCRを行い、テンプレートDNAを増幅した。

T7\_STK\_FW3：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGATGCGCCCGAGGTGATCCTGG-3' (4.8kbの1042〜1065に相補的). 8-kb tao-1 cDNA）、T7\_STK\_RV3: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGCGGCGTCGAGATAGC-3' （4.8-kb tao-1 cDNAの2026-2049に相補的）である。

どちらのプライマーも5'末端にT7プロモーター配列が含まれている。増幅されたDNAからT7 RNA polymerase (Megascript T7 kit, Ambion)を用いてDsRNAをin vitroで転写した。5 ng/nlの濃度の約0.1 nlのdsRNAを、初期裂開期（ステージ2）のnos胚の後極に注入した。注入した胚は、第9-11期および第13/14期まで発育させた。胚はヘプタンと4％パラホルムアルデヒドの1：1混合液で20分間固定し，4％パラホルムアルデヒドで硝子体膜を除去した．固定された胚は，in situ ハイブリダイゼーションまたは免疫染色に供された

**TUNEL法によるDNA断片化の検出**

TUNEL法は*in situ*でDNA断片化を検出する方法として開発されました。アポトーシスによってDNAが断片化された場合、通常、断片化された3'側にOH基を持ちます(3'-OH)。TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)は1本鎖、2本鎖DNAの3'-OH末端にdeoxynucleotide を重合する反応を触媒します。  
アポトーシスを起こした細胞ではクロマチンDNAがエンドヌクレアーゼによりリンカー部位で切断され、1個のヌクレオソーム構造を作るDNAの長さ(約180塩基対)を最小単位としてその整数倍の長さのDNA断片が存在しています。  
細胞・組織切片を処理した後、細胞内の核における断片化DNAの3' -OH末端部にdUTP-FITC、dUTP-BiotinさらにAvidin-DTAFなどの標識したdUTPを結合させることにより断片化DNAを特異的に検出できます。