

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570258

研究課題名(和文) マウス生殖系列へのリプログラムに関わるニッチ形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the niche for mouse germ cell specification

研究代表者

田中 聡 (Tanaka, Satomi)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：10321944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マウス始原生殖細胞の形成に関わるニッチを構成する環境要因としては、BMPシグナル及びWntシグナルが考えられているが、その作用機序の詳細に関しては不明な点が多く残されている。生殖細胞の形成不全を示すDullard欠損マウス胚の解析から、BMPシグナルでなく、Wntシグナルに依存して生殖細胞の形成不全が生じることが明らかとなった。DullardによるWntシグナル活性の適正量の調節には、Dishevelled 2を介したcanonical Wntシグナルの制御機構の存在が考えられた。以上より、Wntシグナル活性の適正量の調節が、マウス生殖細胞形成に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the mouse, the formation of primordial germ cells (PGCs) is influenced by BMP4 and WNT3 activity. Embryos lacking Dullard activity fail to form PGCs. We found mutations in Dullard had no detectable effect on BMP4. Results of the genetic study showed that loss of Dullard has no discernible effect on the expression of Bmp4 and Smads, and does not affect the dose-dependent inductive activity of BMP4 on PGC formation. Instead, Dullard functions as an agonist that modulates WNT signalling activity to facilitate the formation of PGC precursors. Loss of Dullard function was accompanied by down-regulation of WNT/beta-catenin signalling activity and a reduction in the level of Dishevelled 2 (Dvl2). Therefore, Dullard may play a role in the fine-tuning of WNT signaling activity, which is crucial for the specification of the germ cell lineage.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

マウス生殖細胞の発生は、原腸陥入期前の原始外胚葉の基部側領域において転写調節因子をコードする *Prdm1/Blimp1* の活性化により生殖系列へとリクルートされた前駆細胞が、原腸陥入に伴い胚後端部の中胚葉組織に移動しながら細胞塊を形成することに始まる(Ohinata et al., Nature, 2005)。この細胞塊を形成した前駆細胞集団の細胞は、生殖細胞と同時に体細胞への分化能を有している。生殖細胞への運命決定は、前駆細胞集団の細胞塊内でおこると考えられ、その中から選択されて内胚葉組織に移動した細胞が、体細胞への分化能を閉ざされた始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGC) として初めて観察される。原腸陥入期のマウス胚での移植実験から、マウス生殖細胞の運命決定は、細胞自律的にその発生運命が決まっているのではなく、移植された先の細胞外環境により誘導されることが示されている (Tam and Zhou, Developmental Biology, 1996)。このことは、前駆細胞集団の形成する細胞塊に取り込まれれば、移植された *Prdm1* 等を発現していない細胞であっても、おそらく生殖系列の細胞への分化に必須な遺伝子群が、移植先の細胞外微小環境要因により活性化され生殖細胞へと発生運命が決定されることを示唆している。また、申請者が作出した *Dullard*^{-/-}マウス胚では、*Prdm1* 及び膜タンパク質である interferon-inducible transmembrane protein (Ifitm)3 陽性の生殖前駆細胞集団の細胞塊が形成されず、PGC を欠損する。この始原生殖細胞への発生運命の決定を誘導する細胞外微小環境因子の1つとして BMP シグナルが知られているが (Lawson et al., Genes and Development, 1999)、*Dullard*^{-/-}マウス胚での前駆細胞集団による細胞塊の形成不全は、BMP シグナル非依存的であったことから、他のシグナルカスケードがこの細胞塊形成を制御していることが考えられる。申請者は、その候補として canonical Wnt シグナルを見いだしており、*Dullard*^{-/-}マウス胚では、canonical Wnt シグナルに関わる因子の発現異常によりそのシグナル活性が低下していること、*Wnt3*^{-/-}マウス胚でも同様に、*Prdm1* 陽性の前駆細胞集団の細胞塊が形成されず PGC を欠損すること、および *Dullard* と *Wnt3* は、PGC 形成において遺伝学的相関を示すことを見いだしている。また、原腸陥入期のマウス胚では、*Wnt3* が胚後端部の細胞塊が形成される領域に強く発現していた。また、最近の報告から

