

博士論文

ショウジョウバエの生殖細胞中における
遺伝子発現の活性化機構の解析

甲南大学大学院自然科学研究科

生命・機能科学専攻

平 誠司

目次

要旨	1
第1章 序論	2
第2章 Mamo の C ₂ H ₂ 型 Zn フィンガードメインの機能解析	12
第3章 Mamo による <i>vasa</i> 遺伝子の発現制御機構	29
第4章 生殖細胞分化とヒストン修飾の関係	59
第5章 結論	87
謝辞	95
参考文献	96

要旨

平 誠司

多細胞生物において、生殖細胞は種の連続性を担う重要な細胞である。しかし、生殖細胞中で生殖細胞の発生、分化に必要な遺伝子の発現がどのように活性化されるのか、そのメカニズムには不明な点が多い。ショウジョウバエにおいて生殖質に含まれる母性因子が始原生殖細胞（極細胞）の形成や分化に必要であることが示されている。母性因子 *Mamo* (*maternal factor required for meiosis*) は BTB/POZ ドメインと C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもつクロマチン制御因子で、極細胞の分化に関与する母性因子として同定された。母性因子 *Mamo* を欠いた極細胞 (*mamo*⁻極細胞) 中では生殖細胞特異的に発現する *vas* (*vas*) 遺伝子のエンハンサー活性が低下すること、さらに *mamo*⁻極細胞に由来する卵母細胞中で減数分裂が異常になることが報告されている。これらの結果から、極細胞に供給された母性因子 *Mamo* が生殖細胞の分化に必要な遺伝子の発現制御に関与することが予想される。

本研究では、生殖細胞中における *Mamo* による遺伝子発現の制御機構を明らかにすることを目的とし、まず *Mamo* タンパク質の性質を解析した。その結果、*Mamo* がクロマチンに結合すること、生殖細胞特異的なクロマチン構造の制御に関わること、また、*Mamo* タンパク質の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメイン (M_{ZD}) が特定の塩基配列をもつ DNA と直接結合することが明らかになった。次に、*Mamo* が内在性の *vas* 遺伝子の発現に与える影響を調べた。その結果、*Mamo* 欠いた極細胞中で *vas* 遺伝子の発現が低下すること、*Mamo* 及び M_{ZD} の強制発現により、*vas* 遺伝子の発現量が増加すること、さらに M_{ZD} が *vas* 遺伝子座イントロン中の配列と直接結合し、結合部位周辺のヒストン修飾 (H3K27ac) レベルを高めることが明らかになった。これらの結果から、*Mamo* がヒストン修飾の制御を介して、極細胞中の遺伝子発現の活性化に関与することが示唆された。さらに、ヒストン修飾を介した遺伝子発現制御と生殖細胞の分化の関係を調べるために、成虫卵巣中の生殖細胞分化過程におけるヒストン修飾の状態とその機能を解析した。その結果、生殖幹細胞から生殖細胞の分化が始まる過程において、特定のヒストン修飾 (H3K36me3) レベルが高くなること、この修飾が生殖細胞の分化に関わる *orb* 遺伝子の発現の制御に関わることを明らかにした。本研究によって、生殖細胞中の遺伝子発現の活性化に、ヒストン修飾を介したクロマチン構造の制御に関わることが明らかになった。

第1章

序論

多細胞動物の体を構成する細胞は、体細胞と生殖細胞に大別できる。体細胞は、発生過程で様々な細胞種に分化し、個体の生命活動を支持する役割をもつ。体細胞は個体の死とともにその役割を終える。これに対して、生殖細胞は、減数分裂、大規模な細胞の形態変化を経て、最終的に特殊化した配偶子（卵や精子）を作り出す。有性生殖の過程を経て、配偶子が次世代の細胞（受精卵）を作り出す。有性生殖する多細胞動物において、生殖細胞が生命の連続性を担う（Fig. 1-1）。このような特殊な機能をもつ生殖細胞が作り出される仕組みを明らかにすることは、基礎生物学、生殖医学的に重要な課題である。

これまでの発生学的研究から、昆虫、魚類、両生類などのいくつかの動物種で、卵に生殖質と呼ばれる特殊な細胞質が含まれ、これを取り込んだ細胞が、生殖細胞に分化する能力をもつ始原生殖細胞になることが判明している (Beam and Kessel, 1974; Eddy, 1975; Extavour and Akam, 2003)。これに対して、哺乳類などでは、卵中に生殖質が観察されず、胚発生過程の特定の時期に、後生的に始原生殖細胞が誘導される (Extavour and Akam, 2003)。マウス胚においては、原腸陥入期に胚体外外胚葉からの bone morphogenetic protein (BMP) シグナルがエピブラストに作用し、始原生殖細胞の誘導が起こる (Günesdogan et al., 2014)。初期胚に、体細胞と異なる発生運命をもつ始原生殖細胞が形成される分子機構を明らかにすることが、生殖細胞の研究の一つの大きな研究テーマになっている。

Drosophila melanogaster (以下、ショウジョウバエと表記する) は、生命現

象の制御に関わる分子機構を、遺伝子のレベルで解析することに適したモデル生物の一つである。その理由として、(1) ゲノム情報が明らかになっていること (Adams et al., 2000)、(2) 多数の突然変異体が同定されており、突然変異体を用いた遺伝子の機能解析が可能であることが挙げられる (FlyBase、<http://flybase.org>)。また、ショウジョウバエは生殖細胞の形成機構の解析に適した性質をもつことが知られている。ショウジョウバエの卵には生殖質が含まれ、初期胚の段階から、どの細胞から生殖細胞が作り出されるかという細胞の予定運命が明らかにされている。さらに、成虫卵巣中で合成されて生殖質に供給される RNA やタンパク質 (母性因子と呼ばれる) が、生殖細胞の形成および分化に関わることが分かっている (Fig. 1-2) (Extavour and Akam, 2003)。

ショウジョウバエの初期胚の後極には、生殖質が局在しており、この中に母性因子が含まれる。生殖質を取り込む形で、この動物の始原生殖細胞である始原生殖細胞が形成される (胚発生ステージ 4、Fig. 1-3)。胚の後極に形成された始原生殖細胞は、その後、原腸陥入運動に伴い胚体内に入り (ステージ 9、Fig. 1-3)、中腸上皮を通過して血体腔に移動する。そこで始原生殖細胞は中胚葉性の予定生殖巣構成細胞と相互作用し、生殖巣を形成する (ステージ 15、Fig. 1-3)。その後、後胚発生過程において、減数分裂、細胞の形態変化が生殖巣内で起こり、機能的な配偶子が作り出される (Williamson and Lehmann, 1996)。

これまでに、ショウジョウバエの生殖質に含まれる母性因子が始原生殖細胞の形成、維持および分化に必要であることが示されている (Illmensee and Mahowald, 1974)。ミトコンドリアの large ribosomal RNA (mtlrRNA)、Germ cell-less (Gcl) タンパク質は始原生殖細胞の形成に必要である (Kobayashi et

al., 1994; Jongens et al., 1994)。始原生殖細胞中に供給された Nanos (Nos) タンパク質は始原生殖細胞の移動、細胞分裂の抑制、さらに始原生殖細胞の体細胞への分化の抑制に必要である (Hayashi et al., 2004)。また、始原生殖細胞中の *Polar granule component (Pgc)*、*wunen2* の活性が移動中の始原生殖細胞の生存に、*trapped in endoderm-1 (tre-1)* は始原生殖細胞の中腸上皮通過に必要であることが報告されている (Nakamura et al., 1996; Hanyu-Nakamura et al., 2004; Kunwar et al., 2008)。これらの研究から、母性因子がいくつかの特徴的な始原生殖細胞の挙動を制御することが示されている。

もう一つ重要な始原生殖細胞の性質が知られている。それは、形成直後の始原生殖細胞中の転写活性が全体的に抑制されていることである (Kobayashi et al., 2005)。RNA ポリメラーゼ II のカルボキシル末端ドメイン (CTD) の Ser5、Ser2 残基のリン酸化が転写の開始反応、伸長反応にそれぞれ必要である (Dahmus, 1996)。形成直後の始原生殖細胞中では RNA ポリメラーゼ II CTD のこれらのリン酸化が抑制されており、RNA ポリメラーゼ II の活性が低下している (Deshpande et al., 2003)。始原生殖細胞中の全体的な転写活性を抑制し、体細胞性の遺伝子の異所的発現を抑制することが生殖細胞の形成に必要であると考えられている。実際に、いくつかの母性因子 (Gcl、Nos、Pgc) が始原生殖細胞中の転写抑制に関与することが明らかになっている (Kobayashi et al., 2005)。Gcl を欠いた胚の後極の核、つまり本来始原生殖細胞に取り込まれる核の内部で、RNA ポリメラーゼ II の CTD Ser5 残基の異所的なリン酸化が起こり、体細胞性の遺伝子である *sisterless A (sisA)*、*sisterless B (sisB)* の異所的な発現が起こる (Leatherman et al., 2002)。Pgc を欠いた始原生殖細胞中では、

RNA ポリメラーゼ II の CTD の Ser2 のリン酸化が起こり、体細胞性の遺伝子、*zerknüllt (zen)*、*tailless (tll)*、*slow as molasses (slam)* の発現が起こる (Martinho et al., 2004)。Nos を欠いた始原生殖細胞中では、RNA ポリメラーゼ II の CTD の Ser2、Ser5 のリン酸化が起こる (Deshpande et al., 2005)。さらに、アポトーシスを抑制した条件下で、Nos を欠いた始原生殖細胞が体細胞に分化することが報告されている (Hayashi et al., 2004)。形成直後の始原生殖細胞中での遺伝子発現の抑制が生殖細胞の形成、維持に必要であることが明らかになっている。

これまでに遺伝学的、分子遺伝学的解析から、生殖細胞の分化に必要な遺伝子が同定されており、このうちのいくつかの遺伝子 (生殖細胞関連遺伝子: *vasa*、*nos*) の発現が始原生殖細胞中で活性化される。つまり、胚発生過程の始原生殖細胞中で、生殖細胞を特徴づける遺伝子が胚性の発現 (zygotic な発現) を開始することが示されている。これらの生殖細胞関連遺伝子のうち *vasa (vas)* 遺伝子は、DEAD ボックスをもつ RNA ヘリケースタンパク質をコードし、翻訳の制御を通じて、生殖細胞の分化に関わる (Hay et al., 1988; Lasko and Ashburner, 1988)。また、哺乳類を含めた多くの動物種で、*vas* 遺伝子のホモログが同定され、生殖細胞中で発現することが知られている (Extavour and Akam, 2003)。生殖細胞の発生過程を通じて Vas タンパク質が連続的に生殖細胞中で発現するため、代表的な生殖細胞のマーカー遺伝子の一つとして生殖細胞の研究に広く用いられている。上述のように始原生殖細胞の形成機構には種による多様性があるが、*vas* 遺伝子の発現が多くの動物種の生殖細胞中で観察されることから (Noce et al., 2001)、*vas* 遺伝子の発現を活性化する分子機構を解

析することで、遺伝子発現の制御という観点から、普遍的な生殖細胞形成、維持機構を解明する手がかりが得られると予想できる。しかし、著者の知る限りにおいて、その遺伝子発現を活性化する分子機構についてほとんど解析が進んでいない。

Mukai らは、始原生殖細胞中の遺伝子発現を活性化する母性因子を同定することを目的として、遺伝学的スクリーニングを行い、その結果、母性因子 *mamo* (*maternal gene required for meiosis*) を同定した (Mukai et al., 2007)。母性因子 Mamo を欠いた始原生殖細胞 (*mamo*⁻ 始原生殖細胞) 中では生殖細胞特異的に発現する *vas* 遺伝子のエンハンサー活性が低下する。さらに *mamo*⁻ 始原生殖細胞の発生運命を調べた結果、*mamo*⁻ 始原生殖細胞に由来する卵母細胞中で減数分裂が異常になることが判明している。これらの表現型は、母性因子 Mamo が生殖細胞分化の制御に関わることを示唆する。Mamo タンパク質は BTB/POZ ドメインと C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインを含むクロマチン制御因子様タンパク質である。このことから、Mamo が始原生殖細胞中の遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆された。しかし、その作用機構は不明であった。

本研究では、生殖細胞中で遺伝子発現を活性化する分子機構を明らかにすることを目的として、Mamo の作用機構の解析を行った。まず、Mamo タンパク質がクロマチンに結合するか、さらに Mamo の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインが直接 DNA に結合する能力をもつのかを調べた (第 2 章)。さらに、Mamo が *vas* 遺伝子の発現を活性化する機構を、分子遺伝学的手法を用いて解析した (第 3 章)。第 3 章の結果から、ヒストン修飾 (H3K27ac) を中心としたエピジェネティックな遺伝子発現制御が始原生殖細胞中の遺伝子発現の活性化に関与する

ことが明らかになった (Fig. 1-4)。そこで、さらに生殖細胞の分化とエピジェネティックな遺伝子発現制御の関連を解析するために、成虫卵巣中の生殖細胞分化過程におけるヒストン修飾状態とその制御機構について解析を行った。その結果、生殖細胞の分化が起こる過程において、特定のヒストン修飾 (H3K36me3) レベルが高くなること、この修飾が生殖細胞中の分化促進遺伝子 *orb* の発現制御に関わることが明らかになった (第4章)。

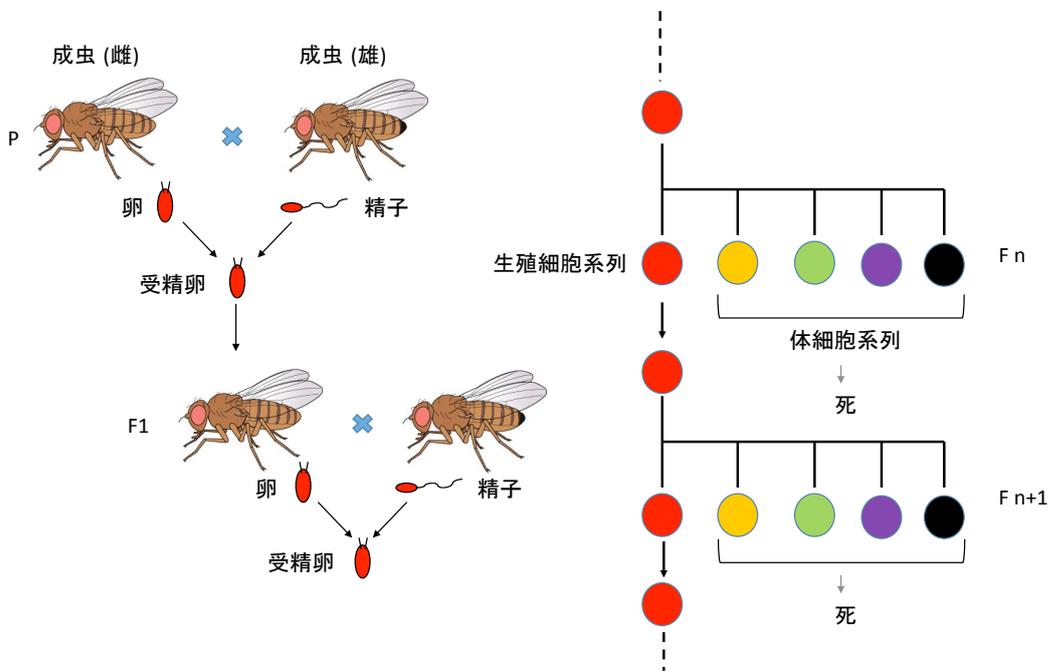


Fig. 1-1 生殖細胞系列と体細胞系列

多細胞動物の体には、体細胞系列と生殖細胞系列の細胞が含まれる。体細胞系列の細胞は個体の死と共に役割を終える。これに対して、生殖細胞系列の細胞（右図、赤丸）は、有性生殖過程を経て、次世代の細胞（受精卵）を作り出し、生命の連続性を担う。

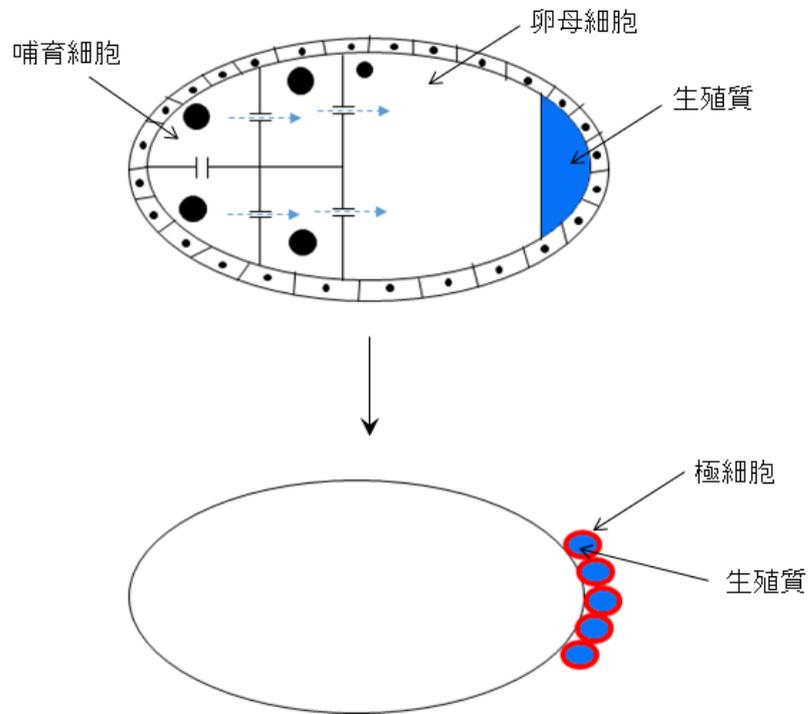


Fig. 1-2 生殖質と始原生殖細胞の関係

ショウジョウバエでは、卵巣中の哺育細胞で合成された RNA やタンパク質は、卵母細胞に運び込まれる（青矢印）。運び込まれた特定の RNA やタンパク質が卵母細胞の後極（生殖質）に局在する（青）。胚発生ステージ 4 (Fig. 1-3 参照) において生殖質がこの動物の始原生殖細胞である始原生殖細胞（赤）に取り込まれる。

