九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Studies on the Expression of Germ Cell-Specific Proteins with their Gene Promoter Methylation and the Proliferation of Primordial Germ Cells in Chicken

木藤, 学志

https://hdl.handle.net/2324/1441318

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏　　名　：　木　藤　　学　志

論文題目　：　Studies on the Expression of Germ Cell-Specific Proteins with their Gene Promoter Methylation and the Proliferation of Primordial Germ Cells in Chicken（ニワトリ生殖細胞特異的遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態と始原生殖細胞の増殖に関する研究）

区　　分　：　甲

論　文　内　容　の　要　旨

生殖細胞は次世代へ自らの遺伝情報を伝達するために必要不可欠な細胞であり，体細胞にはない様々な特徴を有している．一般的に生殖細胞は減数分裂により半数体となり，受精を通じて新たな生命を形成するための核となる．生殖細胞の維持および増殖に深く関与すると考えられているのが生殖細胞でのみ発現する特異的な遺伝子およびそのタンパク質である．また，生物の生殖を理解するうえで生殖系列の幹細胞である始原生殖細胞（PGC）は分化を通して精子や卵を形成するための根幹となる重要な細胞である．これまで PGC の増殖および分化のメカニズムに関する研究が精力的になされてきたが，充分な解明には至ってない．

本研究では，生殖細胞の重要性から初期胚の操作が容易であり PGC を血中から採取可能という特徴を併せ持つニワトリを用いて，生殖細胞における特異的タンパク質の発現とそれをコードする遺伝子の発現制御の解明，並びに PGC に関する研究をより進展させるための培養系の確立を試みた．

まず，生殖細胞特異的タンパク質である Ddx4，Dnd1，および Daz1 に着目し，ニワトリ性腺の発達に伴うこれらのタンパク質の発現解析を行った．リコンビナントタンパク質を大腸菌で作製し，ラットおよびウサギに免疫して抗体を得た。これらの抗体を用いた免疫細胞化学では，Ddx4，Dnd1，および Daz1 タンパク質が PGC で発現することが確認された．また，胚日齢 7 日，15 日，ならびに 1 ヶ月齢ヒナの精巣および卵巣を用いた二重免疫組織化学では，胚日齢 15 日までの性腺においては雌雄ともにいずれの特異的タンパク質の発現も核または細胞質において確認された．一方で，すべての生殖細胞がすでに減数分裂を開始している 1 ヶ月齢ニワトリの卵巣では Ddx4 および Dnd1 の発現は確認されたが，Daz1 の発現が完全に消失していた．対照的に 1 ヶ月齢の精巣では Daz1 が発現している生殖細胞と発現していない生殖細胞の両タイプが見られたが，Ddx4 の発現はいずれの生殖細胞においても認められた．これらの結果より，ニワトリ生殖細胞では減数分裂期を境にして特異的タンパク質の発現および分布に相違があることが明らかにされ，これらのタンパク質の機能に時期特異性があることが示唆された．

次いで，生殖細胞特異的タンパク質をコードする遺伝子の発現制御機構について解析した．一般的に遺伝子の発現はプロモーターの活性が低下することにより抑制されるが，この現象の制御にメチル化やアセチル化といったエピジェネティックな機構の関与が考えられている．そこでニワトリ生殖系列細胞のうち，最も分化が進んでいる精子の生殖細胞特異的遺伝子の発現抑制にメチル化が関与しているかを調べた．比較のために調べた肝臓では，*Ddx4, Dnd1, Daz1* の転写開始点上流域（-1～-500bp）において多数の CpG サイトのメチル化が認められた。これに対し，精子では特異的遺伝子の転写開始点上流域におけるメチル化 CpG サイトの割合は低いことが明らかにされた．また，ニワトリの精子および肝臓においてこれらの遺伝子は発現していないことも確認された．これらのことから，ニワトリ体細胞においては遺伝子転写開始点上流域におけるメチル化の状態が遺伝子の発現状態を反映することが考えられるが，精子を含む生殖細胞においては遺伝子発現調節機構として

メチル化ではないメカニズムの関与が示唆される.

最後に,PGC の増殖因子の同定および大量培養系の確立を試みた.PGC は胚性腺から得られる数が非常に少なく，またその特異的な増殖因子も同定されていないため分子メカニズム等の解析が困難である．そこで，ニワトリ PGC において発現する増殖因子の同定と効率的な PGC の培養系を確立するために，シングルセルサブトラクション法による遺伝子の探索および胚盤葉を用いた細胞培養系の開発を試みた．増殖因子の探索では，神経栄養因子の一種である *NENF* の発現が唯一認められた．また，胚盤葉由来細胞培養系において PGC は 1,500 倍にも増殖することが認められ，しかもリコンビナント NENF の添加により PGC の増殖が有意に促進された．しかし，高濃度の NENF（100nM）では PGC の増殖は認められなかった．これらの結果より，NENF の最適濃度はあるものの胚盤葉由来細胞培養系を用いた PGC の増殖は NENF によって促進されることが明らかにされ,ニワトリ PGC の有効な増殖系であることが認められた.

以上をまとめると，本研究から得られた結果はニワトリ生殖細胞で特異的に発現するタンパク質は生殖細胞の分化に伴ってその発現が変化するが，それらのタンパク質をコードする遺伝子はメチル化による不可逆的な制御を受けていないという生殖細胞の特異性に関する新たな知見を提供するとともに，PGC の効率的な培養系の確立および特異的な増殖因子の同定を通して繁殖生物学領域の研究の進展の一助となると考えられる.