

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

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)

「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（研究1-3）およびマウス（研究4）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機構を明らかにすることを目的としている。現在までの研究により、以下の点が明らかになった。

研究1) ミトコンドリアの2種類のrRNAが極顆粒上に存在し、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ていた。本年度は、このリボソームにより翻訳されるmRNAとして、germ cell-less (gcl)を同定した。

研究2) 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が明らかになっていた。本年度は、Nanosがimportin- α 2 RNAの翻訳を抑制することで極細胞の体細胞分化を抑制していることを明らかにした。

研究3) 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。本年度は、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の1つが、ZnフィンガーモチーフとBTBドメインを持つSVA53タンパク質であることを明らかにした。また、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500同定することにも成功した。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される。

研究4) ショウジョウバエの生殖細胞形成に関わるnanosのマウスホモログnanos2, 3を単離し、マウス個体における機能を解析することを目的として研究をおこなっている。本年度は、nanos2と相互作用するタンパク質の検出、nanos2の雄特異的発現を調節する制御領域の同定をおこなった。また、nanos3の詳細な発現解析をおこなうとともに、nanos3ノックアウトマウスにおける始原生殖細胞の消失が、細胞死を促進するBax遺伝子を欠損させることにより抑制されることも明らかにした。これは、ショウジョウバエにおけるNanosの機能と同様の結果である。

ショウジョウバエにおいて母性因子による減数分裂制御機構を解析しているが、マウスにおいては減数分裂前期に特異的に発現する遺伝子Meisetzを単離し、機能解析をおこなっている。Meisetzのホモ変異マウスでは雌雄ともに生殖能力がなく、パキテン期精母細胞で減数分裂が停止し生殖細胞が細胞死を起こすことが明らかとなった。現在、MeisetzはH3K4のメチル化を介して、減数分裂前期の進行に必要ないくつかの遺伝子の発現を制御していると考えている。

2. 研究実施内容

研究1：極細胞形成機構の解明

昨年度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。また、原核生物タイプの翻訳を阻害するKasugamycinやChloramphenicolにより、ミトコンドリア・タイプのリボソームによる翻訳を阻害した場合に、極細胞の形成率が低下することが明らかとなっている。本年度は、この翻訳阻害剤により、翻訳が阻害されるmRNAとして、germ cell-less (gcl) 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。また、興味深い点として、既に報告されているgcl mRNAのORFは、ミトコンドリアgenetic codeではトリプトファンに対応する終止コドンで終わっており、このgenetic codeによると、さらに30アミノ酸ほどread throughがおりうることを見いだした。実際にこのread throughがおこるか否かを現在検証中である。

研究2：極細胞内でおこる遺伝子発現抑制機構

昨年度までに、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明らかにした。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。本年度は、Nanosが体細胞分化を抑制する機構について解析した。極細胞中でNanosは、Nanosターゲット配列であるNRE配列を持つimportin- α 2 mRNAの翻訳を抑制することにより、転写因子の核内輸送を阻害し、体細胞性の遺伝子発現を低下させることが明らかとなっていた。そこで、Nanosを欠く極細胞の体細胞分化にImportin- α 2が関与すると予想した。これを明らかにするため、Nanosを欠く極細胞中のImportin- α 2活性をRNAi法により低下させ、これら極細胞が体細胞に分化するか否かを調べた結果、極細胞の体細胞分化がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。この結果は、Nanosはimportin- α 2 RNAの翻訳を抑制することで極細胞の体細胞分化を抑制していることを示している。

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。昨年度までに、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た。本年度は、この因子の1つが、ZnフィンガーモチーフとBTBドメインを持つSVA53タンパク質であることを明らかにした。現在、このタンパク質により制御される減数分裂関連遺伝子を探索している。

