

氏 名 望 月 一 史

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第470号

学位授与の日付 平成12年3月24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4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 ヒドラの生殖系列細胞に対する分子マーカーの単離と発現解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 桂 勲
教 授 林 茂生
教 授 廣海 健
教 授 中辻 憲夫（京都大学）
講 師 小林 悟（筑波大学）

論文内容の要旨

ヒドラのポリプには、体細胞と生殖細胞の両方に分化できる細胞(多能性幹細胞)が存在する。従って、ヒドラは成体でも生殖細胞の分化が観察できるユニークな実験動物である。しかし、多能性幹細胞と生殖細胞に対するマーカーはほとんど得られておらず、ヒドラの生殖細胞の分化には不明な点が多い。そこで本研究では、ヒドラの生殖系列細胞である多能性幹細胞と生殖細胞に対する分子マーカーをクローニングし、その発現を解析した。

その分子マーカーの候補として、生殖細胞質の構成成分に着目した。生殖細胞質は多くの動物の生殖系列細胞に共通してみられる、タンパク質とRNAに富む顆粒と、ミトコンドリアが密集している細胞質である。ヒドラでも生殖細胞質に類似した細胞質が多能性幹細胞、生殖細胞および分化の初期の刺細胞前駆細胞で観察されている。ショウジョウバエでは、その生殖細胞質の構成成分が多く同定されており、その中でも *vasa* および *nanos* は、他の複数の生き物にも類縁遺伝子が存在することが明らかになっている。そこで、*vasa* および *nanos* の類縁遺伝子をヒドラから単離し、その遺伝子発現を解析して、それらがヒドラの生殖系列細胞のマーカーに成りうるかどうかを検討した。

RT-PCRにより、チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) から cDNA の単離を試みた結果、*vasa* 類縁遺伝子を含む DEAD ボックス RNA ヘリカーゼをコードすると推定される遺伝子が 8 つと、*nanos* 類縁遺伝子と考えられる cDNA の断片を 2 つ得ることができた。これらのうち、*vasa* の類縁遺伝子と考えられる *Cnvas1* (Cnidarian *vasal*) と *Cnvas2*、マウスではオスの生殖細胞で発現していることが知られている PL10 に近縁な *CnPL10*、*nanos* 類縁遺伝子と考えられる *Cnnos1* (Cnidarian *nanos1*)、*Cnnos2* の 5 つについて、まず、全翻訳領域を含むと推定される cDNA 配列を明らかにした。*Cnvas1*、*Cnvas2*、*CnPL10*、*Cnnos1* および *Cnnos2* の cDNA はそれぞれ 797 aa、890 aa、627 aa、248 aa および 308 aa の ORF を持つと推定された。配列をもとに分子系統学的な解析を行った結果、*Cnvas1* と *Cnvas2* は、DEAD ボックス RNA ヘリカーゼのなかでも、*vasa* 類縁遺伝子のみが含まれる Vas サブファミリーに分類され、*CnPL10* はそれとは別の PL10 サブファミリーに属することが確認された。また、*Cnnos1* と *Cnnos2* がコードすると推定されるタンパク質は、他の Nanos 類縁タンパク質の間でよく保存されている 2 つのジンクフィンガーモチーフの部分が完全に保存されていたことから、*nanos* 類縁遺伝子のメンバーであることが強く示唆された。

次に、正常ヒドラを用いて、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより上記の 5 つの遺伝子の発現を調べた。そのうち *Cnvas1*、*Cnvas2*、*Cnnos1* の mRNA は、オスでは体軸方向につながった、メスでは塊になった大型間細胞で強く発現しており、これらはその形態から生殖細胞であると考えられた。また、この生殖細胞と考えられる発現の強い細胞の他に、発現の弱い大型間細胞が体幹部に散らばっており、これらは多能性幹細胞であると考えられた。一方、*CnPL10* の mRNA は大型間細胞のほかに刺細胞の前駆細胞でも検出され、その発現は生殖系列

細胞に特異的ではなかった。また、*Cnnos2*のmRNAは一部の生殖細胞で弱く、口丘の内胚葉で強く発現していた。これらの結果から、*Cnvas1*、*Cnvas2*、*Cnnos1*の3つの遺伝子の発現は生殖系列細胞のマーカーになる可能性があることが分かった。

