

ショウジョウバエ生殖系形成過程における

母性 Nanos タンパク質の役割

林 良樹

総合研究大学院大学

生命科学研究科

分子生物機構論専攻

岡崎統合バイオサイエンスセンター

発生遺伝研究部門

444-8787 岡崎市明大寺町字東山5-1

目次

I. 概要	3
II. 序	6
III. 材料および方法	14
IV. 結果	22
V. 考察	30
VI. 謝辞	39
VII. 参考文献	40
VIII. 図表	50

I. 概要

生殖細胞は有性生殖の過程を経て次世代を形成しうる唯一の細胞であり、生命の連続性を担っている。多くの動物種において、生殖質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込む細胞が、生殖細胞に分化することが明らかになっている。生殖質中には、生殖細胞の形成に必要な十分な母性因子が局在していることが知られており、これら因子を同定し、その機能解析を行うことにより生殖細胞形成機構が明らかになると考えられる。生殖質が観察される動物種のなかで、ショウジョウバエは実験発生学的手法や遺伝学的手法を駆使した解析が容易であるため、生殖細胞形成機構を解析する上で良い実験材料の一つである。

ショウジョウバエの生殖質は、胚の後極に局在しており、それを取り込む形で極細胞が形成される。極細胞は、胚発生の進行とともに胚内を移動し、生殖巣にとりこまれ、成虫の生殖巣中で卵や精子である生殖細胞に分化する。初期胚発生過程において、極細胞中では体細胞性遺伝子 (somatic genes) の転写が抑制されていることが知られている。この転写抑制に関わる因子の一つとして、Nanos (Nos) が同定されている。母性 Nos タンパク質は生殖質に分布し、極細胞に取り込まれる。極細胞中において、母性 Nos タンパク質は、体細胞性遺伝子の転写因子の核移行を妨げることにより、それら遺伝子の転写を抑制している。このことは、母性 Nos タンパク質が、極細胞の体細胞への分化を抑制していることを予想させる。本研究では、この点を明らかにするために母性 Nos タンパク質を欠いた極細胞 (*nos* 極細胞) の発生運命を詳細に解析し、以下の諸点を明らかにした。

- 1) 母性 Nos タンパク質を欠く胚 (*nos* 突然変異胚) において、胚発生の進行に伴い極細胞数が減少することを見いだした。また、この極細胞はアポトーシスを起こしていることも明らかにした。母性 Nos タンパク質と協同して働くことが知られている母性 Pumilio (Pum) タンパク質を欠く胚 (*pum* 突然変異胚) においても極細胞数の減少、および極細胞におけるアポトーシスの誘導が、*nos* 突然変異胚と同様に観察された。これらの結果より、Nos タンパク質は Pum タンパク質と協同して極細胞のアポトーシスを抑制することにより極細胞の維持をおこなっていることが明らかになった。
- 2) *nos* 極細胞が体細胞に分化することができるか否かを明らかにするために、*nos* 極細胞のアポトーシスを抑制することを試みた。第三染色体の H99 と呼ばれる染色体領域に含まれる *reaper* (*rpr*)、*head involution defective* (*hid*)、*grim* 遺伝子がアポトーシスに関わることが知られている (White et al., 1994; Grether et al., 1995; Chen et al., 1996)。H99 領域の欠失突然変異によって、*nos* 極細胞のアポトーシスが抑制されることを見いだした。そこで、H99 欠失突然変異によりアポトーシスを阻害した *nos* 極細胞 (*nos-H99* 極細胞) の発生運命を解析した結果、一部の *nos-H99* 極細胞が体細胞組織に取り込まれていることが明らかになった。このような *nos-H99* 極細胞は、取り込まれた体細胞組織の細胞と同様の形態をとっていた。さらに、そのような *nos-H99* 極細胞は取り込まれた体細胞組織の分化マーカーを発現しており、反対に生殖系列のマーカーである Vasa (Vas) タンパク質を失っていた。以上の結果より、*nos-H99* 極細胞は体細胞へ分化する能力を持つことが明らかとなった。

3) 上記の研究の過程で、一部の *nos-H99* 極細胞は、生殖巣に取り込まれることも明らかになった。*nos* 極細胞は生殖巣に移動する能力を完全に失っていることが知られていたが、この異常は極細胞がアポトーシスするために引き起こされると結論できる。さらに、生殖巣へ移動した *nos-H99* 極細胞の発生を観察した結果、*nos-H99* 極細胞は機能的な生殖細胞に分化することができなかった。このことは、生殖巣中で極細胞が生殖細胞へ分化する過程にも母性 Nos タンパク質が関与することを示唆している。

本研究により、極細胞は、生殖巣に移動し生殖細胞に分化する能力に加え、アポトーシスにより細胞死をおこす能力、さらに体細胞に分化する能力を持つことが明らかとなった。母性 Nos タンパク質は、アポトーシスや体細胞分化の経路を抑制することにより、極細胞を正常に生殖巣へと移動させ、生殖細胞まで分化させる機能をもつと結論できる。

II. 序

多細胞生物の体を構成する細胞は、体細胞系列と生殖系列の2つの細胞系譜に大別することができる。体細胞系列は、個体の発生とともに様々な組織に分化し、個体の死とともにその役割を終える。一方、生殖系列は有性生殖の過程を経て次世代を作りうる唯一の細胞である生殖細胞を形成し、生命の連続性を担う。このような特殊な機能を持つ生殖細胞が個体の発生過程で形成される機構は、19世紀以来、多くの研究者の興味を引き続けてきた。

多くの動物群において、生殖細胞の形成に必要な因子は、他の卵細胞質とは組織学的に異なる生殖質と呼ばれる領域に局在すると考えられてきた (Eddy, 1975)。昆虫、無尾両生類などの動物では、胚の生殖質を含む領域に紫外線を照射すると、生殖細胞の前駆細胞が形成されない (Smith, 1966; Geigy, 1931)。このように紫外線を照射した胚に、正常な生殖質を移植した場合、生殖細胞を形成する能力が回復することが明らかになっている (Okada et al., 1974; Smith, 1966)。また、生殖質が存在しない胚の領域に生殖質を移植した場合、その領域に生殖細胞の前駆細胞が形成されるが、生殖質以外の細胞質を移植した場合にはそのような細胞は形成されない (Illmensee and Mahowald, 1974; Wakahara, 1977, 1978)。以上の知見は、生殖細胞を形成するのに必要十分な働きを持つ因子が、生殖質に局在していることを示している。生殖細胞の形成機構を明らかにするためには、生殖質中の因子を単離し、その機能を明らかにすることが必要と考えられてきた。

生殖質が観察される動物の中で、ショウジョウバエは、実験発生学的な手法に加えて、突然変異を用いた遺伝学的手法による解析も可能であるため、生殖細胞の形成機構を明らかにするのに適した実験動物の1つである。以下に、ショウジョウバエの生殖細胞の発生過程について概説する。ショウジョウバエの生殖細胞は、胚発生過程の初期に、胚の後極に形成される極細胞に由来する (Underwood et al., 1980; Hay et al., 1988; Campos- Ortega and Hertenstein, 1997)。

極細胞は次のように形成される (図1)。(発生ステージは Campos- Ortega and Hertenstein, 1997 による)。まず、受精卵は卵の中央部で細胞質分裂を伴わない核分裂のみを繰り返し、卵は多核体となる (卵割期; ステージ2)。その後、卵の中央部で増殖した核は表層へと移動する。このとき、卵の後極に進入した核は、極細胞質 (生殖質) とともにくびれだし極細胞を形成する。一方、他の表層へと進入した核はそこで細胞化し、体細胞を形成する (細胞性胚期; ステージ5)。形成された極細胞は後部中腸原基の陥入に伴って移動し (ステージ6~8)、袋状の後部中腸原基に取り込まれる (ステージ9)。その後、極細胞は後部中腸原基の細胞層を通り抜け、生殖巣を構成する中胚葉性の細胞と接する (ステージ10)。極細胞はこれらの中胚葉性の細胞と接した状態で胚の内部を移動し、最終的に腹部第5体節において右左1対の生殖巣を形成する (ステージ14)。生殖巣に取り込まれた極細胞は、蛹から成虫にかけて生殖巣中で卵や精子へと分化する。

ショウジョウバエにおいて、極細胞は生殖細胞のみに分化する細胞であり、体細胞組織の発生には寄与しない。逆に、体細胞が生殖細胞に分化することもない。たとえば、紫外線照射により極細胞のみを欠いた胚は、不妊となるが、

体細胞の分化は正常におこり成虫まで発生することができる (Geigy, 1931; Okada et al., 1974)。また、遺伝学的に標識した極細胞を野生型胚に移植した場合、移植された極細胞は生殖巣に取り込まれるが、体細胞組織に取り込まれることはない (Underwood et al., 1980; Technau and Campos-Ortega, 1985)。以上の結果は、極細胞が胚発生過程の初期から体細胞とは異なった発生運命を持つことを示している。このような発生運命の相違を生み出す機構を明らかにすることが、生殖細胞形成機構を解明する上で重要と考える。

極細胞と体細胞の相違点として、細胞周期制御や転写制御の違いも報告されている。体細胞では胚発生を通じて細胞分裂が継続して観察されるのに対し、生殖巣へ移動中の極細胞では細胞周期が G2 期で停止している (Su et al., 1998; Asaoka-Taguchi et al., 1999)。これは、極細胞中で G2 期から M 期への移行に関わる Cyclin B タンパク質の合成が抑制されているためである (Asaoka-Taguchi et al., 1999)。また、体細胞中で胚性 (zygotic) 遺伝子の転写が開始するのはステージ 4 であるのに対し、極細胞中ではステージ 7/ 8 以降である (Zalokar et al., 1976; Van Doren et al., 1998)。これ以前のステージでは、極細胞中の RNA polymerase II が不活性状態にとどまっている (Seydoux and Dunn, 1997)。さらに、極細胞中では、体細胞とは異なり活性型クロマチンの指標であるヒストン H3 のリジン残基のメチル化が抑制されていることも報告されている (Schaner et al., 2003)。極細胞中で転写抑制が観察されるステージは、体細胞中でボディープラン形成に関わる遺伝子群が発現する時期と一致することから、この転写抑制は極細胞中で体細胞分化を抑制する機構の一つとして考えられてきた (Dixon, 1994)。

発生運命も含め、上記の極細胞と体細胞の相違が生じるためには、極細胞質中の母性因子の働きが必要と考えられる。前述したように、生殖細胞の形成、すなわち極細胞の形成・分化に必要な因子が極細胞質に局在している (Okada et al., 1974; Illmensee and Mahowald, 1974)。極細胞質中に局在する分子として、Oskar, Vas, Tudor タンパク質が知られている (Boswell and Mahowald, 1985; Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1986; Schüpbach and Wieshaus, 1986; Hay et al., 1988; Bardsley et al., 1993; Breitwieser et al., 1996)。これらのタンパク質は、卵形成過程において卵後極に極細胞質を形成するとともに、極細胞形成や極細胞の分化に直接関わる母性因子を極細胞質に局在させる働きを持つ (Ephurussi and Lehmann, 1992; Bardsley et al., 1993; Breitwieser et al., 1996)。現在までに、このような母性因子として、極細胞形成に関与するミトコンドリア large ribosomal RNA と *germ cell-less* mRNA、さらに極細胞分化に関与する *Polar granule component (Pgc)* RNA および *nos* mRNA が同定されている (Jongens et al., 1992; Kobayashi et al., 1993; Kobayashi et al., 1996; Nakamura et al., 1996; Iida and Kobayashi, 1999; Martinho et al., 2004)。これら母性因子のうち、*nos* mRNA によりコードされるタンパク質が、極細胞と体細胞の相違を生み出す機構に関与していることが明らかになっている (Deshpande et al., 1999; Schenar et al., 2003; 浅岡ら、論文投稿中)。

母性 *Nos* タンパク質は、当初腹部形成因子として同定されてきた (Wang and Lehmann, 1991)。卵形成過程において合成された *nos* mRNA は、Osk, Vas, Tudor タンパク質の働きにより極細胞質に局在し (Wang et al., 1994)、受精後 *nos* mRNA の翻訳が開始され、母性 *Nos* タンパク質は胚の後極から前極にかけての濃度勾

配を形成する。胚の後半部（予定腹部領域）に分布する母性 *Nos* タンパク質は、母性 *Pum* タンパク質とともに、その場所に腹部を形成する (Hülskamp et al., 1989; Irish et al., 1989; Struhl, 1989; Baker et al., 1992)。その後、極細胞が形成されるステージになると母性 *Nos* タンパク質は予定腹部領域からは消失し、極細胞中のみ観察されるようになる (Wang et al., 1994)。この後、母性 *Nos* タンパク質は、少なくとも極細胞が胚の生殖巣に取り込まれる時期まで極細胞中のみ検出される (Wang et al., 1994)。

nos 遺伝子の突然変異を用いた研究により、生殖細胞形成過程における母性 *Nos* タンパク質の機能が解析されてきた。*nos* 突然変異のホモ接合体雌より生み出された胚 (*nos* 突然変異胚) は極細胞を形成することができるが、腹部を形成異常のため致死となる (Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1991; Wang and Lehmann, 1991)。したがって、形成された極細胞が生殖細胞まで分化できるかどうかは長い間不明であった。Kobayashi ら (1996) は、*nos* 突然変異胚の極細胞 (*nos* 極細胞) を正常に発生する胚に移植し、*nos* 極細胞の発生運命を解析したところ、*nos* 極細胞は生殖巣へ移動することができず、結果として生殖細胞へ分化できないことを報告した (Kobayashi et al., 1996)。このことは、極細胞中における母性 *Nos* タンパク質の自律的 (autonomous) 機能が、極細胞の分化に必須なことを示している。

極細胞中において母性 *Nos* タンパク質が果たす分子機能について以下の点が明らかになっている。腹部形成領域では、ともに RNA 結合タンパク質である母性 *Nos* および母性 *Pum* タンパク質が、母性 *hunchback (hb)* mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) 上に存在する Nanos Response Element (NRE) と呼ばれる RNA

配列に結合し、その mRNA の翻訳を抑制することが明らかになっている (Wharton and Struhl, 1991; Murata and Wharton, 1995)。極細胞中においても母性 Nos タンパク質は母性 Pum タンパク質と協同して NRE 様の RNA 配列を含む mRNA の翻訳を特異的に抑制することが知られている (Asaoka-Taguchi et al., 1999)。極細胞中において母性 Nos および母性 Pum タンパク質により翻訳が制御される mRNA の一つとして、母性 *cyclinB* (*cycB*) mRNA が同定されている (Asaoka-Taguchi et al., 1999)。この mRNA は、卵形成過程で合成され、極細胞質に局在し、極細胞に取り込まれるという挙動を示す (Dalby and Glover, 1993)。母性 *cycB* mRNA の 3'UTR 中には NRE 様配列が含まれており (Asaoka-Taguchi et al., 1999)、極細胞中で母性 Nos および母性 Pum タンパク質がこの配列に結合することにより母性 *cycB* mRNA の翻訳を抑制している (Sonoda and Wharton, 2001)。このように、極細胞が生殖巣に移動する過程 (ステージ 6-13) において CycB タンパク質の産生が極細胞中で抑制されるため、極細胞の細胞周期が G2 期で停止する (Asaoka-Taguchi et al., 1999)。

