

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生物の発生・分化・再生」

研究課題「生殖細胞形成機構の解明と

その哺乳動物への応用」

研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成18年3月

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)

1 研究実施の概要

ショウジョウバエとマウスに共通する生殖細胞形成機構の解明およびそれぞれの動物種に固有の機構を明らかにすることを目的とし、小林、相賀、松居グループで分担して研究を行ってきた(図1)。小林グループは、ショウジョウバエの生殖細胞形成に関わる遺伝子の同定、その機能解析を行ってきた。これらのうち、マウス始原生殖細胞においても発現していることが明らかとなった *nanos* 遺伝子に関しては、相賀グループがマウスの生殖細胞形成過程における機能の解析を行った。松居グループは、マウスの生殖細胞形成過程に関わる新規遺伝子の探索を行ってきた。このように、ショウジョウバエとマウス間の情報交換および研究分担が本チームの特徴である。各グループの研究実施内容の概略を以下に示す。

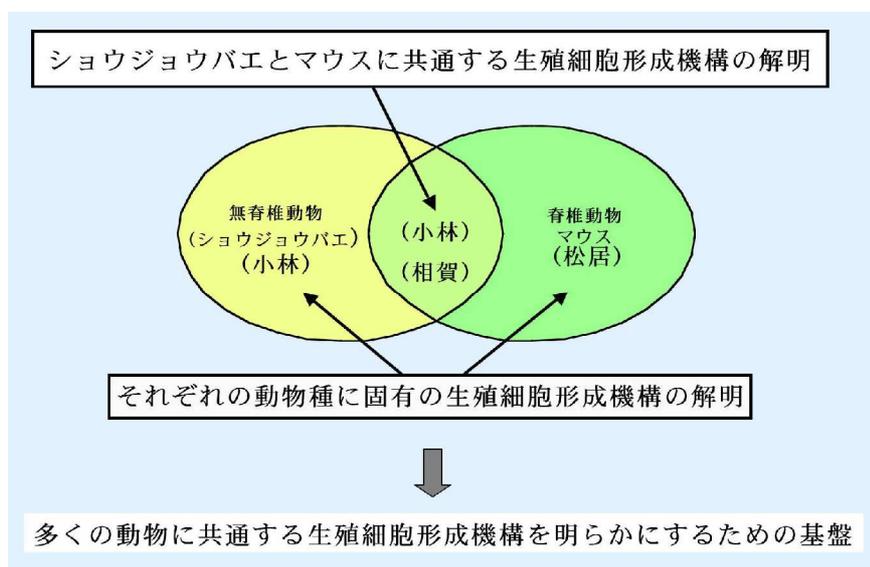


図1. 研究の分担体制

(小林グループ)

哺乳動物では、誘導により「後成的」に生殖細胞が形成されるのに対し、哺乳動物を除く多くの動物種では生殖質と呼ばれる特殊な細胞質が卵中に観察され、その細胞質に局在する母性因子の働きにより「前成的」に生殖細胞が形成される。ショウジョウバエでは、卵の後極に分布する生殖質(極細胞質)に局在する母性因子が生殖細胞の形成に必須であり、これを取り込んだ極細胞と呼ばれる細胞のみが、生殖巣に移動した後に卵や精子である生殖細胞に分化する。小林グループは、この生殖質中の母性因子の同定およびその機能解析を行い以下の成果を得た。

研究1 極細胞形成機構の解明

極細胞の形成に関わるミトコンドリア large rRNA (mtlrRNA) の機能等に関し、以下の諸点を明らかにした。

- ・ mtlrRNA は、ミトコンドリアのゲノムにコードされ、極細胞質中でのみミトコンドリアから極顆粒へと移送され極細胞形成に関わるが、この移送に Tudor タンパク質の働きが必須であることを見いだした。

- ・ 極細胞質にのみ存在する構造物である極顆粒上で、mtlrRNA とミトコンドリア small rRNA (mtsrRNA) は、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(原核生物)タイプのリボソームを形成することが明らかとなった。さらに、このリボソームによる翻訳が極細胞の形成に必要であること、このリボソームにより翻訳される候補 mRNA も明らかにした。以上の成果から、原核生物タイプの翻訳系がミトコンドリア外にも存在し、生殖細胞の形成に深く関わるという新たな概念を提出することができた。

研究2 極細胞中における Nanos タンパク質の機能解析

- ・ Nanos が、極細胞のアポトーシスを抑制することにより、極細胞を正常に生殖巣まで移動させるという「許容的」な機能を果たすことが明らかとなった。さらに、極細胞中で Nanos がアポトーシスに関与する遺伝子の機能を翻訳レベルで阻害することにより、アポトーシスを抑制していることも明らかとなった。

- ・ Nanos は極細胞中で体細胞性遺伝子の発現を阻害することにより、極細胞の体細胞分化を抑制していることが明らかとなった。

以上の結果から、Nanos タンパク質は、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示された。

研究3 生殖細胞の特質を決定する機構

- ・ クロマチンレベルでの転写制御因子として知られる BTB ドメインと Zn フィンガーを持つタンパク質をコードする新規遺伝子 (*sva53*) を単離した。母性 *sva53* 遺伝子の活性を欠く極細胞は、減数分裂が異常となるために子孫をつくることができない。さらに、*sva53* 遺伝子は卵形成過程で発現し、mRNA が極細胞質に強く偏在する。また、そのタンパク質は、極細胞にほぼ限局され、極細胞中で機能することにより減数分裂に関わることも明らかとなった。これらの成果は、減数分裂という生殖細胞の最も重要な特質を制御する母性因子を同定した初めての例である。

- ・ 単離した極細胞で発現する遺伝子のマイクロアレイ解析をおこなった。その結果、約 200 種類が母性 RNA として初期の極細胞に限局され、約 300 種類が極細胞中で選択的に転写されることが明らかとなった。また、単離した胚生殖巣の EST 解析も終了している。現在、これら遺伝子の機能解析が進行中であり、本成果が生殖細胞の運命決定機構を解析する上での重要な基盤になると考えられる。

(相賀グループ)

ショウジョウバエで生殖細胞の形成に関わることが明らかになった遺伝子の相同遺伝子をマウスで単離しその機能解析を行うのが相賀グループの役割である。

マウスにおける *nanos* 相同遺伝子のうち *nanos2* は、精巣中の始原生殖細胞で特異的に発現していた。一方、*nanos3* の発現は、移動期の始原生殖細胞および胎生 14.5 日までの雌雄の始原生殖細胞に観察された。*nanos2* ホモノックアウトマウスでは、雄の精巣が著しく矮小化し、その精巣には精子が全く存在しないばかりか、精原細胞も全く存在せず、セルトリ細胞のみが残存していた。*nanos3* ホモノックアウトマウスは雌雄ともにその生殖巣に異常が見られた。雄の精巣の表現型は、*nanos2* ノックアウトマウスと酷似し、精巣の矮小化と生殖細胞欠損を示した。また *nanos3* ノックアウトマウスでは雌の卵巣の矮小化と生殖細胞欠損も観察された。さらに、*nanos2* や *nanos3* ノックアウトマウスにおける生殖細胞の欠損の一因がアポトーシスであることを明らかにした。

以上の研究により、哺乳類であるマウスにおいても、ショウジョウバエと同様な生殖細胞の形成機構が存在することが明らかになった。

(松居グループ)

マウスにおける生殖細胞形成に関わる遺伝子の同定により以下の成果が得られた。

・マウスの生殖細胞は、多能性幹細胞から分化する。多能性幹細胞集団である胚盤胞の内部細胞塊では発現が低い、始原生殖細胞で形成期から特異的に発現する遺伝子として *mil-1*, *mil-2* を同定した。さらに、これら発現機構に関し、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、この部分は、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わかった。これら遺伝子の発現制御機構の解析から、始原生殖細胞の分化運命決定に関わる転写制御を今後明らかにできると思われる。

・始原生殖細胞の分化決定機構を明らかにするために、これまでに初期胚に存在する多能性幹細胞集団であるエピブラストからの始原生殖細胞形成を再現できる初代培養系を確立した。この培養系を用いた解析から、E-カドヘリンを介した細胞間相互作用が始原生殖細胞への分化決定に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

・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。本研究では、減数分裂前期の生殖細胞で特異的に発現する新規遺伝子 (*Meisetz*) を同定した。この遺伝子は、ヒストン H3K4 をメチル化する活性を持ち、その活性に依存した遺伝子のトランスアクティベーション活性も持つことが明らかになった。さらに、*Meisetz* のホモ変異マウスでは雌雄ともに生殖能力がなく、減数分裂のパキテン期以降の分化が進まず、生殖細胞が細胞死を起していることがわかった。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遺伝子の発現を制御していると考えられる。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究開始時における研究構想では、研究1から4までの研究をほぼ同時進行する形で5年間の研究計画を立案した。その中でも特に、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、その機能解析を行なうこと(研究4)を研究の柱としていた。以下に研究計画の概要を各研究ごとに記す。

研究1: 極細胞形成機構の解明

本研究では、極細胞形成に関わることが明らかとなっていた mtIrrNA の機能解析を中心に解析を行ってきた。特に、1) mtIrrNA がミトコンドリア・タイプのリボソームを形成するか、2) この翻訳システムによって翻訳される mRNA を同定し、それが極細胞形成に関わっているか、3) ミトコンドリア・タイプの翻訳系を阻害する抗生物質で処理した場合に、ターゲット mRNA の翻訳が影響を受けるかを明らかにすることを計画していた。これら課題について期待される成果を得ることができた(研究成果の項参照)。

研究2: 極細胞内でおこる遺伝子発現抑制機構

この研究は、「極細胞中における Nanos タンパク質の機能解析」というタイトルで研究成果を後述する。当初、本研究では、体細胞に分化しないように遺伝子発現をサイレントな状態に維持する機構に関わる Nanos タンパク質の機能解析を計画していた。具体的には、Nanos を欠如させた極細胞が体細胞に分化するか否かを明らかにする予定であった。この課題に関して期待通りの成果を得ることができた。さらに、研究の過程で Nanos がアポトーシスの抑制に関わることも明らかとなり、この制御機構を明らかにする研究を追加した。最終的には、この研究から、極細胞の運命決定機構の一端を明らかにすることに成功した(研究成果の項参照)。

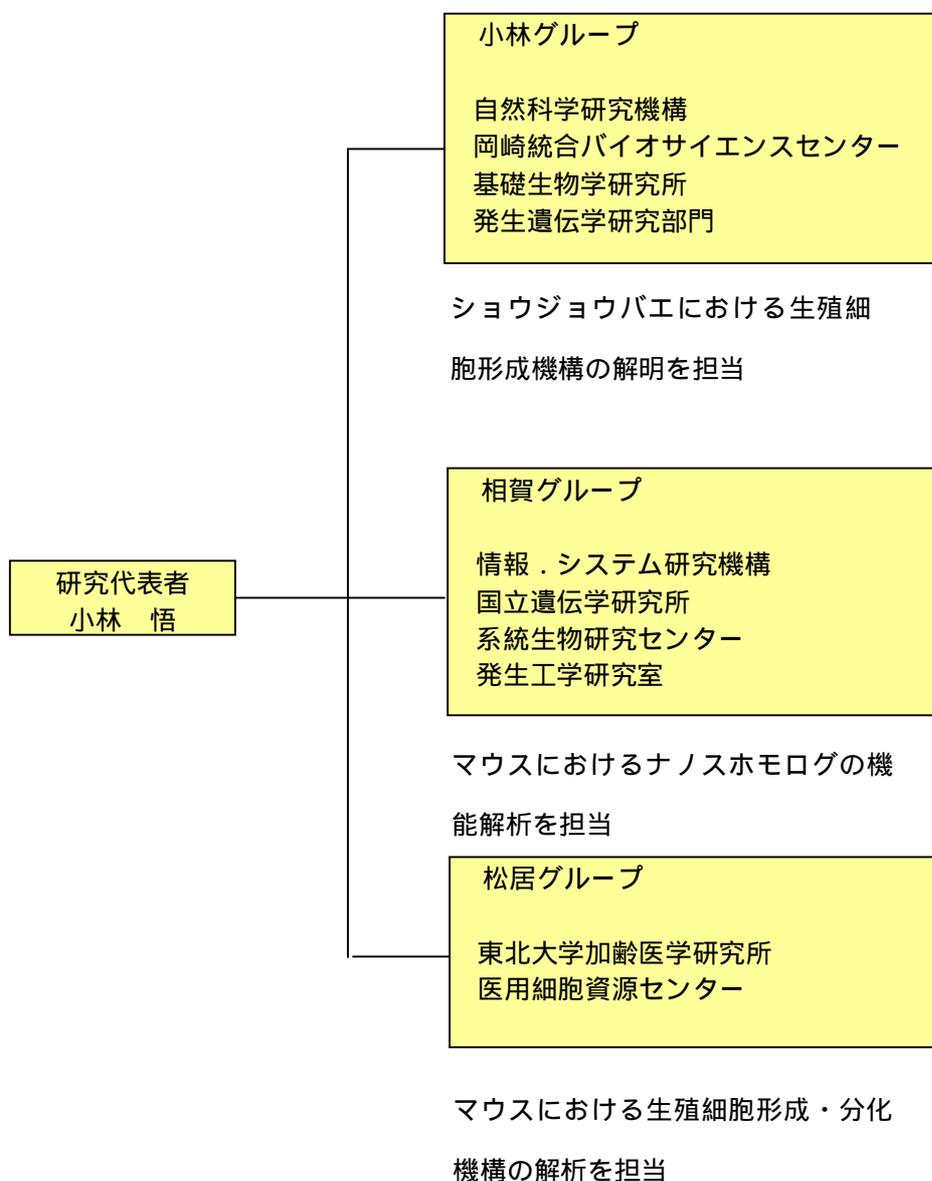
研究3: 生殖細胞の特質を決定する機構

本研究では、生殖細胞の分化の引き金を引く instructive な働きをする因子を単離・同定することを計画していた。この目的のために、極細胞質に存在し極細胞に取り込まれ極細胞中で減数分裂を制御する因子の存在を示唆する結果が得られていたので、1) この因子をコードする遺伝子の単離同定、2) この因子の分子機能の解析を行なう予定であった。最終的に、この因子をコードする遺伝子を同定することに成功し、詳細な機能解析を継続中である。さらに、3) 生殖細胞特異的な遺伝子カスケードを明らかにする目的で、単離した極細胞をもとに cDNA ライブラリーを作成し、EST 解析することも計画していたが、これに関しても十分な成果を得ることができた(研究成果の項参照)。さらに、単離した極細胞で発現する遺伝子の網羅をマイクロアレイを用いて解析する研究を新たに追加し、成果を得ることができた。

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

本研究では、1) *nanos* 遺伝子のホモログをマウスで単離し、その機能解析をノックアウトマウスを用いて行なうこと、2) マウスにおいて生殖細胞の決定に関わる新規遺伝子の単離を計画していた。当初、1)の研究が主眼であったが、両研究において画期的な成果を得ることに成功した(研究成果の項参照)。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構の解明(研究1〜3)

(岡崎統合バイオサイエンスセンター 小林グループ)

(1)研究実施内容及び成果

哺乳動物を除く多くの動物種において、生殖質と呼ばれる特殊な細胞質が卵中に観察される。ショウジョウバエでは、生殖質に局在する母性因子が生殖細胞の形成に必須であり、これを取り込んだ極細胞と呼ばれる細胞のみが、生殖巣に移動した後に卵や精子である生殖細胞に分化する。小林グループは、この生殖質中の母性因子の同定およびその機能解析を行ってきた。本グループの最終的な目標は、この母性因子の同定とそれにより極細胞内で引き起こされる遺伝子発現を明らかにすることである。これにより、生殖系列としての運命決定機構が明らかになると期待できる。以下に現在までの研究の成果を記す。

