

平成 22 年 12 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19770203  
 研究課題名(和文)  
 カタユウレイボヤにおける生殖細胞形成の分子機構解析  
 研究課題名(英文)  
 Analysis of molecular mechanisms for germ cell formation in an ascidian, *Ciona intestinalis*  
 研究代表者  
 倉林 麻貴(白江麻貴)(Kurabayashi Maki)  
 独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究チーム・研究員  
 研究者番号：60391942

## 研究成果の概要(和文)：

本研究では、カタユウレイボヤ胚の生殖質様領域 postplasm に蓄積する母性 RNA 遺伝子 *Ci-PEM* (*Ci-pem-1*) と *Ci-TDRD7* (*Ci-pem-11*) の翻訳産物がそれぞれ生殖細胞分化において重要な役割を持つ事を明らかにした。*Ci-PEM* は卵割期の postplasm と生殖割球の核に局在し、生殖系列割球における体細胞分化関連遺伝子群の転写抑制に必要であった。一方 *Ci-TDRD7* は多細胞動物に保存された生殖細胞マーカー *Vasa* のホモログである *CiVH* と複合体を形成し、原腸胚期以降始原生殖細胞の核辺縁において生殖顆粒様の *CiVH* 顆粒を形成する為に必要であることが分かった。

## 研究成果の概要(英文)：

In this study, I found that the protein products of two postplasmic/PEM RNA genes *Ci-PEM* (*Ci-pem-1*) and *Ci-TDRD7* (*Ci-pem-11*) have crucial roles in germline formation of *Ciona intestinalis* respectively. The protein product of *Ci-PEM* was distributed in the nucleus in the germline blastomeres as well as the postplasm in the cleavage stage and required for the repression of somatic gene expression in the germline. *Ci-TDRD7* protein formed a complex with *CiVH*, a homolog of the conserved germ cell marker *Vasa*, in the germline cells, and it was involved in the formation of the peri-nuclear *CiVH* granules in the primordial germ cells (PGCs) after gastrulation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	246,297	0	246,297
2008 年度	1,853,703	556,110	2,409,813
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	946,110	4,346,110

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：カタユウレイボヤ、生殖細胞、生殖質、*Vasa*、*Tudor*、*TDRD7*、転写抑制、*Groucho*

## 1. 研究開始当初の背景

&lt;生殖細胞形成モデル動物としてのホヤ&gt;

生殖細胞は、卵や精子といった配偶子を形成し、受精により両親の遺伝情報を混合し次

世代に伝えることのできる唯一の細胞種である。従って、世代間の連続性や種多様性の観点からきわめて重要な細胞種といえる。多細胞動物の胚発生過程において、生殖細胞は初期段階から始原生

殖細胞として体細胞と区別される。始原生殖細胞形成にはショウジョウバエ・線虫・カエルなどで知られる母性因子依存型と、有尾両生類・哺乳類に見られるシグナル誘導型の二様式に大別できる (図1)。

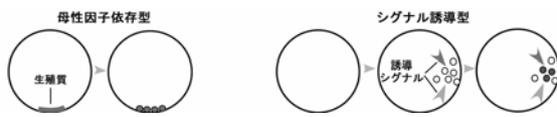


図1 二型の生殖細胞形成様式

系統進化的にはシグナル誘導型を多細胞動物における生殖細胞形成の原型様式である事を示唆する報告もある (文献1) が、ほとんどの動物種がどちらかの様式しか持たず、さらにそれぞれが多様な進化を遂げており、単純な種間比較解析から共通のメカニズムや基本原理を導き出す事は難しい。しかし興味深い事に、カタユレイボヤは同一種が上記二型の始原生殖細胞形成様式を併せ持つと考えられた (図2、文献2,3)。

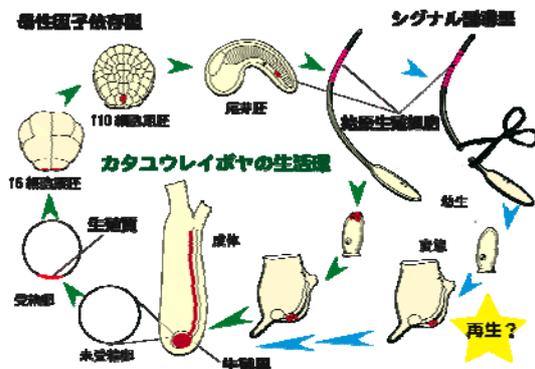


図2 カタユレイボヤの生殖細胞形成

ホヤは生殖質様領域 postplasm を持ち、通常母性因子依存型の生殖細胞形成を行う。しかし一方で、幼生期尾部に局在する始原生殖細胞を尾部ごと切除しても変態後生殖細胞マーカー *Vasa* のホモログ *CiVH* を発現する始原生殖細胞が出現し、生殖細胞が分化する。従ってカタユレイボヤにはシグナル誘導型の生殖細胞形成機構も備わっていると考えられる。このホヤの二型の生殖細胞形成機構を同一種内で比較解析する事によって、生殖細胞形成の共通のメカニズムや基本原理に関して新規知見を得ることが本研究の目的である。

