

氏 名 福田 胡桃

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2086 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analyses of gene regulatory networks involved in murine
oocyte formation

論文審査委員 主 査 教授 平田 たつみ
教授 齋藤 都暁
教授 澤 斉
准教授 酒井 則良
教授 林 克彦 九州大学 大学院医学研究院

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 福田 胡桃

論文題目 Analyses of gene regulatory networks involved in murine oocyte formation

Mammalian oogenesis consists of two genetically distinct events. One is meiosis, which starts in germline cysts in embryonic ovaries, and the other is folliculogenesis occurred after birth. The latter process is initiated by the event termed primordial follicle formation in neonatal ovaries, by which germline cysts are separated and oocytes are enclosed by their supporting somatic cells, pre-granulosa cells. The interaction between germ cells and granulosa cells is known to be important to generate functional oocytes. However, the underlying mechanisms remain elusive.

In my thesis study, I addressed the mechanisms of oogenesis after birth via two different perspectives regarding germ cells and somatic cells. In Chapter I, I described my investigation of the function of a germ cell-specific factor, DAZL, in the postnatal ovary, and in Chapter II, I discussed my analysis of gene expression changes in somatic cells focusing on the pre-granulosa cell lineage during primordial follicle formation.

In Chapter I, I focused on an RNA-binding protein implicated in the translational promoting factor, DAZL, which is known to be a critical factor for meiotic progression and is expected to play a role in folliculogenesis. First, I examined *Dazl* function in the postnatal ovary by generating postnatal oocyte-specific *Dazl* knockout mice. However, I unexpectedly found that the *Dazl* gene is dispensable for oocyte differentiation in postnatal ovaries as mutants were fertile and produced a normal number of pups. In addition, DAZL protein expression was not detected in the postnatal ovary, whereas *Dazl* mRNA was continuously observed, suggesting that DAZL is post-transcriptionally suppressed after birth.

Next, I asked whether DAZL translation was suppressed via its 3'-UTR

sequence. To address this, I removed the *Dazl* 3'-UTR and examined DAZL expression. As a result, DAZL expression was increased in the 3'-UTR-deleted transgenic ovaries, even postnatally, suggesting that DAZL translation is suppressed in a 3'-UTR-dependent manner. Furthermore, the increased DAZL expression caused the mothers to have a reduced litter size due to the failure of pre-implantation development, indicating that the 3'-UTR-dependent suppression of DAZL in postnatal oocytes may be required for pre-implantation mouse development. Based on these results, I concluded that the proper switching of DAZL expression from "on" in the embryonic stage to "off" in the postnatal stage is essential to produce the next generation.

In Chapter-II, I described my transcriptome analyses of pre-granulosa cell progenitors in wild-type and germ cell-deficient ovaries using a FACS method to selectively isolate *Lgr5*-positive developing pre-granulosa cells. Through these comparative analyses, I identified increased and decreased genes associated with pre-granulosa cell differentiation. The most marked changes I found during primordial follicle (PF) formation were the significant downregulation of Wnt and TGF-beta signaling pathway genes, and the upregulation of Notch and PI3K pathway genes. Although *Lgr5*-positive pre-granulosa progenitors developed in the absence of germ cells, oocytes influenced pre-granulosa cell differentiation after birth, suggesting that crosstalk between germ cells and *Lgr5*-positive cells is important for the differentiation of pre-granulosa cells. Thus, I further classified the genes with increased or decreased expression during PF formation as germ cell-dependent or -independent. Based on this classification, gene upregulation was largely dependent on germ cells, whereas the downregulated genes, which comprised putative factors involved in the retention of germline cysts, were regulated in both germ cell-dependent and -independent manners. These results provide insight into the gene regulatory networks functioning in differentiating pre-granulosa cells during primordial follicle formation. Moreover, they will help further analyses to identify unknown factors required for pre-granulosa cell

differentiation.

