

氏 名 林 誠

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1202 号

学位授与の日付 平成 20 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 ショウジョウバエ初期胚発生における左右軸極性および  
生殖細胞決定機構の解析

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

## 論文内容の要旨

動物の初期発生過程において、受精卵の細胞分裂により生じた割球は、将来特定の細胞に分化するように決定を受ける。多くの動物種で、この細胞の分化決定に卵内に局在する母性因子が関与していることが知られている。特にショウジョウバエでは、卵内に局在する母性因子が胚の前後 / 背腹軸極性および生殖細胞の決定に関わることが知られている。このうち、前後 / 背腹軸極性を制御する母性因子は明らかになっている。しかし、第3の体軸である左右軸の極性を決定する機構については解析がほとんどなされておらず、その決定機構は不明である。また、生殖細胞の決定に関わる母性因子に関しても、未だ同定には至っていない。そこで、本研究では「左右軸極性の決定機構」および「生殖細胞の決定機構」を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。

左右軸極性が決定される機構として、これまでに2つのモデルが提唱されてきた。それらは、卵内に偏在する母性因子により左右軸極性が決定するというものと、前後 / 背腹軸極性に依存して左右軸極性が決定されるというものである。そこで、これらの仮説を検証するために、前後軸極性のみを完全に逆転させた胚を作成した。本来胚の前極に局在し頭胸部の形成に関わる *bicoid* (*bcd*) mRNA と胚の後極に局在し腹部の形成に関わる *osker* (*osk*) mRNA の局在を人為的に逆転させることにより、完全な前後軸極性逆転胚を作成することに成功した。ショウジョウバエ胚において、左右軸極性を示す器官として消化管が知られている。そこで本研究では、前後軸極性逆転胚における前胃と後腸の左右軸極性について解析を行った。その結果、前胃、後腸ともに、逆転した前後軸極性に依存して左右軸極性が形成されることが明らかとなった。このことから、ショウジョウバエ胚の左右軸極性は、前後 / 背腹軸極性に依存して決定されると結論づけられる。

ショウジョウバエの生殖細胞は極細胞に由来する。極細胞は、胚の後極に局在する極細胞質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込むように形成される。これまでの研究から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因子が含まれていることが知られている。しかし、極細胞が生殖細胞へと分化するように決定する因子、すなわち「生殖細胞決定因子」は未だ同定されていない。「生殖細胞決定因子」は、極細胞中で生殖系列特異的な遺伝子発現を活性化する転写制御因子であると考えられてきた。そこで、本研究では、生殖系列特異的な遺伝子発現を活性化する転写制御因子の同定および機能解析を行なった。単離した極細胞のマイクロアレイ解析および Whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) 解析により、極細胞質に偏在し転写制御因子をコードする mRNA を同定し、RNAi 法により機能阻害させたときに生殖系列特異的な遺伝子発現 (*vasa* および *nanos*) が阻害されるものを6種類同定した。本研究では、このスクリーニングにより同定された6種類の遺伝子のうち、特定の塩基配列に結合し、遺伝子発現の活性化に関わることが知られていた *ovo* に着目して解析を行った。*ovo* は、*ovo-A*、*ovo-B*、*svb* の3種類の RNA をコードすることが知られている。卵形成過程において、Ovo-B タンパク質は下流遺伝子の転写活性化に関わり、Ovo-A タンパク質はその転写を抑制する機能を持つ。一方、*svb* は胚の表皮の形態形成に関与する。WISH および定量 PCR 法により、極細胞質および極細胞中で *ovo* mRNA が継続して発現していること、極細胞中に検出される *ovo* mRNA の大部分は *ovo-B* mRNA であることを明らかにした。胚発生初期から極細胞質および極細胞中に観察されるこれら mRNA は、母性由来と考えられる。

次に、Ovo-B タンパク質と拮抗的に機能する Ovo-A タンパク質を胚発生過程初期から極細胞中で過剰発現することにより、母性 *ovo* の機能を阻害することを試みた。胚の生殖巣を観察したところ、生殖系列の発生に異常は認められなかったが、3 齢幼虫期になると、観察したすべての雌の生

殖巢から生殖系列の細胞が消失していた。また、雄においても、生殖巢中の生殖系列の細胞が完全に消失しているものが高い割合を占めた。成虫の卵巢と精巢の形態を調べたところ、観察したほぼすべての卵巢と精巢が退縮しており、生殖細胞が失われていた。これまで、胚性 *ovo* の完全機能欠失型 (null) 突然変異体の雌では、3 齢幼虫期において、約 30% の生殖巢中で生殖細胞が消失し、成虫になるとすべての雌個体で生殖細胞が失われ卵巢が退縮すること、雄ではこのような生殖細胞の消失は観察されないことが報告されている。この表現型は、極細胞中で母性 *Ovo-B* タンパク質の機能を阻害することで得られる表現型とは明らかに異なる。胚性 *ovo* が雌特異的に機能するのに対し、母性 *ovo* は雌雄両方において生殖系列の維持に機能していると考えられる。本研究は、長い間その存在を予想されながらも単離同定されていなかった「生殖細胞決定因子」の候補として *ovo* を単離したという点で、意味のあるものだと考えられる。本研究で得られた知見は、生殖細胞決定機構を明らかにする上で重要な基盤となる。

## 論文の審査結果の要旨

動物の初期発生過程において、受精卵の細胞分裂により生じた割球は、将来特定の細胞に分化するように決定を受ける。多くの動物種で、この細胞の分化決定に卵内に局在する母性因子が関与していることが知られている。特にショウジョウバエでは、卵内に局在する母性因子が胚の前後／背腹軸極性および生殖細胞の決定に関わることが知られている。このうち、前後／背腹軸形成を制御する母性因子は明らかになっている。しかし、第3の体軸である左右軸の極性を決定する機構については解析がほとんどなされておらず、その決定機構は不明である。また、生殖細胞の決定に関わる母性因子に関しても、未だ同定には至っていない。そこで、本研究では「左右極性の決定機構」および「生殖細胞の決定機構」を明らかにすることを目的として研究を行った。

左右極性が決定される機構として、これまでに2つのモデルが提唱されてきた。それらは、卵内に偏在する母性因子により左右極性が決定するというものと、前後／背腹軸に依存して左右極性が決定されるというものである。そこで、これらの仮説を検証するために、出願者は前後軸極性のみを完全に逆転させた胚を作成した。本来胚の前極に局在し頭胸部の形成に関わる *bicoid* (*bcd*) mRNA と胚の後極に局在し腹部の形成に関わる *oskar* (*osk*) mRNA の局在を人為的に逆転させたところ、完全な前後軸逆転胚を作出することに成功した。ショウジョウバエ胚において、左右非対称性を示す器官として消化管が知られている。そこで本研究では、前後軸逆転胚における前胃と後腸の左右非対称性について解析を行った。その結果、前胃、後腸ともに、逆転した前後軸極性に依存して左右極性が形成されることが明らかとなった。このことから、ショウジョウバエ胚の左右極性は、前後／背腹軸極性に依存して決定されると結論づけられる。

ショウジョウバエの生殖細胞は、極細胞に由来する。極細胞は、胚の後極に局在する極細胞質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込むように形成される。これまでの研究から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十分な因子が含まれていることが知られている。しかし、極細胞が生殖細胞へと分化するよう決定する因子、すなわち「生殖細胞決定因子」は未だ同定されていない。「生殖細胞決定因子」は、極細胞中で生殖系列特異的な遺伝子発現を活性化する転写制御因子であると考えられてきた。そこで、本研究では、生殖系列特異的な遺伝子発現を活性化する転写制御因子の同定および機能解析を行った。単離した極細胞のマイクロアレイ解析および Whole-mount in situ ハイブリダイゼーション (WISH) 解析により、極細胞質に偏在し転写制御因子をコードする mRNA を同定し、RNAi 法により機能阻害させたときに生殖系列特異的な遺伝子発現 (*vasa* および *nanos*) が阻害されるものを7種類同定した。本研究では、このスクリーニングにより同定された7種類の遺伝子のうち、特定の塩基配列に結合し、遺伝子活性化に関わることが知られていた *ovo* に着目して解析を行った。胚発生過程初期から、極細胞中で母性 *ovo* の機能を阻害することにより、雄雌両方で生殖細胞が消失し、生殖巣の退縮が観察された。このことは、*ovo* は雄雌両方で生殖細胞の発生において機能していることを示している。本研究は、長い間その存在を予想されながらも単離同定されていなかった「生殖細胞決定因子」の候補とし

て *ovo* を単離したという点で、非常に意味のあるものだと考えられる。

本出願論文は、ショウジョウバエ胚の左右軸極性形成機構および生殖細胞決定機構を解明する基盤を築い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。