

氏 名 笹 岡 由美子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第765号

学位授与の日付 平成16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 Functional analysis of mouse nanos3 in  
primordial germ cell development

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 城石 俊彦  
教授 佐々木 裕之  
助教授 角谷 徹仁  
助教授 藤澤 敏孝  
部長 松居 靖久（大阪府立母子保健総合医療センター）

## 論文内容の要旨

All sexually reproducing organisms arise from gametes and all gametes arise from primordial germ cells (PGCs). In many animal groups, cell fate of PGCs is defined by maternal factors localized in a histologically distinguishable region in the egg cytoplasm, so called “germ plasm”. In mammals, however, the germ plasm has never been observed. Germ cell specification takes place during early gastrulation stage after implantation of embryos and requires some inductive factors from extraembryonic tissues. Although the mechanism involved in PGC specification start to be understood, many unanswered questions remain, which include how PGC retain their identity during migration in somatic environment and how PGCs maintain their stem cell like property as keep differentiating as gametes. The mechanism involved in germ cell specification could be quite different in mammals. However, a conserved mechanism has also been indicated by the identification of mouse homolog genes to components of germ plasm of *Drosophila*.

*Nanos* gene is first identified in *Drosophila* as one of the components of germ plasm, and encodes an RNA binding protein containing zinc-finger motif. In the absence of *Nanos*, embryos form pole cells, but they are unable to migrate properly into the embryonic gonads and do not differentiate as functional germ cells. To date, *Nanos* homologs have been identified in both invertebrates and vertebrates. Among them, zebrafish *nanos* homolog (*nanos1*) is also known as an essential protein in ensuring proper migration and survival of PGCs. Therefore, it is inferred that *nanos* homolog gene exists also in mouse and it would participate in germline development. Indeed, *nanos* homolog (referred to as *nanos1*) was isolated from mouse embryo but its expression was not observed in germ cells during embryonic development. Therefore, it is likely that other as yet unidentified *nanos* family

members may exist, and these are expressed during germ cell development. BLAST searches of the NCBI EST database identified three human *nanos*-related genes, which showed significant homologies in the conserved zinc finger domains. This fact suggests that additional *nanos*-related genes also present in the mouse and might be involved in germ cell development.

In this study, to isolate mouse *nanos* homolog, PCR screening was carried out using specific primers of human *nanos* homolog genes. As a result, two *nanos* homolog genes are found in the mouse (referred to as *nanos2* and *nanos3*). This thesis reports the cloning and characterization of *nanos3*. The expression of *nanos3* is first detected in nascent PGCs at late streak stage at approximately 7.25 dpc, and then expressed in the migratory phase of PGCs and also expressed in germ cells after the colonizing embryonic gonads. To determine the functional requirement for mouse *nanos3* in the germ cell development, *nanos3* knockout mice were generated. Both heterozygous and homozygous mice were viable and showed no apparent abnormalities. However, in 4-weeks male, the size and weight of testis are greatly reduced. Histological analyses showed that gametes were completely absent and that the seminiferous tubules were populated only with Sertoli cells. Similar to testis, ovaries of adult *nanos3*-null females were considerably atrophic, and exhibit complete absence of oocyte, follicles and corpora lutea. In *nanos3*-null embryos, equivalent numbers of PGC were observed at 7.5 dpc embryo, which indicates that *nanos3* may not be required for PGC specification. However, number of PGCs in homozygote was smaller than that in heterozygote at 8.5 dpc-9.5 dpc and PGCs were completely absent at 13.5 dpc. Investigation of changes in the number of PGCs between 7.5 dpc and 10.5 dpc embryos revealed that PGC divided at least 2 or 3 times but the number declined gradually and most of PGCs disappeared before 11.5 dpc. Therefore, *nanos3* is involved in the maintenance of PGCs by supporting the

proliferation and /or by suppression of cell death. To further address this question, cell death by TUNEL assay and immunostaining of cleaved caspase3 were analyzed. However, so far no apoptotic PGCs in the *nanos3*-null embryos were detected, although the morphological hallmarks of apoptosis was observed in 9.5 dpc PGCs.

These results indicate that *nanos3* plays important roles in the proliferation and/or survival of PGCs, rather than fate specification. These studies also suggest that evolutionarily distant organisms utilize conserved nanos genes to regulate early germ cell development. So far, PGCs, which segregated from extra embryonic mesoderm are distinct from somatic cells by their alkaline phosphatase activity and specific expression of *stella*. However, ALP or *stella* knockout mice develop without any detectable abnormality in PGCs. This thesis reports here for the first time specifically functional gene in nascent PGCs and elucidates a part of mechanisms of “establishment” as germ cells after germ cell specification.