極細胞中における母性 Nos タンパク質のターゲット mRNA として、母性 *importin- α 2* (*imp α 2*) mRNA も同定されている (浅岡ら、論文投稿中)。母性 *imp α 2* mRNA は初期胚全体に分布しているが、極細胞中では母性 Nos および母性 Pum タンパク質による NRE 依存的な翻訳抑制を受けるため、Imp α 2 タンパク質は体細胞領域のみで検出される (Török et al., 1995; 浅岡ら、論文投稿中)。Imp α 2 タンパク質は、核移行シグナルを持つ転写因子などの核タンパク質の核移行に関わる (Török et al., 1995; 浅岡ら、論文投稿中)。ステージ 4~5 の胚の極細胞中ではこのタンパク質が欠乏するために転写が抑制される。この転写の抑制

は、本来体細胞で発現し体細胞の分化過程に関わる遺伝子（体細胞性の遺伝子）の発現を極細胞中で抑制するために必要と考えられてきた。実際、*nos* 極細胞あるいは *Impα2* タンパク質を異所的に発現させた極細胞中では、体細胞性遺伝子である *fushi tarazu (ftz)*、*even-skipped (eve)* が異所的に発現する（Deshpande et al., 1999；浅岡ら、論文投稿中）。

以上の知見は、*Nos* タンパク質が極細胞の体細胞への分化を抑制していることを予想させる。本研究では、この点を明らかにするため *nos* 極細胞の発生運命を詳細に解析した。以下に結果の概略を示す。

- 1) *nos* および *pum* 突然変異胚の極細胞は、胚発生の進行に伴い、アポトーシスによって失われることが明らかになった。このことは、母性 *Nos* タンパク質が、母性 *Pum* タンパク質と協同して、極細胞のアポトーシスを抑制することにより、極細胞の維持に関与することを示している。
- 2) *nos* 極細胞のアポトーシスは、アポトーシスに関わる遺伝子群（*rpr*、*hid*、*grim*）を含む *H99* 領域の欠失突然変異によって抑制されることが明らかとなった。そこで、*nos* 極細胞が体細胞に分化できるか否かを明らかにする目的で、*H99* 欠失突然変異によりアポトーシスを阻害した *nos* 極細胞（*nos-H99* 極細胞）の発生運命を解析した。その結果、一部の *nos-H99* 極細胞が体細胞に分化することが明らかとなった。このことは、母性 *Nos* タンパク質が極細胞中で体細胞分化を抑制していることを示している。
- 3) 上記の研究の過程で、一部の *nos-H99* 極細胞は生殖巣にも取り込まれることを見いだした。*nos* 極細胞は、前述したように生殖巣へ移動することはできない。以上の結果は、極細胞が正常に生殖巣に移動するためには、母性

Nos タンパク質により極細胞のアポトーシスが抑制されることが必須であることを示している。しかし、生殖巣に移動した *nos-H99* 極細胞は、機能的な卵や精子に分化することができなかった。このことは、生殖巣中で極細胞が生殖細胞に分化する過程にも母性 Nos タンパク質が関与することを示唆している。

以上の結果から、極細胞は生殖巣に取り込まれ生殖細胞に分化する運命のみを持つ細胞ではなく、アポトーシスや体細胞分化の経路をたどることもできる多分化能を持つ細胞であることが明らかである。母性 Nos タンパク質は、アポトーシスや体細胞分化の経路を抑制することにより、極細胞を正常に生殖巣へと移動させ、生殖細胞まで分化させる機能を持つと結論できる。

III. 材料および方法

1. 実験に用いた系統および飼育

nos 突然変異系統として、*nos*^{BN}/*TM3 Sb Ser* 系統を用いた（以下、*nos*^{BN}/*TM3* 系統と略す）。*pum* 突然変異系統として、*In(3R) Msc/ TM3 Sb Ser* と *T(1;3) FC8/ TM3 Sb Ser* 系統を用いた（それぞれ *Msc/ TM3*、*FC8/ TM3* 系統と略す）。これらの系統は Lehmann 博士より供与された。

Hb タンパク質を異所的に発現する胚として、*hb ΔNRE* 胚を用いた（Wharton and Struhl, 1991）。*hb ΔNRE* 系統は Wharton 博士および Struhl 博士より供与された。極細胞で *Impα 2* タンパク質および *CycB* タンパク質を発現する系統として、当研究室で作製された *impα2-nos3'UTR* 系統および *cycB-nos3'UTR* 系統を用いた（Asaoka-Taguchi et al., 1999; 浅岡ら、論文投稿中）。

アポトーシスに必要な遺伝子として知られている *hid*、*grim*、*rpr* 遺伝子を含む *H99* 染色体領域に対する欠失突然変異として、*Df(3L)H99/ TM3 Sb Ser* 系統を用いた（*H99/ TM3* 系統と略す）。また、*hid* 突然変異系統として *hid*⁰⁵⁰¹⁴/*TM3 Sb Ser* (*hid/ TM3* 系統と略す)系統を用いた。*hid/ TM3* 系統では、*hid* 遺伝子の第 1 エクソンに P 因子が挿入されているため、*hid* mRNA の発現が検出されない（Greither et al., 1995）。*H99/ TM3* 系統および *hid/ TM3* 系統は Bloomington Drosophila Stock Center より供与された。*nos*^{BN}/*TM3* 系統、*H99/ TM3* 系統、および *hid/ TM3* 系統を用いて、*nos*^{BN} *H99/ TM3* 系統、および *nos*^{BN}*hid/ TM3* 系統を作製した（*nos-H99/ TM3*、*nos-hid/ TM3* と略す）。移植した極細胞をマークするために *PLH Δ2-3* 系統を用いた。この系統はヒートショックタンパク質 70

(*hsp70*) 遺伝子のプロモーターの下流に β -gal 遺伝子を連結した融合遺伝子が導入されている (Kobayashi et al., 1993)。*nos*^{BN}/*TM3* 系統、*H99*/*TM3* 系統、PLH Δ 2-3 系統を用いて *nos*^{BN} *H99* PLH Δ 2-3/*TM3* 系統を作成した (*nos-H99-PLH Δ 23*/*TM3* と略す)。また、*Df(3L)H99* をホモ接合体で持つ極細胞、および *nos-H99* 極細胞の発生運命を 3 令幼虫で調べる実験においては、バランサー染色体として *TM3 Sb Ser* の代わりに、*TM6 ubi-GFP* を用いた。この染色体はユビキチンプロモーターの下流に GFP 遺伝子を連結した融合遺伝子が導入されているため、GFP タンパク質が生殖細胞、および体細胞で発現する。

以上の系統は、コーンミール・寒天培地 (蒸留水 1 l に寒天 5.4 g、エビオス 70 g、グルコース 100 g を加えて沸騰させた後、プロピオン酸 3 ml、ボーキニン 7ml を加えたもの) を飼育瓶 (直径 3 cm、深さ 10 cm) に 10 ml ずつ分注したものをを用いて、25 °C の恒温室で飼育した。

採卵には羽化後 3~5 日令の成虫を用い、グレープジュースプレート (蒸留水 50 ml に寒天 2 g を加えて加熱した後、グレープジュース 50 ml、エタノール 1 ml、酢酸 1 ml を加えて固めたもの) の上に、25 °C で採卵させた。

2) 中腸分化マーカー遺伝子をプローブとした

in situ ハイブリダイゼーション

胚の固定

グレープジュースプレートからピンセットを用いて胚を回収し、蒸留水で洗

浄した後、次亜塩素酸ナトリウム溶液で脱卵殻をおこなった。脱卵殻を行った胚は、固定液 1 { [4% ホルムアルデヒド/ PBS (130 mM NaCl, 7 mM NaH₂PO₄, 3 mM NaH₂PO₄)] : ヘプタン=1:1 の混合液} を用いて、20 分間固定した。その後、固定液 1 を除き、ヘプタンと等量のメタノールを加え、30 秒間激しく振ることにより卵黄膜を除去した。卵黄膜を除去した胚はメタノール中で-20 °Cで保存した。

RNA プローブの合成

中腸で発現が見られる遺伝子として *midgut expression 1 (mex1)*、*integrin beta neu (bInt-n)*、*dGATAe* と CG11267 を選び、RNA プローブを合成した。*bInt-n* と *dGATAe* は Barkley Drosophila Genome Project の EST clone である LD09848 と LD08432 をもとに合成した。*mex1*、CG11267 に関しては、それぞれ、706bp の cDNA フラグメントおよび 589bp の cDNA フラグメントをもとに合成した。*mex1*、*bInt-n* そして *dGATAe* は胚発生期中腸で発現していることが報告されている (Schulz et al., 1991; Yee et al., 1993; 奥村ら、私信)。CG11267 は当研究室のスクリーンにより、中腸で発現する遺伝子として単離された。これら遺伝子の発現はステージ 13 以降の中腸細胞で観察されるのに対し、生殖巣中、あるいは血体腔中の極細胞においては発現が観察されない。強いシグナルを得るために、*dGATAe* と CG11267 (混合プローブ 1)、*mex1* と *bInt-n* (混合プローブ 2) の転写産物に対するプローブを混合して用いた。

アンチセンスプローブを、Dig RNA labeling kit (Roche 社) を用いて合成した。合成したプローブ溶液 50 μ l に AB 液 (80 nM NaHCO₃、120 mM Na₂CO₃、10 mM DTT) を 50 μ M 加えて 60 °C で 1 時間加水分解を行ったのち、NB 液 (300 mM

NaOAc、1 % Acetic Acid、10 mM DTT) を 100 μ l 加え反応を停止した後、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後、プローブの濃度が 100 ng/ μ l になるよう、50 %ホルムアミドに溶かし、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

ハイブリダイゼーション

固定した胚を ME (90 %メタノール、50 mM EGTA) と固定液 1、1:0、7:3、1:1、3:7 (v/v) の混合液中で順次 5 分間ずつ 3 回洗浄した。洗浄後、胚を 50 μ g/ml の Proteinase K (Merck 社、PBT に溶解) で 23 $^{\circ}$ Cで 3 分間処理し、固定液 1 で 20 分間固定した後、PBT で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。胚を Pre-ハイブリダイゼーション液 (50 %ホルムアミド、5x SSC、100 μ g/ml ヘパリン、100 μ g/ml yeast RNA、0.1 % Tween20) で 60 $^{\circ}$ Cで 1 時間処理した。その後、85 $^{\circ}$ Cで 5 分間熱処理したハイブリダイゼーション液 (50 % ホルムアミド、5x SSC、100 μ g/ml ヘパリン、100 μ g/ml yeast RNA、0.1 % Tween20、10 % Dextran Sulfate、0.2 ng/ μ l RNA プローブ) 中で 60 $^{\circ}$ Cで約 16 時間、ハイブリダイゼーションをおこなった。

その後、胚を洗浄用ハイブリダイゼーション液 (50 %ホルムアミド、5x SSC、0.1 % Tween20) で 60 $^{\circ}$ Cで 30 分ずつ 6 回洗浄した。

発色 (TSA Biotin System)

胚を TNT (100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5、150 mM NaCl、0.5 % Tween 20) で 5 分ずつ 3 回洗浄した後、TNB (100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5、150 mM NaCl、0.5 % Blocking reagent) で 30 分間ブロッキングをおこない、胚に HRP 標識抗 Dig 抗体 (Roche 社) を TNB で 1/ 250 になるように希釈したものを加え 30 分間静か振とうした。TNT で 30 分間ずつ 3 回洗浄したのち、キット付属の Biotinyl

Tyramide stock solution を Amplification Dilution で 1/50 に希釈したものを加え 20 分間反応させた。その後、PBTx (0.1% Triton X-100 in PBS) で 20 分間ずつ 3 回洗浄した。その後、これらの胚に対し、 β -galactosidase (β -gal) と Vas タンパク質への免疫組織化学染色を行った。

3) 免疫組織化学染色

抗 Vas 抗体による極細胞の染色

極細胞を標識するために、抗 Vas 抗体による免疫組織化学染色をおこなった。2) の方法に従って脱卵殻した胚を、固定液 2[(4 % パラホルムアルデヒド/PBS) :ヘプタン= 1:1 の混合液]を用いて、30 分間固定した。固定した胚の卵黄膜を、a-1 の方法に従って除去した。その後、胚を PBTw (0.2 % Tween20 in PBS) で約 30 秒間ずつ 3 回、その後 30 分間ずつ 2 回洗浄した。その後、ブロッキング液 {5% Goat Serum in BAT[0.2% Tween20 in BlockAce (大日本製薬)]} で 1 時間、ブロッキングした。その後、胚を一次抗体溶液 (ラット抗 Vas 抗体を BAT で 1/2000 になるように希釈したもの) 中で 4 °C で約 16 時間反応させた。ラット抗 Vas 抗体は Lasko 博士、そして中村博士から供与されたものを用いた。その後、胚を 10 % BAT (0.2 % Tween20 in 10 % BlackAce) で約 30 秒間ずつ 3 回洗浄したのち、30 分間ずつ 2 回洗浄した。洗浄した胚を二次抗体溶液 [ヤギ TexasRed 標識抗ラット IgG 抗体 (Cappel 社) を BAT で 1/50 に希釈したもの] 中で 4°C で約 16 時間反応させた。その後、胚を 10 % BAT によって、約 30 秒間ずつ 3 回洗浄したのち、30 分間ずつ 2 回洗浄し、VECTASHIELD Mounting

Medium (Vector 社) で封入した。

in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学染色の多重染色

in situ ハイブリダイゼーション、抗 β -gal 抗体そして抗 Vas 抗体による三重染色を次のような方法でおこなった。*in situ* ハイブリダイゼーション後の胚を、ブロッキング液で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体溶液[ウサギ抗 β -gal 抗体 (Chemicon international 社) そしてラット抗 Vas 抗体をそれぞれ、1/400、1/ 2000 になるように BAT で希釈したもの]中で 4 °C で約 16 時間、反応させた。その後、PBTw で約 30 秒間ずつ 3 回、30 分ずつ 2 回洗浄した。洗浄した胚に関して二次抗体溶液[ヤギ FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel 社) とヤギ Alexa647 標識抗ラット IgG 抗体 (Molecular probe 社) をそれぞれ、1/ 50、1/ 500 になるように BAT で希釈したもの]中で、4 °C で約 16 時間反応させた。その後、PBTw で約 30 秒間ずつ 3 回、30 分ずつ 2 回洗浄した。洗浄した胚を三次抗体溶液[ヤギ抗 FITC 抗体 (Molecular probe 社) を BAT で 1/ 60 になるように希釈したもの]中で 4 °C で約 16 時間反応させた。その後、胚を PBTw によって、約 30 秒間ずつ 3 回洗浄したのち、30 分間ずつ 2 回洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium (Vector 社) で封入した。

4) 極細胞におけるアポトーシスの検出

極細胞でアポトーシスが誘導されているかどうかを検出するために TUNEL と抗 Vas 抗体による二重染色を行った。2) の方法で脱卵殻した胚を、固定液 2 中で、30 分間固定した。固定後、2) の方法により卵黄膜を除去した。その後、

