

## 論文の内容の要旨

### Visualization of presumptive primordial germ cells in *Xenopus tropicalis*

( *Xenopus tropicalis* における予定始原生殖細胞の可視化 )

関崎 裕幸

生物の初期発生では、基盤となる未分化な幹細胞群が誘導を受ける事で、様々な組織や臓器を形成する細胞に分化し個体を形成していく。特に生殖細胞は体細胞と異なり、生命体の遺伝情報を次世代に継代し、種における遺伝的多様性を確保するために極めて重要な細胞である。生殖細胞は初期発生においてまず予定始原生殖細胞 (presumptive primordial germ cell: pPGC) として生殖巣原基 (genital ridges) に移動し、生殖細胞の幹細胞と言うべき始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) に分化する。その後、精原細胞 (spermatogonia) または卵原細胞 (oogonia) として分化し、減数分裂を経てそれぞれ精子 (sperm) または卵子 (ovum) に最終分化する事で受精能を獲得する。移動期にある pPGC は胚性生殖細胞 (Embryonic Germ cells: EG cells) としてマウスにおいて樹立されているが、アフリカツメガエル (*Xenopus*) においては樹立されていない。しかしながら、*Xenopus* において pPGC を単離し EG 様細胞を樹立できれば、全能性を保持した胚性幹細胞 (Embryonic Stem cells: ES cell) が存在しない *Xenopus* においても培養系で継代する事ができ、遺伝子変換を施した生殖細胞系譜を作製する事ができる。さらに、*Xenopus laevis* の近縁種でありゲノムの倍数性が2倍体 ( $2n=20$ ) である *Xenopus tropicalis* において EG 様細胞を樹立し、細胞移植によって生殖細胞系譜に組み入れる事ができれば、今まで不可能と思われていた標的遺伝子相同組み換え変異体ができる可能性がある。胎仔発生期における細胞・組織移植などの人為的操作やその追跡に加え、哺乳類では胎性致死になり解析が困難な遺伝子の解析も比較的容易な *Xenopus* において標的遺伝子相同組み換え技術を確立する事は、幹細胞の発生・分

化などを含む初期発生機構の解明に多大な貢献をし得るだろう。

本研究では、標的遺伝子相同組み換え技術の確立に先立ち、大部分の生物種に存在し且つ遺伝情報を次世代に継代しうる唯一の細胞系譜である生殖細胞系譜から EG 様細胞を樹立するため、まず、*X. tropicalis* の pPGC を特異的に可視化する事を目的とした。しかしながら、*X. tropicalis* における生殖細胞系譜の発生様式は遺伝子発現も含めほぼ未知であったため、近縁種である *X. laevis* の母性因子である生殖細胞質 (germ plasm) を含む pPGC に特異的に発現する DAZ 遺伝子 (*Xdazl*) に注目した。DAZ 遺伝子の相同遺伝子はヒトやマウスなど多くの生物種で確認されており、機能としては pPGC を生殖巣原基に移動させ、精原細胞や卵原細胞における減数分裂に関与している事が知られている。これらの知見から、*Xdazl* の部分的 DNA 断片をプローブとし、*X. tropicalis* cDNA・ライブラリーをスクリーニングした結果、*X. tropicalis* DAZ-like gene (*Xtdazl*) の単離に成功した。全長配列の決定により、*Xtdazl* は *X. laevis* の *Xdazl* と比較するとアミノ酸レベルで 75%、塩基レベルで 61% の相同性があり、DAZ family 特有の DAZ-motif と RNP (RNA-binding protein) -domain が存在する事がわかった。各発生段階における *X. tropicalis* 胚から mRNA を抽出し、RT-PCR により *Xtdazl* mRNA の時期的発現を調べた結果、(未) 受精卵、胞胚、原腸胚、神経胚、尾芽胚、初期幼生期において発現が確認できた。成体組織においては体細胞組織には発現が見られず、精巣と卵巣にのみ発現が見られた。加えて、Whole-mount *in situ* hybridization により *Xtdazl* mRNA の空間的発現を追跡した結果、*X. laevis* での知見における pPGC の局在と *Xtdazl* mRNA の発現は一致していた。具体的に述べると、*Xtdazl* mRNA は St. I 前卵黄蓄積期卵母細胞から発現しており、METRO (message transport organizer) 領域から植物極に局在後、受精による卵割を経て胞胚腔へ発現が移行する。その後、*Xtdazl* mRNA 発現細胞は神経胚形成期を通じて原腸直下に停滞しているが、尾芽胚期から初期幼生期に至るまでに内胚葉の最上部 (dorsal crest) に移動する。これらの観察結果より、*Xtdazl* は *X. tropicalis* の pPGC において特異的に発現する遺伝子であると結論付けられるため、*X. tropicalis* の生殖細胞系譜を追跡する最初の遺伝子マーカーとして有用である。

さらに、*Xtdazl* が *X. tropicalis* の pPGC に特異的に発現する事から、個体を生存させたまま pPGC を可視化するために *Xtdazl* プロモーターを探索した。*Xtdazl* の部分的 DNA 断片をプローブとして、*X. tropicalis* ゲノム・ライブラリーをスクリーニングした結果、*Xtdazl* の転写開始点を含む推定プロモーター領域 (約 5kbp) を得る事ができた。Luciferase Assay によりプロモーター活性を確認後、生体内における空間的発現を確認するため、この推定プロモーター領域にレポーター遺伝子 (*EGFP*: enhanced green fluorescent protein) と mRNA の局在化に必要な *Xtdazl* の 3'UTR (untranslated region) を組み込んだプラスミドを構築し遺伝子導入胚を作製した。*Xtdazl*-3'UTR を組み入れた理由は、*Xtdazl*-3'UTR を含まずに遺伝子導入すると、転写された *EGFP* mRNA が生殖細胞質を保持しうる植物極側の細胞に含まれない可能性があり、移動期にある pPGC を特異的に可視化できなくなる可能性があるためである。遺伝子導入胚を幼生期または若成体期において観察した結果、ほとんどの胚において頭部

や腎管などに異所的な発現が見られ、pPGC 特異的な発現は見られなかった。以上の結果は pPGC を特異的に可視化するには単離した *Xtdazl* 推定プロモーター領域だけでは不十分であり、更に *Xtdazl* 特異的エンハンサー領域が必要である事を示唆している。