## 論文の審査結果の要旨

マウスにおける生殖細胞分化のメカニズムは、ショウジョウバエや線虫のように極細胞質によるものではなく、胚体外組織からのシグナルによるものであることが明らかになってきた。しかし、始原生殖細胞 (PGC) の増殖や移動、あるいは幹細胞としての性質の維持に働く機構については不明な点が多い。一方、マウスにおいてもショウジョウバエの生殖細胞の形成に関わる遺伝子のホモログが同定され、同様な機能を持つ例が知られているため、相同遺伝子からの解析は有効なアプローチと考えられる。ショウジョウバエにおいて生殖細胞の形成と維持に必須の遺伝子 *nanos* のマウス相同遺伝子については、すでに *nanos1* が単離されているが、この遺伝子は神経系に非常に強い発現を示し、ノックアウトマウスにおける生殖細胞の形成に影響はみられなかった。そこで、本論文では、マウス *nanos* 遺伝子ファミリーのメンバーの一つである *nanos3* に焦点を絞り、その発現解析およびノックアウトマウス作製による機能解析を行った。

まず、13.5 日胚の精巣から調整した Total RNA を材料とした 5', 3'-RACE によって *nanos3* の完全長 cDNA をクローニングした。この遺伝子は、他の *nanos* ファミリー遺伝子のメンバーと同様に zinc finger モチーフを有していた。最初にマウス胎仔及び成体における *in situ* hybridization 及び RT-PCR 法を用いて詳細な発現解析を行った。その結果、*nanos3* は生殖細胞特異的に発現していることが明らかとなった。その発現は、PGC の形成直後から開始し、生殖巣に到達した後、雌では発現が次第に低下し、胎齢 13.5 日で完全に消失した。一方、雄では生殖巣に入った後も生殖細胞系列に発現し続けるが、胎齢 15.5 日頃にいったん消失し、生後精原細胞において再び発現することが明らかになった。

次に、*nanos3* の機能解析のためノックアウトマウスを作製した。このため、マウス BAC ライブラリーを用いて *nanos3* ゲノム遺伝子のクローニングを行った。この *nanos3* 遺伝子に LacZ 遺伝子を導入したターゲティングベクターを構築し、ES 細胞を用いた相同組換え法によりノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスのホモ変異個体は、見かけは正常であったが、雌雄生殖巣が顕著に矮小化していた。成体の組織学的解析を行った結果、雌雄ともに生殖細胞を完全に欠損していることが確認された。胎仔期の生殖細胞の発生過程を組織化学的に解析したところ、ホモ変異マウスでは、胎齢 7.5 日において野生型及びヘテロ変異マウスと同様に十数個のアルカリ性フォスファターゼ活性陽性細胞として PGC が出現し、生殖細胞の決定には異常がないことがわかった。しかし、その後、生殖細胞の移動期である胎齢 9.5 日から胎齢 10.5 日にかけて、野生型及びヘテロ変異マウスと比較して生殖細胞の数が顕著に減少していることがわかった。さらに、生殖細胞マーカーである TRA104 抗体を用いた免疫染色の結果、生殖巣に到達したわずかな生殖細胞はその後まもなく欠損することが示された。また、生殖細胞の異所的な移動の増加は見られず、胎齢 11.5 日において残った生殖細胞は生殖巣に到達していた。以上の結果から、マウス *nanos3* は PGC の形成の初期過程には直接関与しないが、PGC の増殖或いは生存の維持に重要な機能を果たしていると推測された。

本論文の成果は、ショウジョウバエの生殖細胞の形成と維持に必須の *nanos* 遺伝子のマウス相同遺伝子である *nanos3* が、哺乳動物の生殖細胞の増殖と維持にも重要な働きをすることをはじめて示したことである。そのメカニズムの解明は今後の課題であるが、この成果はこの分野の今後の研究に大きな手がかりを与えたものとして評価できる。

公開發表の後で、研究内容と関連分野に関する質疑応答を行った。笹岡さんは、いずれの質問にも的確に回答し、知識、理解力とも学位を受けるに水準に達していると判断した。また、英語の能力については、すでに研究成果の一部を Science 誌に発表していること、さらに本学位論文が英語で記載されていることから十分と判断した。以上、総合的にみて、本学位論文は、学位を授与するのに相応しい水準に達していると判定した。