胚を 0.3 % PBTx (0.3 % triton X-100 in PBS) 中で約 30 秒を 3 回、さらに 30 分を 2 回洗浄した。その後、洗浄液 [0.3% triton X-100 を含む TUNEL buffer (Roche 社)] で 30 分間洗浄した。その後、胚を TUNEL 反応液 { [TUNEL 酵素 (Roche 社)] と反応液 [6.7 uMdUTP/ 3.3 uM ビオチン標識化 dUTP/ TUNEL buffer (Roche 社)] を 1 : 9 に混合したもの} 中で、37°C で 3 時間反応させた。その後、胚を 0.3 % PBTx 中で約 30 秒を 3 回、さらに 30 分を 2 回洗浄した。その後、蛍光染色液 [アビジン標識 FITC (Vector 社) を Block Ace で 30 倍に希釈したもの] 中で、室温で 1 時間反応させた。その後、10 % BAT 中で約 30 秒を 3 回、さらに 30 分を 2 回洗浄した。その後、3) の方法で抗 Vas 抗体を用いた免疫組織化学染色をおこなった。

5) 極細胞移植

極細胞移植の器具および操作については、小林 (1990a, b, c) の方法に従った。供与体、宿主ともに、25 °C で 50 分間グレープジュースの表面に産卵させた後、25 °C でステージ 5 まで発生させた胚を用いた。これらの胚をそれぞれ回収し、蒸留水で洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム溶液で卵殻を除去した。このような胚を、スライドガラスに貼った両面テープの上に供与体と宿主の胚を後極を向かい合わせにそれぞれ一列に並べた。これらの胚をシリカゲルの入ったデシケーターの中で約 5 分間乾燥させた後、シリコンオイル (信越シリコーン (株)、FL-100、450cs) で胚を覆った。内径 9~12 μm のガラス針を供与体の前極から挿入し、極細胞をガラス針に吸い込み、その後、ガラス針を宿主胚の後極の囲卵腔に挿入し極細胞を注入した。

移植後、保湿箱中で 25 °C で発生させた。移植した極細胞中で β -gal を発現させるため、ヒートショック処理を行った。ヒートショック処理は、保湿した金属シャーレ中に、極細胞移植を行った胚をのせたスライドグラスを入れ、シャーレを 36 °C の水中に 30 分間沈めた。その後、保湿箱中で 25 °C、1 時間放置した。その後、6) の方法で β -gal 活性染色をおこなった。

6) β -gal 活性染色

5) の方法で移植をおこなった宿主胚を、固定液 3 [(2.5 % グルタルアルデヒド/ PBS):ヘプタン=1:1 の混合液] 中で 30 分間ローテーターで固定した。その後、胚を発色液[染色用緩衝液 500 μ l に X-gal を 0.8 μ g 加えたもの] 中で 37 °C で約 24 時間発色させた。この胚を、黒いビニールテープの上に乗せ、70 % エタノールを滴下し、胚の卵黄膜をタングステン針をもちいて除去した。卵黄膜を除去した胚をエタノールで脱水後、ヒストクリア (National diagnostics 社) で透徹し、オイキットで封入した。

7) 蛍光シグナルの検出

蛍光標識したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡[励起光源として ArKr レーザー、エミッションフィルターとして BF530/ 30、LP590、LP665 (Leica Microsystems 社)]により観察した。

IV. 結果

1) Nos タンパク質による極細胞のアポトーシス抑制

母性 Nos タンパク質を欠く胚 (*nos* 突然変異胚) に形成された極細胞 (*nos* 極細胞) の発生運命を解析する過程で、以下のことが明らかになった。正常胚において、形成された極細胞が生殖巣まで移動する時期 (ステージ 5~13) では極細胞数の増減は観察されない (図 2A)。これに対し、*nos* 突然変異胚においては、ステージ 9/10 より極細胞数が減少を開始し、胚発生過程の後期 (ステージ 15/16) に至るまで減少を続け、大部分の極細胞が消失することが明らかとなった (図 2A)。この時期の極細胞の形態を観察すると、図 2C のように極細胞が分断化されている像が観察された。このような現象は正常胚では観察されない (図 2B)。細胞の分断化はアポトーシスを起こしている細胞に見られる特徴の一つであることから (Jacobson et al., 1997)、*nos* 突然変異胚における極細胞数の減少はアポトーシスによるものと予想できる。そこで、*nos* 突然変異胚を TUNEL 法 (Gavrieli et al., 1992) を用いて染色した。その結果、正常胚では、ステージ 10 から 16 にかけて TUNEL 法により染色される極細胞はほとんど観察されなかったのに対し、*nos* 突然変異胚においてはステージ 9/10 より胚発生後期に至るまでの期間、TUNEL 法により染色される極細胞が観察された (図 3A-C)。このとき、あるステージにおいて観察される TUNEL シグナルをもつ極細胞の数は、その直後のステージにおいて減少する極細胞数とほぼ一致した。以上の結果より、母性 Nos タンパク質は極細胞のアポトーシスを抑制

することで、極細胞の維持をおこなっていることが明らかとなった。

母性 *Nos* タンパク質は母性 *Pum* タンパク質と協同して機能することが知られている (Hülkamp et al., 1989; Irish et al., 1989; Struhl, 1989; Baker et al., 1992; Asaoka-Taguchi et al., 1999)。そこで、*pum* 突然変異胚における極細胞数の変化を調べた。その結果、*nos* 突然変異胚の場合と同様に、極細胞は胚発生ステージ 9/10 より減少を開始し、胚発生後期に至るまで減少し続けることが明らかになった (図 4A)。また、*pum* 突然変異胚の極細胞においても、*nos* 突然変異胚と同様に、アポトーシスが誘導されていることも明らかとなった (図 5A, C)。以上の結果から、母性 *Nos* タンパク質は、母性 *Pum* タンパク質と協同して、極細胞のアポトーシスを抑制していることが明らかになった。

2) *Nos* タンパク質による極細胞のアポトーシス抑制機構

nos 極細胞が体細胞に分化する能力を持つか否かを明らかにするためには、極細胞のアポトーシスを抑制する必要がある。この目的のために、極細胞のアポトーシスに関与する遺伝子の同定を試みた。前述したように、母性 *Nos* タンパク質は、母性 *Pum* タンパク質と協同して、NRE 配列に結合し、その配列を持つ mRNA の翻訳抑制をおこなっている (Wharton and Struhl, 1991; Murata and Wharton, 1995)。現在までに、母性 *Nos* タンパク質により翻訳が抑制される mRNA として、*hb*、*cycB*、*impα2* が同定されている (Wharton and Struhl, 1991; Murata and Wharton, 1995; Asaoka-Taguchi et al., 1999; 浅岡ら、論文投稿中)。そこで、これら mRNA がコードするタンパク質を極細胞中で強制発現させたときにアポトーシスが誘導されるか否かを調べた。

2-1) Hb タンパク質は極細胞のアポトーシスを誘導しない

hb mRNA は、卵形成過程で合成され初期胚の全体に分布するが (Tautz and Pfeifle, 1989)、極細胞中ではこの mRNA の翻訳は抑制されている。この翻訳抑制には *hb* mRNA の 3'UTR 中の NRE 配列が必須である (Wharton and Struhl, 1991)。実際に、NRE 配列を欠失させた *hb* mRNA (*hb* ΔNRE) は正常な極細胞中でも、他の体細胞領域と同様に翻訳される (Wharton and Struhl, 1991)。そこで、この *hb* ΔNRE を発現する胚において、極細胞がアポトーシスするか否かを調べた。その結果、このような胚では胚発生過程を通じて、TUNEL シグナルをもつ極細胞は観察されなかった (図 6A、C)。これより、*nos* 突然変異胚の極細胞のアポトーシスには、Hb タンパク質は関与しないと考えられる。

2-2) CycB および Impα2 タンパク質は極細胞のアポトーシスを誘導しない

母性 *Nos* タンパク質は極細胞内において、*cycB* および *impα2* mRNA の翻訳を抑制している (Asaoka-Taguchi et al., 1999; 浅岡ら、論文投稿中)。これらの mRNA にコードされるタンパク質を強制的に極細胞中で発現させるために、*CycB* あるいは *Impα2* タンパク質をコードする cDNA 領域を *nos* 遺伝子のプロモーター配列 (*nos promoter*) の下流に、さらにそれらの下流に *nos* 遺伝子の 3'UTR (*nos* 3'UTR) を連結させた融合遺伝子を持つ系統 (*cycB-nos3'UTR* 系統および *impα2-nos 3'UTR* 系統) を用いた (Asaoka-Taguchi et al., 1999; 浅岡ら、論文投稿中)。これらの系統では、*nos promoter* の働きにより卵形成過程で mRNA が転写され、*nos* 3'UTR の働きで卵の後極に局在し、受精後に翻訳され極細胞に

取り込まれる (Bergsten and Gavis, 1999; Asaoka-Taguchi et al., 1999)。これら系統の雌より産み出された胚において、極細胞がアポトーシスを起こすかどうかを TUNEL 法を用いて調べた。その結果、両系統から得られた胚において、TUNEL シグナルを持つ極細胞は観察されなかった (図 7A、C、図 8A、C)。この結果から、*nos* 突然変異胚の極細胞のアポトーシスは、CycB および Imp α 2 タンパク質に依存しないと考えられる。

2-3) 極細胞のアポトーシスには H99 領域の遺伝子群が必要である

ショウジョウバエでは、アポトーシスに関与する遺伝子として、*reaper (rpr)*、*head involution defective (hid)*、*grim* が知られている (White et al., 1994; Grether et al., 1995; Chen et al., 1996)。これらの遺伝子はともに第三染色体の H99 と呼ばれる染色体領域に存在する。このうち、*hid* 遺伝子から転写される mRNA の 3'UTR 中に、NRE 様配列が存在することを見出した。このことから、*nos* 極細胞中では Hid タンパク質が合成されるためにアポトーシスが誘導されると予想できる。そこで、H99 領域および *hid* 遺伝子の欠失突然変異により、*nos* 突然変異胚における極細胞のアポトーシスが抑制されるか否かを調べた。母性 Nos タンパク質を欠き、かつ胚性 H99 を欠く胚 (*nos-H99* 胚) において、TUNEL シグナルをもつ極細胞が観察されるかどうかを調べた。その結果、*nos-H99* 胚において TUNEL シグナルをもつ極細胞は観察されなかった (表 1)。このことから、*nos* 突然変異胚の極細胞のアポトーシスには、H99 領域の遺伝子群の働きが必要であることが明らかになった。さらに、母性 Nos タンパク質を欠きかつ胚性 *hid* 遺伝子の機能を欠く胚 (*hid-H99* 胚) においても、TUNEL シグナルを

もつ極細胞の割合が、正常胚と比較した場合、有意に減少していた（表 2）。このことは、*nos* 突然変異胚における極細胞のアポトーシスには Hid タンパク質の働きが必要であることを示している。

3) *nos-H99* 極細胞の発生運命の解析

3-1) *nos-H99* 極細胞は体細胞に分化できる

上記の研究から、*H99* 領域の欠失突然変異により *nos* 極細胞のアポトーシスをほぼ完全に抑制できることが明らかとなった。そこで、*nos-H99* 胚の極細胞を用いて、この極細胞が体細胞に分化することができるのか否かを調べた。

nos-H99 胚は母性 Nos タンパク質を欠いているため、腹部が形成されず胚性致死となる。そこで、*nos-H99* 胚より極細胞のみをガラス針で吸い出し、正常胚に移植し、極細胞の発生運命を解析した。移植した極細胞を宿主胚の細胞と区別するために、ヒートショックにより胚全体で β -galactosidase (β -gal) を発現することのできる融合遺伝子 (PLH Δ 2-3) を *nos-H99* 胚に導入した。移植後にヒートショック処理を行えば、宿主胚に移植された *nos-H99* 極細胞のみが β -gal を産生する(表 3 参照) (Kobayashi et al., 1996)。

胞胚期 (ステージ 5) の宿主胚に *nos-H99* 極細胞を移植し、ステージ 17 まで発生させた後に、固定し β -gal 産生細胞の分布を調べた。その結果、移植された *nos-H99* 極細胞が中腸上皮、胃盲のう、気管上皮などの体細胞組織に取り込まれている像が観察された (図 9A-C、表 3)。これに対し、control 胚の極細胞あるいは母性 Nos タンパク質のみを欠く *nos* 極細胞 (遺伝子型に関して表 3 参

照) を移植した場合には、体細胞組織に取り込まれるものは観察されなかった (表 3)。

体細胞組織に取り込まれた *nos-H99* 極細胞は、周囲の宿主由来の体細胞組織の細胞とほぼ同じ形態をとっていた (図 9A-C)。たとえば、中腸上皮に取り込まれた *nos-H99* 極細胞は、周囲の細胞と同様の柱状上皮構造をとっていた (図 9A)。一方、血体腔中に取り残された *nos-H99* 極細胞は球状であり、このような形態をとることはなかった (図 10J)。また、移植された control 胚の極細胞も球状であった (図 11A)。これらの結果は、体細胞組織に取り込まれた *nos-H99* 極細胞が体細胞へ分化したことを強く示唆している。しかし、形態学的な観察だけからでは、これらの極細胞が体細胞へ分化したとは結論づけられない。そこで、次に体細胞組織に取り込まれた *nos-H99* 極細胞が、体細胞の分化マーカーを異所的に発現するか否かを調べた。

表 3 より、*nos-H99* 極細胞は体細胞組織のなかでも特に中腸上皮に高頻度で取り込まれていることが明らかになった。そこで、中腸上皮に取り込まれた *nos-H99* 極細胞に注目し、その極細胞が中腸の分化マーカーを発現するかどうかを調べた。中腸の分化マーカー遺伝子としては *CG11267*、*dGATAe*、*integrin beta neu (bInt-n)* さらに *midgut expression 1 (mex1)* を選択した。これらの遺伝子は、胚の中腸で特異的に発現することが知られている (Schulz et al., 1991; Yee et al., 1993; 奥村ら、私信)。また、これらの遺伝子の発現は、生殖巣中、あるいは血体腔中の極細胞においては発現が観察されない。強いシグナルを得るために、*CG11267* と *dGATAe* (混合プローブ 1)、*bInt-n* と *mex1* (混合プローブ 2) の転写産物に対するプローブを混合して、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

nos-H99 極細胞を移植した宿主胚に対し、これらプローブおよび生殖系列のマーカである Vas タンパク質に対する抗体、さらに β -gal に対する抗体を用いて 3重染色を行った。その結果、中腸上皮に取り込まれた全ての *nos-H99* 極細胞はこれらの分化マーカーを異所的に発現し、Vas タンパク質を失うことが明らかとなった [調べた極細胞数 (N) =13 (混合プローブ 1)、N=9 (混合プローブ 2)] (図 10A-E)。一方、体細胞に取り込まれなかった *nos-H99* 極細胞は、Vas 陽性であり、中腸分化マーカーを発現していなかった [N=11 (混合プローブ 2)] (図 10F-O)。以上の結果より、*nos-H99* 極細胞は中腸上皮細胞に分化したと結論づけられる。

3-2) *nos-H99* 極細胞は生殖巣へ移動することもできる。

上記の研究の過程で、*nos-H99* 極細胞は体細胞組織だけでなく生殖巣にも取り込まれることが明らかとなった (図 11C、表 3)。一方、*nos* 極細胞を宿主胚に移植しても、その極細胞は決して生殖巣には取り込まれない (Kobayashi et al., 1996) (図 11B、表 3)。このことは、*nos* 極細胞も生殖巣へ移動する能力は保持しているが、*nos* 極細胞中でアポトーシスが誘導されるために、生殖巣への移動ができなくなると解釈できる。

