

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

小林 悟

(岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター、教授)

「生殖細胞形成機構の解明とその哺乳動物への応用」

1．研究実施の概要

ショウジョウバエの生殖細胞は、初期胚の後極に形成される極細胞と呼ばれる細胞に由来することが知られている。形成された極細胞は胚内を移動したのち生殖巣に取り込まれ、成虫まで発生した段階で生殖巣の中で卵や精子に分化する。これらの発生過程は、卵の後端に存在する生殖質（極細胞質）中に局在する複数の因子の働きにより制御されていることが明らかになっている。これまでに、これら因子の一部が同定されたが、生殖細胞としての特質を決定する分子、すなわち「生殖細胞決定因子」の定義に良く合う分子は同定されていない。この分子を単離することが本研究の第1のねらいである。本年度は、この分子単離のための準備をおこなった。本研究の第2のねらいは、ショウジョウバエで明らかになっている生殖細胞形成に関わる生殖質中の因子のホモログをマウスで単離しその機能解析をすること、逆に、マウスの生殖細胞形成に関わる因子のホモログをショウジョウバエで単離し機能解析をすることである。現在までに、ショウジョウバエで生殖細胞形成に関わるものが明らかとなっているnanos遺伝子のホモログをマウスで単離し、ノックアウトの準備を進めている。また、マウスにおいて、生殖細胞形成に関わる遺伝子の候補が単離されつつある。以上の研究は、多くの動物に共通する生殖細胞形成機構を明らかにする研究の基礎となるものである。

2．研究実施内容

ショウジョウバエの生殖質中に局在し、生殖細胞の形成に関わるものが知られている分子の1つとして、Nanosタンパク質が知られている。Nanosは、極細胞が生殖巣へ移動する過程に関与する。しかし、この分子は、体細胞で機能する遺伝子の発現を極細胞中で抑制することにより、生殖細胞の発生過程を正常に進行させるという許容的（permissive）なものであることが明らかとなってきた。このことは、生殖細胞としての特質を決定するinstructiveな働きをする分子がNanosとは別に存在することを示唆している。本研究は、このような働きを持つ因子を単離・同定することが目的とする。生殖細胞の特質の1つとして減数分裂を行なうことが挙げられる。私たちは、突然変異を用いた遺伝学的な解析から、極細胞質に存在し極細胞に

取り込まれ、極細胞中で自律的に働き減数分裂を制御する因子が存在することを示唆する結果をすでに得ている。本年度は、この因子をコードする遺伝子の染色体上の位置の決定およびその単離同定のために必要な系統をそろえる等の準備を行なった。

また、本年度は、nanos遺伝子のマウスホモログの機能解析の準備をおこなってきた。現在までに、nanosホモログ遺伝子が、少なくとも3種類マウスに存在することが明かとなった。そのうち1種類(nanos-1)については、ノックアウト系統の作製が先行し、表現型の解析をおこないつつある。nanos-1mRNAは、卵巣にて発現をし、その母性mRNAは受精後ただちに分解され、8細胞期から胚盤胞期にかけて一過性の発現をした後、神経系で顕著な発現を示した。他の2種類のnanosホモログ(nanos-2と-3)に関して、完全長のcDNAを既に単離しており、現在発現場所の特定およびノックアウトの準備を進めている。ゼブラフィッシュでは、少なくとも2種類のnanosホモログが存在し、一方は神経系で、他方は胚の生殖細胞で発現していることから、nanos-2,-3の発現解析および機能解析によりマウスの生殖細胞形成過程におけるnanosの役割が明らかになるものと期待している。

また、マウスにおいて始原生殖細胞の前駆細胞や、その分化段階の初期から特異的に発現する遺伝子を同定し、それら遺伝子の中から、始原生殖細胞の形成および初期の分化過程に関わる遺伝子を単離することを試みた。これまでに、始原生殖細胞で蛍光タンパク質であるGFPを発現するOct-3/4 GFPトランスジェニックマウスから、単離可能な移動期始原生殖細胞を純化した。次にそのようにして得た細胞と、全能性幹細胞を含む胚盤胞との間でサブトラクションcDNAスクリーニングをおこない、候補遺伝子を得た。さらにそれらの発現パターンをin situハイブリダイゼーションにより調べ、移動期および生殖隆起内の始原生殖細胞で発現しているが、全能性幹細胞や体細胞組織では発現しない遺伝子を見いだした。今後、これらの遺伝子の始原生殖細胞形成に対する機能をノックアウト法により明らかにする予定である。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

本プロジェクトの成果に関わる論文はなし