

(論文内容の要旨)

生殖細胞は分化の過程で全能性を再獲得する能力を有し、その分子特性や分化機構を理解することは、生命科学における重要課題の1つである。これまでに、始生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) の遺伝子発現を単一細胞レベルで解析する方法により、PGCs で強く、或いは特異的に発現する遺伝子として *fragilis* (*mil-1 / ifitm3*), *stella* (*pgc7 / Dppa3*), *Blimp1* (*Prdm1*) が同定されてきた。特に *Blimp1* は PGCs 形成過程の最初期に発現を開始し、その分化に必須な因子である事が示された。また PGCs の経時的な単一細胞遺伝子発現解析及び免疫蛍光染色法等から、初期の PGCs 分化過程は少なくとも3つのキーイベント、(1) Hox 遺伝子の発現抑制にみられる体細胞中胚葉化プログラムの抑制と、(2) Sox2 遺伝子の再発現にみられる潜在的多能性の再獲得、(3) その後に引き起こされるゲノムワイドなエピジェネティックリプログラミングが関与する事が示唆された。本研究は、PGC形成機構のより詳細な解明を目的とした。

まず、運命決定直後の *Blimp1* 陽性, *stella* 陰性の PGC 前駆細胞におけるヒストン修飾の状態を解析し、PGC 前駆細胞においてはゲノムワイドなエピゲノム情報の変化は見られず、体細胞中胚葉分化プログラムの抑制及び潜在的多能性の再獲得プロセスが完了した分化決定後の PGCs において、ゲノムワイドなエピジェネティックリプログラミングが引き起こされる事が示された。同時に、エピジェネティックリプログラミングを引き起こすための分子基盤は運命決定直後の PGC 前駆細胞の分化過程で確立される事が示唆された。そこでこのプロセスを詳細に理解する事を目的として、運命決定直後の PGC 前駆細胞で発現が誘導されることが示されていた *Prdm14* (PR domain-containing transcriptional regulator) に着目し、この遺伝子の機能解析を行った。*Prdm14* プロモーターの制御下に細胞膜ターゲット型 Venus タンパク質を発現するレポーターマウス (*Prdm14*-mVenus) を用いてこの遺伝子の発現パターンを解析したところ、E6.5 のエピブラスト及び原条の最近位部後方領域に位置する PGC 前駆細胞にて発現が誘導される事、生殖細胞系列に非常に特異的な発現パターンを示し、その発現を E14.5 まで維持する事が示された。そこで、詳細な機能解析を目的として *Prdm14* 遺伝子欠損マウスを作成した。*Prdm14* 遺伝子欠損マウスは正常に生まれ外見上異常が見られないが、雌雄ともに生殖細胞が完全に失われ不妊であった。この結果から、*Prdm14* が生殖細胞系列特異的な機能を有する事が示唆された。さらに詳細に解析したところ、生殖細胞形成異常が最初期の PGC 分化異常に起因する事、特に、潜在的多能性の再獲得とその後の PGC 分化プロセスに必須である事が遺伝学的に示された。この結果は体細胞中胚葉分化プログラムの抑制と潜在的多能性の再獲得が独立して制御されている事を示唆している。また興味深い事に *Prdm14* 遺伝子欠損マウスにおいては、*Blimp1 / Prdm1* が発現しているにもかかわらず、上記のプロセスに異常が認められた。さらに *Blimp1*, *Bmp4*, *Smad1* の遺伝子欠損マウスにおける *Prdm14* の発現を解析した結果、*Prdm14* が哺乳類動物に於ける生殖細胞系列の分化決定プロセスにおいて、*Blimp1* と同様に *Bmp4*-*Smad1* シグナルにより発現誘導され、Sox2 の発現再活性化を介した『潜在的多能性の再獲得』に必須である事が示された。

(論文審査の結果の要旨)

生殖細胞系列の性質を理解する為には全分化過程において緻密な研究が必要とされる。しかしながら、最初期の生殖細胞である始原生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) の分化決定機構は不明な点が多く、その分化決定に寄与する遺伝子群も十分に同定されていない。そこで申請者は運命決定直後の PGC 前駆細胞で発現が誘導されることが示されていた *Prdm14* に着目し、この遺伝子の機能解析を行った。

申請者はまず、*Prdm14* タンパク質を特異的に認識するラビットポリクローナル抗体を作製し、*Prdm14* が生殖細胞系列特異的に発現誘導される事を示した。さらに *Prdm14* の詳細な遺伝子発現解析を行う事を目的として、*Prdm14* プロモーターの制御下に細胞膜ターゲット型 Venus タンパク質を発現するレポーターマウス (*Prdm14*-mVenus) を作製し、この遺伝子が最も早く発現が誘導される生殖細胞特異的な遺伝子である事を示した。

そこで申請者は、*Prdm14* の機能解析を目的として *Prdm14* 遺伝子欠損マウスを作製した。*Prdm14* 遺伝子欠損マウスは正常に生まれ外見上異常が見られないが、雌雄ともに生殖細胞が完全に失われ不妊であった。この結果から、*Prdm14* が生殖細胞系列特異的な機能を有し、生殖細胞形成に必須である事が示された。申請者はさらに詳細に解析を進め、生殖細胞形成異常が E7.25 頃から見られる事を突き止め、*Prdm14* が PGC の形成機構に寄与する事を示した。次に申請者は *Prdm14* 遺伝子欠損 PGCs において、初期の PGCs 分化プロセスである (1) Hox 遺伝子の発現抑制に代表される『体細胞中胚葉化プログラムの抑制』と、(2) Sox2 遺伝子の再活性化に代表される『潜在的多能性の再獲得』が正常に進行しているか否か解析した。その結果、『体細胞中胚葉分化プログラム』が *Prdm14* 非存在下でも進行する一方で、*Prdm14* 遺伝子欠損 PGCs では Sox2 の発現再活性化が正常に行われず、『潜在的多能性の再獲得』が破綻している事が示唆された。同時に、『体細胞中胚葉分化プログラム』と『潜在的多能性の再獲得』がそれぞれ独立して制御されている事も示唆された。

Prdm14 が最初期の PGCs 分化プロセスに寄与する事が示された事から、申請者は *Prdm14* の発現が誘導される遺伝学的経路の解析を行った。*Blimp1*, *Bmp4*, *Smad1* の遺伝子欠損マウスにおける *Prdm14* の発現を解析した結果、この遺伝子の発現が *Blimp1* と同様に、生殖細胞系列分化誘導シグナルである *Bmp4*-*Smad1* シグナル依存的である事が示された。

以上より申請者は、*Prdm14* が哺乳類動物に於ける生殖細胞系列の分化決定プロセスにおいて、*Blimp1* と同様に *Bmp4*-*Smad1* シグナルにより発現誘導され、Sox2 の発現再活性化を介した『潜在的多能性の再獲得』に必須である事を示した。この成果は生殖細胞形成機構の解明、特に、生殖細胞系列が潜在的多能性を再獲得する分子メカニズムの解明に重要な寄与をしたと判定できる。

よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認められる。なお、平成 20 年 8 月 1 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。