

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570259

研究課題名(和文) アフリカツメガエル生殖細胞質の細胞生物学的特性の解析

研究課題名(英文) Germ plasm of *Xenopus* is the determinant of germinal lineage

研究代表者

渡辺 憲二 (Watanabe, Kenji)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：00079691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物においても、線虫やショウジョウバエと同様に生殖細胞質(GP)が生殖細胞決定因子である事を証明した。脊椎動物ではゼノパスを含む無尾両生類が卵植物極表層に、母性mRNA、タンパク質、大量のミトコンドリアを含むGPをもつ。ミトコンドリアを可視化したゼノパス(Dria系統)を作成し、GPに存在する多量のミトコンドリアを指標にGP、始原生殖細胞(PGCs)、そして生殖細胞をほぼ1世代、追跡可能とした。GPを(将来表皮になる)動物半球に移植すると、異所的なPGC分化が起きること、異所的PGCsは適切な内胚葉環境に戻されると、生殖巣に移動し、機能的な生殖細胞を作ること示した。

研究成果の概要(英文)：Germ plasm is the determinant of germinal lineage in case of *Drosophila* and *C. elegans*. In this work, we have evidenced that this is true also in case of vertebrate. Germ plasm of *Xenopus* is situated in the cortex of egg vegetal cytoplasm, and contains maternal mRNA, protein and a large amount of mitochondria. We have made a transgenic frog whose mitochondria is EGFP-labelled. On the behalf of unique characteristics of germline mitochondria, we can trace GP and PGCs in most of a life cycle. When we explant GP into the animal hemisphere (fated to become epidermis), we obtain ectopic PGCs. The ectopic PGCs cannot migrate from the surface position, but they can migrate towards gonads if they are transferred into the endoderm. And, they can become functional gametes.

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：5806

キーワード：生殖細胞質 ミトコンドリア 決定因子 始原生殖細胞 ゼノパス

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞形成の様式は卵母細胞が生殖細胞質(GP)をもち、受精後の卵割で GP を分配された細胞のみが次世代の生殖細胞になるシステムであり、線虫、ショウジョウバエ、カエルなど広範な動物種で報告されている。GP の組織学的な研究を基に、無尾両生類の発生過程における始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell:PGC) の形態や挙動 (Blackler, 1958) また、卵の植物極表層に GP の存在が明らかにされた (Czolowska, 1969, Ikenishi et al.1986)。GP には、多様な RNA やタンパク質そして細胞小器官が存在する。特に、GP に密集して存在する Mt は古くから形態的に注目されてきた。機能的には、ショウジョウバエの Mt のリボソーム RNA が、生殖細胞形成に必須であることが報告された(Kobayashi & Okada 1989, Kashikawa et al.1999)。

我々は再生、発生における幹細胞の研究を進める中で (Sugiura et al., 2009, Taniguchi et al., 2008, Orii et al., 2007) 次世代を担う生殖細胞系列に関心を抱き始めた。プラナリアの再生では、全身に分布する全能性の幹細胞が領域に応答して生殖細胞系列に分化する(Sato et al., 2006)。これはマウスの発生において、細胞間相互作用に基づき生殖細胞系列すなわち PGC が決定される仕組みと同じである。また、ゼノパス初期胚で細胞分化につながる物質 (mRNA) の不等分布を調べる中で、生殖細胞質に局在する新規の分子を検出した (Kataoka et al., 2006)。ゼノパスは生殖細胞質 (GP) に基づいて PGC 分化を行う。この分子の機能を報告するまでには至らなかったが、以降、GP そして PGC の研究を進めることになった。まず、GP 特異的分子である DEADSouth の 3'UTR と GFP を融合した mRNA を作製し、初期胚に注入する事で、原腸胚以降から st.56 の幼生まで、PGC の可視化に成功した。また、DEADSouth 3'UTR は A,B,C の 3 領域に分類され、A 領域は GP に係留するシグナルと体細胞での分解を促す mir-427 標的シグナルをもっていた (Kataoka et al., 2006)。可視化された PGC をモニターすることで、PGC が性巣へ移動する過程に Notch と Delta の相互作用が要求されることを示した (Morichika et al., 2010)。