### <カタユレイボヤの生殖系列細胞系譜>

研究代表者は、まずカタユレイボヤの母性因子依存型生殖系列細胞系譜の詳細な記載を行った。それまでは、ホヤは初期胚後極に *Vasa* ホモログ *CiVH* など多くの母性後極 RNA が集積する生殖質様領域 postplasm を持ち、これを卵割期終期に取り込んだ B7.6 と呼ばれる後極細胞が変態後生殖細胞へと分化すると考えられていた。しかし、細胞

追跡実験から B7.6 は原腸胚期に不等分裂をおこし、前方に小娘細胞 (B8.11)、後方に大娘細胞 (B8.12) が生じる事が分かった。B8.11 はアクチンに富みほとんどの postplasm 因子を受け継ぐ事から、postplasm に局在する構造体 Centrosome attracting body (CAB) を含むと考えられた。さらに細胞追跡実験の結果、B8.11 は変態後腸管に局在し、始原生殖巣には取り込まれないことも分かった。一方、後方の B8.12 娘細胞は変態後始原生殖巣へ取り込まれ、生殖細胞へと分化した (文献3)。

### <ホヤ生殖系列細胞における母性 RNA の役割>

さらに興味深い発見は、postplasm に局在する母性 RNA (postplasmic/PEM RNA) が B7.6 の不等分裂後の局在により2つのタイプに分けられた事であった。B8.11 のみで見られるタイプと B8.11 と B8.12 双方に見られるタイプである。例えば母性 *CiVH* RNA は B7.6 分裂時に postplasm から diffuse し、B8.12 に引き継がれた後翻訳され、B8.12 系列細胞の核縁には生殖顆粒様の *CiVH* 顆粒が形成された。一方で、B8.11 細胞にのみ留まる母性 RNA のうち *Ci-macho* は、卵割期に翻訳され機能するホヤ特異的な筋決定因子であることが知られていた。従って、1) *CiVH* のように B8.12 に受け継がれる母性 RNA は B7.6 分裂後に生殖系列細胞で翻訳され生殖細胞分化に関与し、2) B8.11 細胞にのみ局在する母性 RNA は、*macho* のように B7.6 分裂以前の生殖系列細胞で翻訳され、何らかの役割を果たすと考えられた (図3、文献3)。

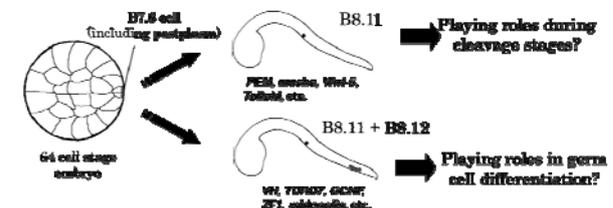


図3 尾芽胚期における postplasmic/PEM RNA 局在

## 2. 研究の目的

本研究においては postplasmic/PEM RNA 遺伝子産物を機能解析し、ホヤの生殖細胞関連遺伝子を同定する事を第一の目的とした。さら同定した遺伝子の胚性発現制御系をホヤの上記二型の生殖細胞形成様式において比較する為、カタユレイボヤ生殖系列細胞におけるプロモーター解析の実験系を立ち上げる事を第二の目的とした。

### <生殖細胞分化における postplasmic/PEM RNA 遺伝子産物の役割>

前年までの研究背景を受け、本研究期間内には B8.12 生殖系列に受け継がれる母性 RNA 遺伝子産物を中心とした機能解析を行う事を当初の目的としていた。特に注目した遺伝子は、*Ci-TDRD7* (*Ci-pem-11*) と *Ci-GCNF* であった。一方で B8.11 にのみ局在する *Ci-PEM* (*Ci-pem-1*) についても研究を行った。