生殖巣に取り込まれた *nos-H99* 極細胞は、形態学的に宿主胚の極細胞と違いは認められなかった (図 11C、図 11O)。また、これら極細胞は宿主胚の極細胞と同様に Vas 陽性である (図 10M)。そこで、生殖巣にとりこまれた *nos-H99* 極細胞が生殖細胞に分化することができるかどうかを発生を追って観察した。*nos-H99* 極細胞由来の細胞は、少なくとも 3 齢幼虫期まで、宿主個体の卵巣中

に観察できた (図 12B、C、表 4)。しかし、この細胞は、宿主の生殖系列の細胞と比べてサイズが小さく、また Vas シグナルも減少していた。3 齢幼虫の精巣中では、*nos-H99* 極細胞由来の細胞は観察できなかった (図 13C、表 5)。これらの結果は、*nos-H99* 極細胞は生殖巣へ移動するものの、その後、正常に生殖細胞へ分化することができないことを示している。これに対し、母性 Nos タンパク質は正常で *H99* 領域のみを欠く極細胞 (*H99* 極細胞) に由来する細胞は、3 齢幼虫の卵巣および精巣において観察され、その形態は宿主の生殖系列の細胞と同様であった (図 12A、図 13A、B)。このことは、生殖巣に取り込まれた極細胞の分化過程にも母性 Nos タンパク質が必要であることを示している。

V. 考察

母性 *Nos* タンパク質による極細胞のアポトーシス抑制機構

本研究において、*nos* 突然変異胚の極細胞はアポトーシスを起こすことが明らかとなった。また、*nos* 突然変異胚では極細胞数が減少することも明らかとなった。以下の理由から、この極細胞数の減少は、極細胞のアポトーシスに起因すると考えられる。第1に、細胞死にはアポトーシス以外にネクローシスが知られているが (Jacobson et al., 1997)、*nos* 突然変異胚の極細胞において、細胞の膨潤、それに引き続く細胞の破裂などネクローシスに特異的な現象が観察されない。第2に、*nos* 突然変異胚の極細胞において TUNEL シグナルが観察され始めるステージと極細胞数が減少し始めるステージが一致していること、第3に、あるステージで TUNEL シグナルが観察される極細胞数とその次のステージまでに減少する極細胞数とがほぼ一致することがあげられる。以上の結果を考えあわせると、母性 *Nos* タンパク質は極細胞のアポトーシスを抑制することにより極細胞の維持をおこなっていると結論できる。

母性 *Nos* タンパク質は、*Pum* タンパク質とともに NRE 配列に結合し、その配列をもつ mRNA の翻訳抑制をおこなう (Hülkamp et al., 1989; Irish et al., 1989; Struhl, 1989; Baker et al., 1992; Asaoka-Tagichi et al., 1999)。本研究において、*pum* 突然変異胚の極細胞は、*nos* 突然変異胚の場合と同様の発生ステージより減少しはじめ、胚発生過程を通じて減少し続けることが明らかになった。また、各発生ステージにおいてアポトーシスを起こす極細胞の割合も *nos* および *pum* 突

然変異胚の間で有意な差は観察されなかった。このことは、母性 Nos と母性 Pum タンパク質が協同して極細胞のアポトーシスの抑制に関わっていることを強く示唆している。おそらく、母性 Nos と母性 Pum タンパク質は、アポトーシスに関わるタンパク質をコードする mRNA の翻訳を、NRE 配列依存的に抑制すると考えられる。母性 Nos および母性 Pum タンパク質は、NRE 配列依存的に、*hb*、*cycB*、*impa2* mRNA の翻訳を極細胞中で抑制していることが知られているが、これら mRNA にコードされるタンパク質の強制発現では、極細胞のアポトーシスは誘導されなかった。このことから、これらタンパク質が極細胞のアポトーシスに關与する可能性は低いと考えられる。

本研究において、*H99* 領域の欠失突然変異により *nos* 極細胞のアポトーシスが抑制されることを明らかにした。さらに、*nos* 極細胞のアポトーシスには、この *H99* 領域の遺伝子の一つである *hid* の働きが必要であることも明らかとなった。極細胞中で Hid タンパク質を強制的に発現させる実験は行っていないが、体細胞において、Hid タンパク質はアポトーシスの誘導に十分な働きがあることが報告されている (Greither et al., 1995)。このことから、母性 Nos および母性 Pum タンパク質は Hid タンパク質の発現を極細胞中で阻害することにより、極細胞のアポトーシスを抑制していると考えられる。この考えを支持する事実として、*hid* mRNA の 3'UTR 中に NRE 様配列が存在することがあげられる。*hid* mRNA が母性 Nos タンパク質によって翻訳抑制をうけるか否か、さらに *hid* mRNA 上の NRE 様配列がこの翻訳抑制に必須であるのかを明らかにすることが今後の課題である。

母性 Nos タンパク質による体細胞分化の抑制機構

本研究の大きな目的は、母性 Nos タンパク質を欠く極細胞が体細胞に分化する能力を持つかを明らかにすることであった。しかし、*nos* 極細胞はアポトーシスにより細胞死を起こす。そこで、*nos-H99* 極細胞の発生運命を極細胞移植を用いて解析した結果、*nos-H99* 極細胞の一部が体細胞組織に取り込まれること、体細胞組織のうち中腸上皮に取り込まれた極細胞は中腸の分化マーカーを異所的に発現すること、このような極細胞は Vas の発現を失うことを明らかにした。これらの結果は、*nos-H99* 極細胞が生殖系列としての性質を失い、中腸上皮細胞へと分化したことを示している。*nos-H99* 極細胞は中腸上皮以外にも、気管上皮、脂肪体、胃盲のう、マルピギー管上皮などの組織に取り込まれていた。これら体細胞組織に取り込まれた極細胞がそれぞれの組織の分化マーカーを発現しているか否かは明らかになっていないが、極細胞の形態から判断して、極細胞が各体細胞に分化していると考えられる。このような組織は、外胚葉、中胚葉、内胚葉由来の組織を含んでいる。*nos-H99* 極細胞は、3 胚葉由来のどの細胞にも分化する能力を持っているのであろう。

nos-H99 極細胞が分化する体細胞の種類はどのように決定されるのであろうか。極細胞が形成される胚の後極には、胚の両端の中腸（内胚葉）の決定に関わる Torso 受容体のシグナルが分布しており、このシグナルを極細胞が受容していることを示唆する結果が得られている (Li et al., 2003)。また、形成された極細胞は、初期胚の背腹軸決定（外胚葉および中胚葉）に関わる Dpp シグナルを受容していることを示唆する結果も得られている (Dorfmann and Shilo, 2001)。このうち Torso は中腸の形成に重要な働きを持つことから (Duffy and Perrimon,

1994)、Torso 下流のシグナル伝達経路の影響により *nos-H99* 極細胞が中腸に分化したと考えられる。また、Dpp 等の他のシグナルを受容することにより、*nos-H99* 極細胞は他の体細胞組織に分化することも考えられる。この考えは、*nos-H99* 極細胞の発生運命が、各々のシグナル伝達を阻害することによって影響をうけるか否か調べることにより検証できる。これは、今後の課題の一つである。

母性 Nos タンパク質は、極細胞中において *Impα2* タンパク質の産生を阻害することにより、体細胞性の遺伝子発現を抑制している（浅岡ら、論文投稿中）。このことから、母性 Nos タンパク質を欠く極細胞の体細胞への分化には *Impα2* タンパク質が関与すると予想できる。実際、*nos-H99* 極細胞の体細胞分化には *Impα2* タンパク質の機能が必要であることを示唆する結果が得られている。RNA 干渉法によって、*nos-H99* 胚の *Impα2* タンパク質の産生を阻害した場合、*nos-H99* 胚の極細胞が体細胞に分化することはない（林 誠、2004）。しかし、*Impα2* タンパク質のみを正常な極細胞中で発現させても、その極細胞は体細胞へ分化しない（林 誠、2004）。このことから、極細胞が体細胞へ分化するためには、*Impα2* タンパク質だけではなく他の分子の働きも必要と考えられる。母性 Nos タンパク質は、*Impα2* タンパク質を含む、複数のタンパク質の産生を翻訳レベルで抑制することによって極細胞の体細胞分化を抑制していると予想できる。

極細胞の移動過程における母性 Nos タンパク質の機能

本研究のもう 1 つの重要な成果は、母性 Nos タンパク質を欠く極細胞であつ

でも、アポトーシスを阻害すれば生殖巣に移動することができることを明らかにした点にある。現在まで、母性 *Nos* タンパク質を欠く極細胞は生殖巣に取りこまれなくなることから、このタンパク質が極細胞の生殖細胞への移動に重要な役割を持つと考えられてきた。しかし、本研究の成果より、*nos* 極細胞が生殖巣に移動することができないのは、単にアポトーシスの過程に入ることにより極細胞が正常な機能を果たせなくなるためと考えられる。母性 *Nos* タンパク質は、極細胞のアポトーシスを抑制することにより、極細胞を正常に生殖巣まで移動させるという許容的 (*permissive*) な働きをもつといえる。このことは、極細胞は潜在的にアポトーシスをするように運命づけられていることを示唆している。どのような機構でアポトーシスに関わる遺伝子が極細胞中で発現するのかを今後解析することにより、この現象の発生学的な意義が明らかになるものと考えている。

母性 *Nos* タンパク質による極細胞の発生運命の制御

本研究で得られた成果を総合すると、極細胞は、生殖巣に移動し生殖細胞に分化する能力とともに、アポトーシスや体細胞に分化する能力を持つことが明らかとなった。このことは、極細胞が潜在的に多分化能を持つ細胞であることを示している。母性 *Nos* タンパク質は、アポトーシスや体細胞分化を抑制することで、極細胞を正常に生殖細胞に分化させることができると考えられる。この意味において、母性 *Nos* タンパク質は、極細胞の維持および生殖細胞と体細胞分化のスイッチ役として重要な役割を果たしていると考えられる。

前述したように、*nos-H99* 極細胞は、生殖巣に移動することも、体細胞に分

化することもできる。*nos-H99* 極細胞が、相反する2つ発生運命を同時に持つことはどのように説明できるのであろうか。ここで考慮すべき重要な点は、全ての極細胞が体細胞組織に取り込まれるわけではないということである。さらに、母性 Nos タンパク質を失った場合に体細胞性の遺伝子が発現する極細胞も全体の一部にすぎない (Deshpande et al., 1999; 浅岡ら、論文投稿中)。また、母性 Nos タンパク質を失ったときに観察される RNA polymerase II の活性化や活性化クロマチンに特徴的なヒストン H3 のリジン残基メチル化も一部の極細胞に限局されている (Schenar et al., 2003; 浅岡ら、論文投稿中)。これらのことを考え合わせると、極細胞はヘテロな集団であり、体細胞に分化することのできる極細胞とそうでない極細胞が存在すると予想できる。母性 Nos タンパク質はこの両集団のアポトーシスを抑制し極細胞の維持を行うとともに、体細胞分化の経路を抑制することにより、これら2種類の極細胞を正常に生殖細胞へと分化させる働きを持つと考えている (図 14)。

上記の仮説は、極細胞中に母性 Nos タンパク質に依存しない遺伝子発現抑制機構が存在することを予想させる。実際、*pgc RNA* と呼ばれる non-coding RNA が、一部の極細胞中で体細胞性の遺伝子発現や RNA polymerase II の活性化を抑制していることが最近明らかとなった (Martinho et al., 2004)。母性 Nos タンパク質とともに、*pgc RNA* の機能を阻害した極細胞がどのような挙動を示すのかを明らかにすることも今後の課題である。

生殖巣中の極細胞における母性 Nos タンパク質の機能

これまで、母性 Nos タンパク質は、極細胞が形成され生殖巣に移動するまで

の期間に機能が限定されると考えられてきた。しかし、本研究により、母性 Nos タンパク質が生殖巣に取り込まれた後の極細胞の発生にも関与することが明らかとなった。一部の *nos-H99* 極細胞は生殖巣に取り込まれることは前述したが、この極細胞は生殖系列の細胞として正常に発生しない。3 令幼虫期に至る過程で、*nos-H99* 極細胞は、精巣中では退化してしまう。また、卵巣中では、*nos-H99* 極細胞に由来する細胞は観察されるが、Vas の発現が減少し、形態学的にも正常な生殖系列の細胞と異なる。*H99* の活性のみを欠く極細胞に由来する細胞は、3 令幼虫期までは、精巣および卵巣中で正常に発生することから、*nos-H99* 極細胞由来の細胞に見られるこの発生異常は、*H99* 領域の遺伝子の働きが失われたためではなく、母性 Nos タンパク質を欠いたことが原因と考えられる。最近の研究によって、胚性 Nos タンパク質の機能が幼虫期の生殖系列の発生に必要なことが明らかになった (Wang and Lin, 2004)。胚性 Nos タンパク質は、胚発生後期から生殖巣中の極細胞で発現が開始し、その後生殖系列の細胞中で引き続き発現する (Wang et al., 1994)。幼虫の卵巣中において、胚性 Nos タンパク質は生殖系列の細胞が配偶子形成過程に入ることを抑制している。したがって、胚性 Nos タンパク質を欠くと、卵巣内の生殖系列の細胞は、早期に配偶子形成過程に進行するが、配偶子形成に必須な濾胞細胞が欠如しているため、結果的に退化してしまう。*nos-H99* 極細胞が生殖巣中で早期に配偶子形成過程に進行するかは明らかではないが、母性 Nos タンパク質も、生殖巣中の極細胞で同様の機能を持つ可能性が考えられる。

Nos タンパク質の機能の普遍性

nos 遺伝子は、脊椎・無脊椎動物を問わず、マウス、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、線虫、ヒドラなどの動物種で保存されている (Zhou and King, 1996; Subramanian and Seydoux, 1999; Mochizuki et al., 2000; Köprunner et al., 2001; Tsuda et al., 2003)。また、これらの動物において *nos* 遺伝子産物は始原生殖細胞に局限して観察される。マウス、ゼブラフィッシュ、線虫では *nos* 遺伝子の機能解析が行われており、いずれの場合も、始原生殖細胞の維持に関わることが報告されている (Subramanian and Seydoux, 1999; Köprunner et al., 2001; Tsuda et al., 2003)。特に、マウスでは、3種類ある *nos* ホモログのうち *nos2* 遺伝子の機能を欠く胚では、雄の始原生殖細胞がアポトーシスを起こし退化する (Tsuda et al., 2003)。また、*nos3* の機能を欠く胚では、移動過程にある雌雄の始原生殖細胞が消失する (Tsuda et al., 2003)。Nos タンパク質が、これらの動物種においてショウジョウバエと同様の機構により始原生殖細胞の維持をおこなっているのかを明らかにすることは今後の課題である。

本研究で明らかにした Nos タンパク質による体細胞分化の抑制という現象は、現在までに他の動物種では報告されていない。体細胞分化の抑制という点に関し、線虫では Pie-1 と呼ばれるタンパク質がこの役割を担っている (Mello et al., 1992)。Pie-1 タンパク質を欠く始原生殖細胞中では、転写の脱抑制がおり、体細胞性の遺伝子発現が活性化され、結果として体細胞に分化する。しかし、Pie-1 と同様の遺伝子は、他の動物種では知られていない。したがって、動物界に広く保存されている Nos タンパク質が、始原生殖細胞の維持とともに、体細胞分化の抑制もおこなっている可能性も考えられる。いずれにしても、Nos タ

ンパク質は多くの動物に共通して生殖細胞の形成に関わる分子である。したがって、本研究で明らかにした知見は、ショウジョウバエのみならず、他の動物の生殖細胞形成機構を明らかにする上での基礎になるものと考えている。

VI. 謝辞

本研究を進めるにあたり、懇篤なご指導を賜り、論文校閲に多大なる尽力を惜しまれなかった小林悟教授に心より御礼申し上げます。また、始終細やかなご指導を頂きました、浅岡先生、向先生、林誠さんに深く感謝いたします。さらに、ウサギ抗 Vas 抗体、およびラット抗 Vas 抗体を譲与して下さった Lasko 博士、中村博士、*nos* 突然変異体、および *pum* 突然変異胚を譲与して下さった Lehmann 博士、*hbΔNRE* 系統を譲与して下さった Wharton 博士、Struhl 博士、*dGATAe* および *bInt-n* cDNA クローンを譲与して下さった村上博士に謝意を捧げます。日頃、有益な討論をしてくださり、また励まし、あたたかく見守って下さいました小林研究室の皆様感謝いたします。ありがとうございました。

VII. 参考文献

Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K. and Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* **1**, 431-437.

