

生殖系列研究チーム

Laboratory for Germline Development

チームリーダー 中村 輝
NAKAMURA, Akira

生物を形作る細胞は、大きく体細胞と生殖細胞とに分類される。生殖細胞は、配偶子を形成する細胞であり、遺伝や進化など生物種の形成・維持に深く関わっている。多くの動物において、生殖細胞は胚発生の早い時期に確立され、体細胞系列とは全く異なった発生プログラムを進行させる。このような生殖細胞の形成・分化は、しばしば生殖質と呼ばれる特殊な細胞質領域に局在化している RNA やタンパク質によって制御されている。しかし、生殖質がどのようにして形成され維持されているのか、あるいは、生殖質がどのようにして生殖細胞の形成・分化を制御しているのかについては、未だ解明されていない多くの謎がある。当研究チームでは、ショウジョウバエを用いて、発生遺伝学的手法から生殖細胞の形成および分化の分子機構を解析している。さらに、脊椎動物における生殖細胞形成機構についての知見を深める目的で、脊索動物であるカタユレイボヤを用いた研究も行っている。

1. 母性 RNA の輸送・局在化と翻訳の時空間的制御機構の解析 (佐藤, 谷川, 中村)

動物の初期胚発生は、しばしば卵内に局在している母性 RNA によって制御されている。このような RNA は、局在した領域でのみ翻訳されることにより細胞内非対称性を作り出す。ショウジョウバエ胚の腹部・生殖細胞形成には、胚後極に形成される生殖質と呼ばれる特殊な細胞質領域が重要である。生殖質の形成は、母性因子 *oskar* によって指揮される。卵形成過程において *oskar* mRNA は、卵母細胞後極に局在した後タンパク質へと翻訳される。そして、そこに腹部形成と生殖細胞形成に関わる様々な母性 RNA・タンパク質が集合して生殖質が形成される。*oskar* の機能を失った突然変異体、あるいは *oskar* mRNA が卵母細胞後極へ局在しない突然変異体から生まれた卵では、生殖細胞も腹部領域も形成されず致死となる。一方、遺伝学的操作により、*oskar* mRNA を前極に局在させた胚においては、前極にも生殖細胞が形成されると共に、腹部を前半部にも持つ双腹胚へと発生する。以上の知見は、*oskar* の活性を後極に限局することが正常な胚発生に必須であることを示している。しかし、*oskar* mRNA の局在だけでは *oskar* の活性を卵母細胞後極に限局するには不十分であり、局在していない mRNA の厳密な翻訳抑制と局在した領域でのみ翻訳抑制を解除する機構が必須である。すなわち、*oskar* mRNA 局在と翻訳制御は互いに連携した制御を受けている。このような過程には、*oskar* mRNA に結合し、RNP 複合体を形成するタンパク質が重要である。しかし、その分子機構については良く分かっていない。

昨年度までの研究により、*oskar* mRNA の輸送過程における翻訳抑制に関わる因子として、Cup を同定した。Cup の機能を欠く卵巣においては、Oskar タンパク質が、卵形成初期から premature に翻訳される。さらに、Cup は翻訳開始因子 eIF4E と直接結合すると共に、*oskar* 3' UTR に結合する翻訳抑制因子として知られていた Bruno とも会合する。以上の結果から、Cup タンパク質は、eIF4E-eIF4G の結合を阻害する活性を持った新規翻訳抑制因子であり、Cup の

oskar mRNA に対する特異性は、*oskar* mRNA の 3' UTR に結合する Bruno タンパク質との会合により獲得されていると考えられた。

本年度は、eIF4E-Cup-Bruno 相互作用の制御が、卵母細胞後極に到達した後の *oskar* mRNA 翻訳抑制に関わっている可能性について検証するため、Cup の翻訳後修飾について検討した。λ フォスファターゼ処理により、Cup の SDS-PAGE 上での移動度が変化することから、Cup タンパク質はリン酸化されていると予想された。次にショウジョウバエ属 6 種の Cup タンパク質の配列を比較した結果、eIF4E 結合領域周辺で完全に保存されている Ser/Thr 残基が 2 つ同定された。これら残基を Ala に置換した変異体を作成し、eIF4E との結合能を検討した。しかし、残念ながら結合能の低下は認められなかった。また、昨年度から着目している PKA に関しては、Cup との間に有意な遺伝学的相互作用は認められなかった。現在、PKA の下流で働くと思われる Ser/Thr キナーゼである LKB1 と、Cup を用いた酵母 Two-hybrid で相互作用が認められた LK6 キナーゼについて、Cup あるいは eIF4E, Bruno のリン酸化に関わっているのかを検討している。また、*oskar* 3' UTR を介した翻訳制御機構を詳細に解析するために、ショウジョウバエ S2 細胞ライゼートを用いた *in vitro* 翻訳系の確立を目指している。

