博士（理　学）　小　林　弘　子

学位論文題名

Molecular mechanisms of germ cell differentiation during gametogenesis in the teleosts

（魚類配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子機構）

学位論文内容の要旨

生殖細胞は個体を形成する細胞の中で唯一、次世代に生命を伝える細胞であり、脊椎動物では、配偶子形成過程を通じて生殖細胞は精子と卵に分化する。この過程は、高度に調節された一連の細胞周期から成り立ち、次の３つの分化過程から構成される：（１）体細胞分裂、（２）減数分裂、（３）減数分裂後の配偶子への分化。配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子制御機構を明らかにするためには、生殖細胞分化過程における体細胞型、及び生殖細胞（減数分裂）型の細胞周期を制御する遺伝子産物の同定とその特性を明らかにする必要があるが、その分子制御機構は未だ不明な点が多い。これは、生殖細胞分化を明らかにするための優れた *in vivo* や *in vitro* での解析系が少ないことに因る。

配偶子形成過程にある生殖細胞分化の分子機構を明らかにするための優れた解析系として、魚類では、卵成熟過程解析のためのキンギョの系と、精子形成過程解析のためのニホンウナギの系が既に確立されている。両者はいずれも、ホルモンの刺激によって生殖細胞の分化過程が開始、進行する。本研究は、これら魚類の解析系を用いて、卵成熟と精子形成の開始、進行について、細胞周期関連遺伝子産物を同定し、その特性を明らかにすることで、未だ不明な点が多い配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子制御機構に関する新知見を得る目的で行われた。

第１章　キンギョ卵成熟過程における cdc2 の挙動

ホルモン刺激により *in vitro* で自由に卵成熟を誘起できるキンギョは、卵成熟の分子機構を探る優れた実験系である。卵成熟は、全真核生物に普遍的な細胞周期調節の鍵分子であるサイクリン依存性キナーゼ（cdk）の一種、M期促進因子（MPF）により最終的に誘起される。MPF の形成・活性化の分子機構を探るため、キンギョ卵成熟過程における MPF の構成分子（cdc2 とサイクリンＢ）の挙動を調べた。未成熟卵と成熟卵抽出液のゲル濾過画分のイムノブロット解析の結果、キンギョ未成熟卵にはサイクリンＢは存在せず、卵成熟過程でサイクリンＢが新たに合成され、これがすでに存在する cdc2 と結合して複合体を形成し、それと同時に cdc2 の活性化が起こることが判った。ツメガエル未成熟卵には不活性型 cdc2-サイクリンＢ複合体がすでに存在するので、ツメガエルとキンギョで異なる MPF 形成・活性化機構を採用していることが明らかになった。

第２章　キンギョ卵成熟過程における Mos の挙動とその機能解析

原ガン遺伝子産物 Mos は、ツメガエルでは卵成熟の開始と第二減数分裂中期(MII)での停止に関わることが知られている。本章ではキンギョ卵成熟過程における Mos の機能を調べた。Mos 蛋白質は卵成熟の途中で出現し始め、MII で停止した成熟卵で最大量となった。mRNA の注射により、ツメガエル及びキンギョの２細胞期胚の割球で Mos を強制発現させると、細胞分裂は中期で停止した。キンギョ未成熟卵に Mos を強制発現させても卵成熟

を誘起しなかった。アンチセンスRNAでキンギョ卵成熟過程に起こるMosの合成を阻害しても卵は成熟した。これらの結果は、Mosは両種において共通にMII停止に関わるが、キンギョではMosは卵成熟の開始に関与しないことを示す。