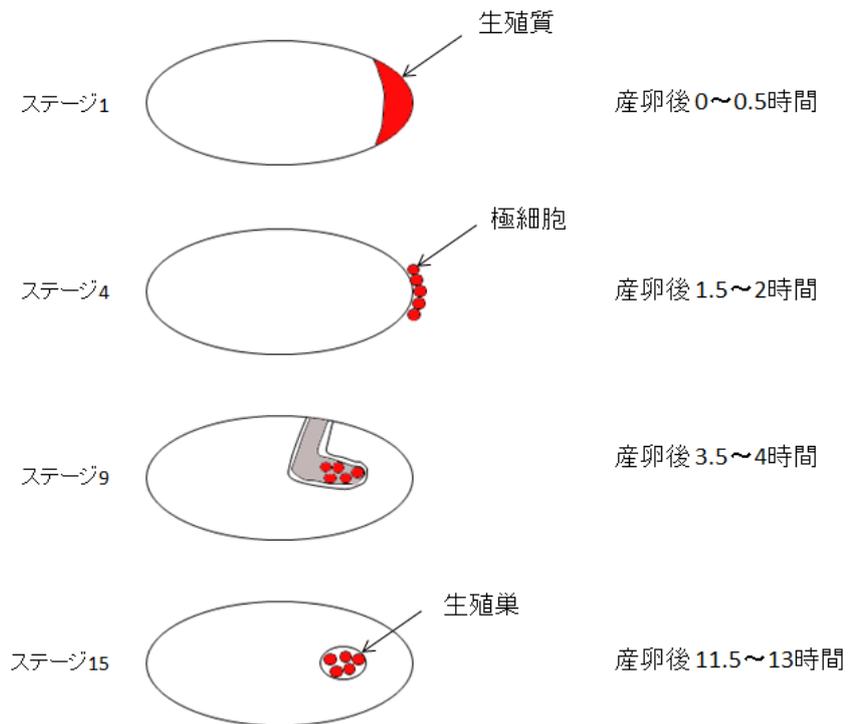


Fig. 1-3 始原生殖細胞の発生過程

ショウジョウバエ初期胚の後極には生殖質（赤）が局在しており（ステージ 1）、生殖質を取り込む形で始原生殖細胞が形成される（ステージ 4）。その後、原腸陥入に伴い始原生殖細胞は胚体内へと移動する（ステージ 9）。始原生殖細胞は中腸上皮を通過して血体腔に移動し、そこで中胚葉性の予定生殖巣構成細胞と相互作用し生殖巣を形成する（ステージ 15）。

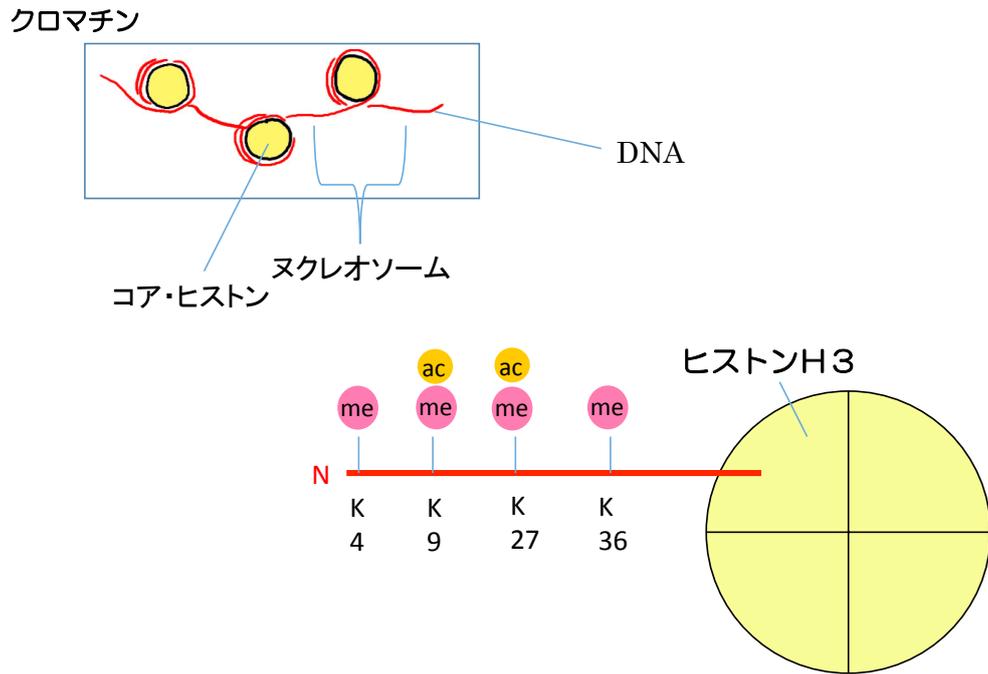


Fig. 1-4 ヒストン H3 タンパク質の N 末端における主な修飾

主なヒストン H3 の修飾について図示した。me はメチル化は、ac はアセチル化を示す。ヒストン H3K4 のメチル化、ヒストン H3K27 のアセチル化、H3K36 のメチル化は転写の活性化と関連する。これに対して、ヒストン H3K9 のメチル化、H3K27 のメチル化は転写の抑制と関連したヒストン修飾として知られている。

第 2 章 Mamo の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインの機能解析

2-1

序論

これまでに、ショウジョウバエの生殖質に含まれる母性因子が始原生殖細胞の形成、維持および分化に必要であることが明らかになっている。母性因子 Gcl、Nos、Pgc がそれぞれ RNA ポリメラーゼ II CTD のリン酸化を抑制し、形成直後の始原生殖細胞中の転写開始や伸長反応を抑制することが明らかになっている。この転写抑制が始原生殖細胞中での体細胞性遺伝子の発現を抑制し、始原生殖細胞の形成維持に関わることが知られている (Kobayashi et al., 2005)。

胚発生過程において、始原生殖細胞中で *vas* 遺伝子などの生殖細胞関連遺伝子の *zygotic* な発現が活性化されることが知られている。しかし、始原生殖細胞中の遺伝子発現の活性化機構に関する研究の報告例は多くない (Sano et al., 2002; Mukai et al., 2007; Yatsu et al., 2008)。これまでに、始原生殖細胞中の遺伝子発現を活性化する母性因子を同定することを目的として、遺伝学的スクリーニングが行われ、その結果、母性因子 Mamo が同定された (Mukai et al., 2007)。Mamo を欠いた始原生殖細胞 (*mamo*⁻ 始原生殖細胞) 中では生殖細胞特異的に発現する *vas* 遺伝子のエンハンサー活性が低下することが分かっている。さらに、*mamo*⁻ 始原生殖細胞に由来する卵母細胞中で減数分裂が異常になることが判明している。これらの結果は、Mamo が生殖細胞分化の制御に関わることを示唆する。Mamo タンパク質は BTB/POZ ドメインと C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインを含むクロマチン制御因子様タンパク質である。このことから、Mamo が、始原生殖細胞中の遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆された。

しかし、その作用機構は不明であった。

そこで、本研究では、Mamo タンパク質の性質を解析することを目的として、全長 Mamo および断片化 Mamo タンパク質を三齢幼虫の唾液腺細胞中で強制発現し、Mamo の細胞内局在を観察した。その結果、Mamo が核に局在すること、さらに、Mamo が多糸染色体に結合することが明らかになった。次に、Mamo が始原生殖細胞中のクロマチン構造の制御に関わるかを解析するために、母性 Mamo タンパク質の欠失が始原生殖細胞中のクロマチン構造に与える影響を解析した。その結果、Mamo を欠いた始原生殖細胞中で、クロマチン構造の異常が観察されることが判明した。さらに、*in vitro* での生化学的解析 (Random oligonucleotide selection 実験、EMSA 解析) を行い、Mamo の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメイン (MZD) が DNA に直接結合するのか、また、どのような塩基配列をもつ DNA と結合するかを解析した。その結果、MZD が特定の塩基配列をもつ DNA と直接結合することが明らかになった。

2 - 2

材料と方法

実験に用いたショウジョウバエの系統

野生型系統として *Oregon-R* を使用した。 *mamo*^{SVA53} 系統を用いて *mamo* の機能解析を行った (Mukai et al., 2007)。 *nanos-Gal4* は Dr. R. Lehman からご供与頂いた。 *P{hs-Gal4(II)}* (stock number 2077)、 *P{hs-Gal4(III)}* (stock number 1799)、 *w ovo^{D1} v²⁴ P{FRT}101; P{hsFLP}38* は Bloomington Stock Center から分与して頂いた。全ての系統は 25°C または室温で、ショウジョウバエ飼育培地を用いて飼育した。

トランスジェニック系統の作製

pBluescript-*mamo*-FLAG プラスミドを鋳型として PCR を行い、FLAG タグを付加した *mamo* cDNA 断片を作製した。MZD-FLAG cDNA 断片は MZD-FLAG-F と T3 プライマーを用いて増幅した。PCR 産物を *Bam*HI と *Xba*I で制限酵素処理し、pUASp ベクターの *Bam*HI/*Xba*I サイトにクローニングした。L-POZ-FLAG は POZ-FLAG-F と L-POZ-FLAG-R プライマーを用いて増幅した。S-POZ-FLAG は POZ-FLAG-F と S-POZ-FLAG-R プライマーを用いて増幅した。これらの *mamo* cDNA 断片を *Xba*I と *Kpn*I で制限酵素処理し、pUASp ベクターの *Xba*I/*Kpn*I サイトにクローニングした。これらのコンストラクトを *y w* にインジェクションし、常法に従ってトランスジェニック系統を作製した (Rubin et al., 1982)。それぞれのプライマーの塩基配列は Table 2-1 に示す。

免疫染色

hs-Gal4 ドライバーを用いて上述の *mamo* cDNA を発現させた三齢幼虫から唾液腺を摘出し、免疫染色した。始原生殖細胞中の Mamo-FLAG タンパク質の分布を調べるために、生殖細胞中で遺伝子発現を誘導できる *nanos-Gal4* ドライバーを用いて、Mamo-FLAG を発現させた。 *nanos-Gal4>UAS-mamo-FLAG* 胚は、固定後タングステン針を用いて解剖し、生殖巣に抗体が浸透しやすい条件で免疫染色した (Kobayashi et al., 1999)。一次抗体は mouse anti-FLAG M2 抗体 (1:200 希釈、Sigma)、mouse anti-histone H3 CMA301 抗体 (1:10 希釈、H. Kimura)、rabbit anti-Vas 抗体 (1:500 希釈、S. Kobayashi) を使用した。Alexa Fluor 488-と 568-標識二次抗体は 1:1000 希釈で使用した。DNA の染色には Hoechst あるいは propidium iodide (PI) を使用した。染色した唾液腺、胚は共焦点顕微鏡を用いて観察した (TCS NT、Leica Microsystems; FV1200、Olympus)。多糸染色体は常法に従って押しつぶし標本を作製し、染色した (Kolesnikova et al., 2013)。多糸染色体の染色には、固定した胚を用いて、rabbit anti-FLAG (Sigma) の吸収抗体を作製し、これを 1:200 希釈で使用した。

GST-MZD の発現と精製

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として、MZD リコンビナントタンパク質を作製した。Mamo タンパク質の 3 つの C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインを含む領域 (アミノ酸残基 798-1089 番目) を GST の C 末端側に融合させ、さらに C 末端に FLAG タグを付加した融合タンパク質 (GST-MZD タンパク質) を発現させるベクターを作製した。具体的には

pBluescript-*mam*-FLAG プラスミドを鋳型として GST-MZD-F プライマーと T3 プライマーを用いて PCR を行い増幅した。PCR 産物を *Xba*I で制限酵素処理し平滑末端化した。その後、*Bam*HI で制限酵素処理し、pGEX-5X-1 ベクターの *Bam*HI/*Sma*I サイトにクローニングした。得られた GST-MZD の発現ベクターを形質転換した大腸菌 BL21 を培養し、IPTG (最終濃度 0.5 mM) を加え 37°C で 2 時間タンパク質の発現誘導を行った。発現させた GST-MZD タンパク質をグルタチオン-セファロース 4B ビーズを用いて精製した。精製したタンパク質は mouse anti-FLAG 抗体 (1:1000 希釈) を用いてウエスタンブロッティングを行って解析し、予想される分子量約 55kDa の GST-MZD タンパク質が確認できた。プライマーの塩基配列は Table 2-1 に示す。

Random oligonucleotide selection 実験

ランダムオリゴヌクレオチド (0.27 μ g) と *Sa*II-*Xba*I プライマー (0.5 μ g) を混合しアニールさせた後に、EX Taq polymerase (TaKaRa) を用いて二重鎖 DNA を合成した。二重鎖のランダムオリゴヌクレオチドと GST-MZD タンパク質 (1 μ g) を Binding Buffer (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol (wt/vol), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 mM ZnSO₄, 1 μ g Poly[dI-dC]) 中で混ぜ、25°C で 30 分間反応させた。その後、GST-MZD タンパク質と結合したオリゴヌクレオチドを回収するためにグルタチオン-セファロース 4B ビーズを加え、25°C で 30 分間インキュベートした。ビーズを Binding Buffer で 4 回洗浄した後に、ビーズに結合したオリゴヌクレオチドを溶出し、*Sa*II-*Xba*I プライマーと *Xho*I-*Eco*RI プライマーを用いて PCR 増幅を行った。この結合反応と

PCR 増幅反応を 5 回繰り返し行った。最終的な PCR 増幅産物をゲル精製し、クローニングし、塩基配列を決定した。この実験で用いたランダムオリゴヌクレオチドとプライマーの塩基配列は Table 2-2 に示す。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

no. 77 sense probe と no. 77 antisense probe をアニールし、DIG gel shift kit, 2nd generation (Roche) の digoxigenin-11-ddUTP を用いて末端標識した。DIG ラベルしたプローブ (30 fmol) と 60 ng の GST または GST-MZD タンパク質を反応溶液 (20 mM HEPES-KOH pH 7.6、1 mM EDTA、10 mM $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ 、1 mM DTT、0.2% Tween 20 (wt/vol)、30 mM KCl、1 μg poly[d(I-C)]、0.1 μg poly L-lysine) 中で、25°C で 15 分間反応させた。その後、タンパク質と DNA の複合体を 7% のポリアクリルアミドゲルで泳動した。タンパク質と DNA の複合体を positively charged nylon membranes (Roche) にトランスファーし、DIG gel shift kit を用いて検出した。コンペティションアッセイの際には、反応液に 25 pmol の非標識 DNA を加えた。スーパーシフトアッセイの時には、1 μg の mouse monoclonal anti-FLAG 抗体を反応液に加えた。この実験で用いたプローブの塩基配列は Table 2-3 に示す。

2-3

結果

唾液腺細胞中における Mamo タンパク質の核局在

Mamo タンパク質の性質を調べるために、全長及び断片化した Mamo タンパク質 (Mamo-FLAG、MZD-FLAG、L-POZ-FLAG、S-POZ-FLAG) を *in vivo* で発現し、それぞれタンパク質の細胞内での局在を観察した (Fig. 2-1)。初期胚の細胞は小さいため、発現タンパク質の細胞内挙動を解析することが困難な場合がある。そこで、細胞サイズが大きい唾液腺細胞を材料として発現解析を行った。Gal4/UAS システムを用いて、唾液腺細胞中で Mamo と断片化した Mamo タンパク質を発現し、タンパク質の局在を観察した。まず、全長の Mamo-FLAG タンパク質を唾液腺中で強制発現し、anti-FLAG 抗体を用いて免疫染色した。その結果、Mamo-FLAG は唾液腺細胞の核内に局在することが分かった (Fig. 2-1B)。次に、Mamo タンパク質の C 末端領域の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもつ MZD-FLAG を唾液腺中で強制発現させ、anti-FLAG 抗体を用いて免疫染色した。その結果、MZD-FLAG も唾液腺細胞の核に局在することが明らかになった (Fig. 2-1B)。これに対して、C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもたない L-POZ-FLAG と S-POZ-FLAG は核に局在しないことが分かった (Fig. 2-1B)。これらの観察結果から、全長の Mamo と MZD が唾液腺細胞の核に局在することが示された。これらの結果から、Mamo が核内で作用する可能性が示された。

Mamo は多糸染色体に結合し、多糸染色体の構造に影響を与える

唾液腺細胞中での Mamo の発現解析から、Mamo、MZD の強制発現が多糸染色体の構造に影響を与えることが分かった。L-POZ-FLAG、S-POZ-FLAG をそれぞれ発現させた唾液腺細胞中の多糸染色体では、野生型の多糸染色体と同様のバンド構造が観察された (Fig. 2-1D、E)。これに対して、Mamo-FLAG あるいは MZD-FLAG をそれぞれ発現させた唾液腺の多糸染色体は野生型に比べて細く、多糸染色体のバンドパターンが異常になることが判明した (Fig. 2-1F、F'、G、G')。これらの結果から、Mamo は多糸染色体に結合し、多糸染色体の構造に影響を与えると考えられる。そこで、Mamo が染色体に結合するかを解析するために、Mamo-FLAG を発現させた唾液腺から、染色体標本を作製し、多糸染色体上における Mamo-FLAG の分布を調べた。その結果、多糸染色体にそって、複数のバンド状の Mamo-FLAG シグナルが検出されることが明らかになった (Fig. 2-1H)。この観察結果から、Mamo が多糸染色体に結合すること、さらに特定のクロマチン領域と強く結合することが明らかになった。これらの結果から、Mamo がクロマチンに直接結合し、クロマチン構造の制御に関与することが示唆される。

Mamo は始原生殖細胞中の生殖細胞特異的なクロマチン構造形成に必要である

これまでに、始原生殖細胞中に高レベルの母性 Mamo タンパク質が検出され、Mamo が核内の特定の領域に点状の局在を示すことが報告されている (Mukai et al., 2007)。この核内分布を確認するために、Mamo-FLAG を始原生殖細胞中

