

学位論文要旨

氏名 藤谷 和子



論文題目

生殖幹細胞アイデンティティにおける Dmrt1-Prkra-p53 システム

指導教授承認印

宮下俊之



生殖幹細胞アイデンティティにおける Dmrt1-Prkra-p53 システム

藤谷 和子

要旨本文 (和文 2000 字以内)

一般的に、脊椎動物の始原生殖細胞は、胚発生過程で未分化生殖巣に移動し、性決定後、卵巣あるいは精巣分化初期に、卵原細胞もしくは精原細胞 (雌雄生殖幹細胞) へと発生・分化すると考えられている。しかし、生殖巣分化初期の卵原細胞と精原細胞の形態学的あるいはエピゲノムレベルでの相違はほとんど明らかになっていない。さらに、卵原細胞と精原細胞のインテグリティに関わる分子基盤の知見も乏しい。本研究では、卵原細胞と精原細胞のアイデンティティあるいはゲノム保持を制御する分子機構を明らかにすることを目的として、両生類アフリカツメガエル (*X. laevis*) を用いて解析を行った。両生類を用いたのは、哺乳類では胎生期にほぼ減数分裂して卵母細胞になるため卵原細胞の解析が容易でないこと、そして、両生類の *X. laevis* を用いたのは、実験動物として繁殖が容易であり、またカエルでは唯一、性決定遺伝子が同定されているため、遺伝的雌あるいは雄個体の判定が可能であることが理由である。まず、生殖幹細胞でその生存に関与していることが知られている Dmrt1 (Doublesex and Mab3 Related Transcription factor) という転写因子の発現を、遺伝的雌雄判別した幼生および変態後の生殖巣を用いて、免疫組織学的解析を行った。その結果、幼生期の一次・二次卵原細胞と一次精原細胞は共に DMRT1 を発現するが、変態後には、二次卵原細胞で発現が認められなかった。興味深いことに、幼生期の一次卵原細胞・一次精原細胞ともに、始原生殖細胞と同様に不定形な核および細胞の形態を呈していたが、変態後には一次卵原細胞のみ円形化が認められた。さらに、二重鎖 DNA 切断シグナルであるゲノム監査役のヒストンバリエント H2AX のリン酸化 (γ H2AX) を調べたところ、幼生期では卵原細胞・精原細胞で発現が見られたが、変態期では精原細胞のみ発現が認められた。これらことから、Dmrt1 と γ H2AX は、それぞれ生殖幹細胞としてのアイデンティティの維持あるいはゲノムインテグリティに関与すると考えられた。

次に、Dmrt1 の生殖幹細胞におけるアイデンティティの維持の分子基盤を明らかにすることを目的として、Dmrt1 結合タンパク質の同定を試みた。網羅的に解析するために、*X. laevis* の生殖幹細胞を含む成体精巣の細胞抽出液から、抗 Dmrt1 抗体を用いて免疫沈降を行い、その後、MS/MS 解析により、3 つの推定結合タンパク質 Phb2, Yb1 および Prkra を同定した。興味深いことに Dmrt1 駆動のルシフェラーゼレポーターを用いた培養細胞系において、Prkra は Dmrt1 の転写活性を強く増強することが分かった。Prkra はがん抑制因子 p53 と関与が知られていたので、この Dmrt1 駆動のルシフェラーゼレポーター系において、p53 の影響を調べた。極めて興味深いことに、Prkra によって増強された Dmrt1 の転写活性は、p53 によって抑制されることが認められた。哺乳類マウスでの精原細胞では、p53 と Dmrt1 は精原細胞で拮抗的に機能することが知られていたが、このツメガエルでの結果は、脊椎動物の生殖幹細胞における p53- Dmrt1 システムの保存性を示唆すると共に、その拮抗作用は Prkra を介している可能性が新たに示された。

生殖幹細胞は、次世代に引き継がれる重要な細胞であり、様々なストレスや障害からゲノムが守られる必要がある。本研究では、生殖幹細胞において、p53 と γ H2AX は、パトロール役とし

てゲノムを守ると共に、損傷細胞の除去に関わること、Dmrt1 は生殖幹細胞のアイデンティティに関わり、その機能は Prkra によって増強されるが、逆に p53 に抑制されることが示唆された。すなわち、Dmrt1- Prkra -p53 システムは、生殖幹細胞インテグリティに重要な機能を果している可能性が考えられる。