第3章　ウナギ精子形成過程におけるE型サイクリンの発現と機能解析

精巣内の生殖細胞が幹細胞型精原細胞のみで構成されているニホンウナギは、ホルモン刺激によって精子形成が開始し、完全な精子形成が *in vivo* 及び *in vitro* で再現できる脊椎動物で唯一の優れた解析系である。この精子形成誘起過程における生殖細胞の分裂・増殖の詳細を明らかにする目的で、細胞周期の主要調節因子cdkの調節サブユニットであるサイクリン（A型、B型、E型）の発現と機能を解析した。本章ではE型サイクリンを調べた。ノーザンブロットと *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果、サイクリンE1 mRNAは顕著な変化を示さないが、サイクリンE2 mRNAは精原細胞に発現し、その増殖パターンと一致する変化を示すことが判った。エレクトロポレーション法による精巣組織細片へのE型サイクリンの遺伝子導入実験の結果は、ホルモン刺激による精子形成誘起後に起こるサイクリンE2の発現の増加が、幹細胞型（A型精原細胞）から分化型精原細胞（B型精原細胞）への移行、増殖に重要な役割を果たすことを示唆した。

第4章　ウナギ精子形成過程におけるA型サイクリンの発現動態

本章ではノーザンブロットと *in situ* ハイブリダイゼーションによって、精子形成誘起過程におけるA型サイクリンの発現動態を調べた。サイクリンA2 mRNAは精原細胞、第二精母細胞、精細胞、体細胞に発現していたが、サイクリンA1 mRNAは第一精母細胞から精細胞までのステージで特異的な発現が認められた。減数分裂期のマーカーであるDmc1の発現解析から、サイクリンA1の発現は第一減数分裂後期から始まることが明らかにされた。

第5章　ウナギ精子形成過程におけるB型サイクリンの発現動態

3種のB型サイクリン（B1、B2、B3）のcDNAをクローニングし、ホルモンによる精子形成誘起過程における、mRNAの発現動態を調べた。サイクリンB1とB2のmRNAは精原細胞から精母細胞のステージで発現し、サイクリンB3 mRNAは精原細胞にのみ発現していた。これらの結果から、サイクリンB3は他のサイクリンBとは異なる機能を持つことが示唆された。

第6章　ウナギ精子形成過程におけるB型サイクリンの挙動とキナーゼ活性

第5章で述べた3種のウナギB型サイクリンについて、それぞれに対する特異的抗体を作製し、ウナギの精子形成過程におけるこれら蛋白質の動態を解析した。これらはホルモン投与後3日目から、サブタイプに関係なくcdc2と複合体（MPF）を形成した。そのキナーゼ活性も3日目に初めて検出され、B3-cdc2複合体がもっとも高い活性を示した。免疫組織化学法による検査では、サイクリンB1及びB2は精原細胞と精母細胞に局在し、サイクリンB3は精原細胞にのみ局在が認められた。精子形成過程におけるこれらB型サイクリンの発現様式とキナーゼ活性における差異は、それぞれのB型サイクリンが精子形成過程で異なる役割を担っていることを示唆する。また、mRNAレベルの解析結果と合わせて考えると、ウナギサイクリンB3は、減数分裂過程ではなく、精原細胞の分裂・増殖過程に特異的に関与することが強く示唆された。

以上、本研究は配偶子形成を解析するための優れた実験系を用いて、これまで不明な点の多かった脊椎動物の配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子制御機構に新たな知見を提供した。特に、1）キンギョ卵成熟の研究から、MPFはあらゆる真核生物に共通の分子構造を持つが、その形成と活性化の機構は種により異なること、2）ウナギ精子形成の研究から、サイクリンE2が精子形成の開始とB型精原細胞の増殖を制御し、サイクリン

B3 が精原細胞の増殖過程に特異的に関与していることを初めて示した点は重要で、生殖生物学に多大な貢献をなすものと考える。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　山　下　正　兼
副　査　教　授　高　橋　孝　行
副　査　助教授　若　原　正　己
副　査　助教授　清　水　　隆
副　査　教　授　長　濱　嘉　孝（自然科学研究機構 基礎生物学研究所）

学位論文題名

Molecular mechanisms of germ cell differentiation during gametogenesis in the teleosts

（魚類配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子機構）

生殖細胞は、個体を形成する細胞の中で唯一、次世代に生命を伝える細胞であり、脊椎動物では、配偶子形成過程を通じて生殖細胞は精子と卵に分化する。配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子制御機構を明らかにするためには、生殖細胞分化過程における体細胞型及び生殖細胞（減数分裂）型の細胞周期を制御する遺伝子産物の同定と、それらの特性を明らかにする必要があるが、未だ十分な研究がなされていない。