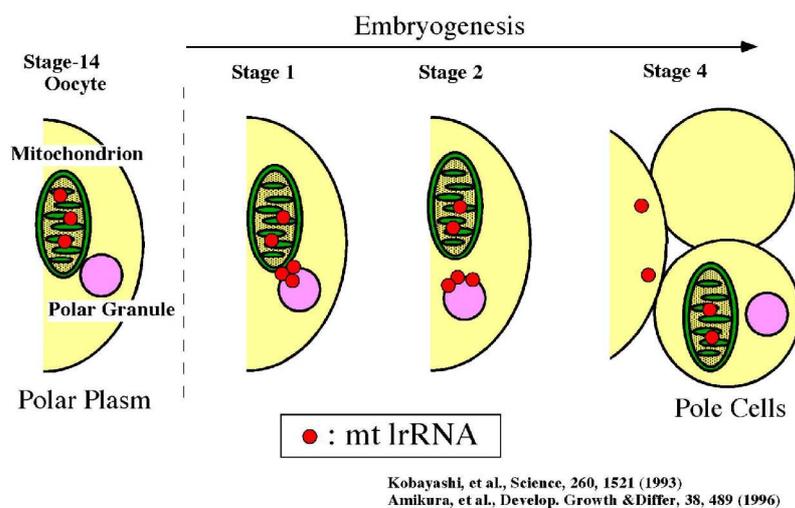


図2. 卵母細胞および初期胚における mt lrrRNA の分布を示す模式図 詳細は本文参照

a) 極細胞形成機構の解明(研究1)

ショウジョウバエにおける生殖細胞形成過程の最初のステップは、極細胞の形成である。極細胞形成に必須な母性因子は、生殖質(極細胞質)に局在することが明らかとなっている。これらの母性因子の1つとしてミトコンドリアのリボソーム大サブユニットを構成する rRNA (mtlrrRNA)が同定されていた。この分子は、紫外線照射により失われる極細胞を形成する能力を回復させる分子として同定された。さらに、mtlrrRNA を特異的に切断・分解するリボザイムを正常胚に注入することにより、極細胞形成が阻害されることも明らかとなっていた。以上の結果は、mtlrrRNA が極細胞形成に必須であることを示

している。本研究では、mtlrRNA の機能等に関し、以下の諸点を明らかにした。

- ・ mtlrRNA は、ミトコンドリアのゲノムにコードされ、極細胞質中でのみミトコンドリアから極顆粒へと

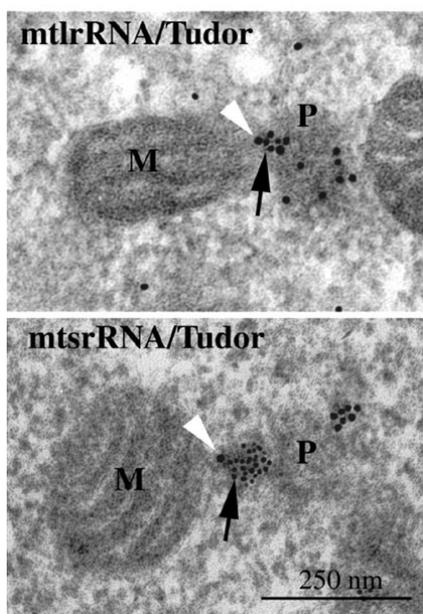


図3. mtrRNAs と Tudor タンパク質の共局在
産卵直後の胚の極細胞質において、mtlrRNA (上段)
および mtsrRNA (下段) (矢印で示す小さい金粒子のシ
グナル) は、Tudor タンパク質 (矢尻で示す大きい金
粒子のシグナル) とともにミトコンドリア (M) と極
顆粒 (P) の接点に共局在する。

移送され、極細胞形成に関わる(図2)。このミトコンドリアから極顆粒への移送に、Tudor と呼ばれるタンパク質の働きが必須であることを見いだした。tudor は、極細胞形成に関わる遺伝子の一つとして同定された。Tudor タンパク質は、極顆粒の構成分子の一つであり、ミトコンドリアにも分布するというユニークな性質を持つ。tudor 遺伝子の機能が減少した突然変異胚における mtlrRNA の分布を調べたところ、極顆粒上にこの分子は見いだされなかった。また、後述するように、ミトコンドリア small rRNA (mtsrRNA) もミトコンドリアから極顆粒へと移送されるが、この分子も tudor 突然変異胚において極顆粒上に検出されなかった。さらに、産卵直後の正常胚においてミトコンドリアから極顆粒へと mtlrRNA および mtsrRNA が移送される時に、これら RNA と Tudor タンパク質が共局在することも明らかとなった(図3)。これらの結果から、Tudor タンパク質が、mtrRNAs のミトコンドリアから極顆粒への移送に関与することが明らかとなった。

- ・ 極顆粒は、極細胞質にのみ存在する構造物であり、極細胞形成に関わる RNA を蓄積し、それら RNA の翻訳の場として機能すると考えられてきた。本研究により、mtlrRNA と mtsrRNA は、ミトコンドリアのリボソーム・タンパク質とともに、極顆粒上でミトコンドリア(原核生物)タイプのリボソームを形成することが明らかとなった(図4、5)。これは、動物細胞においてミトコンドリア外に原核生物タイプのリボソームが存在することを示した最初の例である。

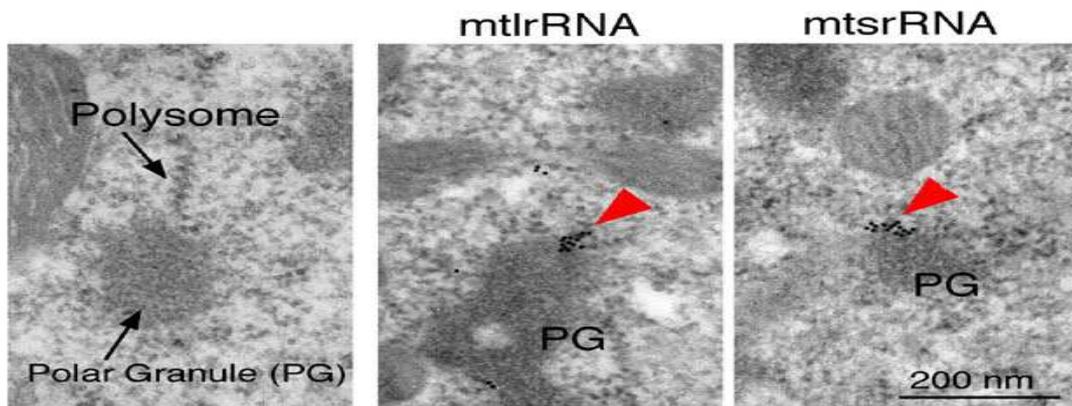


図4. 極顆粒上における mtrRNAs の分布
 極細胞形成直前の胚（ステージ2）の極細胞質中において mtlrRNA および mtsrRNA は、極顆粒（PG）上に形成されるポリソームに分布する。

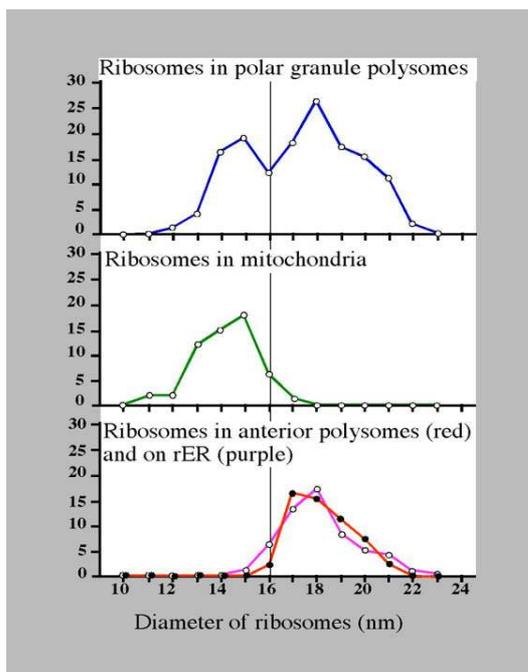


図5. 極顆粒上のポリソーム中に観察されるリボソームの直径の分布
 極細胞形成直前の胚の極顆粒上のポリソーム中に観察されるリボソーム（上段）、ミトコンドリア中のリボソーム（中段）および極細胞質以外の領域（胚の前極）のポリソーム中のリボソームの直径を横軸に、縦軸に頻度を示す。極顆粒上のポリソーム中には直径が小さいミトコンドリア・タイプのリボソームが含まれる。

・ 上記の結果より、極顆粒上に形成されたミトコンドリア・タイプのリボソームにより極細胞形成に関わるタンパク質が合成されるものと予想できる。この点を明らかにするために、原核生物タイプの翻訳を特異的に阻害する翻訳阻害剤として知られるカスガマイシンおよびクロラムフェニコールを初期胚

に微量注射し、極細胞形成に対する影響を調べた。その結果、これらの阻害剤の注射により極細胞形成が阻害されること(図6)、さらに、翻訳の開始反応を阻害するカスガマイシン処理により極顆粒上のミトコンドリア・タイプのリボソーム数が有意に減少することが明らかとなった(図7)。これらの結果は、極顆粒上のミトコンドリア・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示している。

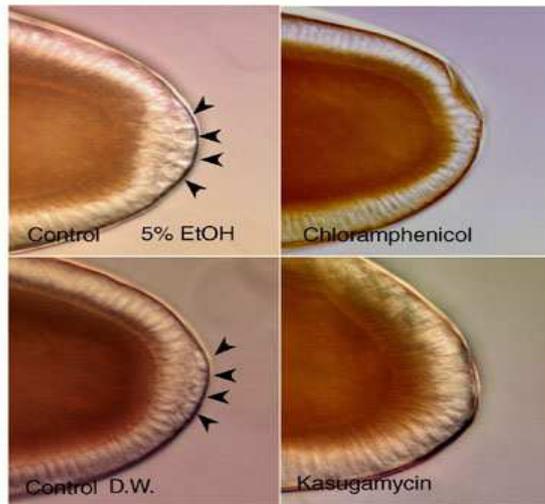


図6. 原核生物タイプの翻訳阻害剤処理による極細胞形成の阻害
極細胞形成に先立つステージの胚の後極にクロラムフェニコール、カスガマイシンを微量注射すると極細胞形成が阻害される。コントロール胚の後極には正常に極細胞(矢尻)が形成されている。

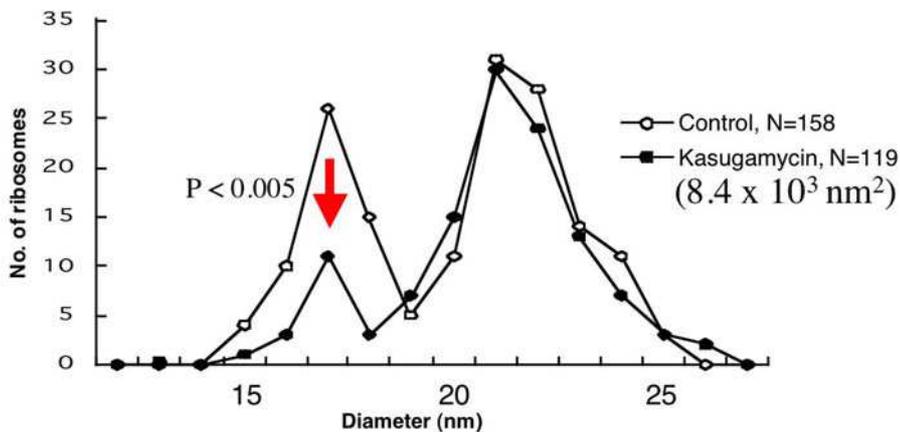


図7. カスガマイシン処理胚におけるミトコンドリア・タイプのリボソームの減少
カスガマイシンの微量注射により、極顆粒上のポリソーム中に観察されるミトコンドリア・タイプのリボソーム(直径の小さいもの)の頻度が減少する。

・ 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候補 mRNA として、極細胞の形成に関わるタンパク質をコードする *germ cell-less (gcl)* RNA が挙げられる。本研究では、この RNA が極顆粒に局在すること、上記の阻害剤処理により Gcl タンパク質の量が減少することが明らかとなった。

以上の成果から、原核生物タイプの翻訳系がミトコンドリア外にも存在し、生殖細胞の形成に深く関わるという新たな概念を提出することができた(図9)。

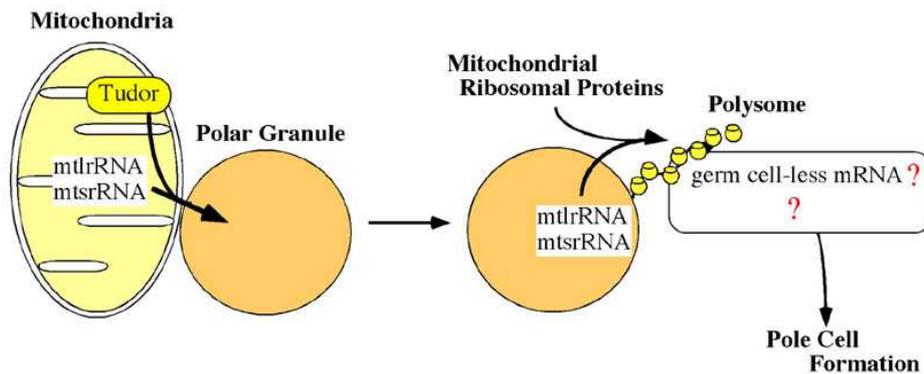


図9. mtrRNAs の挙動を示す模式図 詳細は本文参照。

b) 極細胞中における Nanos タンパク質の機能解析(研究2)

mtrRNAs は極細胞形成のみに関わる分子であり、形成された極細胞の発生過程には別の母性因子が関与する。私たちは、そのような母性因子の一つとして Nanos タンパク質を同定していた。*nanos* RNA は極細胞質に局在し、受精後にその翻訳が開始され Nanos タンパク質が産成される。Nanos タンパク質は、極細胞に取り込まれ、少なくとも極細胞が生殖巣に取り込まれるまで極細胞中に検出される。本研究では、極細胞中における Nanos の機能に関し、以下の諸点が明らかとなった。

・ Nanos の機能を欠く極細胞 (*nanos* 極細胞) は生殖巣に取り込まれないことから、当初 Nanos は極細胞の移動に必須であると考えられていた。本研究では、*nanos* 極細胞がアポトーシスにより細胞死をおこすこと、このアポトーシスを抑制すると極細胞はほぼ正常に生殖巣に取り込まれることが以下のように明らかとなった。まず、*nanos* 極細胞は、中腸壁を通り抜け体腔内に移動する時期から、徐々にアポトーシスにより細胞死をおこす(図10)。Nanos を欠き、かつアポトーシスに必須な遺伝子を含む染色体領域(H99)を欠く極細胞 (*nanos*-H99 極細胞) では、このアポトーシスが完全に抑制される。さらに、*nanos*-H99 極細胞の発生運命を調べたところ、正常な極細胞とほぼ同様に生殖巣に取り込まれることが明らかとなった(図11)。以上の結果から、Nanos が極細胞のアポトーシスを抑制することにより、極細胞を正常に生殖巣まで移動させるという「許容的」な機能を果たすことが明らかとなった。

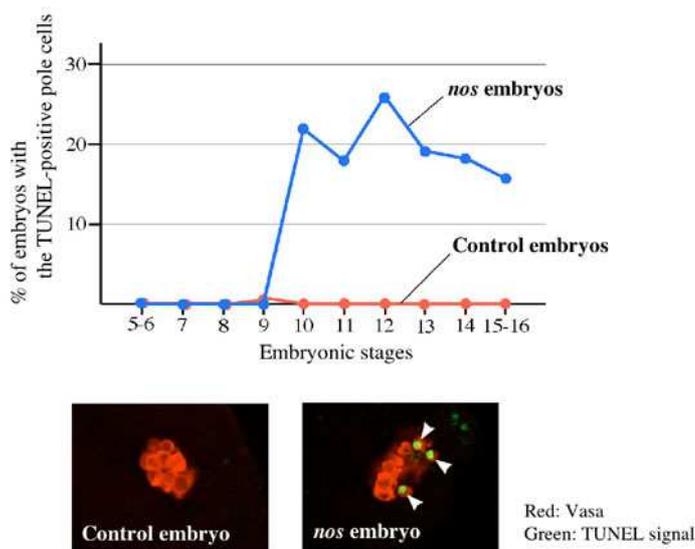


図 10 . Nanos を欠く突然変異胚における極細胞のアポトーシス TUNEL シグナル陽性の極細胞を持つ胚の割合 (上段) および TUNEL シグナル陽性極細胞の写真 (下段) を示す。

