

氏 名 篠塚 裕子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1941 号

学位授与の日付 平成29年3月24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 ショウジョウバエ始原生殖細胞における母性 *ovo* の機能解析

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 吉田 松生
教授 新美 輝幸
准教授 向 正則 甲南大学
教授 小林 悟 筑波大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Clarifying the mechanisms of germline establishment is a century-old issue in developmental biology. In *Drosophila*, a specialized cytoplasm, or germ plasm localized in the posterior pole region of early embryos is partitioned into the primordial germ cells (PGCs). Germ plasm contains the maternal factors required for germline development. It has been proposed that germline-specific gene expression is initiated by the function of maternal factors that are enriched in the germ plasm. Previous studies have demonstrated that *ovo* is a candidate gene encoding such maternal factor, based on the fact that it encodes the maternal transcripts enriched in the germ plasm, and that reduction of its transcript amount causes a defect in expression of the germline genes, such as *vasa* and *nanos*, in PGCs. In this study, I report the expression of Ovo protein in PGCs and its role in germline development as follows.

1) Expression of maternal Ovo protein in PGCs

ovo encodes three protein isoforms, Svb, Ovo-A and Ovo-B, which share a common DNA binding (Zn-finger) domain. Here, I investigated expression of Ovo protein in PGCs during embryogenesis. Since I failed to raise an antibody against Ovo protein, I established two EGFP knock-in alleles. *ovoB-Nterm-EGFP* allele produces EGFP fusion protein of either Svb, Ovo-A or Ovo-B, while *ovoA-Nterm-EGFP* allele produces only fusion protein of EGFP and Ovo-A. In *ovoB-Nterm-EGFP* embryos, EGFP signal was detectable in PGCs throughout embryogenesis, while it was hardly detectable in PGCs of *ovoA-Nterm-EGFP* embryos. Considering that *svb* and *ovo-A* transcripts are at an undetectable level in PGCs, this observation strongly suggests that Ovo-B protein is an abundant form expressed in PGCs. I further found that maternal *ovoB-Nterm-EGFP* allele produced Ovo-EGFP fusion protein enriched in PGCs throughout embryogenesis, while Ovo-EGFP expressed zygotically from paternally-derived *ovoB-Nterm-EGFP* allele was detectable in PGCs only at the end of embryogenesis. Taken together, the above observations show that maternally deposited Ovo-B protein is predominant in PGCs during embryogenesis.

2) Role of maternal Ovo-B in germline development

Next, I examined the role of maternal Ovo-B in PGCs in germline development. Since oogenesis is completely arrested in the ovaries without *ovo-B* function, the embryos lacking maternal Ovo-B activity cannot be obtained. To overcome this problem, I used Ovo-A to specifically reduce Ovo-B activity in PGCs. This is based on the fact that Ovo-A isoform acts antagonistically to Ovo-B and represses the transcription induced by Ovo-B during oogenesis.

Induction of Ovo-A expression in PGCs during embryogenesis by maternally-supplied Gal4 protein caused a significant reduction in the number of germline cells in females during larval development, and consequently these larvae developed into agametic adult females. In

contrast, a subtle decrease in the number of the germline cells was evident in the 1st-instar male larvae, but they increased again after the 2nd-instar larval stage to produce gametes in adult males. Since zygotic *ovo* function is not required for male germline development, a decrease in the number of the germline cells in the 1st-instar larvae was due to the reduction of maternal Ovo-B activity in males. Indeed, strong induction of Ovo-A in PGCs by both maternally- and zygotically-expressed Gal4 protein results in a loss of the germline cells during larval stages in both sexes. Taken together, the above observations strongly suggest that maternal Ovo-B is required in PGCs for their development into germ cells.

3) Downstream genes regulated by maternal Ovo-B

To identify the downstream genes of which expression is regulated by maternal Ovo-B in PGCs, I compared the transcriptomes of PGCs isolated from normal embryos and Ovo-B knockdown (KD) embryos at stage 16. I found that Ovo-B KD caused a decrease in the expression 401 transcripts in PGCs, and conversely it upregulated the expression of 510 transcripts ($q\text{-value} < 0.05$) in PGCs. Of the transcripts regulated by Ovo-B, 122 were found to be expressed predominantly in PGCs, compared to whole embryos (PGC-enriched genes). Interestingly, among these 122 transcripts, 81 were activated by Ovo-B. Furthermore, of the transcripts regulated by Ovo-B, 289 were found to be expressed predominantly in whole embryos, compared to PGCs (soma-enriched genes). Among the 289 transcripts, 194 were repressed by Ovo-B. The above data reveals that maternal Ovo-B has an important role in activating the PGC-enriched genes and conversely repressing the soma-enriched genes. In addition, I found that 3 of 16 PGC-enriched genes which are activated by Ovo-B were required for germline development of both sexes.

