

Analyses on germline establishment and differentiation by nuage components in medaka (*Oryzias latipes*)

(生殖顆粒構成成分によるメダカ生殖細胞系列確立分化解析)

学位論文内容の要旨

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。発生における生殖細胞の確立・分化機構はいくつかのモデル動物で解析されているが、その共通基盤の詳細は明らかでない。生殖細胞の分化・維持には、生殖細胞特異的細胞内構造物である生殖顆粒が必要なことが知られている。本学位研究は、メダカを用いてこの生殖顆粒の構成成分を単離解析し、その局在を調べることにより、生殖細胞の確立過程と分化の様態を明らかにした研究である。学位論文は3章からなる。

第1章は、生殖顆粒の構成成分である *tdrl* 遺伝子をメダカから単離してその蛋白質の抗体を作製、他の構成成分である *nanos3* と *olvas* との共局在と生殖顆粒の形態変化を調べた研究である。その結果、生殖細胞が生殖腺に入る前は密の顆粒構造であった生殖顆粒が生殖腺に入った後では、中空の構造物として検出されるようになった。一方、性分化初期の雌生殖腺では、生殖細胞はシスト分裂を行ない、減数分裂に入る。この過程で調べてみると、中空状構造物が、シスト分裂生殖細胞では細かい顆粒になり、さらに減数分裂期ではこの顆粒が核膜外周に局在することが明らかとなった。このことから、顆粒構造の変化は、何らかの生殖細胞の分化状態を表していると考えられる。生殖細胞が生殖腺に入る前で顆粒構造を変化させたことから、この段階で生殖細胞は形態が同じに見えても、分化状態は異なっていること示唆している。

第2章では、上記生殖顆粒成分の1つ、*nanos* 遺伝子のシンテニー解析と発現解析の結果を示す。第1章の解析過程で *nanos* 産物が原腸胚期以前にも存在する予備結果が得られた。一方、*nanos* 遺伝子は他の動物で遺伝子ファミリーを構成することが知られる。そこで、他に生殖細胞で発現する *nanos* がメダカには存在するか、他の動物で見いだされる生殖細胞発現 *nanos* 遺伝子との系統関係を明らかにするために解析を行なった。その結果、メダカには4つ *nanos* 遺伝子があることを明らかになり、このうちの1つはゲノム上でアノテーションされていない *nanos* 遺伝子 (*nanos1b*) であった。生殖細胞に発現している *nanos* は4つの *nanos* 遺伝子の中で *nanos3* のみであり、4種の *nanos* の中でも一番保存されている遺伝子であることが判明した。以上の結果により、複数の *nanos* 遺伝子の動物種間の対応が明らかになっただけでなく、*nanos3* による生殖細胞分化様態の比較を他の動物とできる基盤が整った。

第3章では受精卵にまで遡り、生殖細胞系列確立を解析した研究結果を示す。この研究の結果、生殖細胞になり得る細胞系列(前駆始原生殖細胞)は *nanos3* 蛋白質を持つ細胞として一細胞期より存在することが明らかになった。*nanos3* 蛋白質は胚盤全体の中心・卵黄側に存在し、この顆粒を取込んだ細胞が前駆始原生殖細胞となることが示唆され、多数の初期卵割の細胞分割面の位置を比較検討した結果、生殖顆粒の位置は分割面とは独立していると考えられた。さらにひとたび他の体細胞系列から分離すると、顆粒の不等分配によりその個数が維持されることが示された。その後原腸胚期初期になると、*nanos3* を含んだ顆粒構造に *tdrd1* や *olvas* 蛋白質が局在するようになることから、この時期に生殖細胞系列(始原生殖細胞)として確立することが示唆された。

以上、生殖腺顆粒を構成する成分をクローニングしてその発現局在を解析することにより、従来は原腸胚期からしか判別できなかったメダカ生殖細胞系列が、予定始原生殖細胞として他の細胞系列から区別できること、

その確立までには、胚盤全体に対する生殖顆粒の分布を決める機構と顆粒構造の不等分配の2つの機構が存在しなくてはならないことが示された。さらに確立原腸胚初期には、tdrd1 や olvas 蛋白質が局在する機構が働き、生殖細胞が確立することが資された。確立期以降も生殖顆粒の局在変化を追うことで、配偶子となりうる生殖細胞の分化段階が識別可能であることを明らかとした。

