

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770250

研究課題名(和文) 円口類ヤツメウナギの始原生殖細胞の発生機構

研究課題名(英文) Developmental mechanisms of primordial germ cells in the cyclostome lamprey

研究代表者

日下部 りえ (Kusakabe, Rie)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70373298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：円口類ヤツメウナギは、脊椎動物進化の初期に分岐し、様々な原始的形質を今に残す動物群である。円口類の生殖細胞系列の発生機構に迫る目的で、ヤツメウナギ胚で始原生殖細胞(PGC)や生殖巣原基の出現の観察を試みた。日本産カワヤツメから、PGC形成の初期に働くと予想される遺伝子や、PGCの生殖巣への移動に関わる遺伝子、生殖巣発生に関わる遺伝子を単離し、発現パターンを解析した。いくつかの生殖質関連遺伝子がヤツメウナギ受精卵に母性RNAとして局在していた。また、生殖細胞の移動に必須なCXCR4遺伝子の上流領域に制御された蛍光タンパク質の遺伝子導入により、初期胚で移動する細胞を追跡する実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：The cyclostome lampreys are a group of vertebrates that diverged early in evolution and retain various ancestral morphological traits. In order to explore the developmental mechanisms underlying the establishment of germ cell lineage, we examined the emergence of primordial germ cells (PGCs) and the gonads in the embryonic lampreys. Genes involved in the specification of PGCs, migration of PGCs to the gonads and in the establishment of gonadal primordium were newly identified by RT-PCR. Expression of each gene was analyzed by whole mount in situ hybridization. The results showed that maternal mRNAs of several germ cell-related genes were localized in fertilized eggs of the lamprey. We also established the experimental system in which migratory cells in the early embryos can be traced with the expression of the reporter fluorescent protein driven by upstream regulatory sequence of CXCR4 gene.

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 脊椎動物 進化 ヤツメウナギ 母性mRNA 生殖巣

1. 研究開始当初の背景

いくつかのモデル動物(ショウジョウバエ、線虫、無尾両生類)において、始原生殖細胞(Primordial Germ Cell: PGC)は将来の生殖巣とは離れた胚領域で形成され、生殖巣に移動することが確認されている。これらの種において、PGCは初期卵割期の特定の割球に由来し、母性 mRNA とタンパク質の複合体である生殖質を受け継ぐ。しかし他の多くの動物系統では、特定の割球に PGC の由来を見いだすことはできていない。例えば、ほ乳類では体細胞からの誘導により PGC が成立することが知られる。生殖質による早期の PGC の決定のしくみが動物界でどの程度保存されているかは不明である。

円口類(ヤツメウナギ、ヌタウナギ)は脊椎動物のなかでも最も初期に分岐し、祖先的な形質(顎を持たない、対鰭をもたない、軸上・軸下骨格筋の区別がない、など)を多く保持しており、脊椎動物群の体制の複雑化・多様化を考える上で、重要なグループである。しかし生殖細胞については、今から 90 年以上前に、初期咽頭胚における形態的な記載(Okelberg ら、1921 年)があるのみである。ヤツメウナギの PGC は卵黄細胞に似た大型の細胞で、初期咽頭胚において体幹後部の前腎輸管の腹側、背大動脈の両側の中胚葉内にみいだされるという。

多くが化石種である無顎類のなかでも、ヤツメウナギは、胚発生を観察することができる貴重な現存種であるが、生殖細胞が発生初期の特定の割球に由来するか、またどのような遺伝子制御機構により運命決定され、生殖巣内に存在するようになるかは未解明である。

2. 研究の目的

本研究ではヤツメウナギにおいて、PGC のマーカー遺伝子や、生殖巣への移動に関わる遺伝子を単離し、発現と機能を、受精卵～初期咽頭胚に焦点を絞って解析する。同時にヤツメウナギ初期胚～アンモシーテス幼生における生殖巣の発生過程を観察する。得られた結果を、ゼブラフィッシュやメダカ、あるいはホヤでの解析結果と比較し、脊椎動物の共通祖先に備わっていた生殖細胞系列の発生機構とその変遷を解明する。