#### a. *Ci-TDRD7*

Ci-TDRD7は脊椎動物に保存されたTudorドメインタンパク質のホモログである。*Drosophila*のTudorタンパク質はVasa同様生殖顆粒の構成因子であり、生殖細胞分化に関与することが分かっていた(文献4)。またTDRD7タンパク質はマウスの精巣での発現が報告されていたが、研究開始当時脊椎動物においてTDRD7を含むTudorドメインタンパク質の機能は報告されていなかった。研究期間内に、この*Ci-TDRD7*の生殖細胞形成における役割、特にCiVHとの相互作用について明らかにすることを第一の目標とした。

#### b. Ci-GCNF

GCNFは、はじめretinoid receptor-related testis-associated receptor (RTR)としてマウスの精巣で見つかったが、最近では胚発生初期にも発現し、多分化能維持に関与する遺伝子*Oct3/4*の転写抑制に役割を持つ転写因子であることが知られている(文献5)。ホヤの生殖系列細胞では卵割期に包括的な転写抑制が起こっている事が予想されていたが(文献6)、具体的なメカニズムや転写開始時期などは不明であった。生殖系列細胞における転写制御機構の手がかりを得る為に、Ci-GCNFの機能解析を第二の目標とした。

#### c. Ci-PEM (Ci-Pem-1)

*pem* (posterior end mark)はユウレイボヤで最初に見つかったホヤ特異的遺伝子であり(文献7)代表的なpostplasmic/PEM RNA遺伝子だが、機能は未知であった。*Ci-PEM* RNAは原腸胚期以降B8.11にのみ局在する事から、B8.12始原生殖細胞における生殖細胞分化には関与しないと推測した。そこで上記仮説を検証する目的で、局在・機能解析の対象とした。

#### <生殖系列細胞における胚性発現解析>

ハエ・線虫では、初期胚の生殖系列細胞が一時的な包括的転写抑制を受けていることが知られていた(文献8)。同様に、ホヤ初期胚の生殖系列細胞においても胚性発現が包括的に抑制されていると推測されていたが(文献6)、一方で生殖系列細胞における胚性発現の開始時期や発現制御機構に関してはほとんど分かっていなかった。研究期間内には、母性因子型・シグナル誘導型双方の生殖細胞において発現することが既に分かっている*CiVH*遺伝子のプロモーター解析を行い、胚性発現時期を特定し、さらに胚性発現を制御するシス領域の同定を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### <生殖細胞分化におけるpostplasmic/PEM RNA遺伝子産物の役割>

抗Ci-TDRD7抗体、抗Ci-GCNF抗体、抗Ci-PEM抗体を作製した。これらの抗体を用いて免疫

染色を行い、ホヤ胚及び成体における局在解析を行った。さらに、モルフォリノオリゴヌクレオチドによるノックダウン実験を行い、胚発生及び生殖細胞形成に対する影響を解析した。またホヤ胚や卵巣のライセートに対し抗体を用いて免疫沈降を行い、CiVHが共沈するかどうかをウェスタンブロットによって調べた。

#### <生殖系列細胞における胚性発現解析>

それまでにホヤ胚生殖系列細胞では通常のプロモーター解析によって胚性発現が検出されないことが分かっていた。そこで笹倉靖徳博士(筑波大学)の協力を得、*CiVH*遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子を繋げたコンストラクトを、*Minos*トランスポゾンを用いてゲノムDNAに導入した。このトランスジェニックホヤを用い、母性因子依存型生殖細胞内や尾部切除時に顕在するシグナル誘導型生殖細胞における*CiVH*遺伝子発現の開始時期を明らかにしようと試みた。

### 4. 研究成果

#### <生殖細胞分化におけるpostplasmic/PEM RNA遺伝子産物の役割>

##### a. Ci-TDRD7

Ci-TDRD7に関しては、すでに抗体を作成してホヤ胚の免疫染色を行い、Ci-TDRD7タンパク質が原腸胚期以降B8.12細胞内のCiVH顆粒に共局在することを明らかにしていた。本研究期間内には、Ci-TDRD7のモルフォリノオリゴヌクレオチドをホヤ胚に注入すると、B8.12細胞内のCiVH顆粒形成が妨げられることを明らかにした(図4)。