2. 生殖質形成が異常となる新規突然変異体のスクリーニング (田中, 中本, 中村)

新たに遺伝学的アプローチから母性 RNA あるいはタンパク質の輸送に関わる新規因子の単離・同定を計画した。突然変異のスクリーニングには、Vasa-GFP 融合タンパク質を利用した。Vasa は、ショウジョウバエ生殖質形成に必須のタンパク質の 1 つで、*oskar* mRNA の局在化・翻訳に依存して卵母細胞後極に局在化することが知られている。第 2 染色体左腕に対し、EMS 処理した 5,122 系統について、“モザイク解析法 (FLP-FRT システム)”を用いて、突然変異ヘテロの個体中で突然変異ホモの生殖系列細胞を作出

し、スクリーニングを行った。その結果、Vasa-GFP が卵母細胞後極に局在化しない、あるいは一過的に局在化するが卵形成の進行に伴ってシグナルが後極から消失する突然変異体が、合わせて 66 系統得られた。これら突然変異体について、遺伝子多型を利用したマッピングを行った。さらに、染色体上の近傍領域にマップされた系統について、相補検定を行った。その結果、これらの内 25 系統は、すでに *oskar* mRNA の輸送に関わることが報告されている突然変異 (*cappuccino*, *spire*) のアリルであった。残り 41 系統については、28 個は 8 つの complementation group に属することが判明した。これらの内 6 つのグループについては責任遺伝子の同定に成功した。残念ながら、5 遺伝子については既知の遺伝子であった。しかしながら、*oskar* mRNA の輸送、局在に対する機能についての詳細な解析がなされていないので引き続き解析を進めていきたい。新規であった遺伝子は、真核生物で高度に保存されている分子機能不明の約 2,000 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。現在抗体作成を行っており、卵形成過程における分布パターンについて検討すると共に、酵母 Two-Hybrid 法、あるいは免疫沈降・質量分析法を用いて、相互作用する分子の同定を進めていく予定にしている。

3. 生殖細胞の維持・分化が異常となる新規母性効果突然変異、*N14* の解析 (羽生-中村, 中村)

ショウジョウバエの予定始原生殖細胞 (極細胞) は、胚発生初期に胚の後極に形成され、その後生殖巣まで移動し、始原生殖細胞へと分化する。これら一連の過程には、母性因子が必須の役割を担っている。現在までに、極細胞の形成過程に必要な母性因子は多数同定されており、その分子機能の解析が進みつつある。一方、極細胞の移動・分化過程については、同定されている母性因子が少なく、未解明の問題が多く残されている。極細胞の移動・分化過程の分子機構を明らかにすることを目的として、この過程が異常となる母性効果突然変異体の単離を行った。このようなスクリーニングによって得られた極細胞が維持されなくなる突然変異系統、*N14* について解析を進めた。

母性 *N14* 変異胚では、極細胞は正常に形成されるが、生殖巣まで移動する過程でその数が激減する。このため、これらの胚から発生した成虫は高い不稔性を示す。caged-FITC を用いたトレーサー実験と細胞死マーカーを用いた各種染色の結果、母性 *N14* 変異胚の極細胞は、カスパーゼ依存的な細胞死とは異なったメカニズムで消失していることを明らかにした。