In this study, I report that maternal Ovo-B has an important role in regulating gene expression in PGCs, namely, activation of the PGC-enriched genes and repression of the soma-enriched genes. Furthermore, reduction in Ovo-B activity in PGCs causes their inability to develop normally into germ cells. It is worthwhile to note that *ovo* gene is conserved among metazoan animals. Thus, I propose that *ovo* acts as a part of evolutionarily conserved mechanism regulating germline development in animals.

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞である。ショウジョウバエの生殖細胞は、初期胚に形成される始原生殖細胞に由来する。始原生殖細胞は、胚の後端に位置する極細胞質を取り込むように形成されることが知られている。極細胞質中には生殖細胞の発生に必要な十分な母性因子が含まれており、その一部は生殖系列特異的な遺伝子の発現を活性化させる機能を持つと考えられてきた。これまでに、生殖系列特異的な遺伝子である *vasa* と *nanos* の転写活性化に必要な転写制御因子をコードする遺伝子としてとして *ovo* が、申請者の所属する研究室において同定されている。*ovo* 遺伝子は、卵形成過程で働く転写促進タンパク質 *Ovo-B* と転写抑制タンパク質 *Ovo-A*、さらに表皮の形態形成に関与する転写活性化タンパク質 *Svb* という 3 種類のアイソフォームをコードしている。これまでに、始原生殖細胞においては *ovo-B* mRNA が優占的に発現しており、*ovo-A* mRNA の発現はその 1/100 程度であること、母性および胚性の *Ovo-B* タンパク質の機能を阻害した場合にはオスとメスともに生殖細胞を含まない生殖巣になることが示されていた。しかし、①始原生殖細胞における母性 *Ovo* タンパク質の発現、②母性 *Ovo-B* を機能阻害した場合の表現型、③始原生殖細胞において母性 *Ovo-B* が発現を制御する下流遺伝子、はいずれも明らかにされていなかった。本研究では、これらの点を解析した。その結果、第一に、始原生殖細胞では、母性 *Ovo-B* タンパク質が優占的に発現していることが明らかになった。第二に、*Ovo-B* と拮抗的に働く転写抑制因子 *Ovo-A* の過剰発現により、母性 *Ovo-B* タンパク質の機能阻害をおこなった結果、母性 *Ovo-B* の機能がオスとメスの生殖細胞の発生に必要であることを強く示唆する結果が得られた。最後に、始原生殖細胞において母性 *Ovo-B* により制御される下流遺伝子をマイクロアレイ解析により同定したところ、体細胞に比べて始原生殖細胞で発現が高い遺伝子の多くは母性 *Ovo-B* によって転写が促進され、逆に体細胞で発現が高い遺伝子の多くは転写が抑制されることが明らかとなった。このことは、母性 *Ovo-B* が始原生殖細胞の発生に必要な遺伝子の発現を促進し、体細胞の発生に必要な遺伝子の発現を抑制していることを示唆している。実際に、母性 *Ovo-B* により発現が促進される 16 遺伝子の機能を生殖系列において阻害したところ、5 つの遺伝子では影響が見られなかったものの、4 つの遺伝子で成虫がオスとメスともに不妊となり、7 つの遺伝子でメスの成虫が不妊となった。これらの結果は、母性 *Ovo-B* が生殖細胞に必要な遺伝子の転写制御に関わっていることを示している。

本研究では、ショウジョウバエ生殖細胞の発生過程における母性 *Ovo-B* タンパク質の機能解析を主眼としており、同様の機能はマウスの生殖細胞形成過程においても観察されることが共同研究より明らかになっている。したがって、本研究の成果は、進化的に保存された生殖細胞形成機構を明らかにする上での重要な基盤となると考えられ、基礎生物学専攻の博士に値することが全員一致で合意された。