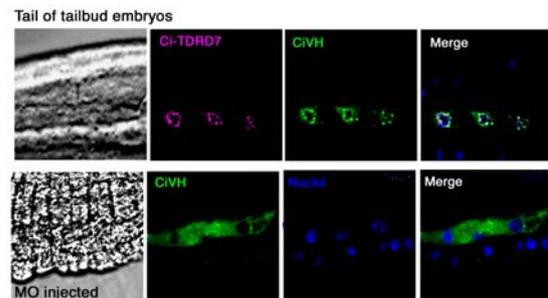


図4 尾芽胚期始原生殖細胞内のCiVHとCi-TDRD7共局在(上)と*Ci-TDRD7*モルフォリノオリゴヌクレオチド注入胚におけるCiVH顆粒の崩壊(下)

さらに、卵巣や尾芽胚のライセートを用いて精製した抗Ci-TDRD7抗体による免疫沈降を行ったところ、CiVHタンパク質が共沈した(図5)。

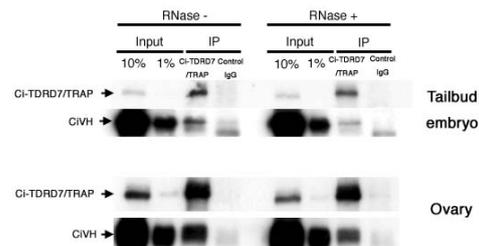


図5 抗Ci-TDRD7抗体を用いた免疫沈降

従って、カタユウレイボヤの TDRD7 は原腸胚期以降の生殖顆粒形成に重要な役割を持つ事が示唆された。

### b. Ci-GCNF

Ci-GCNF アミノ酸配列の一部を用いて抗ペプチド抗体の作製を試みたが、胚において特定の局在を示す抗体の作製に成功しなかった。標的アミノ酸配列がタンパク質のフォールディングによってマスクされている可能性もあり、より広域のアミノ酸配列によって作製したリコンビナントタンパク質を抗原とした抗体作製を行う必要がある。また、*Ci-GCNF* 遺伝子の 5' UTR を標的としたモルフォリノスクレオチドを 2 本作製しホヤ卵に注入したが、いずれも胚発生阻害や生殖細胞分化・生殖顆粒形成阻害などの影響は見られなかった。Ci-GCNF がモルフォリノスクレオチドの影響を受けない発生後期に機能している可能性も考えられ、後期発生に関して別の機能解析手法を開発する必要がある。

### c. Ci-PEM

母性因子依存型生殖細胞形成のモデル動物である線虫やショウジョウバエ初期胚の生殖系列細胞では、RNA polymerase II (RNAP II) の C 末端ドメイン (CTD) の 7 アミノ酸のコンセンサス配列 (YSPTSPS) のうち転写伸長反応を促す Ser2 リン酸化の阻害によって転写抑制が引き起こされる事が報告されていた (文献 8)。さらに近年、この CTD Ser2 リン酸化阻害は、線虫では PIE-1、ショウジョウバエでは Pgc という動物種特異的な生殖質因子によって引き起こされる事が分かった (文献 9)。この包括的転写抑制は、周囲の体細胞分化シグナルから生殖系列細胞を守り維持する為と考えられる。

ホヤ卵割期胚の生殖系列細胞においても包括的に転写が抑制されていると予想されていたが、これまで RNAP II CTD Ser のリン酸化に関する詳細な報告は無かった。本研究において、カタユウレイボヤ卵割期胚の生殖系列細胞では体細胞に比してリン酸化 CTD Ser2 と Ser5 が有為に減少している事が初めて明らかになった (図 6)。

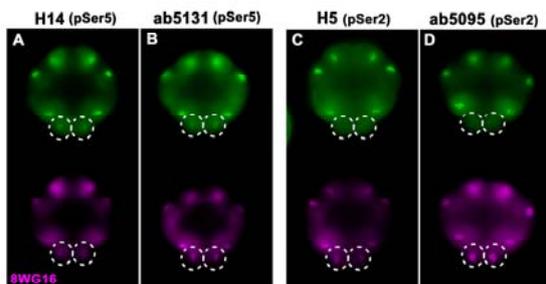


図 6 (上) 抗リン酸化 RNA polymerase II CTD 抗体を用いた 16 細胞胚の免疫染色。破線内が生殖系列細胞。(下) 抗 RNAP II CTD 抗体による共染色。

従って、カタユウレイボヤの生殖系列細胞では RNAP II の活性を downregulate する機構が働いていると考えられた。

ホヤ初期胚の生殖系列細胞における転写抑制を担うのは、線虫やハエの場合と同様、生殖質領域に蓄積する母性因子と考えられた。興味深い事に、Ci-PEM の翻訳産物に対する抗体を作製し免疫染色を行ったところ、卵割期生殖系列細胞の核に局在する事が分かった。さらに *Ci-pem-1* ノックダウン胚では、通常は体細胞系列にのみ胚性発現する *FoxA* や *SoxB1* などの遺伝子が、生殖系列細胞に異所発現を示した (図 7)。

