

氏 名 北館 祐

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第1067号

学位授与の日付 平成19年3月23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生殖巣で発現する遺伝子の同定および
機能解析

論文審査委員 主 査 教授 長濱 嘉孝
教授 小林 悟
教授 上野 直人
教授 松居 靖久（東北大学）

多くの動物種において、始生殖細胞は一部の体細胞とともに生殖巣を形成する。生殖細胞の発生に生殖巣は不可欠であり、この器官で発現する遺伝子の機能を網羅的に解析することは、生殖巣および生殖細胞の発生を制御するメカニズムを明らかにする上で重要である。本研究では、胚生殖巣中で発現する遺伝子の網羅的同定を以下に示す3つのステップでおこなった。まず第1に、胚から生殖巣のみを fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて単離した。第2に、単離した生殖巣から作製された cDNA ライブラリーをもとに EST 解析をおこない、生殖巣で発現する遺伝子を同定した。第3に、EST 解析で同定された遺伝子の発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) 法により解析した。その結果、17,218 クローンの高精度 EST が得られ、3,051 種類の転写産物 (遺伝子) が同定された。これはショウジョウバエゲノムにコードされている遺伝子の約 20% に相当する。3,051 種類の遺伝子すべてについて、WISH 法を用いて発現解析を行い、生殖巣で選択的に高発現する遺伝子を 101 種類同定した。このうち、39 種類が始生殖細胞 (極細胞) で、58 種類が胚生殖巣を構成する体細胞 (SGCs) で 4 種類が極細胞と SGCs の両方で発現することが明らかとなった。これら遺伝子の機能をデータベースをもとに調べたところ、胚生殖巣で発現する遺伝子は広範囲な分子機能と生物学的機能を示すことが明らかとなった。特に、極細胞では生殖系列特異的なリボソーム・タンパク質を含む翻訳制御に関わる遺伝子や転写制御に関わる遺伝子が多数同定された。これは、いままで明確ではなかった極細胞特異的な遺伝子発現制御機構の存在を示唆している。WISH による遺伝子発現パターンを解析している過程で、8 種類の新規遺伝子が胚生殖巣内の一部の SGCs のみで発現することを見いだした。このほかにも、3 種類の遺伝子が胚生殖巣内で領域特異的に発現することも当研究室でおこなわれたマイクロアレイ解析と WISH 解析により明らかとなっている。これらの遺伝子は、胚生殖巣内の一部の SGCs から生じる細胞種の形成に関与するものと考えられる。したがって、このような遺伝子の機能解析により胚生殖巣の領域特異的分化に関わる機構を明らかにすることができると考え、以下の研究をおこなった。本研究では、突然変異系統が既に得られている受容体型チロシンキナーゼをコードする *sevenless (sev)* 遺伝子に注目し解析をおこなった。その結果、*sev* は、雄の胚生殖巣後半部の SGCs で発現することが明らかとなった。さらに、そのリガンド Boss は極細胞で発現していることも明らかとなった。*sev*、*boss* 突然変異胚では、本来生殖巣前端のみに形成される雄生殖幹細胞ニッチの前駆細胞 (ハブ前駆細胞) が胚生殖巣後半部で異所的に形成された。以上の結果を考えあわせると、極細胞で発現する Boss により、Sev が胚生殖巣後半部の SGCs 中で活性化し、後半部 SGCs がハブ前駆細胞に分化するのを抑制すると結論づけられる。これはショウジョウバエ胚生殖巣において、生殖系列から体細胞系列へシグナルが伝達される初めての例である。また、幹細胞ニッチが個体の発生過程で形成される機構を明らかにした例は現在まで報告がない。本研究で得られた知見は幹細胞ニッチの形成機構を明らかにする上で重要な基盤になると考えられる。このように、本研究で同定した胚生殖巣で選択的に発現する遺伝子の機能解析により、生殖巣および生殖細胞の発生を制御する新たな機構を明らかにすることができると考えられる。

論文の審査結果の要旨

多くの動物種において、始原生殖細胞は一部の体細胞とともに生殖巣を形成する。生殖巣は生殖細胞の発生にとって不可欠であり、この器官で発現する遺伝子の網羅的同定および機能解析は、生殖巣および生殖細胞の発生を制御するメカニズムを明らかにする上で重要である。しかし、生殖巣の発生過程で発現する遺伝子を網羅的に同定した例はなかった。そこで、出願者は、胚の生殖巣中で発現する遺伝子の網羅的同定を以下に示す3つのステップでおこなった。まず第1に、胚から生殖巣のみを fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて単離した。第2に、単離した生殖巣から作製された cDNA ライブラリーをもとに EST 解析をおこない、胚生殖巣で発現する遺伝子を同定した。第3に、EST 解析で同定された遺伝子の発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) 法により解析した。その結果、17,218 クローンの高精度 EST が得られ、3,051 種類の転写産物 (遺伝子) が同定された。3,051 種類の遺伝子すべてについて、WISH 法を用いて発現解析を行い、生殖巣で選択的に高発現する遺伝子を 101 種類同定した。このうち、39 種類が始原生殖細胞 (極細胞) で、58 種類が胚生殖巣を構成する体細胞 (SGCs) で 4 種類が極細胞と SGCs の両方で発現することが明らかとなった。以上の研究は、生殖細胞や生殖巣の発生制御機構の全体像を明らかにするための基盤となると考えられる。

さらに、出願者は、WISH 法により 11 種類の新規遺伝子が胚生殖巣内の一部の SGCs のみで発現することを見いだした。これらの遺伝子は、胚生殖巣内の一部の SGCs から生じる細胞種の形成に関与するものと考えられる。出願者は、突然変異系統が既に得られている受容体型チロシンキナーゼをコードする *sevenless* (*sev*) 遺伝子に注目し解析をおこない以下の結果を得た。まず、*sev* は、雄の胚生殖巣後半部の SGCs で発現することが明らかとなった。さらに、そのリガンド *Boss* は極細胞で発現していることも明らかとなった。*sev*、*boss* 突然変異胚では、本来生殖巣前端のみに形成される雄生殖幹細胞ニッチの前駆細胞 (ハブ前駆細胞) が胚生殖巣後半部で異所的に形成された。以上の結果を考えあわせると、極細胞で発現する *Boss* により、*Sev* が胚生殖巣後半部の SGCs 中で活性化し、後半部 SGCs がハブ前駆細胞に分化するのを抑制すると結論づけられる。これはショウジョウバエ胚生殖巣において、生殖系列から体細胞系列へシグナルが伝達される初めての例である。また、幹細胞ニッチが個体の発生過程で形成される機構を明らかにした初めての例でもある。この研究で得られた知見は幹細胞ニッチの形成機構を明らかにする上で重要な基盤になると考えられる。

本出願論文では、胚生殖巣で発現する遺伝子の網羅的な同定をおこない、生殖巣および生殖細胞の発生制御機構を解明するための基盤を築いた点、不明であった生殖幹細胞ニッチの形成機構を明らかにした点において高く評価できる。以上の成果は、博士論文に値するものと審査委員全員一致で判断された。