も、canonical Wnt シグナルが生殖前駆細胞集団の細胞塊形成に重要な役割を担っていることが示唆されている (Ohinata et al., Cell, 2009)。

また、このマウス生殖細胞の形成において、生殖細胞への細胞運命決定のボトルネックとなる過程は、前駆細胞集団からの生殖細胞の選択である。この運命決定には、二つの転写プログラムの制御、つまり体細胞プログラムの抑制と生殖細胞/幹細胞プログラムの再活性化により制御されていると考えられる (Saitou et al., Nature, 2002)。これらのプログラムの調節機構に關与する因子として *Prdm1* や *Prdm14* がそのノックアウトマウスの解析から報告されているが (Ohinata et al., Nature, 2005; Yamaji et al., Nature Genetics, 2008)、その分子機構の詳細は十分には明らかにされていない。

2. 研究の目的

マウス生殖細胞の発生において、その発生運命決定のボトルネックとなる過程は、胚の胚後端部領域での前駆細胞集団による細胞塊形成と、その集団からの生殖細胞の選択である。また、このマウス生殖細胞の形成に伴い、二つの転写プログラムの制御、体細胞プログラムの抑制と生殖細胞/幹細胞プログラムの再活性化がおり、始原生殖細胞へと運命決定される。申請者のこれまでの研究から、生殖前駆細胞集団で発現する遺伝子として、細胞凝集等の細胞間相互作用に働くと考えられている膜タンパク質をコードする *Ifitm1* と *Ifitm3* を同定している (Tanaka and Matsui, Mechanisms of Development, 2002)。特に、*Ifitm1* については、PGC の移動や局在の制御に關与していることを明らかにしている (Tanaka et al., Developmental Cell, 2005; Developmental Dynamics, 2010)。この *Ifitm1* の発現は、前駆細胞集団の細胞塊から選択されて内胚葉組織に移動した PGC では失われている一方、*Ifitm1* の高発現を維持している残りの細胞塊は、中胚葉組織の中で体細胞へと分化すると考えられる。また、*Ifitm1* の発現制御に関しては、マウス胚での Wnt/ β -catenin シグナルの下流ターゲット遺伝子として *Ifitm1* が

同定されている (Lickert et al., Development, 2005)。最近の申請者らの PGC 形成不全を示す *Dullard*^{-/-}マウス胚の研究から、Wnt シグナルが始原生殖細胞への発生運命の決定を誘導する細胞外微小環境因子の 1 つとして重要な役割を担っている事が想定される。そこで、本研究計画では、まず、始原生殖細胞への発生運命の決定を誘導する細胞外微小環境因子の 1 つとして Wnt シグナルがどのように働くかを明らかにする。次いで、始原生殖細胞の形成に伴う、体細胞プログラムの抑制と生殖細胞 / 幹細胞プログラムの二つの転写プログラムの制御機構と Wnt シグナル、或は BMP シグナルの関係について明らかにすることを目的としている。

3 . 研究の方法

マウス始原生殖細胞の形成に関しては、BMP シグナル及び Wnt シグナルに依存した分子機構の存在が考えられているが、その作用機序の詳細に関しては不明な点が多く残されている。申請者らが着目している *Dullard* 遺伝子は、*Xenopus* において同定された分子で、脱リン酸化ドメインを持ち、BMP レセプターの分解を促進していることが示めされている (Satow et al., Developmental Cell, 2006)。申請者らは、この *Dullard* のノックアウトマウスを作成し、その機能欠損解析をおこなったところ、*Dullard*^{-/-}マウス胚では、生殖細胞の形成不全を示すことが明らかとなった。そこで、その生殖細胞の形成不全の作用機序について解析を行う。さらに、生化学的な解析については、*Dullard*^{-/-}ES 細胞株の樹立を行い、解析を進めることを計画している。

次いで、始原生殖細胞への発生運命の決定を誘導する細胞外微小環境因子として BMP シグナル及び Wnt シグナルがどのように働くのかを明らかにするために、それぞれ *Bmp4*^{-/-}マウス胚と *Wnt3*^{-/-}マウス胚において発現が低下し、生殖細胞形成に関与する候補遺伝子の探索を行う。そして、得られた候補遺伝子の機能解析より、それぞれのシグナルカスケードの作用機序についてその分子機構を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) マウス始原生殖細胞の形成と Wnt シグナル活性

マウスの生殖細胞形成には、BMP 及び WNT シグナルが重要な役割を担っていると考えられる。始原生殖細胞が形成されない *Dullard* の欠損マウス胚の解析を行った結果、*Dullard*^{-/-}マウス胚では、BMP シグナルの下流遺伝子発現に変化がなく、BMP シグナルのシグナル伝達因子である Smad1/5/8 の活性化状態 (リン酸化状態) にも変化が見られなかった。また、*Bmp4* ミュータントマウスとの交配実験からも、生殖細胞形成に関して *Dullard* と *Bmp4* の間の遺伝学的相関は認められなかった。一方、*Dullard*^{-/-}マウス胚では、Wnt シグナルの下流遺伝子群の発現が低下しており、canonical Wnt シグナルのシグナル伝達因子である beta-catenin の活性化状態も低下していた。さらに、*Wnt3* ミュータントマウスとの交配実験からも、生殖細胞形成に関して *Dullard* と *Wnt3* の間の遺伝学的相関が認められたことから、*Dullard*^{-/-}マウス胚での始原生殖細胞の形成不全は、canonical Wnt シグナル活性の低下に起因すると考えられた。活性型 beta-catenin の免疫染色を行った結果、*Dullard*^{-/-}マウス胚では、生殖細胞の前駆細胞塊を含む胚後端部の領域を含め、全体的にその活性の低下が観察された。また、始原生殖細胞では、周囲の体細胞と比較して canonical Wnt シグナルが特異的に活性化されている傾向は観察されなかったことから、Wnt シグナルは、おそらく始原生殖細胞形成よりも、それ以前の前駆細胞集団形成に重要な役割を担っていると考えられた。次いで、*Dullard* と *Wnt3* ミュータントマウスとの交配実験より得られたマウス胚を用いて、canonical Wnt シグナル活性について解析を進めたところ、Wnt シグナル活性に伴い、形成される始原生殖細胞の数が減少することが明らかとなった。この Wnt シグナル活性の制御機構について検討を行ったところ、*Dullard*^{-/-}マウス胚では、canonical Wnt シグナルのリガンドである WNT3 とその阻害因子である Dkk1 の発現バランスに異常が認められた。WNT3 とその阻害因子である Dkk1 との間には、ネガティブフィードバックループの存在しており、頭部形成等においてこのネガティブフィードバックループにより WNT シグナル活性を適正量に調節して形作りを行っていることが報告されている。これらのことから、*Dullard* は *Wnt3*-*Dkk1* のネガティブフィードバックループを介して Wnt シグナル活性を適正量

に調節しており、この Wnt のシグナル活性を適正量に調節することが生殖細胞形成に必須であることが明らかとなった (Tanaka et al., PLoS ONE, 2013)。近年、Wnt シグナルにより転写活性化される *Brachyury* (*T*) が、生殖細胞の前駆細胞に発現する *Prdm1* 等の転写活性化に働き、生殖細胞形成に関与していることが報告された (Aramaki et al., Developmental Cell, 2013)。このことは、*Dullard* と *Wnt3* ミュータントマウス胚において、canonical Wnt シグナル活性の低下に伴い *Brachyury* の発現が低下していることと一致していた。次いで、この *Dullard* 欠損による canonical Wnt シグナルの低下の原因について解析を進めた結果、*Dullard* は、Wnt のレセプターである Dishevelled と結合することを見いだした。*Dullard*^{-/-} マウス胚では、Dishevelled 2 の発現量が低下していることから、1 つの可能性として *Dullard* による Dishevelled 2 を介した canonical Wnt シグナルの制御機構の存在が考えられた。また、*Dullard*^{-/-} ES 細胞株では、Wnt3a を含む培養上澄による刺激に対する反応性が低下しており、その低下は、野生型の *Dullard* の強制発現により改善されるが、リン酸化ドメインにミューテーションを入れ不活性化させた変異体では改善されなかった。

(2) マウス始原生殖細胞の形成における Wnt シグナルの役割について

始原生殖細胞への発生運命の決定を誘導する細胞外微小環境因子として BMP シグナル及び Wnt シグナルがどのように働くのかを明らかにするために、それぞれ *Bmp4*^{-/-} マウス胚と *Wnt3*^{-/-} マウス胚において発現が低下し、生殖細胞形成に関与する候補遺伝子の探索を行った。先にも述べたように、その候補に 1 つとして、Wnt シグナルにより転写活性化される *Brachyury* (*T*) が生殖細胞形成に関与していることが報告されている

(Aramaki et al., Developmental Cell, 2013)。申請者らは、*Wnt3*^{-/-} マウス胚において発現が低下し、生殖細胞形成に関与する候補遺伝子の 1 つとして、転写調節因子をコードする *Sall4* を見いだした。*Sall4* は、Zn フィンガーモチーフを持つ核内タンパク質で、その局在は、始原生殖細胞の核内の転写活性に対し抑制型の構造であるヘテロクロマチン領域に観察される。*Sall4* 欠損マウス胚は、着床後間もなく、生殖細胞が形成される以前に致死となる。そこで、我々のグループでは、*Sall4* の conditional ノック

アウトマウス (CKO) を作出し、解析を進めている。*Sall4* を生殖細胞系譜特異的に欠損させると、*Sall4* を欠損した始原生殖細胞は、胎仔生殖巣から失われた。そこで、形成直後の胎齢 7.5 日胚での始原生殖細胞数を計測したところ、コントロールと比べ差は認められなかった。しかし、*Sall4* CKO 胚では、始原生殖細胞が内胚葉組織へと移動しておらず、その結果、c-kit/steel 等の始原生殖細胞の生存に必須なシグナルの活性化がされないために細胞死を起こして失われていた (投稿中)。マウス生殖細胞は、幹細胞維持に関わる "germ cell program" 遺伝子群の再活性化と、体細胞分化を誘導すると考えられる "somatic cell program" 遺伝子群の発現抑制を伴って形成される。そこで、*Sall4* を欠損させた生殖前駆細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現を調べた結果、"germ cell program" 遺伝子は活性化されるが、それらの生殖細胞では、"somatic cell program" 遺伝子群の抑制が起きていなかった。

(3) マウス始原生殖細胞の形成における BMP シグナルの役割について

Bmp4^{-/-} マウス胚において発現が低下し、生殖細胞形成に関与する候補遺伝子の探索をマイクロアレイにより行った。その結果、生殖細胞の前駆細胞に特異的に発現し、*Bmp4*^{-/-} マウス胚において発現が低下する *Six4* と、発現は原始外胚葉全体に観察されるが、同様に *Bmp4*^{-/-} マウス胚において発現が低下するファミリー遺伝子 *Six1* を同定した。*Six* ファミリーは、ホメオドメインと *Six* ドメインを持つ DNA 結合型の転写因子であり、ファミリー間で redundant に働くことが知られている。*Six1*、或は *Six4* を単独で欠損したマウス胚では、生殖細胞の形成異常は観察されないが、*Six1/Six4* の両方を欠損したマウス胚では、形成される生殖細胞数が減少した (発表準備中)。興味深いことに、*Six1/Six4* の両方を欠損したマウス胚では、生殖巣の形成不全と性分化異常が起きており、*Six1/Six4* が、それぞれ異なる転写カスケードを介して生殖巣の大きさと性の決定を制御していることを明らかにした (Fujimoto et al., Developmental Cell, 2013)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者

には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Yuka Fujimoto, *Satomi S. Tanaka, Yasuka L. Yamaguchi, Hiroki Kobayashi, Shunsuke Kuroki, Makoto Tachibana, Mai Shinomura, Yoshiakira Kanai, Ken-ichirou Morohashi, Kiyoshi Kawakami *Ryuichi Nishinakamura (*corresponding authors). Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev Cell*, 26: 416-430, 2013. 査読有り。
2. Satomi S. Tanaka, Akihiro Nakane, Yasuka L. Yamaguchi, Takeshi Terabayashi, Takaya Abe, Kazuki Nakao, Makoto Asashima, Kirsten A. Steiner, *Patrick P. L. Tam and *Ryuichi Nishinakamura (*corresponding authors). Dullard/Ctdnep1 Modulates WNT signalling activity for the formation of primordial germ cells in the mouse embryo. *PLoS ONE*, 8: e57428, 2013. 査読有り。
3. *Satomi S. Tanaka, Yoji Kojima, Yasuka L. Yamaguchi, Ryuichi Nishinakamura and *Patrick P. L. Tam (*corresponding authors). Impact of WNT signalling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo. *Dev Growth Differ*, 53: 843-856, 2011 (cover photo). 査読有り。

〔学会発表〕(計 12件)

1. S.S. Tanaka et al., Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development
日本分子生物学会 2013年12月5日、神戸
2. 藤本、他
Six1遺伝子とSix4遺伝子はマウス生殖腺の雄性分化に必須である
日本分子生物学会 2012年12月13日、福岡
3. S.S. Tanaka et al., Dullard/Ctdnep1 modulates WNT signalling activity for the formation of primordial germ cells in the mouse embryo.
日本分子生物学会、2012年12月12日、福岡
4. S.S. Tanaka et al., *Dullard/Ctdnep1* modulates WNT signalling activity for the formation of primordial germ cells in the mouse embryo.
Hong Kong Society for Developmental

Biology Symposium, November 27, 2012, Hong Kong Academy of Medicine, Hong Kong, China.

5. Y. Fujimoto *et al.*, Six1 and Six4 homeoproteins are required for sex determination in mouse gonad.
日本発生物学会、2012年05月30日、神戸
6. S.S. Tanaka et al., Six1 and Six4 homeodomain proteins act downstream to BMP signal in mouse primordial germ cell formation.
日本発生物学会、2012年05月31日、神戸
7. 藤本、他
Six1 and Six4 homeoproteins are required for sex determination in mouse gonad.
日本分子生物学会年会 2011年12月13日、横浜
8. Y. Fujimoto *et al.*, Six1 and Six4 homeoproteins are required for sex determination in the mouse gonad.
Cold Spring harbor Asia conference, Developmental control of Sex, Growth and Cellular Fate, October 12, 2011, Suzhou, China.
9. S.S. Tanaka et al., Dullard controls primordial germ cell formation by regulating canonical WNT signalling activity in the mouse embryo.
Cold Spring harbor Asia conference, Developmental control of Sex, Growth and Cellular Fate, October 14, 2011, Suzhou, China.
10. Y. Fujimoto *et al.*, Six1 and Six4 homeoproteins are required for sex determination in mouse gonad.
日本発生物学会 2011年5月20日、沖縄
11. S.S. Tanaka et al., Stage-specific Importin13 activity influences meiotic differentiation of germ cells in the mouse.
日本発生物学会 2011年5月20日、沖縄
12. Y. L. Yamaguchi *et al.*, *Sall4* is required for suppression of the somatic gene program during mouse germ cell specification through the epigenetic modification.
日本発生物学会 2011年5月20日、沖縄

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 聡 (TANAKA SATOMI)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号： 10321944

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：