3. 研究の方法

以下の解析により、日本産カワヤツメ *Lethenteron japonicum* の PGC 発生関連遺伝子の配列を同定し、胚発生過程における発現パターンを解明する。また、生殖巣の形成過程を組織学的に解明し、PGC との位置関係を発生過程を通じて明らかにする。

- (1) RT-PCR 法により PGC 形成の初期に働くと予想される遺伝子、PGC の生殖巣への移動に関わる遺伝子、生殖巣の発生に関わる遺伝子を新規に単離し、塩基配列を明らかにする。
- (2) (1)で得られた遺伝子に対する RNA プローブを合成し、ヤツメウナギ胚に対する in situ ハイブリダイゼーションにより発現領域を検出する。
- (3) ヤツメウナギ後期胚やアンモシーテス幼生の組織切片を作成し、組織学的な解析により PGC や生殖細胞を見いだす。
- (4) マーカー遺伝子を発現しつつ、生殖巣原基にむかって移動する細胞を見だし、組織レベルでの観察と比較する。

4. 研究成果

(1) ヤツメウナギ PGC 発生関連遺伝子の単離

ゼブラフィッシュなどのモデル脊椎動物では、Nanos, Vasa などの母性 mRNA やタンパク質が受精卵内で局在し、生殖質を構成することが知られる。これらの遺伝子の相同遺伝子を、米国産カワヤツメ *Petromyzon marinus* のゲノムデータベース中に検索し、候補配列に対するプライマーを設計した。日本産カワヤツメ胚より RNA を抽出し、RT-PCR を行って cDNA を単離した。また同様の手法で、FtzF1 などの生殖巣形成に関わる遺伝子も単離した。

(2) 初期胚における発現パターンの解析

(1)で単離した遺伝子に対する RNA プローブ(digoxigenin で標識)を合成し、ホルマウント in situ ハイブリダイゼーション法により発現パターンを調べた。その結果、受精卵において数種類の母性 mRNA が動物局側に局在し、卵割の進行に伴って、一部の細胞のみに受け継

られることを見いだした。

また、*FtzF1* などの生殖巣形成に関わる遺伝子が、ヤツメウナギの体節の腹側に接する側板中胚葉に細長く発現することを見いだした。すなわち、ヤツメウナギでも咽頭胚期までに生殖巣のもとになる中胚葉が運命決定されると推察される。

(3) ヤツメウナギ生殖巣の形態的な観察

本研究の主要な材料であるカワヤツメに近縁な、スナヤツメ *Lethenteron reissneri* のアンモシーテス幼生を用い、成熟前の生殖巣の形態的な観察を行った。幼生をブアン固定し、横断面の連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行って観察した。その結果、体長 90mm 程度（受精後 1 年以上）の個体ではすでに、正中線上にひとつの生殖巣が存在し、内部にはさまざまな分化段階の卵母細胞が観察された。

(4) CXCR4-GFP レポーター遺伝子による細胞移動の観察

脊椎動物の始原生殖細胞の移動に必須なケモカインレセプターである CXCR4 遺伝子の 5' 上流領域を、ヤツメウナギゲノム配列中に同定した。この配列を蛍光タンパク質 GFP のコード領域の 5' 側に連結した融合レポーター遺伝子を作成した。この遺伝子 (DNA プラスミド) をヤツメウナギ受精卵に顕微注入して発生させた。その結果、蛍光をもつ大型の細胞が咽頭胚の腹側から、予定生殖巣領域に向かって移動する様子を観察することができた (図 1)。

