The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マボヤ母性局在因子postplasmic/PEM RNAsによる生殖細胞系列の転写調節機構の解析
Author(s)	宮奥, 香理
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70674
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

平成 30 年度

マボヤ母性局在因子 *postplasmic/PEM* RNAs による生殖細胞系列の転写調節機構の解析

Analysis of transcriptional regulation by maternally localized *postplasmic/PEM* RNAs in the germline of the ascidian, *Halocynthia roretzi*

大阪大学

理学研究科

生物科学専攻

宮奥香理

目次

和文要旨 3

欧文要旨 5

第一章 序論

1. 1 生殖細胞系列の形成と転写制御 6

1. 2 生殖細胞系列の転写制御に重要な母性局在因子 7

1. 3 ホヤ胚における生殖細胞系列形成の特徴と *postplasmic/PEM* RNAs 9

1. 4 本研究の目的と概要 12

第二章 材料と方法

2. 1 動物 13

2. 1 Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 13

2. 3 アクチノマイシン D 処理 13

2. 4 *in vitro* mRNA の合成と強制発現実験 14

2. 5 モルフォリノアンチセンスオリゴの顕微注入 15

2. 6 Pem タンパク質に対する免疫染色 15

第三章 結果

3. 1 Popk-1 は生殖細胞系列における転写抑制に寄与する。 16

3. 2 生殖細胞系列における胚性発現開始時期 18

3. 3 Pem タンパク質の減少が生殖細胞系列の胚性発現に必要十分である。 20

3. 4 Zf-1 は Pem タンパク質を減少させることにより胚性発現を開始 23

させる。

第四章 考察

4. 1 本研究から示唆されたこと 27

4. 2 生殖質の形成と転写抑制 28

4. 3 Pem による体細胞遺伝子および生殖細胞遺伝子の転写制御 29

4. 4 Pem 以外の転写抑制機構 31

4. 5 Zf-1 による Pem タンパク質の減少機構 31

4. 6 総括および今後の課題 32

引用文献 41

発表リスト 53

謝辞 54

和文要旨

受精卵の細胞質は均質ではなく、母性因子や細胞内小器官、卵黄が局在する。多くの動物種の胚発生において、母性局在 mRNA は、体軸の形成や細胞の発生運命の決定等、重要な役割を果たすことが知られている。ホヤ胚の後方には、Centrosome-Attracting body (CAB) と呼ばれる細胞内構造が存在し、CAB には *postplasmic/PEM* RNAs と呼ばれる母性 mRNA 群が局在する。CAB には、生殖質と呼ばれる、生殖細胞の形成に必要な因子を含む特殊な細胞質に似た構造が含まれ、CAB 及び *postplasmic/PEM* RNAs は卵割を経て生殖細胞系列に受け継がれる。近年、*postplasmic/PEM* RNAs の一つ、Pem は、4~16 細胞期の生殖細胞系列の核に存在し、RNA polymerase Ⅱ の転写伸長反応の活性化に重要な因子 pTEFb に結合し、グローバルな転写抑制を引き起こすことが明らかになった。この転写抑制は、生殖細胞系列が体細胞の分化に巻き込まれることなく全能性を保ち続けることに必要であると考えられている。一方で、*Pem* 以外の *postplasmic/PEM* RNAs が生殖細胞系列の形成にどのように寄与するかは殆ど明らかになっていない。本研究では、生殖細胞系列における *postplasmic/PEM* RNAs の転写制御機能を明らかにすることで、同系列の体細胞からの分離に重要な役割を果たす転写抑制に代表される転写制御機構の全体像を明らかにすることを目的とした。

まず、生殖細胞系列における転写抑制に寄与する Pem 以外の因子を探索した。結果、*postplasmic/PEM* RNAs の一つ *Popk-1* を機能阻害した 16 細胞期胚の生殖細胞系列において、体細胞の運命決定に重要な *FoxD.a* が異所的に発現した。また、Popk-1 機能阻害胚では生殖細胞系列の転写抑制に必要な核での Pem タンパク質の発現量が減少した。このような胚において、同時に Pem タンパク質の強制発現を行ったところ、生殖細胞系列における異所的な *FoxD.a* の発現は消失した。よって、Popk-1 は Pem を介して生殖細胞系列での転写抑制を制御することが示唆された。先行研究から、Popk-1 機能阻害胚では、CAB における *postplasmic/PEM* RNAs の局在は正常だが、CAB の大きさが縮小し、局在する mRNA の量が減少することが明らかになっている。また、*postplasmic/PEM* RNAs は CAB で翻訳されることが示唆されている。以上より、Popk-1 は CAB の大きさの制御を通して、局在する *Pem* mRNA 量及び、タンパク質量を間接的に制御し、生殖細胞系列の転写を抑制することが示唆された。

続いて、Pem によるグローバルな転写抑制が 32 細胞期以降にどのように解除され、生殖細胞形成に必要な遺伝子の発現（胚性発現）が始まるかを調べた。まず、生殖細胞系列胚性発現の開始時期を明らかにするために、尾芽胚の

生殖細胞系列で発現することが知られている遺伝子 *Clone 45* の胚性発現開始時期を解析した。そのために、各胚発生ステージから転写阻害剤処理をし、後期神経胚まで発生させた後、その胚の生殖細胞系列での *Clone 45* の発現を観察した。結果、110 細胞期以前から転写阻害剤処理を開始した胚では生殖細胞系列での *Clone 45* の発現が観察されたが、初期原腸胚以後に処理を開始した胚では *Clone 45* の発現が観察された。以上より、生殖細胞系列では 110 細胞期～初期原腸胚期から少なくとも一つの胚性遺伝子の発現が開始することが示唆された。

次に、遺伝子 *Clone 45* の発現を指標として、生殖細胞系列での胚性発現の開始機構について調べた。Pem タンパク質は発生に伴い減少していくことが知られていたことから、発生に伴い Pem タンパク質が減少する事で転写抑制が解除される機構を予想した。そこで、Pem タンパク質を過剰発現させ、発生に伴う Pem の減少を抑えた結果、尾芽胚の生殖細胞系列での胚性発現は減少した。反対に、Pem の機能阻害を行うことで、Pem タンパク質の減少を早めた結果、*Clone 45* の胚性発現の開始のタイミングが早まった。よって、胚発生に伴う Pem タンパク質の減少は、生殖細胞系列における胚性遺伝子の発現の開始に必要十分であることが示唆された。以上より、Pem タンパク質の発現量を調節することで生殖細胞遺伝子の胚性発現の開始のタイミングが制御されることが予想された。

続いて、*postplasmic/PEM* RNAs の一つ、*Zf-1* の機能阻害胚では、生殖細胞系列の *Clone 45* の胚性発現が減少した。よって、Zf-1 は生殖細胞系列の胚性発現に必要であるということが示唆されたので、Zf-1 が Pem タンパク質の減少を介して生殖細胞遺伝子の胚性発現を開始させるかを検証した。そのために、Zf-1 機能阻害胚における Pem タンパク質の影響を調べたところ、本来は Pem タンパク質が殆ど観察されない時期である 64 細胞期において、核での Pem タンパク質の増加が観察された。さらに、Zf-1 と Pem を同時に機能阻害した結果、*Clone 45* の胚性発現が観察された。よって、Zf-1 機能阻害による *Clone 45* の胚性発現の減少は Pem タンパク質の減少が抑制されたからだと考えられた。以上より、Zf-1 は Pem タンパク質の発現を減少させることで、胚性発現を開始させることが示唆された。

本研究から、Popk-1 と Zf-1 が転写抑制因子 Pem タンパク質の翻訳レベルをそれぞれ正・負に制御し、生殖細胞系列において適切な転写制御が行われることで、生殖細胞系列の形成に寄与することが示唆された。しかし、*postplasmic/PEM* RNAs は機能未知のものが依然として多く存在し、ホヤの生殖細胞系列の形成に関する知見はその他のモデル動物と比べると乏しい。今後は更なる研究によってこれらの知見が蓄積し、ホヤと他のモデル動物との比較

によって生殖細胞系列の形成における更なる理解へ繋がることを期待したい。

欧文要旨

In many animals, germline is segregated from the somatic linage in development. Transcriptional regulation in the germline is known to play pivotal roles in germline segregation. In ascidian embryos, maternal mRNAs called *postplasmic/PEM* RNAs are localized to a subcellular structure called the Centrosome-Attracting Body (CAB), which contains the ascidian germ plasm and are inherited by the germline cells during embryogenesis. Previous studies have shown that *Pem*, a *postplasmic/PEM* RNAs member, represses somatic gene expression in the cleavage-stage germline and contributes to germline segregation. However, other mechanisms by which gene expression is regulated in the germline, in particular, by other *postplasmic/PEM* RNAs members, are largely unknown. Here, we analyzed the functions of three *postplasmic/PEM* RNAs members: *Popk-1*, *Pem* and *Zf-1* and found that 1) Popk-1 contributes to the repression of germline transcription indirectly by regulating the proper CAB formation and the amount of Pem protein produced there, 2) decreasing Pem protein level in the course of development is necessary and sufficient for the onset of zygotic germline gene expression at the gastrula stage, and, 3) Zf-1 facilitates the downregulation of Pem protein level for zygotic gene expression. Taken together, we propose that two maternally localized factors Popk-1 and Zf-1 control the Pem protein level and regulate transcription during ascidian germline formation.

第一章 序論

1．1 生殖細胞系列の形成と転写制御

多くの動物種の細胞は体細胞と生殖細胞に大別される。体細胞は個体の死とともに消滅してしまうのに対し、生殖細胞は、生殖によって次世代に遺伝情報を伝え、世代を超えて生き続けることのできる唯一の細胞である。多くの動物種において始原生殖細胞は胚発生中に形成されることが知られている。発生過程において、生殖細胞を作る細胞系譜は生殖細胞系列（germline）と呼ばれ、発生運命が生殖細胞のみに限定された細胞は始原生殖細胞（primordial germ cells, PGCs）と呼ばれる。始原生殖細胞は生殖巣へと移動し、生殖巣原基（gonad rudiment）を形成する。その後、始原生殖細胞は分化して生殖母細胞（gametocyte）になり、減数分裂を経て配偶子である卵・精子を形成するようになる。

胚発生中に始原生殖細胞が形成される動物での生殖細胞系列の形成様式は生殖質局在型（Preformation type または、Cytoplasmic inheritance type）と誘導型（Epigenesis type または、Zygotic induction type）に大別される（Extavour and Akam, 2003; Kumano et al., 2015; Swartz et al., 2015）。生殖質局在型は、ホヤ *Harocynthia roretzi* (Tomioka et al., 2002; Kumano et al., 2011) / *Ciona robusta* (Fujimura and Takamura, 2000）、アフリカツメガエル *Xenopus laevis*、(Blackler, 1962; Kloc et al., 2002)、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* (Bontems et al., 2009)、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (Illmensee and Mahowald, 1974; Lehman, 1992)、線虫 *Caenorhabditis elegans* (Kawasaki et al., 1998; Seydoux and Strome, 1999; Subramanian and Seydoux, 1999）等においてみられ、生殖質（germ plasm）と呼ばれる始原生殖細胞の形成に必要な因子が集積する特殊な細胞質が卵の中に局在する。そして、卵割に伴い生殖質を受け継ぐ細胞が始原生殖細胞に分化する。誘導型の形成様式は、マウス *Mus musculus* (Ginsburg et al., 1990; Hayashi et al., 2007）、アホロートル *Ambystoma mexicanum* (Johnson et al., 2001; Johnson et al., 2004)、コオロギ *Gryllus bimaculatus* (Ewen-Campen et al., 2012; Donoughe et al., 2014）等の胚でみられ、卵の時期に生殖質は観察されず、胚発生のある時期に細胞間誘導シグナルによって始原生殖細胞が誘導される。動物界全体で誘導型の形成様式をとる動物が多く、生殖質局在型の形成様式をとる系統はは少数派であること、海綿動物や刺胞動物等の進化の段階で早くに分岐した系統において誘導型の形成様式をとることから、誘導型が祖先的形質であると考えられており、生殖質局在型の形成様式は個々の系統で独立して獲得された形質だと考えられている（Extavour and Akam,

2003; Kumano et al., 2014）。また、誘導型の動物は系統的に離れた動物種間にあるにもかかわらず、BMP シグナル経路によって始原生殖細胞が誘導される点が共通であることに対し（Hayashi et al., 2007; Chatfield et al., 2014; Donoughe et al., 2014）、生殖質の形成に必要な因子はそれぞれの系統において新規に獲得した因子によっておこる（Ephrussi et al., 1999; Hanazawa et al., 2011; Bontems et al., 2009; Machado et al., 2005）。このことは、誘導型の形成様式が祖先型の形質であるという主張を支持する結果である。

以上のように始原生殖細胞は大きく異なる形成様式をとる一方で、いくつかの共通の特徴も存在する（Extavour and Akam, 2003）。その特徴として、①生殖細胞系列では、胚発生の一時期に全遺伝子もしくは多くの遺伝子の転写が抑制されること、②分裂が G2 期で一時的に停止すること、③Vasa, Nanos, Piwi などの生殖細胞マーカーを mRNA もしくはタンパク質として含んでいる。

多くの動物種では、生殖細胞系列は胚発生の初期に体細胞系列から分離される。この分離によって生殖細胞系列は体細胞系列の発生分化プログラムに巻き込まれないように保護され、さらに全能性（totipotency）や不死性（immortality）等の生殖細胞の特徴を保つことができると考えられている。この分離を維持し、生殖細胞系列を保護する機構として、①体細胞遺伝子の転写抑制、② 有糸分裂活性の減少、③トランスポゾンの活性の減少等が挙げられる。いずれの機構も、重要な遺伝情報がコードされている DNA に傷や変異が入るリスクを下げるための機構であると考えられている他、①については転写が活性化されている体細胞系列の分化プログラムに巻き込まれないようにするためであるとも考えられている。これらのうち、①に代表されるような胚発生期の生殖細胞系列における転写制御機構は長年の重要な研究対象となっている（Nakamura and Seydoux et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Robert et al., 2015; Strome and Updike et al., 2015）。

1．2 生殖細胞系列の転写制御に重要な母性局在因子

生殖細胞系列の形成における転写制御機構のうち、近年最も研究されている現象の一つは、体細胞系列からの分離に重要な転写抑制である。

この現象は、ショウジョウバエ、線虫（Seydoux et al., 1997）、アフリカツメガエル（Venkatarama et al., 2010）、ホヤ（Kumano et al., 2011; Shirae-Kurabayashi et al., 2011）、アメリカムラサキウニ *Strongylocentrotus purpuratus*（Swartz et al., 2014）、マウス（Saitou et al., 2002）等多くの動物種において観察されている。その中でも特に生殖質局在型の形成様式をとる動物において、初期胚における転写抑制は母性因子が制御していることが知られ

ている。その例として、ハエの Polar granule component (Pgc)、Germ cell-less (Gcl)、 Nanos (Asaoka et al., 1998; Deshpande et al., 1999; Leatherman et al., 2002; Martinho et al., 2004; Hanyu-Nakamura et al., 2008; Timinszky et al., 2008)、線虫の OMA-1/-2、PIE-1 (Batchelder et al., 1999; Zhang et al., 2003; Guven-Ozkan et al., 2008）、アフリカツメガエルの Nanos1 (Lai et al., 2010）、ホヤの Pem (Kumano et al., 2011; Shirae-Kurabayashi et al., 2011) が知られている。これらの因子のうち、ショウジョウバエの Pgc, 線虫の PIE-1、マボヤ *Halocynthia roretzi* の Pem は RNA polymerase II の転写伸長活性を制御する pTEFb (positive transcription elongation factor b）に結合することで転写抑制することが知られている（Hanyu-Nakamura et al., 2008; Batchelder et al., 1999; Kumano et al., 2011）。カエルの Nanos1 についても RNA Polymerase Ⅱの転写伸長活性を制御することが示唆されているが、分子メカニズムについては不明である（Lai et al., 2010）。これらの抑制メカニズムは RNA polymerase Ⅱの制御を介することから、グローバルな転写抑制であると考えられている。ただし、Pgc, PIE-1, Pem の三者の間にはアミノ酸配列の共通性は見られない。マボヤの Pem には既知のドメイン構造はなく、そのホモログはホヤ以外では検出されない。よって、これらはそれぞれその系統で独立に進化したと考えられている（Kumano et al., 2011）。

体細胞遺伝子の転写を抑制するメカニズムとしては、RNA polymerase Ⅱによる転写産物の伸長を制御するメカニズムの他に、クロマチン修飾によるエピジェネティックな制御が知られており、ショウジョウバエや線虫では Pgc や PIE-1 による転写抑制の後、エピジェネティックな転写抑制に切り替わることが報告されている（Nakamura and Seydoux, 2008; Strome and Updike, 2015）。ショウジョウバエでは、Pgc による転写抑制機構が機能している時期および Pgc タンパク質が分解された時期において、転写の指標となるヒストン H3K4 のメチル化は生殖細胞系列の核において観察されず、Pgc タンパク質が分解された後も、遺伝子の発現はほとんど抑制されたままである（Martinho et al., 2004; Van Dren et al., 1998; Zalokar, 1976）。この H3K4 のメチル化の抑制には Nanos が必要であると考えられている（Schaner et al., 2003）。一方で、線虫では PIE-1 による抑制が解除された後、生殖細胞系列の核において、転写の指標であるヒストン H3K4 のメチル化および、ヒストン H4K8 のアセチル化活性が消失する（Schaner et al., 2003; Checchi and Kelly et al., 2006）。また、転写抑制の指標であるヒストン H3K27 のトリメチル化は初期胚のすべての細胞の核で観察されるが、PIE-1 による抑制が解除された後は生殖細胞系列のみにおいてトリメチル化修飾が維持される（Bender et al., 2004）。変異体の解析から、H3K4 のメチル化の抑制には Nanos が必要であ