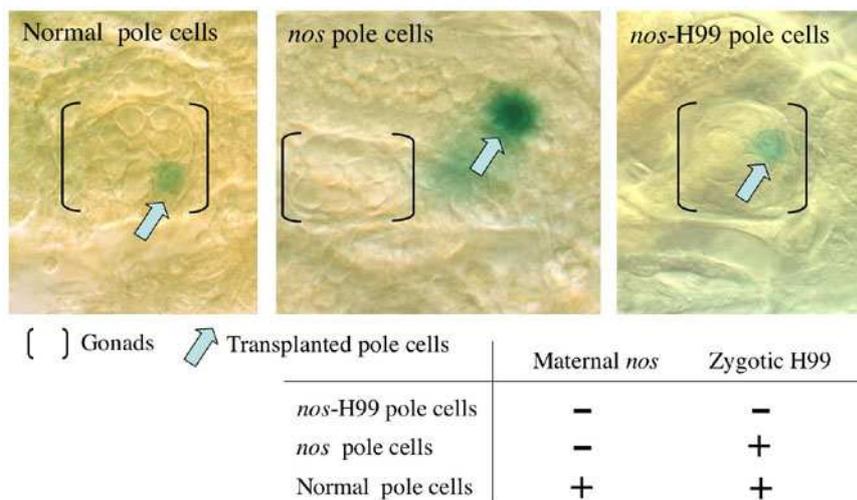


図 11 . nanos-H99 極細胞の発生運命

正常 (左図) Nanos を欠く極細胞 (中央) および *nanos*-H99 極細胞を正常胚に移植し、その挙動を追跡した。図中緑に染色されている細胞は、移植された極細胞、括弧で囲んである組織は胚生殖巣を示す。

・極細胞中において、Nanos によりアポトーシスが抑制される機構に関し以下の点が明らかとなった (未発表)。Nanos は、CCHC 型の Zn フィンガーを持つ RNA 結合タンパク質であり、Pumilio タンパク質とともに、NRE (Nanos Response Element) と呼ばれる RNA 配列に結合し、その配列を持つ mRNA

の翻訳を特異的に抑制することが知られていた(図13)。前述したように、*nanos* 極細胞のアポトーシスは、H99 染色体領域の欠失により抑制されることから、この領域に含まれる遺伝子にコードされる

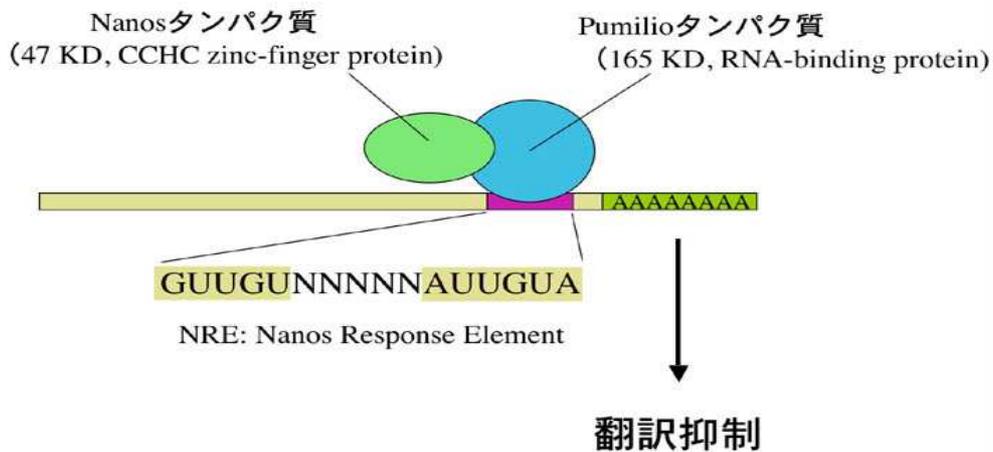


図13. Nanos および Pumilio による NRE 配列を介した翻訳抑制

mRNA が Nanos による翻訳抑制のターゲットとなっていると考えられる。探索の結果、H99 領域に含まれアポトーシスに関与する *head involution defective* (*hid*) 遺伝子によりコードされる mRNA 中に NRE 配列を見いだした。*hid* mRNA は極細胞中で発現し、その機能を突然変異により抑制すると、H99 同様 *nanos* 極細胞のアポトーシスが抑制される。さらに、NRE を欠失させた *hid* mRNA を極細胞中で発

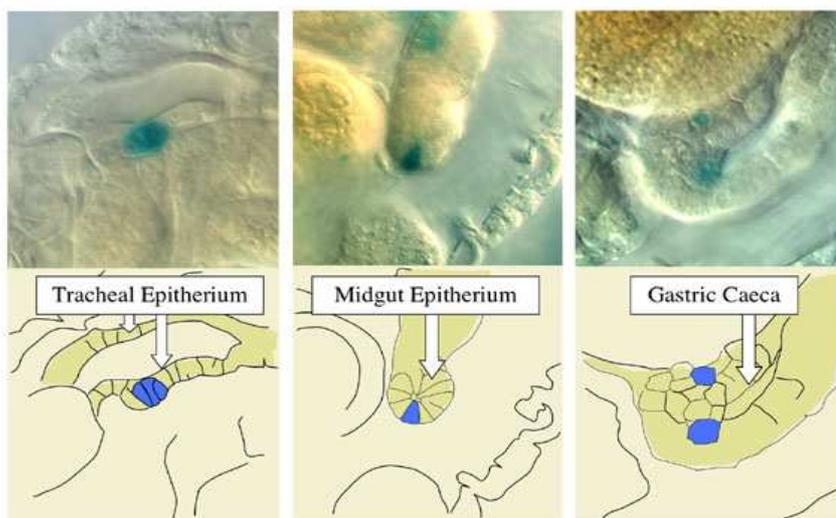


図14. *nanos*-H99 極細胞の発生運命

nanos-H99 極細胞は、生殖巣に取り込まれるだけでなく、その一部は気管壁(左図)、中腸壁(中央)や胃盲嚢(右図)といった体細胞組織に取り込まれる。移植した *nanos*-H99 極細胞は、緑に染色されており、周囲の体細胞と同様の形態をとっている。

現させると、極細胞のアポトーシスが Nanos により抑制できなくなることを示唆する結果も得られてい

る。以上の結果は、極細胞中で Nanos が *hid* mRNA の翻訳を NRE 依存的に阻害することにより、アポトーシスを抑制していることを示唆している。

・Nanos のもう一つのターゲットとして *importin- α 2* mRNA を同定した。この RNA は、母性 RNA として卵内に供給される。しかし、その 3' UTR 中に存在する NRE 配列依存的に Nanos により翻訳が阻害されるために、極細胞中でのみ Importin- α 2 タンパク質の産生が抑制される。このタンパク質は、Importin- α ホモログであり、転写因子などの核タンパク質の核移行に関わる。Nanos は、極細胞中で Importin- α 2 の産生を抑制することにより、転写因子の核移行を妨げ、体細胞性遺伝子の発現を阻害することが明らかとなった(未発表)。これは、生殖細胞中における体細胞性遺伝子の発現を抑制する機構を明らかにした初めての例である。

・以上の結果は、Nanos を欠く極細胞が体細胞に分化することを予想させる。この点を明らかにするために、*nanos*-H99 極細胞の発生運命を詳細に観察した。その結果、一部の *nanos*-H99 極細胞が体細胞組織に取り込まれていることが明らかとなった(図14)。この極細胞は、生殖細胞マーカーである *vasa* 遺伝子の発現を失い、逆に体細胞分化マーカーを発現する(図15)。さらに、この体細胞分化は、Importin- α 2 の機能を低下させると抑制されることも明らかとなった。これらの結果は、Nanos が Importin- α 2 の産生を阻害することにより、極細胞の体細胞分化を抑制していることを示している。

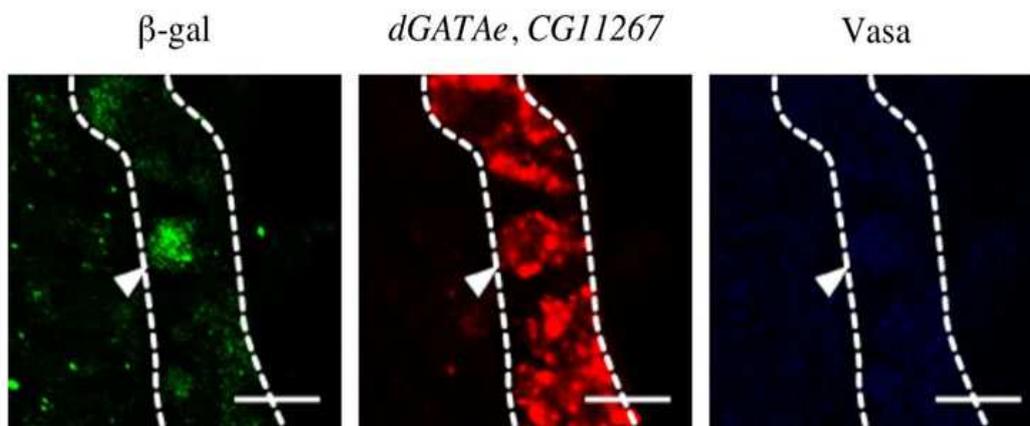


図15. 中腸壁に取り込まれた *nanos*-H99 極細胞におけるマーカー遺伝子の発現
移植マーカー(右図)、中腸分化マーカー(中央)および生殖細胞マーカー(左図)の発現を示す。

以上の結果を総合すると、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となった(図16)。この成果は、極細胞が潜在的には分化多能性であることを示した初めての例であり、極細胞の運命決定機構において Nanos が重要な役割を担っていることを明らかにすることができた。

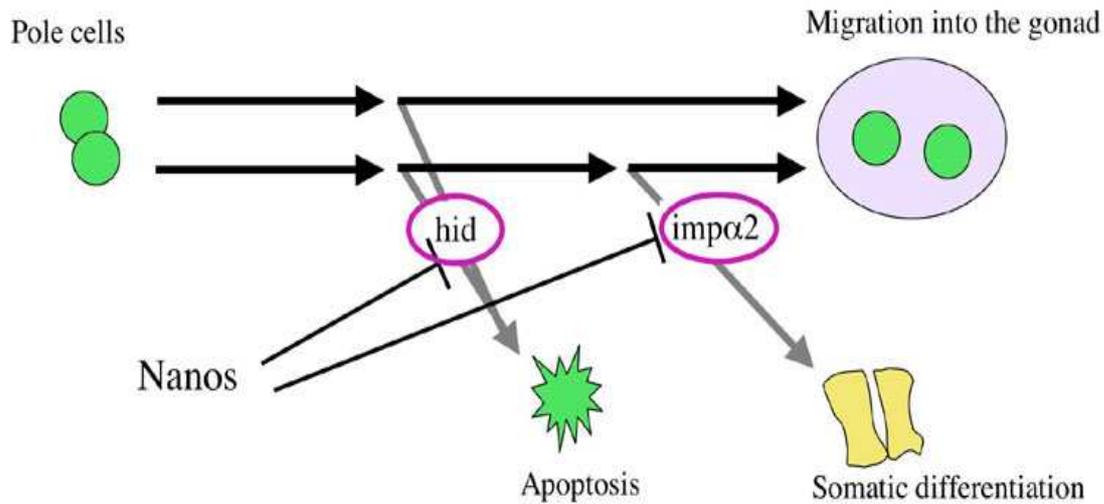


図 1 6 . 極細胞の発生運命決定機構における Nanos の役割

c) 生殖細胞の特質を決定する機構 (研究3)

Nanos は、極細胞の細胞死や体細胞性遺伝子の発現を抑制することにより極細胞の分化過程を正常に進行させるという許容的(permissive)な働きをする因子である。このことから、これら因子とは別に生殖細胞への分化の引き金を引く instructive な働きをする因子が存在すると考えられる。本研究では、そのような因子の同定を以下のように試みてきた。

・生殖細胞特異的な遺伝子発現の活性化に関わる母性因子の同定を突然変異を用いた遺伝学的手法により行ってきた。まず、極細胞中における *vasa* 遺伝子の発現が低下する第1染色体上の母性効果突然変異を1つ単離し、*sva53*と命名した。母性 *sva53* 遺伝子の活性を欠く極細胞は、減数分裂が異常となるために子孫をつくることができない。さらに、*sva53* 遺伝子は、卵形成過程で発現し、mRNA が極細胞質に強く偏在する。また、そのタンパク質は、極細胞にほぼ限局され、極細胞中で機能することにより減数分裂に関わることも明らかとなった。*sva53* 遺伝子はクロマチンレベルでの転写制御因子として知られる BTB ドメインと Zn フィンガーを持つタンパク質をコードすることから、極細胞中での遺伝子発現制御をおこなっていると考えられる(論文投稿中)。これらの成果は、減数分裂という生殖細胞の最も重要な特質を制御する母性因子を同定した初めての例であり、この分子機能の解析により生殖細胞への分化の引き金を引く機構が明らかになると期待できる。

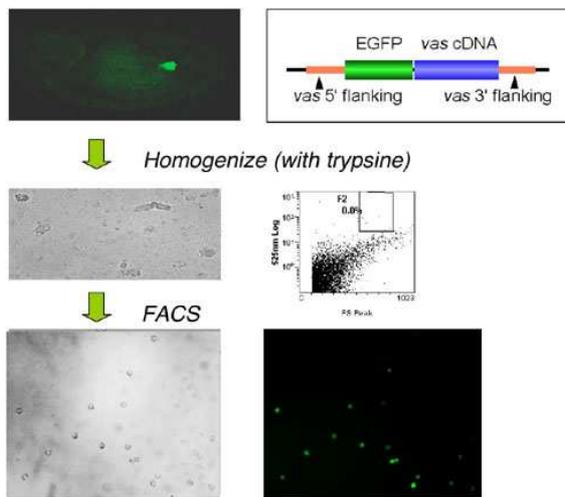


図17. 極細胞の単離
*vasa*プロモーターの下流にEGFPを融合した遺伝子を持つ胚(上段)をホモジエナイズし、FACSによりGFP蛍光を示す極細胞のみを単離した。

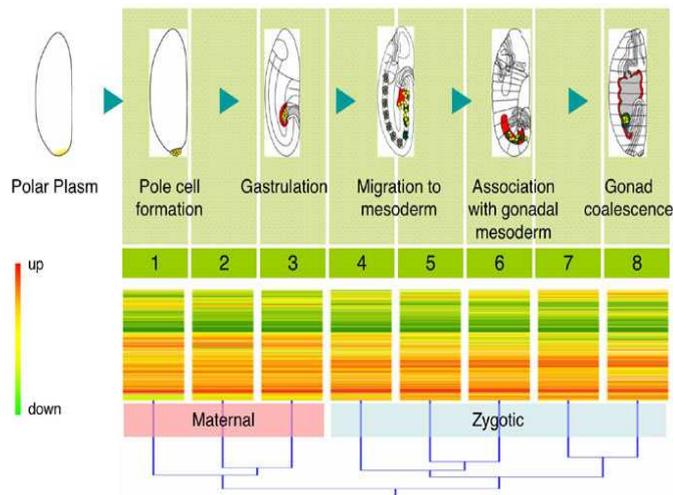


図18. マイクロアレイ解析

胚発生過程(模式図を上段に示す)を8つの段階に分割し、それぞれの胚からRNAを抽出したのちプローブとして用いた。下段は、マイクロアレイの結果をまとめたものである。ショウジョウバエのゲノム中に存在する全ての遺伝子の発現を示す(横一列は、全てのステージで同一の遺伝子の発現を示している)。赤は、胚全体に比べ極細胞中で高発現していることを示す。緑は、発現が低いことを示す。それぞれのステージでの全遺伝子の発現パターンをクラスタリングの手法で比較したところ、1-3のグループと4-8のグループに大きく分けることができた。これは、前者が極細胞に取り込まれた母性RNAによるもので、後者は極細胞中における胚性の遺伝子発現によるものと考えられる。