ショウジョウバエでは生殖顆粒を取込んだ細胞が前駆始原生殖細胞となる。ゼノパスの生殖顆粒は卵植物極側に局在することが知られている。メダカを用いた本研究結果は、分割面とは独立した生殖顆粒の局在機構が初期発生には脊椎動物共通に存在することを示唆しており、ゼノパスでの解析結果もこの仮説に矛盾しない。本研究は、生殖顆粒の局在を詳細に追跡することにより、メダカ生殖細胞確立、分化の様態を明らかにしただけでなく、動物共通の機構を示唆した研究となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 隆

副 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 准教授 田 中 実((独)自然科学研究機構・

基礎生物学研究所)

学 位 論 文 題 名

Analyses on germline establishment and differentiation by nuage components in medaka (*Oryzias latipes*)

(生殖顆粒構成成分によるメダカ生殖細胞系列確立分化解析)

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。発生における生殖細胞の確立・分化機構はいくつかのモデル動物で解析されているが、その共通基盤の詳細は明らかでない。生殖細胞の分化・維持には、生殖細胞特異的細胞内構造物である生殖顆粒が必要な事が知られている。本学位研究は、メダカを用いてこの生殖顆粒の構成成分を単離解析し、その局在を調べることにより生殖細胞の確立・分化の様態を明らかにした研究である。学位論文は3章からなる。

第1章は、生殖顆粒の構成成分である *tdtr1* 遺伝子をメダカから単離してその蛋白質の抗体を作製、他の構成成分である *nanos3* と *olvas* との共局在と生殖顆粒の形態変化を調べた研究である。その結果、生殖顆粒の構造は生殖細胞が生殖腺に入る前と入った後では異なり、さらに卵形成の過程でも分化状態によって異なることが明らかとなった。この研究は、形態的に同じに見えても、分化状態は異なっていることを細胞学的に示した研究である。

第2章では、上記生殖顆粒成分の1つ、*nanos* 遺伝子のシンテニー解析と発現解析の結果を示す。*nanos* 遺伝子は遺伝子ファミリーを構成するが、メダカには4つ *nanos* 遺伝子があることを明らかになった。このうちの1つはゲノム上でアノテーションされていない *nanos* 遺伝子 (*nanos1b*) であった。生殖細胞に発現している *nanos* は *nanos3* であり、4種の *nanos* の中で一番保存されている遺伝子であることが判明した。以上の結果により複数の *nanos* 遺伝子の動物種間の対応が明らかになっただけでなく、*nanos3* による生殖細胞分化様態の比較を他の動物とできる基盤が整った。

第3章では受精卵にまで遡り、生殖細胞系列確立を解析した研究結果を示す。この研究の結果、生殖細胞になり得る細胞系列(予定始原生殖細胞)は *nanos3* 蛋白質を持つ細胞として一細胞期より存在することが明らかになった。*nanos3* 蛋白質は胚盤全体の中心・卵黄側に存在し、卵割の結果この顆粒を取込んだ細胞が予定始原生殖細胞となることが示唆された。さらにひとたび他の体細胞系列から分離すると、不等分裂によりその個数が維持されることが示された。その後原腸胚期初期になると、*nanos3* を含んだ顆粒構造に *tdrd1* や *olvas* 蛋白質が局在するようになることから、この時期に生殖細胞系列(始原生殖細胞)として確立することが示唆された。

以上、生殖腺顆粒を構成する成分をクローニングしてその発現局在を解析することにより、従来は原腸胚期

からしか判別できなかったメダカ生殖細胞系列が、予定始原生殖細胞として他の細胞系列から区別できること、その確立維持には、胚盤全体に対する生殖顆粒の分布を決める機構と不等分裂の2つの機構が存在しなくてはならないことが示された。さらに確立以降も生殖顆粒の局在変化を追う事で、配偶子となりうる生殖細胞の分化段階が識別できることが明らかとなった。この機構は他の動物の生殖細胞分化にも共通部分があると予想され、本学位研究はメダカの生物学だけでなく、動物一般の生殖研究や応用水産研究へも影響を与えることが期待される。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。