ること（Schaner et al., 2003）、H3K27 トリメチル化の維持には MES-2, MES-3, MES-6 が必要であることが知られている。

このように、母性局在因子による生殖細胞系列での体細胞系列遺伝子の転写抑制機構はハエや線虫等のモデル動物において詳しく研究されている。しかし、グローバルな転写抑制は胚発生の進行とともに解除され、生殖細胞系列の形成に必要な遺伝子の発現（胚性遺伝子の発現／転写）が開始するが、そのスイッチングに関わる機構についてはほとんど解析されていない。また、転写を正に制御する母性局在因子の候補として、ハエのOVOが唯一同定されているのみである。OVOは転写因子であり、生殖細胞系列で発現する遺伝子の転写を促進すること、体細胞系列遺伝子の発現を抑制することが示唆されている（Yatsu et al., 2008; Hayashi et al., 2017）。さらに、生殖細胞系列における転写抑制が解除されると、生殖細胞系列遺伝子の発現が開始するが、体細胞系列遺伝子の転写は抑制された状態が保たれる。しかし、どのようにして体細胞系列遺伝子と生殖細胞系列遺伝子の転写調節が区別されるのかについては殆ど研究されていない。

一方で、誘導型の形成様式をとるマウスにおいても、体細胞系列遺伝子の転写が抑制されることが知られている（Saitou et al., 2002）。BMP シグナルによる誘導によって生じた始原生殖細胞では、ヒストン H3K9 の脱メチル化、RNA Polymerase Ⅱの転写伸長活性の抑制、ヒストン H3K27 のメチル化が起こることにより、体細胞系列遺伝子の転写が抑制される。特に、ヒストン H3K27 のメチル化は、Blimp1、Prdm14、AP2γによって制御されており、またこれらの因子は生殖細胞系列の遺伝子の転写を促進する転写因子でもあることが知られている（Ohinata et al., 2005; Kurimoto et al., 2008; Yamaji et al., 2008; Weber et al., 2010）。

以上のことから、生殖質局在型・誘導型の形成様式に関わらず、生殖細胞系列の形成には厳密な転写調節機構が重要であることが伺える。

1．3 ホヤ胚における生殖細胞系列形成の特徴と*postplasmic/PEM* RNAs

ホヤは脊索動物門尾索動物亜門（もしくは脊索動物上門尾索動物門）ホヤ綱に分類され（Satoh et al., 2014）、脊椎動物の姉妹群に属する動物である。成体は脊索を持たないが、幼生期は脊索及び背側神経管等の脊索動物固有の特徴を有している（Satoh, 1994; Kumano and Nishida, 2007; Lemaire and Pitte, 2016）。ホヤは、①胚発生が早く、②細胞系譜が詳細に記されており（Nishida, 1987; Hotta et al., 2007）、③発生に個体差がないこと、④幼生の細胞数が3000個程度と少ないため（Yamada and Nishida, 1999）、1細胞レベルでの解析が可能であり（Kumano and Nishida, 2007）、⑤顕微操作が容易で、

⑥近年、ゲノム配列情報が明らかになったこと（Satou et al., 2005; Tassy et al., 2010; Borozovic et al., 2015; Borozovic et al., 2017）などの理由から、発生生物学のモデル動物として重要視されている。
ホヤの生殖細胞系列は、Fig. 1 A-Hの濃紫色で示す細胞である。ホヤの生殖細胞系列は、卵割期では植物半球の後極末端に存在し、3回の連続する不等分裂により生じるという特徴がある（Fig. 1 A-F）。例えば、16細胞期の生殖細胞系列B 5.2 (Fig. 1 C) は不等分裂し、32細胞期においては後方末端に位置するより小さい生殖細胞系列B 6.4と、より大きい姉妹体細胞系列のB 6.3に分かれる（Fig. 1 D）。胚発生が進行すると、原腸陥入に伴い、生殖細胞系列の細胞は体の内側へ移動し、神経胚期においては腹側の正中線上の後方末端に（Fig. 1 G）、尾芽胚においては尾の先端に存在するようになる（Fig. 1 H）。この細胞がホヤの生殖細胞系列であると考えられている根拠として以下の事が挙げられる。①これら細胞では転写が抑制されていること（Tomioka et al., 2002; Kumano et al., 2011; Shirae- Kurabayashi et al., 2011）、②細胞分裂が胚発生中の一定期間停止すること（Nishida, 1987; Shirae-Kurabayashi et al., 2006）、③生殖質様の構造を含むCentrosome-Attacting body (CAB) とよばれる細胞内構造が存在すること（Hibino et al., 1998; Iseto and Nishida, 1999）、④生殖細胞マーカー*Vasa* mRNAが発現すること（Fujimura and Takamura, 2000; Takamura et al., 2002; Makabe and Nishida, 2012）、⑤カタユウレイボヤ（*Ciona robusta*）胚を用いた生殖細胞系列B 7.6の追跡の結果、幼若体の生殖巣原基の中に移動することが確認されている（Shirae-Kurabayashi et al., 2006）点が挙げられる。

CABには、ホヤの母性局在mRNA群である*postplasmic/PEM* RNAs が局在する（Sardet et al., 2005; Prodon et al., 2007; Makabe and Nishida, 2012）。興味深いことに、*postplasmic/PEM* RNAs はホヤ唯一の母性局在mRNA群であり、全て同じ局在パターンを示す。*postplasmic/PEM* RNAsはカタユウレイボヤでは39種類、マボヤでは14種類の遺伝子が同定されている（Sardet et al., 2005; Prodon et al., 2007; Makabe and Nishida, 2012）。*postplasmic/PEM* RNAsはホヤの胚発生において極めて重要なmRNA群である。これらのmRNAは胚後方に局在することから想像できるように、後方組織の形成に関わることが知られている。例えば、その一つである*Macho-1*は転写因子をコードしており、筋肉決定のマスター遺伝子である（Nishida and Sawada 2001; Sawada et al., 2005）他、後方組織である間充織の形成にも重要である（Kobayasi et al., 2003; Imai et al., 2003; Tokuoka et al., 2005）。また、*Pem*は胚後方に特徴的な不等分裂に必要である（Negishi et al., 2007）。これらの他にも、*Popk-1*の翻訳産物はCABの形成に必要であることが知られている（Nakamura *et al.,*

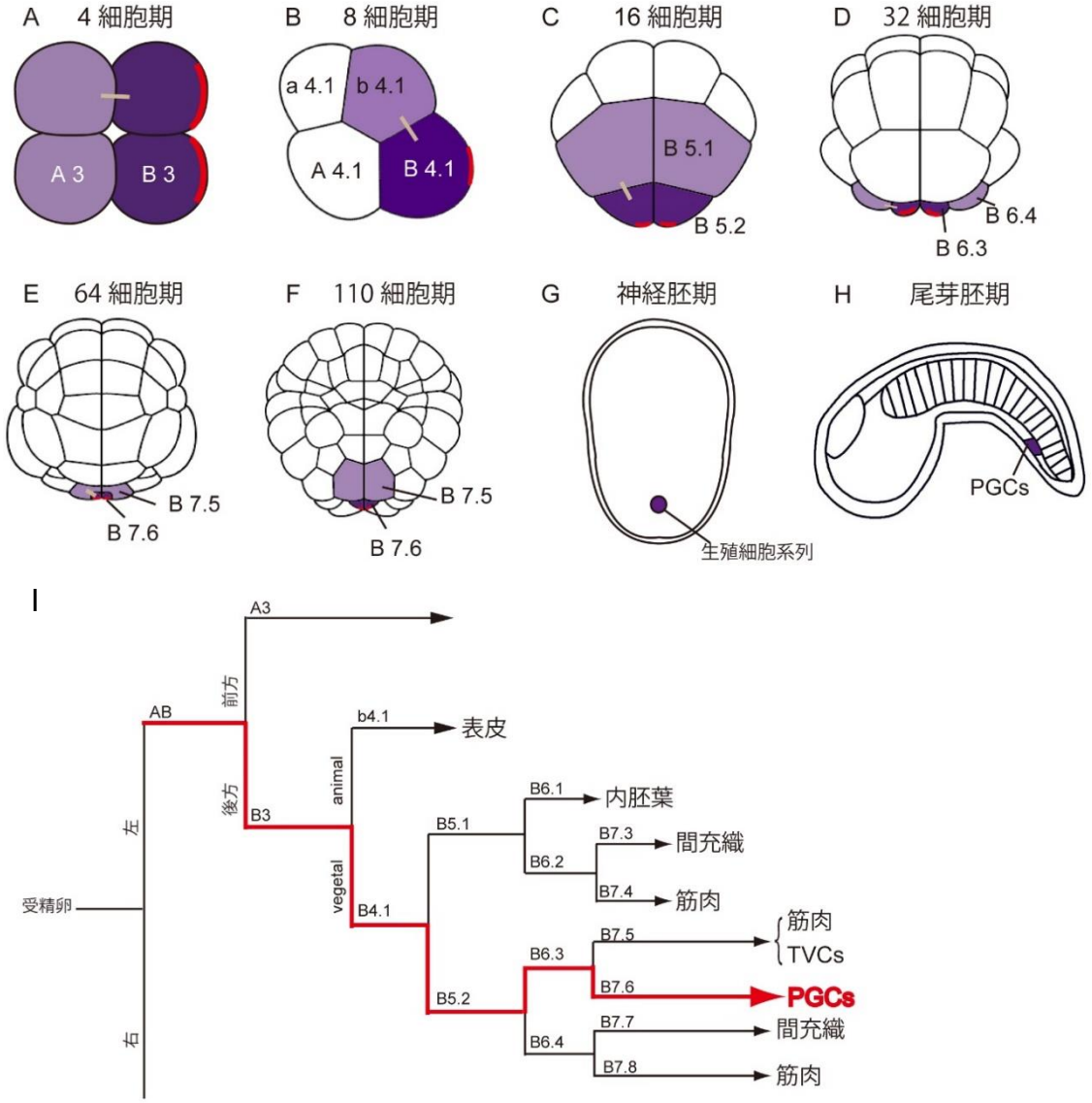

Fig.1 マボヤ胚生殖細胞系列の細胞系譜

8 細胞期（B）と尾芽胚（H）は胚を横から、4 細胞期（A）及び 16 細胞期から神経胚まで（C-G）は植物極側から見た図である。4 細胞期と尾芽胚は左が胚の前方、右が後方、残りは上が胚の前方、下が胚の後方である。卵割期では生殖細胞系列の割球（濃紫）は植物半球の後極末端に存在する。生殖細胞系列の細胞は細胞分裂によって生殖質（赤）を受け継ぐ生殖細胞系列と体細胞系列（薄紫）に分かれる（A-E）。その後原腸陥入を経て体の内側に移動し、尾芽胚（G）では尾部の末端に始原生殖細胞（PGCs）が存在するようになる。卵割期の生殖細胞系列とその姉妹体細胞は線で結んでいる。赤は生殖質と同時に *posiplasmic/ PEM* RNAs の局在場所を示している。(I) 生殖系列を細胞系譜図で表したもの。赤線が生殖細胞系列である。PGCs; 始原生殖細胞、TVCs; 体幹部腹側細胞。

2005）。しかしながら、*postplasmic/PEM* RNAsは生殖質（CAB）に局在するという特徴があるにも関わらず、生殖細胞系列の形成における機能について明らかになっているものは前述の通り*Pem*のみである。

1. 4 本研究の目的と概要

Pemは生殖質局在型を示す新口動物ではじめて転写抑制に関わる母性因子として同定され、それによる転写抑制の分子メカニズムが明らかになった因子である。ホヤを用いることでPemを足掛かりにして、生殖細胞系列における転写制御の全体像を明らかにできる可能性がある。本研究では、*postplasmic/PEM* RNAsのなかで、生殖細胞系列の形成に重要な転写調節機構に関与する因子の探索と機能解析をすることで、その一端を明らかにすることを目的とした。

その結果、①*Popk-1* は正常な CAB の形成を介して、*Pem* mRNA を局在させ、転写抑制に十分な量の Pem タンパク質の翻訳を促すことで、生殖細胞系列における体細胞遺伝子の転写抑制に寄与すること、②胚発生に伴う Pem タンパク質の減少が生殖細胞系列における遺伝子の胚性発現に必要十分であること、③ *Zf-1* (Nakamura et al., 2003; Sasakura et al., 2010）が、Pem タンパク質の発現を減少させることで胚性発現の開始に寄与することが示唆された。

以上のことから、転写抑制因子 Pem は生殖細胞系列における体細胞系列遺伝子の異所的な発現を抑制するだけでなく、生殖細胞系列における胚性発現の開始も制御していることが明らかになった。そして、Popk-1、Zf-1 が Pem タンパク質の発現量をそれぞれ正・負に制御することによって生殖細胞系列の転写制御に関与することが明らかになった。

第二章 材料と方法

2. 1 動物

本研究では、脊索動物門尾索動物亜門（または脊索動物上門尾索動物門）ホヤ綱マボヤ亜目に分類されるマボヤ *Halocynthia roretzi*を用いた。青森県陸奥湾にて自然生息している個体、もしくは陸奥湾及び岩手県大槌湾で養殖された個体を用いた。マボヤは放卵・放精を抑えるために低温（8℃）、恒明条件下で常時飼育した。実験の際には、海水温を11~13℃に上昇させ、恒暗条件下で4～8時間飼育した後、恒明条件に切り替えることによって放卵・放精を促した。マボヤは雌雄同体であるが、自家不和合性を持つため、異個体由来の卵と精子を混ぜ合わせ、人工授精させた。受精卵は濾過海水に移し、9～13℃で発生させた。濾過海水は自然海水を孔径0.45 µm/mのニトロセルロース膜（Millipore）を用いて濾過滅菌し、50 mg/Lのストレプトマイシン硫酸塩（Sigma）と50 mg/Lのカナマイシン硫酸塩（Wako）を加えたものを使用した。

2. 2 Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

目的のmRNAの発現時期・場所を調べるために、Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) によって*FoxD.a* (Harore.CG.MTP2014.S128.g04021 in the Aniseed database, https://www.aniseed.cnrs.fr/; Kumano et al., 2006）、*Pem* (Harore.CG.MTP2014.S480.g14149; Nishida and Sawada et al., 2001）、*Clone 45* (Harore.CG.MTP2014.S737.g07016）のmRNAの発現を検出した。*Clone 45*は*ADT/ATP translocase* (*ATL1*) をコードしている遺伝子である（Miya et al., 1994）。*Clone 45*プローブはマボヤESTデータベースであるMAGEST (Makabe et al., 2001; http://magest.hgc.jp/) のFE107G06のクローンプラスミドをテンプレートとして、digoxigenin (DIG) 標識したアンチセンスRNAを合成することで用意した。手順としては、テンプレートとなるプラスミドをNot I で直鎖化し、T7 RNA polymeraseⅡ（Roche）によって合成した。WISHのプロトコールはWada et al., 1995に従った 。WISH後、80% Glycerol in PBSにマウントし、実体顕微鏡SZX16 (Olympus) もしくは正立顕微鏡BX-51 (Olympus)で観察した。

2. 3 アクチノマイシンD処理

転写の抑制をするために、転写阻害剤であるアクチノマイシンD処理（Sigma）を行った。64細胞期から中期神経胚までの各ステージから40 µg/mlのアクチノマイシンD処理を開始した。コントロール胚（アクチノマイシンDの溶媒であるDMSOを含む海水で発生させた胚）が後期神経胚まで発生した時点

で、WISH用に、4%パラフォルムアルデヒドを含んだFix buffer (0.5 M NaCl, 0.1 M MOPS (pH 7.5)) を用いて、4℃、16時間固定した。別種のホヤ *Phallusia (Ascidia) nigra*において、20 µg/mlの濃度でアクチノマイシンD処理をすることによって、uridineの取り込みを70% 抑制すること、取り込まれなかった30%は低分子のRNAであることが報告されている（Smith, 1967）。また、マボヤにおいても、20 µg/mlの濃度のアクチノマイシンD処理によって、アセチルコリンエステラーゼ、Myosin heavy chain, Epidermis-specific antigenの転写が十分阻害されることが知られている（Satoh and Ikegami, 1981; Nishikata et al., 1987a,b）。

2. 4 *in vitro* mRNAの合成と強制発現実験

Pem mRNA と *LacZ* mRNA は、プラスミド Pem in pBluescriptHTB(N)および、pSP6nußGal をテンプレートにして mRNA 合成を行った。*Zf-1* (Harore.CG.MTP2014.S839.g14521; Sasakura et al., 2000）の強制発現コンストラクト Zf-1 in pBluescriptHTB (N)は、以下の通りに作成した。まず、MAGEST の FE201N08 のクローンプラスミドをテンプレートとして Zf-1 の Open Reading Frame (ORF) と 1652 bp の 3' UTR 領域を PCR 法を用いて増幅した。その際に、Forward primer として制限酵素 Sma1 の認識サイト (CCCGGG) とコザック配列（CCACC）、および Zf-1 の翻訳開始点から+1 ~ +16 bp の配列をカバーしたプライマー、5'- CGCCCGGGCCACCATGGGAATTCCACCAC -3'を、Reverse primer として、制限酵素 Pst1 の認識サイト（CTGCAG）および、翻訳開始点から+3497~ +3516 の領域（ACATTTGTGTGTGATAATAA）をカバーした領域を含む配列の相補的配列である 5'- CGCTGCAGTTATTATCACACACAAATGT -3'を用いた。得られた PCR 断片を Sma1 と Pst1 で切断し、同じ酵素で直鎖化した pBluescriptHTB(N)にサブクローン化することによって得た。

Pem および Zf-1 コンストラクトは Not- I で直鎖化したのち、T3 mMassage mMachine kit (Ambion) を用いて mRNA 合成を行い、LacZ コンストラクトは Xho-1 で直鎖化したのち、SP6 mMassage mMachine kit (Ambion) を用いて mRNA 合成を行った。その後、Poly (A) Tailing kit (Ambion) により poly A 付加を行った。

Pem mRNA および*LacZ* mRNAは0.1 µg/µlの濃度に希釈し、受精卵もしくは16細胞期の左右両側の生殖細胞系列（B 5.2）に細胞の1/5 ~ 1/4径の量を顕微注入することにより、Pemタンパク質の強制発現実験を行った。なお、顕微注入によるB 5.2の子孫細胞の生死は、mRNA同時に顕微注入した蛍光色素ファストグリーンの赤色蛍光観察によって確認し、尾芽胚の時点でファストグリー

