

「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、極細胞の形成に関わる分子としてミトコンドリアの rRNA (mtrRNA) が、極細胞が生殖巣に移動する過程に関わる分子として Nanos タンパク質を同定した。本年度の研究により、これらの分子に関して以下の点が明らかになった。1) 極細胞質中でミトコンドリア外に搬出された mtrRNA は、極顆粒と呼ばれる構造物上でミトコンドリア・タイプのリボソームを形成することが明らかとなった。おそらく、このリボソーム上で極細胞形成に関わるタンパク質をコードする mRNA が翻訳されると考えられる。2) Nanos が極細胞の細胞死(apoptosis)を阻害することにより生殖系列の維持を行っていることが明らかとなった。Nanos は、間接あるいは直接に apoptosis に関わる遺伝子の発現を抑制していると考えている。

以上の分子の他に、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」が存在すると予想される。この分子は、おそらく生殖系列特異的な遺伝子発現を極細胞中で活性化することによりこの機能を果たしていると考えられる。本年度は、この分子をコードすると考えられる遺伝子の単離を試みてきた。また、*vasa* 遺伝子の生殖系列特異的な発現に必須なプロモーター領域を同定することに成功した。この配列に結合するタンパク質を同定することにより生殖細胞決定因子の実体に迫れるものと期待している。

さらに、本研究では、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、その機能解析を行うことも目的としている。前年度までに、マウス *nanos* 遺伝子を3種類単離する事に成功しており、本年度はそれら遺伝子のノックアウト系統の作成を行った。以上の研究により、多くの動物に共通する生殖細胞形成機構の一端を明らかにすることができると考えている。

## 2. 研究実施内容

本研究では、生殖細胞の特質を決定する因子を単離・同定すること(研究3)、さらにそのような因子のホモログをマウスで同定し、その機能解析をおこなうこと(研究4)を主眼にしているが、生殖細胞決定因子の全容を明らかにするという観点から、研究1及び2に関しても継続しておこなった。以下にそれらの研究成果を記す。

### 研究1: 極細胞形成機構の解明

現在までの本研究において、ミトコンドリアの2種類のrRNAが、Tudorと呼ばれるタンパク質の働きにより、卵の極細胞質中でミトコンドリアから極顆粒上に移送されることが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡による観察により、それらrRNAが、極細胞の形成に先立って、極顆粒上でミトコンドリアのリボソームタンパク質とともに、ミトコンドリア・タイプのリボソームを形成していることも明らかとなった。おそらくこのリボソームにより極細胞形成に関わるタンパク質をコードするmRNAが翻訳されると考えている。このmRNAの候補として、*germ cell-less* mRNAをあげることができる。このmRNAは、極細胞形成に関わるタンパク質をコードしており、その翻訳の開始時期は極顆粒上にミトコンドリアタイプのリボソームが形成される時期とほぼ一致する。今後、極顆粒上のミトコンドリア・タイプのリボソームにより翻訳されるmRNAを同定することが研究の発展に必須である。

### 研究2: 極細胞内でおこる遺伝子発現抑制機構

現在までに、Nanosタンパク質が、本来体細胞で発現し体細胞の分化過程に関わる遺伝子の発現を抑制することにより、極細胞の移動過程を正常に進行させることを明らかにした。生殖系列には体細胞に分化させない機構が備わっていると考えられてきたが、その機能を担う分子機構の一端を明らかにした意義は大きい。

さらに、この機能に加え、Nanosは、極細胞の細胞死(apoptosis)を抑制する機能も持つことが明らかになった。おそらく、Nanosは、apoptosisに関わる遺伝子の発現を抑制することによりこの機能を果たしていると考えられる。その遺伝子の候補として、*head involution defective (hid)*があげられる。*hid*はapoptosisに関わることが知られている。さらに、そのmRNA上にはNanosが結合し翻訳抑制を行うために必須なNanos Response Element (NRE)が存在する。今後、この遺伝子の発現がNanosにより抑制されているかを明らかにする予定である。

### 研究3: 生殖細胞の特質を決定する機構

現在までに、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母性因子が存在することを示唆する結果を得ている。減数分裂は生殖細胞の重要な特質の一つであることから、この因子は、生殖細胞の特質を決定する因子としてとらえることができる。現在も、この遺伝子の単離を試みている。また、生殖系列特異的に発現することが知られている*vasa*遺伝子のプロモーター領域に段階的な欠失を導入し、生殖系列特異的な発現に必須なDNA領域を同定した。この配列に結合するタンパク質を同定することにより生殖細胞の特質を決定する因子の実体に迫れるものと期待している。

### 研究4: ショウジョウバエの生殖細胞形成因子の機能の普遍性の検討

- 1) ショウジョウバエで生殖細胞の形成に関わる遺伝子のホモログをマウスで単離し、その機能解析を試みている。現在までに、マウスの *nanos* 遺伝子を3種類単離する事に成功しており、本年度はそれら遺伝子のノックアウトシステムの作成を行った。来年度の早い時期にノックアウトシステムが作成できると予想している。その後、引き続きそれらの表現型の解析を行う予定である。
- 2) また、マウスにおいて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ており、その発現解析および機能解析を継続して行っている。今後、この結果得られる遺伝子のホモログをショウジョウバエで単離し、機能解析をおこなう予定である。以上の研究により、多くの動物に共通する生殖細胞形成機構の一端を明らかにすることができると考えている。

### 3. 研究実施体制

#### 小林グループ

- グループ長: 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)  
研究項目: ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構の解明に関する研究を行った。  
上記研究実施内容の研究1~3に相当。

#### 相賀グループ

- グループ長: 相賀裕美子(国立遺伝学研究所系統生物研究センター・教授)  
上記研究実施内容の研究4のうち、1)を実施した。

#### 松居グループ

- グループ長: 松居靖久(大阪府立母子保健総合医療センター研究所・部長)  
上記研究実施内容の研究4のうち、2)を実施した。

#### 中村グループ

- グループ長: 中村輝(筑波大学生物科学系・遺伝子実験センター・講師)  
上記研究内容の研究3を担当。

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- R. Amikura, K. Hanyu, M. Kashikawa and S. Kobayashi (2001)  
Tudor protein is essential for the localization of mitochondrial ribosomal RNAs in polar granules in germ plasm of *Drosophila* embryos.  
Mech. Dev. 107, 97-104.
- R. Amikura, M. Kashikawa, A. Nakamura and S. Kobayashi (2001)  
Presence of mitochondrial-type ribosomes outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila* embryos.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 9133-9138.
- A. Nakamura, R. Amikura, K. Hanyu and S. Kobayashi (2001)  
Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic

RNP complex during *Drosophila* oogenesis..

Development. 128, 3233–3242.

- H. Sano, M. Mukai and S. Kobayashi (2001)

Maternal Nanos and Pumilio regulate zygotic vasa expression autonomously in the germline progenitors of *Drosophila* embryos.

Develop. Growth & Differ. 43, 545–552.

- H. Sano, A. Nakamura and S. Kobayashi (2002)

Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of *vasa* gene in *Drosophila melanogaster*.

Mech. Dev. 112, 129–139.

- (2) 特許出願

なし