

学 位 論 文 題 名

Germ line specification in amphibians :
epigenesis vs. preformation

(両生類における生殖細胞系列の決定：後成説対前成説)

学位論文内容の要旨

有性生殖を行う全生物にとって、生殖細胞とは次世代を担うという意味で最も重要な細胞であり、多細胞生物の進化の過程で最初に必要となった細胞である。後生動物における生殖細胞系列決定機構については大きく二つの機構が知られている。一つは、卵に局在する母性因子の複合体である生殖細胞質（生殖質）によって前成的に生殖細胞を決定する機構であり、昆虫、線虫、無尾両生類などにおいてよく知られているものである。もう一つは、胚発生時の比較的後期に胚誘導や細胞間相互作用によって生殖細胞が後成的に決定されるという機構であり、哺乳類でよく知られている。無尾両生類と非常によく似た胚発生過程を持つにも関わらず、有尾両生類は後者の機構を採用していると考えられている。後生動物全体における両機構の採用状況の概観から、後成的機構が祖先形質であり、前成的機構は派生形質であると予想されている。つまり、前成的機構は多細胞動物進化の過程で複数の動物門に独立に進化したものである。この二つの機構の進化に対する系統発生学的な考察は現在まで何度かなされているが、両生類の二群のように、非常に近縁な動物群がなぜ別々の機構を採用しているのかを含めて、いまだ納得のいく仮説は提出されていない。本研究においては、生殖細胞系列決定機構の進化を解析することを目的として、この両生類二群、有尾類と無尾類、をモデルとして取り上げた。まず、いまだ明らかになっていない有尾両生類での生殖細胞系列決定機構の詳細をイモリを用いて解析し、次に胚外植体を用いた無尾類（アフリカツメガエル）との比較実験を行うことにより生殖細胞系列決定機構の両者間での違いとその進化を考察した。

まず、イモリで始原生殖細胞を同定するための分子的指標を確立するために、既に他の多くの動物で報告され、生殖細胞特異的発現が確認されている *Dazl* 遺伝子のイモリ相同遺伝子 (*Cydazl*) を単離し、その全長配列を決定した。また、この *Cydazl* のリコンビナントタンパクを精製し、マウスに免疫することによって抗 *Cydazl* ポリク

ローナル抗体を作製した。これらをプローブに用いて、イモリにおける *Dazl* 相同遺伝子の発現解析を行った。その結果、1) *Cydazl* mRNA 及び *Cydazl* タンパクともに卵形成過程から初期胚発生過程を通して、微量ではあるが母性因子として胚全体に発現しており、2) 胚発生過程における細胞特異的な発現は、孵化後幼生において生殖巣に到達した始原生殖細胞で初めて観察された。この発現パターンは、卵母細胞の生殖質に局在する無尾類のそれと大きく異なっており、有尾類の生殖細胞系列決定機構は、無尾類のような生殖質に依存した前成的決定機構とは異なることが示唆された。

次に、両者における始原生殖細胞の胚内起源の違いをさらに明確にする目的で、胞胚、原腸胚、後期神経胚から胚の一部を切り出して外植体として培養した後に、先に確立したプローブを用いて、各外植体での生殖細胞の分化状況を解析した。この結果、アフリカツメガエルでは常に腹側外植体に生殖細胞の分化が観察されるが、イモリでは逆に背側外植体に観察された。この結果によって、有尾両生類の始原生殖細胞の胚内起源は中胚葉にあり、その予定細胞は中胚葉誘導により出現することが示唆された。つまり有尾類の生殖細胞系列決定機構は中胚葉誘導による後成的機構であり、無尾類における植物極内胚葉の生殖質に依存した前成的機構とは決定的に異なることが分かった。

この有尾類型（祖先型）から無尾類型（派生型）への進化を説明するために、以下の二つの現象に着目した。胚誘導因子（体軸形成因子、胚葉形成因子と生殖細胞形成因子）に対する細胞の応答能と、それらの母性因子の卵内における局在化様式である。有尾類が採用している祖先型の後成的機構では、母性因子の局在は体軸形成因子や胚葉形成因子に限られ、生殖細胞形成因子は局在しない。そのため生殖細胞形成因子は広く卵内に分布するので、初期胚の多くの割球が生殖細胞へと誘導されうる潜在性を持つ。一方無尾類では、生殖細胞形成因子が他の胚誘導因子の卵内局在に関わる機構を利用して、それらと同様な卵内局在を示すようになり、特定の割球のみが生殖細胞へと決定されるようになった。この進化過程は胚誘導応答遺伝子のシス調節領域や生殖細胞形成に必要な遺伝子の3'非翻訳領域に偶発的に起こりうる数塩基の置換によって説明できる。

この仮説は、後生動物全体に当てはめて考えることができるものである。つまり、ボディープランを母性因子の卵内局在に頼っているモザイク性の強い胚において、生殖質を用いる前成的機構が収斂進化し易く、等価な胚性幹細胞群を生み出す調節性の強い胚では前成的機構が進化しにくい、という新しい仮説である。

学位論文審査の要旨

主査 助教授 若原正己
副査 教授 山下正兼
副査 教授 高橋孝行
副査 助教授 清水 隆

学位論文題名

Germ line specification in amphibians : epigenesis vs. preformation

(両生類における生殖細胞系列の決定：後成説対前成説)

本論文は、有尾両生類と無尾両生類に見られる、これまで長年にわたって解明されていなかった生殖細胞系列の決定様式の違いを明らかにするために行われた。申請者はイモリ（有尾類）とアフリカツメガエル（無尾類）をモデル動物として採用し、実験発生学的、分子生物学的、分子進化学的手法を用いて研究した。まずイモリの生殖細胞の分子マーカーとしてイモリ *Dazl* 遺伝子 (*Cydazl*) を単離し、さらにその遺伝子産物に対する抗体を作成して、各発生段階における *Cydazl* mRNA および *Cydazl* タンパク質の発現パターンを詳細に分析した。また、さまざまな発生段階のイモリ胚とアフリカツメガエル胚からそれぞれ背側および腹側半胚を切りだして外植し、生殖細胞がどちら側の半胚から分化するかを追跡した。その結果、アフリカツメガエルでは腹側半胚から、イモリ胚では背側半胚から生殖細胞が分化することを決定的に証明した。本研究は、生殖細胞特異的分子マーカーを用いてイモリ始原生殖細胞の形成部位が背側中胚葉であることを世界にさきがけて明らかにしたものである。これらの知見をもとに、有尾両生類の後成的な生殖細胞形成方法が祖先型であり、無尾類の前成的な仕組みが派生形質であるという仮説を提出した。この仮説は本論文によってはじめて厳密に立証されたものであり、生殖細胞形成機構に関する研究の発展に大きく貢献するものである。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。