

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570252

研究課題名(和文)母性局在因子PEMによる生殖細胞形成機構

研究課題名(英文)Germline development regulation by maternally localized factor PEM

研究代表者

熊野 岳 (Kumano, Gaku)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80372605

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)：生殖細胞は全能性を維持するために発生過程において体細胞と分離し続けなければならない。そのために胚発生のある時期に体細胞のプログラムを動かさないよう全ての遺伝子発現を抑制する。本申請では、この遺伝子発現抑制をコントロールする因子を脊索動物マボヤで同定し、どのような仕組みで抑制を行っているのかを明らかにした。その結果驚くべきことに、この因子自体はホヤ特有のものであるにもかかわらず、抑制の仕組みはハエや線虫と同じであることがわかった。これは、進化の過程で動物種を超えて抑制の仕組みは変えられない強い拘束が働いていることを示しており、生殖細胞の特徴の1つを明らかにしたといえる。

研究成果の概要(英文)：Suppression of zygotic transcription in early embryonic germline cells is tightly linked to its separation from the somatic lineage. Many invertebrate embryos utilize localized maternal factors that are successively inherited by the germline cells for silencing the germline. Germline quiescence has also been associated with the underphosphorylation of Ser2 of RNA polymerase II. Using an ascidian *Hyalocynthia roretzi*, we identified a first deuterostome example of a maternally localized factor, PEM, which represses germline transcription through Ser2 underphosphorylation. Our results suggest that non-homologous proteins, PEM, Pgc of *Drosophila*, and PIE-1 of *C. elegans*, repress germline gene expression through analogous functions: by keeping Ser2 underphosphorylated through binding to the P-TEFb complex, a kinase that phosphorylates Ser2. The present study provides an interesting example of evolutionary constraint on how a mechanism of germline silencing can evolve in diverse animals.

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：ホヤ 生殖細胞 転写抑制 母性局在因子 PEM

### 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は全能性を維持するとともに、世代を超えて生き続ける特殊な性質を持つ。このような生殖細胞が発生過程にどのように形成されるのか、その制御機構については限られた動物種においてのみ研究がなされている。申請者は最近、脊索動物マボヤ初期胚において母性局在因子 posterior end mark (PEM) が、将来生殖細胞を作る生殖細胞系列において転写抑制に関わるという、ショウジョウバエの Pgc、Gcl、線虫の PIE-1 に次ぐ新口動物では初めてとなる重要母性局在因子の発見をした。生殖細胞系列における転写抑制は、体細胞の運命決定に関わる様々な遺伝子が生殖細胞で発現しないようにすることで生殖細胞における全能性の維持に貢献し、生殖細胞形成の根幹に関わることが知られる。したがってこの発見を足掛かりにして、これまであまり解析がなされてこなかった新口動物種における生殖細胞系列での転写抑制機構を明らかにし、生殖細胞を特徴づける発生初期の転写抑制機構について、動物界全体にわたった抑制機構の全体像に迫れると考えた。

### 2. 研究の目的

生殖細胞が発生過程にどのように形成されるのか、その機構を明らかにするのが本研究の目的である。特に本研究では、生殖細胞系列が体細胞と分離し性質を異にするために重要な役割を果たす、生殖細胞系列における遺伝子発現の抑制機構に着目し、脊索動物マボヤ胚を用いて、PEM がどのように生殖細胞系列での転写抑制を引き起こすのかそのタンパク質レベルでの機構を明らかにし、他種での既知の機構と比較する。

また、生殖細胞を特徴づける転写抑制以外の機能についても PEM により制御されているのかを調べ、PEM がホヤ生殖細胞形成において統括的な役割を果たすか否かを確かめることも目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) PEM がどのように転写抑制を行うのかその分子機構を明らかにする。特に着目すべき点は、PEM の C 末端に存在する WRPW 配列の関与である。この配列は他の系で転写抑制因子である Groucho タンパクをリクルートし、転写抑制に関わることが知られる。また、ショウジョウバエの Pgc や線虫の PIE-1 で明らかにされているように RNA polymerase II のリン酸化制御を介して転写抑制を行っているかどうか調べる。