本研究は、卵成熟過程解析のためのキンギョの系と、精子形成過程解析のためのニホンウナギの系を用いて、卵成熟と精子形成の開始、進行について、細胞周期関連遺伝子産物を同定し、それらの特性を明らかにすることで、未だ不明な点が多い配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子制御機構に関する新知見を得る目的で行われた。

学位論文は6章からなる。第1章ではキンギョ卵成熟過程におけるcdc2の挙動が解析された。卵成熟はM期促進因子（MPF）により最終的に誘起される。キンギョ卵成熟過程におけるMPFの構成分子（cdc2とサイクリンB）の挙動を調べた結果、未成熟卵にはサイクリンBは存在せず、卵成熟過程でサイクリンBが新たに合成され、これがすでに存在するcdc2と結合して複合体を形成し、それと同時にcdc2の活性化が起こることが判った。これはツメガエルにおける機構と明らかに異なる。

第2章ではキンギョ卵成熟過程におけるMosの機能を調べた。原ガン遺伝子産物Mosは、ツメガエルでは卵成熟の開始と第二減数分裂中期(MII)での停止に関わることが知られている。ツメガエル及びキンギョの割球でMosを強制発現させると、細胞分裂は中期で停止した。キンギョ未成熟卵にMosを強制発現させても卵成熟を誘起しなかった。アンチセンスRNAでキンギョ卵成熟過程に起こるMosの合成を阻害しても卵は成熟した。これらの結果は、Mosは両種において共通にMII停止に関わるが、キンギョではMosは卵成熟の開始に関与しないことを示す。

第3章ではウナギ精子形成過程におけるE型サイクリンの発現と機能解析が行われた。サイクリンE1 mRNAは顕著な変化を示さないが、サイクリンE2 mRNAは精原細胞に

発現し、その増殖パターンと一致する変化を示すことが判った。精巣組織細片へのE型サイクリンの遺伝子導入実験の結果は、ホルモン刺激による精子形成誘起後に起こるサイクリンE2の発現の増加が、幹細胞型（A型精原細胞）から分化型精原細胞（B型精原細胞）への移行、増殖に重要な役割を果たすことを示唆した。

第4章　ではウナギ精子形成におけるA型サイクリンの発現動態を調べた。サイクリンA2 mRNAは精原細胞、第二精母細胞、精細胞、体細胞に発現していたが、サイクリンA1 mRNAは第一精母細胞から精細胞までのステージで特異的な発現が認められた。減数分裂期のマーカーであるDmc1の発現解析から、サイクリンA1の発現は第一減数分裂後期から始まることが明らかにされた。

第5章ではウナギ精子形成過程における3種のB型サイクリン(B1、B2、B3)のmRNAの発現動態を調べた。サイクリンB1とB2のmRNAは精原細胞から精母細胞のステージで発現し、サイクリンB3 mRNAは精原細胞にのみ発現していた。

第6章ではウナギ精子形成過程における3種のB型サイクリン蛋白質の動態を解析した。これらはホルモン投与後3日目からcdc2と複合体（MPF）を形成し、活性化した。サイクリンB1及びB2は精原細胞と精母細胞に局在し、サイクリンB3は精原細胞にのみ局在が認められた。これらの事から、ウナギサイクリンB3は、減数分裂過程ではなく、精原細胞の分裂・増殖過程に特異的に関与することが強く示唆された。

以上をまとめると、著者は魚類の実験系を用いて、これまで不明な点の多かった脊椎動物の配偶子形成過程における生殖細胞分化の分子制御機構に新たな知見を提供した。特に、1）キンギョ卵成熟の研究から、MPFはあらゆる真核生物に共通の分子構造を持つが、その形成と活性化の機構は種により異なること、2）ウナギ精子形成の研究から、サイクリンE2が精子形成の開始とB型精原細胞の増殖を制御し、サイクリンB3が精原細胞の増殖過程に特異的に関与することを初めて示した点は重要である。これらの成果は魚類の持つ特性を十分に生かした緻密な研究により得られたもので、生殖生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。