ンの蛍光が始原生殖細胞系列としての正しい位置に観察される胚のみを用いて解析を行った。*Zf-1* mRNAは後述の*Zf-1* MOと受精卵に共注入した。

2. 5 モルフォリノアンチセンスオリゴの顕微注入

Popk-1 (Harore.CG.MTP2014.S69.g03049) 、Pem、Zf-1の機能を抑えるために、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO, Gene Tool社) を用いた。そのために、受精卵に*Popk-1* MO (Nakamura et al., 2005) を1000 pg、*Pem* MO (Negishi et al., 2007) を100 pg、*Zf-1* MOを350 pgもしくは200 pg注入した。*Zf-1* MOの配列は、Zf-1の翻訳開始点から−25~−1bpの5' UTR領域 (5'-TCTCTGCTTTTTTGTTATTCCTTGC-3') をカバーした5'-GCAAGGAATAACAAAAAAGCAGAGA-3'である。また、*Zf-1* MOの特異性を検証するために、*Zf-1* MO 100 pgと*Zf-1* mRNA 200 pgを卵に顕微注入した。このとき使用した*Zf-1* mRNAは*Zf-1 MO*がカバーする領域である−25~−1bpの5' UTR領域をふくまないため、Zf-1 MOが注入したZf-1 mRNAの翻訳を阻害することはない。それぞれのコントロールとして、Gene Tools社のstandard MO (5'-CCTCTTACCTCAGTTACCATTTATA -3')を注入した。

2. 6 Pemタンパク質に対する免疫染色

Pem タンパク質の検出を行うために Pem の免疫染色を行った。プロトコールは Kumano et al., 2011 を基本に、以下のような改良を加えた。即ち、使用する抗 Pem ポリクローナル抗体 (ウサギ) 25 倍希釈を 450 倍もしくは 750 倍希釈に、胚の洗浄に用いる PBS, 0.05% Triton X-100 を PBS, 0.1% Triton X-100 に変更し、バックグラウンドを下げるための NH_4Cl 処理の後に PBS, 1% Triton X-100 で 10 分の界面活性剤処理をするように工程を加えた。染色を終えた試料は PBS, 0.1% Triton X-100 で洗浄した後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES 社) でマウントし、BX51 蛍光顕微鏡 (Olympus)を用いて観察した。

第三章 結果

3. 1 Popk-1 は生殖細胞系列における転写抑制に寄与する。

マボヤ胚の生殖細胞系列における転写調節機構については、*postplasmic /PEM* RNAs の一つである Pem が体細胞系列の運命決定に関わる因子のうち、調べた限り全ての転写を抑制する因子であることが明らかになっている (Kumano et al., 2011) 。マボヤの生殖細胞系列での転写制御の全体像に迫るために、まず、胚発生初期の生殖細胞系列における転写抑制を制御する Pem 以外の因子の探索を行った。Pem 機能阻害胚の生殖細胞系列では、*FoxD.a* 等の体細胞の運命決定に重要な転写因子の異所的な発現が観察されることが知られているので、解析の際は生殖細胞系列において異所的な *FoxD. a* の発現が観察されるかを指標とした。

先行研究から、*postplasmic/PEM RNAs* の一つである Popk-1 を機能阻害した胚において、CAB のサイズが縮小し、CAB に局在する *postplasmic/PEM* RNAs の量が減少することが明らかになっている（Nakamura et al., 2005）。また、Pem 等の *postplasmic/PEM* RNAs は CAB において翻訳されることが示唆されている（Paix et al., 2011）。これらのことから、Popk-1 は正常な CAB の形成を促し、生殖細胞系列での転写抑制因子である Pem タンパク質の翻訳の場を形成することを介して、転写抑制を行う可能性が考えられたので、Popk-1 について解析を以下の通りに行った。

まず、*Popk-1* MO を 1000pg 顕微注入することで目的の遺伝子の機能阻害を行った受精卵を、16 細胞期まで培養したのちに WISH 用に固定し、*FoxD.a* の WISH を行った。その結果、*Popk-1* MO を 1000pg 顕微注入した胚では、24% (n=38) の胚において、B 5.2 において異所的な *FoxD. a* の発現が観察された (Fig. 2 A ,B, E) 。なお、注入する *Popk-1* MO の量を 1500 pg に上げると、95% (n=19) の胚において、B 5.2 の異所的な *FoxD. a* の発現が観察される胚が観察された（熊野らの未発表データ）。このことから、Popk-1 もまた、Pem による転写抑制が起こる時期にこの転写抑制に必要であることが示唆された。Popk-1 はリン酸化酵素である。

以上のことから、Popk-1 は正常な CAB の形成を促し、生殖細胞系列での転写抑制因子である Pem タンパク質の翻訳の場を形成することで、生殖細胞系列における転写抑制に働く十分量の Pem タンパク質を提供するという仮説が立てられた。

そこで、Popk-1 を機能阻害した胚を 16 細胞期の時点で固定し、Pem タンパク質の免疫染色を行った。control MO を 1000 pg を注入した胚では、生殖細胞系列 B 5.2 の核において Pem タンパク質の発現が観察された（Fig. 2 F, 白

矢印）。一方、*Popk-1* MO を 1000 pg 注入した胚では、生殖細胞系列 B 5.2 の核における Pem タンパク質の発現レベルが減少した（Fig. 2 G, 白矢印）。先行研究より、核の Pem タンパク質が転写抑制に関わることが知られていることから（Kumano et al., 2011）、Popk-1 機能阻害胚では転写抑制に必要な Pem タンパク質が減少しているといえる。また、CAB 上のシグナルも減少し

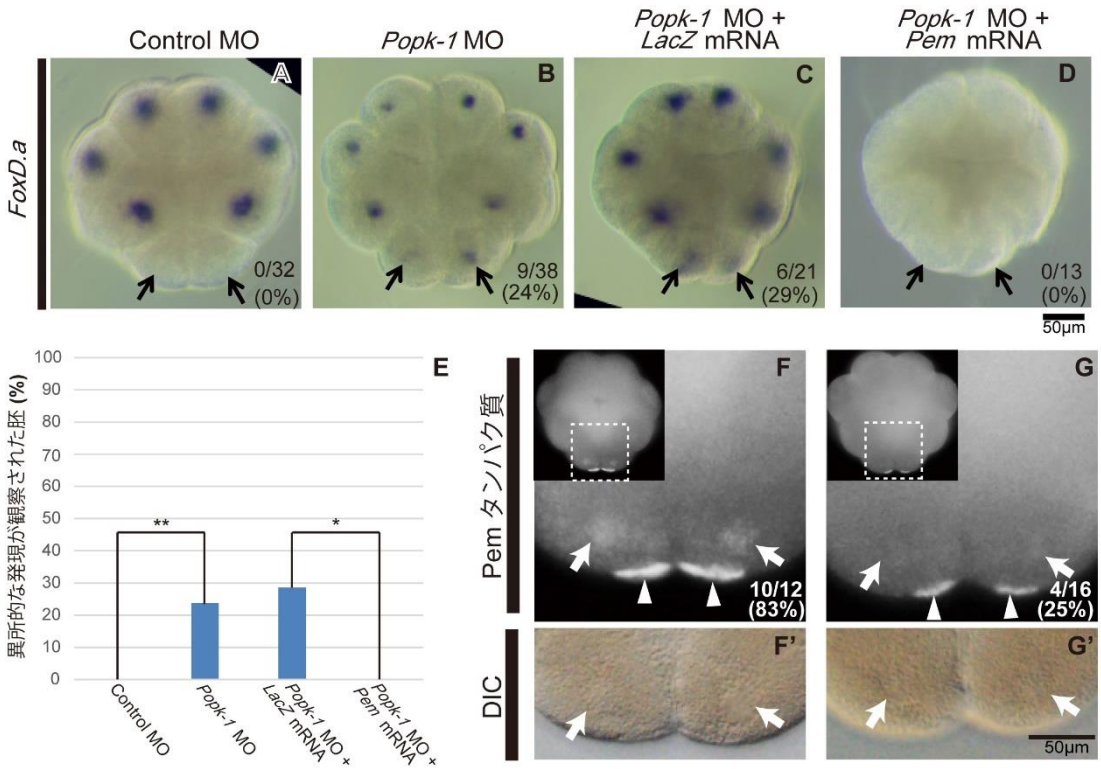

Fig.2 生殖細胞系列の転写抑制における POPK-1 機能阻害の影響

Popk-1 MO を受精卵に顕微注入することで機能阻害を行ったところ、生殖細胞系列において体細胞系列遺伝子 *FoxD. a* の異所的な発現が観察された（B、矢印）。また、*Popk-1* MO と *Pem* mRNA の共注入した胚においては異所的な発現が消失した（D、矢印）。黒矢印は生殖細胞系列を指している。E は A-D の胚の生殖細胞系列（B 5.2）において異所的な *FoxD. A* の発現が観察された胚の数の割合を示している。**はフィッシャー正確確率検定を行い、片側検定において P<0.01 の有意差が、*は P<0.05 の有意差が見られたことを示している。

Pem タンパク質は 16 細胞期の生殖細胞系列の核（矢印）と CAB（矢尻）において検出される(F)。Popk-1 機能阻害胚においては核における Pem タンパク質の発現レベルが減少した(G)。下段は F, G と同じ焦点面の DIC 画像であり、矢印は核の位置を示している(F', G')。同じ焦点面で G'では核に焦点を合わせているので、G で核の Pem タンパク質のシグナルが減少しているのは、焦点が核から外れていることが原因ではない。

図の胚は全て植物極側から撮影し、上が胚の前方、下が胚の後方である。F, G においては左上が全胚像で、破線で囲んだ部分の拡大図を示している。スケールバーは 50 μm である。各胚の図の右下には、生殖細胞系列において *FoxD. a* の異所的な発現が見られた胚の数と割合（A-D）と、生殖細胞系列の核において Pem タンパク質のシグナルが観察された胚の数と割合（F, G）を示している。

ていることから（Fig.2 F, G, 白矢尻）、先行研究の結果通り CAB の大きさが縮小し、翻訳されたであろう Pem タンパク質量自体が減少していることが分かる。

次に、Popk-1 の転写抑制機能が Pem を介しているか否かを確かめるために、Popk-1 の機能阻害によって Pem タンパク質量が減少した胚において、Pem タンパク質の強制発現を行い、Pem タンパク質量を増やしたときの *FoxD.a* の異所的な発現への影響を調べた。*Popk-1* MO 1000 pg と *Pem* mRNA 50 pg の共注入を行ったところ、16 細胞期の生殖細胞系列での *FoxD.a* の異所的な発現は消失し、また体細胞系列での遺伝子発現も消失した（Fig.2, C-E)。

以上の結果から、Popk-1 は、正常な CAB の形成を促すことで、CAB で翻訳され、転写抑制に働く十分な Pem タンパク質量を確保して生殖細胞系列における転写抑制を確実なものとすると考えられる。

3. 2 生殖細胞系列における胚性発現開始時期

胚発生初期における生殖細胞系列でのグローバルな転写抑制は胚発生の進行に伴い解除され、生殖細胞の形成に必要な遺伝子の転写（胚性発現; zygotic expression）が開始する。多くの動物種において生殖細胞系列における胚性発現がどのようなメカニズムで開始するかについては不明な点が多い。先行研究では、マボヤの*Pem* mRNA発現量は発生が進むにつれて減少し、Pemタンパク質もまた、発生が進むにつれて減少することが知られている（Fig. 3;

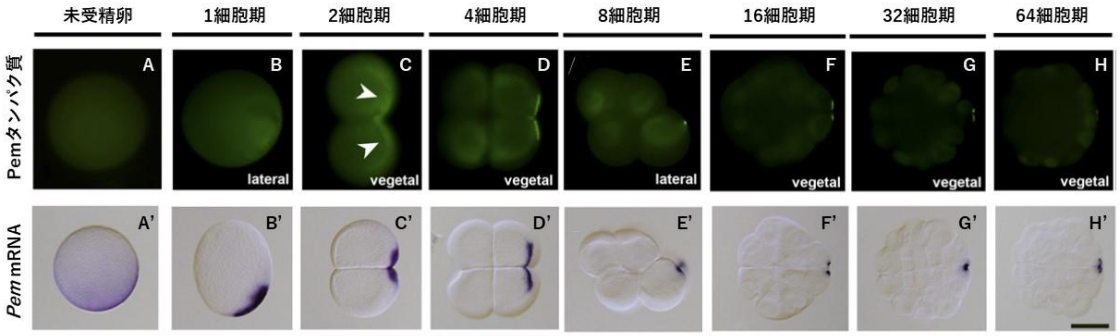

Fig. 3 胚発生におけるPemタンパク質と*Pem* mRNAの発現の変化（Negishi et al., 2007より引用）

未受精卵～64細胞期における各胚発生ステージでのPemタンパク質（A-H）および、*Pem* mRNA (A'-H') を、免疫染色もしくはWISHを用いて検出している。Pemタンパク質は2細胞期以後のCABにおいて観察され（C-H）、*Pem* mRNAは1細胞期の胚の後方の細胞質で（B'）、2細胞期以後はCABで観察される（C'- H'）。発生の進行に伴い、Pemタンパク質、*Pem* mRNAの発現シグナルの強さが減少することが観察される。

Negishi et al., 2007）。このことから、発生が進むにつれてPemの発現量が減少することで転写抑制が解除され、胚性発現が開始する可能性を考えた。
上記の可能性を検証するためにまず、解析の指標となる、生殖細胞系列における胚性発現のマーカー遺伝子の探索を行った。マボヤ EST データベース MAGEST に登録されている遺伝子のうち、20 種類が尾芽胚の始原生殖細胞で発現が見られることが知られている（Makabe et al., 2001）。そのうち、*Clone 45* と呼ばれる遺伝子が尾芽胚の始原生殖細胞で特に強い発現を示すことから、*Clone 45* を本研究で用いた（塙 2005 年 卒業研究）。*Clone 45* の WISH を中期原腸胚から中期尾芽胚までの各発生ステージで行った。結果、*Clone 45* は初期神経胚以後のステージの胚における始原生殖細胞（Fig 4D-H, 矢印）と間充織（Fig 4D-H, 矢尻）で発現が観察された。しかしながら、神経板期以前のステージでは母性由来と考えられる発現が始原生殖細胞の周辺に検出されるため、始原生殖細胞での発現の有無が判定できず、どのステージから *Clone 45* の胚性発現シグナルが検出されるのかを特定することができなかった（Fig. 4 A-C）。

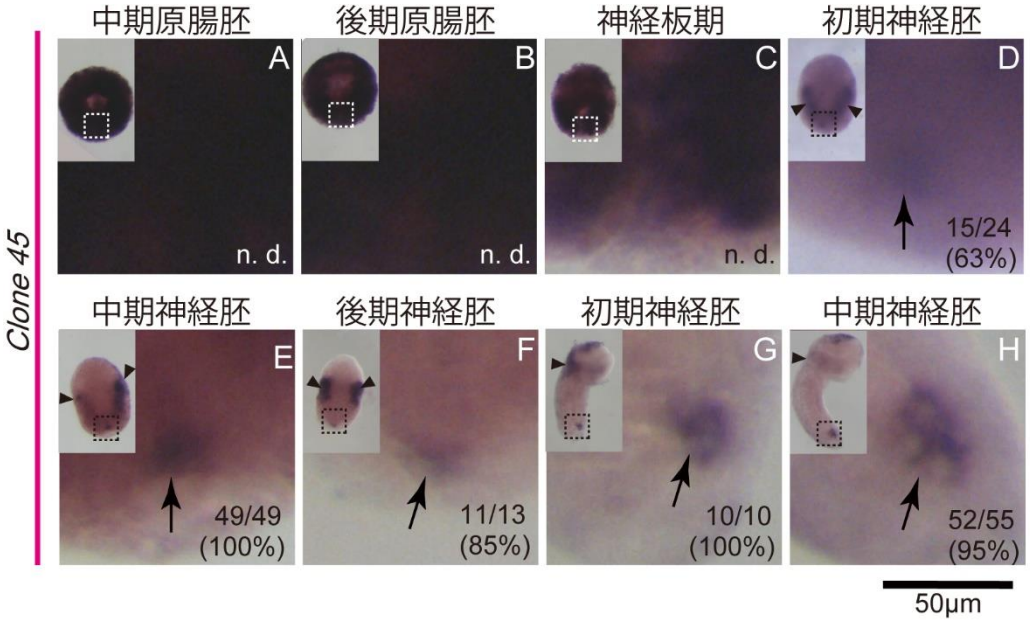

Fig.4　各発生ステージの生殖細胞系列における *Clone 45* の発現

中期原腸胚から中期尾芽胚までの胚において *Clone 45* の WISH を行った。初期神経胚以後において生殖細胞系列発現が観察されたが（D-H, 矢尻）、神経板期以前では母性由来の mRNA によると考えられる染色の存在により、生殖細胞系列で発現しているかを判別することができなかった（A-C）。左上が胚の全胚像で、破線で囲んだ部分の拡大図を示している。図は全て上が胚の前方、下が後方である。中期・後期原腸胚は植物極側から見た図、神経板期～後期神経胚は腹側から、初期・中期尾芽胚は横側から観察した。スケールバーは 50 μm、各図の右下には生殖細胞系列発現が観察された胚の数と割合を示す。左上全胚像内の矢尻は間充織における染色を示している。生殖細胞系列での発現かどうかを判別できなかった胚は n.d. (not determined) と表記した。

そこで、*Clone 45*の転写開始時期を調べるために転写阻害剤アクチノマイシンDを用いた以下の実験を行った。110細胞期から中期神経胚までの各発生ステージから40 µg/mlのアクチノマイシンD処理を始め、そのステージ以降に開始する転写を阻害した。アクチノマイシンD処理をしてもそれまでに蓄積されていたmRNAを使って、しばらくは細胞分裂と形態変化は続いていく。その後、母性mRNAの残存がほとんど見られなくなる後期神経胚相当の時期まで発生させた後、固定し、これらの胚の*Clone 45*の発現をWISHにより調べた(Fig. 5)。結果、未処理胚と神経板期からアクチノマイシンD処理をした胚においては、95%以上の胚（神経板期 n=62; 初期神経胚 n=78; 中期神経胚 n=66; 未処理胚; n=118, Fig.5 F-I）で、生殖細胞系列における*Clone 45*の明瞭な発現が観察された。初期原腸胚から後期神経胚においてアクチノマイシンD処理をした胚においては、65%以上の胚で生殖細胞系列での*Clone 45*シグナルが観察されたが、(初期原腸胚 n=50; 中期原腸胚 n=58; 後期原腸胚; n=66, Fig.5 C-E) 神経板期以後に処理を開始した胚と比べて弱い*Clone 45*シグナルを示す胚の割合が増加した（Fig. 5 J）。しかし、110細胞期からアクチノマイシンD処理を開始した胚において明瞭な発現が観察された胚は12% (n=34) であった（Fig.5 B）。