・生殖細胞への分化の引き金を引く母性因子は、極細胞中で生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化し、その発生運命を生殖細胞に局限すると考えられる。そこで、この遺伝子発現制御機構を明らかにする目的で、極細胞中に局在する母性因子と同時に生殖細胞特異的に発現する遺伝子の網羅的な同定を試みてきた。*vasa* 遺伝子のプロモーターの下流に GFP を連結させた融合遺伝子を持つトランスフォーマント系統の胚から、セル・ソーターにより極細胞のみを単離し、マイクロアレイ解析

をおこなった(図17)。この解析には、ショウジョウバエのゲノム上でタンパク質をコードする(予想されているものも含む)全ての遺伝子に対するプローブを含むカスタム・オリゴアレイを用いた。その結果、約200種類が母性RNAとして初期の極細胞に局限され、約300種類が極細胞中で選択的に転写されることが明らかとなった(図18)(論文作成中)。極細胞質および極細胞に局限される母性因子の大部分が母性RNAとして蓄えられていることから、この解析により生殖細胞形成に関わる母性因子の多くが網羅されていると考えられる。生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化する母性因子を同定するため、これら母性RNAのうち転写因子をコードするものに注目した。*in situ* hybridization法により極細胞質や極細胞に局限されることが明らかとなった34種類の転写因子をコードする母性RNAの機能解析をRNAi法を用いて行った結果、9種類のRNAの機能が*vasa*遺伝子の発現に必要であることが明らかとなった(未発表)。現在これら母性RNAの機能を詳細に解析している。転写因子をコードし、生殖細胞特異的な遺伝子発現に関与する母性因子の同定は他に報告がなく、生殖細胞の運命決定機構を解析する上での重要な基盤をつくると考えられる。

・本研究では、生殖細胞特異的な発現をする遺伝子を同定するために、単離した生殖巣からcDNAライブラリーを作成し、EST解析及び*in situ* ハイブリダイゼーションによる分布解析も行ってきた(論文作成中)。その結果、極細胞を含む生殖巣では少なくとも2900種類の遺伝子が発現しており、そのうち生殖巣特異的あるいは生殖巣と限られた体細胞器官でのみ発現するものが約100種類同定できた。このうち半数程度が極細胞で発現している。また単離した生殖巣を用いたショウジョウバエ全遺伝子マイクロアレイの解析によっても同様の結果が得られている。この成果は、上記マイクロアレイ解析とともに、生殖細胞の運命決定機構を解析する上での重要な基盤を形成すると考えられる。

・極細胞は、生殖巣を構成する体細胞とともに胚生殖巣を構成する。この過程は生殖細胞の発生に不可欠であるが、その過程における極細胞と体細胞の相互作用等は十分に明らかになっていない。私たちは、単離生殖巣を出発点としたESTおよびマイクロアレイ解析から、胚生殖巣中でシグナル伝達に関わる遺伝子群が多く発現していることに気づいた。そこで、それらのうち、レセプター型チロシン・キナーゼをコードする*sevenless(sev)*に注目し、その機能解析を行ってきた(論文作成中)。その結果、*sev*は、胚生殖巣後方の体細胞で発現し、その領域に生殖幹細胞ニッチが形成されるのを阻害していることが明らかとなった。すなわち、*sev*は生殖幹細胞ニッチを胚生殖巣の前端に局限する機構に関わる。これは、生殖幹細胞ニッチ形成機構の一端を明らかにした初めての例である。さらに、*Sev*レセプターのリガンドを極細胞が発現していることも明らかとなり、極細胞から胚生殖巣へのシグナル伝達の初めての例となった。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究と関連が深い最近の研究のトピックスとして、「生殖細胞の前駆細胞(始原生殖細胞)内における体細胞性遺伝子の転写および体細胞分化抑制機構」を挙げることができる。この機能を担う分子として、ショウジョウバエでは、*Nanos*や*Pgc*、線虫では*Pie-1*、マウスでは*Blimp-1*が知られている。このうち、多くの動物の生殖細胞(始原生殖細胞)に共通して発現が見られるのは*Nanos*のみで

ある。本研究で明らかにすることができたNanosのターゲット分子およびそれらの機能は、ショウジョウバエのみならずマウスなどの動物におけるNanosの機能を明らかにする上での基盤となり、学術的な波及効果は大きい。一方、「生殖細胞分化の引き金を引く機構」は未解明の問題であった。マウスでも誘導により「後成的」に生殖細胞が形成されることは周知の事実であるが、その誘導と生殖細胞特異的な遺伝子発現を結ぶカスケードも未だ不明である。このような国内外の研究の流れの中で、生殖細胞の特質である減数分裂を制御する母性因子 Sva53 の発見および極細胞質に局在する母性RNA および極細胞中で発現する遺伝子の網羅的同定、さらに生殖細胞特異的遺伝子の活性化に関わる転写因子をコードする母性因子の同定といった本研究の成果は先導的であり、今後の研究基盤を形成するものである。すなわち、本研究で得られた成果は、ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構を明らかにする上で重要な位置を占めるだけでなく、ヒトを含めた多くの動物に共通する生殖細胞形成機構を解明する上でも基礎となると考えている。

3.2 マウスにおけるナノホモログの機能解析(研究4)

(国立遺伝学研究所 相賀グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ショウジョウバエで生殖細胞の形成に関わることが明らかになった遺伝子の相同遺伝子をマウスで単離しその機能解析を行うのが相賀グループの役割である。その解析に当たり、多くの遺伝子ノックアウト及びノックインマウスを作成し、特に *nanos2*, *nanos3* ノックアウトマウスの表現型は生殖細胞の完全欠損という非常に興味深い結果が得られたので、特許を申請し、またその論文は Science に発表されている。この研究期間に得られた主な成果を以下に記す。

・ マウスにおいて3種類の *nanos* 相同遺伝子 (*nanos1*, *nanos2*, *nanos3*) を単離し(図19)、それらの遺伝子ノックアウトマウスを作成した。

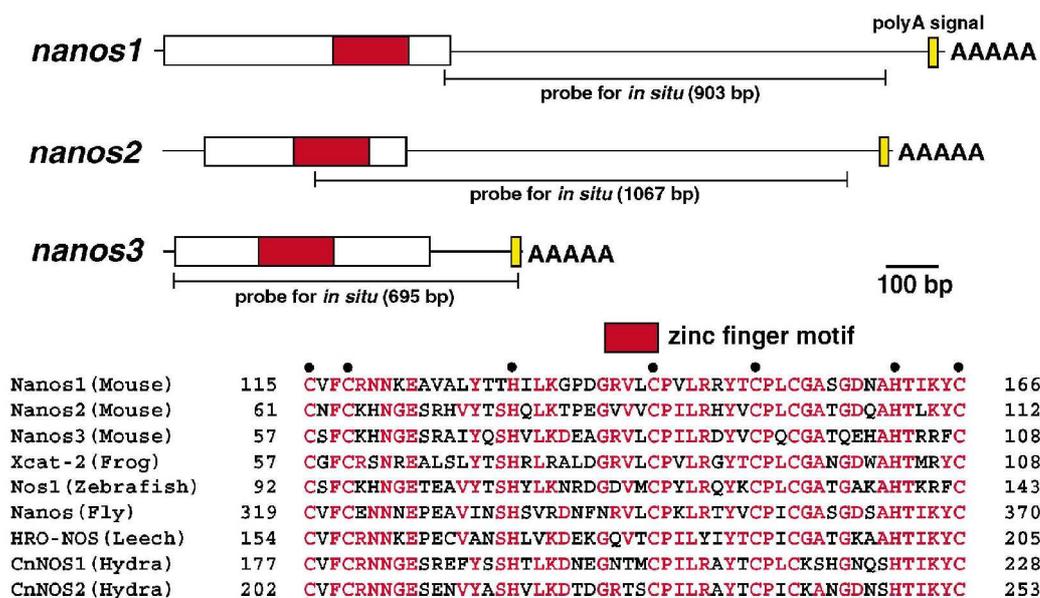


図19. 3種類のマウス*nanos* ホモログ (*nanos1*, *nanos2*, *nanos3*)

Nanos タンパク質は非常に良く保存された zinc finger motif をもっており(下図)、機能的にも重要な役割を担っていると考えられる。

・ *nanos1* は、生殖細胞ではなく中枢神経に発現しており、そのノックアウトマウスにおける異常は今のところ見いだされていない。

・ *nanos2* は、移動期の始原生殖細胞における発現は検出されなかったが、精巢中の雄の始原生殖細胞で特異的に発現しており、その発現も胎生 13.5-15.5 日の間一過的にみられた。一方、*nanos3* の発現は、移動期の始原生殖細胞および胎生 14.5 日までの雌雄の始原生殖細胞に観察された。またこれらの遺伝子は生後の精子形成過程において、未分化な精原細胞に発現しており、特

に興味深いことに、生殖幹細胞に発現している可能性が示唆された (図20) (論文投稿中)。

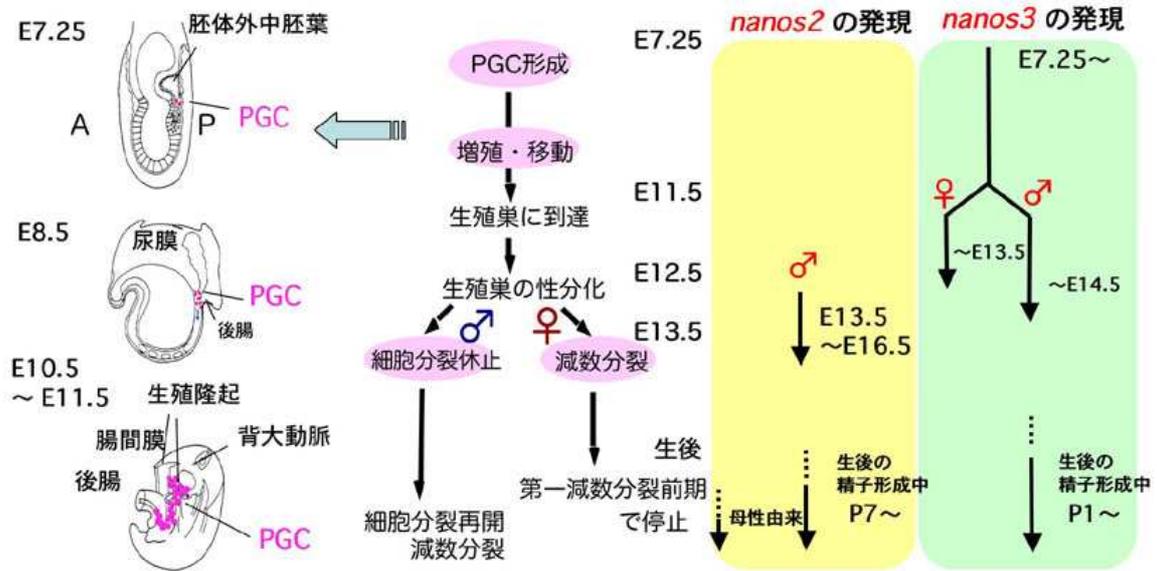


図 20、*nanos2* 及び *nanos3* 遺伝子の発現

nanos2 の発現は雄に特異的で、胎生期の精巣内の生殖細胞で発現し、その後減少する。生後に再び未分化な精原細胞に発現する。一方、*nanos3* は生殖細胞形成直後に発現が開始し、生殖巣に入った後発現が減少する。生後は *nanos2* 同様、未分化な精原細胞に発現する。

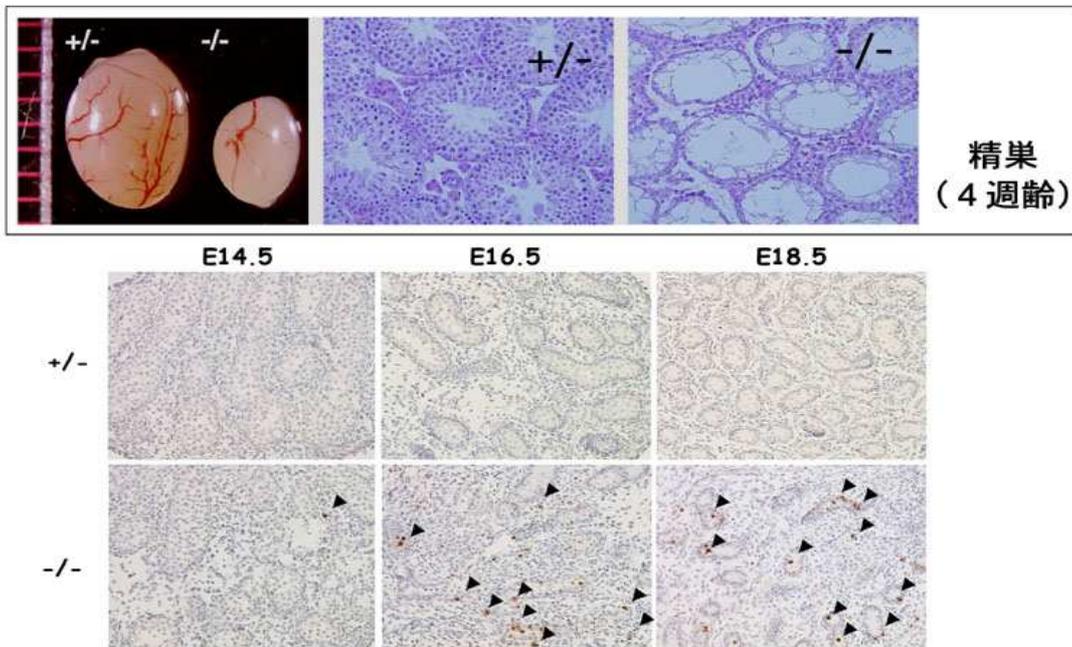


図 21 . *nanos2* ノックアウトマウスの解析

nanos2 ホモ変異マウスでは、雄において成体精巣の矮小化が認められ、その組織切片の観察により、精巣内の生殖細胞が消失していることがわかった。

- ・ *nanos2* ホモノックアウトマウスでは、雄の精巣が著しく矮小化し、その精巣には精子が全く存在しないばかりか(図21)、精原細胞も存在せず、セルトリ細胞のみが残存していた。この生殖細胞欠損は *nanos2* が最初に発現する直後、胎生約 15.5 日目から持続的に起こる生殖細胞特異的細胞死による。以上のことから、*nanos2* は精巣内における生殖細胞の維持に必要な遺伝子であることが明らかになった。さらに *nanos2* ノックアウトマウスにおける遺伝子発現を解析した結果、アポトーシス関連遺伝子の発現が亢進している以外に雄性生殖細胞のインプリンティングに重要な役割をはたすメチル化関連遺伝子の発現が消失していることが明らかになった。

- ・ *nanos2* の 3' -UTR が *nanos2* 自身の翻訳を制御している可能性を示唆する結果が得られたので、3-UTR を特異的に欠損するマウスを作成したところ、生後の精子形成過程に異常が見られ、実際に *nanos2* の翻訳制御に関与することが示された(論文投稿中)。

- ・ *nanos2* の発現が雄特異的であることから、体細胞からの誘導をうけて、生殖細胞の性を決定する遺伝子である可能性がある。そこで、その発現を制御するエンハンサーの解析を行ない、胎生期及び生後の発現に必要な最小領域を確定した。このエンハンサーは雄特異的に遺伝子を発現させるのに有用であるばかりでなく、今後このエンハンサーに結合する因子を探索することにより、体細胞からの誘導現象を分子レベルで解析することが可能になった。