で強制発現させた胚 (*nanos-Gal4>UAS-mamo-FLAG* 胚) を anti-FLAG 抗体で免疫染色した。その結果、Mamo-FLAG が始原生殖細胞の核内で点状の染色パターンを示すことが判明した (Fig. 2-2A、A')。Mamo-FLAG が始原生殖細胞の核内に検出されたこと、Mamo-FLAG を強制発現させた唾液腺細胞中でクロマチン構造に異常が観察されたことから、Mamo が始原生殖細胞中におけるクロマチン構造の制御に関与する可能性が考えられた。そこでまず、始原生殖細胞中のクロマチン構造を確かめるために anti-ヒストン H3 抗体を用いて野生型胚を免疫染色した。その結果、胚発生期のステージ 15 の始原生殖細胞中で生殖細胞特異的なクロマチンの凝縮が観察された (Fig. 2-2B、B')。また、このような凝縮したクロマチン構造は周辺の体細胞では観察されないことが分かった。次に、Mamo を欠いた始原生殖細胞中でのクロマチン構造の観察を行った。ステージ 15-16 の野生型胚では 99% ($n = 299$) の胚で凝縮したクロマチンが観察された (Fig. 2-2)。これに対して、Mamo を欠いた始原生殖細胞中では、体細胞のクロマチンと似た構造、すなわち凝縮度の低いクロマチン構造が 46% ($n = 200$, $P < 0.001$) の胚で観察された (Fig. 2-2C、C')。これらの結果から、Mamo が生殖細胞特異的なクロマチン構造の制御に関与することが明らかになった。

GST-MZD 融合タンパク質の発現と精製

C_2H_2 型 Zn フィンガードメインをもつタンパク質は、このドメインを介して直接 DNA に結合することが報告されている (Pavletich and Pabo, 1991; Pavletich and Pabo, 1993)。このことから、Mamo が DNA に直接結合し、クロマチン構造の制御に関与する可能性が考えられる。そこで、Mamo の C_2H_2

型 Zn フィンガードメイン (MZD) が DNA と直接結合する能力をもつのか、また MZD がどのような塩基配列をもつ DNA と結合するのかを解析した。まず、Mamo の 3 つの C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもつリコンビナントタンパク質を作製した。Mamo タンパク質の 3 つの C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインを含む領域 (アミノ酸残基 798-1089 番目) を GST の C 末端側に融合させ、さらに C 末端に FLAG タグを付加した融合タンパク質 (GST-MZD タンパク質) を大腸菌で発現させ、精製した。得られたタンパク質を SDS-PAGE と anti-FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって解析した (Fig. 2-3A、B)。その結果、GST-MZD タンパク質が精製されていることが明らかになった。

GST-MZD タンパク質に結合する DNA の解析

次に GST-MZD タンパク質に結合する DNA の塩基配列の特徴を明らかにするために、random oligonucleotide selection 実験を行った (Lee and Garfinkel, 2000; Unezaki et al., 2004)。32 塩基のランダムオリゴヌクレオチドと GST-MZD タンパク質を *in vitro* で結合させ、その後、グルタチオンセファロースビーズを用いた pull down 実験を行い、GST-MZD タンパク質に結合するオリゴヌクレオチド DNA を回収した。その後 DNA をクローニングし、塩基配列を解析した (Fig. 2-3C)。49 個の独立のクローンを単離し、塩基配列を決定した結果、GST-MZD に結合する DNA 断片の塩基配列に特徴があることが明らかになった。これらの塩基配列をもとに、MZD の DNA 結合に必要なコンセンサス配列を明らかにするために、Multiple Em for Motif Eliciation (MEME) を用いて解析を行った。その結果、多くのオリゴヌクレオチドが TGCGT という塩基

配列を1つ以上もつことが分かった (Fig. 2-3C、D)。GST-MZD タンパク質と random oligonucleotide selection 実験により得られたオリゴヌクレオチド DNA との結合を確認するために、EMSA を行った。TGCGT 配列を1つ含むオリゴヌクレオチド DNA (no. 77) を選び、これを DIG 標識したプローブを作製し、EMSA を行った結果、オリゴヌクレオチド DNA と GST-MZD タンパク質との結合を確認することができた。GST タンパク質を EMSA 反応液に加えた場合には、バンドのシフトアップは起こらないが、GST-MZD タンパク質を反応液に添加した場合には、バンドのシフトアップが確認できた (Fig. 2-3E)。また、標識していないプローブをコンペティターとして反応させると、コンペティションが起こることが分かった。さらに、抗 FLAG 抗体を EMSA 反応液に加えると、スーパーシフトが確認された (Fig. 2-3E)。次に、プローブ中のコンセンサス配列 (TGCGT) が GST-MZD との結合に必要なかを調べるために、コンセンサス配列を除いたプローブ (no. 77 Δ TGCGT) を用いてゲルシフト解析を行った。その結果、GST-MZD タンパク質と no.77 Δ TGCGT プローブを反応させても、バンドのシフトアップが起こらないことが分かった (Fig. 2-3F)。これらの結果から、MZD タンパク質がある特定の塩基配列を認識し、その配列をもつ DNA と特異的に結合する性質をもつことが明らかになった。

2-4

考察

本研究では、唾液腺で Mamo を強制発現し、Mamo タンパク質の細胞内での局在を解析した。その結果、Mamo は核内に局在し、さらに、間期のモデル染色体である多糸染色体と結合することが明らかになった。この解析の過程で、Mamo の強制発現が多糸染色体の構造に影響を与えることも判明した。また、母性 Mamo を欠いた始原生殖細胞中では生殖細胞特異的なクロマチン構造に異常がみられることが分かった。さらに、GST-MZD タンパク質を作製し、random oligonucleotide selection 実験、EMSA を用いた解析を行い、GST-MZD と結合する塩基配列の特徴を明らかにした。これらの結果から、Mamo タンパク質が始原生殖細胞中のクロマチン構造の制御に関与することが示唆される。

本研究によって Mamo タンパク質が核に局在することが明らかになった。核に局在するタンパク質は一般的に核移行シグナル (classical nuclear localization signals; cNLS) をもつことが知られている (Lang et al., 2007)。そこで、Mamo タンパク質が cNLS をもつのかを PSORT II の検索アルゴリズム (Nakai and Horton, 1999) を用いて解析した結果、Mamo は cNLS をもたないことが明らかになった。このことから、Mamo の核移行には、cNLS に依存しない他のシステムによって制御されると考えられる。Signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 は cNLS をもたないが、Importin- α を介したシステムによって核に移行することが知られている (Fragerlund et al., 2002)。このことから、Importin- α を介した同様のシステムによって Mamo の核局在が制御される可能性が考えられる。

Mamo が始原生殖細胞中の生殖細胞特異的なクロマチン構造の形成に必要であることが、本研究により明らかになった。同様の凝集した染色体が、*C. elegans* の始原生殖細胞中に観察されることが報告されている (Schancer et al., 2003; Fukuyama et al., 2006)。このことから、生殖細胞特異的な染色体構造が複数の生物種で保存されており、生殖細胞の発生に必要である可能性が示唆される。母性 Mamo の活性を欠いた始原生殖細胞に由来する卵母細胞中では、減数分裂特異的な染色体凝集が起こらないことが報告されている (Mukai et al., 2007)。これらの結果から、Mamo が、生殖細胞中のいくつかのクロマチン構造の制御に関わることが示唆される。BTB/POZ-Zn フィンガータンパク質はクロマチン制御因子と複合体を形成し、機能することが知られている (Mishra et al., 2003; Ito et al., 2012)。Mamo が始原生殖細胞中のクロマチンにクロマチン制御因子をリクルートし、凝集したクロマチン構造を形成する可能性がある。

さらに本研究では、random oligonucleotide selection 実験を用いて、MZD の結合配列の解析を試みた。その結果、MZD がグアニンに富む DNA 配列に結合することが明らかになった。この結果は、C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもつタンパク質と DNA の結合には、グアニンを多く含むコンセンサス配列が必要であるという以前の報告と合致する (Berg et al., 1992; Kobayashi et al., 2000)。本研究から Mamo が特異的な配列をもつ DNA、もしくは特定の標的遺伝子に直接結合することで始原生殖細胞中のクロマチン構造を制御する可能性、また Mamo がクロマチン構造の制御を介して、特定の遺伝子発現の調節に関わる可能性が示された。

Table2-1 クローニングに用いたプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
MZD-FLAG-F	5'-CGCGGATCCATGGATGCCATGCCCGTGATT-3'
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
POZ-FLAG-F	5'-CGGGGTACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGGGCAGTGAGCACTAC-3'
L-POZ-FLAG-R	5'-CTAGTCTAGATTATTTATCATCATCATCTTTATAATCCTCGTCATCCGAGTGCG-3'
S-POZ-FLAG-R	5'-GCTCTAGATTATTTATCATCATCATCTTTATAATCGTTCGTCATCTCGGCCAG-3'
GST-MZD-F	5'-CGGGATCCCCCACTGCACATGTTTCCGT-3'

下線で示した配列は制限酵素の認識サイトを示す。

Table 2-2 random oligonucleotide selection 実験に用いたオリゴヌクレオチドとプライマーの塩基配列

	塩基配列
ランダムオリゴヌクレオチド	5'-CGCTCGAGGGATCCGAATTCN ₃₂ TCTAGAAAGCTTGTCGACGC-3'
<i>SalI-XbaI</i> プライマー	5'-GCGTCGACAAGCTTTCTAGA-3'
<i>XhoI-EcoRI</i> プライマー	5'-CGCTCGAGGGATCCGAATTC-3'

Table 2-3 EMSA に用いたプローブの塩基配列

プローブ	塩基配列
no. 77 sense probe	5' -GTCCATGCTTGGGTTGTGTGCGTTTGGTTG-3'
no. 77 antisense probe	5' -CAACCAAACGCACACAACCCAAGCATGGAC-3'
no.77 Δ gcgt sense probe	5'-GTCCATGCTTGGGTTGTGTGTTGTTG-3'
no.77 Δ gcgt antisense probe	5'-CAACCAAACAACCCAAGCATGGAC-3'

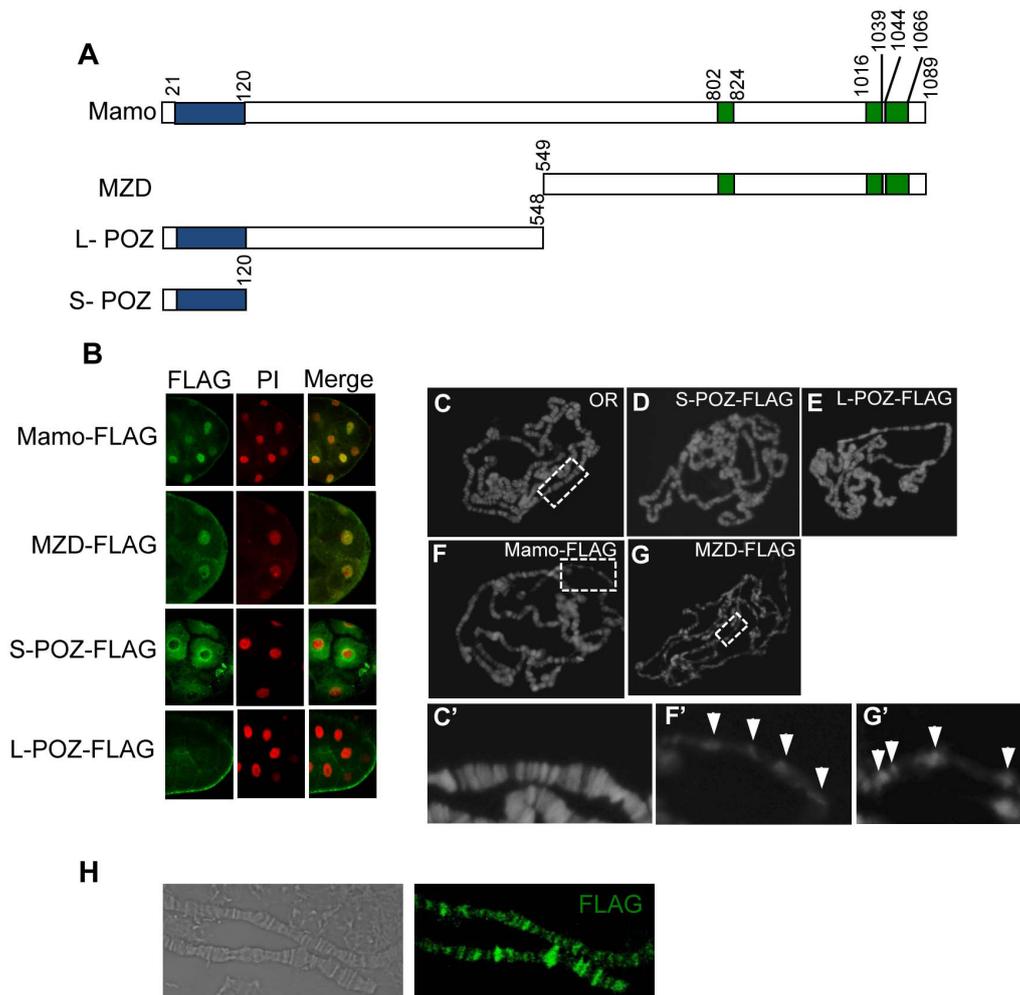


Fig. 2-1 唾液腺細胞における Mammo タンパク質の核局在と多糸染色体に対する Mammo タンパク質の結合

(A) 実験に用いた Mammo タンパク質、断片化タンパク質の模式図。Mammo は BTB/POZ ドメイン (青) と C_2H_2 型 Zn フィンガードメイン (緑) をもつ。数字はアミノ酸残基を示す。模式図には示さないが、検出のために、全てのタンパク質の C 末端側に FLAG タグを付加した。(B) Mammo-FLAG、MZO-FLAG、S-POZ-FLAG、L-POZ-FLAG を発現した唾液腺を anti-FLAG 抗体 (緑) と PI (赤) を用いて二重染色した。(C-G) Mammo-FLAG、MZO-FLAG、S-POZ-FLAG、L-POZ-FLAG を発現した唾液腺をそれぞれ材料として多糸染色体の押しつぶし標本を作製し、ヘキストで染色した。(C')、(F')、(G') は (C)、(F)、(G) の点線部分を拡大したもの。(H) Mammo-FLAG を発現した唾液腺を材料として多糸染色体の押しつぶし標本を作製し、anti-FLAG 抗体 (緑) で染色した。

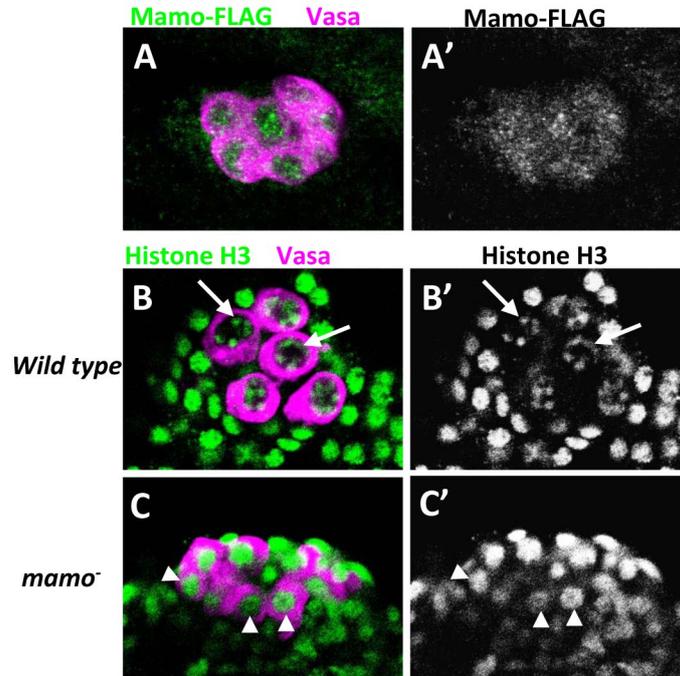


Fig. 2-2 母性 Mamo を欠いた始原生殖細胞中に観察される異常なクロマチン構造

(A) *nanos-Gal4>UAS-mamo-FLAG* 胚中の始原生殖細胞を anti-FLAG 抗体 (緑) と anti-Vas 抗体 (マゼンタ) で染色した。(A') FLAG チャンネルを個別に示したもの。(B と C) ステージ 15 における野生型胚の始原生殖細胞 (B) と *mamo*⁻ 胚の始原生殖細胞 (C) を anti-histone H3 (緑) と anti-Vas (マゼンタ) で染色した。(B' と C') ヒストン H3 チャンネルを個別に示したもの。生殖細胞特異的なクロマチン凝集が、野生型の始原生殖細胞中に見られるが (B、矢印)、Mamo を欠いた始原生殖細胞では観察されない (C、矢じり)。

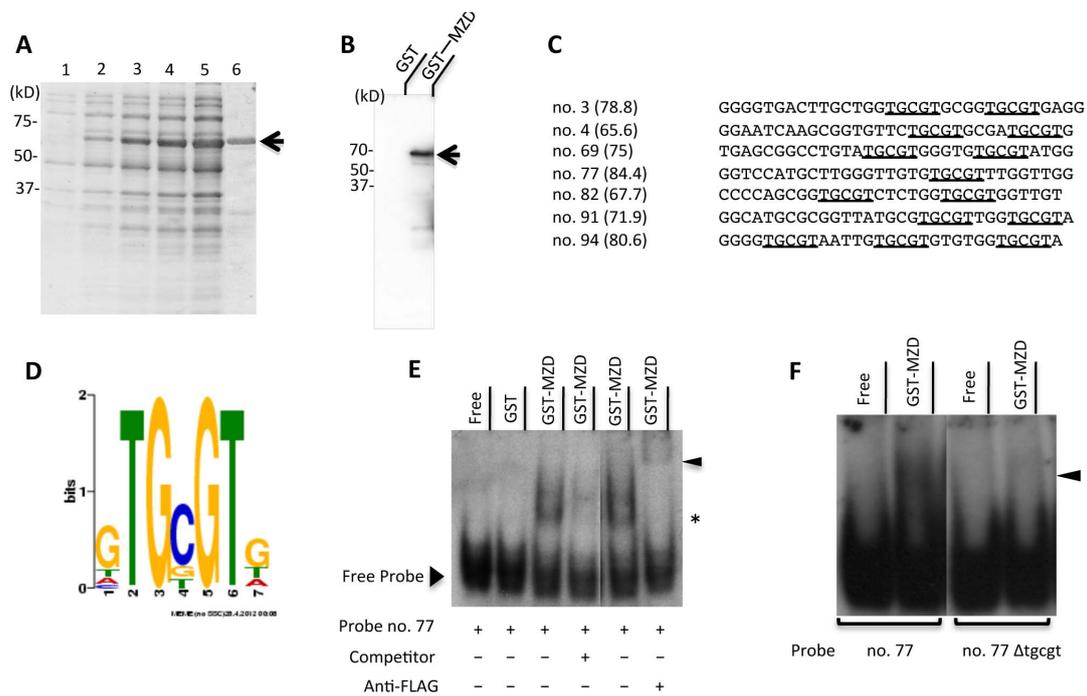


Fig. 2-3 MZD タンパク質は特定の塩基配列をもつ DNA に直接結合する

(A) 大腸菌で発現し、精製した GST-MZD タンパク質を SDS-PAGE で解析した。Lane1、タンパク質の発現誘導しなかったコントロール; Lane2、発現誘導後 0.5 h; Lane3、発現誘導後 1 h; Lane4、発現誘導後 1.5 h; Lane5、発現誘導後 2 h; Lane6、精製した GST-MZD タンパク質。