遺伝子座のマッピング、DNA シークエンス、およびゲノム断片を用いた transgenic rescue 解析により、*N14* 突然変異体は *Wunen2* (*Wun2*) タンパク質のコーディング領域の 111 番目のトリプトファンコドン (TGG) が終始コドン (TGA) に置換されたナンセンス変異であることを明らかにした。*wun2* 遺伝子は、膜結合型の脂質代謝酵素である lipid phosphate phosphatase (LPP) をコードしている。LPP は多細胞生物において脂質シグナリング分子の生産あるいは分解に関わっていることが予想されている。興味深いことに、LPP は細胞外のリン脂質を基質として、その脱リン酸化反応を触媒すると共に、脂質産物を細胞内に取り込む活性を持つ Ecto 酵素である。

母性 *wun2* mRNA は、胚発生初期において極細胞に濃縮していた。さらに、Gal4-UAS システムを用いて *wun2* 遺伝子を極細胞特異的に発現させることにより、母性 *N14* 変異の異常は相補された。以上の結果から、*Wun2* は生殖細胞自律的に働いていると考えられた。一方、*Wun2* はホモログである *Wun* と共に体細胞で発現し、極細胞の移動に対し反発性環境を作り出すことに関わっていることが知られている。さらに、*Wun* あるいは *Wun2* を体細胞で過剰発現させると、極細胞死が引き起こされることが報告されている。興味深いことに、極細胞での *Wun2* 過剰発現は、*Wun2* の体細胞での過剰発現による極細胞死をレスキューすることを見いだした。すなわち、体細胞での LPP と極細胞中の LPP 活性とが互いに競合していることが判明した。LPP が細胞外リン脂質を基質とする Ecto 酵素であると考え合わせると、極細胞内の LPP と体細胞の LPP とは、基質の分解、細胞内への取込みに関して競合していると考えられた。以上の結果から、体細胞で発現する *Wun*、*Wun2* は、極細胞の生存因子を作り出すために必要な細胞外リン脂質を分解することにより、極細胞移動の反発環境を作り出している可能性が考えられた。

4. *polar granule component* (*pgc*) 遺伝子突然変異体の単離 (園部, 羽生-中村, 中村)

ショウジョウバエの生殖質には、特異的なオルガネラである極顆粒 (*polar granule*) が存在する。極顆粒は非膜性の構造物であり、生殖細胞の形成・分化に関わる母性 RNA やタンパク質が局在した RNP 複合体である。我々は、極顆粒の主要構成成分の 1 つとして *pgc* RNA を同定している。また、*pgc* RNA の分子機能の 1 つとして、生殖細胞の維持・分化に必要なことを明らかにしてきた。しかし、この結果は、アンチセンス RNA の発現によって内在 *pgc* RNA 量を低下させた胚を用いた解析によるものであり、*pgc* RNA のより詳細な分子機能解析のためには、*pgc* RNA 遺伝子の突然変異が必要である。そこで、*pgc* RNA 遺伝子の 5' 側約 13 kb に位置する P 因子系統 (rF139) を使って、*pgc* RNA 遺伝子領域の欠失変異体のスクリーニングを行った。その結果、P 因子挿入点から *pgc* 遺伝子領域の約 100 bp 下流までの約 15 kb が欠失した系統を得ることができた。次に rF139P 因子挿入点と *pgc* 遺伝子の間に存在する必須遺伝子の機能を、この領域を含むゲノム配列によって相補させ *pgc* 遺伝子領域のみが完全に欠失した系統 *pgc*^{Δ1} を作成した。*pgc*^{Δ1} 系統のホモ雌は正常に卵を産んだ。しかし、そのような胚では、生殖細胞が胚発生中期以降、カスパーゼ依存的な細胞死によって消失し、80% 以上の子孫は不妊の成虫へと発生した。この生殖細胞特異的な異常は *pgc* cDNA を Gal4-UAS システムを用いて卵形成過程で発現させることにより相補された。以上の結果から、*pgc*^{Δ1} すなわち *pgc*-null の表現系は、アンチセンス RNA 発現の場合と基本的には同じであることが明らかとなった。現在、*pgc*^{Δ1} 系統に様々な変異 *pgc* 遺伝子を導入し、*pgc* の分子機能について解析している。

5. カタユウレイボヤにおける生殖細胞形成機構の解析 (白江, 中村)