受精卵 GP のミトコンドリアは卵割に伴い、少数の割球に分配され、始原生殖細胞そして生殖細胞に受け継がれる。すなわち、生殖系列のミトコンドリア(germline-mitochondria: gl-Mt)が存在する。我々は gl-Mt は体細胞の Mt とは異なった特性をもつと仮定し、ゼノパス GP がもつ gl-Mt と体細胞 Mt をタンパク質レベルで比較し、gl-Mt では ATP 合成酵素の発現が抑制されることを発見した。さらに、Mt の内膜に存在する他の呼吸鎖複合体である cytochrome c oxidase (COX)の活性が同様に低下することを確認した。gl-Mt の重要な特性は呼吸が抑制されることであり、呼

吸にともなう活性酸素種の発生を抑えることで、次世代へ健康な Mt-DNA を伝えると結論した。また、gl-Mt の呼吸抑制はゼノパス以外の生物にも必要と考えられた(Kogo et al., 2011)。

## 2. 研究の目的

生殖細胞質については線虫、そして生殖細胞分化については線虫、ショウジョウバエ、マウスで遺伝学的に研究が進められている。カエルの卵母細胞、生殖細胞質、始原生殖細胞は大きく、細胞や細胞質の分離、生化学的分析、微小注入などの手術を有効に適用できる。GP の存在状態は卵形成過程、卵成熟、受精そして胚発生過程で変化する。本研究では第一に、Mt を可視化することでミトコンドリアが多量に存在する GP のライブ観察を可能とした。ついで、GP と他の細胞小器官 (細胞膜、細胞骨格、核など)との関係に注目し、GP の PGC 形成における動態を理解し、さらに GP が PGC 分化の決定因子であることを証明する。また、PGC の生殖細胞質への移動の契機となる細胞間相互作用にも注目し、解析する。

## 3. 研究の方法

GP および PGC の特性を明らかにするために、前述の DEADSouth 3'UTR-GFP mRNA を利用した PGC の可視化だけでなく、GP の可視化も必要であった。EGFP-OMP25(ミトコンドリア外膜タンパク質の膜貫通領域)を pRC/CMV に組み込んだコンストラクトを Kroll & Amaya(1996)の方法でゼノパス受精卵に遺伝子導入した。蛍光を発現する個体を選別し、成熟するまで飼育し、トランスジェニック雌カエル(F0)を 17 匹えた。これらの雌カエルからえた卵を野生型精子で受精し、ミトコンドリア特異的な蛍光をもつ胚(F1)を産むカエルを 4 匹選択した。4 系統の子カエル (F1) を育て解剖すると、他の組織に比べて、卵巣により特異的に蛍光をもつものがあつた。その親カエル(F0)を Dria と名付けた (Tguchi et al., 2012)。

## 4. 研究成果

Xenopus を含む無尾両生類では、卵植物極表層に、母性 mRNA、タンパク質、大量のミトコンドリアを含む生殖細胞質(GP)が存在し、GP を分配された細胞が中期胚遷移 (MBT)以降に始原生殖細胞(PGC)へ分化し、PGC は生殖巣へ移動、生殖細胞へ分化する。生殖細胞特異的分子を利用した PGC の可視化、およびミトコンドリアを指標とした生殖細胞質の可視化を用いて、生殖系列の研究を行ない、成果を数本の論文としてまとめた。

### 生殖系列ミトコンドリア(gl-Mt)の安定性

Mt の光る (EGFP をもつ) transgenic カエル (Dria 系統) は EGFP 遺伝子についてヘテロで維持されている。Dria 系統雌の卵巣の

中で、卵母細胞は第一減数分裂前期で分裂停止をし、4倍体状態で成長し、EGFPタンパク質を蓄積する。成熟卵母細胞は野生型の精子との受精時に減数分裂を終了し、EGFPについて+/-または-/-の胚となる。すべての胚が蛍光をもつが、発生が進むと、半数の胚が蛍光を失う。逆に Dria 雄と野生型雌を交配して生じた+/-または-/-の胚は蛍光をもたず、半数の胚が中期胞胚遷移(MBT)の後にzygotic な発現を始める。

Dria 系統雌と野生型精子と交配させ生じた-/-胚は体細胞での蛍光を徐々に失うのと対照的に、GP そして PGC での蛍光を st.50 (受精後 2 週)まで維持する(Taguchi et al., 2012)。Dria 系統初期胚からの生殖細胞質を野生型胚の動物半球に異所的に移植した場合にも、GP は長期にわたって維持される (Tada et al., 2012)。すなわち、GP 中の gl-Mt は多数の体細胞 Mt の存在下でも、その特性を維持している。生殖細胞系列ではタンパク質の分解を含む代謝活性が低い可能性がある。

