

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19570209  
 研究課題名（和文） マウス生殖細胞の移動を制御する分子機構の解明  
 研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanisms underlying mouse primordial germ cell localization  
 研究代表者  
 田中 聡 (TANAKA SATOMI)  
 熊本大学・発生医学研究センター・助教  
 研究者番号：10321944

研究成果の概要： マウス始原生殖細胞(PGC)の移動における *Ifitm* ファミリー遺伝子の役割について解析を進めた。*Ifitm1* の異所的発現は、PGC 局在に対して排他的に働いた。また、PGC の移動に異常が観察されるミュータントマウスでも *Ifitm1* の発現異常が観察された。siRNA を用いた培養マウス胚での *Ifitm1* ノックダウン実験では、PGC の局在異常が観察された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、移動、*Ifitm1*、*Ifitm3*、マウス、始原生殖細胞、培養マウス胚

## 1. 研究開始当初の背景

マウス生殖細胞の発生は、胚後端部の中胚葉組織から内胚葉に移動した始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGC) として初めて観察される。内胚葉に移動した PGC は、その後、後腸に取り込まれ、胎仔生殖巣へと向かって移動していく。やがて、生殖巣に到達

した PGC は、世代を越えて生命の連続性を担う唯一の細胞である配偶子へと分化していく。マウス生殖細胞の移動を制御機構については、腸管内を移動する PGC が生殖巣原基に定着する過程の分子機構は報告されているが、それ以前の原始内胚葉に移動して後腸に取り込まれる過程については、これまで十分

には解明されていなかった。申請者は、内部細胞塊を含む胚盤胞と移動期 PGC の間でのサブトラクティブ cDNA スクリーニングをおこない、生殖細胞に特異的な発現を示す 5 個の候補遺伝子を得た。その中の同じ遺伝子ファミリーの属する 2 つの遺伝子、*interferon-induced transmembrane protein 3 Ifitm3 (mil-1/fragilis)* 及び *Ifitm1 (mil-2)* は、構造がよく保存された 2 つの細胞膜貫通領域を持つ膜タンパク質をコードしており、その PGC 形成期における発現は、これまで明確にされていなかった PGC の前駆細胞と推定される細胞集団において発現が認められた。また、*Ifitm3* 遺伝子については、他のグループからも単離、報告されている (*fragilis*)。

## 2 . 研究の目的

申請者はこれまで、PGC と周囲の細胞での発現の組み合わせにより、*Ifitm1* と *Ifitm3* がそれぞれ異なる様式で PGC の移動制御をおこなっている可能性を示唆している。*Ifitm1* と *Ifitm3* を共に発現している PGC 前駆細胞集団は、*Ifitm1* を発現している中胚葉組織内に存在するが、その後、PGC へと specification を受けた細胞では *Ifitm1* の発現が失われ、そのような PGC は、*Ifitm1* 陽性の中胚葉組織の環境にとどまる事ができず、*Ifitm1* を発現していない内胚葉組織に移動する、つまり、周囲の細胞での *Ifitm1* 活性は、PGC の局在に対して排他的に働くことで PGC の移動を制御していることを明らかにした。また興味深い事に、*Ifitm1* の PGC の局在に対する排他的活性は、*Ifitm3* を共発現させることにより失われた。このことは、*Ifitm* ファミリーの発現の組み合わせが、その作用を規定している可能性が考えられる。そこで本申請では、マウス始原生殖細胞の移動過程において、生殖細胞とその周囲の細胞でダイナミックな発現様式を示す *Ifitm* ファミリー遺伝子群の発現の組み合わせによる PGC の局在を制御機構に着目して、その分子機構の作

用機序の解析を進めた。

## 3 . 研究の方法

基本的な方法としては、マウス着床期胚 (胎齢 7 日目頃) に DNA や siRNA を胚操作技術により導入をおこない、その後、*in vitro* での全胚培養系を用いて培養、過剰発現やノックダウンによる標的遺伝子の活性変化の影響を調べた。