(B) 精製した GST-MZD タンパク質を anti-FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットングした。

(C) GST-MZD との結合により選別されたオリゴヌクレオチドは GC 含量の高い (65.6-84.4%) 塩基配列であった。コンセンサス配列 (TGCGT) を下線で示す。

(D) MZD の結合に必要なコンセンサス配列。random oligonucleotide selection 実験から得られた塩基配列を MEME により解析した。

(E) EMSA 解析から、GST-MZD が no.77 プローブと特異的に結合することが分かった。EMSA 反応液に DIG-標識 no.77 プローブのみを加えたもの、また反応液に DIG-標識 no.77 プローブと GST タンパク質を加えたものはネガティブコントロールである。Free Probe の位置に、タンパク質と結合していない DIG-標識 no.77 プローブが検出されている。アスタリスクの位置に、GST-MZD と DIG-標識 no.77 プローブの複合体が検出されている。矢じりの位置に、スーパーシフト、すなわち anti-FLAG 抗体、GST-MZD と DIG-標識 no.77 プローブの複合体が検出されている。この結果から、複合体中に GST-MZD が含まれることが確認できた。

(F) EMSA 解析の結果、GST-MZD の結合にはコンセンサス配列 (TGCGT) が必要であることが分かった。

第3章 Mamo による *vasa* 遺伝子の発現制御機構

3-1

序論

これまでにショウジョウバエの遺伝学的、分子遺伝学的解析から、生殖細胞の分化に必要な遺伝子が同定されており、このうちのいくつかの遺伝子 (*vas*, *nos*) の発現が初期胚の始原生殖細胞中で特異的に活性化されることが分かっている。*vas* 遺伝子は、生殖細胞の発生過程を通じて連続的に発現が観察される。また、哺乳類を含めた多くの動物種で、*vas* 遺伝子のホモログが同定され、生殖細胞中で特異的に発現することが知られている (Lasko and Ashburner, 1988; Extavour and Akam, 2003)。*vas* 遺伝子を含めたこれらの生殖細胞関連遺伝子の発現から、胚発生過程の始原生殖細胞中で、生殖細胞を特徴づける遺伝子発現が *zygotic* に活性化され始めることが示唆されるが、その遺伝子発現を活性化する分子機構については不明な点が多い。

ショウジョウバエの生殖質に含まれる母性因子が生殖細胞の形成分化に必要十分であることが細胞質の移植実験により証明されている (Illmensee and Mahowald, 1974; Illmensee and Mahowald, 1976; Illmensee et al., 1976)。このことから、生殖質に含まれる転写活性化因子が始原生殖細胞に供給され、始原生殖細胞中の生殖細胞関連遺伝子の発現を活性化すると考えられてきたが、その分子の実体は不明であった。最近、始原生殖細胞のトランスクリプトーム解析が行われ、始原生殖細胞中に含まれる転写調節因子がいくつか同定されている。また、これらの転写調節因子に対する RNAi を用いたノックダウンにより、始原生殖細胞中の *vas* 遺伝子の発現が抑制されることが報告されている

(Yatsu *et al.*, 2008)。しかし、これらの転写調節因子が *vas* 遺伝子に直接作用するのか、また、これらの因子がどのような分子機構で転写を活性化するのかについては不明である。

Mamo タンパク質は始原生殖細胞中に母性供給され、Mamo を欠いた始原生殖細胞 (*mamo*⁻ 始原生殖細胞) 中では生殖細胞特異的に発現する *vas* 遺伝子のエンハンサー活性が低下することが報告されている (Mukai *et al.*, 2007)。さらに、第 2 章の生化学的解析から、Mamo が特定の塩基配列をもつ DNA に直接結合することが示された。これら結果から、Mamo が *vas* 遺伝子に直接作用して、遺伝子発現を活性化する可能性が考えられた。第 3 章の研究では、*vas* 遺伝子に対する Mamo の作用を中心に解析を行った。その結果、Mamo が *vas* 遺伝子座に直接作用すること、*vas* 遺伝子の発現活性化にヒストンアセチル化を介したエピジェネティックな分子機構が関わることが明らかになった (Fig. 1-4)。

3-2

材料と方法

実験に用いたショウジョウバエの系統

野生型系統として Oregon-R (OR) を使用した。 *mamo*^{SV453} (Mukai et al. 2007)、 *UAS-MZD-FLAG* 系統 (Hira et al., 2013; 第2章の材料と方法を参照) を実験に用いた。また、 *UAS-CBP* 系統は Dr. J. Kumar からご供与頂いた。 *w**; *P{mata4-GAL-VP16}V37* (7063)、 *w nej^{0.3}/FM7c* (34040)、 *w ovo^{D1} v²⁴* *P{FRT}101*; *P{hsFLP}38* は Bloomington Stock Center から分与して頂いた。全ての系統は 25°C または室温で、ショウジョウバエ飼育培地を用いて飼育した。

Mamo または CBP の機能を欠いた生殖細胞クローンの作製

Mamo の機能を欠いた生殖細胞クローン作製は以前に報告した方法に従って行った (Mukai et al., 2007)。この方法では FLP/FRT 組換えシステムを用いて、突然変異ヘテロ接合の個体の卵巣に、ホモ接合の生殖細胞クローンを作製することができる。また、卵巣中の突然変異ヘテロ接合の生殖細胞は、優性の雌性突然変異 *ovo^{D1}* の作用によって、成熟卵に分化できないため、産み出された成熟卵は、突然変異ホモ接合の生殖細胞に由来する。この卵を発生させて、母性 Mamo 欠いた胚 (*mamo*⁻ 胚) の解析を行った。母性 CBP を欠いた胚の解析のために、減数分裂組換えを利用して、FRT 配列をもつ染色体に *nej^{0.3}* 突然変異を導入した。この *nej^{0.3}FRT* 系統と *w ovo^{D1} v²⁴ P{FRT}101; P{hsFLP}38* 系統を交配し、生殖細胞クローンを作製し、クローンに由来する胚を *CBP*⁻ 胚として実験に用いた。

Mamo および MZD 強制発現胚の解析

卵巣中で遺伝子発現を誘導できる *mata-tub-Gal4* ドライバーと *UAS-Mamo-FLAG* または *UAS-MZD-FLAG* 系統 (第2章参照、Hira et al., 2013) とを交配し、*mata-tub-Gal4> UAS-Mamo-FLAG*、*mata-tub-Gal4>UAS-MZD-FLAG* をそれぞれ得た。*mata-tub-Gal4> UAS-Mamo-FLAG* 雌の産み出した胚 (Mamo-FLAG OE 胚)、*mata-tub-Gal4>UAS-MZD-FLAG* 雌の産み出した胚 (MZD-FLAG OE 胚) を用いて Mamo、MZD 強制発現の影響を調べた。*UAS-MZD-FLAG*, *UAS-CBP* と *mata-tub-Gal4* を交配し得られた雌 *mata-tub-Gal4> UAS-MZD-FLAG*, *UAS-CBP* を用いて MZD と CBP の同時強制発現胚 (CBP・MZD-FLAG OE 胚) の解析を行った。

in situ hybridization

vas mRNA の検出には、全長の *vas* cDNA (pGEM-*vas* cDNA) を鋳型として、DIG 標識アンチセンス RNA プローブを合成し、*in situ* hybridization に用いた。Mamo-FLAG OE 胚、MZD-FLAG OE 胚を材料とした *vas* mRNA の *in situ* hybridization は、以前報告した方法に従って行った (Mukai et. al., 2006; Mukai et. al., 2007)。しかし、従来法を用いて、ステージ 9 – 10 の *mamo*⁻ 胚および *CBP*⁻ 胚の *vas* mRNA のシグナルを安定して検出することが困難であった。これらの胚が物理的に弱く、損傷しやすいため良好なシグナルが検出しにくいことが分かった。そこで、この点を解決するために、*in situ* hybridization

の方法に以下の変更を加えた。採卵後の胚をステンレスメッシュ上に集め、次亜塩素酸ナトリウムを加え3分室温でインキュベートし、ミリQ水で洗浄した。その後、胚を、ヘプタン 1 mL と 4% (vol/vol) ホルムアルデヒドを含む PBS (4% ホルムアルデヒド/PBS) 500 μ L を混合した固定液に加え、25 分間固定した。その後、下層 (4% ホルムアルデヒド/PBS) を取り除き、メタノールを加え、激しく振り、卵黄膜の除去を行った。その後、胚をメタノールで 2 回洗浄し、メタノール中で-20°Cで保存した。

染色の時には、メタノール中で保存した胚を ME (90 vol% メタノール、24 mM EGTA)、さらに ME:4% ホルムアルデヒド/PBS=7:3、1:1、3:7 の混合液で洗浄した。その後、4% ホルムアルデヒド/PBS 中で、室温で 20 分間、後固定した。後固定後の胚を PBTw0.1 (1 \times PBS、0.1% Tween20 (wt/vol)) で洗浄後、改良版プレハイブリダイゼーション buffer (50 vol% ホルムアミド、4 \times SSC、0.01% Tween 20 (wt/vol)) を 300 μ L 加え室温で 1 時間インキュベートした。改良版ハイブリダイゼーション buffer (50 vol% ホルムアミド、4 \times SSC、5% dextran sulfate (wt/vol)、0.01% Tween 20 (wt/vol)) 200 μ L に DIG 標識 *vas* アンチセンス RNA プローブを 100 ng 加え、プローブ溶液を用意した。プレハイブリダイゼーション buffer を取り除き、胚にプローブ溶液を加え 55°Cで一晩振盪しながらインキュベートした。インキュベート後の胚を Washing buffer (50 vol% ホルムアミド、2 \times SSC、0.01% Tween (wt/vol)) で洗浄し、過剰なプローブを取り除いた。その後、胚を Washing buffer で洗浄し、Washing buffer 中で 55°C、45 分間の洗浄を 8 回行った。洗浄後の胚に Washing buffer を加え、さらに 55°Cで一晩振盪しながらインキュベートした。その後、胚を PBTw0.1

で洗浄し、Washing buffer を除去した。さらに PBTw0.1 中で 30 分間、室温で振盪しながら洗浄した後に、胚に抗体溶液（5 vol% ヤギ血清、AP 標識 anti-DIG Fab 抗体（1:2000）を含む PBTw0.1 溶液）を 200 μ L 加え室温で 2 時間振盪しながら反応させた。その後、PBTw0.1 で洗浄し、過剰な抗体を取り除き、AP 発色用の溶液 buffer3（100 mM Tris-HCl pH 9.5、100 mM NaCl、50 mM MgCl₂、0.1% Tween20 (wt/vol)）で胚を洗浄した。その後、最終濃度 175 μ g/mL の BCIP、450 μ g/mL NBT を含む buffer3 中で胚を発色させた。発色後の胚を PBTw0.1 で洗浄し、エタノールシリーズで脱水、ヒストクリアによる透徹処理後、オイキットを用いてマウントした。

qRT-PCR

野生型および MZD 強制発現胚を、1 時間採卵し、その後 25°C で 4 時間インキュベートし、ステージ 9 まで発生させた。この胚をステンレスメッシュ上に集め、次亜塩素酸ナトリウムで卵殻を除去し、ミリ Q 水で洗浄した。約 100 個の胚からトータル RNA を QIAGEN RNeasy Mini Kit を用いて抽出した。回収した RNA 溶液 30 μ L の一部（5 μ L）を使って RNA の濃度を測定し、電気泳動を行って RNA の質を確認した。RT-PCR に使用するまで、RNA はエタノール沈殿の状態、-80°C で保存した。

野生型および MZD 強制発現胚から抽出したトータル RNA（1 μ g）を SuperScript III First-Strand 合成キット（Invitrogen）を用いて逆転写反応を行った。合成された cDNA（1/10 量）、遺伝子増幅用プライマー、SYBR Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）と混合し、qRT-PCR 反応液を調製した。増幅

反応はリアルタイム PCR 装置 (TaKaRa Thermal cycler Dice Real Time) を用いて行った。野生型の cDNA の希釈系列を用いて、遺伝子の発現量を測定した。各遺伝子に対するプライマーの塩基配列を Table 3-1 に示す。

EMSA

EMSA は以前に報告した方法に従って行った (Hira et al., 2013; 第 2 章の材料と方法を参照)。解析に用いたプローブの配列は Table 3-2 に示す。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析用の胚の固定

野生型および MZD 強制発現胚を約 0.15 g 集め、次亜塩素酸ナトリウムを用いて卵殻を除去し、胚をミリ Q 水で洗浄した。その胚を、1.8% (vol/vol) のホルムアルデヒドを含む Buffer A1 (15 mM HEPES-KOH pH 7.5、15 mM NaCl、60 mM KCl、4 mM MgCl₂、0.5% Triton X-100 (wt/vol)、0.5 mM DDT、complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) に入れ氷上でホモジナイズし、15 分間、室温でインキュベートした。その後、グリシン (最終濃度 0.125M) を加え 5 分間、室温でインキュベートした。その後、4°C で 3000 rpm、5 分間、遠心を行い、沈殿 (固定した胚) を回収した。沈殿に Buffer A1 を 5 mL 加え、攪拌し洗浄した。この洗浄を合計 3 回行った。その後、沈殿に Buffer A2 (15 mM HEPES-KOH pH 7.5、140 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、1% Triton-X100 (wt/vol)、0.1% sodium deoxycholate (wt/vol)、0.1% SDS (wt/vol)、0.5% N-lauroylsarcosine (wt/vol)、complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) を加えて、攪拌し、沈殿を Buffer A2 で洗い、最終的に沈殿を 2 mL

の Buffer A2 に懸濁し、4°C で 14000 rpm、2 分間、遠心し、沈殿を回収した。

この沈殿（固定胚）を、液体窒素を用いて凍結させた。

ChIP 解析

Dynabeads M280 Sheep anti-Mouse IgG (Life Technologies 社) 40 μ L を 0.5% BSA (wt/vol) を含む 1×PBS (0.5% BSA/PBS) 1mL で 3 回洗浄した。ビーズに 0.5% BSA/PBS を含む 1×PBS 250 μ L を加え、そこに抗体を 1 μ g 加え、4°C で一晩反応した。抗体は mouse anti-FLAG M2 抗体 (SIGMA 社)、mouse anti-histone H3K27ac CMA309 (H. Kimura)、normal mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用した。上述の凍結保存した固定胚を溶かし、buffer A2 4 mL に懸濁した。それを氷上で超音波破碎した。超音波破碎は、ampl. 30% で 30 秒 4 回、インターバル 30 秒で行った。その後、4°C で 10000 rpm 30 分間、遠心を行い、上清（断片化クロマチンサンプル）を回収した。この一部（10%）を input として実験に使った。4°C で一晩、抗体と反応したビーズを 0.5% BSA/PBS 1 mL で 3 回洗浄し、過剰な抗体を取り除いた。抗体が結合したビーズに断片化クロマチンサンプルを加え、4°C で一晩、反応した。その後、ビーズを、RIPA buffer 150 mM (50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA pH 8.0、0.1% SDS (wt/vol)、0.1% sodium deoxycholate (wt/vol)、150 mM NaCl、complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) 1 mL で洗浄した。次に RIPA buffer 500 mM (50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA pH 8.0、0.1% SDS (wt/vol)、0.1% sodium deoxycholate (wt/vol)、500 mM NaCl、complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) 1 mL で洗浄し、その後、TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTA) 1mL で 2 回洗浄した。洗浄後のビーズに ChIP

溶出 buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0、300mM NaCl、5 mM EDTA pH 8.0、0.5% SDS (wt/vol)) 200 μ L 加え 65°Cで一晩、加温し、クロマチンを溶出した。この時、input にも溶出 buffer を加え 65°Cで一晩加温した。溶出したクロマチンに RNase (最終濃度 0.2 μ g/ μ L) を加え 37°Cで 30 分間反応した。その後、proteinase K (最終濃度 0.2 μ g/ μ L) を加え 55°Cで 2 時間反応した。その後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により、DNA を抽出し、TE 40 μ L に溶解した。免疫沈降産物から回収された DNA 1 μ L、プライマー、SYBR *Premix Ex Taq*TM II (Tli RNaseH Plus) と混合し、qPCR 反応液を調製した。増幅反応はリアルタイム PCR 装置 (TaKaRa Thermal cycler Dice Real Time) を用いて行った。input の DNA の希釈系列を検量線として用いて、免疫沈降産物に含まれる DNA の量を測定した。ChIP 解析に用いたプライマーの塩基配列を Table 3-1 に示す。

結果

MZD 強制発現は内在性 *vas* 遺伝子の発現を活性化する

これまでにエンハンサートラップ系統を用いた解析から、母性 *Mamo* タンパク質を欠いた胚 (*mamo*⁻ 胚) では *vas* のエンハンサー活性が低下することが判明している (Mukai et al., 2007)。しかし、*Mamo* が内在性 *vas* 遺伝子の発現制御に関わるのかは明確ではなかった。そこで、*mamo*⁻ 胚における内在性 *vas* mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて解析した。これまでの研究から内在性 *vas* 遺伝子の zygotic な発現は胚発生ステージ 9 から始まることが明らかになっている (Van Doren et al., 1998)。そこでステージ 9-10 における *vas* 遺伝子の発現を観察した。その結果、野生型胚と比較して、*mamo*⁻ 胚では始原生殖細胞中の *vas* 遺伝子の発現が低下することが分かった。野生型の 69% の胚で、*vas* mRNA シグナル陽性の始原生殖細胞が観察される ($n = 77$)。これに対して、38% の *mamo*⁻ 胚でしか *vas* シグナル陽性の始原生殖細胞が検出されない ($n = 55$, $P < 0.01$; Fig. 3-1)。この結果から、*Mamo* が *vas* 遺伝子発現の活性化に必要であることが示唆される。次に、*Mamo* を強制発現させた胚での *vas* 遺伝子の発現を調べた。

