

京都大学	博士（生命科学）	氏名	廣田 孝幸
論文題目	マウス生殖細胞系列における薬剤依存的遺伝子操作系の構築と <i>Blimp1</i> 機能解析への応用		
(論文内容の要旨)			
多細胞生物を構成する細胞は、体細胞と生殖細胞に大別される。マウスにおいて、卵子や精子の起源となる始原生殖細胞（Primordial Germ Cells: PGCs）は、その発生過程において、体細胞化の抑制・多能性の再獲得・生殖細胞特異的な遺伝子発現・活発な増殖・インプリントの消去を含むゲノムワイドなエピゲノムリプログラミング・性分化など、次世代に遺伝情報を継承する上で重要な現象を順序立てて起こすことが知られている。ところがこれらの現象の分子機構は、その大部分が未解明である。その理由の一つとして、PGCsに特異的な遺伝子操作を可能とする適切な実験系がこれまで存在しなかったことが挙げられる。 申請者は、第一に、PGCs特異的に、高い効率で、また薬剤依存的に遺伝子組み換えを誘導しうるマウス系統の樹立を行い、第二に、それを用いてPGCsの増殖・生存における転写制御因子<i>Blimp1</i>の機能を解明することを目的とする研究を行い、これらを合わせて、学位論文に記載した。 第一に、申請者は、PGCs、生後卵母細胞、着床前胚で特異的に強く発現する<i>stella</i>遺伝子の発現制御下に、薬剤[4-hydroxytamoxifen(4-OHT)]によってCre recombinase 組換えを誘導できるMER(murine estrogen receptor)-Cre-MER (MCM)、及びそれにPEST配列を付与したMCM-PEST(MCMP)、を発現するトランスジェニックマウス系統を樹立した。申請者は、<i>stella-MCM</i>及び<i>stella-MCMP</i>トランスジェニックマウス両系統が、PGCs、生後卵母細胞、着床前胚において、特異的、4-OHT依存的、高効率なCre組換えを起こす事を示した。特に、<i>stella-MCMP</i>マウスは、発生9.5日（E9.5）以降のPGCsにおいて70%以上の遺伝子組み換えを起こし、それ以外の細胞では全く組み換えを起こさなかった。また、<i>stella-MCM</i>マウスは、すべての成熟段階の卵母細胞で90%以上の組み換えを起こした。 第二に、申請者は、樹立した<i>stella-MCMP</i>系統を利用して、PGCsの増殖・生存における、BLIMP1の機能解析を行った。BLIMP1は、PGCsの形成に必須であることが知られている転写制御因子である。申請者は、BLIMP1は、PGCsにおいて、オスではE13.5まで、メスではE12.5まで発現することを示した。<i>stella-MCMP</i>系統を利用して、E9.5-11.5のPGCにおいて<i>Blimp1</i>を欠損させると、オスメスともにPGCsの顕著な減少が引き起こされる事がわかった。また特にメスにおいては、E9.5とE11.5での<i>Blimp1</i>欠損PGCsの表現型に違いが見られた事から、BLIMP1が、E9.5-11.5の間とE11.5以降の時期のメスPGCsにおいて別個の現象を制御している可能性が示された。 以上、申請者は、PGCs、生後卵母細胞、着床前胚で、薬剤依存的に高い効率で遺伝子組み換えを起こしうるマウス系統の樹立に成功し、それを用いて、PGCsの増殖・生存における、BLIMP1の必要性を示した。この結果をふまえて、<i>stella-MCM</i>及び<i>stella-MCMP</i>トランスジェニックマウスの今後の利用法や、PGCsの増殖・生存における、BLIMP1のさらなる機能解析・解明などを議論している。			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、生殖系列の起源である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells, PGCs)において、特異的かつ薬剤依存的にDNA組換えを起こす新規トランスジェニックマウスモデルを作成し、またそれを利用して、PGCsの増殖・生存における転写制御因子BLIMP1の役割を解析し、報告している。

PGCsにおいてCre組換えを起こすマウス系統が過去にいくつか報告され利用されて来たが、それらは組換え効率・特異性・組換えのコントロール・組換え時期のいずれかの点において問題を有し、PGCsの発生過程における遺伝子機能解析は困難な状況であった。申請者は、PGC特異的遺伝子である *stella* の発現調節領域下に、薬剤 (4-Hydroxytamoxifen) 依存的にCre組換えを誘導できるMER (murine estrogen receptor) -Cre-MER (MCM)を導入したBACを作成し、それを用いて *stella*-MCMトランスジェニックマウスを樹立した。またタンパク質分解促進配列であるPEST配列を付与したMCM-PEST (MCMP)についても同様にトランスジェニックマウスを樹立した。マウスの発生過程において、*stella* は、着床前胚・PGCs・生後卵母細胞で発現する。申請者は、これら3つの発生時期／細胞系譜における *stella*-MCM(P)系統によるCre組換え能を検証し、*stella*-MCM(P)系統が、いずれにおいても、特異的・薬剤依存的・高効率にCre組換えを起こすことを示した。

また申請者は、樹立した *stella*-MCMP系統を利用し、PGC発生過程において *Blimp1* のコンディショナルノックアウト (cKO)を行った。*Blimp1* はPGCの発生最初期 (E6.25) から発現する転写制御因子である。通常のノックアウトにより、BLIMP1はPGCの形成に必須であることが知られているが、PGCsのその後の発生におけるBLIMP1の役割は未解明であった。申請者は、PGCが生殖巣へ移動しているE9.5、生殖巣に到達したE11.5、性分化が進むE13.5にそれぞれ *Blimp1* cKOを行い、その結果、E9.5、E11.5でのcKOによりPGCsが顕著に減少する事がわかった。またオスのE9.5、E11.5でのcKO、メスのE9.5でのcKOでは組換え誘導後3日でPGC減少が見られた一方で、メスのE11.5でのcKOではより遅い7日での減少が見られた。このことから、申請者は、E9.5-11.5とE11.5以降のメスPGCsにおいて *Blimp1* が別個の現象の制御に関わるのではないかと考察した。

以上、申請者は、PGC発生機構の解明に有用な系を構築し、またそれを利用してPGC発生過程における *Blimp1* の必要性を初めて明らかにしており、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た。なお、平成24年2月7日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、PEST配列付与によるMCMタンパク質の安定性変化、*Blimp1* cKOによるPGCsの詳細な動態に関する質疑等がなされたが、申請者はそれらに適切に応答し、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：25年3月31日