まず、*Ifitm1* の発現が本来低下する段階の PGC に *Ifitm1* を強制発現させるため、リポフェクション溶液をマウス胚にマイクロインジェクションして遺伝子導入をおこなう方法 (Yamamoto M *et al.*, Nature, 428: 387-392, 2004)、或は、申請者がこれまでおこなってきている electroporation 法により生殖細胞に対する遺伝子導入をおこなったが、生殖細胞への導入効率は、極めて低かった。そこで、申請者がこれまでに同定している PGC とその前駆細胞での発現を制御している *Ifitm3* の転写調節領域を用いて、その制御下において標的遺伝子を発現するようなトランスジェニックマウスを作出し、その解析を進めた。そして、*Ifitm1* を PGC で異所的に強制発現させた結果、PGC が正常に識別されて内胚葉に移動するか、その強制発現細胞でのマーカー分子、例えば、*Dppa3/Pgc7/stella* や *Ifitm3*, *Pou5f1/oct-3/4*, *Nanog*, *Akp2/Tnap* 等の発現を調べ、生殖細胞形成における PGC での *Ifitm1* 発現低下の意義を明らかにする。また、マウス着床期胚に対する遺伝子導入等の胚操作については、これまで申請者らを含めて用いられている定法にのっとりおこなった。

## 4 . 研究成果

PGC の移動における *Ifitm* ファミリー遺伝子の役割について解析を進めた。*Ifitm1* の異所的発現は、PGC 局在に対して排他的に働いた。また、PGC の移動に異常が観察されるミュータントマウスでも *Ifitm1* の発現異常が

観察された。siRNA を用いた培養マウス胚での *Ifitm1* ノックダウン実験では、PGC の局在異常が観察された。一方、複数の方法、でおこなった全胚培養系での *Ifitm1* の異所的発現、具体的には、electroporation 法やリポフェクション法による内胚葉組織の1部、或は全域での異所的発現では、*Ifitm1* が PGC の局在に対して排他的に働く結果が得られた。また、トランスジェニックマウスを用いて PGC 前駆細胞集団での *Ifitm1* の強制発現をおこなった予備的な実験からも、同様な PGC の局在変化が観察された。さらに、我々が平行して解析を進めている始原生殖細胞の移動に異常が観察される *Dullard* ノックアウトマウス及び *Lhx1* コンディショナルノックアウトマウスにおいても、*Ifitm3* の生殖細胞での発現は認められたが、周囲の体細胞での *Ifitm1* の発現異常が観察された。近年報告された *Ifitm3* ノックアウトマウスの解析からも (Lange et al., 2008)、*Ifitm3* 単独では、PGC の移動の制御に必須な働きは果たしていないと考えられる。また、*Ifitm1* の PGC の局在に対する影響は、*Ifitm3* との共発現により打ち消されることから、*Ifitm* ファミリー遺伝子群の発現の組み合わせが重要と考えられる。先のグループによる *Ifitm1* 及び *Ifitm2*, *Ifitm3*, *Ifitm5*, *Ifitm6* を欠損したマウスの解析から PGC 局在異常は報告されていないが、他のファミリー遺伝子群の欠損により影響が打ち消された可能性も考えられる。そこで、siRNA を用いた培養マウス胚でのノックダウン実験の系を構築して、中胚葉での *Ifitm1* のノックダウンを行った結果、始原生殖細胞は移動せずに中胚葉に留まっていた。今後、さらに *Ifitm1* 単独ノックアウトマウスの解析をおこなうことより、この点を明らかにできると考えられる。

#### 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 1 件)

1. Shahidul M. Islam, Yohei Shinmyo, Tatsuya Okafuji, Yuhong Su, Iftekhar Bin Naser, Giasuddin Ahmed, Sanbing Zhang, Sandy Chen, Kunimasa Ohta, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Satomi Tanaka, Ryuichi Nishinakamura, Toshio Terashima, Toshio Kitamura, Hideaki Tanaka. Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures. **Science**, 323, 388 – 393, 2009, 査読有り。

[学会発表](計 5 件)

1. S.S. Tanaka et al.,  
Molecular mechanisms of the primordial germ cell allocation in the gastrulating mouse embryo.  
日本分子生物学会、2007年12月14日、横浜
2. S.S. Tanaka et al.,  
*Lhx1* activity is required for the localization of the primordial germ cells in the early mouse embryo.  
日本発生生物学会、2007年5月29日、福岡
3. 田中聡 他、  
*Ifitm/mil/fragilis* ファミリーによるマウス生殖細胞の移動の制御。  
頭部形成研究会、2008年4月15日、熊本
4. S.S. Tanaka et al.,  
*Dullard* is essential for primordial germ cell formation and posterior extraembryonic mesoderm differentiation in the gastrulating

mouse embryo.

日本発生生物学会、

2008年5月29日、

徳島

5. S.S. Tanaka *et al.*,

Functional analysis of Dullard in ES cell differentiation, which is essential for germ cell formation in the gastrulating mouse embryo.

The 23<sup>rd</sup> Naito Conference,

2008年11月12日、

神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 聡 (TANAKA SATOMI)

熊本大学・発生医学研究センター・助教

研究者番号: 10321944

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者