以上のことから、① *Clone 45* の生殖細胞系列における発現は胚性発現をともなっていること、② アクチノマイシン D の効果がすぐに現れるとすると、*Clone 45* の胚性発現の開始時期は 110 細胞期～初期原腸胚の間であることが示唆された。よって、これ以降、*Clone 45* を生殖細胞系列における胚性発現マーカーとして用いることにした。

3. 3 Pem タンパク質の減少が生殖細胞系列の胚性発現に必要十分である。

次に*Clone 45*を用いてマボヤにおける胚性発現開始機構を調べた。すなわち、Pemタンパク質が減少することにより胚性発現が始まるという仮説の検証を行った。そのためにまず、Pemの強制発現を行い、発生に伴うPemタンパク質の減少を抑制することによって、胚性遺伝子の発現が抑制されるか否かを観察した。16細胞期の左右両方の生殖細胞系列の細胞B5.2 (Fig.1 C) に*Pem* mRNAを顕微注入し、中期尾芽胚まで発生させ、*Clone 45*のWISHを行った。このとき、顕微注入マーカーの観察によりB5.2の子孫細胞が確かに生き残っている胚を用いて解析を行った（2. 4参照）。コントロールとして*LacZ* mRNAを注入した胚では始原生殖細胞で明瞭な*Clone45*の発現が観察されたが（Fig. 6 A, 82%, n=28）、Pem過剰発現胚では生殖細胞系列における明瞭な*Clone45*のシグナルを示す胚は減少した(Fig. 6 B, 24%, n=21）。このことから、胚発生に伴いPemタンパク質が減少することが、生殖細胞系列での胚性遺伝子発現にと

って必要であることが示唆された。

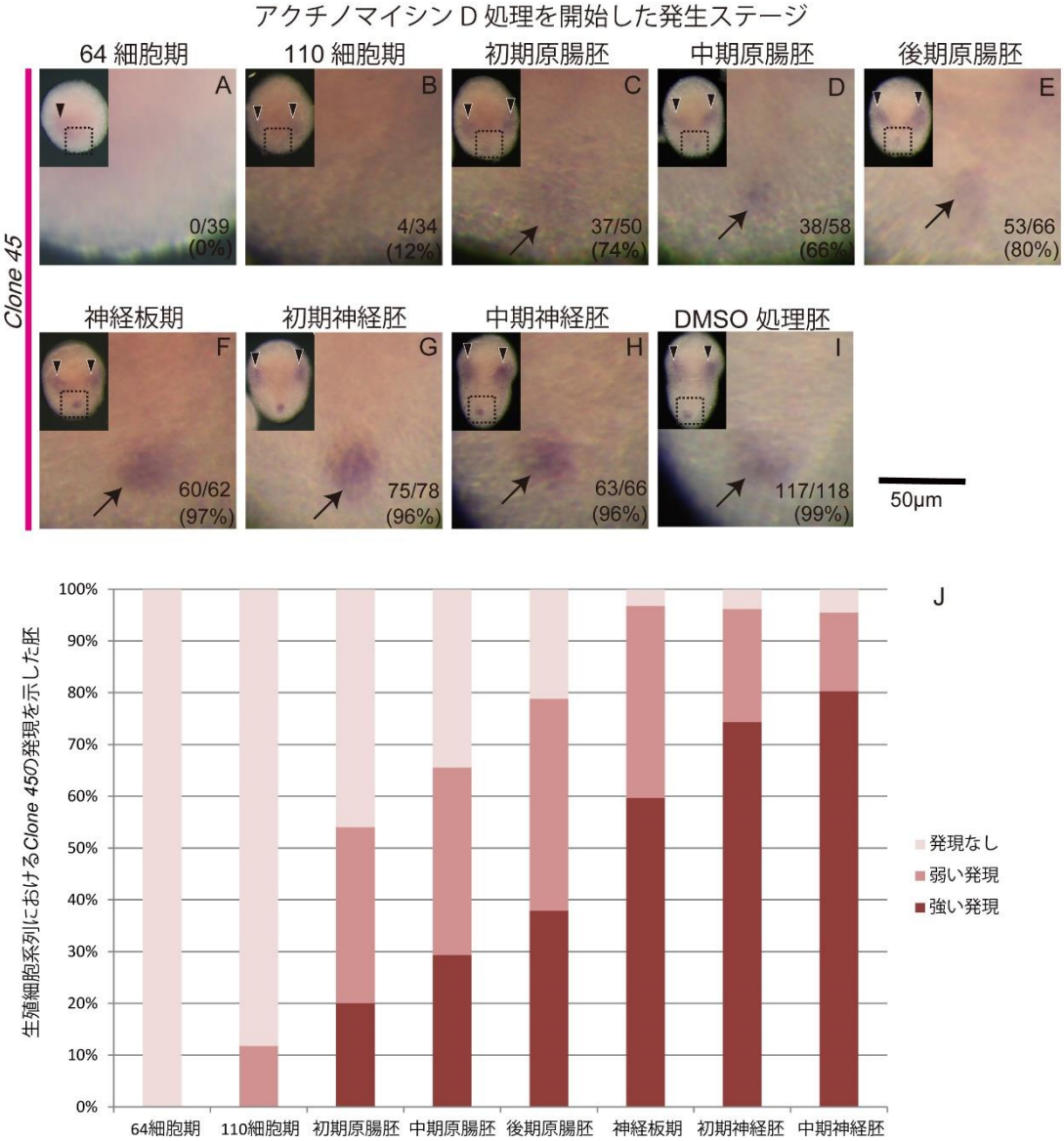

Fig. 5 アクチノマイシン D 処理胚における *Clone 45* の発現

64 細胞期から中期神経胚までの各発生段階からアクチノマイシン D 処理を開始し、後期神経胚まで発生させた後、*Clone 45* の WISH を行った。初期原腸胚以降にアクチノマイシン D 処理を開始した胚の多くで、生殖細胞系列において遺伝子発現が観察された（C-H, 矢印, J）。しかし、110 細胞期以前からアクチノマイシン D 処理をした胚では *Clone 45* の発現は殆ど観察されなかった（A, B, J）。胚の図は全て腹側から観察したもので、上が胚の前方を、下が後方である。左上は全胚像で、全胚像の破線で囲った部分の拡大図を示している。矢印は生殖細胞系列での胚性発現を、矢尻は間充織での染色を、数字は生殖細胞系列での発現が観察された胚の数と割合を示している。スケールバーは 50 μm である。J は A-H の各処理において *Clone 45* の強い発現、弱い発現が観察された胚、発現が観察されなかった胚の割合を示している。文中および図中の「明瞭な発現」は強い発現と弱い発現の両方を示している。

次に、Pem の機能阻害を行い、通常よりも早い段階で Pem タンパク質を減少させることによって、胚性遺伝子の発現の開始が早まるか否かを観察した。受精卵に *Pem* MO を顕微注入した胚を、110 細胞期まで発生させ、アクチノマイシン D 処理を開始し、後期神経胚期で WISH 用に固定した。正常胚において 110 細胞期からのアクチノマイシン D 処理では、*Clone 45* の生殖細胞系列での発現はほとんど観察されないため（Fig. 4 A 参照）、この時期からアクチノマイシン D 処理をしたうえで *Clone 45* の発現が観察されるのであれば、胚性発現の開始が早まったと判断できる。

上記実験の結果、control MOを注入した胚では約半数の胚で観察されたが（Fig 6 C, 48%, n=44）、Pem機能阻害胚では90%以上の胚において生殖細胞系列での*Clone 45*の発現が観察された（Fig. 6 D, 91%, n=44）。このことから、胚発生に伴いPemタンパク質が減少することが、胚性発現の開始に十分であることが示唆された。以上の結果から、発生に伴うPemタンパク質の減少が生殖細胞系列での*Clone 45*の胚性発現に必要十分であることが示唆された。また、生殖細胞系列に存在するPemは初期卵割期においては、体細胞系列遺伝子の発現を抑制していることが分かっていたが（Kumano et al., 2011）、その後、110～eGにおいて、生殖細胞系列遺伝子である*Clone 45*の胚性発現を調節することが分かった。*Clone 45*の結果が、生殖細胞系列における胚性発現遺伝子に

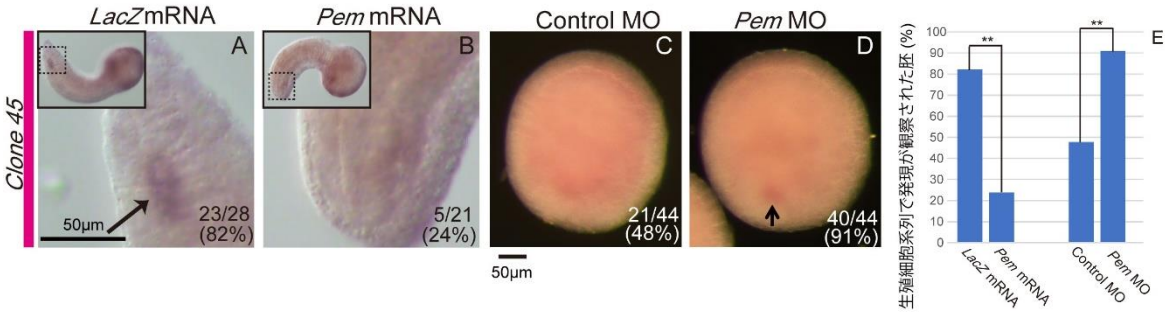

Fig. 6 Pem による *Clone45* の胚性発現の制御

コントロールとして *LacZ* mRNA を生殖細胞系列 B 5. 2 の左右両側に顕微注入した胚では、尾芽胚の生殖細胞系列での *Clone 45* の発現が観察された（A）。*Pem* mRNA を B 5. 2 の左右両側に顕微注入し過剰発現を行い、これら子孫細胞で Pem タンパク質の減少を抑えたところ、*Clone 45* の発現が弱くなった（B)。矢印は生殖細胞系列での発現を示している。図は、側面から撮影した胚である。右が胚の前方、左が胚の後方である。左上は全胚像であり、破線で囲んだ部分を拡大して示している。受精卵に control MO を注入し、110 細胞期からアクチノマイシン D 処理をした胚では生殖細胞系列における *Clone 45* の発現は検出されなかった（C）。*Pem* MO を受精卵に顕微注入した胚においては強い *Clone 45* の発現が検出された（D, 矢印）。E は A-D の胚の生殖細胞系列において *Clone 45* の発現が観察された胚の数と割合を示している。**はカイ二乗検定を行い、P<0.01 の有意差が見られたことを示している。

胚の図は、胚を腹側から撮影している。上が胚の前方、下が胚の後方である。矢尻は間充織と考えられる体細胞での *Clone 45* の発現を示している。右下の数字は胚性発現マーカー*Clone 45* の明瞭なシグナルが観察された胚の数 を示している（A-D）。

おいて普遍的であるとすると、転写抑制因子Pemは生殖細胞系列で発現する遺伝子の転写のタイミングを調節していることが考えられた。

3. 4 Zf-1 は Pem タンパク質を減少させることにより胚性発現を開始させる。

生殖細胞系列遺伝子の発現に関与する *postplasmic/PEM* RNAs の探索を引き続き行った。先行研究から、*postplasmic/PEM* RNAs の一つ *Zf-1* の機能阻害胚では、尾芽胚の始原生殖細胞において *Clone 45* の発現を示す胚が減少すると報告されていた（塙 卒業研究、2005 年）。よって、Zf-1 が生殖細胞系列における胚性発現に必要な因子であると考えた。Zf-1 が生殖細胞系列における胚性発現の開始に関わるか否かを調べるために、*Zf-1* MO を受精卵に顕微注入し、既に *Clone 45* の胚性発現が開始されている時期である神経板期からアクチノマイシン D 処理を開始し、後期神経胚期で WISH 用に固定した。アクチノマイシン D 処理によって神経板期以降の転写を抑制することで、初期の胚性発現のみを観察することができる。結果、conrol MO を 350 pg 注入した胚の生殖細胞系列において、*Clone 45* の明瞭な発現シグナルが観察されたが（Fig. 7 A, n=15, 67%）、Zf-1 機能阻害胚では、*Clone 45* の発現を示す胚の割合は、control MO を注入した胚と比べて減少した（Fig. 7 B, D, n=19, 21%）。以上より、Zf-1 は生殖細胞系列における初期の胚性発現の開始に必要であることが示唆された。

使用した *Zf-1* MO の特異性を検証するために、*Zf-1* MO と *Zf-1* mRNA の共注入によるレスキュー実験を行った。結果、*Zf-1* MO と *LacZ* mRNA を共注入した胚においては、21%の胚でのみ生殖細胞系列での *Clone 45* の明瞭な発現シグナルが観察されたのに対し（Fig. 7 F, n=56）、*Zf-1* MO と *Zf-1* mRNA を共注入した胚においては、47%の胚で *Clone 45* の発現が観察された（Fig. 7 G, 矢印、n=74）。このことから、*Zf-1* MO による *Clone 45* の発現の減少は、*Zf-1* mRNA を共注入することによりレスキューされたことが示された。よって、使用した *Zf-1* MO は Zf-1 の翻訳を特異的に阻害しているといえる。

つづいて、Zf-1 がどのようにして胚性発現を制御しているのかを調べた。前項 3. 3 の結果から、胚性遺伝子の発現には Pem タンパク質の減少が関わることが明らかになったので、Zf-1 が Pem タンパク質の減少に関わるか否かを調べた。もし、Zf-1 が Pem タンパク質の減少に関わるのであれば、Zf-1 の機能阻害では生殖細胞系列の核における Pem タンパク質の減少が抑制されることで、*Clone 45* の発現の生殖細胞系列での発現が減少すると考えられる。よって、Zf-1 と Pem を同時に機能阻害することで、胚性発現が回復するか否かを検証した。その結果、Zf-1 と Pem の二重機能阻害では、67% (n=23) の胚において正常胚と同程度の強さの *Clone 45* の発現が観察され、このような胚の頻

度は *Zf-1* MO と control MO を共注入した場合よりも有意に高くなった（Fig. 7 B, C）。よって、Zf-1 による胚性発現の調節は Pem の量的調節を介していることが示された。

さらに、Zf-1 機能阻害胚の生殖細胞系列における Pem タンパク質を免疫染色し、Zf-1 が Pem タンパク質量をコントロールしているか否かを直接検証した。正常な 64 細胞期の生殖細胞系列では、Pem タンパク質は核においてわずかに検出された（n=24; Fig. 7 I）。しかしながら、Zf-1 機能阻害を行ったすべての 64 細胞期胚の生殖細胞系列の核において Pem タンパク質の明瞭なシグナルが検出された（n=28, Fig. 7 J）。以上の結果から、Zf-1 は Pem タンパク質を減少させることにより、胚性発現を促進していることが示唆された。また、

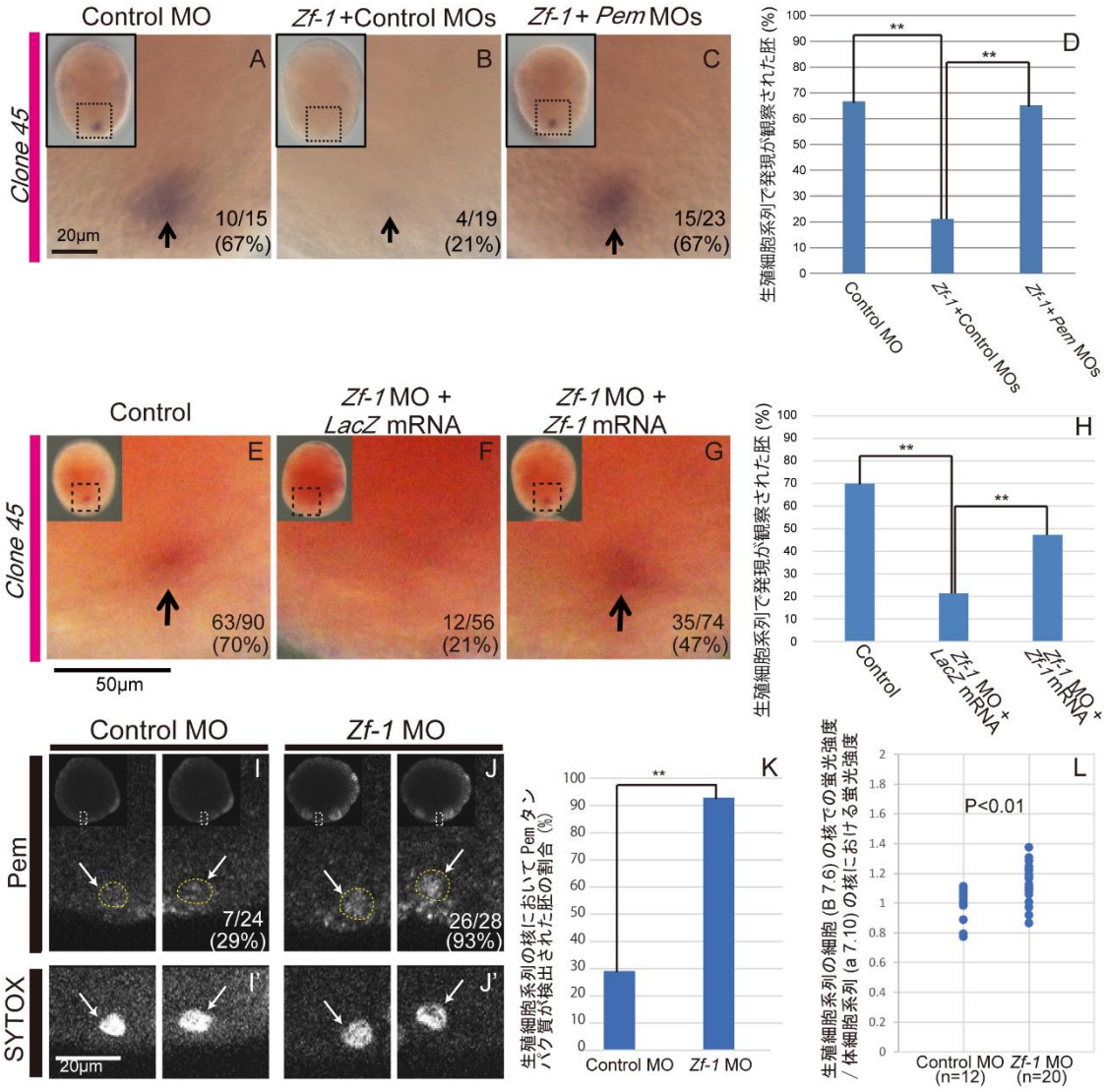

Fig. 7 Zf-1 による *Clone45* の胚性発現と Pem の制御

A-D:　受精卵に control MO を注入し、神経板期からアクチノマイシン D 処理をし、後期神経胚で固定した胚は、生殖細胞系列において *Clone 45* の発現が観察される（A, 矢印）。*Zf-1* MO と control MO を受精卵に顕微注入した胚では、生殖細胞系列での *Clone 45* の明瞭な発現を示す胚の数が減少した（B）。*Zf-1* MO と *Pem* MO を顕微注入した胚（C）においては、control MO のみを注入した胚（A）と同程度の強さの *Clone 45* の発現を示す胚の割合が増加した（A, C, D）。D は A-C の胚の生殖細胞系列において *Clone 45* の発現が観察された胚の数と割合を示している。**はカイ二乗検定を行い、P<0.01 の有意差が見られたことを示している。胚の図の黒矢印は生殖細胞系列における *Clone 45* の発現を示している。スケールバーは 20 µm である。図の左上は全胚像であり、破線で囲んだ部分を拡大して示している。右下の数字は胚性発現マーカー *Clone 45* の明瞭なシグナルが観察された胚の数を示している。