さらに、上皮細胞と腺細胞の他には生殖細胞のみが存在する偽上皮ヒドラを用いて、*Cnvas1*、*Cnvas2*、*Cnnos1*のmRNAの遺伝子の発現を調べたところ、いずれの遺伝子の発現も大型間細胞つまり生殖細胞で強く発現していた。染色された細胞はオスでは体軸方向につながっており、メスでは数カ所で塊になっていた。これらは、正常ヒドラのオスおよびメスの強く染まる細胞の形態とよく一致しており、正常ヒドラで強く染まる細胞は生殖細胞であることが、さらに強く示唆された。また、正常ヒドラで刺細胞系列のマーカーを用いて2重染色をおこない、これらの遺伝子が刺細胞系列では発現していないことも確かめた。

以上のことから、*Cnvas1*、*Cnvas2*、*Cnnos1*のmRNAの発現は生殖細胞と多能性幹細胞に特異的であり、相対的に生殖細胞ではその発現は強く、多能性幹細胞では弱いことが分かった。よって、*Cnvas1*、*Cnvas2*、*Cnnos1*のmRNAの発現は、ヒドラの生殖系列細胞の発生、分化を研究する上で有効なマーカーである。

論文の審査結果の要旨

ヒドラは、成体中でも多能性幹細胞から生殖細胞への分化が起るという興味ある性質を持つが、生殖細胞の分化は分子的にはほとんど調べられていない。そこで、望月君は、まず生殖細胞の分化に関する分子マーカーを確立することが重要と考え、他のいくつかの生物でマーカーとなっている *vasa* と *nanos* の類縁遺伝子を研究した。

まず望月君は、RT-PCRと5'-および3'-RACEにより、ヒドラから *vasa* サブファミリーに属する遺伝子2つ (*Cnvas1*, *Cnvas2*)、*vasa* と同じ DEAD box RNA helicase ファミリーだが別のサブファミリーに属するが PL10 の類縁遺伝子1つ (*CnPL10*)、*nanos* の類縁遺伝子2つ (*Cnnos1*, *Cnnos2*) の合計5種類の cDNA を得た。

次に、これらの遺伝子の発現を whole mount *in situ* hybridization で調べた。無性的に増殖し精子や卵の形成が起こらない条件の正常ヒドラでは、5つの遺伝子の内、*Cnvas1*, *Cnvas2*, *Cnnos1* は、雌雄ともに生殖幹細胞で強く、多能性幹細胞で弱く発現し、他の細胞での発現は実質的になかった。この結果は、上皮細胞のみをもつ上皮ヒドラや、上皮細胞・腺細胞・生殖細胞のみから成る偽上皮ヒドラを用いて確認された。また、多能性幹細胞から生じる刺細胞やその前駆体で発現しないことは、これらの細胞のマーカー *CnASH* との二重染色で確かめられた。すなわち、*Cnvas1*, *Cnvas2*, *Cnnos1* は生殖幹細胞と多能性幹細胞を他の細胞から、および互いに区別するマーカーとして使えることがわかった。一方、*Cnnos2* は、少なくとも一部の生殖幹細胞で弱く発現する他に、口丘内胚葉でも発現が見られた。また、*CnPL10* は、生殖幹細胞と多能性幹細胞の他に、刺細胞の前駆細胞でも発現しており、生殖系列特異的ではなかった。

さらに、ヒドラを有性化条件に置いて *Cnvas1*, *Cnvas2*, *Cnnos1* の発現を追跡したところ、雄では精子形成の途中でこれらの遺伝子の発現が止まるが、雌では卵形成の過程でかえって発現が増大することがわかった。

これらの研究は、*Vasa* と *Nanos* が後生動物の進化の初期から生殖系列に固有の蛋白質として働いていることを示し、発生的に多様な生殖系列の進化が共通の分子的基盤の上に議論できることを明らかにした。また、*Cnvas1*, *Cnvas2*, *Cnnos1* が生殖系列のマーカーとして有用なことを示し、ヒドラの生殖細胞分化の研究を行う分子的基盤を整備した。これらの研究で実験は注意深く行われており、問題点も的確に指摘され議論されていた。以上の理由で、審査委員会は、全員一致で、この論文が博士論文として十分であるとの結論に達した。

博士論文審査会では難問を含む様々な質問が出たが、これに対し、望月君は、一つ一つ質問をよく聞き、よく考えて適切な解答をした。この受け答え、および公開発表の内容から判断して、望月君は専門分野および基礎分野で、博士号を得るのに十分な知識と理解力を持つと結論した。また、博士論文の英語の要旨、および英語の投稿論文の原稿を見て、望月君は十分な英語能力を持つと判断した。