卵巣中で遺伝子発現を誘導できる *mat α -tub-Gal4* ドライバーを用いて、*Mamo* の母性発現量を増加させ、*Mamo* の発現量を胚全体で増加させた (*Mamo*-FLAG OE 胚)。 *Mamo*-FLAG OE 胚を材料として、定量 PCR を行い、*vas* 遺伝子の発現量の解析を行った。その結果、ステージ 9-10 の *Mamo*-FLAG OE 胚では、野生型胚に比べて *vas* 遺伝子の発現量が増加することが判明した

(Fig. 3-2)。これらの結果から、Mamo が *vas* 遺伝子の発現を活性化する作用をもつことが示唆される。第 2 章の解析から、Mamo の断片化タンパク質 (MZD) が、全長タンパク質と同様に核に局在し、クロマチン構造に影響を与えることが分かった。また、Mamo-FLAG OE 胚の発生の進行に伴って、Mamo-FLAG タンパク質の部分分解が起こり、C 末端の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインを含む断片化タンパク質が検出されることが判明した (Fig. 3-3)。そこで、MZD に注目し、*mat α-tub-Gal4* ドライバーを用いて、MZD の発現量を胚全体で増加させた (MZD-FLAG OE 胚)。この MZD-FLAG OE 胚 (ステージ 9 – 10) を材料として、定量 PCR を行い、*vas* 遺伝子の発現量の解析を行った。その結果、野生型と比較して MZD-FLAG OE 胚で、*vas* 遺伝子の発現量が増加することが分かった (Fig. 3-4)。さらに、Mamo 全長を強制発現させた場合と比較して、MZD の強制発現が *vas* 遺伝子の発現をより強く活性化することが明らかになった (Fig. 3-4)。

MZD は *vas* 遺伝子座に直接作用する

次に、MZD が直接的に *vas* 遺伝子の発現を活性化するのか、間接的に活性化するのかを解析した。もし直接的に *vas* 遺伝子の発現を活性化するのであれば MZD が *vas* 遺伝子座に直接結合することが予想される。そこで、MZD が *vas* 遺伝子座のどの領域に結合するのかを、MZD の DNA 結合に必要なコンセンサス配列 (TGCGT) を用いて検索した (第 2 章参照)。その結果、*vas* 遺伝子座に 13 箇所の MZD 結合サイト候補が見つかった (Fig. 3-5)。MZD がこれらの候補サイトと結合するのかを、MZD-FLAG OE 胚を材料として、anti-FLAG 抗体を

用いた ChIP 解析を行った。その結果、MZD が *vas* 遺伝子座のイントロンにある配列 (*vas A*) と *in vivo* で結合することが分かった (Fig. 3-6B)。MZD と *vas A* の配列をもつ DNA との結合を確認するために、*vas A* の配列をプローブとして EMSA による解析を行った結果、*vas A* の配列をもつ DNA と GST-MZD タンパク質が直接結合することが分かった (Fig. 3-6A)。これらの結果から、MZD が *vas* 遺伝子座の第一イントロン中の配列と直接結合し、クロマチンの状態に影響を与えることが示唆される。

MZD 強制発現によって、*vas* イントロン中の MZD 結合領域のヒストン H3K27 のアセチル化レベルが高くなる

次に、MZD による *vas* 遺伝子の発現活性化メカニズムの解析を試みた。これまでの研究から BTB/POZ zinc-finger タンパク質として知られている Fruitless タンパク質が、クロマチン制御因子と相互作用し、下流遺伝子の発現を制御することが明らかにされている (Ito et al., 2012)。また、イントロン中にエンハンサーが含まれる遺伝子では、イントロンの領域のヒストン H3 タンパク質 N 末端の 27 番目のリシン残基のアセチル化 (H3K27ac) のレベルが高くなることが報告されている (Creyghton et al., 2010; Fig. 1-4)。さらに、H3K27ac 修飾が転写伸長反応の促進に関わることが示されている (Stasevich et al., 2014)。これらのことから、MZD が *vas* 遺伝子座の H3K27ac 修飾レベルを高め、*vas* 遺伝子の発現を活性化すると予想した。この可能性を検証するために、野生型胚及び MZD-FLAG OE 胚を材料として、anti-H3K27ac 抗体を用いた ChIP 解析を行った。その結果、野生型と比べて MZD-FLAG OE 胚中で、MZD 結合サイ

ト (*vas A*) のヒストン H3K27ac のレベルが著しく高くなることが分かった (Fig. 3-7)。これらの結果から、MZD は *vas* 遺伝子座に直接結合し、ヒストンのアセチル化の制御を介して、*vas* 遺伝子の発現を活性化すると考えられる。

MZD 自体にはヒストンのアセチル化に関与する機能ドメインは含まれていない。このことから、MZD が別のヒストンアセチル化酵素と共同して作用し、*vas* 遺伝子の発現を活性化すると予想した。これまでに CBP タンパク質がヒストン H3K27 のアセチル化に関与することが報告されている (Tie et al., 2009)。そこで、CBP タンパク質に注目し、まず CBP タンパク質が内在性 *vas* 遺伝子の発現に必要なかを解析した。発生過程の RNA-seq 解析データから、*CBP* mRNA が初期胚に母性供給されることが示唆された (FlyBase, <http://flybase.org>)。シヨウジョウバエでは *nejire* (*nej*) 遺伝子が CBP をコードする。*nej* 突然変異体は致死であるため、germline clone 作製して、母性供給 CBP を低下させた (*CBP*⁻胚)。*CBP*⁻胚における *vas* 遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法により解析した。野生型と *CBP*胚のステージ 9 – 10 における *vas* 遺伝子の発現を比較した結果、*CBP*⁻胚では *vas* 遺伝子の発現が低下することが分かった (Fig. 3-8)。60%の野生型胚で、*vas* mRNA 陽性の始原生殖細胞が観察されるのに対して ($n = 35$)、5%の *CBP*⁻胚でしか *vas* mRNA 陽性の始原生殖細胞が観察されないことが分かった ($n = 44$, $P < 0.01$)。このことから、CBP が内在性 *vas* 遺伝子の発現活性化に必要であることが明らかになった。次に、MZD と CBP が共同して *vas* 遺伝子の発現を活性化するかを検討するために、MZD と CBP を同時に初期胚中で強制発現し (*CBP*・MZD-FLAG OE 胚)、*vas* 遺伝子の発現量に対する影響を調べた。MZD-FLAG OE 胚では *vas* 遺伝子の発現量が増加する

ことが分かっている。これに対して、CBP・MZD-FLAG OE 胚では、MZD-FLAG OE 胚よりさらに *vas* 遺伝子の発現量が増加することが判明した (Fig. 3-9)。また、CBP だけを強制発現させた胚 (CBP OE 胚) では *vas* 遺伝子の発現量はほとんど増加せず、野生型と同程度であることが明らかになった (Fig. 3-9)。これらの結果から、CBP 単独の強制発現は、*vas* 遺伝子の発現活性化に十分ではないが、MZD と CBP の共発現が *vas* 遺伝子発現を相乗的に活性化する作用をもつことが示唆される。以上の解析結果は、MZD が CBP を *vas* 遺伝子座にリクルートし、ヒストン H3K27 のアセチル化を促進することを介して、*vas* 遺伝子の発現を活性化するという制御機構を強く支持する。

胚発生過程の始原生殖細胞中で、生殖細胞関連遺伝子 *nos* の発現が活性化されることが知られている (Yatsu et al., 2008)。そこで、MZD の強制発現が *nos* 遺伝子の発現に影響を与えるかを調べた。その結果、MZD の強制発現が、*nos* 遺伝子の発現に顕著な影響を与えないことが分かった (Fig. 3-10)。この結果から、Mamo が特定の遺伝子発現に影響を与えることが示唆される。

3-4

考察

第3章の解析から、生殖細胞関連遺伝子である *vas* 遺伝子が *Mamo* の標的遺伝子の一つであることが明らかになった。内在性 *vas* 遺伝子の発現が開始する胚発生ステージ 9-10 での *vas* 遺伝子の発現を解析した結果、*mamo* を欠いた胚では野生型と比べて、始原生殖細胞中で *vas* 遺伝子の発現が低下することが明らかになった。逆に、*Mamo* 及び *MZD* の強制発現により、*vas* 遺伝子の発現量が増加することが判明した。ChIP 解析、EMSA 解析により、*MZD* が *vas* 遺伝子座のイントロン中の *vas A* 配列と直接結合することが明らかになった。また、*MZD* 強制発現によって *vas A* 領域のヒストン H3K27ac のレベルが高くなることが明らかになった。さらに遺伝学的解析から、*MZD* と H3K27 のアセチル化酵素 *CBP* とが共同して作用することが判明した。これらの結果は、*Mamo* が *CBP* を *vas* 遺伝子座にリクルートすることで、*vas* 遺伝子の発現を活性化するという作用機構を強く支持する。

著者の知る限りにおいて、これまでに、*vas* 遺伝子の発現に影響を与える母性因子は同定されているが、その発現の活性化に十分な因子は報告されていない (Yatsu *et al.*, 2008)。*Mamo* の低下が、始原生殖細胞の生存や維持に影響を与え、間接的に *vas* 遺伝子発現の低下を引き起こす可能性が考えられる。しかし、*Mamo* の母性供給量を増加させることにより、*vas* 遺伝子の発現量が増加することから、*Mamo* が *vas* 遺伝子の転写活性化に関わることが示唆される。さらに、*MZD* が *vas* 遺伝子座に直接作用すること、*vas* 遺伝子座の転写活性化に関わるヒストン修飾 H3K27ac レベルを高めることから、*Mamo* が転写活性化に

直接関与すると考えられる。

本研究により、Mamo 全長とともに MZD 強制発現が *vas* 遺伝子の発現誘導に十分であることが分かった (Fig. 3-4)。このことから Mamo の N 末端の BTB/POZ ドメインは *vas* 遺伝子の活性化に必要ないと考えられる。MZD の C 末端の Zn フィンガードドメインは特定の塩基配列をもつ DNA に結合する性質をもつ (第 2 章)。MZD の他のドメインが CBP と相互作用し、この相互作用を介して CBP が *vas* 遺伝子座にリクルートされる可能性がある。これまでに CBP がポリグルタミン配列やポリプロリン配列をもつタンパク質と相互作用することが報告されている (Steffan et al., 2000)。MZD にもポリグルタミン配列やポリプロリン配列が含まれており、これらの配列を介して MZD が CBP と相互作用することが予想できる。今後、MZD と CBP タンパク質間の相互作用を解析する必要がある。

Mamo 全長の強制発現よりも、MZD の強制発現が *vas* 遺伝子の発現をより強く誘導することが分かった。これまでに、ほ乳類の BTB/POZ Zn フィンゲータタンパク質の解析から、BTB/POZ と C₂H₂ 型 Zn フィンガードドメインの間の領域が翻訳後修飾を受け、BTB/POZ Zn フィンゲータタンパク質の活性が抑制されることが知られている (Roh et al., 2007)。Mamo に含まれる機能調節あるいは抑制ドメインが取り除かれたことによって、MZD がより強い転写活性化の効果をもつ可能性が考えられる。今回、実験で用いた MZD は Mamo タンパク質を断片化した人工産物である。しかし、ショウジョウバエのトランスクリプトーム解析から MZD と似た構造をもつ *mamo* mRNA が卵巣中に検出されることが報告されている (FlyBase)。このことから、始原生殖細胞中で BTB/POZ ドメイン

をもたない Mamo タンパク質が機能をもつ可能性が考えられる。

mamo⁻ の始原生殖細胞中で、*vas* 遺伝子のエンハンサー活性が低下することが知られているが、*vas* 遺伝子の発現は完全に抑制されないことが報告されている (Mukai et al., 2007)。このことから、Mamo 以外の因子による *vas* 遺伝子発現の活性化が予想できる。*vas* 遺伝子上流解析から、転写開始点上流 -96 ~ -57 塩基の位置にあるシスエレメントが *vas* 遺伝子の発現に必要であることが知られている (Sano et al., 2002)。このシスエレメントに Mamo 結合配列は含まれないことから、別の転写活性化因子が上流のシスエレメントを介して、*vas* 遺伝子の転写活性化に関わる可能性が示唆される。本研究によって、Mamo が *vas* 遺伝子の第一イントロン中の結合配列に作用することが明らかになった。*vas* 遺伝子上流域とイントロンにそれぞれ独立の転写制御機構が作用し、並列的に *vas* 遺伝子の発現を制御する可能性が考えられる。複数の転写制御機構が、生殖細胞中での *vas* 遺伝子発現の安定化や発現の連続性に寄与するのかもしれない。

これまでに、ヒストンのアセチル化と転写活性化の相関は明らかになっていたが、因果関係については不明であった。最近、特定の遺伝子座のヒストンアセチル化 (H3K27ac) が、転写因子が標的遺伝子を探し出す速度を上げること、さらに RNA ポリメラーゼ II の CTD の Ser5 リン酸化から Ser2 リン酸化への変化を促進し転写開始反応から伸長反応に移行する速度を高めることで、標的遺伝子の転写を高めることが明らかになった (Stasevich et al., 2014)。ヒストンのアセチル化修飾が転写反応を促進する一つの原因であると考えられる。この結果と本研究の結果を合わせて考えると、Mamo が、ヒストンアセ

チル化を介して、始原生殖細胞中の特定の遺伝子の発現を高めるための前提となるクロマチン状態を作り出すことが強く示唆される。母性供給される転写因子の RNAi によるノックダウンスクリーニングにより、*vas* 遺伝子の発現に影響を与える転写関連因子 (*ovo*、*Trf2*) が同定されている (Yatsu et al., 2008)。クロマチン制御因子 *Mamo* と転写因子 *ovo*、さらに TATA 配列結合タンパク質関連因子 *Trf2* が共同して *vas* 遺伝子の活性化に関わる可能性がある。

本研究により、*vas* 遺伝子が *Mamo* の標的遺伝子の一つであることが明らかになった。今後、MZD-FLAG OE 胚を材料とした網羅的な ChIP-seq 解析と遺伝子発現解析を行うことで、*Mamo* の標的遺伝子の全貌が明らかになると予想できる。MZD の強制発現が、生殖細胞関連遺伝子 *nos* の発現を活性化しない (Fig. 3-10) ことから、*Mamo* が生殖細胞中の特定の遺伝子発現に影響を与えること、生殖細胞関連遺伝子の転写活性化に複数の制御機構が関与することが示唆される。

これまでに、ショウジョウバエの生殖質に含まれる多くの母性因子が同定されており、いくつかの母性因子 (*Gcl*、*Nos*、*Pgc*) が RNA ポリメラーゼ II CTD のリン酸化の抑制を介した始原生殖細胞中の転写抑制に関与することが明らかになっている (Kobayashi et al., 2005)。これに対して、始原生殖細胞中における転写活性化の制御機構に関する研究の報告例は多くない。本研究により、ヒストンアセチル化を介したエピジェネティックな制御機構が始原生殖細胞中の生殖細胞関連遺伝子の活性化に関わることが明らかになった。また、*CBP* が *Mamo* のコファクターとして作用することが判明した。マウスの始原生殖細胞中では embryonic stem (ES) 細胞と比較して、*CBP* が高レベルで発現しており、

始原生殖細胞の維持に関与することが報告されている (Elliott et al., 2007)。このことからショウジョウバエ以外の他の動物種においても、ヒストンアセチル化を介した制御が生殖細胞の維持や、分化に重要な働きをもつ可能性が示唆される。本研究の結果は、始原生殖細胞中のエピジェネティックな遺伝子発現制御の重要性を示すもので、生殖細胞の形成に関わる分子機構の解明に貢献すると考えられる。

Table 3-1 リアルタイム PCR に用いたプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
RT-rp49 F	5'-AGCGCACCAAGCACTTCATC-3'
Rt-rp49 R	5'-GACGCACTCTGTTGTCGATACC-3'
RT-vas sense	5'-TTGCGTTGCGCGAAGTGAT-3'
RT-vas anti-sense	5'-CGCCGCGAGTATCAACAAT-3'
RT-nos F	5'-CGGACGAGATTGCGCGAT-3'
RT-nos R	5'-ACGGGAGTGCTCCGCCA-3'

Table 3-2 EMSA に用いたプローブの塩基配列

プローブ	塩基配列
EMSA-vasa 2S	5'-ATTTGTTTTTCCTGCGTTGCCTGCTGAGT-3'
EMSA-vasa 2AS	5'-ACTCAGCAGGCAACGCAGGAAAAACAAAT-3'



Fig. 3-1 *mamo*⁻ 胚における *vas* 遺伝子の発現低下

ステージ 10 の野生型胚と *mamo*⁻ 胚を、*vas* アンチセンスプローブを用いて染色した。野生型胚では、胚の中腸原基の近傍の始原生殖細胞中に *vas* mRNA のシグナルが検出される（矢じり）。*mamo*⁻ 胚では *vas* mRNA のシグナルが著しく低下する。

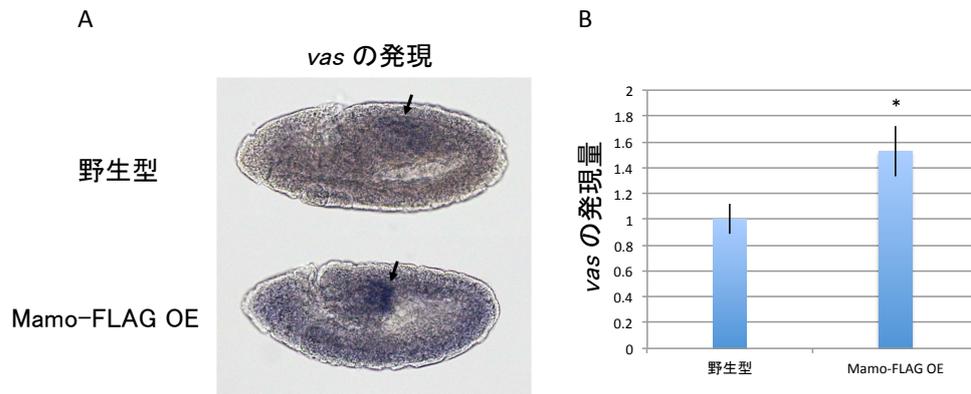


Fig. 3-2 Mamo-FLAG OE 胚における *vas* 遺伝子の発現

(A) ステージ 10 の野生型胚と Mamo-FLAG OE 胚を *vas* アンチセンスプローブを用いて染色した。矢印は *vas* 陽性の始原生殖細胞を示す。(B) ステージ 9–10 の野生型と Mamo-FLAG OE 胚における *vas* mRNA の発現量を qRT-PCR により検出した。* $P < 0.05$ 有意差検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用いた。