### GP と細胞骨格の相互作用

卵割期には、GP は細胞膜に接した細胞質皮質にあり、不等分裂により GP をもつ細胞の数は約 4 個と限定される。過去の組織学的な観察から、MBT 以降、GP は核周囲に移動し、2 個の細胞に等分配される。Deia 胚由来の GP をもつ割球を培養し、観察すると、ライブで不等分裂、等分裂の様子を観察できた。また、ノコダゾールやサイトカラシン D の処理を行った結果、GP の細胞質皮質から核周囲への移動は微小管依存的であった (Taguchi et al., 2012)。

### 生殖細胞質は PGC の決定因子である

カエル受精卵の GP を紫外線で不活化すると、生殖細胞の形成が阻害される。生殖細胞質をもつ割球の細胞系譜が PGC になることに、GP だけで十分なのかは確定していなかった。Willy(1985)は GP をもつ割球を色素で生体染色し、別の胚に移植した。色素をもつ細胞は胚葉を超えて見いだされたが、生殖巣にはなかった。彼らは GP だけでは PGC 形成に不十分であり、周辺の細胞からのシグナルも必要だと結論した。

多田は Dria 胚からの GP を他の胚の動物半球(将来表皮や神経に分化する領域)に移植し、異所的に GP をもつ割球そして細胞は gl-Mt だけでなく、生殖細胞質特異的分子も保持していることを確認した。しかし、発生が進んでも、異所的な GP をもつ細胞はその位置から動かず、生殖巣へ移動する事はなかった。ついで、異所的な GP をもつ細胞を宿主胚の適切な内胚葉環境に移植すると、生殖巣に移動することがわかった。さらに、GP をもつ細胞が機能的な生殖細胞になることは遺伝的マーカーをもつ宿主胚に GP をもつ細胞を移植することで証明された。Xenopus

PGCs 形成には、GP 以外に細胞間相互作用も必要であるとの従来の説を修正し、線虫やショウジョウバエと同様に、カエルすなわち脊椎動物の GP が生殖細胞決定因子である事を証明した (Tada et al., 2012)。

### 始原生殖細胞特異的遺伝子 DEADSouth の機能解析

片岡(Kataoka et al., 2006)の仕事を引き継ぎ、山口は修飾オリゴマーによる DEADSouth mRNA の knockdown を行った。結果、PGCs における GP の細胞質皮質から核周囲への再配置が阻害され、細胞分裂が遅れ、PGC の数が減少した。DEADSouth mRNA の注入による過剰発現では、細胞分裂は進行するが、神経胚期から尾芽胚期にかけて PGCs が減少した。PGCs の内部では生殖細胞質を中心に分子ネットワークが形成され、DEADSouth タンパク質はその一員として働くと考えられる。(Yamaguchi et al., 2013)。

DEADSouth 3' UTR の 3 領域のうちの A 領域に GP に係留するシグナルと体細胞での分解を促す mir-427 応答配列(MRE)が存在する。MRE は体細胞では働くが、PGC では働かない。一つの原因は PGC に mir-427 が極端に少ないことによるかもしれない (Yamaguchi et al., 2014)。

### 発生過程における PGCs の移動能力の変化

寺山は抗 Dazl 抗体を用いて、in vivo PGCs の移動期の分布を調べ 4 ステージに分類した。PGCs がクラスターを形成するステージ、PGCs が分散するステージ、方向性のある移動をするステージ、そして PGCs が再集合するステージである。ついで、PGCs を単離・培養する実験系を確立し、in vitro PGCs を観察した。クラスター期の PGCs は丸い形状で、ほとんど運動性がなく、分散期と移動期の PGCs は運動する時期と止まって大きな膨らみを形成する時期を繰り返した。再集合期の PGCs は丸い細胞で運動性はなかった。PGCs の運動能は発生段階に依存して変化した(Terayama et al., 2013)。また、単離した PGCs を異なる時期の胚の内胚葉領域に移植し、運動性の変化を観察した結果、PGC の運動性の獲得は細胞非自律的、すなわち内胚葉環境に依存すること、及び、PGC の運動性の消失は不可逆的に起こることを観察した。PGC と内胚葉細胞の間で、分泌性因子、もしくは接着因子を介してどのような相互作用が行われ、を達成するのか興味深い。