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。また、現在までに同定されている極細胞質に局在する母性因子の大部分は、RNAとして局在することも明らかとなっている。そこで、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をおこなった。胚発生過程を8つのステージに分け、それぞれから極細胞を単離し、マイクロアレイ解析をおこなった結果、約500遺伝子が極細胞中で高発現することが明らかとなった。現在、この結果を確認するとともに、これら遺伝子の機能解析を開始したところである。

以上の研究は小林グループが行った。

研究4：マウスにおける生殖細胞形成・分化機構

1) 相賀グループ

nanos2の発現・機能解析

ショウジョウバエの生殖細胞形成に関わるNanosのマウスホモログを単離し、マウス個体における機能を解析することを目的として研究をおこなっている。昨年度までに、nanos2, nanos3遺伝子ノックアウトマウスを作成し解析した結果、それらが生殖細胞の形成に必須であることが明らかとなった。本年度は、これらのタンパク質の機能解析のために、特異抗体の作成および精製をおこなった。作成したnanos2タンパク質に対する抗体を利用して、nanos2と相互作用するタンパク質の検出に成功した。現在、その同定に向けた解析を行っている。またnanos2の内在性3'-UTRを保持した形でLacZをノックインしたマウスを作成したところ、強い発現が維持され、生後の発現解析が可能になった。その結果、nanos2発現細胞は精巣の生殖幹細胞に発現している可能性が示唆された。さらに、nanos2の雄特異的発現を調節する制御領域を同定すべく、トランスジェニックマウスを用いたエンハンサー解析を行った。その結果、5'領域に存在する約300bpの配列が精巣特異的な発現調節領域であることを見出した。

nanos3の発現・機能解析

nanos3に関しては、初期の始原生殖細胞における発現開始時期及びその場所を明らかにするために、LacZをノックインしたマウスを作成した。その結果、非常に初期（7.5日目の胚）において、尿膜基部に発現する始原生殖細胞に特異的は染色像が得られた。また、

生後の生殖幹細胞において、nanos3はnanos2と非常に似た発現パターンを示しており、生後においては、これらのタンパク質が協調して機能する可能性も考えられる。

nanos3ノックアウトマウスにおいて、生殖巣に達するまでに始原生殖細胞が消滅する原因は不明であった。そこで細胞死による可能性を検討するために、細胞死を促進するBax遺伝子を欠損させることにより始原生殖細胞の生存が回復するか否か検討した。予備的な結果であるが、Baxを欠損させると、nanos3ノックアウトマウスにおいて、生後の精巣で生殖細胞が観察されており、細胞死の抑制によりある程度nanos3欠損がレスキューされる可能性が示唆されている。

2) 松居グループ

*mil-1*の機能解析

マウス始原生殖細胞は原腸陥入開始期に、多能性幹細胞から前駆細胞を経て分化決定される。これまでにこの分化決定を受ける前後から始原生殖細胞で特異的に発現する膜タンパク質遺伝子*mil-1*を同定した。この遺伝子は始原生殖細胞の前駆細胞の時期から特異的に発現するため、始原生殖細胞の分化決定に関わっていることが予想された。そこで、その機能をRNAiを用いて明らかにすることを計画した。まずRNAiにより*mil-1*タンパク質の減少が見られるかどうかを、*mil-1*を発現していることがわかっているES細胞を利用して検討した。*mil-1*に対するsiRNAをリポフェクションによりES細胞に導入後、*mil-1*タンパク質の発現をウエスタンブロットにより調べたが、siRNAを導入しなかったものに比べて、*mil-1*タンパク質の量の減少は観察されなかった。この結果から、siRNAのデザインを含めて実験条件の検討が必要であると考えられる。