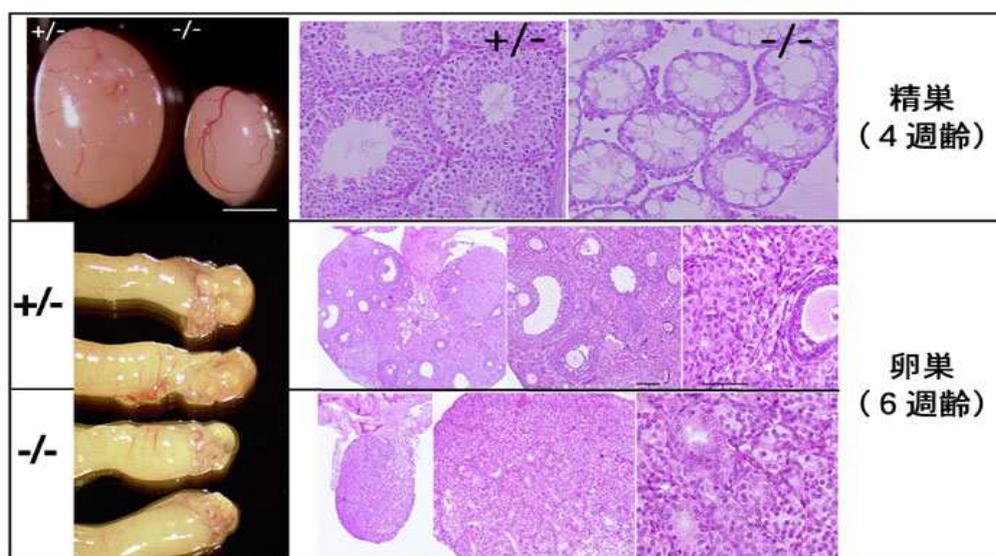


図22. *nanos3* ノックアウトマウスの解析

nanos3 ホモ変異マウスでは、成体の精巣および卵巢の矮小化が認められた。組織切片の観察により、精巣および卵巢内の生殖細胞が消失していることが明らかになった。

- ・ *nanos3* ホモノックアウトマウスは雌雄ともにその生殖巣に異常が見られた。雄の精巣の表現型は、*nanos2* ノックアウトマウスと酷似し、精巣の矮小化と生殖細胞欠損を示した。また *nanos3* ノックアウトマウスでは雌の卵巢の矮小化と生殖細胞欠損も観察された(図22)。胎生 12.5 日目においても雌雄ともに生殖細胞がほとんど欠損していることが明らかになった。さらに、移動期の始原生殖細胞は、

野生型マウスと同様に移動経路に存在していたが、その数は著しく減少していた。しかし、最初に形成される生殖細胞の数は、野生型とほぼ同数であり、*nanos3*は生殖細胞の形成そのものには必要ではないが、その後の移動過程における生殖細胞の維持に重要な役割をはたすことが示された(図23)。

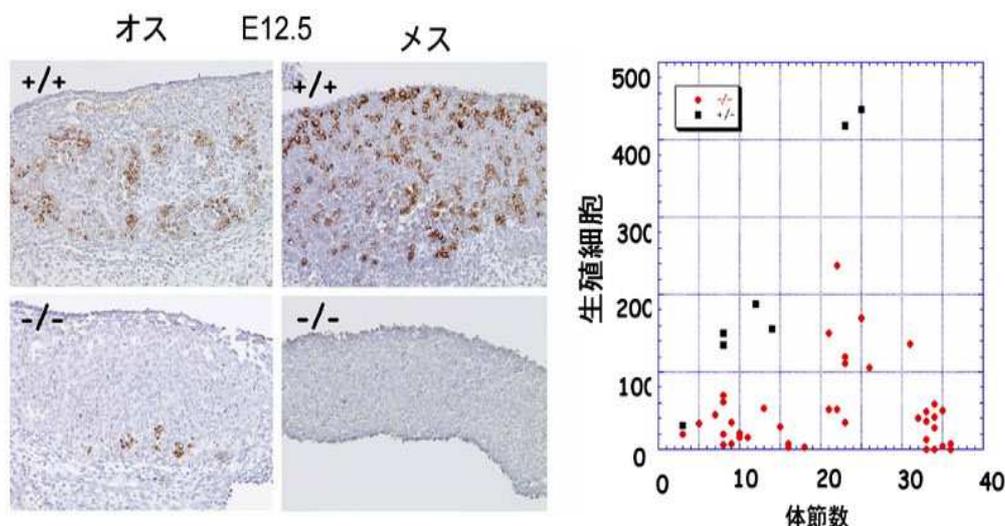


図23 . Nanos3 ノックアウトマウスの解析

*nanos3*ホモマウスにおいて、生殖細胞が生殖巣に達するころにはすでにその数が激減している。発生過程を追って調べた結果、最初に形成される生殖細胞の数は正常であり、その後増殖するものの、やがて完全に欠損する。この原因は、少なくとも *nanos2* 同様にアポトーシスによる可能性が示唆される。

・ *nanos3* を欠損した生殖細胞が消失する原因として、*nanos2* と同様に細胞死が起きていると仮定し、その検出とレスキュー実験を試みた。アポトーシス促進因子 *bax* と *nanos3* をダブルノックアウトしたマウスでは、少数の始原生殖細胞が生殖巣へ到達し、その後も維持されて、成体でも生殖細胞が存在することがわかった。このことから、*nanos3* ノックアウトマウスにおける生殖細胞消失の一因はアポトーシスであること、*nanos3* が Bax を介したアポトーシス経路を抑制していることが示唆された。この結果は、ショウジョウバエで小林らが観察した現象と非常によく似ており、*nanos* がなくてもアポトーシスを抑制するとわずかであるが生殖細胞に分化することから細胞死の抑制が *nanos* の機能として最も本質的なものであると考える。

以上の研究により、哺乳類であるマウスにおいても、ショウジョウバエと同様な生殖細胞の形成機構が存在することが明らかになった。

(2)研究成果の今後期待される効果

生殖細胞の操作は倫理的問題により、ヒトへの応用はまず考えられないが、生殖細胞の形成機構を明らかにすることにより、生殖細胞欠損(不妊)の原因遺伝子群の同定やそのモデルマウスの作成が可能である。これらの成果により今後の遺伝子診断が容易になり、また精子形成過程に関しては、培

養系での治療的な方法が確立される可能性がある。生殖細胞は体細胞と完全に異なった遺伝子発現機構を有し、体細胞への分化を常に抑制し、何か誤りが起こった際には、細胞は死滅する運命にある。基礎研究の面から論じると、この *nanos* 遺伝子は現在同定されている遺伝子のなかでも、唯一、生殖細胞に特異的に発現し、機能することが証明された遺伝子である。したがって進化の過程でも生殖細胞を形成する最も重要で基本的な遺伝子として維持されてきた可能性が高く、科学的なインパクトは大きい。さらに今後の基礎研究推進に関して、現在作成中の *cre* リコンビナーゼ発現マウスは生殖細胞特異的な遺伝子ノックアウトや、遺伝子発現に有用なマウス系統として、多くの研究者に有用であると確信する。

3.3 マウスにおける生殖細胞形成・分化機構（研究4）

（東北大学 松居グループ）

(1)研究実施内容及び成果

a) 細胞特異的遺伝子 *mil-1* の同定と発現制御機構の解析

マウスの生殖細胞は、着床前後の初期胚に存在する多能性幹細胞から分化する。その過程で、まず始原生殖細胞の前駆細胞が胚体外組織による誘導作用により形成され、原腸陥入が始まる時期にこの前駆細胞が細胞塊を形成し、始原生殖細胞への分化決定を受けると考えられる。

こういったマウスの生殖細胞形成・分化を制御する遺伝子を単離・同定することを目的に以下の実験を行った。まず移動期始原生殖細胞と胚盤胞を用いたサブトラクション cDNA スクリーニングを行った。その結果、多能性幹細胞集団である胚盤胞の内部細胞塊では発現が低いながら、始原生殖細胞で形成期から特異的に発現する遺伝子として *mil-1*, *mil-2* を同定した(図24)。次に *mil-1* 遺伝子の形成期始原生殖細胞での特異的な発現の制御機構を明らかにすることで、より上位で始原生殖細胞の分化運命の決定に働く分子を同定できると考え、*mil-1* 遺伝子近傍領域に GFP レポーター遺伝子

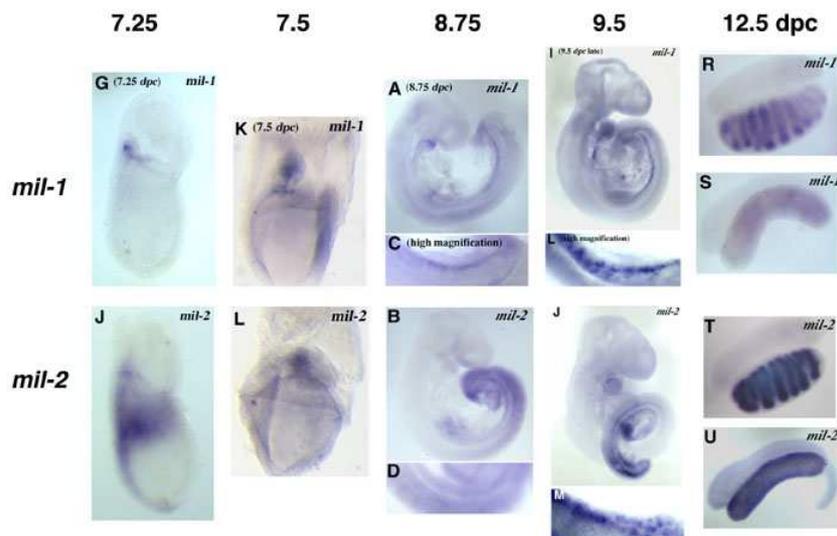


図24. *mil-1*および *mil-2*の始原生殖細胞における発現

mil-1 は 7.25 日胚の形成直後の始原生殖細胞から生殖巣内に至るまで特異的に発現している。
mil-2 は早い時期では周囲の細胞でも発現が見られ、特異性ははっきりしないが、9.5 日胚以降は始原生殖細胞で特異的な発現が見られる。

をつないだ融合遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作製し(図25)、発現制御領域を同定することを試みた。様々な長さの近傍領域を使って、特異的な発現の有無を調べた結果、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、この部分は、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わかった。

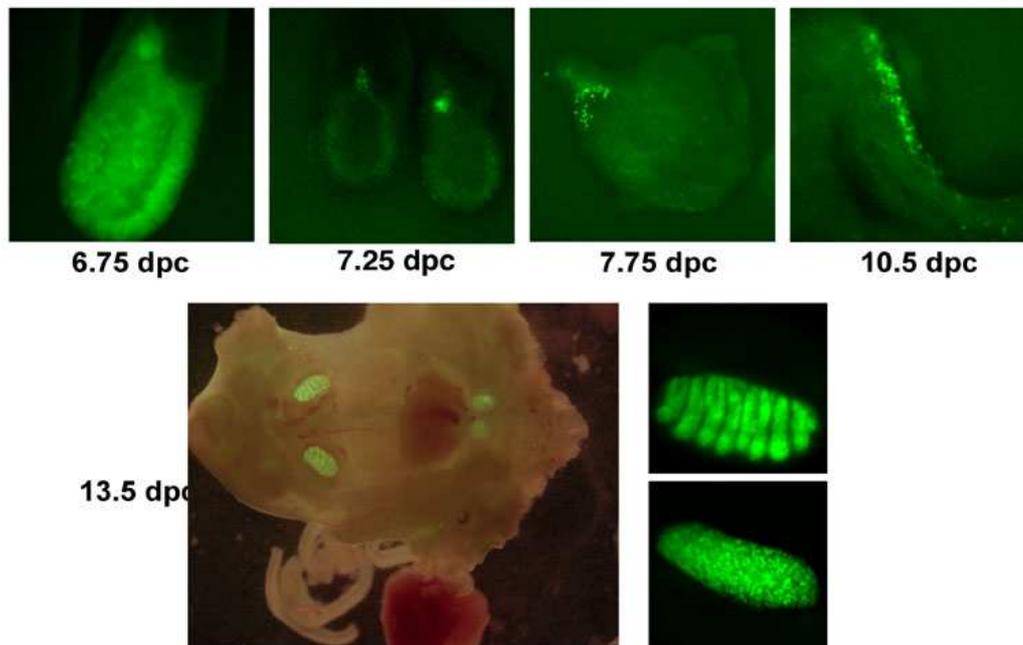


図 2.5. *mil-1*-GFP トランスジェニックマウス胚における GFP 発現
mil-1 遺伝子の上流領域 3kbp に GFP 遺伝子をつないだもので作成したトランスジェニックマウス胚における GFP の発現。6.75 日胚ではエピプラスト全体で GFP が発現しているが、前駆細胞クラスターではより強い発現が見られる。7.25 日胚で始原生殖細胞の分化が起こった以降は、移動期、生殖隆起内の始原生殖細胞で発現が見られる。

mil-1 遺伝子は英国の Surani らの報告した *fragilis* と同一の遺伝子だが、その発現制御はこれまで明らかにされていない。また、これまで *Oct3/4* 遺伝子の始原生殖細胞での発現制御に関する報告はあるが、この遺伝子の場合は形成期の始原生殖細胞では特異的な発現が見られず、周囲の未分化細胞でも発現している。これに対して、形成期の始原生殖細胞から特異的に発現する *mil-1* 遺伝子の発現制御の解析から、始原生殖細胞の運命決定に係わる転写制御を、今後明らかにできると思われる。

b) 始原生殖細胞形成における E カドヘリンの機能

始原生殖細胞の分化決定機構を明らかにするために、これまでに初期胚に存在する多能性幹細胞集団であるエピプラストからの始原生殖細胞形成を再現できる初代培養系を確立した。この培養系を利用して、以下のような実験により始原生殖細胞の分化決定機構を明らかにした。まず、始原生殖細胞の前駆細胞が分化決定を受ける時に胚内のどこに存在するかを、胚を断片化して培養することにより調べ、胚体外中胚葉に存在することを示した。次に胚体外中胚葉から始原生殖細胞が形成される過程を観察する目的で、始原生殖細胞で GFP の発現する *Oct3/4*-GFP トランスジェニックマウスの胚体外中胚葉断片を培養し、タイムラプス解析で GFP を発現する細胞の挙動を観察した。その結果 GFP 発現細胞は、培養開始後しばらくは細胞塊を形成し、その後、活発に移動する始原

生殖細胞に分化した。このことから分化運命の決定時に、始原生殖細胞の前駆細胞が細胞塊を作り相互作用をすることが重要であることが考えられた。さらに細胞接着分子 E-カドヘリンの発現を調べたところ、胚体外中胚葉内で始原生殖細胞の前駆細胞が形成する細胞塊で発現がみられ(図 26)、その阻害抗体を培養系に添加すると始原生殖細胞形成が阻害された(図 27)。この結果から、E-カドヘリンを介した細胞間相互作用が始原生殖細胞への分化運命決定に必須な役割を果たしていることが明らかになった(図28)。

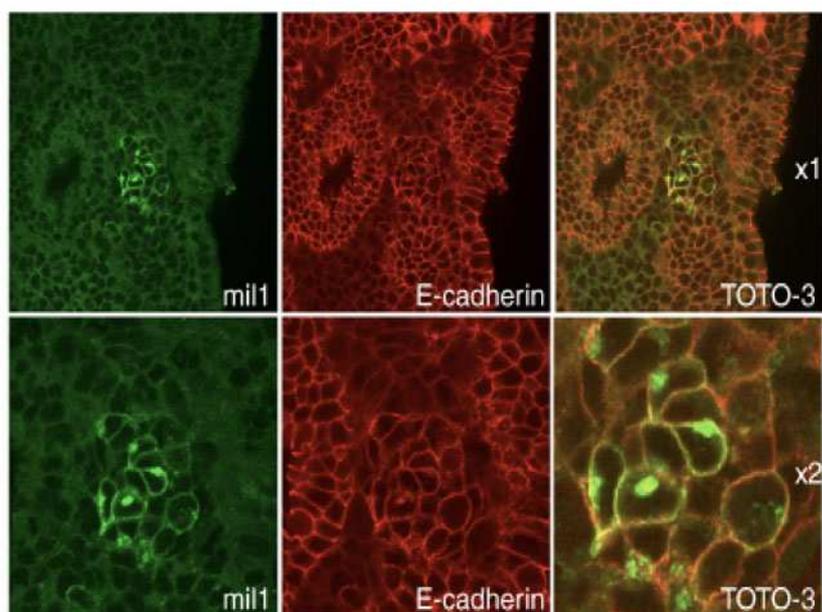


図 26 . 7.0 日胚の胚体外中胚葉での E カドヘリン, *mil-1* の発現
マウス始原生殖細胞の前駆細胞が形成する細胞クラスターでは、*mil-1* および E カドヘリンが発現している。

始原生殖細胞の前駆細胞が、分化決定に先立って細胞塊を作ることは Surani らも *fragilis* の発現パターンから報告していたが、この細胞塊のなかで E カドヘリンを介した細胞間相互作用が働いていることは、この研究により初めて明らかになった。

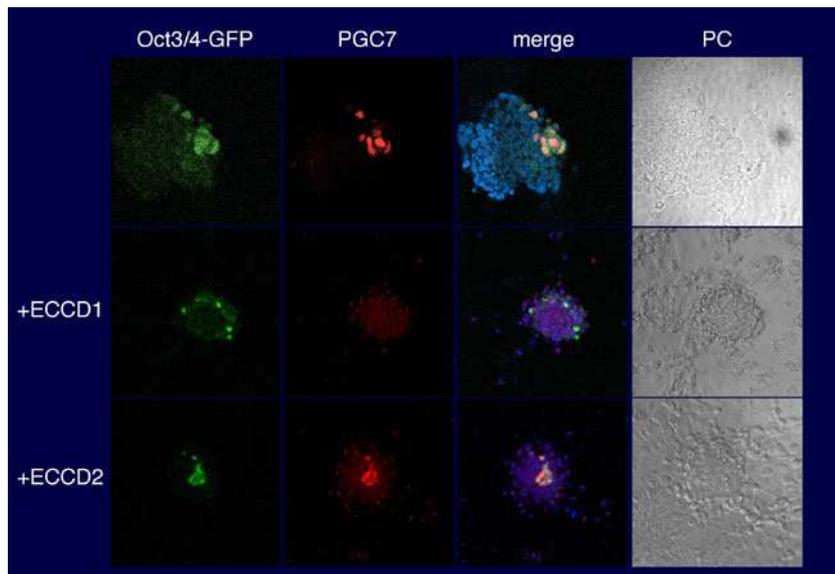


図 27. 阻害抗体による E カドヘリンの機能阻害
 始原生殖細胞の前駆細胞を培養すると、始原生殖細胞の分化が起こり、特異的なマーカーである PGC7 を発現するようになる（上段）。培養する際に、E カドヘリンの阻害抗体 (ECCD-1) を添加すると、分化が阻害される（中段）。阻害効果を持たない抗体 (ECCD-2) を添加した場合は分化が起こる（下段）。

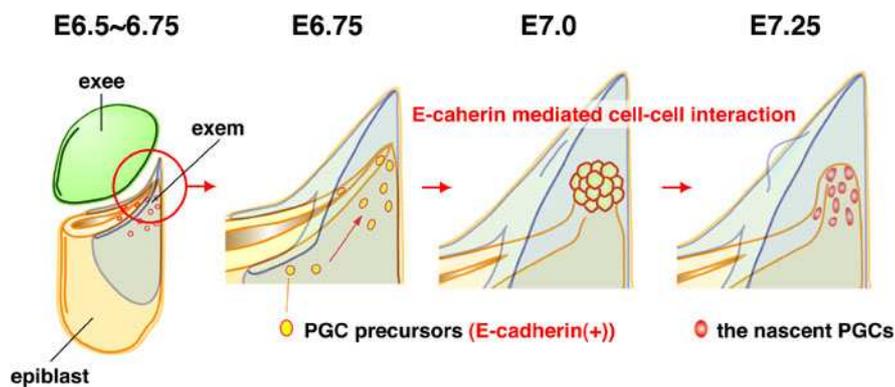


図 28. E カドヘリンに依存した細胞間相互作用による始原生殖細胞の分化決定
 始原生殖細胞の前駆細胞は、原腸陥入の開始とともに、胚の後端部分に移動し、細胞クラスターを形成する。クラスター内で、前駆細胞同士が E カドヘリンを介して相互作用し、これにより始原生殖細胞への分化決定がおこる。

c) 減数分裂前期で特異的に発現するヒストンメチル化酵素 Meisetz の同定と機能解析

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、減数分裂の開始や初期段階の進行を制御する分子を同定することを目的に、以下の実験を行った。

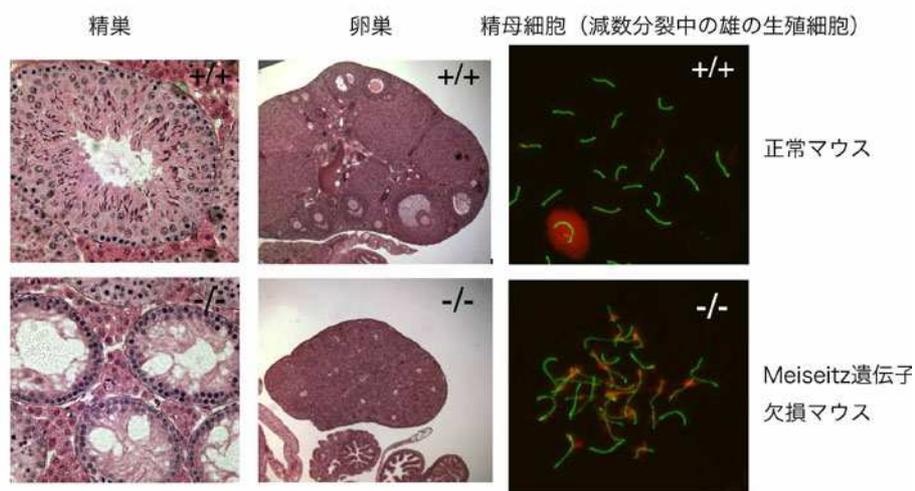


図 29. *Meisetz* 遺伝子欠損マウスにおける減数分裂の異常
Meisetz 遺伝子が欠損すると、雌雄ともに減数分裂前期のパキテン期で停止し(左、中)、このとき相同染色体の対合と相同組み換えが異常になる(右)。右の写真はパキテン期精母細胞を、シナプトネマコンプレックスに局在する Scp3 に対する抗体(緑)と、DNA 二本鎖切断部位に局在する gamma-H2AX に対する抗体(赤)で染色したものを示す。*Meisetz* 欠損マウスでは対合した染色体が枝分かれしたり、異常に結合したりしている。また、gamma-H2AX 陽性の DNA 切断部位がのこり、修復に依存した相同組み換えが起こっていないことがわかる。

減数分裂の開始とともに発現が上昇する遺伝子を同定するために、胎仔卵巣では 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ョン 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。得られた候補遺伝子の中で、減数分裂前期の生殖細胞で特異的に発現する *Meisetz* と名付けた遺伝子に注目して詳しい解析を行った。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ティ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、減数分裂のパキテン期以降の分化が進まず(図 29)、生殖細胞が細胞死を起こしていることがわかった。ま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(図 29)。さらに変異マウスの精母細胞の核内では H3K4 のメチル化が低下しており、また減数分裂に関わると考えられる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遺伝子の発現を制御していると考えられる(図30)。

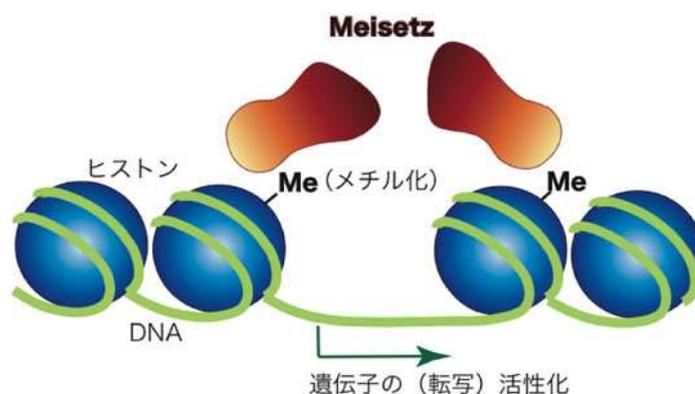


図30. Meisetzによる遺伝子活性化の模式図
MeisetzはヒストンH3K4のメチル化により、減数分裂前期におこる相同染色体の対合と相同組み換えに必要な遺伝子の発現を活性化する。

(2)研究成果の今後期待される効果

今後は、*mil-1*の始原生殖細胞での特異的な発現を制御する因子を同定すること、Eカドヘリンの働きに依存して始原生殖細胞の前駆細胞で発現が誘導され、分化決定を直接引き起こす分子を明らかにすることにより、始原生殖細胞の分化決定を制御する分子群の連携を解明することを目指す。また、Meisetzタンパク質の核内での局在や相互作用する分子を明らかにすることより、この研究で明らかにした遺伝子の転写活性化だけでなく、クロマチン構造の変換を介した減数分裂における染色体の挙動の制御といった、Meisetzの新たな機能を解明できることが見込まれる。これらの研究により、不明な点が多い生殖細胞の特性の形成・分化を制御する分子と、それらの作用機序の多くが解明され、生殖細胞とはどのような細胞なのかという問いに対して、より明確に答えうるようになることが期待できる。また、得られた知見を手がかりに、多能性幹細胞から生殖細胞への変換、さらには体細胞から生殖細胞への変換など、生殖系列細胞の機能を自由に制御する基盤技術の開発が期待できる。こういった技術は、再生医療、生殖医療、有用物質の生産、食用家畜の品種改良や品種保存、希少動物保存など、医療、畜産、環境など広い分野に、これまでにない新たな方法論を開拓し、大きな波及効果をもたらす可能性がある。

4 研究参加者

小林グループ(ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
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	研究計画総括	平成13年4月～
向 正則	同	助手	研究3	平成13年4月～
重信秀治	同	助手	研究3	平成13年4月～
野田千代	自然科学研究機構 基礎生物学研究所	技術職員	研究3	平成13年4月～
網蔵令子	(独)科学技術振興機構	CREST 研究員	研究1	平成13年4月～平成16年3月
佐藤仁泰	同	CREST 研究員	研究1	平成13年4月～
林 良樹	同	CREST 研究員	研究2	平成13年4月～
有田佳代	同	CREST 技術員		平成14年4月～
植田佳子	同	CREST 技術員		平成13年11月～
鈴木昌子	同	CREST 事務員		平成13年7月～平成16年8月
天野起代子	同	CREST 事務員		平成16年5月～平成16年6月
本多聡子	同	CREST 事務員		平成16年7月～
雲内浩平	筑波大学生命環境科学研究科	学生	研究1	平成13年4月～平成16年3月
北館 祐	総合研究大学院大学	D 3	研究3	平成13年4月～
林 誠	同	D 2	研究2	平成14年4月～
谷津 潤	同	D 2	研究3	平成16年6月～
前澤孝信	同	D 1	研究1	平成17年4月～
橋山一哉	同	D 1	研究3	平成17年10月～
土谷直美	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター	研究補助員		平成13年11月～
佐藤香織	同	研究補助員		平成15年5月～

相賀グループ(マウスにおけるナノスホモログの機能の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
相賀裕美子	国立遺伝学研究所	教授	研究4	平成12年10月～
原口清輝	滋賀医科大学	助手	研究4	平成12年10月～平成13年9月
三井 薫	国立遺伝学研究所	助手	研究4	平成16年4月～
浅岡美穂	同	助手	研究4	平成16年4月～
木曾 誠	同	技術職員	研究4	平成13年4月～
津田雅之	(独)科学技術振興機構	CREST 研究員	研究4	平成13年4月～平成17年3月
森本 充	同	CREST 研究員	研究4	平成17年4月～
笹岡由美子	総合研究大学院大学	学生	研究4	平成13年4月～平成16年3月
鈴木 敦	同	学生	研究4	平成16年4月～
藤井孝吉	同	学生	研究4	平成13年4月～平成16年3月
鈴木仁美	東京大学	学生	研究4	平成16年4月～

松居グループ(マウスにおける生殖細胞形成・分化機構の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
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	研究4	平成12年10月～
岡村大治	同	助手	研究4	平成13年4月～
林 克彦	同	研究員	研究4	平成15年4月～平成17年3月
田中 聡	同	研究員	研究4	平成13年4月～平成15年3月
谷口大史	同	技術員	研究4	平成16年4月～
佐藤 俊	(独)科学技術振興機構	CREST 研究員	研究4	平成13年4月～平成14年10月
山本美和子	大阪大学大学院	学生	研究4	平成13年4月～平成15年3月
関 由行	同	学生	研究4	平成14年4月～平成15年2月
永松 剛	同	学生	研究4	平成15年4月～平成16年10月
山口泰華	奈良先端大学院大学	学生	研究4	平成13年4月～平成15年3月
須槍 理	京都工芸繊維大学	学生	研究4	平成15年4月～平成16年3月
時武裕子	(独)科学技術振興機構	CREST 技術員		平成14年4月～
笠美由紀	大阪府立母子保健総合医療 センター研究所	研究補助員		平成13年4月～平成15年3月
瀧山由香里	(独)科学技術振興機構	CREST研究補助員		平成14年4月～平成17年3月

5 成果発表等

小林グループ

(1)論文発表 (国内 12 件、海外 16 件)

< 海外 >

- 1 . M. Kashikawa, R. Amikura and S. Kobayashi (2001) Mitochondrial small ribosomal RNA is a component of germinal granules in *Xenopus* embryos. **Mech. Dev.** **101**, 71-77.
- 2 . 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.
- 3 . 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.
- 4 . 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.
- 5 . 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.
- 6 . 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.
- 7 . S. B. Inoue, M. Shimoda, I. Nishinokubi, M. C. Siomi, M. Okamura, A. Nakamura, S. Kobayashi, N. Ishida and H. Siomi (2002) A Role for the *Drosophila* Fragile X-related gene in circadian output. **Current Biology** **12**, 1331-1335.
- 8 . M. Tsuda, Y. Sasaoka, M. Kiso, K. Abe, S. Haraguchi, S. Kobayashi and Y. Saga (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. **Science** **301**, 1239-1241.
- 9 . Y. Hayashi, M. Hayashi and S. Kobayashi (2004) Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germline. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **101**, 10338-10342.
- 10 . K. Hanyu-Nakamura, S. Kobayashi and A. Nakamura (2004) Intrinsic and extrinsic lipid phosphate phosphatase defines cell viability that promotes directional migration of *Drosophila* germ cells **Development** **131**, 4545-4553.

11. S. Unezaki, M. Nishizawa, E. Okuda-Ashitaka, Y. Masu, M. Mukai, S. Kobayashi, K. Sawamoto, H. Okano and S. Ito (2004) Characterization of the isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of *Drosophila ovo* as transcription factors. **Gene** **336**, 47-58.
12. R. Amikura, K. Sato and S. Kobayashi (2005) Role of mitochondrial ribosome-dependent translation in germline formation in *Drosophila* embryos. **Mech. Dev.** **122**, 1087-1093.
13. M. Hayashi, H. Aono, J. Ishihara, S. Oshima, H. Yamamoto, Y. Makazato and S. Kobayashi (2005) Left-right asymmetry in the alimentary canal of the *Drosophila* embryo. **Develop. Growth Differ.** **47**, 457-460.
14. S. Kobayashi, K. Sato and Y. Hayashi (2005) The role of mitochondrial rRNAs and Nanos protein in germline formation in *Drosophila* embryos. **Zool. Sci.** **22**, 943-954.
15. M. Mukai, Y. Kitadate, K. Arita, S. Shigenobu and S. Kobayashi (2006) Expression of meiotic genes in the germline progenitors of *Drosophila* embryos. **Gene Expr. Patterns** **6**, 256-266.
16. S. Shigenobu, K. Arita, Y. Kitadate, C. Noda and S. Kobayashi (2006) Isolation of germline cells from *Drosophila* embryos by flow cytometry. **Develop. Growth Differ** **48**, 49-57.

< 国内 >

分担著書および総説

1. 小林悟(2001):生殖細胞をつくる八杉貞雄、西鷲秀俊編、「たった一つの卵から生命現象の不思議」、東京科学同人
2. 樫川真樹、小林悟(2001):生殖細胞形成におけるミトコンドリアの新しい役割 「新ミトコンドリア学」内海耕慥、井上正康監修、共立出版
3. 網蔵令子、小林悟(2002):極顆粒の構築とミトコンドリア rRNA 生体の科学 53、110-116.
4. 網蔵令子、小林悟(2003):ミトコンドリアの生殖細胞形成における役割 実験医学 21、1736-1741.
5. 小林悟、網蔵令子(2003):生殖細胞の発生とミトコンドリアの RNA 蛋白質核酸酵素 48、444-450.
6. 小林悟、相賀裕美子(2003):ショウジョウバエとマウスの生殖細胞形成過程における Nanos の役割 細胞工学 22、1065-1068.

