

氏 名（本籍）	おおのひろこ 大 野 裕 子
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 0 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 1 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 病 理 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	始 原 生 殖 細 胞 の 発 生 過 程 を 制 御 す る 遺 伝 子 の 単 離 と その 機 能 解 析

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 帶 刀 益 夫	教 授 田 村 眞 理
	教 授 野 田 哲 生	

論文内容要旨

始生殖細胞 (PGC) の発生過程に関与する遺伝子の単離を目的として以下の研究をおこなった。PGC 由来の EG 細胞および内部細胞塊由来の ES 細胞の cDNA で EG-ES というサブトラクションをおこない、EG 細胞特異的に発現するクローンを選択することで EG 細胞が保持すると考えられる PGC としての性質を反映する cDNA を濃縮しようとした。サブトラクションにより濃縮された EG-ES cDNA ライブラリーから 103 クローンをクローニングし、ノザンプロットによって ES 細胞よりも EG 細胞で多く発現する 16 クローンを選択した。これらの EG 細胞での発現量は ES 細胞に比べて 1.9 倍～56 倍多かった。これらの塩基配列を調べたところ、新規遺伝子が 11 クローン、既知遺伝子と 70%以上の相同性があったのは 5 クローンであった。さらに生体内での発現をホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討し、PGC 存在部位または近接部位で発現するクローン 31 および 111 を選択した。31 は胚体外外胚葉で発現し、また 111 は生殖巣原基である生殖隆起において発現していた。胚体外外胚葉は胚体外外胚葉から PGC を誘導する因子を供給する組織であり、クローン 31 が PGC 誘導に関与する可能性が考えられたのでクローン 31 についてもさらに解析をおこなった。

クローン 31 について EG 細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、その結果得られた約 2.0kb の cDNA の塩基配列を決定した。得られた配列中にはコザック配列を含む開始コドンは見られず、coding region を完全にカバーしていないと予想される。しかしこの cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列中にはラットの nuclear pore glycoprotein p62 との相同性が見いだされ、クローン 31 が新規の核膜孔タンパクである可能性が示唆された。さらに、切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションをおこない、細胞レベルでの発現を検討した。その結果、クローン 31 は 5.5 および 6.5dpc 胚の胚体外外胚葉の細胞で確かに発現していることが明らかになった。しかし PGC 出現後の時期である 7.5dpc 胚ではその発現が検出できず、6.5～7.5dpc のあいだに発現量の減衰が起こることが示唆された。PGC の出現前という時期特異的に胚体外外胚葉で発現するクローン 31 は、PGC 誘導因子の産生等に関与する可能性が考えられる。

クローン 111 は ErbB-3 をコードしており、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより ErbB-3 mRNA が 13.5dpc の雌雄の生殖隆起で発現することが明らかになった。さらに、ErbB-3 タンパクはオス生殖隆起において PGC と支持細胞とで PGC が増殖期にある 12.5dpc から発現し、PGC が増殖を停止する 13.5dpc 以降に発現する細胞数が減少した。メスでは、生殖隆起のほとんどの細胞で ErbB-3 mRNA の発現が見られたが、タンパクレベルでは一部の体細胞のみで発現が検出され、ほとんどの細胞では低レベルで発現していると考えられる。また、ErbB-3

が生殖隆起のPGCで発現することを確認するために、ErbB-3抗体およびPGC特異的抗原であるTRA98を用いて二重染色した。ErbB-3はTRA98陽性のPGCおよび陰性の支持細胞、さらに一部の間質細胞に発現していることが明らかになった。同時にErbB-3のco-receptorであるErbB-2も生殖隆起のPGCで発現することが明らかになった。以上より、生殖隆起のPGCにおいてErbB-2およびErbB-3が発現してヘテロダイマーを形成し機能する可能性が示唆された。さらに、ErbB-3のリガンドであるNeuregulinの生殖隆起での発現を検討したところ、Neuregulin- β が支持細胞で発現し、ErbB-3と同様に13.5dpc以降に発現する細胞数が減少した。続いて、PGCに対するNeuregulin- β の効果をPGC初代培養系において検討したところ、Neuregulin- β の添加によって雌雄ともにPGC数の有意な増加が認められた。以上の結果から、ErbB-2、ErbB-3およびNeuregulin- β がPGCの増殖あるいは生存を支持し、これらの発現がなくなることでPGCの増殖停止またはその後の細胞死が引き起こされる可能性が考えられる。

審査結果の要旨

精子、卵子などの生殖細胞に分化する能力をもつ始原生殖細胞（PGC）の個体発生での発生過程の制御に働く遺伝子の単離を目的として以下の研究をおこなった。PGC由来のEG細胞および内部細胞塊由来のES細胞のcDNAでEG-ESというサブトラクションをおこないPGCとしての性質を反映する103クローンをクローニングし、ノザンプロットによってES細胞よりもEG細胞で多く発現する16クローンを選択した。これらの塩基配列を調べたところ、新規遺伝子が11クローン、既知遺伝子と70%以上の相同性があったのは5クローンであった。さらに生体内での発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討し、PGC存在部位または近接部位で発現するクローン31および111を選択した。

クローン31の約2.0kbのcDNAの塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列から新規の核膜孔タンパクと考えられた。切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションより、クローン31は5.5および6.5dpc胚の胚体外外胚葉の細胞で確かに発現しているが、PGC出現後の時期である7.5dpc胚ではその発現が検出できず、6.5～7.5dpcのあいだに発現量の減衰が起こることが示唆された。PGCの出現前という時期特異的に胚体外外胚葉で発現するクローン31は、PGC誘導因子の産生等に関与する可能性が考えられた。

クローン111はEGF受容体のホモログであるErbB-3をコードしており、そのmRNAが13.5dpcの雌雄の生殖隆起で発現していた。ErbB-3抗体およびPGC特異的抗原であるTRA98を用いて二重染色し、ErbB-3が生殖隆起のPGCで発現することを確認した。同時にErbB-3のco-receptorであるErbB-2も生殖隆起のPGCで発現することが明らかになった。以上より、生殖隆起のPGCにおいてErbB-2およびErbB-3が発現してヘテロダイマーを形成し機能する可能性が示唆された。さらに、ErbB-3のリガンドであるNeuregulin- β は生殖隆起支持細胞で発現し、ErbB-3と同様に13.5dpc以降に発現する細胞数が減少した。さらに、Neuregulin- β の添加によってPGC初代培養系で雌雄ともにPGC数の有意な増加が認められた。以上の結果から、ErbB-2、ErbB-3およびNeuregulin- β がPGCの増殖あるいは生存を支持し、これらの発現がなくなることでPGCの増殖停止またはその後の細胞死が引き起こされる可能性が示唆された。

これらの研究結果は、生殖系列細胞の個体発生に於ける発生の制御因子を新たに同定したもので、細胞生物学、発生生物学研究に貢献するものであり、医学博士を授与するにふさわしいものと考えられる。