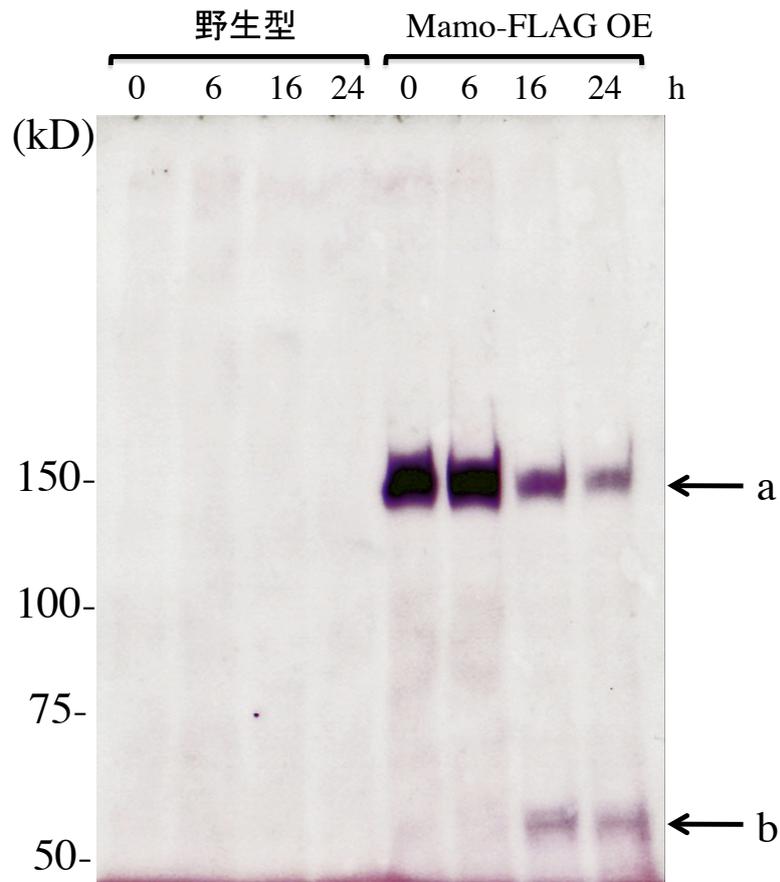


Fig. 3-3 胚発生の進行に伴う母性 Mamo タンパク質の部分分解

野生型及び Mamo-FLAG OE 胚の抽出物を、anti-FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットティングした。産卵直後の胚には全長 Mamo (a) が検出されるが、胚発生の進行に伴って低分子量の Mamo 分解産物のシグナル (b) が検出される。18 °C で一定時間発生を進行させた胚を解析に用いた。Mamo の C 末端に付加した FLAG タグを検出していることから、Mamo の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもつ Mamo 断片が検出されている。

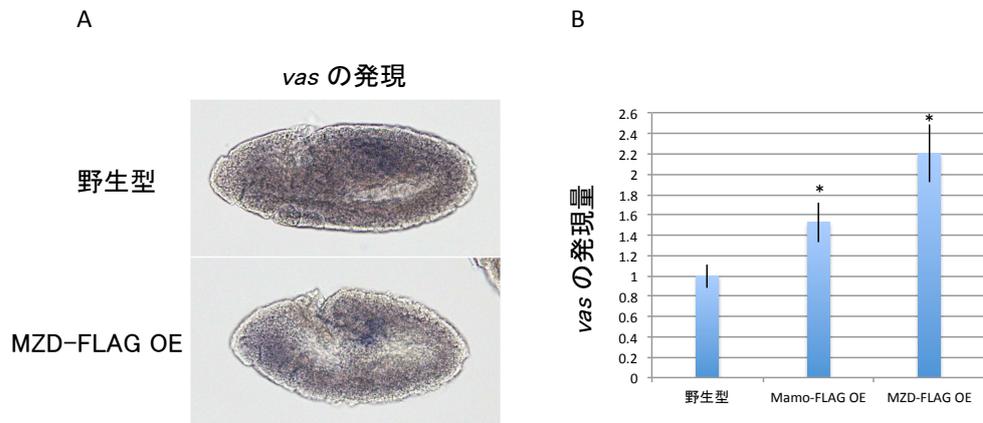


Fig. 3-4 MZD-FLAG OE 胚における *vas* 遺伝子の発現

(A) ステージ 10 の野生型胚と MZD-FLAG OE 胚を *vas* アンチセンスプローブを用いて染色した。(B) ステージ 9 – 10 の野生型胚と MZD-FLAG OE 胚における *vas* mRNA の発現量を qRT-PCR により検出した。* $P < 0.05$ 有意差検定には one-way ANOVA を用いた。

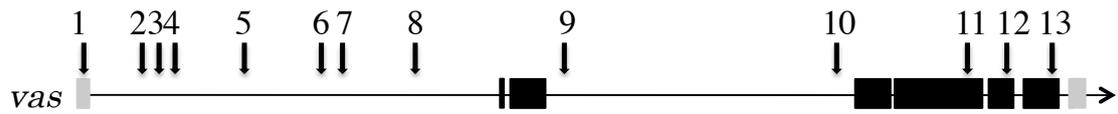
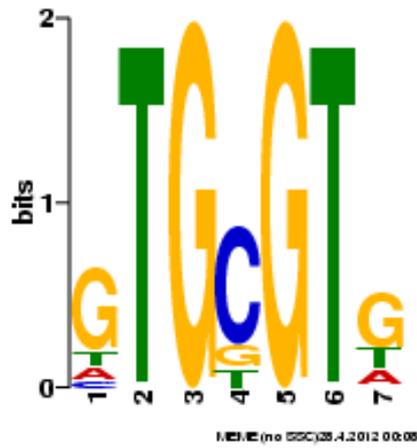


Fig. 3-5 *vas* 遺伝子座の MZD 結合配列の候補

MZD の DNA 結合に必要なコンセンサス配列をもとに、*vas* 遺伝子座上の MZD 結合配列の候補を検索した結果、13 箇所候補があることが分かった。

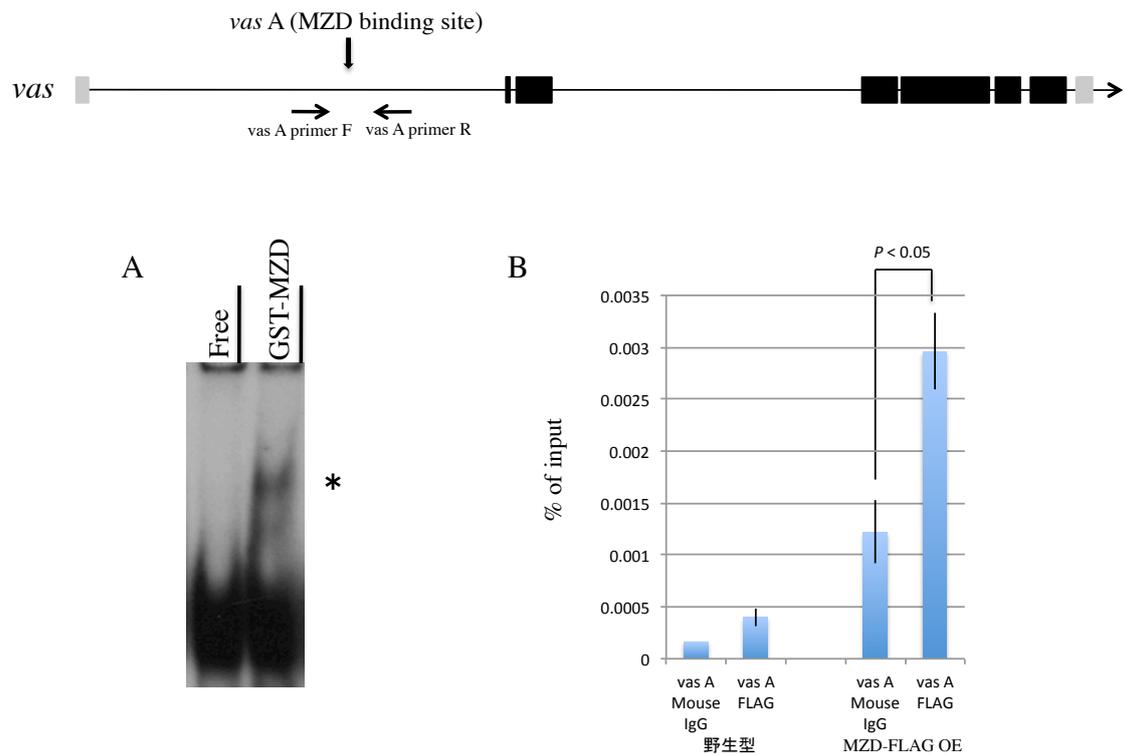


Fig. 3-6 MZD は *vas* 遺伝子座に直接結合する

(A) EMSA 解析により MZD が *vas* 遺伝子座にある配列 (*vas A*) と結合することが分かった。*vas A* の塩基配列をもつプローブと GST-MZD タンパク質を用いて EMSA 解析した結果、プローブと GST-MZD の複合体が検出された (アスタリスク)。(B) MZD-FLAG OE 胚に対して anti-FLAG 抗体を用いた CHIP 解析を行った結果、MZD が *vas A* の領域に多く検出された。有意差検定には one-way ANOVA を用いた。

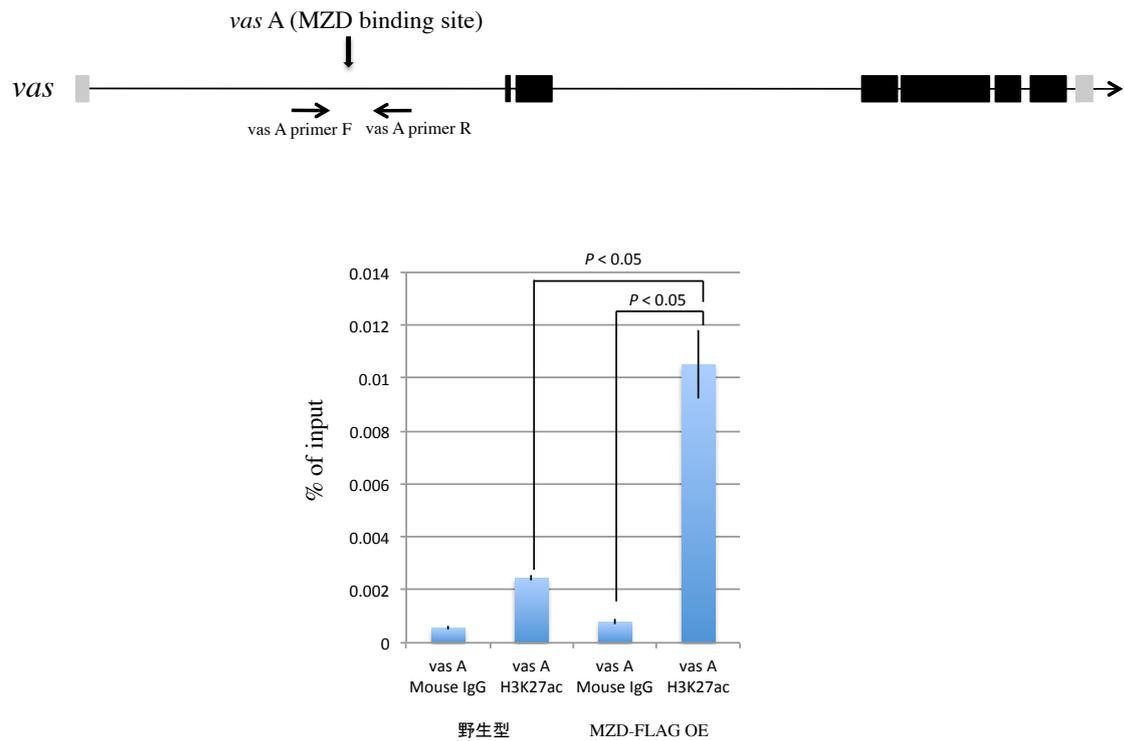


Fig. 3-7 MZD 強制発現による H3K27ac 修飾レベルの上昇

MZD-FLAG OE 胚と野生型胚に対して anti-H3K27ac 抗体を用いた ChIP 解析を行った結果、MZD-FLAG OE 胚の *vas A* 領域に高レベルの H3K27ac が検出された。

有意差検定には one-way ANOVA を用いた。



Fig. 3-8 母性 *CBP* を低下させた胚における *vas* 遺伝子の発現

ステージ 10 の野生型胚と *CBP*⁻ 胚を *vas* アンチセンスプローブを用いて染色した。矢じりは *vas* 陽性の始原生殖細胞を示す。母性 *CBP* を低下させた胚の始原生殖細胞中では、*vas* 遺伝子の発現が低下することが分かった。

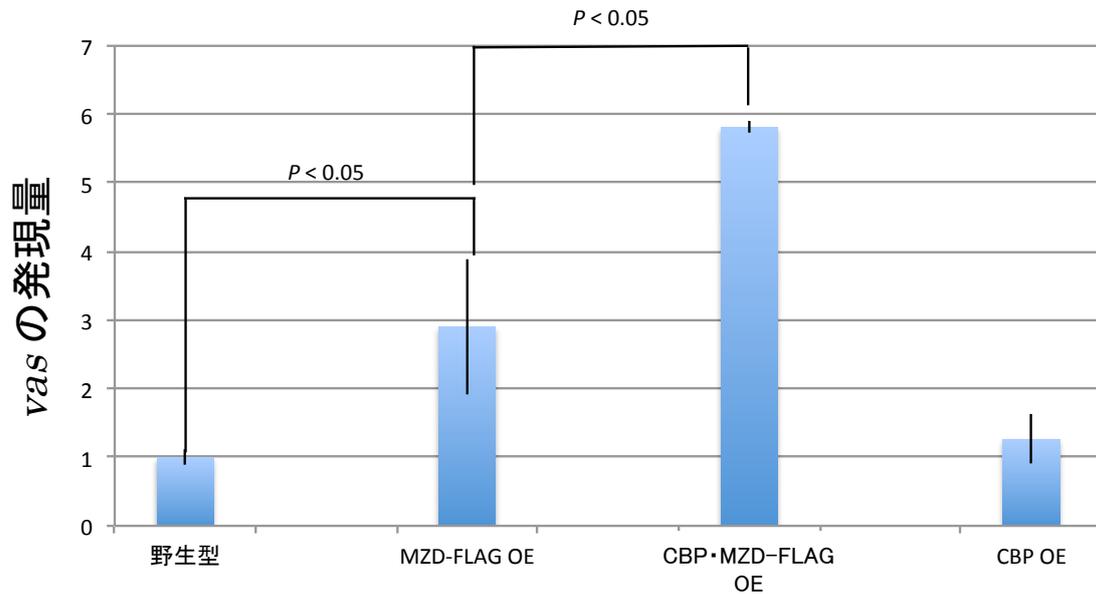


Fig. 3-9 MZD と CBP の共発現の *vas* 遺伝子の発現に対する影響

ステージ 15 の野生型、MZD-FLAG OE、CBP・MZD-FLAG OE、CBP OE 胚における *vas* mRNA の発現量を qRT-PCR により検出した。*vas* 遺伝子の発現量は、MZD だけを強制発現させた時よりも MZD と CBP の両方を強制発現させた時の方が増加する。これに対して、CBP だけを強制発現させても *vas* 遺伝子の発現量に影響を与えない。

有意差検定には one-way ANOVA を用いた。

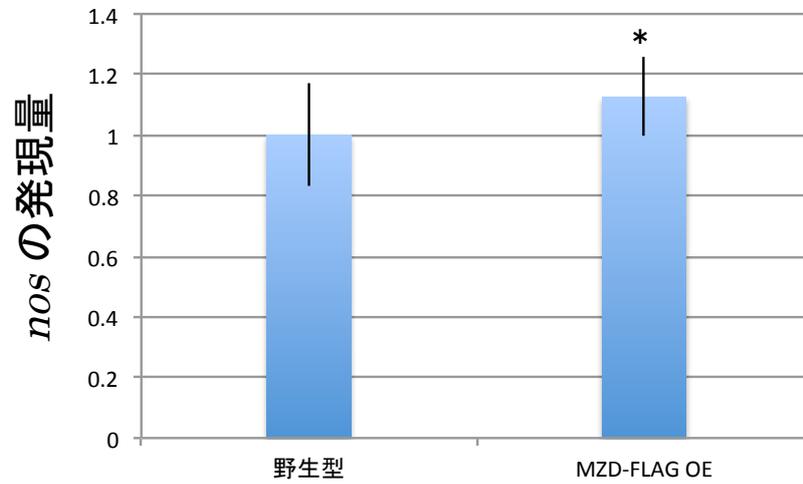


Fig. 3-10 MZD 強制発現の *nos* 遺伝子の発現に対する影響

ステージ 15 の野生型胚と MZD-FLAG OE 胚における *nos* mRNA の発現量を qRT-PCR により検出した。 $P > 0.05$ 有意差検定には one-way ANOVA を用いた。

第4章 生殖細胞分化とヒストン修飾の関係

4-1

序論

ヒストンタンパク質の翻訳後修飾は、転写の活性化や抑制などの遺伝子発現制御に関与する。例えば、遺伝子発現の活性化には、ヒストン H3 タンパク質 N 末端の 4 番目のリシン残基 (H3K4) や 36 番目のリシン残基 (H3K36) のメチル化が関係する。これに対して、9 番目のリシン残基 (H3K9) や 27 番目のリシン残基 (H3K27) のメチル化が遺伝子発現の抑制と関係することが知られている (Fig. 1-4) (Sims et al., 2003)。H3K4me3、H3K27me3 などのヒストン修飾が、全能性幹細胞である ES 細胞の維持やその分化能の制御に重要な役割をもつことが知られている (Bloushtain-Qimron et al., 2009; Jiang et al., 2011)。また、ヒストン修飾が成体組織中の幹細胞の維持にも関与する (Buszczak et al., 2009)。