E-H:　使用した *Zf-1* MO の特異性を検証するために Zf-1 のレスキュー実験を行った。神経板期からアクチノマイシン D 処理をした正常胚においては *Clone 45* の発現が観察された（E, 矢印)。*Zf-1* MO 注入胚では *Clone 45* の発現を示す胚の割合は減少した（F, 矢印)。*Zf-1* MO と *Zf-1* mRNA を共注入したところ、アクチノマイシン D 処理をしたのみの胚（E, 矢印）と同程度の強さの発現を示す胚の数が増加した（G, 矢印)。H は E-G の胚の生殖細胞系列において *Clone 45* の発現が観察された胚の数と割合を示している。**はカイ二乗検定を行い、P<0.01 の有意差が見られたことを示している。胚の図の黒矢印は生殖細胞系列における *Clone 45* の発現を示している。スケールバーは E-G は 50 µm である。図の左上は全胚像であり、破線で囲んだ部分を拡大して示している。右下の数字は胚性発現マーカー *Clone 45* の明瞭なシグナルが観察された胚の数を示している。

I- L:　ZF-1 機能阻害胚における Pem タンパク質の影響を調べた。受精卵に control MO を注入した 64 細胞期においては、生殖細胞系列の核での Pem タンパク質は少ない割合の胚でわずかに検出されるのみであった（I）。Zf-1 機能阻害胚では生殖細胞系列の核において明瞭な Pem タンパク質が検出された胚の数が増加した（J）。I' J'では DAPI 染色によって生殖細胞系列の核を検出している（I', J', 矢印）。I' J'はそれぞれ I, J と同じ焦点面で撮影している。よって、核から焦点面が外れているため、核での Pem タンパク質シグナルが検出されなかったのではない。K は I, J の胚の生殖細胞系列の核において Pem タンパク質の明確な発現が観察された胚の数と割合を示している。**はカイ二乗検定を行い、P<0.01 の有意差が見られたことを示している。L は I, J の胚において、核に Pem タンパク質が存在しないであると考えられている体細胞 a 7.10 の核の蛍光強度を 1 としたときに、生殖細胞系列の細胞 B 7.6 での核の蛍光強度が何倍強いかを各胚において計測した結果である。マン・ホイットニーの U 検定およびウェルチの t 検定を行い、P<0.01 の有意差が見られたことを表に記載している。

胚の図の白矢印は生殖細胞系列の核を（I, I', J, J'）を示している。図は、植物極側から撮影している。上が胚の前方、下が胚の後方である。スケールバーは 20 µm である。図の左上は全胚像であり、破線で囲んだ部分を拡大して示している。右上；の数字は、核における Pem タンパク質が明瞭に観察された胚の数（I, J）を示している。

CAB でのシグナルも増加したことから、CAB における Pem タンパク質の翻訳量が増加していることが示唆された。しかし、Zf-1 が CAB の構造や大きさに影響を与えている可能性もある。

それでは、Zf-1 はどのような分子メカニズムで Pem タンパク質を減少させるのだろうか。Zf-1 は C3H 型 zinc finger domain をコードしていることから、RNA 結合タンパク質であると考えられている（Nakamura et al., 2003; Sasakura et al., 2000）。このことから、Zf-1 は *Pem* mRNA と結合することにより、Pem の翻訳抑制もしくは mRNA の分解によってタンパク質の減少を引き起こしている可能性が考えらる。

そこで、尾芽胚期において *Pem* mRNA の WISH と Pem タンパク質の免疫染色を行ったところ、尾芽胚期の生殖細胞系列では、WISH によって *Pem* mRNA のかなりの残存が観察されるのに対して（Fig. 8 A）、免疫染色によって Pem タンパク質は検出されなかった（Fig. 8 B）。このことから、*Pem* mRNA は存在するものの、翻訳が抑制されている可能性が考えられたので、Zf-1 が Pem mRNA の翻訳を制御している可能性が高いことが分かった。

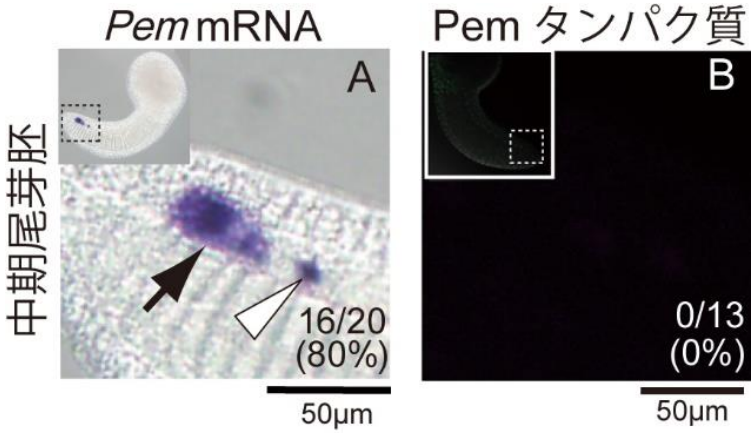

Fig. 8 尾芽胚における *Pem* mRNA および Pem タンパク質の発現

中期尾芽胚における *Pem* mRNA (A) および Pem タンパク質（B）の発現を観察した。*Pem* mRNA は生殖細胞系列で発現が観察されたが（A, 矢印）、Pem タンパク質は検出されなかった（B）。図は全て横から観察しており、全胚図（左上）のうち破線で囲んだ部分の拡大図を示している。また、生殖細胞系列の前方に *Pem* mRNA の点在が観察された（A 白矢尻）。カタユウレイボヤ胚においては、生殖細胞系列 B 7.6 は始原生殖細胞 B 8.12 と、B 8.12 の前方に位置する細胞 B 8.11 に分裂することが知られている（Shirae-Kurabayashi et al., 2006）。しかし、マボヤ胚における *Pem* mRNA の点在（A, 白矢印）が細胞であるかどうか、そして細胞である場合は B 8.11 に相当するものであるかどうかは不明である。各図の右下には生殖細胞系列における *Pem* mRNA もしくは Pem タンパク質の観察された胚の数と割合を示している。スケールバーは 50 μm である。

第四章 考察

4.1 本研究から示唆されたこと

本研究の結果から以下の事項が示唆された。

① 卵割期の生殖細胞系列では、Popk-1 が CAB の大きさの制御を通して、局在する mRNA 量及び転写抑制に必要な Pem タンパク質量を間接的に制御することで、生殖細胞系列のグローバルな転写抑制に寄与する。

② 生殖細胞系列における胚性発現マーカー遺伝子 *Clone 45* の転写は 110 細胞期～初期原腸胚において開始する。

③ 転写抑制因子 Pem が発生に伴い減少する事により生殖細胞系列の胚性発現遺伝子 *Clone 45* の発現が開始する。

④ Zf-1 は Pem タンパク質翻訳量を減少させることにより、胚性発現を開始させる。

これらの結果及び先行研究の結果を基にして、マボヤの胚発生期における生殖細胞系列での転写制御機構は以下のようなものであると考えている（Fig. 9）。すなわち、4 細胞期～16/ 32 細胞期頃までの初期胚においては、Popk-1

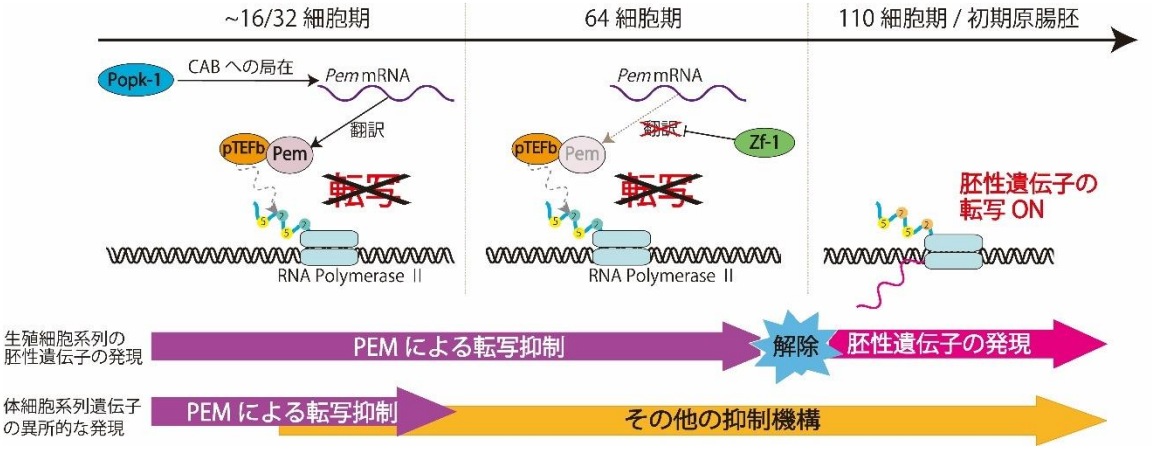

Fig. 9 *postplasmic/PEM* RNAs による生殖細胞系列の転写調節機構のモデル

生殖細胞系列の転写調節において Pem は、体細胞系列遺伝子の抑制（16~32 細胞期頃まで）と生殖細胞系列の胚性遺伝子の発現の調節（110~初期原腸胚期以後）の 2 つの機能を持つと考えられる。そして、これらの機能を担う Pem タンパク質の発現レベルは Popk-1 と Zf-1 が調節していることが示唆された。16~32 細胞期頃までの初期卵割期胚においては、Popk-1 が CAB を形成し、転写抑制に十分な量の *Pem* mRNA の CAB への局在を促すことにより、Pem タンパク質の翻訳に寄与する。結果、Popk-1 はグローバルな転写抑制をする。そして、Zf-1 が Pem タンパク質の発現量を減少させることにより、生殖細胞系列の胚性遺伝子の発現が開始する環境を提供し、110~初期原腸胚期から生殖細胞系列の胚性発現が開始する。また、32 細胞期頃から体細胞系列遺伝子の異所的な発現は Pem による抑制からそのほかの抑制機構に受け継がれる。

が正常な大きさの CAB を形成することにより、*Pem* mRNA は CAB に局在し、翻訳される。翻訳された Pem タンパク質は生殖細胞系列の核へ移行し、pTEFb に結合することにより、RNA polymerase Ⅱの転写伸長活性を抑制する。このことによって、グローバルな抑制がおこる。発生が進行すると、Zf-1 によって Pem タンパク質の翻訳量が減少し、Pem による転写抑制が解除される。このことにより、転写が開始する環境が整えられ、110 細胞期/初期原腸胚から、生殖細胞系列遺伝子の胚性発現が開始する。しかし、Zf-1 の発現がどの発生ステージから開始し、いつまで機能するかは現段階では不明である。同系列における体細胞遺伝子の発現の抑制は Pem によるグローバルな抑制の後に、Pem とは独立したその他の機構によって抑制され続けるので、生殖細胞系列において発現が開始することはない。このように、本研究での解析は、マボヤの生殖細胞系列における転写制御機構の全体像を明らかにすることに貢献したといえる。

4. 2 生殖質の形成と転写抑制

本研究から、リン酸化酵素である Popk-1 は Pem を介して、間接的に生殖細胞系列での体細胞系列遺伝子の転写を抑制することが示唆された。先行研究から、CAB には *postplasmic/PEM* RNAs が局在し（Nakamura et al., 2003; Prodon et al., 2007; Makabe and Nishida, 2012）、これらの mRNA 群は CAB において翻訳されると考えられている（Paix et al., 2011）。このことから、Popk-1 は Pem の翻訳の場を適切に形成することを介して、生殖細胞系列での転写抑制に寄与していると考えられる。

先行研究から、Popk-1 機能阻害胚では筋肉及び間充織マーカー遺伝子の発現が観察されないこと、*postplasmic/ PEM* RNAs の一つ *Macho-1* mRNA の CAB に局在する量が減少することが報告されている（Nakamura et al., 2005）。*Macho-1* は筋肉のマスター因子であり、間充織の形成を制御することから（Nishida and Sawada, 2001; Kobayashi et al., 2003）、Popk-1 は CAB の形成を促し、正常な量の *Macho-1* mRNA を局在させることによって筋肉と間充織の形成を制御すると考えられる（Nakamura et al., 2005）。この先行研究からの知見は、Popk-1 が正常な CAB の形成を促し、局在する Pem mRNA の量を制御することにより、転写抑制に寄与するという本研究結果と類似している。

他の動物種においても、生殖質を形成する因子が数種類同定されている。その例として、ショウジョウバエの Oskar (Ephrussi et al., 1999; Bretwieser et al., 1996）、線虫の PGL-1, 3 (Hanazawa et al., 2011）、ゼブラフィッシュの Backy ball (Bontems et al., 2009）、アフリカツメガエルの Xpat (Machado et

al., 2005）が挙げられる。これらの因子は他の母性 mRNA とタンパク質を生殖質に局在させ（Ephrussi et al., 1999, Hanazawa et al., 2011, Bontems et al., 2009, Machado et al., 2005)、始原生殖細胞の形成に必要であることが知られている（Ephrussi et al., 1999, Bontems et al., 2009, Machado et al., 2005）。ハエでは、*oskar* 変異体の生殖質では *pgc* mRNA の後極での局在および翻訳は観察されないこと（Nakamura et al., 1996; Rangen et al., 2000)、Nanos は生殖質に局在した *nanos* mRNA のみが翻訳されること(Gavis and Lehmann, 1992; Wang et al., 1994; Zaessinger et al., 2006; Jaske et al., 2015）が知られている。このことから、ハエはマボヤと同様に生殖質の形成に必要な因子が転写抑制因子の適切な翻訳を介して転写抑制を制御する可能性がある。しかしハエを含む他の動物において、生殖質の形成に必要な因子が生殖細胞系列の転写抑制に寄与するかについては殆ど調べられていない。

また、上述のホヤ以外の動物種において生殖質の形成を制御する因子である、ハエの Oskar、線虫の PGL-1, 3、ゼブラフィッシュの Backy ball は互いに進化的な保存性がなく、他の動物にオーソログが存在しない、それぞれの系統で新たに獲得した遺伝子である（Ephrussi et al., 1999; Hanazawa et al., 2011; Bontems et al., 2009; Machado et al., 2005; Ewen-Campen et al., 2010; Kumano et al., 2014）。このことは、生殖質局在型の形成様式は祖先的な形質ではなく派生的な形質であることを支持する。しかし、Popk-1 はリン酸化酵素であり（Nakamura et al., 2005）、線虫およびマウスにおいてそれぞれオーソログである SAD-1, SAD-A が存在することが知られており、これらの動物種においては、神経軸索の正常な機能に重要であることが知られている（Crump et al.,2001; Kishi et al., 2005）。他の動物種においても、Popk-1 のオーソログが生殖細胞系列の形成に関与するかはとても興味深い。なお、ホヤ胚において Popk-1 のリン酸化標的因子や生殖質の形成に寄与する詳細な分子メカニズムについては不明である。

4. 3 Pem による体細胞遺伝子および生殖細胞遺伝子の転写制御

本研究から、胚発生に伴う Pem タンパク質レベルの減少は、生殖細胞系列の胚性発現の開始に必要十分であることが示唆された。先行研究では、免疫染色によって検出される Pem タンパク質レベルは 32~64 細胞期において徐々に減少することが知られている（Negishi et al, 2007）。この結果は、*Clone 45* の胚性発現が 110 細胞期～初期原腸胚において開始することを示唆するという本研究の結果と一致する（Fig. 5）。よって、Pem は体細胞系列遺伝子の発現の抑制の他に（Kmano et al., 2011）、その量的減少によって生殖細胞系列での胚性発現の開始時期の制御をしていることが示唆された。それでは、どのよう

