

「生物の発生・分化・再生」  
平成12年度採択研究代表者

小林 悟

(大学共同利用機関法人自然科学研究機構岡崎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

本研究は、ショウジョウバエおよびマウスの生殖細胞の形成に関わる分子の同定およびその機能解析を行い、無脊椎、脊椎動物に共通する生殖細胞形成機構、さらにショウジョウバエやマウスに固有の生殖細胞形成機構を明らかにすることを目的としている。

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) を、極細胞が生殖巣に移動する過程において機能する分子としてNanosタンパク質を同定した。

現在までの研究により、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し、極細胞形成に関わるタンパク質の合成に関わることが明らかとなった。このリボソームにより翻訳される候補mRNAとして、germ cell-less mRNAを同定した。このRNAにコードされるタンパク質は極細胞形成に必要であり、その合成は、極顆粒上にミトコンドリア・タイプのリボソームが観察されるステージから開始されることが明らかになっていた。2) Nanosタンパク質を欠き、かつ細胞死を抑制した極細胞は、体細胞組織に取り込まれることが明らかとなっていた。この極細胞中では、生殖細胞マーカー遺伝子 (vasa) の発現が失われ、逆に体細胞の分化マーカーの発現が観察された。このことは、Nanosタンパク質が体細胞に分化する経路を阻害する機能を持つことを示している。ショウジョウバエの極細胞は潜在的には分化多能性であり、Nanosによりその運命が生殖細胞に分化するべく限局されることが明らかとなった。

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事によりこの機能を果たしていると考えられる。そこで、生殖巣のEST解析を行い、極細胞中で特異的に発現する遺伝子を同定した。また、これ以外にも、マイ

クロアレイ解析により極細胞で強く発現する遺伝子をも同定しつつある。今後、これらの遺伝子の機能および発現制御機構を明らかにすることにより、生殖細胞決定に関わる遺伝的経路が明らかになるものと期待している。

マウスには、ショウジョウバエの*nanos*遺伝子のホモログが3種類存在する。そのうち*nanos2*および*nanos3*を欠いたノックアウトマウスにおいて始原生殖細胞が欠損することが明らかとなっている。このことは、*nanos*が、ショウジョウバエのみならずマウスにおいても生殖細胞の形成に重要な機能を果たすことを示している。特に、*nanos3*の発現は、始原生殖細胞が形成された直後に開始することが新たに明らかとなったことから、この遺伝子の機能が生殖細胞としての性質の獲得、およびその維持に密接に関連している可能性が考えられる。現在、*nanos2*および*nanos3*の発現制御機構を明らかにするために、エンハンサー解析等を行っている。また、*nanos3*を欠く生殖細胞の発生運命の解析も進行中である。

さらに、マウスにおける生殖細胞形成機構を明らかにする目的で、初期の始原生殖細胞で発現することが明らかになっている*mil1*および*mil2*遺伝子の発現制御領域を同定した。この配列に結合する上位因子を同定することにより始原生殖細胞の決定に関わる因子が同定されるものと期待できる。また、Eカドヘリン依存的な細胞間相互作用による始原生殖細胞の決定に関わる遺伝子の同定、および減数分裂の開始を制御する遺伝子の同定も進行中である。

## 2. 研究実施内容

### 研究1：極細胞形成機構の解明

現在までの研究において、ミトコンドリアの2種類のrRNAが極顆粒上に存在し、それらが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が明らかとなった。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。本年度は、前年度に引き続き、原核生物タイプの翻訳を阻害するKasugamycinやChloramphenicolを用いた研究をおこない、ミトコンドリア・タイプのリボソームによる翻訳が極細胞の形成に必須であることを明らかにした。また、この翻訳阻害剤により、翻訳が阻害されるmRNAの候補として、*germ cell-less mRNA*を同定した。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。現在、この結果を確認中である。

### 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、細胞死への経路と体細胞分化経路を抑制することにより、極細胞の発生運命を生殖細胞に分化するように限局していることを示唆する予備的な結果が得られた。そこで、本年度は、体細胞および生殖細胞特異的な分化マーカーを用いてNanosタンパク質を欠く極細胞の発生運命をさらに詳細に調べた。その結果、Nanosを欠きかつ細胞死を抑制した極細胞の一部は、体細胞組織に取り込まれ、生殖細胞特異的な