ショウジョウバエ成虫の卵巣小管の *germarium* 領域の先端部には生殖幹細胞が存在し、*terminal filament* やキャップ細胞から構成される生殖幹細胞ニッチに接触した状態で生殖幹細胞が維持される (Fig. 4-1)。生殖幹細胞が分裂し、ニッチから離れた娘細胞はシストブラストに分化し、さらに不完全分裂し、細胞間連絡で繋がった 16 細胞シストに分化する。16 細胞シスト中には枝分かれた細胞内小器官フェーズームが観察され、この構造が 16 細胞シスト中の生殖細胞の運命決定に関与することが知られている。16 細胞シスト中の 1 つが卵母細胞に、残りの 15 個の細胞が哺育細胞に運命決定される。16 細胞シストはその後、濾胞細胞に取り囲まれて卵室を形成し、その中で卵母細胞の成熟が進行

する (Fig. 4-1)。

これまでに生殖幹細胞ニッチから作り出される分泌性タンパク質、bone morphogenetic protein (BMP) が生殖幹細胞の維持に重要な役割をもつことが報告されている (Ohlstein and McKearin, 1997; Chen and McKearin, 2003)。BMP がニッチに接した生殖幹細胞に作用し、幹細胞中の分化促進因子 *bag-of-marbles (bam)* の発現の抑制が起こり、幹細胞の未分化状態が維持される。幹細胞が分裂し、娘細胞がニッチから離れると、BMP シグナルによる転写抑制が解除され、娘細胞 (シストブラスト) 中で分化促進因子 Bam が合成されるようになる。Bam タンパク質が Nanos/Pumilio 翻訳抑制複合体と拮抗し、翻訳抑制の解除を介して、生殖細胞の分化を促進するモデルが提唱されている (Li et al., 2009)。

BMP シグナルだけでなく、エピジェネティックな遺伝子発現の抑制が生殖幹細胞の維持に必要であることが報告されている。遺伝子発現の抑制に関わるヒストン修飾を触媒する酵素をコードする *scrawny* や *eggless* 遺伝子が生殖幹細胞の維持に必要である (Buszczak et al., 2009; Wang et al., 2011)。しかし、分化の促進に関わるエピジェネティックな遺伝子発現の制御機構や、分化促進因子 Bam とエピジェネティックな制御機構との関係は不明である。

本研究によって、生殖幹細胞の分化過程において、生殖細胞中でヒストン修飾 H3K36 のトリメチル化 (H3K36me3) のレベルが一過的に増加すること、H3K36 のトリメチル化酵素 Set2 が生殖細胞中の H3K36me3 レベルの上昇と生殖細胞の分化に必要であること、さらに、Set2 が分化促進因子 Bam の下流で働くことが判明した。また、生殖細胞の分化に必要な *orb* 遺伝子の発現の活性

化に Set2 が関与することが判明した。

4-2

材料と方法

実験に用いたショウジョウバエの系統

野生型系統として、*Oregon-R*を使用した。*Set2¹/FM7*は Dr. M. Kuroda から、*bam⁸⁶/TM3* は Dr. D. M. MacKearin からご供与頂いた。*orb^{dec/+}*、*UAS-Set2.IR*、*v²⁴ P{FRT}101*、*P{ubi-GFP FRT101}*、*P{MKRS, hs-FLP 86E}*、*P{hs-Gal4}*は Bloomington Stock Center から、*A2BP1^{KG06463/+}* は Drosophila Genetic Resource Center から、*UAS-Set2 RNAi* (106459) は Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) から分与して頂いた。全ての系統は 25°C もしくは室温で、ショウジョウバエ飼育培地を用いて飼育した。各々の実験に使った温度条件は以下に記述した。

免疫染色

以前に報告した方法に従って卵巣の免疫染色を行った (Mukai et al., 2011)。H3K4me1 に特異的なモノクローナル抗体 (CMA301)、H3K4me2 に特異的なモノクローナル抗体 (CMA302)、H3K4me3 に特異的なモノクローナル抗体 (CMA303)、H3K27ac に特異的なモノクローナル抗体 (CMA309)、H3K27me3 に特異的なモノクローナル抗体 (140-20 IE7)、H3K36me3 に特異的なモノクローナル抗体 (144-6 13C9) をそれぞれ 1:10 に希釈して使用した (Kimura et al., 2008)。一次抗体として、rabbit anti-Vas 抗体 (1:500 希釈)、mouse anti-Set2/dHyph (1:15 希釈) (Bell et al., 2007)、rabbit anti-GFP (1:200 希釈, Invitrogen) を使用した。mouse 1B1 モノクローナル抗体 (1:10 希釈)、mouse

anti-Orb 4H8 モノクローナル抗体 (1:30 希釈)、rat anti-DN-cadherin モノクローナル抗体 (1:20 希釈) は Developmental Studies Hybridoma Bank から分与して頂いた。Alexa Fluor 488-と 568-標識二次抗体 (Molecular Probes) は 1:1000 希釈で使用した。染色した卵巣は共焦点顕微鏡 (TCS NT、Leica Microsystems) で観察した。

卵巣の表現型の解析方法

FLP/FRT 組換えシステムを用いて、突然変異ヘテロ接合の個体にホモ接合の細胞クローンを作製し、遺伝子の機能を失った細胞の解析を行った。クローン作製は以前に報告した手順に従って行った (Mukai et al., 2011)。減数分裂組換えを利用して、FRT 配列をもつ染色体に *Set2^l* 突然変異を導入した。この *Set2^l* FRT 染色体を用いて、*Set2⁻* の生殖細胞クローンを作製した。コントロールの生殖細胞クローンは突然変異を導入していない FRT 染色体を用いて作製した。*Set2* 遺伝子に対する RNAi を用いてノックダウン実験を行うために、成虫になるまで 30°C で飼育した *nanos-Gal4/+; UAS-Set2.IR/+* の雌個体を実験群とし、同様に 30°C で飼育した *nanos-Gal4/+* の雌個体をコントロール群として実験を行った。生殖幹細胞に対する *bam* 遺伝子の強制発現の影響を調べるために、*hs-bam* 系統の雌成虫を 37°C で 1 時間加温し、その後 1 時間 25°C で飼育した。その後、もう一度 37°C で 1 時間加温し、解剖するまで 25°C で飼育した。この条件でヒートショック処理を行った野生型卵巣で、生殖細胞中の *Set2* の細胞内局在に異常が観察されることが分かった。そこで、*hs-bam* の発現をより穏やかな温度条件で誘導し、*Set2* の核局在に対する *bam* 強制発現の影響を調べた。

hs-bam 系統と野生型の成虫雌個体をそれぞれ 30°C で 3 日間飼育し、免疫染色し Set2 の核局在を解析した。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析

野生型と *bam*⁸⁶ 突然変異体の卵巣を材料として、以前に報告されている方法に従って、ChIP 解析を行った (Baxley et al., 2011)。免疫沈降反応には 1 µg の抗体を使用した。コントロールとして、normal mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用した。anti-H3K36me3、anti-H3K4me3 (Kimura et al., 2008) と anti-RNA polymerase II (8WG16; Covance) 抗体を ChIP 解析に使用した。インプットの DNA、コントロール IgG を用いた免疫沈降サンプルの DNA および各種の抗体を用いた免疫沈降サンプルの DNA をそれぞれ PCR により解析した。定量 PCR には GeneAce SYBR qPCR Mix (Nippon Gene) を使用した。Table 4-1 のプライマーを ChIP 解析に用いた。

4-3

結果

シストブラスト中で H3K36me3 のレベルが高くなる

生殖細胞の分化とヒストン修飾を介した遺伝子発現制御との関連を調べるために、まず、成虫卵巣において、生殖幹細胞からシストブラスト、さらに 16 細胞シストに分化する過程でヒストン修飾の状態がどのように変化するかを解析した。野生型の卵巣をヒストン修飾特異的な抗体を用いて染色した (Fig. 4-2; Kimura et al., 2008)。その結果、ニッチを離れ、分化を開始した生殖細胞であるシストブラスト中で、遺伝子の発現活性化と関連するヒストン修飾 H3K36me3 のレベルが高くなることが分かった (Fig. 4-2F, G)。シストブラスト中で分化促進因子 Bam が発現することが知られている。そこで、Bam の発現を *bam-GFP* レポーターを用いて検出し、ヒストン修飾 H3K36me3 のシグナルと比較した結果、H3K36me3 のシグナルが *bam-GFP* 陽性のシストブラスト中で増加することが明らかになった (*bam-GFP*; Chen and McKearin, 2003a) (Fig. 4-2H)。これに対して、遺伝子の抑制と関係するヒストン修飾である H3K27me3 のシグナルは *bam-GFP* 陰性の未分化な生殖細胞中では高く、*bam-GFP* 陽性の分化が進んだシストブラスト中では、H3K27me3 のシグナルが低下することが分かった (Fig. 4-2E, I)。これらの観察から、H3K36me3 のレベルが生殖幹細胞からシストブラストへの分化過程で高くなることが判明した。次に、未分化な生殖細胞が多く含まれる野生型の三齢幼虫の卵巣と *bam*⁸⁶ 突然変異体の成虫卵巣における H3K36me3 のレベルを解析した。その結果、未分化な生殖細胞中では H3K27me3 のシグナルは検出されたが、H3K36me3 の

強いシグナルは検出されなかった (Fig. 4-2J-M)。これらの結果から、H3K36me3 を介したエピジェネティックな制御が生殖細胞の分化に関与することが示唆された。

Set2 ヒストンメチル化酵素はシストブラストにおける H3K36me3 レベルの上昇と分化に必要である

H3K36me3 修飾に Set2 ヒストンメチル化酵素が関与することが知られている (Larschan et al., 2007; Stabell et al., 2007)。そこで、Set2 の卵巣における発現を、anti-Set2 抗体を用いた免疫染色により調べた。その結果、germarium 中のほとんどの生殖細胞中で Set2 が発現していること、さらに Set2 の核内レベルがシストブラスト中で高くなることが分かった (Fig. 4-3A)。次に Set2 が H3K36me3 レベルの上昇や生殖細胞の分化に必要なかどうかを確かめるため、*UAS-Set2.IR* 系統 (Stabell et al., 2007) を用いて生殖細胞中の Set2 の発現を抑制することを試みた。生殖細胞中で *Set2 RNAi* を発現させることで、Set2 レベルを低下させることができることが判明した (Fig. 4-4)。全て (100%) のコントロール (*nanos-Gal4/+*) の卵巣小管の *germarium* 領域では、生殖細胞中で Set2 シグナルが検出された ($n = 97$)。これに対して、*Set2 RNAi* を *nanos-Gal4* を用いて生殖細胞中で発現させた場合には、57%の卵巣小管で生殖細胞中の Set2 のシグナルが著しく低下することが分かった (Fig. 4-4; $n = 170$)。

次に、*Set2 RNAi* を発現させた卵巣小管での H3K36me3 レベルを観察した。その結果、*Set2 RNAi* 処理により H3K36me3 のレベルが低下することが明らかになった。コントロールの卵巣では、97%の卵巣小管においてシストブラスト

中で H3K36me3 シグナルが検出された (Fig. 4-3B; $n = 30$)。これに対して、*nanos-Gal4* ドライバーを用いて *Set2* RNAi を生殖細胞中で発現させた時には、シストブラスト中に H3K36me3 のシグナルが検出される卵巣小管が 41%まで減少することが判明した (Fig. 4-3C; $n = 39$, $P < 0.001$)。さらに、*Set2* RNAi 処理によって生殖細胞の分化が阻害されることが分かった。野生型の卵巣小管に含まれる生殖幹細胞やシストブラスト中にはスペクトロソームという球状の細胞内小器官が含まれる。これに対して、より分化の進んだ 16 細胞シスト中には枝分かれした細胞内小器官フューゾームが観察される。このフューゾーム構造が 16 細胞シストの分化の指標となる。1B1 抗体を用いた免疫染色により、卵巣小管中のフューゾーム構造を解析した結果、ほとんど (96%) のコントロール (*nanos-Gal4/+*) の卵巣小管において、枝分かれしたフューゾームをもつ生殖細胞シストが観察された (Fig. 4-3D; $n = 47$)。これに対して、34%の *Set2* RNAi を発現させた卵巣小管中で、フューゾームの断片化が起こり、生殖細胞シストの分化の異常が観察された (Fig. 4-3E; $n = 67$; $P < 0.001$)。これらの結果から、*Set2* が H3K36me3 レベルの上昇とシストブラストの分化の両方に必要であることが示された。

次に *Set2* の null allele である *Set2^l* 突然変異体 (Larschan et al., 2007) を用いて生殖細胞クローンの解析を行った。その結果、ほとんど (80%) のコントロールクローン中で、強い H3K36me3 シグナルが検出された (Fig. 4-3F; $n = 30$)。これに対して、74%の *Set2* の機能を欠いた (*Set2⁻*) 生殖細胞クローン中で H3K36me3 レベルが著しく低下することが分かった (Fig. 4-3G; $n = 38$)。さらに、84%の *Set2⁻* 生殖細胞シストで生殖細胞の分化異常が観察された (Fig.

4-3H; $n = 37$)。これらの結果から、*Set2* がシストブラストにおける H3K36me3 レベルの上昇と生殖細胞の分化に必要であることが明らかになった。

Set2 は *bam* の下流で作用する

次に *Set2* と分化促進因子 Bam が共同して生殖細胞の分化を制御するのかを調べるために、両者間の遺伝学的相互作用を調べた。それぞれの突然変異体のヘテロ接合体 *bam*^{86/+} と *Set1*^{+/+} の卵巣では、シストブラストの分化の異常が観察される卵巣小管の割合がそれぞれ 5% ($n = 77$)、3% ($n = 68$) 程度であるのに対して、2重ヘテロ突然変異体 (*Set2*^{1/+}; *bam*^{86/+}) では、26%の *germarium* で、シストブラストの分化の異常が観察された ($n = 125$) (Fig. 4-5A-C)。これらの結果から、*Set2* が *bam* と共同してシストブラストの分化を促進する可能性が示された。次に Bam の発現に *Set2* の活性が必要かを確かめるために、*Set2*^{-/-} の生殖細胞中での Bam の発現を調べた。その結果、生殖細胞中の *Set2* の活性が Bam の発現に必要ないことが分かった (Fig. 4-6)。これに対して、*bam* 突然変異体では生殖細胞中の核内 *Set2* レベルが減少することが明らかになった (Fig. 4-5D、E)。これらの結果から、*bam* が *Set2* の制御に関わることが示唆される。このことは、上述の *bam* 突然変異体で H3K36me3 のレベルが減少する結果と合致する (Fig. 4-2M)。

もし、*bam* が *Set2* の制御に関わるならば、*bam* と *Set2* が共同してヒストン修飾 H3K36me3 の制御に関与することが予想できる。そこで、次に *bam* と *Set2* の2重ヘテロ突然変異体を作製し、H3K36me3 修飾に対する影響を調べた。それぞれの突然変異体のヘテロ接合体 *Set1*^{+/+} と *bam*^{86/+} の卵巣では、シストブラ

ストの中の H3K36me3 シグナルが検出されない卵巣小管の割合がそれぞれ 3% ($n = 117$)、2% ($n = 134$) 程度であるのに対して、2重ヘテロ突然変異体 ($Set2^{1/+}; bam^{86/+}$) では、29%の卵巣小管でシストブラスト中の H3K36me3 シグナルが観察されないことが分かった ($n = 157$) (Fig. 4-7)。これらの結果から、*bam* と *Set2* が共同して H3K36me3 修飾の制御に関わることが明らかになった。

bam が H3K36me3 レベルの上昇に十分かを確かめるために、ヒートショック処理によって強制的に *bam* の発現を誘導できる *hs-bam* 系統 (ヒートショックプロモーターの下流に *bam* の cDNA が連結されたコンストラクトを導入した系統、Ohlstein and McKearin, 1997) を用いて、H3K36me3 に対する影響を観察した。その結果、*bam* の強制発現によって H3K36me3 レベルが上昇することが判明した。野生型の卵巣小管では、ヒートショック処理によって H3K36me3 レベルが上昇した生殖幹細胞は観察されない ($n = 42$)。これに対して、*hs-bam* 系統の場合には、ヒートショック処理を行った 51%の卵巣小管中で強い H3K36me3 シグナルをもつ生殖幹細胞が検出された (Fig. 4-5F、G; $n = 65$)。この観察から、*bam* の発現が H3K36me3 レベルを上昇させる作用をもつことが示唆される。

Set2 が H3K36me3 修飾を触媒するメチル化酵素であることから、*bam* が *Set2* を活性化し、H3K36me3 レベルの増加が起こり、生殖細胞の分化が促進されると予想した。そこで、*Set2* が *bam* の下流で作用するのかを検討するために、次の実験を行った。*bam* 強制発現によって幹細胞の分化を誘導することができる (Ohlstein and McKearin, 1997)。この分化誘導の際に同時に *Set2* の活性を抑制し、幹細胞の分化に対する影響を調べた。*hs-bam* 系統をヒートショック処

理し、その 24 時間後の卵巣を観察した結果、71%の卵巣小管で、生殖幹細胞の分化が誘導され、幹細胞が失われることが分かった (Fig. 4-5H; $n = 79$)。これに対して、*bam* と *Set2* RNAi を同時に強制発現させると、生殖幹細胞の分化誘導が抑制されることが判明した (19.6%、 $n = 189$; $P < 0.02$) (Fig. 4-5I、J)。これらの結果から、*Set2* の活性が *bam* によって制御されること、さらに *bam* の下流で *Set2* が作用することが示唆される。

上述の観察から、核内 *Set2* レベルがシストブラスト中で高くなること (Fig. 4-3A)、生殖細胞における核内 *Set2* レベルが *bam* 突然変異体では低下すること (Fig. 4-5E) が判明している。これらの結果から、*bam* が *Set2* の核局在を制御すると予想した。そこで、*bam* 発現が *Set2* の核局在を促進する作用をもつのかを検証した。*bam* を強制発現するために、*hs-bam* 系統を 30°C で飼育し、*Set2* の細胞内局在を観察した。まず始めに、この温度条件で、H3K36me3 レベルが上昇するかを検討した。野生型の卵巣において、生殖幹細胞中に高レベルの H3K36me3 シグナルが検出される卵巣小管の割合は 6% ($n = 79$) であった (Fig. 4-8A)。これに対して、*hs-bam* 系統の卵巣では、生殖幹細胞中に高レベルの H3K36me3 シグナルが検出される卵巣小管の割合は 36% ($n = 84$, $P < 0.01$) であった (Fig. 4-8B)。この結果から、この条件下での *bam* の強制発現が H3K36me3 レベルの上昇に十分であることが分かった。次に、30°C で飼育した *hs-bam* 系統での *Set2* の細胞内局在を観察した。野生型卵巣においては、核内 *Set2* レベルが高い生殖幹細胞が観察される卵巣小管の割合が 12% ($n = 79$) であるのに対して、*hs-bam* 系統の卵巣においては、54%の卵巣小管中で核内 *Set2* レベルが高い生殖幹細胞が検出されることが判明した (Fig. 4-8C、D; $n = 79$ 、