Bergsten, S. E. and Gavis, E. R. (1999). Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development.* **126**, 659-669.

Baker, D. D., Wang, C., Moore, J., Dickinson, L. K. and Lehmann, R. (1992). Pumilio is essential for formation but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos. *Genes Dev.* **6**, 2312-2326.

Bardsley, A., McDonald, K. and Boswell, R. E. (1993). Distribution of tudor protein in the *Drosophila* embryo suggests separation of functions based on site of localization. *Development.* **119**, 207-219

Boswell, R. E. and Mahowald, A. P. (1985). Tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell.* **43**, 97-104.

Breitwieser, W., Markussen, F., Horstmann, H. and Ephrussi, A. (1996). Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step on polar granule assembly. *Genes Dev.* **10**, 2179-2188.

Campos-Ortega, J.A. and Hartenstein, V. (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2nd ed. Berlin : Springer-Verlag

Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. and Abrams, J. M. (1996). *grim*, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* **10** , 1773-1782.

Dalby, B. and Glover, D. M. (1993). Discrete wequence elements control posterior pole accumulation and translational repression of maternal cyclinB in *Drosophila*. *EMBOJ.* **12**, 1219-1227.

Deshpande, G., Calhoun, G., Yanowitz, J. L. and Schedl, P. D. (1999). Novel functions of *nanos* in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell* **99** , 271-281.

Dixon, K. E. (1994). Evolutionary aspects of primordial germ cell formation. *Ciba Foundation Symposium* **182**, 92-120.

Dorfan, R. and Shilo, B. Z. (2001). Biphasic activation of the BMP pathway patterns the *Drosophila* embryonic dorsal region. *Development* **128**, 965-972.

Duffy, J. B. and Perrimon, N. (1994). The Torso pathway in *Drosophila*: Lessons on Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Pattern Formation. *Dev. Biol.* **166**, 380-395.

Eddy, E. M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* **43** , 229-280.

Ephrussi, A. and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature*. **358**, 387-392.

Forbes, A. and Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* **125** , 679-690.

Gavrieli, Y. Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493-501.

Geigy, R. (1931). Action de l'ultra-violet sur le pole germinal dans l'oeuf de *Drosophila melanogaster* (castration et mutabilite). *Rev. Suisse Zool.* **38**, 187-288

Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K. and Steller, H. (1995). The *head involution defective* gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev.* **9**, 1694-1708.

Hay, B., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. H. (1988). Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development* **103** , 625-640.

林 誠 (2004) 「極細胞における母性Nanosタンパク質による体細胞分化抑制」
修士学位論文 (筑波大学)

Hülskamp, M., Schroder, C., Pfeifle, C., Jackle, H. and Tautz, D. (1989). Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. *Nature* **338** , 629-632.

Iida, T. and Kobayashi, S. (1998). Essential role of mitochondrially-encoded large rRNA for germ line formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 11274-11278.

Illmensee, K. and Mahowald, A. P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole cell of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71** , 1016-1020.

Irish, V., Lehmann, R. and Akam, M. (1989). The *Drosophila* posterior-group gene *nanos* functions by repressing *hunchback* activity. *Nature* **338** , 646-648.

Jacsonson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell.* **88**, 347-354.

Jongens, T. A., Hay, B., Jan, L. Y., Jan. Y. N. (1992). The germ cell-less product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell.* **70**, 569-584.

小林 悟 (1990a). ショウジョウバエ卵細胞へのマイクロインジェクション (1). *Cell Science* **6**, 254-257.

小林 悟 (1990b). ショウジョウバエ卵細胞へのマイクロインジェクション (2). *Cell Science* **6**, 332-335.

小林 悟 (1990c). ショウジョウバエ卵細胞へのマイクロインジェクション (3). *Cell Science* **6**, 413-416.

Kobayashi, S. and Okada, M. (1989). Restriction of pole-cell-forming ability to u.v.-irradiated *Drosophila* embryos by injection of mitochondrial lrRNA. *Development*. **107**, 733-742.

Kobayashi, S., Amikura, R., and Okada, M. (1993). Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasma of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **260**, 1521-1524.

Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M. and Kitamura, T. (1996). Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature* **380**, 708-711.

Kobayashi, S., Amikura, R., Nakamura, A. and Lasko, P. (1999). Techniques for analyzing protein and RNA distribution in *Drosophila* ovaries and embryos at structural and ultrastructural resolution. In *A comparative methods approach to the study of oocytes and embryos*, (ed. J. D. Richter), pp. 426-445. New York, Oxford: Oxford University Press

Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* **15**, 2877-2885.

Lehamann, R. and Nüsslein-Volhard, C. (1986). Abdominal segmentation. Pole cell formation and embryonic polarity required the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell*. **47**, 1141-1152.

Lehamann, R. and Nüsslein-Volhard, C. (1991). The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*. **112**, 679-691.

Li, J., Xia, F. and Li, W. X. (2003). Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Dev. Cell*. **5**, 787-798.

Martinho, R. G., Kunwar, J. C. and Lehmann, R. (2004). A noncoding RNA is required for the repression of RNAPolIII-dependent transcription in primordial germ cell. *Curr. Biol*. **14**, 159-165.

Mello, C. C., Draper, B. W., Krause, M., Weintraub, H. and Priess, J. R. (1992). The *pie-1* and *mex-1* genes and maternal control of blastomere identity in *C. elegans* embryo. *Cell* **70** , 163-176.

Mochizuki, K., Sano, H., Kobayashi, S., Nishimiya-Fujisawa, C. and Fujisawa, T. (2000). Expression and evolutionary conservation of *nanos*-related genes in Hydra. *Dev Genes Evo*. **210** , 591-602.

Murata, Y. and Wharton, R. P. (1995). Binding of Pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning on *Drosophila* embryos. *Cell*. **80**, 747-756.

Nakamura, A., Amikura, R., Mukai, M., Kobayashi, S. and Lasko, P. F. (1996). Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* **274** , 2075-2079.

Okada, M., Kleinman, A. I. And Schneidermann, H. A. (1974). Restriction of fertility in sterilized *Drosophila* eggs by transplantation of polar cytoplasm. *Dev. Biol.* **37**, 43-54.

Schulz, R. A., Xie, X., Andres, A. J. and Galewsky, S. (1991). Endoderm-specific expression of the *Drosophila* *mex1* gene. *Dev. Biol.* **143**, 206-211.

Schaner , C. E., Deshpande, G., Schedl, P. D., Kelly, W. D. (2003). A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. *Dev. Cell.* **5**, 747-757.

Seydoux, G. and Dunn, M. A. (1997). Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* **124** , 2191-2201.

Shüpbach, T. and Wieschaus, E. (1986). Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. Roux's Arch. *Dev. Biol.* **195**, 302-317.

Smith, L. D. (1961). The role of a "germ plasm" in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. *Dev. Biol.* **14**, 330-347

Sonoda, J. and Wharton, R. P. (2001). *Drosophila* brain tumor is a translational repressor. *Genes Dev.* **15**, 762-773.

Struhl, G. (1989). Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in *Drosophila* embryos. *Nature* **338** , 741-744.

Su, T. T., Campbell, S. D. and O'Farrell, P. H. (1998). The cell cycle program in germ cells of the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **196** , 160-170.

Subramaniam, K. and Seydoux, G. (1999). *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **126** , 4861-4871.

Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma.* **98**, 81-85.

Technau, G. M. and Campos-Ortega, J. A. (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. *Rou's Arch. Dev. Biol.* **195**, 489-498.

Török, I., Strand, D., Schmitt, R., Tick, G., Torok, T., Kiss, I. and Mechler, B. M. (1995). The *overgrown hematopoietic organs-31* tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes an Importin-like protein accumulating in the nucleus at the onset of mitosis. *J. Cell Biol.* **129** , 1473-1489.

Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. and Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* **301** , 1239-1241.

Underwood, E., Caulton JH, Allis CD, Mahowald AP. (1980). Developmental fate of pole cells in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **77** , 303-314.

Van Doren, M., Williamson, A. L. and Lehmann, R. (1998). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol.* **8**, 243-246.

Wakahara, M. (1977). Partial characterization of “primordial germ cell-forming activity” localized in vegetal pole cytoplasm in anuran eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* **39**, 221-233.

Wakahara, M. (1978). Induction of supernumerary primordial germ cells by injecting vegetal pole cytoplasm into *Xenopus* eggs. *J. Exp. Zool.* **203**, 159-164.

Wang, C. and Lehmann, R. (1991). Nanos Is the Localized Posterior Determinant in *Drosophila*. *Cell* **66** , 637-647.

Wang, C., Dickinson, L. K. and Lehmann, R. (1994). Genetics of Nanos Localization in *Drosophila*. *Dev. Dyn.* **199** , 103-115.

Wang, Z. and Lin, H. (2004). Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science* **303**, 2016-2019.

Wharton, R. P. and Struhl, G. (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen *nanos*. *Cell* **67** , 955-967.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264** , 677-683.

Yee, G. H. and Hynes, R. O. (1993). A novel, tissue-specific integrin subunit, beta nu, expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Development*. **118**, 845-858.

Zalokar, M. (1976). Autoradiographic studies of protein and RNA formation during early development of *Drosophila* eggs. *Dev. Biol.* **49** , 425-437.

Zhou, Y. and King, M. L. (1996). Localization of Xcat-2, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocyte. *Development* **122** , 2947-2953.

VIII. 図表

図 1. ショウジョウバエの胚発生過程

胚は左側が前極、上が背側を示す。図 A~C 中の黒い点は核を表す。
胚発生過程はステージ 17 (産卵後 16~24 時間まで) で終了する。() は 25 °C
でインキュベーション時の産卵後の時間を示す。

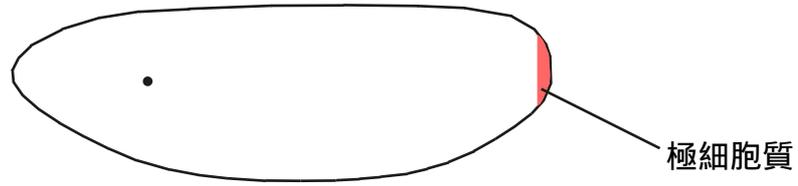
- A. ステージ 1 (産卵後~0.5 時間)
- B. ステージ 2 (産卵後 0.5~1 時間)
胚の中央部で細胞質分裂を伴わない核分裂が起こる。
- C. ステージ 4 (産卵後 1.5~2 時間)
胚の後極に極細胞が観察される。
- D. ステージ 9 (産卵後 3~4 時間)
極細胞は、後部中腸原基の陥入に伴って胚の内部に入る。
- E. ステージ 10 (産卵後 4~5 時間)
極細胞は体腔内への侵入を開始する。
- F. ステージ 14 (産卵後 10~11 時間)
極細胞が生殖巣に取り込まれる。

D~F 中、

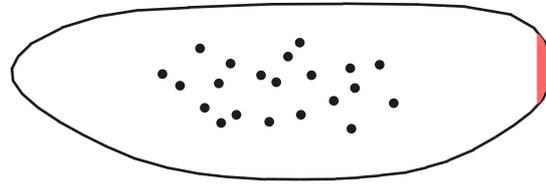
am: 前部中腸原基、as: 洋しょう膜、cl: 頭楯上唇、go: 生殖巣、hg: 後腸、
mg: 中腸、pm/ pr: 後部中腸原基、pnb: 前頭部神経芽細胞、ps: 後気門、pv: 前
胃、spg: 食道上神経節、st: 口陥、stp: 口陥盆、vnb: 腹部神経芽細胞、vnc: 腹
部神経系を表す。

Campos-Ortega and Hartenstein. (1997) より改変。

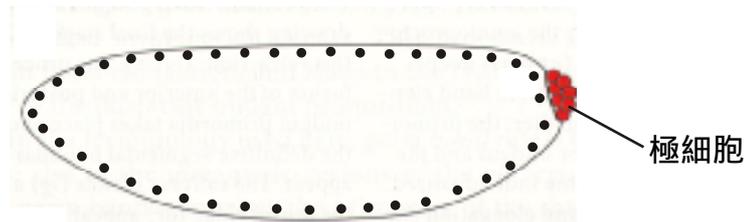
A



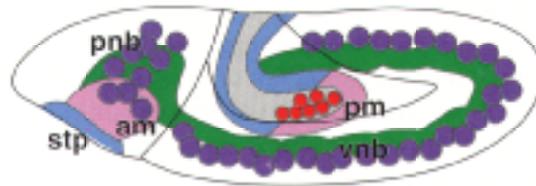
B



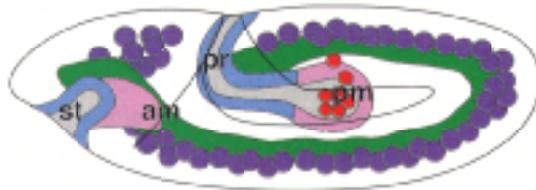
C



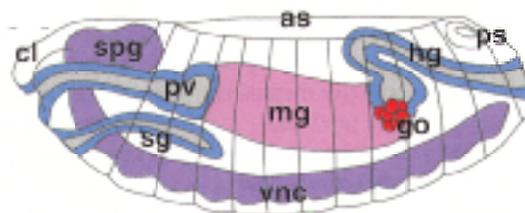
D



E



F



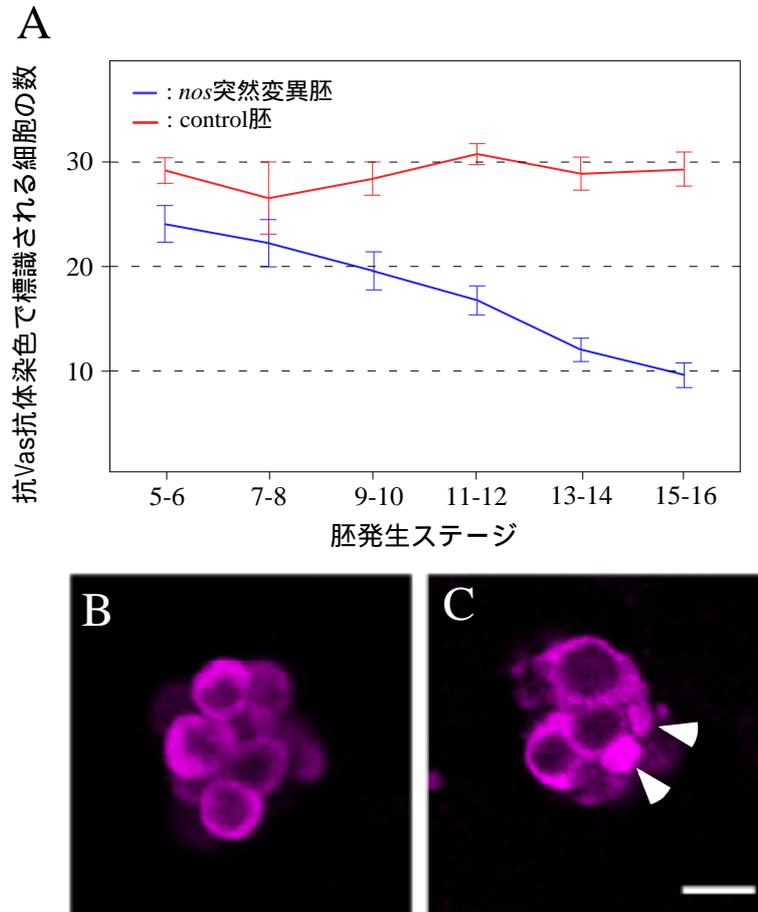


図 2. Nosタンパク質を欠く胚の極細胞数の変化

*nos*突然変異胚として nos^{BN}/nos^{BN} 雌より生み出された胚を用いた。この胚においては母性Nosタンパク質が検出されない。またcontrol胚として、 $nos^{BN}/TM3$ 雌より生み出された胚を用いた。各胚を抗Vas抗体（マゼンダ）で免疫染色することによって極細胞を標識し、極細胞数を計測した。