な機構によって、Pem は異なる種類の遺伝子の転写を調節しているのだろうか。

先行研究から、少なくとも 8~32 細胞期頃の生殖細胞系列において、調べられた限りすべての体細胞系列遺伝子の発現は Pem によって抑制され、Pem 機能阻害胚では生殖細胞系列において、異所的な体細胞系列遺伝子の発現が観察される。しかし詳細にみると、16 細胞期の Pem 機能阻害胚の生殖細胞系列において異所的な発現を示す体細胞系列の転写因子 *FoxA*, *FoxD.a*, *SoxB1* は、32 細胞期胚においては生殖細胞系列での異所的な発現は観察されない（Kumano et al., 2011）。生殖細胞系列では、体細胞系列遺伝子の転写は継続的に抑制されることを考慮すると、このことは、Pem による体細胞系列遺伝子の転写抑制機構は 32 細胞期以降に別の抑制機構に引き継がれる可能性を示しており、Pem の後に別の転写抑制機構が存在すると考えられる。

一方で、生殖細胞系列で起こる胚性遺伝子発現は 110 細胞期~初期原腸胚まで Pem による転写抑制を受けていると考えられる。すなわち、生殖細胞系列において Pem による体細胞系列遺伝子と胚性の生殖細胞系列遺伝子の転写抑制制御が起こっている時期が異なることが示唆される。よって、Pem が減少することにより体細胞系列遺伝子が発現することを防ぐために、体細胞系列の抑制機構は Pem による機構から別の機構に移行する可能性が考えられる。このことにより、発生がさらに進行し、生殖細胞系列での胚性発現が開始する時期においても体細胞系列遺伝子の発現は抑制されたままであると考えれられる。

体細胞系列遺伝子の転写抑制機構がより早い時期においてPemからそれ以外の機構に移行するということは、体細胞系列遺伝子の発現はPemタンパク質量の減少の影響を非常に受けやすい可能性がある。実際、生殖細胞系列から分離した体細胞（B 5.1等）では、分離後速やかに*FoxA*等の体細胞遺伝子の転写が開始される。すなわち、生殖細胞系列から分離した体細胞系列では、Pemタンパク質の供給源と考えられているCABが受け継がれないため、Pemタンパク質が減少し、転写抑制が解除されることで体細胞系列遺伝子の発現がすぐに開始すると考えられる。

Pemによる転写抑制が解除された後、速やかに体細胞系列遺伝子が転写されるのは、体細胞遺伝子の転写は伸長反応の途中段階で停止しているからだと考えられている。酵母、ショウジョウバエ、ヒトの細胞などにおいては、転写が不活性化している多くの遺伝子においてRNA PolymeraseⅡがDNA上にロードされているが伸長活性のない状態で各遺伝子の5’領域に留まっていることが報告されている（Radonjic et al., 2005; Zeitlinger et al., 2007; Muse et al., 2007; Guenther et al., 2007）。そして、この状態が、胚発生におけるシグナル制御に応じての素早い転写の開始に寄与していると考えられている（Zeitlinger et

al., 2007; Kumano et al., 2011）。マボヤのPemは転写伸長を抑制することから、転写の開始は既に起こっていることが予想される（Kumano et al., 2011）。このことにより、Pemによる抑制が解除され、体細胞遺伝子の転写の伸長が速やかに再開され、転写が起こると考えられる。

4. 4 Pem 以外の転写抑制機構

前項 4. 3 で述べたように、Pem の他に生殖細胞系列における体細胞系列遺伝子の転写抑制機構が存在し、32 細胞期頃から別の抑制機構に引き継がれることが示唆された。線虫では、PIE-1 による RNA polymerase Ⅱ の転写伸長の制御による転写抑制機構の後、体細胞系列遺伝子の抑制はクロマチン修飾による抑制機構に引き継がれると考えられている（Schaner et al., 2003; Lachner et al., 2003; Bender et al., 2009）。また、線虫の生殖細胞系列遺伝子の胚性発現は、PIE-1 タンパク質が消失するだけで活性化することが知られている（Spencer et al., 2011）。このことから、PIE-1 分解後の線虫の生殖細胞系列では、胚性発現遺伝子に関してはクロマチン修飾による抑制をうけないのかもしれない。ホヤの生殖細胞系列においても、Pem がなくなっても生殖細胞系列における体細胞系列遺伝子の抑制はクロマチン修飾によって体細胞系列遺伝子の転写が抑制され続けるため、生殖細胞系列の胚性発現遺伝子のみが発現するようになるのかもしれない。

4. 5 Zf-1 による Pem タンパク質の減少機構

本研究では、Zf-1 が Pem タンパク質レベルを減少させることにより、胚性発現のタイミングを制御することが示唆された。*Zf-1* mRNA は母性由来で未受精卵中に存在する。そのため、Zf-1 タンパク質は発生過程で徐々に翻訳され、Pem の翻訳抑制に十分量蓄積することで、あるタイミングから *Clone 45* の転写開始を引き起こすと予想される。

Zf-1 は C3H 型の Zinc finger domain をコードしていることから RNA 結合タンパク質であることが予想される（Nakamura et al., 2003; Sasakura et al., 2000）。RNA 結合タンパク質による翻訳抑制は他の動物種の生殖細胞系列の形成においても重要な役割を果たすことが知られている（Ewen-Campen et al., 2010; Marlow et al., 2015; Strome et al., 2015）。例えば、Nanos は RNA 結合タンパク質の Pumilio と複合体を形成し、胚の前方の形成に重要な hunchback の翻訳抑制をすることで胚後方の形成に寄与する（Sonoda and Wharton 1999; Edwards et al., 2001）。他にも、RNA 結合タンパク質 Bruno は oskar の翻訳抑制を介して *oskar* mRNA の胚後方への局在が完了するまで

に Oskar の翻訳が起こらないようにしている（Kim-Ha et al., 1995; Webstar et al., 1997）。

よって、マボヤにおいても RNA 結合タンパク質によって生殖細胞系列の形成が制御されている可能性が十分考えられる。現在、Zf-1 が *Pem* mRNA もしくは、Pem タンパク質の翻訳を正に制御する因子の mRNA に結合することによって Pem タンパク質の翻訳量を減少させる機構を予想している。今後、この可能性を検証するために後述 4. 6 で述べる解析を行うことにより検証したい。

4. 6 総括および今後の課題

本研究の結果から、*postplasmic/PEM* mRNAs のメンバーである Popk-1 と Zf-1 が、転写抑制因子 Pem のタンパク質レベルをそれぞれ正もしくは負に制御することで生殖細胞系列において適切な転写制御が行われ、生殖細胞系列の形成に寄与することが示唆された。

今後の課題として以下の研究が挙げられる。すなわち、本研究に直接関わるものとして、①Zf-1 による Pem タンパク質の減少メカニズムの詳細な解析、②今回得られた胚性発現の開始メカニズムが普遍的であるかを検証するために *Clone 45* 以外の胚性発現マーカーを用いての解析が挙げられる。また、ホヤの生殖細胞系列における生殖細胞系列の転写制御の全体像の解明のために、③ Pem 以外の転写調節機構の解明とそれを制御する因子の探索が挙げられる。

課題① Zf-1 による Pem タンパク質の減少メカニズムの詳細な解析。

本研究では、Zf-1 が Pem タンパク質を減少させることにより、生殖細胞系列での胚性発現が開始することが示唆された。しかし、本研究では詳細な解析には至らなかった。Zf-1 による Pem タンパク質減少の詳細なメカニズムを明らかにするための実験として、1) Zf-1 の強制発現実験、2) Zf-1 タンパク質の発現パターンの記載、3) Zf-1 タンパク質と Pem mRNA の結合実験が挙げられる。

<u>1) Zf-1 の強制発現実験</u>

本研究では、生殖細胞系列の核における Pem タンパク質の発現量の減少や胚性発現の開始が Zf-1 により引き起こされるのか、その十分性を検証するに至らなかった。これらを検証するために、Zf-1 の強制発現を行い、Pem タンパク質の減少する時期が早まるか、胚性発現の開始時期が早まるかを調べる必要がある。現在、Zf-1 の強制発現に対する Pem タンパク質の影響を検証している。例数は少ないが、*LacZ* mRNA を受精卵に顕微注入した全ての胚では、32

細胞期の生殖細胞系列の核と CAB において明瞭な Pem タンパク質の存在が観察された（Fig. 10 A, 100%, n=6）。しかし、*Zf-1* mRNA を顕微注入した胚では生殖細胞系列の核において明瞭な Pem タンパク質の存在を示した胚の数は減少した（Fig. 10 B, 40%, n=10）。このことから、Zf-1 は Pem タンパク質の減少に十分であることが示唆された。まだ、これは予備的な結果であり、参考までにここに記したが、今後、実験の例数を増やすことにより、引き続き検証する。

また、C3H 型 Zinc finger domain が欠失した *Zf-1* mRNA を顕微注入し、RNA 結合機能が失われた Zf-1 を強制発現した胚において Pem タンパク質の減少する時期が早まるか、胚性発現の開始時期が早まるかを調べることにより、Zf-1 の RNA 結合機能が Pem タンパク質の減少及び、胚性発現の開始に重要であるかを検証する必要がある。

2) 胚発生における Zf-1 タンパク質の翻訳量の変化の記載

先行研究から、*Pem* を含む *postplasmic/PEM* RNAs は CAB で翻訳されることが示唆されているので（Paix et al., 2011）、Zf-1 は CAB において Pem タンパク質の翻訳量を減少させていると考えられる。そして、Pem タンパク質の翻訳量は胚発生に伴い減少するので、反対に、Zf-1 タンパク質は胚発生のある

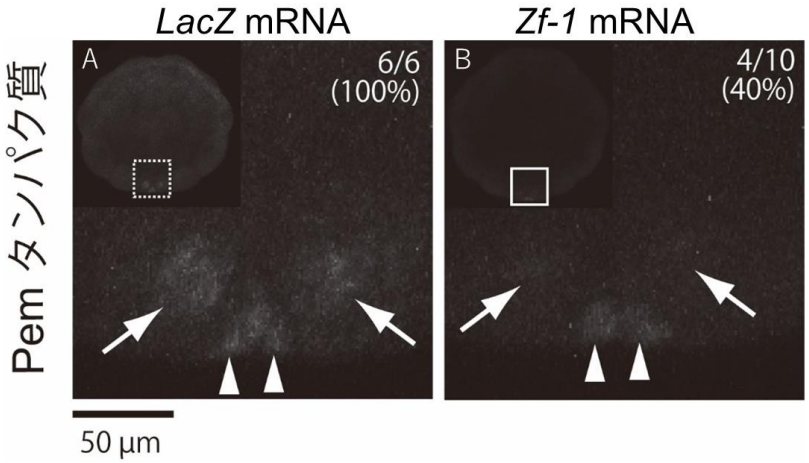

Fig. 10 Zf-1 による *Clone45* の胚性発現と Pem の制御

ZF-1 強制発現胚における Pem タンパク質量の影響を調べた。*LacZ* mRNA を注入した 32 細胞期においては、生殖細胞系列の核での Pem タンパク質は生殖細胞系列の核（A, 矢印）と CAB (A, 矢尻）で観察された 。しかし、*Zf-1* mRNA を注入した胚では、Pem タンパク質は CAB で観察されたが（B, 矢尻）、核では Pem タンパク質は殆ど観察されなかった（B, 矢印）。写真はコンフォーカル顕微鏡を用いて撮影しており、生殖細胞系列の細胞全体を撮影した写真を Max intensity によって重ね合わせたものである。スケールバーは 50 µm である。図の左上は全胚像であり、破線で囲んだ部分を拡大して示している。右上の数字はもしくは核における Pem タンパク質が明瞭に観察された胚の数を示している。

時期から徐々に翻訳されることが予想される。このことを検証するために、受精卵から尾芽胚までの各胚発生ステージにおいて Zf-1 タンパク質の免疫染色を行い、CAB における Zf-1 タンパク質の翻訳量を検出することで、解析を行う必要がある。

3) Zf-1 タンパク質と Pem mRNA の結合実験

Zf-1 の分子的なメカニズムの解析は重要な実験である。現在、Zf-1 は翻訳抑制によって Pem タンパク質の発現を制御する機構を予想している。そのために、*in vitro* 翻訳系を用いて Zf-1 タンパク質存在下で Pem タンパク質の翻訳が起きるか否かを検証することが必要である。また、Zf-1 タンパク質と *Pem* mRNA が結合するか否かを調べるために pull down assay 法を用いて Zf-1 タンパク質に結合する mRNA に *Pem* mRNA が含まれるのかを解析することも重要である。

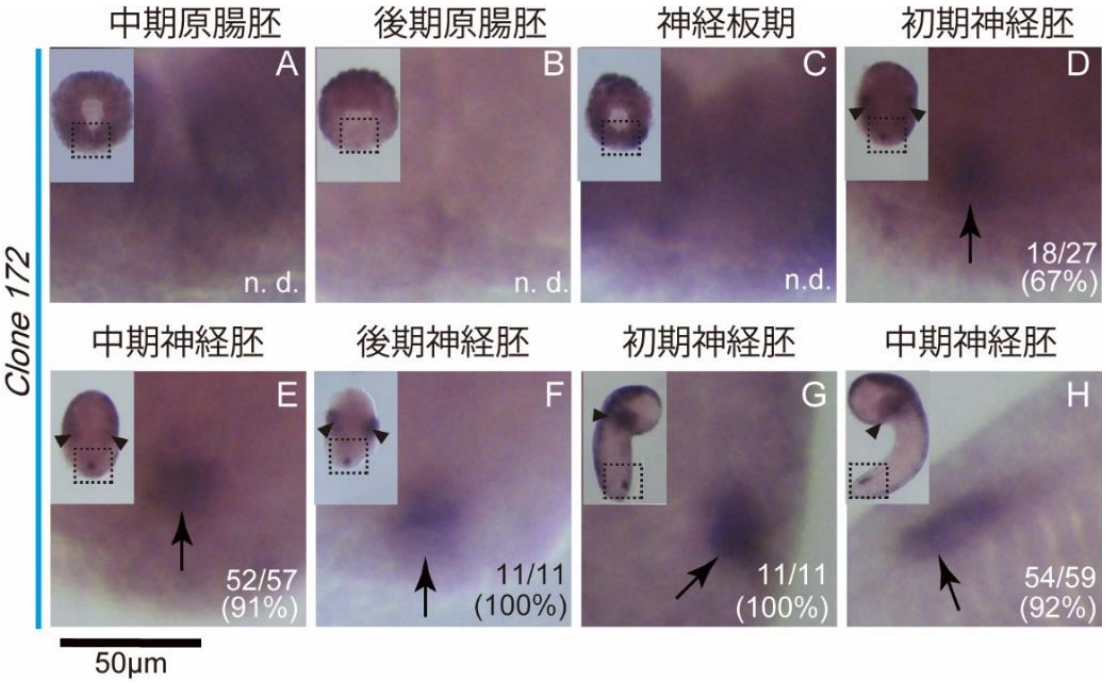

Fig. 11 各発生ステージの生殖細胞系列における *Clone 45* の発現

中期原腸胚から中期尾芽胚までの胚において *Clone 172* の WISH を行った。初期神経胚以後において生殖細胞系列発現が観察されたが（D-H）、神経板期以前では母性由来の mRNA によると考えられるバックグラウンドが生殖細胞系列の周辺で発現していたため、生殖細胞系列で発現しているか否かを判別することができなかった（A-C)。左上が胚の全胚像で、破線で囲んだ部分の拡大図を示している。図は全て上が胚の前方、下が後方である。中期、後期原腸胚は植物極側から見た図、神経板期～後期神経胚は腹側から、初期・中期尾芽胚は横側から観察した。スケールバーは 50 μm、各図の右下には生殖細胞系列発現が観察された胚の数と割合を示す。矢尻は間充織における染色を示している。生殖細胞系列での発現かどうかを判別できなかった胚は n.d. (not determined）と表記している。

課題②　*Clone 45* 以外の胚性発現マーカーを用いての解析

本研究では胚性発現マーカーとして *Clone 45* を用い、生殖細胞系列の胚性発現は 110 細胞期~初期原腸胚期の間に開始することが示唆された。ただし、*Clone 45* には母性 mRNA があらかじめ存在すること、生殖細胞系列以外でも間充織に胚性発現があることなどから理想的な生殖細胞遺伝子の胚性発現マーカーであるとは言い難い。ただし、そのような理想的な発現を示す遺伝子はまだマボヤでは同定されていない。よって、*Clone 45* 以外の生殖細胞系列の胚性発現遺伝子についても、転写開始時期や開始機構が同じかは興味深い。よって、MAGEST から他の胚性発現マーカーの探索を行い、胚性発現の開始時期および機構について解析することが望まれる。

予備的には、*Clone 45* の他に *Clone 172* と呼ばれる遺伝子について解析を試みている。その予備的結果を参考までに以下に示しておく。*Clone 172* は WW domain-containing adapter protein をコードすると予測されている遺伝子である。まず、生殖細胞系列における *Clone 172* の胚性発現の開始時期を特定するために、WISH を中期原腸胚から中期尾芽胚までの各発生ステージで行った。結果、初期神経胚以後のステージの胚の生殖細胞系列で *Clone 172* の発現が観察された（Fig. 11 D-H, 矢印）。しかし、神経板期以前のステージでは生殖細胞系列の周囲に弱いながらもシグナルが観察されたため生殖細胞系列での発現を確認することができなかった（Fig. 11 A-C）。このように、*Clone 172* にも母性 mRNA や間充織での発現が存在しており、残念ながら理想的なマーカーではない。

Clone 45 を解析した際と同様にアクチノマイシン D 処理を用いた実験を行った（Fig. 12）。その結果、初期原腸胚からアクチノマイシン D 処理をした胚においては、59%以上の胚において明瞭な生殖細胞系列における *Clone 172* の発現の発現が観察された（Fig 12 C-H）。110 細胞期から処理を開始した胚においては 62%において発現は観察されず（Fig 12 B, n=50）、64 細胞期から処理を開始した胚においては発現を示す胚は観察されなかった（Fig. 12 A, n=48）。このことから、*Clone 172* の生殖細胞系列における胚性発現は 110 細胞期頃から開始することが示唆された。本研究結果から、生殖細胞系列での *Clone 45* の胚性発現は 110 細胞期～初期原腸胚から始まることが示唆されたことから、*Clone 45, 172* の胚性発現はほぼ同時期に開始することが示唆された。