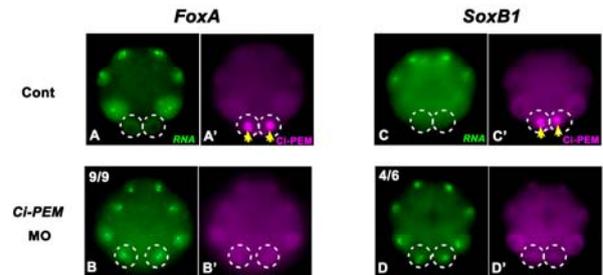


図 7 (上) 通常胚における体細胞遺伝子の胚性発現 (緑) と生殖割球核に局在する Ci-PEM タンパク質 (マゼンタ)。(下) *Ci-PEM* ノックダウン胚の生殖割球における異所的遺伝子発現 (緑、破線内)。

従って、カタユウレイボヤでは Ci-PEM が生殖系列細胞における転写抑制機構に重要な役割を持つことが示唆された。さらに、Ci-PEM アミノ酸配列の C 末端には保存された転写抑制補因子として知られる Groucho の結合モチーフが存在した。ほ乳類培養細胞に Ci-PEM と 2 つの Groucho ホモログ Ci-Groucho1, Ci-Groucho2 を共発現させ、細胞ライセートを用いて免疫沈降を行った結果、Groucho 結合モチーフ依存的に共沈することが分かった。従って、生殖系列細胞における転写抑制は Ci-PEM と Groucho との相互作用を介している可能性が示唆された。

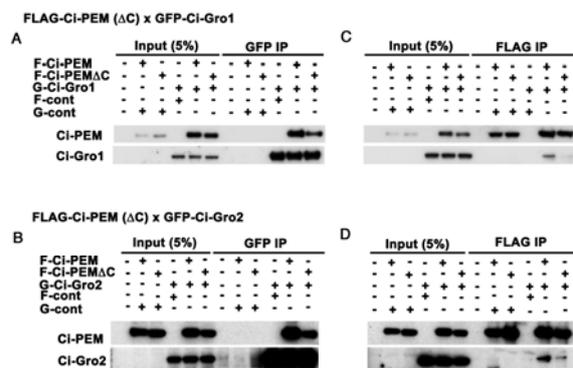


図 7 HEK293 培養細胞に共発現させた Ci-PEM と Ci-Groucho1, 2 の共沈実験。

### < 生殖系列細胞における胚性発現解析 >

#### CiVH トランスジェニック系統の作製

(笹倉靖徳博士 (筑波大) との共同研究)

*CiVH* 遺伝子上流ゲノム領域 2k をクローニン

グし、GFP 遺伝子を繋げたコンストラクトを作製し、*Minos* トランスポゾンを用いてゲノム DNA に挿入した。4 系統の作製に成功したが、胚発生期や幼生期に生殖系列細胞で胚性発現を検出できる系統は無かった。また、これらの系統においてオタマジヤクシ型幼生の尾部（母性因子型生殖細胞を含む）を切除した場合、100%の確立で変態後幼体の始原生殖巣に CiVH 陽性の始原生殖細胞が認められた。それにも関わらず、これらの CiVH 陽性細胞に GFP シグナルは認められなかった。同時に作製した *EF-1* 遺伝子プロモーターのトランスジェニック系統は体細胞全体に強力な GFP シグナルを示す為、コンストラクト作成に問題はなかったと考える。また、成体の卵母細胞や卵細胞においては GFP 発現が認められる事から、検出感度を上げる事で性成熟前個体の生殖細胞においても胚性発現が確認できる可能性がある。今後 Kaede 等の強い蛍光物質を用いるなどの工夫を加え、解析を続ける予定である。

以上により、カタユウレイボヤの生殖細胞形成における postplasmic/PEM RNA 遺伝子産物の役割や生殖系列細胞における転写制御機構について新たな知見が得られた。現在 2 本の筆頭著者論文を作成中であり、うち 1 本は投稿済みである。本研究成果はホヤ生殖細胞研究の先駆けとなり、さらに二型の生殖細胞形成における分子機構の比較解析を進め、生殖細胞形成の基本メカニズムや普遍性に関して理解を深める上で礎になると確信している。