マーカーの発現を失い、体細胞分化マーカーを異所的に発現することが明らかとなった。この結果は、Nanosタンパク質が体細胞への分化経路を阻害していることを示すものである。すなわち、ショウジョウバエの極細胞は潜在的には分化多能性であり、Nanosによりその運命が生殖細胞に分化するべく限局されていくことを示唆している。

### 研究3：生殖細胞の特質を決定する機構

本研究では、生殖細胞の分化の引き金を引く instructive な働きをする母性因子を単離・同定することを試みる。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。この因子の候補として、Znフィンガーモチーフと BTB ドメインを持つタンパク質を同定した。今後この結果を確認するとともに、機能解析を行う。

生殖細胞の分化の引き金を引く instructive な働きをする母性因子は、極細胞内で生殖系列特異的な遺伝子発現を引き起こすと考えられてきた。そこで、生殖巣に取り込まれた極細胞中で発現する遺伝子を網羅することを試みてきた。単離した生殖巣から cDNA ライブラリーを作成し、EST 解析と *in situ* hybridization による分布解析を行った結果、約 2900 遺伝子が生殖巣で発現しており、そのうち 40 が生殖巣特異的に、103 が生殖巣と一部の体細胞組織で発現していた。また、生殖巣中の極細胞に特異的に発現する遺伝子を 4 種類、極細胞と一部の体細胞で発現する遺伝子を 39 種類見出した。今後この遺伝子の機能解析を行う予定である。また、ショウジョウバエ全遺伝子セット（ユニゾン・セット）マイクロアレイを用いて、極細胞で発現する遺伝子を網羅する研究も進行中である。以上の研究は小林グループが行った。

### 研究4：ショウジョウバエの生殖細胞決定因子の機能の普遍性の検討

#### 1) 相賀グループ

昨年度までに、nanos2 及び nanos3 を欠損したノックアウトマウスにおいて生殖細胞が欠損することが明らかとなった。このことは、nanos がマウスにおいても生殖細胞の形成に重要な機能を果たすことを示している。本年度は、これら遺伝子の発現制御機構を解析し、以下の結果を得た。

nanos2 の 3' -UTR の遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。その結果、nanos2 遺伝子に外来の 3' -UTR を挿入した場合に比べ、内在性の 3' -UTR を用いた方が、生殖巣における発現が強く、その発現が維持されることが明らかとなった。その際に RNA の発現量は変化していなかったことから、タンパク質の翻訳効率に違いがあると考えられる。さらに、3' -UTR のみを欠損させたノックアウトマウスを作成し解析した結果、胎児精巣における生殖細胞の形成と維持には影響はなかったが、出生後に精原細胞の増殖が一過的に減少した。また、このマウスと nanos2 ノックアウトマウスを交配し、nanos2 の量を減少させるとさらに生殖細胞の減少が顕著に見られた。このことから nanos2 の 3' -UTR は、生殖細胞が増殖

する出生後に十分な量のnanos2を供給するために必要であることが示唆される。

始原生殖細胞が形成された直後に、nanos3の発現が開始することが新たに明らかとなった。すなわち、nanos3は、生殖細胞中で最も初期から発現する遺伝子の一つである。このことから、nanos3の機能は、生殖細胞としての性質の獲得、およびその維持に密接に関連している可能性が考えられる。nanos3ノックアウトマウスにおいて、始原生殖細胞が移動中に失われていくことが観察されている。これが、ショウジョウバエで明らかになったように、細胞死や体細胞への分化転換によるものなのか不明である。細胞死に関わるcaspase-3の抗体と生殖細胞のマーカーを用いて解析を試みてきたが、細胞死が起こっている証拠は得られていない。今後、細胞培養系を用いて生殖細胞の挙動を追い、この点を明らかにする予定である。

さらに、nanos2およびnanos3遺伝子の発現調節機構を解析するために、エンハンサー解析も開始している。現在までに、nanos2の発現を制御する領域の同定に成功している。