Taken together, my study revealed dynamic changes from the embryonic to postnatal stages during oocyte development such as DAZL expression regulation in oocytes and gene expression changes during pre-granulosa cell differentiation in somatic cells. By focusing on different events related to oocyte development, as described in Chapters I and II, my study helps clarify the complicated regulatory mechanisms at the transcriptional and post-transcriptional levels necessary for making a functional oocyte.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 福田 胡桃

Title
論文題目 Analyses of gene regulatory networks involved in murine oocyte formation

哺乳類の卵子の発生は、胎児期の生殖巣内で始まり、出生後の成長過程を経て、成体で成熟した卵が排卵されることで完成する。福田胡桃さんは、マウスの胎児期から成熟期にかけておきる卵発生の分子機構について2つの研究を行った。

一つ目は、RNA結合タンパク質DAZLの機能解析である。マウス胎児期の卵原細胞は体細胞分裂を続けて数を増すが、出生後になると個々の卵母細胞が体細胞により取り囲まれ単離された卵胞を形成するようになる。これまでの研究では、DAZLタンパク質は胚発生の卵発生と排卵直前に始まる卵成熟の両方の過程に必要であるという報告がある一方で、生後の成長過程の卵母細胞ではDAZLタンパク質の発現が急速に消失していることも報告されている。福田さんがDAZLタンパクとmRNAの発現を胚発生前から生後にかけて検証したところ、タンパクの消失が確認された一方で、mRNAは胚発生前から生後にかけて引き続き発現しており、何らかの転写後調節が予想された。福田さんは、胚発生前の卵発生以降のDAZLタンパク質の機能を正確に解析することを目的に、生後の卵母細胞特異的に*Dazl*遺伝子の条件的破壊を行なった。その結果、*Dazl*遺伝子が無くても、卵子は正常に発生し、受精可能で、正常に子孫が得られることがわかった。この結果から、福田さんはこれまでの発想を逆転し、生後の卵母細胞においてDAZLタンパク質の発現が抑制される意味に興味を持った。まず、*Dazl*遺伝子の3'-UTR配列を欠失させたBACトランスジェニックマウスを用いて、*Dazl*遺伝子の3'-UTR配列が、生後の卵母細胞におけるDAZLタンパク質の発現抑制を担うことを明らかにした。そしてこのトランスジェニックマウスを利用することで、生後の卵母細胞においてDAZLタンパク質が恒常的に発現する状況を作り出し、その後の卵子の発生および受精後の胚発生について解析した。その結果、DAZLタンパク質を過剰発現させた卵子から生じる産仔が有意に少ないこと、またその理由として多くの受精卵の卵割が胚盤胞期に至るまでに停止して異常胚となってしまうことがわかった。以上の結果から、福田さんは、生後の成長過程の卵母細胞においてDAZLタンパク質の発現が抑制されることが、それ以降の受精卵発生において重要であると結論づけた。

もう一つの研究は、卵母細胞を取り囲んで卵胞を形成する顆粒膜細胞の転写産物解析である。顆粒膜細胞は、マウスの胎児期から新生児期にかけて未熟な生殖巣の中で卵母細胞と相互作用しながら分化すると考えられているが、その発生機構には不明な点が多い。福田さんは、発生途中の顆粒膜細胞の前駆細胞を集める方法を新たに確立してRNA解析を行い、胎生17.5日から生後1日目の間に転写産物の種類が大きく変化することを示した。さらに、異なる発達段階で卵母細胞の発生に異常をきたす2種類の遺伝子破壊動物を使うこ

とで、卵母細胞を消失した生殖巣における顆粒膜細胞の発現RNA解析を行い、卵母細胞に依存して発現制御される遺伝子群と、依存しないで発現制御される遺伝子群を分類した。以上の成果は、卵子形成を制御する顆粒膜細胞の働きを解明する分子基盤を提供するものである。

以上の福田さんの研究成果は、卵子形成機構において既存の知識を覆すなど重要な新規知見を与えるものであり、質量ともに十分な内容を含んでいる。前半部の研究については、すでに査読付きの国際学術雑誌に公表されており、遺伝学専攻の博士授与の水準を十分に満たしていると、審査員全員一致で判断した。