

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 Investigation of the mechanism of gametogenesis in the emerging model newt, *Pleurodeles waltl*
(新規モデル生物イベリアトゲイモリにおける生殖細胞形成機構の解明)

広島大学大学院統合生命科学研究科
生命医科学プログラム
学生番号 D193209
氏 名 客野 瑞月

脊椎動物において、生殖細胞は次世代を生み出すことができる唯一の細胞であり、全ての生殖細胞は発生初期に形成される始原生殖細胞 (PGC) に由来する。その決定様式は動物により異なり、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、ニワトリは、卵の細胞質における母性因子の局在により PGC が決定される「生殖質型」、マウスなどの哺乳類は母性因子に依存せず細胞間相互作用により PGC が誘導される「誘導型」に分類される。有尾両生類のイモリは、卵の形態は生殖質型のツメガエルによく似ているが、哺乳類と同じく PGC が誘導作用により決定されることが示唆されている。また雄個体は、性成熟後も精巣を新生する、あるいは精巣を摘出して再生することができるが、これは精巣に隣接する結合組織内に PGC 様の細胞を維持しているためであると考えられている。イモリにおいて PGC が決定される機構や、PGC から生殖細胞が分化する仕組みを理解することは、生殖細胞形成機構の全体像や多様性を理解する上で重要であるが、未だ不明な点が多い。

従来の研究に用いられてきたアカハライモリなどは性成熟まで 2-3 年を要する、繁殖が季節性である、産卵数が少ないなどの性質のため、研究が難しかった。そこで私は所属する研究グループの一員として、年間を通じた大量繁殖を容易に行えるイベリアトゲイモリを導入して、遺伝子操作をはじめとする実験系を確立してきた。これによりイモリにおける PGC の決定機構を分子生物学のレベルで解析することが可能になった。しかしながら、イモリでは生殖細胞あるいは生殖巣の発達に関する基本的な情報がほとんど存在しなかった。そのため、私はまずイベリアトゲイモリにおける生殖巣の詳細な形成過程を明らかにした上で、イモリにおける PGC 決定の分子機構の解明を目指した。

第 1 部 イベリアトゲイモリにおける精巣の形成過程の解析

イベリアトゲイモリの幼生期から成体における精巣の発達過程の詳細を調べた。受精後 2 ヶ月から生殖巣の形態に雌雄差が現れ、受精後 6 ヶ月で受精能のある精子が採取された。また、精子形成は成体を解剖した時期によらず、精巣内で観察された。さらに、環境条件が生殖細胞の分化に与える影響を明らかにするため日照時間を長日条件および短日条件に設定して受精後 2 ヶ

月から飼育し、受精後6ヶ月の成体雄において解剖をしたが、精巣の発達に形態的な違いは確認されず、どちらの条件でも同様に生殖細胞の増殖が観察された。これらの結果から、飼育下のイベリアトゲイモリの性成熟に要する期間は他種イモリと比較して極めて短く、また雄性生殖細胞の分化が時期や日照時間に影響を受けないことが判明した。

第2部 生殖細胞形成における遺伝子機能解析

イモリ生殖細胞にて特異的に発現する遺伝子である *dazl* および *vasa* の機能解析を行った。*dazl* と *vasa* は生殖細胞形成に関連する遺伝子として保存されており、イモリにおいて両遺伝子は精巣・卵巣で発現するだけでなく未受精卵に母性因子として存在する。そこで、母性因子の機能阻害および接合子核に由来する遺伝子発現の欠損による生殖細胞形成への影響を解析した。その結果、母性因子の *dazl* mRNA の阻害により生殖腺原基での PGC の数が減少したが、CRISPR/Cas9 により *dazl* の接合子由来の発現を欠損させた個体では、生殖腺原基に存在していた PGC が性分化前の増殖期において著しく減少し、成体の雌雄はともに不稔となった。一方、*vasa* 遺伝子を破壊した個体およびその交配により得られた母性因子含む *vasa* を完全に欠損した個体において、生殖細胞形成に異常は確認されなかった。これにより、有尾両生類の生殖細胞形成において *vasa* は必須でないが、*dazl* は母性因子として PGC 形成の初期段階に機能し、接合子由来の発現によりその後の PGC の分化あるいは増殖に必要であることが明らかになった。

これらの研究成果により、新規のモデル動物であるイベリアトゲイモリにおける雄性生殖細胞の詳細な形成過程が示された。また、飼育環境下にあるイベリアトゲイモリでは生殖細胞形成が年間を通じて進行することが明らかになった。ゲノム編集などの遺伝子操作が可能であることから、本種が有尾両生類の生殖細胞形成の分子機構の解析に適した実験系であることが示された。加えて、生殖細胞は遺伝子操作の対象ともなるため、その基本情報はイベリアトゲイモリのモデル動物としての価値を高めるだろう。一方 PGC 形成機構に関しては、従来考えられていた二者択一的な機構と異なり、誘導型であるとされるイモリの PGC 形成において母性因子として存在する *dazl* が必要であることを示したことで、有尾両生類の PGC 決定が誘導型と生殖質型の両方の特徴を持つことが示唆された。イベリアトゲイモリの実験系を用いることで、マウスやツメガエルといった先行するモデル生物との比較が可能になり、有尾両生類だけでなく脊椎動物全体において生殖細胞形成に関する新たな知見が得られることが期待される。