文献

1. **Extavour C G, and Akam M.** (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* **130**, 5869-5884.
2. **Takamura K, Fujimura M, and Yamaguchi Y.** (2002). Primordial germ cells originate from the endodermal strand cells in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev Genes Evol.* **212**, 11-8.
3. **Shirae-Kurabayashi M, Nishikata T, Takamura K, Nakamoto C, Tanaka K, and Nakamura A.** (2006). Dynamic re-distribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in *Ciona intestinalis*. *Development.* **133**, 2683-93.
4. **Thomson T, and Lasko P.** (2005). Tudor and its domains: germ cell formation from a Tudor perspective. *Cell Res.* **15**:281-91. Review.
5. **Sato N, Kondo M, and Arai K.** (2006). The orphan nuclear receptor GCNF recruits DNA

methyltransferase for Oct-3/4 silencing. *Biochem Biophys Res Commun.* **344**, 845-51.

6. **Tomioka M, Miya T, and Nishida H.** (2002). Repression of zygotic gene expression in the putative germline cells in ascidian embryos. *Zoolog Sci.* **19**, 49-55.
7. **Yoshida S, Marikawa Y, and Satoh N.** (1996). Posterior end mark, a novel maternal gene encoding a localized factor in the ascidian embryo. *Development.* **122**:2005-12.
8. **Seydoux G, and Dunn MA.** (1997) Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development.* **124**:2191-201.
9. **Nakamura A, and Seydoux G.** (2008). Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development.* **135**:3817-27. Review.

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 2 件)

1. **François Prodon, Liyx Yamada, Maki Shirae-Kurabayashi, Yoriko Nakamura, and Yasunori Sasakura.** (2007). *Postplasmic/PEM* RNAs: A class of localized maternal mRNAs with multiple roles in cell polarity and development in ascidian embryos. *Dev Dyn.* **236**: 1698-1715. Reviewed.
2. **Akira Nakamura, Maki Shirae-Kurabayashi, and Kazuko Hanyu-Nakamura.** (2010). Repression of early zygotic transcription in the germline. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**: 709-714. Reviewed.

[学会発表] (計 8 件)

1. 白江-倉林麻貴、西方敬人、中村輝「Tudor Domain Containing Protein, Ci-TDRD7/TRAP, is a Novel Component of Perinuclear Germ Granules in an Ascidian *Ciona intestinalis*」第 40 回日本発牛生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡、2007 年 5 月
2. 白江-倉林麻貴、西方敬人、中村輝「Postplasmic/PEM RNA *Ci-TDRD7/TRAP* (*Ci-pem11*) 及び *Ci-PEM* 翻訳産物の生殖細胞分化への関与」第 2 回ホヤ研究集会、下田、2007 年 5 月
3. 白江-倉林麻貴、中村輝「Investigating the roles of Ci-PEM in germline formation in an ascidian, *Ciona intestinalis*」第 41 回日本発牛生物学会、徳島、2008 年 5 月
4. Maki Shirae-Kurabayashi and Akira Nakamura. Ci-PEM is required for transcriptional

repression in germline cells during cleavage stages in an ascidian, *Ciona intestinalis*. 第5回国際ホヤミーティング、沖縄、2009年6月.

5. 白江-倉林麻貴、松田 一起、中村 輝「ホヤ生殖割球における転写抑制機構-Ci-PEMの機能解析」第1回甲南大学・モレキュラーサイエンスワークショップ「ホヤ遺伝子機能制御の最新知見」、神戸、2010年3月

6. Maki Shirae-Kurabayashi, Kazuki Matsuda and Akira Nakamura. A Protein Product of Ci-PEM, a Major Postplasmic/PEM RNA Gene in Ascidians, Plays Crucial Roles in Transcriptional Repression in Germline Blastomeres. 第19回CDBミーティング“RNA Sciences in Developmental Biology” 神戸、2010年5月

7. 白江-倉林麻貴、松田一起、中村輝「Ci-PEM is required for transcriptional repression in germline blastomeres in an ascidian, *Ciona intestinalis*.」第43回日本発生生物学会、京都、2010年6月

8. 白江-倉林麻貴「原索動物ホヤの生殖細胞形成-多細胞動物はどのようにして生命を引き継ぐのか」第20回広島大学・「細胞のかたちと機能プロジェクト」セミナー、広島、2010年11月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉林 麻貴(白江麻貴) (Kurabayashi Maki)  
独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究チーム・研究員  
研究者番号：60391942