(2) 次に PEM による転写抑制の解除および生殖細胞系列での胚性遺伝子発現機構を明らかにする。まずは基本的な情報として、胚性遺伝子発現がいつ開始するのか明らかにする。つづいて、転写抑制の解除が PEM のタンパク量の減少に伴って起こるものなのか、それともショウジョウバエの Pgc や線虫の

PIE-1 の例で知られるように、これら因子のタンパク量が減少しても別の抑制機構に受け継がれるのかを明らかにする。さらに、PEM タンパク質の減少や別の抑制機構に関わる因子や、胚性遺伝子発現を促す転写因子等が、これまで機能未知であったマボヤ母性局在因子の中に存在するかどうかを機能阻害実験等により確かめる。

### 4. 研究成果

本研究ではまず、PEM がどのようにして転写を抑制するのかについての分子機構を詳細に調べたところ、以下のようなことを明らかにした。すなわち、PEM は pTEFb と呼ばれるタンパク複合体との結合を介して、RNA polymerase II のリン酸化、および転写伸長を抑えることで、生殖細胞系列の転写をグローバルに抑制することを示した。この分子機構は、ショウジョウバエや線虫で知られる機構と同様で、ショウジョウの近縁種にのみ存在する母性局在因子 Pgc と、線虫の近縁種にのみ存在する PIE-1 も、pTEFb 複合体に結合し、RNA polymerase II のリン酸化を抑制することが知られる。興味深いことに、PEM もホヤにユニークな因子であることから、八エ、線虫、ホヤを含めた幅広い種で、それぞれにユニークな母性局在因子が、pTEFb を介した RNA polymerase II のリン酸化の抑制という共通の機構で生殖細胞系列での転写を制御することが示唆された。このことは、進化上、生殖細胞系列での転写抑制機構に機能的拘束が働いていたことを示唆する重要な発見であり、この成果は、Current Biology 誌に掲載された。Vasa や Nanos といった生殖細胞形成に必須の遺伝子産物をリクルートすることで生殖質の形成を促す八エの Oskar やゼブラフィッシュの Bucky ball も進化的に新しい因子であり、種を超えて共通で、かつ必須なイベントが、進化的には最近生じた種に固有な因子によって制御されるという制御機構は、生殖系列に特徴的な性質なのかもしれない。

また、PEM の C 末部分の WRPW 配列に関しては、わずかではあるが転写抑制への関与が認められた。

つづいて、生殖細胞系列における一連の転写制御機構を明らかにするために、これまで明らかにしてきた PEM による転写抑制がどのように解除されて、どのように生殖細胞形成に重要な胚性遺伝子発現が開始するのかを理解することを目的に研究を行った。様々な動物種で生殖細胞系列における転写抑制機構の解析は行われているが、その解除および胚性遺伝子発現機構についてはほとんど調べられていない。解析の結果、(1) 中期原腸胚期に胚性遺伝子発現が開始すること、(2) 発生に伴った PEM タンパクの減少が胚性遺伝子発現開始に必要な十分であることを明らかにした。さらに PEM タンパクの減少を制御すると考えられる母性局在因子 ZF-1 を同定し、ZF-1 のない環境下では、本来の胚性遺伝子発

現の開始時期には遺伝子発現が見られないこと、発生に伴ったPEMタンパクの減少が遅延することを明らかにした。

以上のように、マボヤ初期胚では複数の母性局在因子により生殖細胞系列における転写が制御されていることを明らかにしたが、機能未知の母性局在因子はまだ存在し、これら因子が生殖細胞系列形成にどのように関わるのか明らかにすることが今後重要になると考えられる。

#### 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5件)

1 Kuwajima, M., Kumano, G. and Nishida, H. (2014). Regulation of the number of cell division rounds by tissue-specific transcription factors and Cdk inhibitor during ascidian embryogenesis. *PLoS One* 9, e90188. doi: 10.1371/journal.pone.0090188. 査読あり

2 Nishide, K., Mugitani, M., Kumano, G. and Nishida, H. (2012). Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae. *Development* 139, 1467-1475. doi: 10.1242/dev.076083. 査読あり