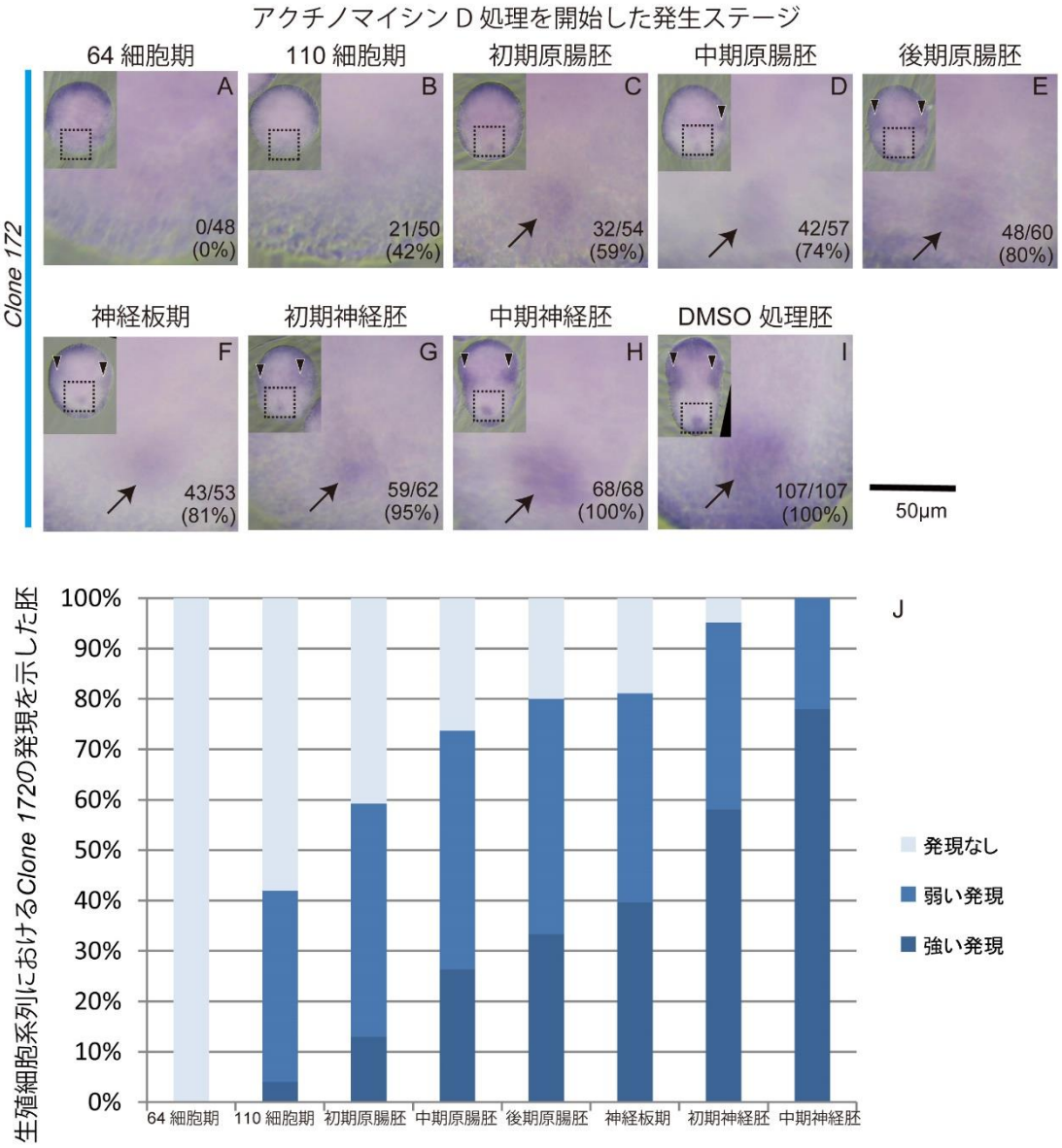

Fig. 12 アクチノマイシン D 処理胚における *Clone 172* の発現

64 細胞期から中期神経胚までの各発生段階からアクチノマイシン D 処理を開始し、後期神経胚まで発生させた後、*Clone 172* の WISH を行った。初期原腸胚以降に処理を開始した胚の多くで、生殖細胞系列において遺伝子発現が観察されたが（C-H, 矢印）、110 細胞期で処理を開始した胚では発現が観察された胚は 42%であり（B）、64 細胞期から処理した胚は 0%であった（A）。胚の図は全て腹側から観察したもので、上が胚の前方を、下が後方である。左上は全胚像で、全胚像の破線で囲った部分の拡大図を示している。矢印は生殖細胞系列での胚性発現を、矢尻は間充織での染色を、数字は生殖細胞系列での発現が観察された胚の数と割合を示している。スケールバーは 50 μm である。

J は A-H の各処理において *Clone 172* の強い発現、弱い発現が観察された胚、発現が観察されなかった胚の割合を示している。

次に、*Clone 172* の生殖細胞系列における胚性発現が Pem によって制御されているかを調べた。生殖細胞系列において Pem タンパク質を過剰発現した尾芽胚においては、コントロール胚（Fig. 13 A, n=16）と比較して Clone 172 の発現量が減少し、コントロールと同程度の *Clone 172* の発現を示す胚は観察されなかった（Fig. 13 B, n=13）。一方で、Pem の機能阻害をすると、*Clone 45* の解析結果とは異なり、*Clone 172* の発現は観察されなかった（Fig 13 D, n=32）。このことから、ネガティブリザルトであるが、生殖細胞系列における *Clone 172* の胚性発現に Pem タンパク質の減少は必要であるが十分ではないことが示唆された。

さらに、*Clone 172* の発現が Zf-1 によって制御されているかを調べた。Zf-1 機能阻害胚では、*Clone 45* の発現と同様に神経板期における明瞭な *Clone 172* の発現を示す胚の数は減少した（Fig 13 F, n=20, 45%）。しかし、*Zf-1* MO と *Pem* MO を共注入した胚においては、生殖細胞系列での *Clone 172* の胚性発現が観察された胚は 39%であり（Fig. 13 G, n=18）、Zf-1 のみを機能阻害した胚と有意差は確認されなかった（Fig. 13 H）。このことから、*Clone 172* の発現は Zf-1 の機能阻害によって抑制されるが、この発現の抑制は Pem の機能阻害によって解除されないことが示唆された。

以上の結果から、*Clone 172* の胚性発現は Zf-1 によって制御されるが、Pem の減少を介さない別の機構によって制御されている可能性が考えられた。しかし現時点ではまだ、これらの結論を確証するには至っていない。Pem の機能阻害が十分ではない可能性もあるため、注入する *Pem* MO 量を増やすことにより、さらなる検証を行う必要がある。

課題③Pem 以外の転写調節機構の解明とそれを制御する因子の探索

postplasmic/PEM mRNAs はいまだ機能未知遺伝子が多く存在し、本研究では機能解析に至らなかった他の *postplasmic/PEM* mRNAs について、生殖細胞系列の転写調節における解析を行うことが望まれる。具体的には本研究と同様に遺伝子特異的な MO による機能阻害を行い、卵割期の生殖細胞系列における *FoxD.a* の異所的な発現がみられるかを観察することで、体細胞系列遺伝子の転写抑制に寄与するかを検証する。因子が特定された場合、Pem を介した転写調節をするのか、Pem とは独立した機構によって転写調節に寄与するのかについて調べるために、特定された因子の MO を注入した胚の生殖細胞系列の核において Pem タンパク質が減少するかを調べるとよい。

また、胚性発現の開始に寄与する因子の探索をする。特に、生殖細胞系列の発現を正に制御する転写因子の探索は重要である。*postplasmic/ PEM* mRNAs のうち、転写因子をコードしているのは *Macho-1* (Nishida and Sawada et al.,

2001）及び *Ets*（Miya and Nidhida, 2003）があるので、これらを第一の候補

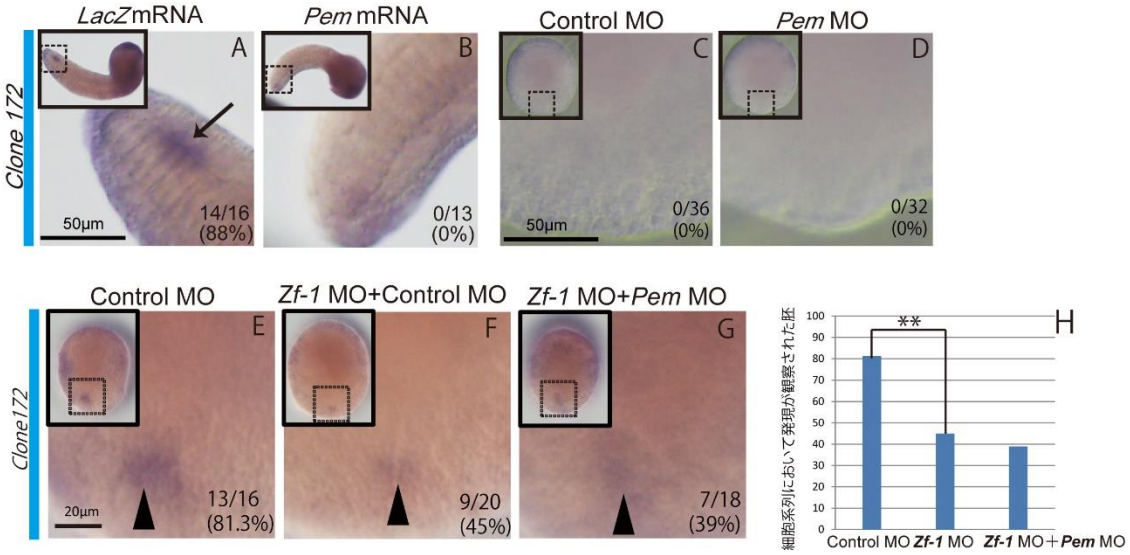

Fig. 13 Zf-1 による *Clone172* の胚性発現と Pem の制御

A, B: *LacZ* mRNA を生殖細胞系列 B 5. 2 の左右両側に顕微注入した胚では尾芽胚の生殖細胞系列での *Clone 172* の発現が観察される（A）。*Pem* mRNA を B 5. 2 の左右両側に顕微注入し過剰発現を行い、これら子孫細胞で Pem タンパク質の減少を抑えたところ、*Clone 45* の発現が弱くなった（B)。矢印は生殖細胞系列での発現を示している。図は、側面から撮影した胚である。右が胚の前方、左が胚の後方である。

C, D: 受精卵に control MO を注入し、110 細胞期からアクチノマイシン D 処理をした胚では生殖細胞系列における *Clone 172* の発現は検出されなかった（C）。*Pem* MO を受精卵に顕微注入した胚においても *Clone 172* の発現は検出されなかった（D）。上が胚の前方、下が胚の後方である。

E-H: 受精卵に control MO を注入し、神経板期からアクチノマイシン D 処理をした胚では、*Clone 172* の発現が観察される（E, 矢印）。*Zf-1* MO と control MO を受精卵に顕微注入した胚では、生殖細胞系列での *Clone 172* の明瞭な発現を示す胚の数が減少した（F)。*Zf-1* MO と *Pem* MO を顕微注入した胚においても生殖細胞系列での *Clone 172* の明瞭な発現を示す胚の数が減少した（G)。H は E-G の胚の生殖細胞系列において *Clone 172* の発現が観察された胚の数の割合を示している。**はカイ二乗検定を行い、P<0.01 の有意差が見られたことを示している。胚の図は、胚を腹側から撮影している。上が胚の前方、下が胚の後方である。黒矢印は生殖細胞系列における *Clone 45* の発現を示している。スケールバーは A-C は 20 μm、E-G は 50 μm である。図の左上は全胚像であり、破線で囲んだ部分を拡大して示している。右下の数字は胚性発現マーカー *Clone 45* の明瞭なシグナルが観察された胚の数を示している。

因子として解析することで、これら *postplasmic/ PEM* mRNAs が生殖細胞系列の胚性遺伝子の転写を正に制御するのか否かを調べる必要がある。また、*postplasmic/ PEM* mRNAs の他にも、β-catein タンパク質は CAB に局在することが報告されているので（Kumano et al., 2009）、β-catein についても候補因子として挙げられる。

さらに、Pem の減少後、体細胞系列遺伝子の抑制と、生殖細胞系列の胚性発現抑制との遺伝子の区別がどのようなメカニズムで行われているのかについて解析することは興味深い。他の動物においては、転写抑制因子による抑制の後、クロマチン修飾による抑制に引き継がれることが考えられているため、転写開始の指標となるヒストン H3K4 のメチル化や H4K8 のアセチル化、転写抑制の指標となるヒストン H3K27 のメチル化を検出する抗体を用いて生殖細胞系列の核のエピジェネティックな制御状態について解析する。32 細胞期以降の生殖細胞系列においてクロマチン修飾による転写抑制の状態が観察された際は、それを制御する因子の探索をする。その候補因子は *postplasmic/ PEM* mRNAs だけでなく、ヒストン H4K8 の脱アセチル化を担う histone deacetylase (HDAC) (contigs 52, 3281）、Polycomb タンパク質の Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) (contig 7325) など、他の動物で転写抑制に関わる遺伝子のオーソログが MAGEST に登録されている因子も含まれる。生殖細胞系列のクロマチン修飾を制御する因子の探索に成功した場合は、その因子の機能阻害胚の生殖細胞系列において異所的な体細胞系列遺伝子の発現が観察されるかを検証する。

ホヤの生殖細胞系列の発生における知見はその他のモデル動物と比べると乏しい。よって、生殖細胞系列の転写抑制機構だけでなく、詳細な細胞系譜の追跡や始原生殖細胞に特徴的である細胞分裂の停止機構等の現象について解析を行うことによって、新たに興味深い知見を得られることが期待される。特に、生殖細胞系列の詳細な細胞系譜は基礎的かつ重要な情報を提供するにも関わらず、マボヤでは初期原腸胚期以後は不明である。そこで、64~110 細胞期の生殖細胞系列 B 7.6 を蛍光色素 DiI で標識することで、どのステージにおいて分裂するのか、分裂パターンはカタユウレイボヤと同じであるかを解析する。そして、尾芽胚期において始原生殖細胞は正中線上に一列に並ぶことが知られているが、生殖細胞系列 B 7.6 の左右の子孫細胞がどのような配置をとるかを記載する。その際、DiI 及び DiO によって左右の生殖細胞系列を標識し、細胞を追跡する。

他にも、尾芽胚期において観察される *Pem* mRNA の点在（Fig.8 A, 白矢尻）が細胞である場合、生殖細胞系列の形成に寄与するかは興味深い。マボヤの尾

芽胚では一部の胚において、点在が存在する位置に向けて生殖細胞系列の細胞から突起状の構造観察されることを、筆者は観察した（未発表データ）。ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、ウニ等の動物では、生殖巣原基へ異動する始原生殖細胞において突起構造が観察され（Richardson and Lehmann, 2010; Campanale et al., 2014）、線虫においては始原生殖細胞の細胞質の一部がローブ状に変形し、隣接する体細胞に貪食される現象が知られている（Adbu et al., 2016）。このマボヤで観察された突起が生殖細胞系列の形成においてどのような機能を持つかは非常に興味深い。

以上のように、様々な問題が残っているが、本研究では生殖細胞系列における転写制御機構について大まかな道筋をつけることができたと考えられる。

引用文献

Abdu Y, Maniscalco C, Heddleston JM, Chew TL, Nance J. Developmentally programmed germ cell remodeling by endodermal cell cannibalism. Nat. Cell Biol. 2016: 18; 1302-1310.

Asaoka M, Sano H, Obara Y, Kobayashi S. Maternal Nanos regulates zygotic gene expression in germline progenitors of *Drosophila melanogaster*. Mech Dev. 1998: 78; 153-158.

Batchelder C, Dunn MA, Choy B, Suh Y, Cassie C, Shim EY, et al. Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1. Genes Dev. 1999: 13; 202-212.

Blackler AW. Transfer of primordial germ-cells between two subspecies of *Xenopus laevis*. J Embryol exp Morph. 1962: 10; 641-651.

Bontems F, Stein A, Marlow F, Lyautey J, Gupta T, Mullins MC, et al. Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. Curr Biol. 2009: 19; 414-422.

Brozovic M, Martin C, Dantec C, Dauga D, Mendez M, Simion P, et al. ANISEED 2015: a digital framework for the comparative developmental biology of ascidians. Nucleic Acids Res. 2016: 44; 808-818

Brozovic M, Dantec C, Dardaillon J, Dauga D, Faure E, Gineste M, et al. ANISEED 2017: extending the integrated ascidian database to the exploration and evolutionary comparison of genome-scale datasets. Nucleic Acids Res. 2017: doi: 10.1093/nar/gkx1108 (Epub ahead of print)

Breitwieser W, Markussen FH, Horstmann H, Ephrussi A. Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. Genes Dev. 1996: 10; 2179-2188.

Campanale JP, Gökirmak T, Espinoza JA, Oulhen N, Wessel GM, Hamdoun

A. Migration of Sea Urchin Primordial Germ Cells. Dev Dyn. 2014: 243; 917-927.

Chatfield J, O'Reilly MA, Bachvarova RF, Ferjentsik Z, Redwood C, Walmsley M et al., Stochastic specification of primordial germ cells from mesoderm precursors in axolotl embryos. Development. 2014: 141. 2429-2440.

Checchi PM, Kelly WG. emb-4 is a conserved gene required for efficient germline-specific chromatin remodeling during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. Genetics. 2006: 174; 1895-1906.

Crump JG, Zhen M, Jin Y, Bargmann CI. The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination. Neuron. 2001: 29; 115-129.

Deshpande G, Calhoun G, Yanowitz JL, Schedl PD. Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. Cell. 1999: 99; 271-281.

Donoughe S, Nakamura T, Ewen-Campena B, Green II DA, Henderson L, Extavour CG. BMP signaling is required for the generation of primordial germ cells in an insect. Proc Natl Acad Sci USA. 2014: 111; 4133-4138.

Edwards TA, Pyle SE, Wharton RP, Aggarwal AK. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. Cell. 2001: 105; 281-289

Ephrussi A, Dickinson LK, Lehmann R. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. Cell. 1991: 66; 37-50.

Ewen-Campen B, Schwager EE, Exravour C. The Molecular machinery of germ line specification. Mol Reprod Dev. 2010: 77; 3-18.

