

氏 名 谷津 潤

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1390 号

学位授与の日付 平成 22 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 ショウジョウバエ胚における生殖細胞特異的遺伝子  
発現に関わる母性転写因子の同定

論文審査委員 主 査 教授 上野 直人  
教授 小林 悟  
教授 高田 慎治  
教授 諸橋 憲一郎 （九州大学）

## 論文内容の要旨

多細胞生物を構成する細胞は、生殖細胞と体細胞に大別される。生殖細胞は体細胞と異なり、遺伝情報を次世代へ伝える役割を持つ卵や精子を形成し、種の維持に極めて重要な役割を担っている。生殖細胞形成機構は、多くの研究者の興味を長年引きつけてきたが、その全容は未だ明らかになっていない。本研究では、マイクロインジェクションや細胞移植といった実験発生学的手法に加え、突然変異体やRNAi (RNA interference) を利用した遺伝子の機能解析が容易に行なうことができるショウジョウバエを用いて、生殖細胞形成に関わる遺伝子の同定を行なった。

ショウジョウバエの初期胚後極には極細胞質と呼ばれる特殊な卵細胞質が局在しており、この細胞質を取り込む極細胞(始原生殖細胞)のみが生殖細胞に分化できる。極細胞質中には、極細胞が生殖細胞に分化する過程に必要な複数の母性因子が含まれていることが知られている。生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化する機能を持つ転写因子もこのような母性因子のひとつと考えられてきたが未だ同定されていない。そこで本研究では、生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化する機能を持つ母性転写因子を同定するために、以下に示す3段階のスクリーンを行った。

第1に、極細胞において高発現する遺伝子(RNA)を同定するために、マイクロアレイ解析を行った。まず、初期胚から極細胞のみをセル・ソーターを用いて単離し、マイクロアレイ解析を行なった。このとき、リファレンスとして胚全体を用い、胚全体に比べて極細胞で高発現する735種類のRNAを同定した。さらに、これらRNAから、ショウジョウバエのゲノムデータベース(Flybase)中のGene Ontology(GO)アノテーションを利用し、転写制御因子[“transcription regulator activity”(GO:0030528)]をコードしているものを68種選択した。

第2に、この68種のRNAの胚内分布をWhole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション(WISH)法を用いて調べ、65種について有効なデータが得られた。その結果、27種のRNAが極細胞質に局在あるいは偏在することが明らかとなった。これら27種は、産卵直後の胚から観察されることから、すべて母性RNAと判断できる。27種のRNAのうち7種 [Arc 70,

*sd, ovo, mei-P26, CG10462, Trf2, Dsp1*] は胚発生後期まで継続して極細胞中での発現が観察された。それに対して、残りの20種 [*CG10445, bip2, EP2237, CG3136, Tif-1A, Zyx102EF, rgr, Tra1, Rel, NC2alpha, ref(2)P, Pcl, CG31716, Hcf, H, Zfh1, Smox, CG5640, l(2)NC136, ttk*] は、胚発生段階の中期までに極細胞における発現が消失した。また、胚発生期を通して、極細胞質と極細胞のみに局在しているRNAは*CG10445*と*Arc70*の2つのみであった。残り25種は、極細胞に加え、中腸や神経などの体細胞での発現も観察された。

第3に、極細胞質に偏在し転写因子をコードする27種の母性RNAの機能阻害実験を行い、生殖細胞特異的な *vasa* (*vas*) と *nanos* (*nos*) の胚性発現 (zygotic expression) に影響を及ぼすものを同定した。機能阻害のために、double strand RNA (dsRNA) を初期胚の後極に注射するRNAi法を用いた。この方法は、効率良くかつ速やかに母性RNAを胚内で分解することができ、突然変異を利用した機能解析よりも簡便である。このような解析により、*vas* または *nos* の発現に関与する6種のRNA [*bip2, ovo, CG31716, Trf2, l(2)NC136, Tif-1A*] を同定した。これらのうち、*bip2, ovo, CG31716, Trf2* は、*vas* と *nos* の両方、*l(2)NC136* は *vas* のみ、*Tif-1A* は *nos* のみの発現に影響を及ぼした。

以上のように、ショウジョウバエの生殖細胞形成過程で機能する母性転写因子に着目して、スクリーニングを行った報告はなく、本研究は先駆的であるといえる。また、転写因子をコードし極細胞質および極細胞に偏在する母性RNAの網羅的な同定は、生殖細胞形成機構の全容を解明する上での重要な研究基盤になると考えられる。

生殖細胞は次世代へと世代を超えて遺伝情報の受け渡しを担う点で体細胞と大きく異なり、体細胞分化と独立した生殖細胞分化の分子および細胞メカニズムを明らかにすることは生物学の重要な課題の一つである。申請者は生殖細胞分化のしくみを遺伝子発現制御の視点から明らかにするために以下のような研究を行った。ショウジョウバエの初期胚後極には極細胞質と呼ばれる特殊な卵細胞質が局在しており、この細胞質を取り込む極細胞（始原生殖細胞）のみが生殖細胞に分化できる。極細胞質中には、極細胞が生殖細胞に分化する過程に必要な複数の母性因子が含まれていることが知られている。しかし、極細胞の発生運命を生殖細胞に分化するように決定する母性因子は未だ同定されていない。この因子は、極細胞中で生殖細胞特異的な遺伝子発現を活性化する機能を持つと考えられてきた。そこで本研究では、このような機能を持つ母性転写因子を同定するために、ショウジョウバエ生殖細胞を特異的に蛍光標識し、セルソーターを用いて生殖細胞のみを単離したのちに、以下の3段階のスクリーニングを行った。第1に、全遺伝子を対象としたマイクロアレイデータをもとに、極細胞において高発現する遺伝子（RNA）を735種類同定した。さらに、これらRNAから、転写制御因子をコードするものを68種選択した。第2に、この68種のRNAの胚内分布をWhole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション（WISH）法を用いて調べ、最終的に27種のRNAが極細胞質に局在あるいは偏在することが明らかとなった。第3に、27種の母性RNAの機能阻害実験を行い、生殖細胞特異的な *vasa* (*vas*) と *nanos* (*nos*) 遺伝子の胚性発現（zygotic expression）に影響を及ぼすものを同定した。さらに、機能阻害によって同定した転写因子の本来の機能を明らかにするために、double strand RNA（dsRNA）を初期胚の後極に注射するRNAi法を用いた。その結果、*vas*または*nos*の発現に関与する6種のRNA [*bip2*, *ovo*, *CG31716*, *Trf2*, *1(2)NC136*, *Tif-1A*] を同定した。これまでに、ショウジョウバエの生殖細胞形成過程で機能する母性転写因子に着目して、スクリーニングを行った報告はなく、本研究は先駆的であるといえる。また、転写因子をコードし極細胞質および極細胞に偏在する母性RNAの網羅的な同定は、生殖細胞形成機構の全容を解明する上での重要な研究基盤になると考えられる。

本研究は、生殖細胞特異的に発現する遺伝子の活性化に必要な母性転写因子の同定を主眼としたもので、セルソーターによる細胞選別、マイクロアレイ解析、時空間的遺伝子発現プロフィール解析などを組み合わせて、多くの生殖細胞特異的転写調節因子の同定に成功している。また、RNAi法で同定された母性転写因子の機能解析にまで踏み込んだ点は高く評価された。胚における限られた特定の細胞集団の遺伝子制御ネットワーク解明に向けたこの成果は、今後の生殖細胞研究ばかりでなく、広く発生生物学の重要な基盤となると考えられ、審議の結果、研究成果は学位授与に相応しいと判断した。