## 2) 松居グループ

### *mill*遺伝子の発現制御機構および機能

形成期始原生殖細胞で発現する遺伝子として、互いに類似した構造をもつ膜タンパク質をコードする*mill*, *mil2*を単離している。これら遺伝子の上位で働く分子を同定することを目的に、*mill*遺伝子の近傍領域をGFP遺伝子につないでトランスジェニックマウスを作り、始原生殖細胞での特異的な発現の有無を調べた。その結果、転写開始点から上流2-3kbpの部分に、始原生殖細胞での発現を促進する領域と、体細胞での発現を抑制する領域が複数存在することが明らかになった。特に、上流2kbp付近には他の始原生殖細胞で特異的に発現する遺伝子の近傍にも共通に見られる配列があり、この部分が、始原生殖細胞での発現の促進と、体細胞での発現の抑制の両者に働いていることが明らかとなった。

### Eカドヘリンによる細胞間相互作用に依存して働く生殖細胞決定因子の同定

これまでの研究により、始原生殖細胞の前駆細胞において細胞接着分子Eカドヘリンを介した細胞間相互作用が働くことが、始原生殖細胞への分化決定に必要であることを示した。本年度は、Eカドヘリンの作用を阻害した場合に前駆細胞のまま分化を停止した細胞と、阻害しない場合に出現する分化決定直後の始原生殖細胞で差違的に発現する遺伝子をスクリーニングし、生殖細胞分化決定遺伝子を同定することを試みてきた。さらに*mil1*に対する特異的な抗体を作製し、免疫染色を行った結果、細胞塊を形成している前駆細胞の表面に*mil1*が特異的に発現していることも明らかになっている。

### 減数分裂の開始を制御する分子の同定

減数分裂は、生殖細胞を特徴づける現象で、その開始の制御は生殖細胞の本質と深く関わっていると思われるが、これまで特に高等動物においては、体細胞分裂から減数分裂への切り替えを引き起こす分子機構はわかっていない。そこで、減数分裂の開始を制御する分子を同定することを目的として以下の研究を行ってきた。胎仔卵巢では13.5日胚頃に減

数分裂が開始することに注目し、13.5日胚と11.5日胚から単離した始原生殖細胞を使ってサブトラクシオンcDNAスクリーニングを行い、前者に特異的に発現する遺伝子を単離した。それら遺伝子のいくつかは、生殖細胞で特異的に発現し、さらに減数分裂やゲノム構造の制御に関わる遺伝子と相同性を示す新規遺伝子であることが明らかとなった。

### 3. 研究実施体制

#### 小林グループ

- ① 研究分担グループ長：小林悟（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授）
- ② 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

- ① 研究分担グループ長：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）
- ② 研究項目：  
上記研究実施内容の研究4

#### 松居グループ

- ① 研究分担グループ長：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）
- ② 研究項目：  
上記研究実施内容の研究4

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文（原著論文）発表

- M. Tsuda, Y. Sasaoka, M. Kiso, K. Abe, S. Haraguchi, S. Kobayashi, and Y. Saga  
Conserved role of nanos proteins in germ cell development.  
Science 301, 1239-1241 (2003)
- S. Sato, T. Yoshimizu, E. Sato, and Y. Matsui  
Erasure of methylation imprinting of *Igf2r* during mouse primordial germ-cell development. Mol. Reprod. Dev. 65, 41-50 (2003)
- T. Ara, Y. Nakamura, T. Egawa, T. Sugiyama, K. Abe, T. Kishimoto, Y. Matsui, and T. Nagasawa  
Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice

lacking a chemokine, stromal cell-derived factor (SDF-1).

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100: 5319-5323 (2003)

- D. Okamura, T. Kimura, T. Nakano, Y. Matsui  
Cadherin-mediated cell interaction regulate germ cell determination in mice.  
Development 130, 6423-6430 (2003)
- S. Tanaka, G. Nagamatsu, Y. Tokitake, M. Kasa, P.P.L, Tam, Y. Matsui  
Regulation of expression of mouse interferon-induced transmembrane protein  
like gene-1, mil-1/fragilis, in germ cells.  
Dev. Dyn. in press.
- T. Yano, S. López de Quinto, Y. Matsui, A. Shevchenko, A. Ephrussi  
Hrp48 regulates and couples *oskar* mRNA localization and translational  
control during *Drosophila* oogenesis.  
Dev. Cell, in press

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数： 0 件（研究期間累積件数： 1 件）