Ewen-Campen B, Jones TE, Extavour CG. Evidence against a germ plasm

in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*, a hemimetabolous insect. Biol Open. 2013: 16; 556-568.

Extavour CG, Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. Development. 2003: 130; 5869-5884.

Extavour CG. Evolution of the bilaterian germ line: lineage origin and modulation of specification mechanisms. Integr Comp Biol. 2007: 47; 770-785.

Gallo CM, Wang JT, Motegi F, Seydoux G. Cytoplasmic partitioning of P granule components is not required to specify the germline in *C. elegans*. Science. 2010: 330; 1685-1689.

Gavis ER, Lehmann R. Localization of *nanos* RNA controls embryonic polarity. Cell. 1992: 71; 301-313.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development. 1990: 110; 521-528.

Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. Development. 1994: 120; 135-141.

Guven-Ozkan T, Nishi Y, Robertson SM, Lin R. Global transcriptional repression in *C. elegans* germline precursors by regulated sequestration of TAF-4. Cell. 2008: 135; 149–160.

Hanyu-Nakamura K, Sonobe-Nojima H, Tanigawa A, Lasko P, Nakamura A. *Drosophila* Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. Nature. 2008: 451; 730-733.

Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA. Germ cell specification in mice. Science. 2007: 316; 394-396.

Hayashi M, ShinozukaY, Shigenobu S, Sato M, Sugimoto M, Ito S, Abe K, Kobayashi S. Conserved role of Ovo in germline development in mouse and *Drosophila*. Scientific Reports. 2017: 7; doi: 10.1038/srep40056

Hanazawa M, Yonetani M, Sugimoto A. PGL proteins self associate and bind RNPs to mediate germ granule assembly in *C. elegans*. J Cell Biol. 2011: 192; 929-937.

Hibino T, Nishikata T, Nishida H. Centrosome-attracting body: A novel structure closely related to unequal cleavages in the ascidian embryo. Dev Growth Differ. 1998: 40; 85-95.

Hotta K, Mitsuhara K, Takahashi H, Inaba K, Oka K, Gojobori T et al. A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. Development. 2007: 236; 1790-1805.

Ikenishi K. Germ plasm in Caenorhabditis elegans, Drosophila and Xenopus. Develop Growth Differ. 1998: 40; 1-10.

Illmensee K, Mahowald AP. Transplantation of Posterior Polar Plasm in Drosophila. Induction of Germ Cells at the Anterior Pole of the Egg (cytoplasmic determinants/transplantation of cytoplasm/germ-line mosaics/insect embryogenesis). Proc Nat Acad Sci USA. 1974: 71; 1016-1020.

Imai SK, Satoh N, Satou Y. A Twist-like bHLH gene is a downstream factor of an endogenous FGF and determines mesenchymal fate in the ascidian embryos. Development. 2003: 130; 4461-4472.

Johnson AD, Bachvarova RF, Drum M, Masi T. Expression of axolotl *DAZL* RNA, a marker of germ plasm: Widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad. Deve Biol. 2001: 234; 402-415.

Johnson AD, Crother B, White ME, Patient R, Bachvarova RF, Drum M, Masi T. Regulative germ cell specification in axolotl embryos: a primitive

trait conserved in the mammalian lineage. 2003. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003: 358; 1371-1379.

Kawasaki I, Shim YH, Kirchner J, Kaminker J, Wood WB, Strome S. PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in C. elegans. Cell. 1998: 94; 635-645.

Kloc M, Dougherty MT, Bilinski S, Chan AP, Brey E, King ML, Patrick CW Jr, Etkin LD. Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. Dev Biol. 2002: 241;79-93.

Kobayashi K, Sawada K, Yamamoto H, Wada S, Saiga H, Nishida H. Maternal macho-1 is an intrinsic factor that makes cell response to the same FGF signal differ between mesenchyme and notochord induction in ascidian embryos. Development. 2003: 130; 5179-5190.

Kumano G, Yamaguchi S, Nishida H. Overlapping expression of FoxA and Zic confers responsiveness to FGF signaling to specify notochord in ascidian embryos. Dev Biol. 2006: 30; 770-784.

Kumano G, Nishida H. Ascidian embryonic development: an emerging model system for the study of cell fate specification in chordates. Dev Dyn. 2007: 236; 1732-1747.

Kumano G, Nishida H. Patterning of an ascidian embryo along the anterior–posterior axis through spatial regulation of competence and induction ability by maternally localized PEM. Dev Biol. 2009: 331; 78-88.

Kumano G, Takatori N, Negishi T, Takada T, Nishida H. A maternal factor unique to ascidians silences the germline via binding to P-TEFb and RNAP II regulation. Curr Biol. 2011: 21; 1308-1311.

Kumano G. Taxon-specific maternal factors for germline specification. In: Kondoh, H, Kuroiwa A. New Principles in Developmental Processes. Heidelberg: Springer; 2014. pp. 3-11.

Kobayashi K, Sawada K, Yamamoto H, Wada S, Saiga H, Nishida H. Maternal macho-1 is an intrinsic factor that makes cell response to the same FGF signal differ between mesenchyme and notochord induction in ascidian embryos. Development. 2003: 130; 5179-5190.

Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. J Cell Sci. 2003: 116; 2117-2124.

Lai F, Luo X, Singh A, King ML. Xenopus Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. Development. 2010: 139; 1476-1486.

Leatherman JL, Levin L, Boero J, Jongens TA. germ cell-less acts to repress transcription during the establishment of the *Drosophila* germ cell lineage. Curr Biol. 2002: 12; 1681-1685.

Lehmann R. Germ-plasm formation and germ-cell determination in *Drosophila*. Curr Opin Genet Dev. 1992: 2; 543-549.

Lemaire P, Piette J. Tunicates: exploring the sea shores and roaming the open ocean. A tribute to Thomas Huxley. Open Biol. 2016: 5; doi.org/10.1098/rsob.150053

Machado RJ, Moore W, Hames R, Houliston E, Chang P, King ML, et al. *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and positioning. Dev Biol. 2005: 287; 289-300.

Makabe KW, Kawashima T, Kawashima S, Minokawa T, Adachi A, Kawamura H, et al. Large-scale cDNA analysis of the maternal genetic information in the egg of *Halocynthia roretzi* for a gene expression catalog of ascidian development. Development. 2001: 128; 2555-2567.

Makabe KW, Nishida H. Cytoplasmic localization and reorganization in ascidian eggs: role of *postplasmic/PEM* RNAs in axis formation and fate determination. Wires Dev Biol. 2012: 1; 501-518. doi: 10. 1002/ wdev. 54

Marlow F. Primordial Germ Cell Specification and Migration. F1000Res. 2015: 4; 542 doi:10.12688/f1000research.6995.1

Martinho RG, Kunwar PS, Casanova J, Lehmann R. A noncoding RNA is required for the repression of RNApol II-dependent transcription in primordial germ cells. Curr Biol. 2004: 14; 159-165.

Miya T, Morita K, Suzuki A, Ueno N, Satoh N. Functional analysis of an ascidian homologue of vertebrate Bmp-2/Bmp-4 suggests its role in the inhibition of neural fate specification. Development. 1997: 124; 5149-5159.

Miya T, Makabe K, Satoh N. Expression of a gene for major mitochondrial protein, ADP/ATP translocase, during embryogenesis in the ascidian *Halocynthia roretzi*. Dev Growth Differ. 1994: 36; 39-48.

Nakamura A, Seydoux D. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. Development. 2008; 135: 3817-3827.

Nakamura A, Shirae-Kurabayashi M, Hanyu-Nakamura K. Repression of early zygotic transcription in the germline. Curr Opin Cell Biol. 2010; 22: 709-714.

Nakamura Y, Makabe KW, Nishida H. Localization and expression pattern of type I postplasmic mRNAs in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Gene Expr Patterns. 2003: 5; 429-37.

Nakamura Y, Makabe KW, and Nishida H. POPK-1/Sad-1 kinase is required for the proper translocation of maternal mRNAs and putative germ plasm at the posterior pole of the ascidian embryo. Development. 2005: 132; 4731-4742.

Negishi T, Takada T, Kawai N, Nishida H. Localized PEM mRNA and protein are involved in cleavage-plane orientation and unequal cell divisions in ascidians. Curr Biol. 2007: 17; 1014-1025.

Nishikata T, Mita-Miyazawa I, Deno T, Satoh N. Muscle cell differentiation in ascidian embryos analyzed with a tissue-specific monoclonal antibody. Development. 1987: 99; 163-171.

Nishikata T, Mita-Miyazawa I, Deno T, Takamura K, Satoh N. Expression of epidermis-specific antigens during embryogenesis of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. Dev Biol. 1987: 121; 408–416.

Nishida H. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III Up to the tissue restricted stage. Dev. Biol. 1987: 121; 526-541.

Nishida H, Sawada K. macho-1encodes a localized mRNA in ascidian eggs that species muscle fate during embryogenesis. Nature. 2001: 409; 724-729.

Reese KJ, Dunn MA, Waddle JA, Seydoux G. Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. Mol Cell. 2000: 6; 445-455.

Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010: 11; 37-49.

Robert VJ, Garvis S, Palladino F. Repression of somatic cell fate in the germline. Cell Mol Life Sci. 2015; 72: 3599-3620.

Rongo C, Lehmann R. Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. Trends Genet. 1996: 12; 102-109.

Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. Nature. 2002: 418; 293-300.

Sardet C, Dru P, Prodon F. Maternal determinants and mRNAs in the cortex of ascidian oocytes, zygotes and embryos. Biol Cell. 2005: 97; 35-49.

Sasakura Y, Ogasawara M, Makabe KW. Two pathways of maternal RNA

localization at the posterior-vegetal cytoplasm in early ascidian embryos. Dev Biol. 2000: 220; 365-378.

Satoh N. Developmental Biology of Ascidians. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.

Satoh N, Ikegami S. On the ' clock' mechanism determining the time of tissue-specific enzyme development during ascidian embryogenesis II. Evidence for association of the clock with the cycle of DNA replication. J Embryol exp Morph. 1981: Vol. 64; 61-71.

Satou Y, Kawashima T, Shoguchi E, Nakayama A, Satoh N. An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: towards functional genomics. Zoolog Sci. 2005: 22; 837-843.

Sawada K, Fukushima Y, Nishida H. Macho-1 functions as transcriptional activator for muscle formation in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Gene Expr. Patterns 5, 429-437.

Schaner CE, Deshpande G, Schedl PD, Kelly WG. A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. Dev Cell. 2003. 5; 747-757.

Schaner, CE, Kelly WG. Germline chromatin. WormBook: 2006: 1-14.

Seydoux G, and Strome S. Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. Development. 126: 3275; 3275-3283.

Seydoux G, Dunn MA. Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. Development. 1997: 124; 2191-2201.

Seydoux G, Blackwell TK. Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1. Genes Dev. 1999: 13; 202-212.

Seydoux, G. and Brean, R. Pathway to Totipotency: Lessons from Germ Cells. Cell. 2003: 127; 891-904.

Shirae-Kurabayashi M, Nishikata T, Takamura K, Tanaka KJ, Nakamoto C, Nakamura A. Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in *Ciona intestinalis*. Development. 2006: 133; 2683-2693.

Shirae-Kurabayashi M, Matsuda K, Nakamura A. Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. Development. 2010: 138; 2871-2881.

Smith KD. Genetic control of macromolecular synthesis during development of an ascidian: *Ascidia nigra*. J Exp Zool. 1967: 164; 393-405.

Sonoda J, Wharton RP. Recruitment of Nanos to *hunchback* mRNA by Pumilio. Genes Dev. 1999: 13; 2704-2712.

Spencer WC, Zeller G, Watson JD, Henz SR, Watkins KL, McWhirter RD, et al. A spatial and temporal map of *C. elegans* gene expression. Genome Research. 2011: 21; 325-341.

Strome S, Updike D. Specifying and protecting germ cell fate.Nat Rev Mol Cell Biol. 2015; 16 (7): 406-416.

Subramaniam K, Seydoux G. *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. Development. 1999: 126; 4861-4871.

Swartz SZ, Reich AM, Oulhen N, Raz T, Milos PM, Campanale JP, et al. Deadenylase depletion protects inherited mRNAs in primordial germ cells. Development. 2014: 141; 3134-3142.

Swartz SZ, Wessel GM. Germ Line Versus Soma in the Transition from Egg to Embryo. Curr Top Dev Biol. 2015: 113; 149-190.

Tassy O, Dauga D, Daian F, Sobral D, Robin F, Khoueiry P, et al. The ANISEED database: Digital representation, formalization, and elucidation of a chordate developmental program. Genome Res. 2010: 20; 1459–1468.

Tokuoka M, Satoh N, Satou Y. A bHLH transcription factor gene, Twist-like 1, is essential for the formation of mesodermal tissues of *Ciona juveniles*. Dev Biol. 2005: 288; 387-396.

Tomioka M, Miya T, and Nishida H. Repression of zygotic gene expression in the putative germline cells in ascidian embryos. Zool Sci. 2002: 19; 49-55.

Timinszky G, Bortfeld M, Ladurner AG. Repression of RNA polymerase II transcription by a *Drosophila* oligopeptide. PLoS One 2008: 3; e2506. doi:10.1371/journal.pone.0002506

Van Doren M, Williamson AL, Lehmann R. Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. Curr Biol. 1998: 8; 243-246.

Venkatarama T, Lai F, Luo X, Zhou Y, Newman K, King ML. Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline. Development. 2010: 137; 651-660.

Wada S, Katsuyama Y, Yasugi, S, Saiga H. Spatially and temporally regulated expression of the LIM class homeobox gene Hrlim suggests multiple distinct functions in development of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. Mech Dev. 1995: 51; 115-126.

Wang C, Dickinson LK, Lehmann R. Genetics of *nanos* localization in *Drosophila*. Dev Dyn. 1994:199;103-115.

Wakahara M. Primordial germ cell development: is the urodele pattern closer to mammals than to anurans? Int J Dev Biol. 1996: 40; 653-659.

Webster PJ, Liang L, Berg CA, Lasko P, Macdonald PM. Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely

conserved. Genes Dev. 1997: 11; 2510-2521.

Yatsu J, Hayashi M, Mukai M, Arita K, Shigenobu S, Kobayashi S. Maternal RNAs encoding transcription factors for germline specific gene expression in *Drosophila* embryos. Int J Dev Biol. 2008: 52; 913-923.

Zalokar, M. Autoradiographic study of protein and RNA formation during early development of *Drosophila* eggs. Dev Biol. 1976: 49; 425-437.

Zhang F, Barboric M, Blackwell TK, Peterlin BM. A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. Genes Dev. 2003: 17; 748-758.

発表リスト

報文目録

Kaori Miyaoku, Ayaki Nakamoto, Hiroki Nishida, Gaku Kumano
Control of Pem protein level by localized maternal factors for transcriptional regulation in the germline of the ascidian, *Halocynthia roretzi*.
PLOS ONE

講演目録

○宮奥香理、西田宏記、熊野岳
「マボヤ胚生殖系列における転写抑制解除および胚性発現制御機構の解析」
『日本動物学会 第 84 回大会』3F1645・岡山・2013 年 9 月、口頭発表

○宮奥香理、中本章貴、西田宏記、熊野岳
「マボヤ胚生殖細胞系列における転写御機構の解析」
『ホヤ研究会 2014』p10・東京・2014 年 10 月、口頭発表

○宮奥香理、中本章貴、西田宏記、熊野岳
「マボヤ胚生殖細胞系列における転写御機構の解析」
『平成 28 年度 日本動物学会 東北支部大会』p7・福島・2016 年 7 月、口頭発表

○Kaori Miyaoku, Ayaki Nakamoto, Hiroki Nishida, Gaku Kumano
Regulation of germline gene expression during ascidian embryogenesis.
『The 8th international tunicate meeting』, Aomori, Japan, July 2015
ポスター発表

○宮奥香理、中本章貴、西田宏記、熊野岳
「マボヤ胚生殖細胞系列における転写御機構の解析」
『新学術領域研究「配偶子産生制御」第 6 回領域会議』p4・東京・2016 年 9 月、ポスター発表

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さり、適切なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院理学研究科の西田宏記教授、東北大学生命科学研究科附属浅虫海洋生物教育研究センターの熊野岳教授に深く感謝致します。

熊野岳教授には、研究においての適切なご指導・ご助言のみならず、日常の様々なことについても大変多くのご指導を頂きました。ご指導を通して、研究者としての姿勢や考え方等たくさんのことを学ばせて頂きました。

西田宏記教授は、熊野教授が浅虫海洋生物学教育研究センターへ転任される際、特別研究学生として浅虫へ異動することを快く認めてくださり、異動後も熱心に研究のご指導を賜りました。

大阪大学理学研究科発生生物学研究室の皆様、浅虫海洋生物学教育研究センターの皆様には研究のみならず、多くの面で助けて頂きました。発生生物学研究室の小沼健助教、西野敦雄助教（現弘前大学准教授）、高鳥直士博士（現首都東京大学准教授）、浅虫海洋生物学教育研究センターの中本章貴助教、根岸剛文特任助教には実験方法のご指導と、研究のご助言を頂きました。
特に、中本助教には研究のご指導の際に、納得がいくまで議論して頂きました。そして、浅虫で立ち上がったばかりの新研究室での、研究が円滑に行える環境を作ってくださいました。浅虫海洋生物学教育研究センターの美濃川拓哉准教授もまた、研究が円滑に行える環境を作ってくださりました。元スタッフである沼宮内隆晴博士には、ホヤの飼育・管理についてご指導頂きました。

東北大学生命科学研究科附属浅虫海洋生物研究センター、東京大学海洋研究所付属大槌国際沿岸海洋研究センター、京都大学理学研究科付属瀬戸臨海研究所、神戸市立須磨水族館、大阪府立水産技術センターの皆様には、ホヤの採集、飼育や海水の使用にあたって大変お世話になりました。特に、東北大学生命科学研究科附属浅虫海洋生物研究センター技術職員の鷲尾正彦氏、阿部広和氏には多大なるご協力を頂きました。

最後に長い学生生活を常に見守り、支え、激励してくれた両親と、研究活動を応援してくれた広島、静岡、大阪、青森で出会った沢山の素敵な友人に感謝致します。