(A) 各ステージにおける、胚あたりの極細胞数の平均を示す。各ステージにおいて、2~30個の胚を観察した。

(B、C) ステージ13におけるcontrol胚(B)および、*nos*突然変異胚(C)の極細胞を示す。

(C)では極細胞の分断化された極細胞を示す(矢頭)。スケールバー:10 μ m

A

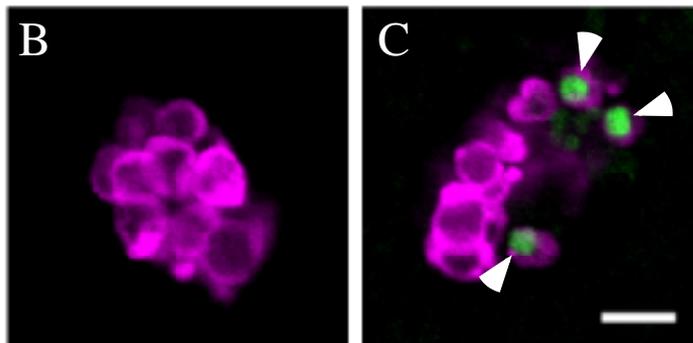
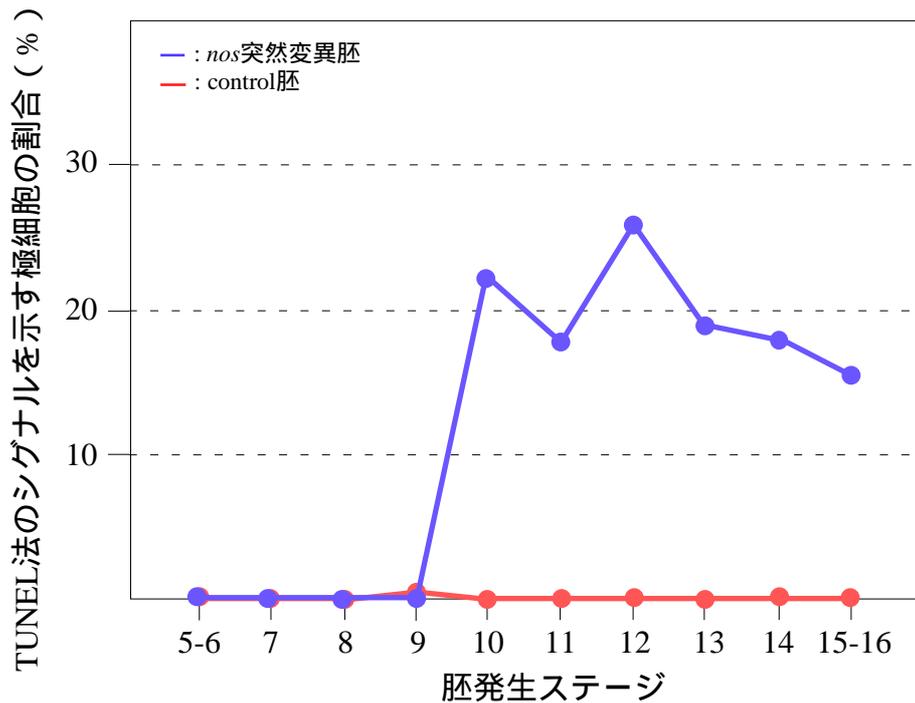


図3. Nosタンパク質を欠く極細胞におけるアポトーシスの誘導

*nos*突然変異胚、およびcontrol胚において極細部がアポトーシスを起こすか否かを抗Vas抗体染色(マゼンダ)およびTUNEL法(緑)を用いて調べた。

(A) *nos*突然変異胚、control胚においてTUNELシグナルをもつ極細胞の割合を示す。各ステージにおいて、16~258個の極細胞を観察した。

(B、C) ステージ13におけるcontrol胚の極細胞(B)および*nos*突然変異胚の極細胞(C)を示す。(C)ではTUNELシグナルをもつ極細胞を示す(矢頭)。

スケールバー:10 μ m

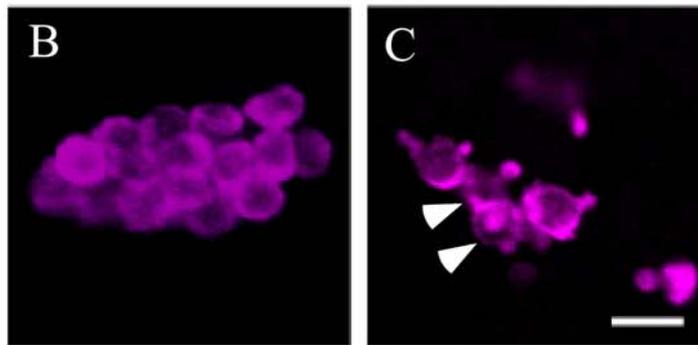
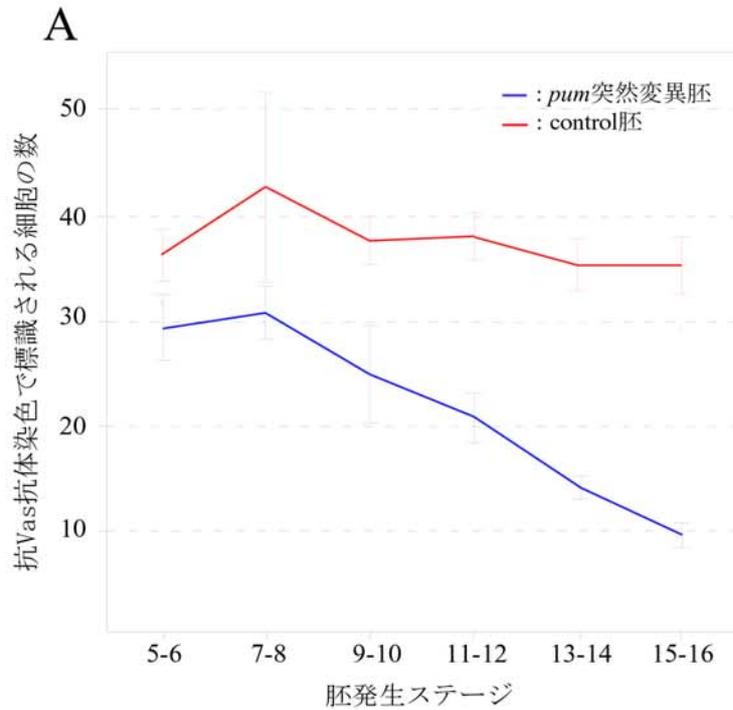


図4. Pumタンパク質を欠く胚の極細胞数の変化

*pum*突然変異胚として *pum^{MSC}/pum^{FCS}* 雌より生み出された胚を用いた。この胚においてPumタンパク質は検出されない。control胚として *pum^{MSC}/TM3* 雌より生み出された胚を用いた。各胚を抗Vas抗体(マゼンダ)で免疫染色することによって極細胞を標識し、極細胞数を計測した。

(A) 各ステージにおける、胚あたりの極細胞数の平均を示す。各ステージにおいて、2~37個の胚を観察した。

(B、C) ステージ13におけるcontrol胚 (B)および、*pum*突然変異胚 (C)の極細胞を示す。(C)では極細胞の分断化が観察される(矢頭)。スケールバー:10 μ m

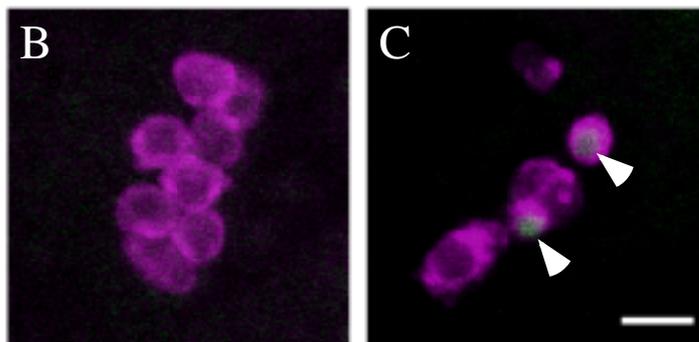
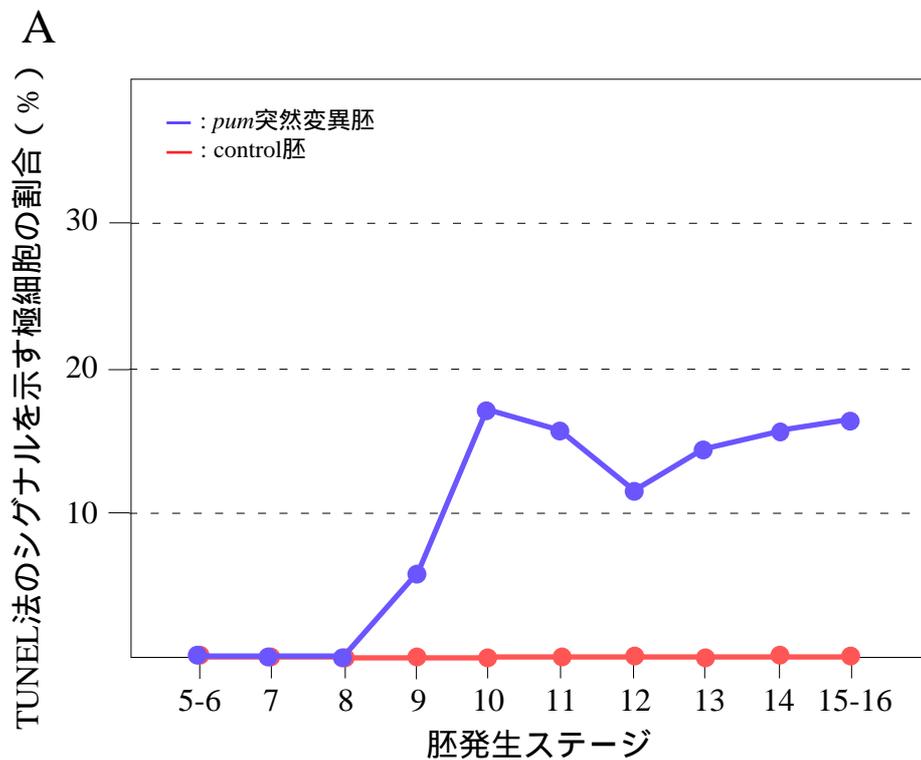


図5. Pumタンパク質を欠く極細胞におけるアポトーシスの誘導

*pum*突然変異胚、およびcontrol胚において極細部がアポトーシスを起こすか否かを抗Vas抗体染色(マゼンダ)およびTUNEL法(緑)によって調べた。

(A) *pum*突然変異胚、control胚において、TUNELシグナルをもつ極細胞の割合を示す。各ステージにおいて、26~579個の極細胞を観察した。

(B、C) ステージ13におけるcontrol胚(B)および*pum*突然変異胚(C)の極細胞を示す。(C)ではTUNELシグナルをもつ極細胞を示す(矢頭)。

スケールバー:10 μ m

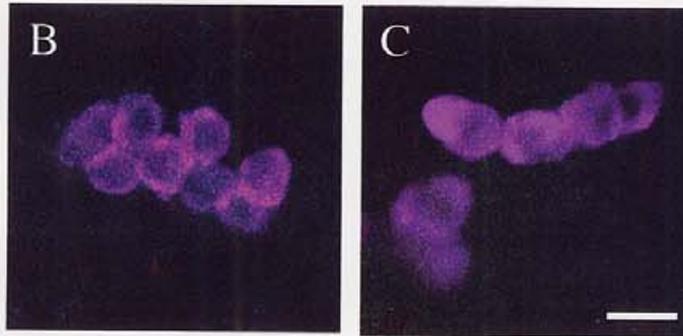
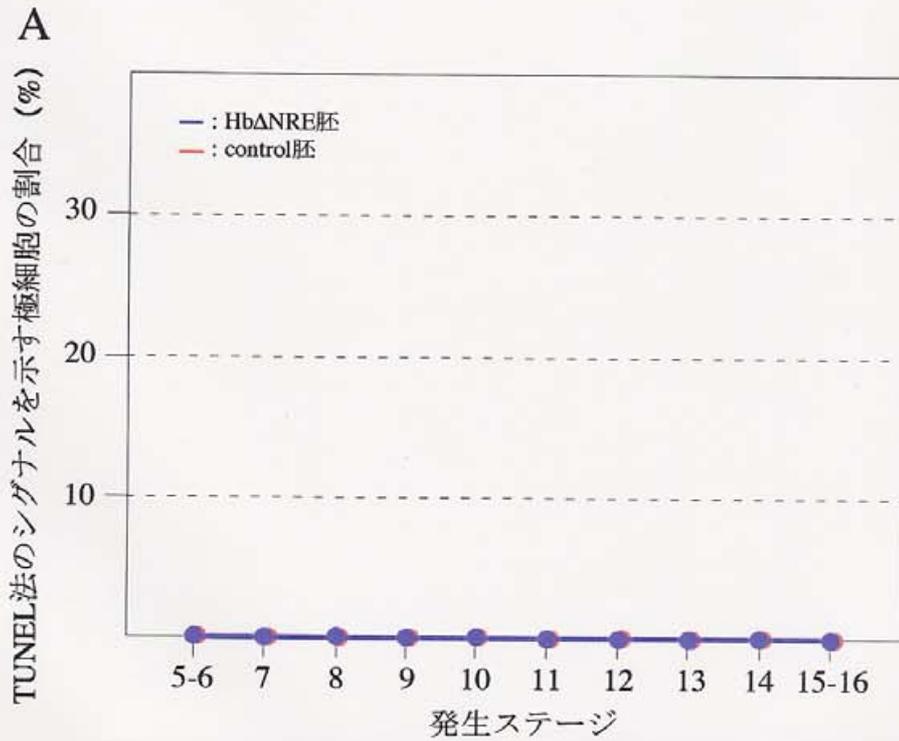


図6. *hb* Δ NRE胚における極細胞のアポトーシスの観察

hb Δ NRE胚、およびcontrol胚において極細胞がアポトーシスを起こすか否かを抗Vas抗体染色(マゼンダ) およびTUNEL法(緑)を用いて調べた。(A) *hb* Δ NRE胚、control胚においてTUNELシグナルをもつ極細胞の割合を示す。各ステージにおいて、18~571個の極細胞を観察した。各ステージにおいて、18~571個の極細胞を観察した。(B、C) ステージ13におけるcontrol胚(B)および*hb* Δ NRE胚(C)の極細胞を示す。スケールバー:10 μ m

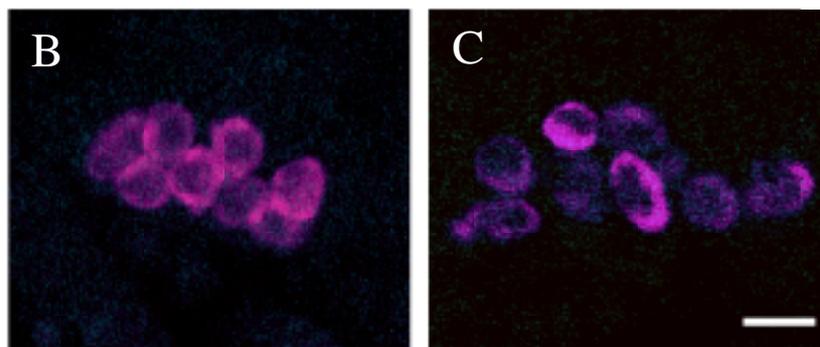
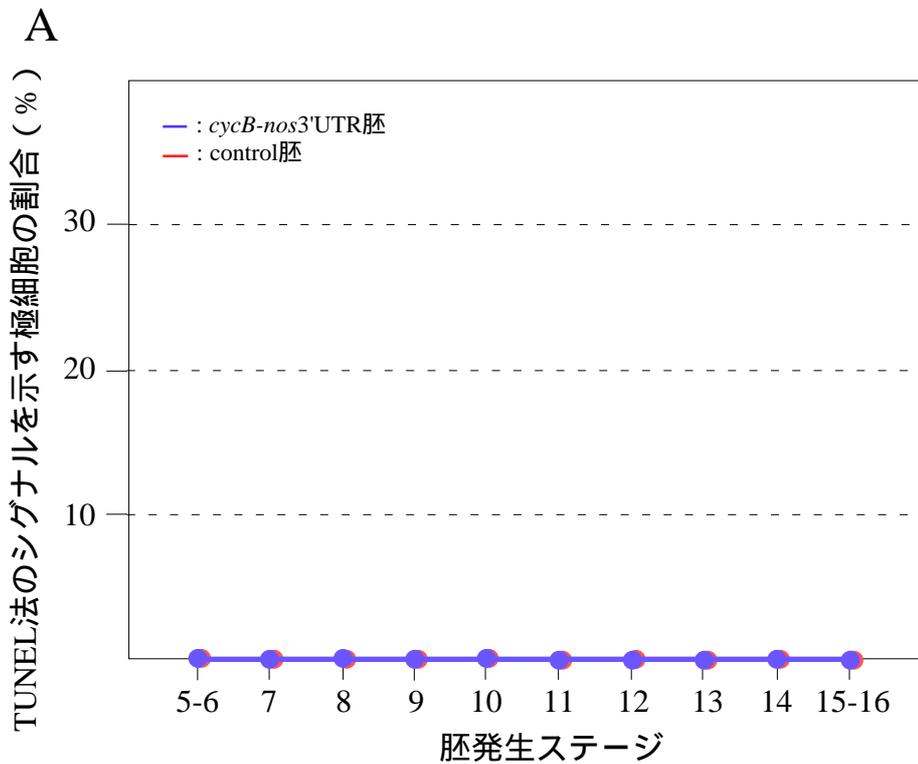


図7. *cycB-nos3'UTR* 胚における極細胞のアポトーシスの観察

cycB-nos3'UTR 胚、および control 胚において極細胞がアポトーシスを起こすか否かを抗Vas抗体染色(マゼンダ) およびTUNEL法(緑)を用いて調べた。(A) *cycB-nos3'UTR* 胚、control 胚においてTUNELシグナルをもつ極細胞の割合を示す。各ステージにおいて、16~138個の極細胞を観察した。各ステージにおいて、16~138個の極細胞を観察した。(B、C) ステージ13におけるcontrol 胚(B)と*cycB-nos3'UTR* 胚(C)の極細胞を示す。スケールバー:10 μm

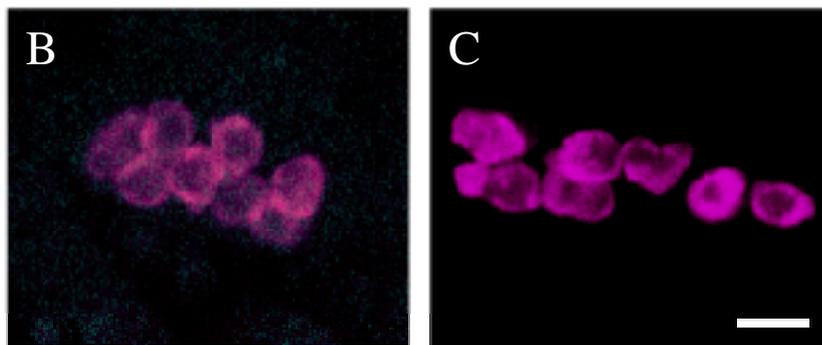
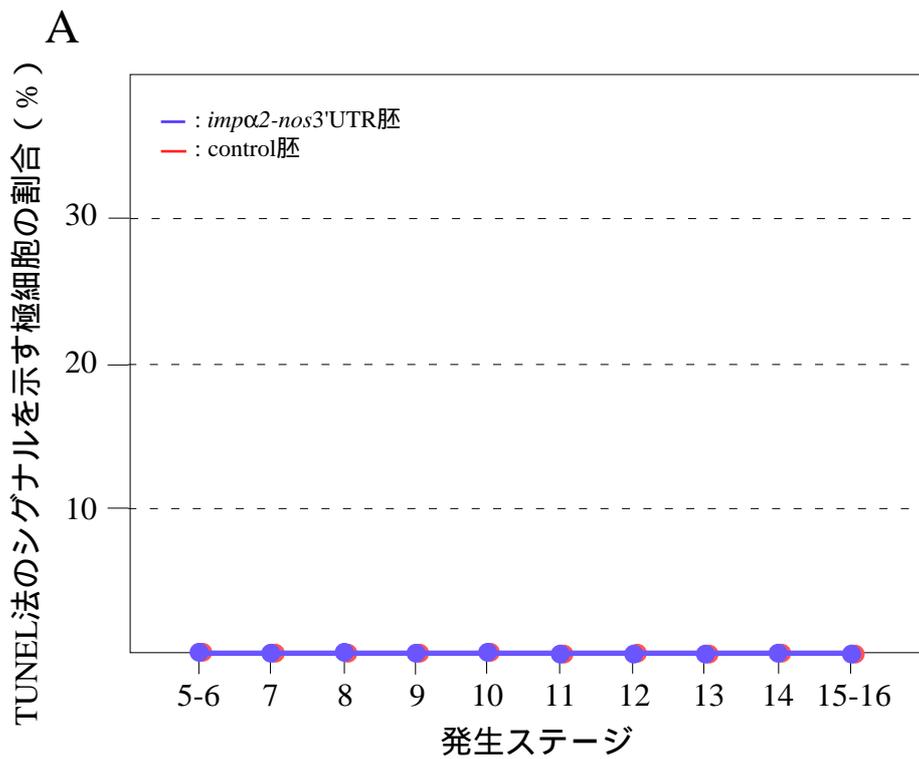


図8. *impα2-nos3'UTR* 胚における極細胞のアポトーシスの観察

impα2-nos3'UTR 胚、および control 胚において極細胞がアポトーシスを起こすか否かを抗Vas抗体染色(マゼンダ)とTUNEL法(緑)を用いて調べた。

(A) *impα2-nos3'UTR* 胚、および control 胚においてTUNELシグナルをもつ極細胞の割合を示す。各ステージにおいて、16~297個の極細胞を観察した。

(B、C) ステージ13における control 胚(B)および *impα2-nos3'UTR* 胚(C)の極細胞を示す。スケールバー: 10 μm

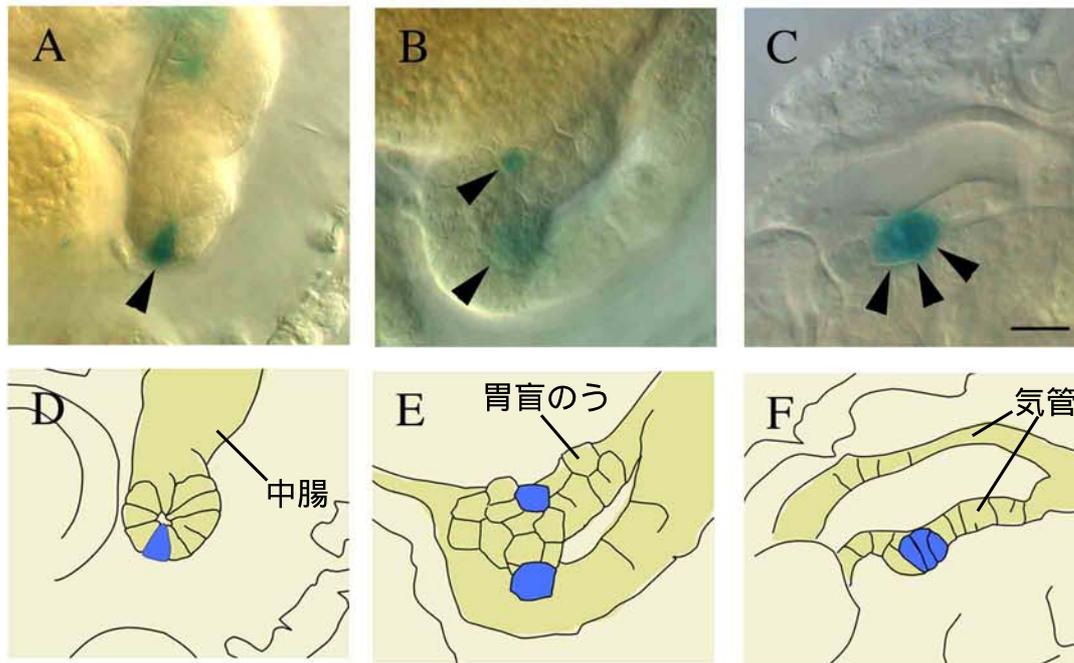


図9. 体細胞組織に取り込まれた *nos-H99* 極細胞

nos-H99 極細胞を正常胚に移植し、胚発生ステージ 17 まで発生させた後、移植した極細胞を β -gal 活性染色によって検出した。

(A-C) 体細胞組織に取り込まれた極細胞を示す。移植された極細胞は β -gal 陽性細胞として青く観察される (矢頭)。中腸上皮 (A)、胃盲のう (B)、気管上皮 (C) に取り込まれた *nos-H99* 極細胞を示す。

(D-F) 体細胞組織に取り込まれた極細胞の形態をトレースした像を示す。青色の細胞が移植された *nos-H99* 極細胞を示す。*nos-H99* 極細胞は周囲の宿主由来の体細胞と同様の形態をとっている。スケールバー: 10 μ m

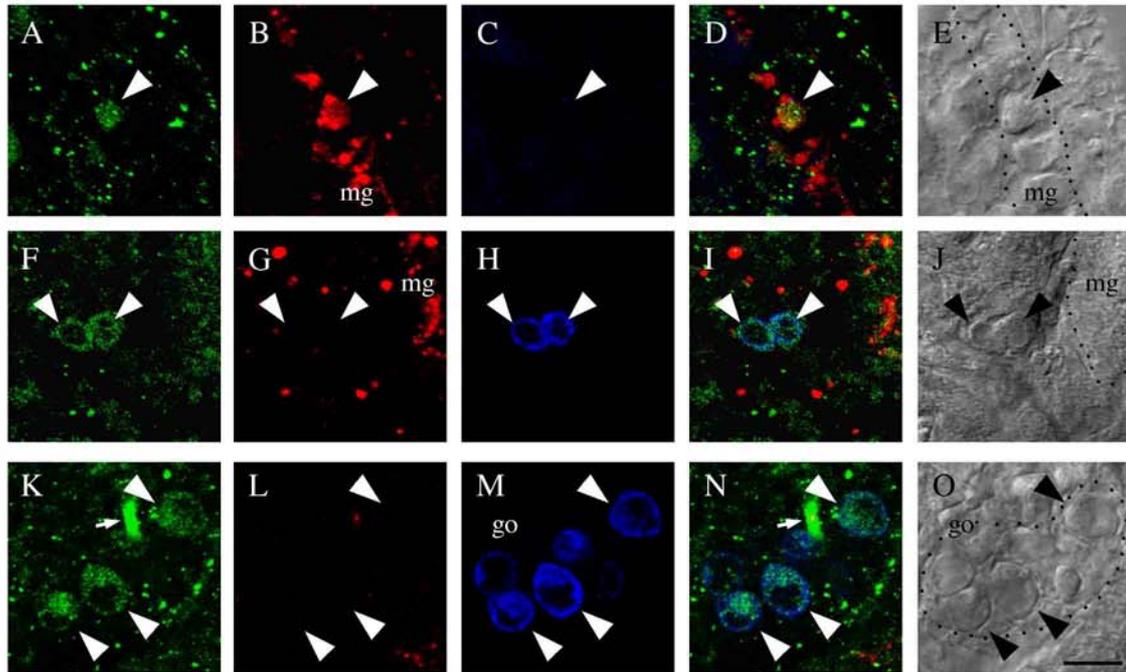


図 10. 中腸上皮に取り込まれた *nos-H99* 極細胞における中腸分化マーカー、および Vas タンパク質の発現

中腸上皮 (A-E)、血体腔 (F-J)、生殖巣 (K-O) 中に観察された *nos-H99* 極細胞を示す。*nos-H99* 極細胞を移植した宿主胚に対して、抗 β -gal 抗体 (A、F、K:緑)、中腸分化マーカー (混合プローブ 2; 材料および方法の項参照) (B、G、L:赤) および抗 Vas 抗体 (C、H、M:青) を用いて 3 重染色した。移植された極細胞は β -gal 陽性の細胞として観察される (矢頭)。(E、J、O)ノマルスキー顕微鏡像を示す。中腸上皮(mg)に取り込まれた *nos-H99* 極細胞は、宿主由来の周囲の細胞と同様に立方状の形態を示す (E)。この *nos-H99* 極細胞は中腸分化マーカーを発現しているが(B)、Vas タンパク質を失っている(C)。一方、血体腔中、あるいは生殖巣に観察される *nos-H99* 極細胞は中腸分化マーカーを発現しない (G、L)。これらの極細胞は宿主由来の極細胞と同様に球形をしており(J、O)、Vas タンパク質も観察される (H、M)。N 中の矢印は気管内腔に観察される非特異的シグナルを示す。(D、I、N)各マーカーの染色を重ねあわせた像を示す。スケールバー : 10 μ m

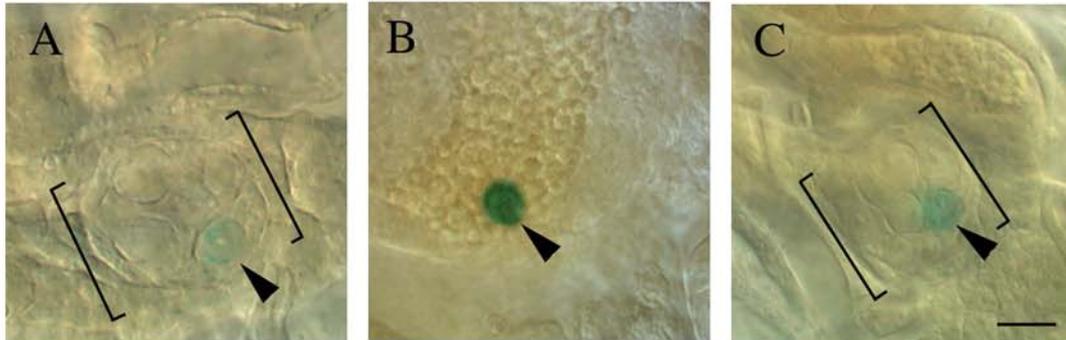


図 11.生殖巣に取り込まれた *nos-H99* 極細胞

control 胚、*nos* 胚、および *nos-H99* 胚（表 3 参照）の極細胞を正常胚に移植し、ステージ 17 まで発生させた後、移植した極細胞を β -gal 活性染色によって検出した。移植された極細胞は β -gal 陽性細胞として青く観察される（A-C: 矢頭）。

（A）生殖巣に取り込まれた control 胚の極細胞を示す。（B）卵黄内にとどまっている *nos* 胚の極細胞を示す。*nos* 胚の極細胞は生殖巣に取り込まれることはない。（C）生殖巣に取り込まれた *nos-H99* 極細胞を示す。A、C 中の括弧は生殖巣を示す。スケールバー: 10 μ m

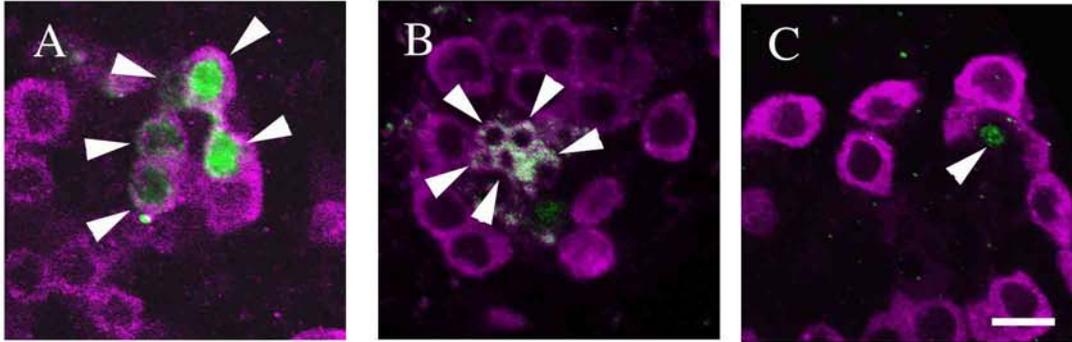


図 12. 3 齢幼虫の卵巣における *nos-H99* 極細胞の発生運命

3 齢幼虫の卵巣において、*H99* 極細胞 (A)、および *nos-H99* 極細胞 (B、C) の発生を観察した。

(A) *H99* 極細胞は、*H99/ TM6 ubi-GFP* 雄を交配させた *nos^{BN}-H99-PLHΔ2-3/ TM6 ubi-GFP* 雌より生み出された胚から得た。この交配により得られる全ての胚は母性 Nos タンパク質を有する。また *PLHΔ2-3* (β -gal を産生)をもつ胚の半数が *Df(3L)H99* ホモ接合体である。*Df(3L)H99* ホモ接合体以外の胚は *TM6 ubi-GFP* 染色体をもつので、 β -gal 陽性(緑)かつ GFP 陰性(data not shown)の細胞を *H99* 極細胞と判断した。*H99* 極細胞由来の細胞(A 中の矢頭) は宿主由来の細胞と同様の形態および Vas タンパク質(マゼンダ)の発現を示す。

(B、C) *nos-H99* 極細胞は *H99/ TM6 ubi-GFP* 雄を交配させた *nos^{BN}-H99-PLHΔ2-3/ nos^{BN}* 雌より生み出された胚から得た。この交配により得られる全ての胚は母性 Nos タンパク質を欠く。また *PLHΔ2-3* をもつ胚の約半数が *Df(3L)H99* ホモ接合体である。*nos* 極細胞は胚の生殖巣へ移動することはないので、観察される β -gal 陽性の細胞は *nos-H99* 極細胞と判断した。*nos-H99* 極細胞由来の細胞は、宿主および *H99* 極細胞由来の細胞と比較してサイズが小さい (B、C 中の矢頭)。また、この細胞では Vas タンパク質 (マゼンダ) の発現が減少していた。スケールバー:10 μ m

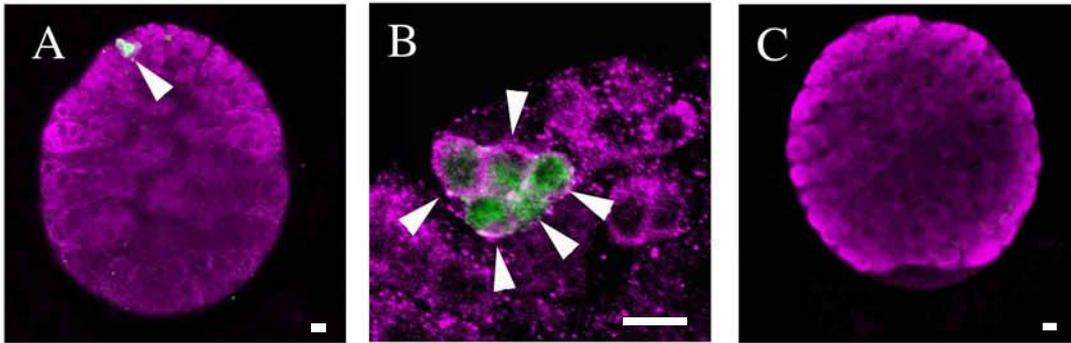


図 13. 3 齢幼虫の精巣における *nos-H99* 極細胞の発生運命の観察

3 齢幼虫の精巣において、*H99* 極細胞 (A、B)、および *nos-H99* 極細胞 (C) の発生を観察した。

(A、B) *H99* 極細胞 (図 12 の説明参照) に由来の細胞 (緑) (矢頭) は宿主由来の細胞と同様の形態、Vas タンパク質 (マゼンダ) の発現を示す。(B) に (A) の拡大像を示す。

(C) *nos-H99* 極細胞 (図 12 の説明参照) に由来する細胞 3 齢幼虫の精巣中に観察されなかった。スケールバー: 10 μm

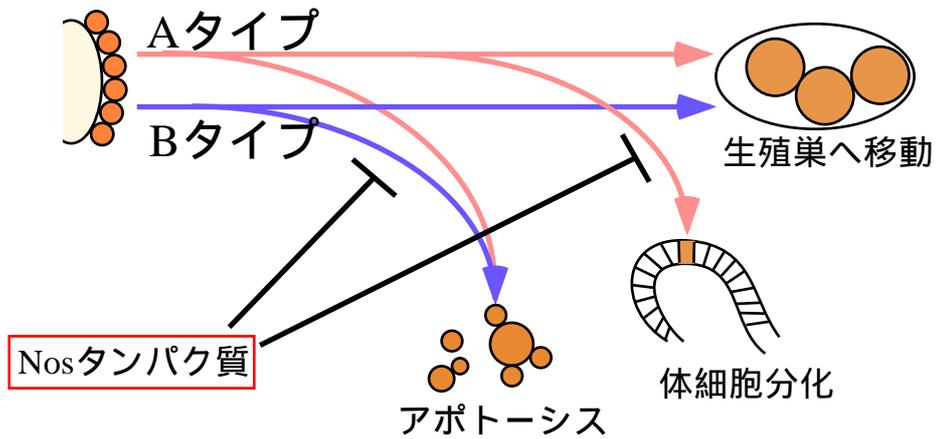


図14. 母性Nosタンパク質による極細胞の発生運命の制御モデル

形成された極細胞には、体細胞に分化することのできる極細胞（Aタイプ）とそうでない極細胞（Bタイプ）が存在すると考えられる。母性Nosタンパク質は、アポトーシスをA、B両タイプの極細胞において抑制するとともに、Aタイプ極細胞の体細胞分化経路をも抑制することにより、これらの極細胞を生殖細胞へと分化させる働きをもつと考えられる。

表1. *H99* 欠失突然変異による *nos* 極細胞のアポトーシス抑制

観察した胚	観察した極細胞数	TUNELシグナル陽性の極細胞数 (%)	有意差 ^c
<i>nos</i> ^a	380	75 (19.7)	
<i>nos-H99</i> ^b	524	0 (0)	P < 0.0001

^a *nos*^{BN} / *nos*^{BN} 雌に野生型雄を交配し得られた胚を用いた。

^b *nos*^{BN} *Df(3L)H99* / *nos*^{BN} 雌に *Df(3L)H99* / *TM3* 雄を交配し得られた胚を用いた。

これらの胚のうち、顎体節および頭葉でTUNELシグナルが観察されない胚を *nos-H99* 胚と判断した。
Fisherの検定法により有意差を計算した。

表2. *hid* 突然変異による *nos* 極細胞のアポトーシス抑制

観察した胚	観察した 極細胞数	TUNELシグナル陽性の 極細胞数 (%)	有意差。
<i>nos</i> ^a	617	118 (19.1)	
<i>nos-hid</i> ^b	473	7 (1.6)	P < 0.0001

^a *nos*^{BN} / *nos*^{BN} 雌に野生型雄を交配し得られた胚を用いた。

^b *nos*^{BN} *hid*⁰⁵⁰¹⁴ / *nos*^{BN} 雌に *hid*⁰⁵⁰¹⁴ / *TM3* 雄を交配し得られた胚を用いた。

これらの胚のうち、頭葉でTUNELシグナルが観察されない胚を *nos-H99* 胚と判断した。
。Fisherの検定法により有意差を計算した。

表3. 移植した極細胞の発生運命

極細胞の 供与胚	移植した 宿主胚の数	発生した 宿主胚の数	総数	移植した極細胞が検出された胚の数 ^a		有意差 ^f
				生殖巣に取り込まれた 極細胞を持つ胚の数 (%)	体細胞組織に取り込まれた 極細胞を持つ胚の数 (%) ^e	
<i>nos</i> - <i>H99</i> ^a	539	361	112	28 (25.0)	20 (17.9)	
<i>nos</i> ^b	431	218	64	0 (0)	0 (0)	P < 0.05
control ^c	134	86	35	20 (57.1)	0 (0)	P < 0.05

^a *nos*^{BN} *Df(3L)H99 PLHA2-3 / nos*^{BN} 雌に *Df(3L)H99 / TM3* 雄を交配し得られた胚を用いた。得られた全ての胚は母性Nosタンパク質を欠く。そのうち *PLHA2-3* をもつ胚の約半数は *Df(3L)H99* ホモ接合体の胚である。

^b *nos*^{BN} *Df(3L)H99 PLHA2-3 / nos*^{BN} 雌に野生型雄を交配し得られた胚を用いた。得られた全ての胚は母性Nosタンパク質を欠き、かつ *Df(3L)H99* ヘテロ接合体である。

^c *nos*^{BN} *Df(3L)H99 PLHA2-3 / TM3* 雌に *Df(3L)H99 / TM3* 雄を交配し得られた胚を用いた。得られた胚は全て母性Nosタンパク質を有する。そのうち半数は *Df(3L)H99* ホモ接合体である。この胚の極細胞を移植した結果は、野生型胚の極細胞を移植した結果と比較して有意差はなかった (data not shown)。

^d 移植した極細胞が観察された胚 (ステージ16/17) の数を示す。

^e *nos*-*H99* 極細胞が取り込まれた体細胞組織は、中腸上皮 (12/20)、器官上皮 (1/20)、

胃首のうち (1/20)、脂肪体 (1/20)、マルピギー管 (2/20)、後腸 (1/20) であった。

^f 体細胞組織に取り込まれた極細胞を持つ胚の割合を *nos*-*H99* と *nos*, *nos*-*H99* と *H99* の間で比較し、Fisherの検定法により有意差を計算した。

表4. 3令幼虫卵巣における*nos-H99* 極細胞の発生運命

極細胞の 供与胚	総数	観察した卵巣の数			有意差 ^d
		移植された極細胞 由来の細胞をもつ 卵巣の数	移植された極細胞が 異常な発生を 示した卵巣の数 ^e		
<i>H99</i> ^a	86	6	0		
<i>nos-H99</i> ^b	72	11	11		$P < 0.005$

^a *nos*^{BN} *Df(3L)H99 P1HΔ2-3 / TM6 ubi-GFP* 雌に *Df(3L)H99 / TM6 ubi-GFP* 雄を交配し得られた胚を用いた。得られた胚の極細胞を宿主胚に移植後、宿主胚が3令幼虫になるまで飼育した。移植された極細胞由来の細胞は宿主の卵巣中で、*β-gal*陽性の細胞として識別される。その細胞のうちGFP陰性の細胞を *Df(3L)H99* ホモ接合体と判断した(図12の説明参照)。

^b *nos*^{BN} *Df(3L)H99 / nos*^{BN} 雌に *Df(3L)H99 / TM3* 雄を交配し得られた胚を用いた。*nos* 極細胞は生殖巣へ移動することはないので、観察された*β-gal*陽性の細胞を *H99* ホモ接合体の極細胞と判断した(図12の説明参照)。

^c *β-gal*陽性細胞で、宿主の細胞に比べて大きさが小さく、*Vas*シグナルが弱いものを異常な細胞とし、そのような細胞をもつ卵巣の数を示した。

^d Fisherの検定法により有意差を計算した。

表5. 3令幼虫精巣における*nos-H99* 極細胞の発生運命

極細胞の 供与胚	総数	観察した卵巣の数		有意差 ^c
		移植された極細胞 由来の細胞をもつ 精巣の数		
<i>H99</i> ^a	86	5		
<i>nos-H99</i> ^b	78	0		$P < 0.05$

^a *nos*^{BN} *Df(3L)H99 P1HA2-3 / TM6 ubi-GFP* 雌に *Df(3L)H99 / TM6 ubi-GFP* 雄を交配し得られた胚を用いた。

得られた胚の極細胞を宿主胚に移植後、宿主胚が3令幼虫になるまで飼育した。移植された極細胞由来の細胞は宿主の精巣中で、 β -gal陽性の細胞として識別される。その細胞のうちGFP陰性の細胞を *Df(3L)H99* ホモ接合体と判断した(図12の説明参照)。

^b *nos*^{BN} *Df(3L)H99 / nos*^{BN} 雌に *Df(3L)H99 / TM3* 雄を交配し得られた胚を用いた。

nos 極細胞は生殖巣へ移動することはないので、観察された β -gal陽性細胞を *H99* ホモ接合体の極細胞と判断した(図12の説明参照)。

^c Fisherの検定法により有意差を計算した。