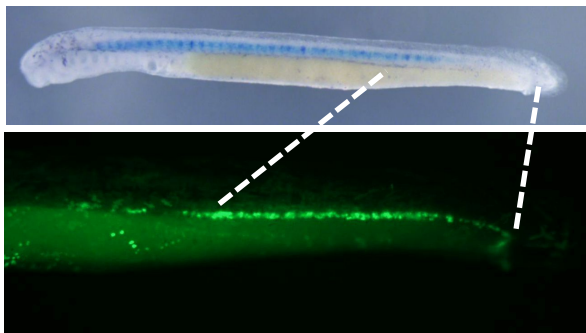


図 1. ヤツメウナギ CXCR4 遺伝子の 5' 上流領域に制御された GFP 遺伝子の発現。1 細胞期胚に DNA コンストラクトを導入すると、発現は胚の後方の生殖隆起近傍に局在する。写真は同一個体。

(5) ヤツメウナギ生殖細胞形成過程に関する考察

以上の実験・観察結果により、ヤツメウナギ受精卵において、いわゆる生殖質に類似した mRNA の局在個所が存在し、これが限られた細胞に受け継がれて PGC が運命決定されると推察される。PGC がおさまる生殖巣原基は、咽頭胚の左右に一对存在するが、アンモシーテス幼生期に正中線上で統一されて成熟を迎えると考えられる。

(6) 今後の展望

本研究の成果により、円口類の生殖細胞関連遺伝子が初めて同定され、発生過程を通じての PGC の挙動の概要をつかむことができた。また、平成 25 年度には、本研究で用いている日本産カワヤツメの全ゲノム配列が発表され、遺伝子配列の同定がさらに容易になった。これを利用して、遺伝子のタンパク質コード領域のみならず、周辺の非翻訳領域や、遺伝子クラスターの構成なども探索することが可能である。特に、本研究で解析した、生殖質に局在する mRNA については、3' 非翻訳領域に結合する microRNA による翻訳レベルでの制御が示唆されている (谷、日下部ほか, 2010 年、*Gene* など)。ゲノム情報の利用により、体細胞と生殖細胞の区別の成立について、脊椎動物の他系統での遺伝子相互作用との共通点や相違点を予測し、胚を用いた実験による検証を試みていく予定である。

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) Yuri L. Kawai, Kei Yura, Miyuki Shindo, Rie Kusakabe, Keiko Hayashi, Kenichiro Hata, Kazuhiko Nakabayashi, Kohji Okamura (2014) Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the river lamprey, *Lethenteron japonicum*. Mitochondrial DNA Early Online: 1–2. DOI: 10.3109/19401736.2013.861432 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

- 1) 日下部 りえ : microRNA の多様性と脊椎動物の進化、日本発生生物学会秋季シンポジウム 2013、2013.11.18.、神戸しあわせの村 (神戸市)
- 2) Rie Kusakabe: Developmental Evolution of Migratory Precursor Cells in Vertebrates. CDB Symposium 2013 [The Making of a Vertebrate]. 2013.3.4.-3.6.、理化学研究所発生再生科学総合研究センター (神戸市)
- 3) 日下部 りえ : 円口類ヤツメウナギに探る、始原生殖細胞 (PGC) の発生と進化、日本発生生物学会秋季シンポジウム 2011、2011.12.19-21、岡崎カンファレンスセンター (岡崎市)
- 4) Rie Kusakabe: Evolution of Developmental Mechanisms of Vertebrate Muscles. The 6th NIBB International Practical Course and The 1st NIBB - TLL Joint International Practical Course "Developmental Genetics of Medaka IV"、2011.11.15、基礎生物学研究所 (岡崎市)
- 5) Rie Kusakabe : Cyclostome Lampreys as a Developmental Model 第 17 回小型魚類研究会 2011.9.8-9.9、東レ総合研修センター (三島市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日下部 りえ (KUSAKABE RIE)

神戸大学・大学院理学研究科生物学専攻・
理学研究科研究員
研究者番号 : 70373298

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし