

氏名	森田 俊平		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 乙 第 2 9 1 6 号		
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Roles of Nucleoli in Germline Development of <i>Drosophila melanogaster</i> (キイロショウジョウバエ生殖系列発生過程における核小体の役割)		
主査	筑波大学教授	理学博士	小林 悟
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	和田 洋
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	丹羽 隆介

論 文 の 要 旨

キイロショウジョウバエの生殖系列は、初期胚の後極に形成される始原生殖細胞に由来する。始原生殖細胞は、生殖質と呼ばれる特殊な細胞質を取り込む形で形成され、生殖巣へと移動した後に生殖幹細胞に分化し、成虫生殖巣内で配偶子形成を連続的に行う。これまで、初期胚の始原生殖細胞内では核小体が観察されないこと、配偶子形成過程で核小体の形態が変化することなどが報告されていたが、生殖系列の発生過程における核小体の役割は明らかになっていなかった。本論文は、rRNA の転写領域中に存在するマイクロ RNA である *mir-10404* が始原生殖細胞の細胞分裂制御に関与すること、核小体に蓄積される NHP2 タンパク質が卵形成の進行に関与することを明らかにした。

始原生殖細胞における *mir-10404* の役割

始原生殖細胞の特徴の1つとして、細胞周期が停止することが知られている。初期胚後極に形成される始原生殖細胞は G2 期から M 期への移行 (G2/M transition) が抑制されている。これは母性 Nanos (Nos) タンパク質が、Cyclin B (CycB) タンパク質の発現を翻訳レベルで抑制するためである。母性 Nos の機能を失った胚 (*nos* 変異胚) では、G2/M transition が脱抑制される。しかし、これら始原生殖細胞は G1/S transition で再び細胞周期が停止する。このことは G1/S transition を抑制する機構が始原生殖細胞に備わっていることを示しているが、その分子メカニズムは明らかになっていなかった。本論文は、この問題に関して、以下の諸点を明らかにした。

著者は、まず形成直後の始原生殖細胞では核小体が観察されないことを核小体マーカーを用いて明らかにした。核小体は、リボソームを構成する rRNA 転写の場であるにもかかわらず、始原生殖細胞におけるタンパク質合成活性は、核小体が観察される体細胞と比較して亢進していた。このことから、著者は、核小体は、rRNA 以外の RNA の産生にも関わるのではないかと考えるに至った。実際、rDNA 領域の 18S と 5.8S rRNA 間のスペーサーにマイクロ RNA (*mir-10404*) がコードされていることから、このマイクロ RNA の機能を明らかにする研究を開始した。次いで、著者は、*miR-10404* の標的 mRNA 候補として、G1/S transition を抑制するタンパク質をコードする *dacapo* (*dap*) を同定し、*miR-10404* が母性 *dap* mRNA の発現を抑制 (分解) していることを明らかにした。さらに、著者は、形成直後の始原生殖細胞における *miR-10404* の発現抑制が、始原生殖細胞の G1/S transition の抑制に関与していることを明らかにした。これら成果から、著者は以下のモデルを提唱した。形成直後の始原生殖細胞では、核小体の形成が阻害され、*miR-10404* の発現も抑制される。*miR-10404* の発現抑制により、始原生殖細胞に取り込まれた母性 *dap* mRNA が分解を受

けることなく、Dap タンパク質を産生する。その結果、Dap タンパク質により、始原生殖細胞の G1/S transition が抑制される。著者は、G2/M および G1/S transition を脱抑制した始原生殖細胞は、正常に生殖系列の発生過程を辿ることができないことを見出している。したがって、強固な細胞周期の停止は、正常な生殖系列の発生に必要と考えられる。以上のように、本論文は、始原生殖細胞の G1/S transition が抑制される分子メカニズムの一端を解明し、その細胞周期停止の意義を明らかにしている。

卵形成過程における核小体の役割

キイロショウジョウバエの成虫卵巣の先端に位置する生殖幹細胞は、細胞分裂により 2 つの娘細胞を生み出す。娘細胞の一方は 4 回の同調した不完全分裂によって、2 細胞、4 細胞、8 細胞シストを経て、16 細胞シストと呼ばれる 16 細胞の合胞体を形成し、そのうちの 1 つが卵母細胞となる。生殖幹細胞は、巨大な核小体を有し、その後のシスト形成(分化)過程で、そのサイズが減少することが知られていたが、シスト形成過程における核小体を構成するタンパク質の役割は明らかになっていなかった。

本論文は、核小体において rRNA に修飾塩基(シュードウリジン)を付与する NHP2 タンパク質に着目し、以下の諸点を明らかにした。まず、NHP2 タンパク質はシスト形成過程を通じて、核小体に局在するが、シスト形成の 4~8 細胞シストにおける核小体のサイズ減少に伴って、NHP2 タンパク質の発現量が減少すること、16 細胞シストにおいて核小体のサイズの増加とともに、NHP2 タンパク質の発現量も上昇することを明らかにした。次いで、NHP2 の生殖系列特異的ノックダウン (GS-KD)により、形成細胞巢内で、8 細胞シストが増加することを明らかにした。この結果は NHP2 の発現量の減少が 8 細胞シストへの正常な分化を促進していることを強く示唆している。さらに、著者は、4~8 細胞シストにおける NHP2 タンパク質の発現量の一過的減少に、RNA 結合タンパク質である Sex-lethal (Sxl) が関与することを強く示唆する結果を得た。核小体サイズの変化によってタンパク質合成活性が変化しなかったことから、正常にシスト形成が進行するためには NHP2 による rRNA のシュードウリジン化の制御が重要であると考えられる。

本論文では、核小体で転写される rDNA 中に存在する *mir-10404* および核小体に蓄積される NHP2 タンパク質の役割を明らかにすることができた。核小体は、生物種間で機能や構成要素が保存されていることから、本研究の成果は、他の生物種の生殖系列発生過程における核小体の役割を解明する上での基礎になることが期待される。

審 査 の 要 旨

形成直後の始原生殖細胞において、電子顕微鏡下で核小体が観察されないことは 50 年ほど前に明らかにされていた。しかし、その意義や役割に関して解析する研究は皆無であった。それは、核小体がリボソーム産生場であるにもかかわらず、タンパク質合成能の低下が形成直後の始原生殖細胞で観察されないためであった。著者は、これらの観察を分子マーカーなどを用いて再確認したのち、核小体の形成不全とリンクして、rRNA のスペーサー領域にコードされるマイクロRNA の産生が抑えられ、それにより始原生殖細胞の細胞周期の G1/S transition が抑制されることを見出した。さらに、細胞周期が停止しない始原生殖細胞はその発生過程が異常となることも明らかにした。また、核小体の構成分子である NHP2 が卵形成過程に関わることも明らかにした。以上の研究は、生殖系列の発生過程における核小体の役割を明らかにした点で意義深い。特に、核小体の形成不全と細胞周期停止との関連を明らかにした研究は独創性が高いと評価できる。

平成 31 年 1 月 2 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。