7. 小林悟(2004): ショウジョウバエ生殖細胞形成過程における Nanos 蛋白質による転写レベルでの遺伝子発現制御分子 細胞治療3、100-103.
8. 小林悟(2004): ショウジョウバエ生殖細胞形成過程における Nanos の機能 「発生における細胞増殖制御」竹内隆、岸本健雄編、日本シュプリンガーフェアラグ
9. 小林悟(2005): ショウジョウバエにおける極細胞の形成と維持 実験医学 23、20-25.
10. 小林悟(2005): 生殖細胞研究の動向 実験医学 23、682-685.
11. 重信秀治、小林悟(2005): トランスクリプトーム解析によるショウジョウバエ生殖細胞形成機構の解明 実験医学 23、686-691.
12. 林良樹、小林悟(2005): ショウジョウバエ極細胞の発生運命の制御機構 蛋白質核酸酵素 50、535-540.

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待、口頭講演 (国内 19 件、海外 3 件)

< 海外 >

1. S. Kobayashi Role of mitochondrial rRNAs in pole cell formation in *Drosophila*. FASEB Summer Research Conference (Colorado) 2003 年 6 月
2. S. Kobayashi A global profile of germline gene expression in *Drosophila* embryos. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2004 年 10 月
3. S. Kobayashi Role of Nanos protein in germline development in *Drosophila* embryos. EMBL meeting (Heidelberg) 2005 年 7 月

< 国内 >

1. 小林悟: ショウジョウバエの生殖系列における Nanos タンパク質による核移行制御 第74回日本生化学会(京都)2001 年 10 月
2. 小林悟: ショウジョウバエの生殖細胞形成にかかわる RNA と RNA 結合タンパク質 京都大学ウイルス研究所コロキウム(京都)2002 年 2 月

3. 小林悟: ショウジョウバエの生殖細胞形成過程における Nanos タンパク質の役割 第35回日本発生生物学会(横浜)2002年5月
4. 北館祐、重信秀治、野田千代、小林悟: ショウジョウバエ生殖巣で発現する遺伝子の網羅的解析 第73回日本動物学会(金沢)2002年9月
5. 向正則、羽生賀津子、林良樹、小林悟: ショウジョウバエの減数分裂を制御する母性因子 sva53 の解析 第73回日本動物学会(金沢)2002年9月
6. 網蔵令子、小林悟: ミトコンドリアタイプ翻訳阻害剤を用いた極細胞形成阻害 第73回日本動物学会(金沢)2002年9月
7. 林良樹、浅岡(田口)美穂、小林悟: Nanos タンパク質と pumilio タンパク質によるショウジョウバエの極細胞の細胞死抑制 第73回日本動物学会(金沢)2002年9月
8. 小林悟: ショウジョウバエの生殖細胞の形成メカニズム 大学と科学「動物の形作りーその最前線と新展開」(東京)2002年11月
9. 小林悟: ショウジョウバエの生殖細胞形成過程におけるミトコンドリアの役割 第40回生物物理学会(名古屋)2002年11月
10. 林良樹、小林悟: Nanos タンパク質による極細胞の運命決定機構 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
11. 小林悟: 生殖細胞形成メカニズムの研究の進め方 甲南大学ワークショップ「細胞を知る。生命を知る」2003年3月
12. 向正則、林良樹、小林悟: ショウジョウバエ極細胞中の遺伝子発現を制御する新規 Zn フィンガータンパク質 第74回日本動物学会(函館)2003年9月
13. 重信秀治、北館祐、野田千代、有田佳代、小林悟: ショウジョウバエ胚生殖巣のトランスクリプトーム解析 第74回日本動物学会(函館)2003年9月
14. 小林悟: 生殖細胞形成メカニズム RNA 若手の会(淡路島)2004年5月
15. 小林悟: 動物における生殖細胞形成機構 特定領域研究「植物の軸と情報」シンポジウム(京都)2004年12月
16. 小林悟: 生殖細胞の形成に関わる RNA 千里ライフサイエンスシンポジウム(大阪)2005年2月

17. 小林悟: ショウジョウバエの生殖細胞形成に関わるRNA 第 38 回日本発生生物学会(仙台)2005年6月
18. 北舘祐、野田千代、有田佳代、重信秀治、小林悟: ショウジョウバエ生殖巣における sevenless 遺伝子の発現および機能解析 第 38 回日本発生生物学会(仙台)2005年6月
19. 小林悟: ショウジョウバエの胚生殖巣で発現する遺伝子の同定と機能解析 第 76 回日本動物学会(筑波)2005年10月

ポスター発表 (国内 38 件、海外 8 件)

< 海外 >

1. K. Hanyu, A. Nakamura and S. Kobayashi: Identification of *N14* gene required for pole cell maintenance in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002年10月
2. Y. Hayashi, M. Asaoka-Taguchi and S. Kobayashi: Nanos and Pumilio inhibit apoptosis of pole cells in *Drosophila* embryos. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002年10月
3. M. Mukai and S. Kobayashi: *sva53*, a maternal gene required for meiosis. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002年10月
4. A. Nakamura, K. Hanyu and S. Kobayashi: Biochemical characterization of a maternal RNP complex in *Drosophila* oogenesis-A linkage between RNA localization and translational control. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002年10月
5. S. Shigenobu, Y., Kitadate, C. Noda and S. Kobayashi: Comprehensive analysis of genes expressed in *Drosophila* gonad. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002年10月
6. M. Tsuda, Y. Sasaoka, S. Haraguchi, S. Kobayashi and Y. Saga: Isolation and functional analysis of mouse Nanos homologs. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002年10月
7. K. Hanyu-Nakamura, S. Kobayashi and A. Nakamura: Germ cell-autonomous *wunen2* is required for germline development in *Drosophila* embryos. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2004年10月
8. S. Shigenobu and S. Kobayashi: A global profile of germline gene expression in *Drosophila* embryos. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2004年10月

< 国内 >

1. K. Hanyu, A. Nakamura and S. Kobayashi: A novel maternal mutation affecting pole cell maintenance in *Drosophila embryos*. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001 年7月
2. M. Mukai, K. Hanyu, Y. Hyashi and S. Kobayashi: *sva53*, a *Drosophila* maternal gene required for gene expression in the germline progenitors and meiosis. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001 年7月
3. 林良樹、浅岡(田口)美穂、小林悟: Nanos タンパク質と Pumilio タンパク質によるショウジョウバエ極細胞の細胞死抑制機構 第72回日本動物学会(福岡)2001 年 10 月
4. 羽生賀津子、中村輝、小林悟: ショウジョウバエの極細胞の維持に関わる新規母性効果突然変異体の解析 第72回日本動物学会(福岡)2001 年 10 月
5. 田上貴寛、小島美咲、柴田典人、鏡味裕、武田久美子、花田博文、小林悟: ニワトリ nanos 遺伝子の単離とその発現様式 第35回日本発生生物学会(横浜)2002 年 5 月
6. 中村輝、羽生賀津子、小林悟: 母性 RNA の輸送・局在化と翻訳を連携させるショウジョウバエ母性 RNP 複合体の解析 第35回日本発生生物学会(横浜)2002 年 5 月
7. 羽生賀津子、中村輝、小林悟: ショウジョウバエの極細胞の維持に関わる遺伝子 N14 の同定 第35回日本発生生物学会(横浜)2002 年 5 月
8. 津田雅之、笹岡由美子、原口清輝、小林悟、相賀裕美子: 新規マウス nanos 遺伝子の単離と発現解析 第35回日本発生生物学会(横浜)2002 年 5 月
9. 秋山孝洋、市瀬文、向正則、小林悟: ギャップ結合構成タンパク質 ductin によるショウジョウバエ始原生殖細胞の増殖制御 第35回日本発生生物学会(横浜)2002 年 5 月
10. 津田雅之、笹岡由美子、原口清輝、小林悟、相賀裕美子: 新規マウス nanos 遺伝子の単離と発現解析 第35回日本発生生物学会(横浜)2002 年 5 月
11. 重信秀治、北舘祐、野田千代、小林悟: ショウジョウバエ生殖巣の EST 解析および網羅的 in situ ハイブリダイゼーション 第25回日本分子生物学会(横浜)2002 年 12 月
12. 網蔵令子、小林悟: ミトコンドリアタイプ翻訳阻害剤を用いた極細胞形成阻害の解析 第36回日本発生生物学会(札幌)2003 年 6 月

13. 羽生賀津子、中村輝、小林悟:母性 *wunen2* は、ショウジョウバエの生殖細胞分化過程において重要な役割を持つ 第36回日本発生生物学会(札幌)2003年6月
14. 仙石徹、濡木理、中村輝、小林悟、横山茂之:DEAD-box RNA helicase である *Vasa* が RNA と ATP アナログを結合した「収縮型」構造 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月
15. 向正則、林良樹、小林悟:ショウジョウバエの極細胞中の遺伝子発現に必要な新規 Zn フィンガータンパク質 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月
16. 林良樹、林誠、小林悟:ショウジョウバエ母性 *Nanos* 蛋白質を欠いた極細胞の発生運命 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月
17. 北舘祐、重信秀治、野田千代、有田佳代、小林悟:ショウジョウバエ生殖巣で発現する遺伝子の網羅的解析 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月
18. T. Taya, S. Shigenobu, K. Kayo and S. Kobayashi Establishment of efficient and reliable DNA microarray analysis of *Drosophila* 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月
19. 中村征史、林良樹、小林悟、新見輝幸、松野健治:ショウジョウバエ卵殻形態の進化的多様性を生み出す EGFR シグナル伝達経路の種特異的な活性化様式 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月
20. 網蔵令子、佐藤仁泰、小林悟:ショウジョウバエの極細胞形成におけるミトコンドリア翻訳系の役割 第37回日本発生生物学会(名古屋)2004年6月
21. 羽生一、中村賀津子、中村輝、小林悟:母性 lipid phosphate phosphatase はショウジョウバエの生殖細胞分化過程において必須な役割を持つ 第37回日本発生生物学会(名古屋)2004年6月
22. 中村征史、影沢達夫、林良樹、小林悟、新見輝幸、松野健治:ショウジョウバエ卵殻形態の進化的多様性を生み出す EGFR シグナル伝達経路の種特異的な活性化様式 第37回日本発生生物学会(名古屋)2004年6月
23. 林良樹、小林悟:ショウジョウバエ母性 *Nanos* 蛋白質による極細胞のアポトーシス制御 第27回日本分子生物学会(神戸)2004年12月
24. 佐藤仁泰、二宮裕一、向正則、有田佳代、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエの極細胞質に局在する新規プロテインキナーゼの機能解析 第27回日本分子生物学会(神戸)2004年12月
25. 向正則、北舘祐、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエ極細胞中で発現する減数分裂制御遺伝子の解析 第27回日本分子生物学会(神戸)2004年12月

26. 中村征史、影沢達夫、林良樹、小林悟、新見輝幸、松野健治:ショウジョウバエ卵殻形態進化における rhp エンハンサー機能と位置情報の意義に関する研究 第27回日本分子生物学会(神戸) 2004年12月
27. 浅岡美穂、北館祐、重信秀治、小林悟、広海健:ショウジョウバエにおける生殖幹細胞ニッチの形成機構 第27回日本分子生物学会(神戸)2004年12月
28. 向正則、北館祐、有田佳代、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエの極細胞中における母性因子による減数分裂関連遺伝子の発現制御 第38回日本発生生物学会(仙台) 2005年6月
29. 佐藤仁泰、林良樹、二宮裕一、向正則、有田佳代、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエ極細胞のアポトーシス誘導に関わる新規プロテインキナーゼ の機能解析 第38回日本発生生物学会(仙台) 2005年6月
30. 林良樹、佐藤仁泰、小林悟:ショウジョウバエ母性 Nanos タンパク質による極細胞のアポトーシス抑制 第38回日本発生生物学会(仙台) 2005年6月
31. 向正則、北館祐、有田佳代、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエ母性因子SVA53による減数分裂関連遺伝子の発現制御 第76回日本動物学会(筑波)2005年10月
32. 重信秀治、北館祐、野田千代、有田佳代、小林悟:ショウジョウバエ胚生殖巣で発現する多様なレトロトランスポゾン 第76回日本動物学会(筑波)2005年10月
33. 佐藤仁泰、林良樹、二宮裕一、向正則、有田佳代、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエ極細胞のアポトーシス誘導に関わる新規プロテインキナーゼ の機能解析 第76回日本動物学会(筑波) 2005年10月
34. 林良樹、佐藤仁泰、小林悟:ショウジョウバエ母性 Nanos タンパク質による極細胞のアポトーシス抑制 第76回日本動物学会(筑波)2005年10月
35. 北館祐、野田千代、有田佳代、重信秀治、小林悟:ショウジョウバエ胚生殖巣における *sevenless* 遺伝子の発現および機能解析 第76回日本動物学会(筑波)2005年10月
36. 谷津潤、林誠、向正則、重信秀治、有田佳代、小林悟:生殖細胞形成に関わる母性転写因子のスクリーニング 第76回日本動物学会(筑波)2005年10月
37. 林良樹、佐藤仁泰、小林悟:ショウジョウバエ母性 Nanos タンパク質による極細胞のアポトーシス抑制機構 第28回日本分子生物学会(福岡)2005年12月
38. 谷津潤、林誠、向正則、重信秀治、有田佳代、小林悟:生殖細胞形成に関わる母性転写因子のスクリーニング 第28回日本分子生物学会(福岡)2005年12月

相賀グループ

(1)論文発表 (国内 2 件、海外 2 件)

< 海外 >

1. M. Tsuda, Y. Sasaoka, M. Kiso, K. Abe, S. Haraguchi, S. Kobayashi and Y. Saga (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. **Science** **301**, 1239-1241.
2. S. Haraguchi, M. Tsuda, S. Kitajima, Y. Sasaoka, A. Nomura-Kitabayashi, K. Kurokawa, Y. Saga nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. **Mech Dev.** **120:721-31.** (2003)

< 国内 >

分担著書および総説

1. 小林悟、相賀裕美子 (2003) ショウジョウバエとマウスの生殖細胞形成過程における Nanos の役割 細胞工学 22、1065-1068.
2. 相賀裕美子、松居靖久 (2003) 生殖細胞形成、「発生生物学がわかる」 わかる実験医学シリーズ、24-29.

