The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells
Author(s)	佐藤, 正岳
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43735
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【46】

氏　　名	佐藤正岳（さとう まさたけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16843　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells （初期胚と生殖細胞で高発現を示す新規遺伝子 PGC7）
論文審査委員	（主査） 教授　仲野　徹 （副査） 教授　岡部　勝　　教授　濱田　博司

論文内容の要旨

【目的】

胚性幹細胞（ES細胞）は全分化能を有する。発生過程において出現する始原生殖細胞（PGC）は生殖系列への運命づけがなされているが、同時に全分化能を持つ細胞である胚性生殖細胞に脱分化する能力を有している。細胞の全分化能および生殖系列細胞への運命づけの分子基盤を明らかにすることを目的としてES細胞とPGCにおけるmRNAの発現様式をSAGE（Serial Analysis of Gene Expression）法で比較した。その結果、PGCで高い発現を示すPGC7遺伝子を発見し、そのクローニングならびに発現様式の解析を行った。

【方法ならびに成績】

SAGEライブラリーを作製するために、ES細胞（E14株）と交尾後12.5日胚のTNAP$^{\beta\text{-geo}}$マウスからソーティングして精製したPGCを用いた。これらの細胞由来のtotal RNAからcDNAを合成し、*Rsa* I、*BsmF* I制限酵素を用いて18塩基からなるシークエンス・タグを作成した。次にこのタグをタンデムにライゲーションしたconcatemerをプラスミドにサブクローニングし、シークエンス解析を行った。このSAGE法により得られた結果はコンピューターを用いてデータ処理を行い、ES細胞、PGC各々における遺伝子の発現プロファイルを得た。定量性についてはES細胞とPGCで発現で10倍以上発現の差を有した遺伝子をそれぞれ1つずつ選び、定量的RT-PCR法を用いることでSAGE法で得られた結果が正しいことを確認した。次にES細胞と比較してPGCにおいてSAGE法で64倍、定量的RT-PCR法にて35倍多く発現し、PGC発現プロファイル上7番目に多く発現を認めた未知のタグ配列をPGC7と名づけ以下の解析を行った。

EESTデータベースから予想されるPGC7遺伝子の全長cDNAをRT-PCR法にてクローニングした。PGC7タンパクは160アミノ酸から成り、今まで知られているタンパク質にホモロジーはなく、42番目から59番目のアミノ酸に核移行シグナルまた32番目から46番目のアミノ酸に核外移行シグナルを有していた。成熟マウス各組織に対するノーザンブロット解析では卵巣にのみ約0.7kbのバンドの発現を認めた。

PGC7に対するポリクローナル抗体を作製し、発現パターンを調べた。成熟マウスの卵巣では卵細胞にだけ発現を認め、卵巣内に存在する他の体細胞には発現を認めなかった。一次卵胞から一層の顆粒細胞で囲まれた未成熟期の卵細胞においては核より細胞質において強い発現を認めたが、それ以降の成熟した卵母細胞では核により強い発現を認

めた。排卵後の未受精卵においては細胞質全体に弱い発現が認められたが、受精後12-16時間後には前核および極体に強い発現を示した。2細胞期から桑実胚にかけては細胞全体に発現を認めた。交尾後3.5日（E3.5）の胚盤胞では内部細胞塊、栄養外胚葉両方においてPGC7の発現を認めた。しかし、E2.5胚、E3.5胚をそれぞれ2日、1日培養して得た着床期のE4.5胚に相当する胚においてはPGC7の発現は消失していた。その後E5.5、E6.5胚でもPGC7の発現は認めなかった。しかし、PGCが出現するE7.5に一致して再びPGC7に染色される細胞が尿膜および尿膜基部に出現した。このPGC7陽性細胞は同時にPGCのマーカーである4C9も陽性であることから、出現直後のPGCであることが確認できた。その後PGC7陽性細胞はE8.5には後腸を、E9.5には背側腸間膜を移動し、E12.5までにオス、メスともに生殖隆起に移動した。メスではE14.5以降PGC7の発現は減弱し、E16.5には消失したが生後0日から再び発現を認めた。一方、オスのPGCはE15.5まではPGC7を発現しているが、これ以降徐々に発現が減弱し、生後は発現を認めなかった。

【総括】

PGC7は発生初期から発現を認め、E4.5以降発現が消失し、再びPGCの発生とともにE7.5から発現が認められた。この結果からPGC7がPGCの発生に何らかの重要な機能を有しているのではないかと推測している。PGCのマーカーとしてOct-3/4、TNAP、4C9があるが、いずれもPGC7と異なりE4.5、E5.5においても発現しており、かつ原始外胚葉、胚盤葉上層の両方において発現を認める。このことからPGC7はPGC発生初期の非常に優れたマーカーとして使用することができる。PGC7タンパク質には核移行シグナルおよび核外移行シグナルが重なるようにして存在した。受精によりオスとメスの前核および極体にPGC7が集積し、2細胞になると細胞全体に分布する。また、成熟マウスの卵巣において卵細胞の成熟により細胞質から核へとPGC7の局在部位が異なること、および排卵後における初期胚発生段階において分布が変化すること、は、核－細胞質間のシャトリングを調節する何らかのタンパク質が関係していると考えられる。今後はPGC7をノックアウトしたマウスを作成し、初期胚発生およびPGC7の出現に影響があるか調べるとともにPGC7と相互作用を有するタンパク質としてどのようなものがあるのか探索し、PGC7機能の解明を目指していく。

論文審査の結果の要旨

胚性幹細胞（ES細胞）は分化における全能性を有する細胞である。一方、発生過程において出現する始原生殖細胞（PGC）は生殖系列への運命づけがなされているが、特定の培養条件においてES細胞に類似し全分化能を有する胚性生殖細胞（EG細胞）へと「脱分化」することができる。本研究では細胞の全分化能および生殖系列細胞への運命づけの分子基盤を明らかにすることを目的として、ES細胞とPGCにおけるmRNAの発現様式をSAGE（Serial Analysis of Gene Expression）法を用いて比較した。その結果、PGCで高い発現を示す新規の遺伝子であるPGC7を見出し、そのcDNAクローニングを行った。次に、PGC7に対するポリクローナル抗体を作製し、PGC7や成熟マウス各組織およびマウス発生段階における発現様式の詳細な解析を行った。成熟マウスでは卵細胞、初期胚では受精後3.5日までPGC7の発現を認めた。着床後PGC7の発現は一旦消失するが、受精後7.5日以後はPGCにおいて特異的な発現を認めた。また、卵細胞の成熟過程およびマウス発生段階でPGC7の核－細胞質間における細胞内移動が認められた。以上からPGC7がPGCの発生に何らかの重要な機能を有していると考えられ、今後機能の解析を中心とした研究への発展が期待される。また、PGC7がPGC発生初期の非常に優れたマーカーとして生殖細胞発生の研究に寄与することからも、本研究は学位授与に値すると考えられる。