### 今後の研究

Xenopus GP が PGC 決定因子であることが確定した。GP 内に存在する多数の分子の中で PGC 決定のマスターとなる分子を判別できるシステムが今後の課題である。一つのシステムは、GP の成分を未分化細胞もしくは未分化核に作用させ、PGC 分化に向かわせ

るものかもしれない。また、Wakahara(1978)が報告したシステム：植物極のGPにさらに精製GP分画を投与すると、PGCの数が増える、が有力かもしれない。

PGC移動の契機を与える内分泌環境PGCの移動期の内胚葉はPGCに対して移動を開始するシグナルをあたえる。また、移動期の後の内胚葉は移動可能なPGCの運動能を抑制する。この2つの現象は、PGCの運動制御に関する分子の実態を明らかにすること、すなわちPGCの生殖巣への移動メカニズムに直結すると考える。

#### 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7件)

1. Yamaguchi, T., Kensuke Kataoka, K. Watanabe, K. and Orii, H. (2014) Restriction of the Xenopus DEADSouth mRNA to the primordial germ cells is ensured by multiple mechanisms. Mechanism of Development 131, 15-23. (査読有)  
doi: 10.1016/j.mod.2013.11.002.
2. Yamaguchi T, Taguchi A, Watanabe K, Orii H. (2013) Germes is involved in translocation of germ plasm during development of Xenopus primordial germ cells. Int J Dev Biol. 57(5):439-443. (査読有)  
doi: 10.1387/ijdb.120215ty.
3. Yamaguchi, T., Taguchi, A., Watanabe, K. Orii, H. (2013) DEADSouth protein localizes to germ plasm and required for the development of primordial germ cells in Xenopus laevis. Biology open 15:191-199. (査読有)  
doi: 10.1242/bio.20123111.
4. Terayama, K., Kataoka, K., Morichika, K., Orii, H., Watanabe, K. Mochii, M. (2013) Developmental regulation of locomotive activity in Xenopus primordial germ cells. (2013) Dev. Growth Differ. 55, 217-228. (査読有)  
doi: 10.1111/dgd.12018.
5. Taguchi, A., Takii, M., Motoishi, M., Orii, H., Mochii, M., Watanabe, K. (2012) Analysis of localization and reorganization of germ plasm in Xenopus transgenic line with fluorescence-labelled mitochondria. Develop. Growth Differ. 54, 767-776  
doi: 10.1111/dgd.12005. (査読有)
6. Tada, H., Mochii, M., Orii, H., Watanabe, K. (2012) Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm: Direct evidence for germ cell determinant in Xenopus.

Developmental Biology 371, 86-93  
doi: 10.1016/j.ydbio.2012.08.014. (査読有)

7. Kogo N., Tazaki, A., Kashino, Y., Morichika, K., Orii, H., Mochii, M., Watanabe, K. (2011) Germ-line mitochondria exhibit suppressed respiratory activity to support their accurate transmission to the next generation. Dev. Biol. 47:511-521  
doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.021. (査読有)

[学会発表](計6件)

1. Terayama K, Kataoka K, Morichika K, Orii H, Watanabe K, Mochii M. (2011) In vitro studies on migratory activity of Xenopus primordial germ cells. 第44回日本発生生物学会年会(沖縄コンベンションセンター、沖縄県)
2. Tada H, Watanabe K (2011) Germ plasm includes germ cell determinant in Xenopus. 第44回日本発生生物学会年会(沖縄コンベンションセンター、沖縄県)
3. 寺山、片岡、森近、渡辺、織井、餅井 (2011) アフリカツメガエル始原生殖細胞の移動に関する研究. 第82回に本道物学会大会(大雪クリスタルホール、北海道)
4. 渡辺憲二 (2012) ミトコンドリアを指標にした生殖細胞質、始原生殖細胞形成の解析. 第83回に本道物学会大会(大阪大学、大阪府)
5. Tada H, Mochii M, Orii H, Watanabe K. (2012) Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm. 14<sup>th</sup> International Xenopus Conference (Giens Peninsula, France)
6. Terayama K, Orii H, Watanabe K. (2013) Locomotive activity of Xenopus primordial germ cell is regulated by extracellular signals involving SDF-1. 第46回日本発生生物学会年会(くにびきメッセ、島根県)

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
渡辺憲二 (WATANABE, Kenji)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号：00079691
- (2) 研究分担者  
( )  
研究者番号：
- (3) 連携研究者  
( )

研究者番号：