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待、口頭講演 (国内 0 件、海外 2 件)

< 海外 >

1. Y. Saga:Function of nanos proteins in mouse germ cell development.Mini-Symposium on current work in the areas of developmental and cellularbiology. EMBL meeting (Heidelberg) 2005 年 7 月
2. Y. Saga:Implication of mouse nanos2-3'-UTR in spermatogenesis. 15th International Society of Developmental Biologists Congress (Sydney) 2005 年 9 月

ポスター発表 (国内 13 件、海外 2 件)

< 海外 >

1. M. Tsuda, Y. Sasaoka, S. Haraguchi, S. Kobayashi and Y. Saga: Isolation and functional analysis of mouse Nanos homologs. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002 年 10 月
2. M. Tsuda and Y. Saga: Analysis of mouse nanos2-3' untranslated region (3'UTR). Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2004 年 10 月

< 国内 >

1. 津田雅之、笹岡由美子、原口清輝、小林悟、相賀裕美子: 新規マウス nanos 遺伝子の単離と発現解析 第35回日本発生生物学会(横浜)2002年5月
2. 原口清輝、津田雅之、北嶋聡、相賀裕美子: マウス nanos ホモログ(mNos1)の機能解析 第35回日本発生生物学会(横浜)2002年5月
3. 津田雅之、笹岡由美子、原口清輝、小林悟、相賀裕美子: 新規マウス nanos 遺伝子の単離と発現解析 第35回日本発生生物学会(横浜)2002年5月
4. 津田雅之、笹岡由美子、原口清輝、相賀裕美子: マウス nanos ホモログ(nanos2)の機能解析 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
5. 笹岡由美子、津田雅之、原口清輝、相賀裕美子: マウス nanos 相同遺伝子 (nanos3)の機能解析 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
6. 相賀裕美子、津田雅之、笹岡由美子、原口清輝: マウス nanos 遺伝子の機能解析 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
7. 笹岡由美子、津田雅之、原口清輝、相賀裕美子: マウス始原生殖細胞発生過程における nanos3 の機能解析 第36回日本発生生物学会(札幌)2003年6月
8. 津田雅之、笹岡由美子、原口清輝、相賀裕美子: マウス nanos ホモログ(nanos2)の機能解析 第36回日本発生生物学会(札幌)2003年6月
9. 津田雅之、相賀裕美子: マウス nanos2 の 3'非翻訳領域(UTR)の解析 第37回日本発生生物学会(名古屋)2004年6月

10. 津田雅之、鈴木敦、相賀 裕美子:精子形成過程におけるマウス nanos2 3'非翻訳領域(3'UTR)の役割 第27回日本分子生物学会(神戸)2004年12月
11. 津田雅之、吉田松生、鈴木敦、鈴木仁美、木曾誠、相賀裕美子:マウス精子形成過程における nanos の発現と役割 第28回日本分子生物学会(福岡)2005年12月
12. 鈴木仁美、津田雅之、相賀裕美子:マウス始原生殖細胞における nanos3 の発現と機能 第28回日本分子生物学会(福岡)2005年12月
13. 三井薫、鈴木敦、津田雅之、相賀裕美子:マウス nanos2 遺伝子の転写発現調節機構の解析 第28回日本分子生物学会(福岡)2005年12月

松居グループ

(1)論文発表 (国内 13 件、海外 12 件)

< 海外 >

1. M. Yamamoto and Y. Matsui (2002) Testis-specific expression of a novel mouse defensin-like gene, Tdl. **Mech. Dev.** **116**, 217-221.
2. Y. Nakamura, M. Yamamoto and Y. Matsui (2002) Introduction and expression of foreign genes in cultured embryonic gonads. **Reprod. Fertil. Dev.** **14**, 259-265.
3. S. S. Tanaka and Y. Matsui (2002)
Developmentally regulated expression of *mil-1* and *mil-2*, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during formation and differentiation of primordial germ cells. **Mech. Dev.** **119S**, S261-S267.
4. S. Sato, T. Yoshimizu, E. Sato and Y. Matsui (2003) Erasure of methylation imprinting of *Igf2r* during mouse primordial germ-cell development. **Mol. Reprod. Dev.** **65**, 41-50.
5. D. Okamura, T. Kimura, T. Nakano and Y. Matsui (2003) Cadherin-mediated cell interaction regulate germ cell determination in mice. **Development** **130**, 6423-6430.
6. T. Yano, S. López de Quinto, Y. Matsui, A. Shevchenko, A. Shevchenko and A. Ephrussi (2004) Hrp48 regulates and couples *oskar* mRNA localization and translational control during *Drosophila* oogenesis. **Dev. Cell** **6**, 637-648.
7. S. S. Tanaka, G. Nagamatsu, Y. Tokitake, M. Kasa, P. P. L. Tam and Y. Matsui (2004) Regulation of expression of mouse interferon-induced transmembrane protein like gene-1, *Ifitm3* (*mil-1/fragilis*), in germ cells. **Dev. Dyn.** **230**, 651-659.
8. D. Okamura, K. Hayashi, and Y. Matsui (2005) Mouse epiblast changes responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation by the functions of extraembryonic ectoderm. **Mol. Reprod. Dev.** **70**, 20-29.
9. Y. Seki, K. Hayashi, K. Itoh, M. Mizugaki, M. Saitou and Y. Matsui (2005) 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.
10. Y. Matsui and D. Okamura (2005) Mechanisms of germ cell specification in mouse embryos. **BioEssays** **27**, 136-143.

11. K. Hayashi, K. Yoshida and Y. Matsui (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. **Nature** **438**, 374-378.
12. L. Y. Yamaguchi, S. S. Tanaka, M. Kasa, K. Yasuda, P. P. L. Tam and Y. Matsui Expression of low density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lpr4) gene in the mouse germ cells. **Gene Expr. Patterns, in press.**

< 国内 >

分担著書および総説

1. 松居靖久 (2001) 生殖細胞と全能性はどのような関係にあるのか? 実験医学 19、1505-1510.
2. 松居靖久 (2001) EG 細胞の樹立と特質 実験医学 19、1952-1958.
3. 田中聡、松居靖久 (2001) 生殖細胞と幹細胞 現代医療 33、1963-1966.
4. 松居靖久 (2002) 胚細胞の発生 小児科診断 65、1671-1676.
5. 松居靖久 (2003) 生殖細胞の形成機構 分子細胞治療 2、47-51.
6. 松居靖久 (2003) 生殖細胞と体細胞の違いと接点 Molecular Medicine 40、128-134.
7. 松居靖久 (2003) 生殖系列細胞の分化能と多能性 実験医学 21、1079-1084.
8. 関由行、松居靖久 (2003) 生殖系列におけるエピジェネティクスのプログラム 実験医学 21、1520-1526.
9. 松居靖久 (2003) 生殖細胞形成機構の本質 細胞工学 22、1058-1060.
10. 岡村大治、松居靖久 (2003) 組織・細胞間相互作用によるマウス生殖細胞の分化決定 細胞工学 22、1086-1089.
11. 松居靖久 (2004) 始原生殖細胞の形成と分化 産婦人科の世界 56、969-975.
12. 林 克彦、松居靖久 (2005) マウス生殖細胞系列のエピジェネティクスと減数分裂異常 実験医学 23、712-718.
13. 松居靖久 (2005) 生殖細胞の分化決定と再プログラム化の分子機構 加齢医学研究所雑誌 56、47-55.

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待、口頭講演 (国内 11 件、海外 3 件)

< 海外 >

1. Y. Matsui. Molecular Mechanisms of mouse primordial germ cell formation from epiblast. Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2002 年 10 月
2. Y. Matsui. Germ cell specification in mouse embryos. 14 th Lake Shirakaba Conference, International Symposium on Epigenetics and Regenerative Medecine (Vedbeck, Denmark) 2004 年 6 月
3. Y. Matsui. Primordial germ cell ontogeny. 21th Annual meeting of The European Society of human Reproduction and Embryology (Copenhagen, Denmark) 2005 年 6 月

< 国内 >

1. Y. Matsui: Mechanisms regulating PGC formation from epiblast in mouse embryos. International Symposium, Development and Epigenetics of mammalian Germ Cell and Pluripotential Stem Cells. (Kyoto) 2001 年 11 月
2. 岡村大治、林克彦、小林隆志、北村大介、松居靖久: マウス始原生殖細胞形成に必要な BMP4 シグナルへの epiblast の反応性の変化 第 35 回日本発生生物学会 (横浜) 2002 年 5 月
3. 松居靖久: 多能性幹細胞集団から生殖細胞の発生運命が決定される分子機構 第 25 回日本分子生物学会 (横浜) 2002 年 12 月
4. 岡村大治、木村透、仲野徹、松居靖久: E-cadherin を介した細胞間相互作用によるマウス生殖細胞の決定機構 日本分子生物学会第 3 回春季シンポジウム (鳥取) 2003 年 5 月
5. 松居靖久: 生殖細胞発生の基礎研究と応用の接点 第 36 回日本発生生物学会大会シンポジウム (札幌) 2003 年 6 月
6. Y. Matsui, S. Sato and Y. Seki: Nuclear Reprogramming during germ cell development. 第 76 回日本生化学会大会シンポジウム (横浜) 2003 年 10 月
7. 関由行、松居靖久: マウス始原生殖細胞の発生、分化過程におけるクロマチン修飾の解析 第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム (神戸) 2003 年 12 月

8. 林克彦、松居靖久:減数分裂時に特異的に発現するヒストンメチル化酵素 meisetz の機能解析 第27回日本分子生物学会年会シンポジウム (神戸) 2004年12月
9. 松居靖久:ヒストン修飾による減数分裂の制御 第38回日本発生生物学会大会ワークショップ(仙台)2005年6月
10. 松居靖久、岡村大治:生殖細胞と多能性の関係 第38回日本発生生物学会大会シンポジウム(仙台)2005年6月
11. K. Hayashi, K. Yoshida and Y. Matsui: Epigenetic control of meiosis. Internal Symposium on Germ cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells. (Kyoto)2005年11月

ポスター発表 (国内 15 件、海外 7 件)

< 海外 >

1. S. Sato, T. Yoshimizu, E. Sato and Y. Matsui:
Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ cell development.
Cold Spring Harbor Meeting(New York)2002年10月
2. S. S. Tanaka, and Y. Matsui:
Expression of mil-1 and mil-2 in mouse primordial germ cells during their formation and differentiation.
Cold Spring Harbor Meeting(New York)2002年10月
3. M. Yamamoto and Y. Matsui:
Identification of genes encoding secreted or cell-surface proteins preferentially expressed in male genital ridges of mice.
Cold Spring Harbor Meeting(New York)2002年10月
4. D. Okamura, K. Hayashi, T. Kobayashi, D. Kitamura and Y. Matsui:
Mouse epiblast changes the responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation by the function of extraembryonic ectoderm.
Cold Spring Harbor Meeting(New York)2002年10月
5. D. Okamura, T. Kimura, T. Nakano and Y. Matsui:
Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice.
Keystone symposia 'Stem Cells' (Keystone) 2004年1月

6. K. Hayashi and Y. Matsui:

A critical role of meisetz encoding meiosis-specific histone methyltransferase in mouse gametogenesis.

Cold Spring Harbor Meeting (New York) 2004 年 10 月

7. D. Okamura, Y. Tokitake, H. Taniguchi, H. Niwa and Y. Matsui:

Biphasic expression of germline-specific transcription factor Oct3/4 regulates germ cell specification.

15 th International Society of Developmental Biologist Congress (Sydney, Australia)

2005 年 9 月

< 国内 >

1. S. Sato, T. Yoshimizu, E. Sato and Y. Matsui: Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ cell development. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto)2001 年 7 月

2. S. S. Tanaka, and Y. Matsui: An attempt to identify molecules that regulate mouse germ cell determination. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto)2001 年 7 月

3. S. Sato, T. Yoshimizu, E. Sato and Y. Matsui: Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ cell development. International Symposium, Development and Epigenetics of mammalian Germ Cell and Pluripotential Stem Cells (Kyoto)2001 年 11 月

4. S. S. Tanaka, and Y. Matsui: An attempt to identify molecules that regulate mouse germ cell determination. International Symposium, Development and Epigenetics of mammalian Germ Cell and Pluripotential Stem Cells (Kyoto)2001 年 11 月

5. M. Yamamoto and Y. Matsui: Isolation of genes encoding secreted or cell-surface proteins preferentially expressed in male genital ridges of mice. International Symposium, Development and Epigenetics of mammalian Germ Cell and Pluripotential Stem Cells (Kyoto)2001 年 11 月

6. D. Okamura, K. Hayashi, T. Kobayashi, D. Kitamura and Y. Matsui: Mechanisms of the expression of Smad1 in epiblast, which is required for development of mouse primordial germ cells. International Symposium, Development and Epigenetics of mammalian Germ Cell and Pluripotential Stem Cells (Kyoto)2001 年 11 月

7. 山本美和子、松居靖久: マウス生殖隆起でオス特異的に発現する分泌型および膜蛋白質をコードする遺伝子の同定 第24回日本分子生物学会年会(横浜)2001 年 12 月

8. 岡村大治、林克彦、小林隆志、北村大介、松居靖久: PGC 形成に必要な Smad1 の epiblast 基部特異的な発現機構 第24回日本分子生物学会年会(横浜)2001年12月
9. 佐藤俊、吉水朋美、佐藤英明、松居靖久: マウス始原生殖細胞(PGCs)の発生過程におけるゲノム刷り込み遺伝子 *Igf2r* のメチル化状態の解析 第35回日本発生生物学会大会(横浜)2002年5月
10. 岡村大治、林克彦、松居靖久: マウス始原生殖細胞発生に必要な BMP4 シグナルへの epiblast の反応性の変化 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
11. 関由行、松居靖久: マウス始原生殖細胞の性質を司る閥内基盤の解析 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
12. 田中聡、松居靖久: マウス生殖細胞の形成・分化過程に発現する遺伝子、*mil-1*, *mil-2*の同定 第25回日本分子生物学会(横浜)2002年12月
13. 岡村大治、木村透、仲野徹、松居靖久: E-cadherin を介した細胞間相互作用によるマウス生殖細胞の決定機構 第36回日本発生生物学会(札幌)2003年6月
14. 岡村大治、時武裕子、丹羽仁史、松居靖久: マウス始原生殖細胞形成における Oct3/4 の機能 第38回日本発生生物学会(仙台)2005年6月
15. D. Okamura, Y. Tokitake, H. Taniguchi, H. Niwa and Y. Matsui: Biphasic expression of germline-specific transcription factor Oct3/4 regulates germ cell specification. Epigenetic control of meiosis. Internal Symposium on Germ cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells. (Kyoto) 2005年11月

(3)特許出願

国内出願 (1件)

発明の名称 マウスナノス様遺伝子
発明者 相賀裕美子、津田雅之
出願人 科学技術振興事業団
出願日 平成 14 年 8 月 2 日

海外出願 (0 件)

(4)受賞等

受賞

小林 悟
平成17年度日本動物学会賞
「ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構の解明」
受賞日: 平成17年10月7日

新聞報道

「ハエとマウスの生殖細胞の形成に同じ蛋白質が関与」相賀・小林グループ
平成15年8月29日 毎日新聞
平成15年9月1日 化学工業新聞
平成15年9月5日 科学新聞

「Nanos タンパク質の機能解明」小林グループ
平成16年6月29日
日刊工業新聞、日経産業新聞

「減数分裂を制御する Meisetz」松居グループ

平成17年10月17日

読売、毎日新聞：朝刊全国版

日経産業、日刊工業、化学工業、東京、河北新報、東奥日報、秋田さきがけ、山形、

福島民友：朝刊

平成17年11月29日

朝日：夕刊全国版（科学欄）

その他 なし

(5)その他特記事項 なし

6 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H14.4.18,19	外部講師によるセミナー	大阪府立母子保健総合医療センター研究所	20人	生殖細胞発生に伴う、DNAメチル化の変化に関するセミナー、及び討論
H14.8.20,21	研究チーム会議	国立遺伝学研究所	31人	CREST 小林グループ研究発表会
H14.12.19	外部講師によるセミナー	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所	50人	マウス生殖細胞系列成立の分子機構の講演、及び討論
H15.10.29,30	研究チーム会議	KKR ホテルびわこ	23人	CREST 小林グループ研究発表会
H16.11.5	部門公開セミナー	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	40人	研究チーム主催シンポジウム
H17.2.28	部門公開セミナー	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	40人	研究チーム主催シンポジウム

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Paul Lasko (McGill 大学・教授)	セミナー開催、及び研究打ち合わせ	岡崎国立共同研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	H13.7.15～7.20 (日本滞在 7/7～7/20)
田口(浅岡)美穂 (Duke 大学・研究員)	実験、及び研究打ち合わせ	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所	H13.9.20～11.19
甲斐歳恵 (Carnegie Institution of Washington)	部門公開セミナー	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	H16.11.5
前島一博 (理化学研究所)	部門公開セミナー	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	H17.2.28

7 結び

本研究チームは、比較的小規模の研究グループで構成されているが、当初の目的はほぼ達成されたと考えられる。特に、ショウジョウバエとマウスの生殖細胞形成に Nanos が共通して関与するという発見は、多くの動物における生殖細胞形成機構解明の基盤を形成する。さらに、減数分裂を制御する母性因子(ショウジョウバエ)や *Meisetz* 遺伝子(マウス)の発見は、両動物における生殖細胞の特質を決定する機構の解明に大きく寄与するだけでなく、両者の機構を比較する端緒となりうる。また、ショウジョウバエにおける生殖細胞特異的な遺伝子のゲノムワイドな探索は、今後の当該分野の基礎となる。このような意味において、本研究は、当初の目的以上に、当該分野の発展に今後寄与すると考えられる。

CREST 研究費は、研究方法の急な転換などに対処できる等、融通性のある点において、きわめて使いやすい予算であると思う。今後もこの制度の継続を強く望むと同時に、発展性のある基礎研究分野を視野に入れた研究領域の設定を強く希望する。

最後になりましたが、研究総括およびアドバイザーの先生方、研究事務所の方々、研究チームで日夜ハードな研究をこなししてきた研究参加者の方々に深く御礼申し上げます。



小林グループと
お世話になったショウジョウバエとマウス