

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	分子発生生物学講座 (小笠原 直毅教授)		
氏 名	前川 真吾	提 出	平成14年 1月 8日
題 目	ゼブラフィッシュ生殖細胞形成過程における vasおよびzDazl遺伝子の機能解析		
要旨 生殖細胞は高等真核生物において次世代を生み出すために特化した細胞であり、初期発生過程において、どの時期に決定され分化するのかは非常に興味深い問題である。現在までにショウジョウバエや線虫、アフリカツメガエルを用いた研究から、生殖質と呼ばれる特定の卵細胞質により生殖細胞が決定されることが明らかとされている。さらに、ショウジョウバエや線虫を用いた遺伝学的な解析から形成機構に関する多くの知見が得られているが、脊椎動物においてはほとんど明らかにされていない。本研究では脊椎動物のモデルとして近年注目されているゼブラフィッシュを用いて生殖細胞形成機構の解析を行った。 ゼブラフィッシュにおける生殖細胞を識別するために、まず、生殖細胞に特異的に発現する遺伝子の同定を試みた。候補遺伝子としてはvasa相同遺伝子に注目した。vasa相同遺伝子はDEAD box型のRNAヘリケースをコードしており、線虫やショウジョウバエ、ツメガエル、マウスなど多くの生物種で同定されている。さらに、それぞれの生物種において生殖細胞に特異的に発現することが報告されており、ゼブラフィッシュにおいても生殖細胞に特異的に発現すると考えられた。RT-PCR法およびcDNAライブラリースクリーニングにより、ゼブラフィッシュvasa相同遺伝子(vas遺伝子)を単離した。発現解析の結果、vas遺伝子は初期発生過程から成魚に至るまで生殖細胞特異的に発現することが明らかとなった。さらに、興味深いことにvas遺伝子は母性的に発現し、母性vas mRNAが卵割面の両端に局在することが明らかとなった。以上の結果から、この卵割面両端領域に局在する因子群をとりこんだ細胞が生殖細胞として決定されることが示唆された。そこで、この卵割面両端領域に局在する因子群が生殖細胞形成に果たす役割を調べるために、卵割面両端領域の細胞質の除去を行い、その後の生殖細胞形成の解析を行った。			

その結果、両端領域の細胞質を除去した胚においては生殖細胞が著しく減少していた。このことから卵断面の両端領域には生殖細胞形成に必須な因子群が局在していることが明らかとなった。

さらに生殖細胞形成機構を明らかにするために、ゼブラフィッシュDAZ相同遺伝子の同定を行った。DAZ遺伝子はヒトの無精子症の原因遺伝子として単離され、RNA認識モチーフ(RRM)をもつRNA結合タンパク質をコードしている。さらに、その相同遺伝子が様々な生物で単離されており生殖細胞の形成や分化に関与することが示唆されている。特にツメガエルにおいては母性mRNAが生殖質に局在することが知られている。

定法に従ってゼブラフィッシュDAZ相同遺伝子(zDazl遺伝子)を同定した。発現様式の解析からzDazl遺伝子は母性的に発現し、母性zDazl mRNAは1細胞期胚の植物極(卵黄底部)に局在するという非常に興味深い結果を得た。その後、4-16細胞期にかけて母性mRNAの植物極から動物極への移動が観察された。このような初期胚における植物極への局在や移動は魚類においては初めて観察された現象である。その後原腸胚期に発現が消失し、生殖細胞の分化が始まる受精後8.5日目から再び生殖細胞に発現が観察され、成魚精巣においては精原細胞、精母細胞に発現がみられた。

このような興味深い局在や発現様式を示すzDazl遺伝子の機能を解析する第一歩として結合RNA配列の同定を行った。in vitro selection法を用いて結合配列を決定した結果、zDAZLタンパク質はGUUC配列に特異的に結合することが明らかとなった。さらに、zDAZLタンパク質は3'非翻訳領域(3'UTR)のGUUC配列を介して標的mRNAを認識し、ポリソームと相互作用することで標的mRNAからの翻訳を活性化することが明らかとなった。また、zcdc25やzDazl遺伝子および最近、生殖細胞特異的に発現することが示されたnanos相同遺伝子の3'UTRを介して翻訳を活性化することも明らかとなり、これらのmRNAが標的mRNAであることが示唆された。以上から、zDAZLタンパク質は標的mRNAの翻訳を活性化することで生殖細胞の形成や分化の制御を行うことが示唆された。

本研究から、ゼブラフィッシュにおいてはvas mRNAやzDazl mRNAのような母性mRNAの局在や翻訳の制御などの転写後制御が生殖細胞の決定や分化に重要な役割を果たすものと結論した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 前川 真吾

生殖細胞は生命の連続性を担う細胞であり、その形成・成立機構の理解は、分子発生生物学領域の最も主要な研究課題の一つである。

本研究では、ゼブラフィッシュをモデル実験生物として、まず、生殖細胞特異的に発現する *vasa* (*vas*) 遺伝子を同定し、その母性 mRNA が初期卵割期の卵割溝に局在することを見出した。外科的手術によってこの局在部域を除去したところ、生殖細胞形成が阻害されたことから、*vas* mRNA を含む母性局在因子がゼブラフィッシュ生殖細胞決定因子として働くことが強く示唆された。次に、ヒト無精子症原因遺伝子として知られる *DAZ* 遺伝子に高い相同性を有するゼブラフィッシュ *DAZ-like* (*Dazl*) 遺伝子を同定した。*Dazl* 遺伝子は、精巣では精原細胞や精母細胞に強く発現しており、減数分裂開始過程への関与が示唆された。また、卵母細胞、および受精卵中で植物極に母性 mRNA の局在が観察された。さらに、*Dazl* 遺伝子のコードする RNA 結合蛋白質の標的 RNA 配列を同定した。そして、培養細胞におけるレポーター解析や *in vitro* 翻訳系を用いて、*Dazl* 蛋白質が標的配列への結合を介して mRNA の翻訳活性化を行うことを示すとともに、翻訳活性化に必須な蛋白質内ドメインを明らかにした。また、*dazl* mRNA や *nanos* mRNA が *Dazl* 蛋白質による翻訳活性化制御を受けることを示し、生殖細胞形成過程における役割について考察を行った。

以上のように、本論文は脊椎動物の生殖細胞形成過程に働く RNA 情報発現制御機構を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。