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は、遺伝子発現

機構を解析する上で有用なモデル生物の1つである。そこで、ホヤを用いて生殖細胞形成・分化機構を遺伝子発現ネットワークの観点から解析することを計画した。生殖細胞の分化機構は、生物が多細胞体へと進化した際に最初に確立されたものであると予想されている。しかし、生殖細胞の形成機構は動物種間で異なっている。例えば、ショウジョウバエ、線虫、カエルでは、生殖細胞の形成・分化に関わる因子が、母性因子として生殖質に局在しているが、哺乳類の生殖細胞は胚発生過程で細胞間の相互作用（すなわち外部からのシグナル分子の作用）によって形成される。興味深いことに、ホヤにおいては上記2つの生殖細胞形成機構が共存している可能性が高いとの報告がある。本研究では、ホヤの生殖細胞で発現する遺伝子について、生殖細胞における発現に必要なプロモーター領域を同定する。さらに、これら制御領域に結合するトランス因子を同定することにより、生殖細胞の形成・分化にかかわる遺伝子の発現制御ネットワークの解明を目指す。

カタユレイボヤの胚発生過程において生殖細胞で特異的に発現が認められる mRNA としてショウジョウバエ *vasa* のホモログ (*CiVH*) と *tudor* のホモログ (*CiTud3*) を同定した。次に、*CiVH* タンパク質に対する特異的抗体を作成した。抗 *CiVH* 抗体を用いてホヤ胚を染色した結果、興味深いことを見いだした。今まで、ホヤの生殖細胞は 64 細胞期に確立され (B7.6 割球と呼ばれる)、胚発生過程はそれ以降細胞分裂しないと記載されてきた。しかし、*CiVH* 抗体と細胞分裂の M 期のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 抗体 (PH3) との 2 重染色の結果、B7.6 割球が原腸胚期から神経板胚期にかけて分裂していることを見いだした。*CiTUD3* タンパク質についても特異的抗体を作成し解析を進めた結果、*CiTUD3* タンパク質も *CiVH* と同様のパターンで発現していた。さらに、生殖細胞を含む幼生の尾部を切除し成体まで飼育した実験により、カタユレイボヤにおいては、生殖細胞が変態後に再生することを確認した。

さらに、*CiVH* 遺伝子については、5' 側上流約 2 kb 中に生殖細胞での発現に十分なプロモーター領域が含まれていることを明らかにした。しかしながら、レポータープラスミドの B7.6 細胞への導入効率が極めて悪く、詳細な解析を困難にしている。現在、レポーター遺伝子の導入効率を上げる目的で *Minos* トランスポゾンを用いた形質転換法を試みている。

Germ cells, the progenitors of gametes, are the only type of cell that transmits genetic information through fertilization. Thus, they play unique and central roles in heredity and evolution. Germ cells also arise via a developmental program that differs from that of somatic cell lineages. In many animal species, including *Drosophila* and *Xenopus*, germline formation is controlled by maternally inherited RNAs and proteins localized to a specialized form of cytoplasm in eggs, called the germ plasm. Germ plasm mRNAs are translated in a spatio-temporally regulated manner. However, the mechanisms by which germ plasm is assembled and controls germline development remain largely elusive. We are studying the mechanisms underlying germline development using *Drosophila* as a model system. In addition, we have started investigations into germline development in an ascidian, *Ciona*

intestinalis, a member of the chordate lineage, from which all vertebrates arose.

We have isolated a maternal-effect mutant, named *N14* that affects pole cell development. Embryos from *N14* mutant mothers (hereafter called *N14^{m-}* embryos) form normal numbers of pole cells. However, in subsequent embryogenesis, pole cells begin to die, and few or no pole cells are incorporated into the gonads. No discernible morphological defect in the somatic cell development is observed in *N14^{m-}* embryos, and they develop into sterile adults at high frequency (> 80%). All of these phenotypes appeared to be very similar to those in *pgc⁻* embryos. However, detailed examinations of *N14^{m-}* embryos have led us to conclude that *N14* is a novel class of maternal-effect mutations that affect pole cell survival. For example, the pole cell death in *N14^{m-}* embryos, unlike that in *pgc⁻* embryos, occurs in a caspase-3-independent manner, and, unlike in *pgc⁻* pole cells, global transcriptional regulation remains intact in early *N14^{m-}* pole cells.