3 Kumano, G. (2012). Polarizing animal cells via mRNA localization in oogenesis and early development. *Dev. Growth and Differ.* 54, 1-18. doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01301.x. 査読あり

4 Kumano, G., Takatori, N., Negishi, T., Takada, T. and Nishida, H. (2011). A maternal factor unique to ascidians silences the germline via binding to P-TEFb and RNAP II regulation. *Curr. Biol.* 21, 1308-1313. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.050. 査読あり

5 Hashimoto, H., Enomoto, T., Kumano, G. and Nishida, H. (2011). The transcription factor FoxB mediates temporal loss of cellular competence for notochord induction in ascidian embryos. *Development* 138, 2591-2600. doi: 10.1242/dev.070383. 査読あり

[学会発表](計17件)

1 熊野岳、マボヤ神経胚における「くびれ」形成機構の解析、第4回 JMBIO フォーラム、2014年1月16日、東京

2 熊野岳、ホヤ幼生の尾が形づくられる仕

組み、秋の浅虫研究会ミニシンポ、2013年10月19日、浅虫、青森

3 熊野岳、ホヤの原腸形成、かたちまつり3、2013年10月12日、高槻、大阪

4 熊野岳、マボヤ神経胚における「くびれ」形成機構の解析、第84回日本動物学会「ホヤの生物学談話会」、2013年9月26日~28日、岡山

5 宮奥香理、マボヤ初期胚における生殖細胞系列での転写抑制解除機構の解析、第84回日本動物学会、2013年9月26日~28日、岡山

6 Kumano, G. Mechanism of the “KUBIRE” formation in the neurula embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. 46<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Cosponsor APDBN), May 28-31, 2013, Matsue, Japan.

7 Kumano, G. Mechanism of Formation of the “Neurula Small Waist” in the Ascidian, *Halocynthia roretzi*. The 23<sup>rd</sup> CDB Meeting “Building Multicellular Systems from Cellular Cross-Talk”, Jan., 22-23, 2013, Kobe, Japan.

8 Kumano, G. *Halocynthia roretzi*, a Japanese ascidian species, as a model animal for the study of chordate embryogenesis. The 2nd Annual Meeting for Whole-Organism Science Society, Sep. 28-29, 2012, Hyogo, Japan.

9 桑島真美、ホヤ胚発生における発生運命と細胞分裂の回数制御の関係。第83回日本動物学会、2012年9月13日~15日、大阪

10 高鳥直士、Not mRNA 非対称分配による中胚葉と内胚葉運命の分離機構。第83回日本動物学会、2012年9月13日~15日、大阪

11 Kumano, G. PEM, a localized maternal factor unique to ascidians, represses germline gene expression through RNAP II regulation and binding to p-TEFb. The 58th and 60th NIBB Conference “Germline Specification, Sex, and Stem Cells”, July 17-21, 2012, Okazaki, Japan.

12 熊野岳、マボヤ神経胚における「くびれ」形成機構の解析。ホヤ研究会、2012年6月11日~12日、京都

13 Kumano, G. Roles for maternally-localized PEM in ascidian germline development. Joint Meeting of

JSDB 45th and JSCB 64th, May, 28-31, 2012, Kobe, Japan.

14 Takatori, N. A localized factor polarizes mesendoderm cells and separates mesoderm and endoderm fates in the ascidian embryo. Joint Meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, May, 28-31, 2012 Kobe, Japan.

15 熊野岳、マボヤ胚における生殖細胞系列での転写抑制機構。日本発生生物学会秋季シンポジウム、2011年12月19～21日、岡崎

16 熊野岳、マボヤ胚母性局在因子 PEM による生殖細胞系列での転写抑制機構、第82回大会日本動物学会2011年9月21日～23日、旭川

17 Kumano, G. PEM, a localized maternal factor unique to ascidians, represses germline gene expression through RNAP II regulation and binding to p-TEFb. 6th International Tunicate Meeting, July 3-7, 2011, Montreal, Canada.

〔図書〕(計1件)

1 Kumano, G., Springer, New Principles in Developmental Processes, 2014, 3-11.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/asamushi/kumano\\_lab/index.html](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/asamushi/kumano_lab/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊野 岳 (KUMANO, GAKU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：80372605