Eカドヘリンの下流で始原生殖細胞の分化決定働く遺伝子候補の単離

これまでの研究から、前駆細胞から始原生殖細胞の分化決定が起こる際には、細胞接着分子Eカドヘリンを介した前駆細胞間の相互作用が必要であることを明らかにした。そこでこの細胞間相互作用に依存して前駆細胞で発現し、始原生殖細胞の分化決定に働くことが予想される遺伝子候補の単離を試みた。始原生殖細胞の前駆細胞をEカドヘリンの阻害抗体存在下、非存在下で培養したものからそれぞれcDNAを合成し、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法により、Eカドヘリンを阻害しない場合にのみ現れる分化決定直後の始原生殖細胞に特異的に発現する可能性のある遺伝子候補を得た。次にそれらの発現の特異性をin situハイブリダイゼーションおよびPCRにより調べた。しかし、いずれの候補遺伝子についても、分化決定直後の始原生殖細胞での発現が確認できなかった。この結果から、今回のスクリーニングでは目的とする遺伝子候補は得られなかったと考えられる。

減数分裂前期で特異的に発現する転写因子Meisetzの機能解析

減数分裂の開始や初期の進行に係わる遺伝子を同定するために、これまでに減数分裂前期に特異的に発現する遺伝子Meisetzを単離した。この遺伝子は、ヒストンメチルトラン

スフェラーゼの活性モチーフを持つタンパク質をコードしており、また実際にin vitroでヒストンH3K4をメチル化する活性を持ち、さらにその活性に依存した遺伝子のトランスアクリベーション活性も持つことが明らかになった。次にMeisetzの減数分裂における機能を調べるために遺伝子ノックアウトマウスを作成し解析した。その結果、Meisetzのホモ変異マウスでは雌雄ともに生殖能力がなく、パキテン期精母細胞で減数分裂が停止し生殖細胞が細胞死を起こしていることがわかった。組織解析から変異マウスでは減数分裂に伴う相同染色体の対合・組み換えに異常を起こしていることがわかった。さらに変異マウスの精母細胞ではH3K4のメチル化が低下しており、また生殖細胞で特異的に発現するいくつかの遺伝子の発現が減少していることが観察された。これらの結果から、MeisetzはH3K4のメチル化を介して、減数分裂前期の進行に必要ないくつかの遺伝子の発現を制御していると考えられる。

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

(東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター・教授)

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

○ Hayashi, Y., Hayashi, M. Kobayashi, S.

Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germline.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 10338-10342 (2004)

○ Hanyu-Nakamura, K., Kobayashi, S., Nakamura, A.

Intrinsic and extrinsic lipid phosphate phosphatase defines cell

viability that promotes directional migration of *Drosophila* germ cells.
Development 131, 4545-4553 (2004)

- Unezaki, S., Nishizawa, M., Okuda-Ashitaka, E. Masu, Y., Mukai, M., Kobayashi S., Sawamoto, K. Okano H., Ito, S.
Characterization of the isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of Drosophila ovom as transcription factors.
Gene 336, 47-58 (2004)
- Yano T., Lopez de Quinto, S., Matsui, Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Ephrussi,
A. Hrp48 regulates and couples oskar mRNA localization and translational control during Drosophila oogenesis.
Dev. Cell 6, 637-648 (2004)
- Tanaka, S.S., Nagamatsu, G., Tokitake, Y., Kasa, M., Tam, P.P.L, Matsui, Y.
Regulation of expression of mouse interferon-induced transmembrane protein like gene-1, Ifitm3 (mil-1/fragilis), in germ cells.
Dev. Dyn. 230, 651-659 (2004).
- Okamura, D., Hayashi, K., and Matsui, Y. Mouse epiblast changes responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation by the functions of extraembryonic ectoderm.
Mol. Reprod.
Dev. 70, 20-29 (2005).
- Miki, H., Inoue, K., Kohda, T., Honda, A., Ogonuki, N., Yuzuriha, M., Mise, N., Matsui, Y., Baba, T., Abe, K., Ishino, F., and Ogura, A. Birth of mice produced by germ cell nuclear transfer.
Genesis 41, 81-86 (2005).
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modification associated with specification and early development of germ cells in mice.
Dev. Biol. 278, 440-458 (2005).
- Matsui, Y., and Okamura, D. Mechanisms of germ cell specification in mouse embryos.
BioEssays 27, 136-143 (2005).

(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）