We have identified *N14* as an allele of *wunen2* (*wun2*), which encodes lipid phosphate phosphatase (LPP). LPP is an integral membrane protein that promotes the uptake and dephosphorylation of extracellular lipid phosphate substrates. LPP can dephosphorylate a variety of lipid phosphates *in vitro*, such as sphingosine 1-phosphate, ceramide 1-phosphate, lysophosphatidic acid and phosphatidic acid, generating bioactive lipids such as sphingosine, ceramide and diacylglycerol. We found that pole cells were highly enriched in maternal *wun2* mRNA, and that the pole-cell death in *N14^{m-}* embryos was rescued by the pole cell-specific expression of *wun2* in embryogenesis. Thus, it seems likely that the maternally supplied Wun2 is required cell-autonomously in pole cells for their survival. Interestingly, it has been reported that Wun2 and its homolog Wun are expressed zygotically in somatic cells to provide a repulsive environment to steer the migration of pole cells. Furthermore, it has also been reported that overexpression of either Wun or Wun2 in somatic cells causes pole cell death. This latter phenotype is very similar to that observed in maternal *wun2* mutant embryos. We obtained genetic evidence that pole cell survival requires a proper balance between LPP activity in pole cells and somatic cells.

Given that Wun and Wun2 are likely to function as ecto-enzymes, it may be that the same extracellular lipid phosphate is dephosphorylated by Wun2 in pole cells and both Wun and Wun2 in somatic cells. Thus, we propose that Wun2 in pole cells competes with Wun and Wun2 in somatic cells for the uptake and dephosphorylation of a lipid phosphate substrate, which is required by pole cells to produce a survival signal. An extracellular substrate might direct somatic cells to produce a repellent molecule, while directing pole cells to produce a distinct survival signal. However, we feel it is also conceivable that the activity of Wun and Wun2 in somatic cells provides a repulsive environment for pole cell migration simply by depleting a substrate required for pole cell survival.

Research Subjects

1. Mechanisms underlying the assembly of germ plasm
2. Roles of germ plasm components in germ cell development
3. Inter-species similarities and differences in germ cell formation

Staff

Team Leader

Dr. Akira NAKAMURA

Research Scientists

Dr. Kazuko HANYU-NAKAMURA

Dr. Keiji SATO

Dr. Maki SHIRAE-KURABAYASHI

Dr. Tsubasa TANAKA

Technical Staff

Ms. Chiaki NAKAMOTO

Ms. Hiroko SONOBE

Ms. Akie TANIGAWA

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Hanyu-Nakamura K., Kobayashi S., and Nakamura A.:
“Germ cell-autonomous Wunen2 is required for germline
development in *Drosophila* embryos”, *Development* **131**,
4545–4553 (2004). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nakamura A., Sato K., and Hanyu-Nakamura K.: “Cup
binds to eIF4E and regulates *oskar* mRNA translation
in *Drosophila* oogenesis”, FASEB 2003 summer research
conf. on Intracellular RNA sorting, transport and local-
ization, Snowmass, USA, June (2003).

Nakamura A., Sato K., and Hanyu-Nakamura K.:
“*Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that as-
sociates with Bruno and regulates *oskar* mRNA transla-
tion in oogenesis”, RNA 2003 Kyoto on the New Frontier
of RNA Science, (The RNA Society of Japan), Kyoto,
Nov. (2003).

Hanyu-Nakamura K., Nakamura A., and Kobayashi S.:
“Requirement of the maternally-supplied phospholipid
phosphatase for germ cell development in *Drosophila*
embryos”, 45th Ann. *Drosophila* Research Conf., Wash-
ington DC, USA, Mar. (2004).

Nakamura A., Hanyu-Nakamura K., and Sonobe H.: “A
small polypeptide encoded by polar granule compo-
nent RNA is essential for germ cell development in
Drosophila embryos”, Cold Spring Harbor Lab. Meet.
on Germ Cells, Cold Spring Harbor, USA, Oct. (2004).

Hanyu-Nakamura K., Kobayashi S., and Nakamura A.:
“Germ cell-autonomous Wunen2 is required for germline
development in *Drosophila* embryos”, Cold Spring Har-
bor Lab. Meet. on Germ Cells, Cold Spring Harbor,
USA, Oct. (2004).