$P < 0.01$)。これらの結果から、*bam* が *Set2* の核内への局在を促進する作用をもつことが示唆される。

***Set2* は *orb* 遺伝子の発現活性化に必要である**

次に、*Set2* がどのようにして生殖細胞の分化を制御するのか、そのメカニズムを解析するために、*Set2* 遺伝子とシストブラストの分化に必要な分化遺伝子である *A2BP1* あるいは *orb* 遺伝子 (Lantz et al., 1994; Tastan et al., 2010) との間の遺伝学的相互作用を解析した。*Set2*^{+/+} と *orb*^{dec/+} の卵巣では、シストブラストの分化異常が観察される卵巣小管の割合がそれぞれ 7% ($n = 106$)、4% ($n = 73$) 程度であるのに対して、2重ヘテロ突然変異体 (*Set2*^{1/+}; *orb*^{dec/+}) の卵巣では、24%の卵巣小管でシストブラストの分化の異常が観察された ($n = 132$) (Fig. 4-9A-C)。これらの結果から、*Set2* が *orb* と共同してシストブラストの分化を促進する可能性が示された。これに対して、*Set2*^{1/+}; *A2BP1*^{KG06463/+} の卵巣では、シストブラストの分化異常はほとんど観察されなかった。これらの結果から、*Set2* が、特に *orb* の発現の制御に必要であることが示唆される。この可能性を検証するために、*Set2* の機能を欠いた生殖細胞クローン中での *orb* の発現を解析した。野生型の卵巣では、Orb タンパク質は *germarium* の region 2a に位置する分化途中の 4 細胞シスト中で発現が検出され始める (Fig. 4-1; 16 細胞シストになる前の段階)。コントロールの卵巣では、*germarium* の region 2a に位置する 74%の生殖細胞クローン中に Orb のシグナルが検出された (Fig. 4-9D; $n = 50$)。これに対して、31%の *Set2*⁻ 生殖細胞クローン中にしか Orb のシグナルが観察されなかった (Fig. 4-9E; $n = 62$, $P < 0.001$)。これらの結果から、シ

ストブラストから 16 細胞シストが分化する過程において、*Set2* が適切に *orb* の発現を促進するために必要であることが示された。

次に、卵巣における *orb* 遺伝子座の H3K36me3 修飾の状態を調べた。ChIP 解析を行った結果、*orb* 遺伝子座に H3K36me3 修飾が検出された。さらに *orb* 遺伝子座の 3'-UTR の H3K36me3 レベルが 5'-UTR のレベルより高いことが判明した (Fig. 4-10B、C)。これまでに、転写が活発な遺伝子座に H3K36me3 修飾が検出され、さらに遺伝子座の 5'-UTR と比較して 3'-UTR の H3K36me3 修飾レベルが高いことが報告されている (Larschan et al., 2007; Barski et al., 2007)。これらの結果から、生殖細胞中の *orb* の発現が、H3K36me3 を介したエピジェネティックな制御によって活性化されることが示唆される。

次に、*bam*⁸⁶ 突然変異体卵巣における *orb* 遺伝子座の H3K36me3 状態を調べた。上述の結果から、*bam*⁸⁶ 突然変異体の卵巣中で *orb* 遺伝子座の H3K36me3 修飾レベルは低くなると予想される。ChIP 解析の結果、*bam*⁸⁶ 突然変異体の卵巣において、*orb* 遺伝子座の 3'-UTR 領域の H3K36me3 レベルが、野生型と比較して顕著に低いことが明らかになった (Fig. 4-10D)。H3K36me3 修飾が転写の伸長反応を促進することが報告されている (Krogan et al., 2003)。これらの結果から、*bam* がエピジェネティックな制御を介して *orb* の発現を活性化すると考えられる。さらに *bam*⁸⁶ 突然変異体の卵巣中では、*orb* 遺伝子座の 5'-UTR 領域における H3K4me3 や RNA ポリメラーゼ II のレベルが低下する (Fig. 4-10D) ことから、*bam* が転写の開始の過程にも影響を与える可能性がある。

4-4

考察

第4章の研究によって、成虫卵巣中の生殖幹細胞の分化過程において、転写の伸長反応に関わるヒストン修飾 H3K36me3 のレベルが一過的に上昇すること、H3K36 のトリメチル化酵素 Set2 が生殖細胞中の H3K36me3 レベルの上昇と生殖細胞の分化に必要であること、さらに、Set2 が分化促進因子 Bam の下流で作用することが判明した。また、生殖細胞の分化に必要な orb 遺伝子の発現の活性化に Set2 が関与すること、卵巣中の orb 遺伝子座に H3K36me3 修飾が検出されることが判明した。これらの結果から、分化促進因子 Bam とエピジェネティックな転写制御との新たな関係が明らかになった。

生殖細胞中の H3K36me3 修飾状態が分化促進因子 Bam によって制御されることが本研究により示された。Bam タンパク質は主に細胞質中に検出されることが、また Bam タンパク質自体は核移行の制御に関連したドメインをもたないことから、Bam は Set2 の核局在を間接的に制御すると考えられる。Set2 はコファクターと相互作用することで、その機能が調節されることが知られている (Fuchs et al., 2012)。Bam が Set2 を制御するメカニズムを解明するためには、Set2 の核内移送に関わるコファクターの同定が必要である。本研究によって、分化促進因子 Bam とエピジェネティックな転写制御との新たな関係が明らかになった。Bam は、おそらく H3K36me3 修飾を介したエピジェネティックな制御を介して、転写抑制に関わるヒストン修飾を解除し、生殖細胞の分化を促進すると考えられる。あるいは、H3K36me3 修飾により転写伸長反応が促進され、その結果として転写抑制に関わるエピジェネティックな制御が抑制される

可能性も考えられる。

本研究によって、エピジェネティックな制御によって *orb* の発現が活性化されることが明らかになった。*orb* は細胞質ポリアデニル化エレメント結合タンパク質 (CPEB タンパク質) をコードしているため、翻訳の制御に関わると予想できる。*Orb* タンパク質が生殖細胞中の mRNA のポリアデニル化の制御を介して、mRNA の安定性を高める可能性や、タンパク質の翻訳を促進する可能性が考えられる。本研究により明らかになったエピジェネティックな転写活性化の下流で翻訳の促進機構が作用する可能性がある。

生殖幹細胞中で *Nanos/Pumilio* 翻訳抑制複合体が生殖細胞の分化に関わる因子の mRNA の翻訳を抑制することで幹細胞の未分化状態が維持され、シストプラスト中で合成された *Bam* タンパク質が *Nanos/Pumilio* 翻訳抑制複合体と拮抗し、翻訳抑制を解除することで、生殖細胞の分化が促進されるというモデル、つまり翻訳制御を中心とした生殖細胞の分化制御モデルが提唱されている (Li et al., 2009)。しかし、この制御の標的となる mRNA の実体はまだ明らかになっていない。さらに、標的 mRNA の転写活性化の機構も不明である。本研究により、*Bam* 強制発現によって誘導される生殖幹細胞の分化過程に *Set2* が必要であることが分かった。このことから、*Bam* の下流で、*H3K36me3* 修飾を受ける遺伝子に注目して解析することで、生殖細胞の分化に関わる新たな遺伝子の同定や、生殖細胞の分化促進に関わる制御機構の解明が可能になることが予想できる。*Set2* は転写の伸長反応を促進することが知られていることから (Krogan et al., 2003)、生殖幹細胞中の分化遺伝子はおそらく転写の準備が整った状態で休止しており、*bam* の発現により、転写伸長反応が促進されることで、

遺伝子発現が活性化される可能性がある。

Table 4-1 ChIP 解析に用いたプライマーの塩基配列

プライマー	配列
<i>orb</i> 5'-UTR For	5'-GAGTAGTTTGGCGAAACAGCATCG-3'
<i>orb</i> 5'-UTR Rev	5'-CGCACTTGCAATCGCATCCCGT-3'
<i>orb</i> 3'-UTR For	5'-GTCAACAGCATCAGGCGATC-3'
<i>orb</i> 3'-UTR Rev	5'-CAATGATAATGACGATGATGAGCCC-3'

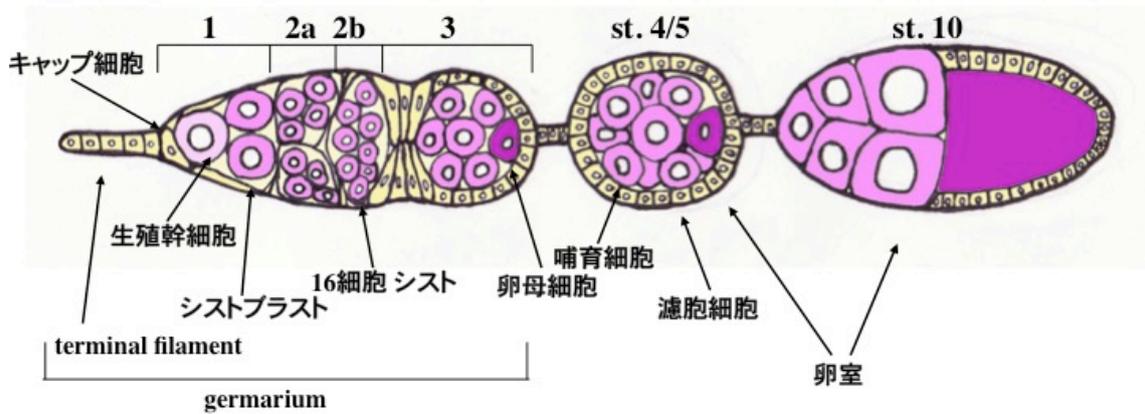


Fig. 4-1 ショウジョウバエ成虫の卵巣小管の模式図

ショウジョウバエの成虫卵巣は約 16 本の卵巣小管から構成される。卵巣小管の先端部には germarium 領域がある。germarium の先端には体細胞性の terminal filament とキャップ細胞からなる生殖幹細胞ニッチがあり、そこに接した状態で生殖幹細胞が存在する。生殖幹細胞が分裂し、ニッチから離れた娘細胞はシストプラストへと分化する。シストプラストは 4 回の不完全分裂をし、細胞間連絡で繋がった 16 細胞シストへと分化する。

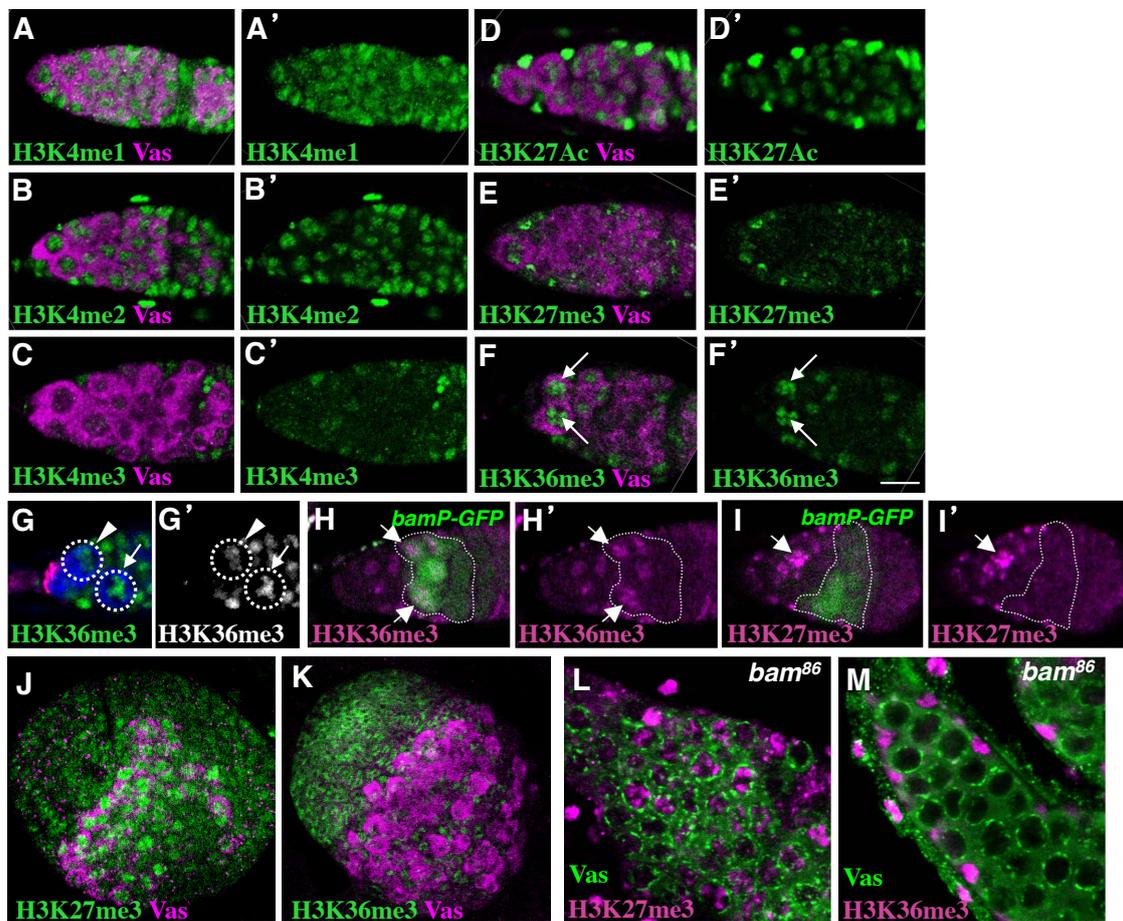


Fig. 4-2 生殖細胞の分化に伴うヒストン修飾レベルの変化

(A-F) 野生型の卵巢小管をそれぞれのヒストン修飾に対する抗体 (緑) と anti-Vas 抗体 (マゼンタ) で二重染色した。H3K36me3 の強いシグナルがシストブラスト中に検出された (F、矢印)。(G) 卵巢小管を anti-H3K36me3 抗体 (緑)、anti-Vas 抗体 (青)、生殖幹細胞ニッチを染める anti-DN-cadherin 抗体 (赤) で三重染色した。強い H3K36me3 のシグナルがシストブラスト (矢印) で検出された。矢じりは生殖幹細胞を示す。(H と I) *bamP-GFP* 系統の卵巢小管を anti-H3K36me3 抗体 (H、マゼンタ) または anti-H3K27me3 抗体 (I、マゼンタ) と anti-GFP 抗体 (緑) で二重染色した。(J と K) 三齢幼虫の卵巢を anti-H3K27me3 抗体 (J、緑) または anti-H3K36me3 抗体 (K、緑) と anti-Vas 抗体 (マゼンタ) で二重染色した。(L と M) *bam⁸⁶* 突然変異体の卵巢小管を anti-H3K27me3 抗体 (L、マゼンタ) または anti-H3K36me3 抗体 (M、マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。

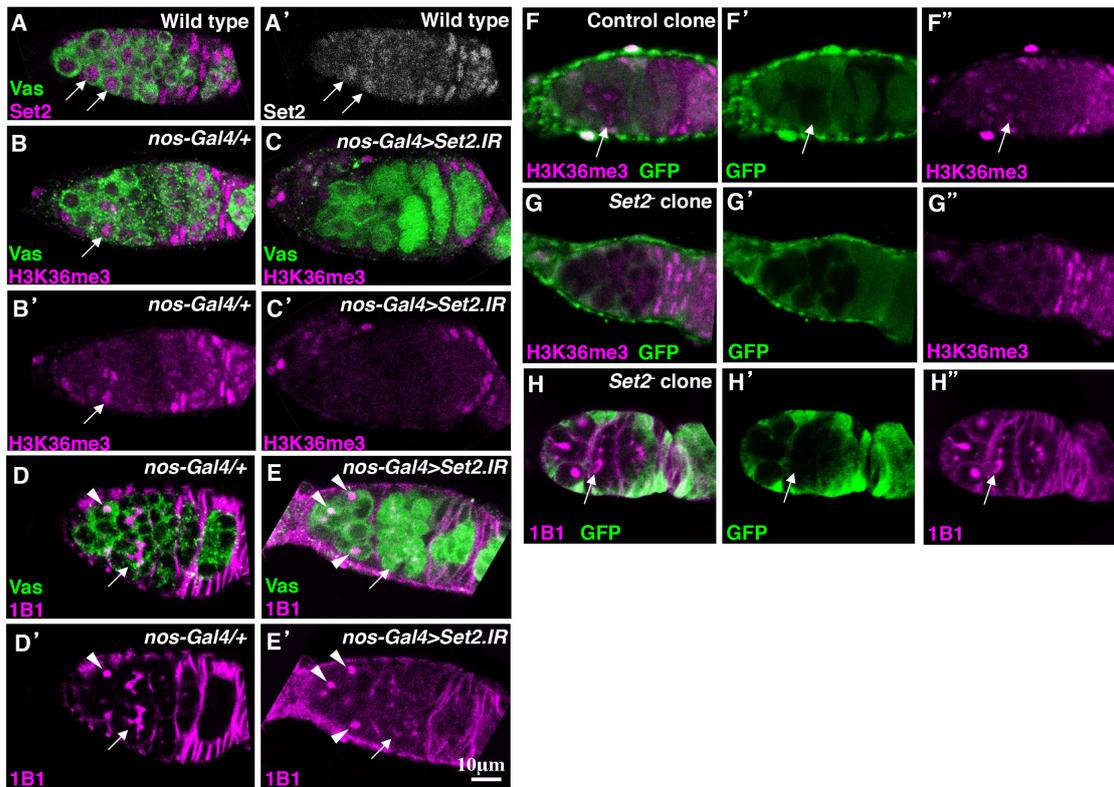


Fig. 4-3 生殖細胞の分化に伴う Set2 の核内レベルの変化とその機能解析

(A) 卵巣小管を anti-Set2 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。核内の Set2 レベルはシストブラスト中で高くなる (矢印)。(B と C) コントロール (*nos-Gal4/+*) (B) と *nos-Gal4>UAS-Set2.1R* (C) の卵巣小管を anti-H3K36me3 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で染色した結果。(D と E) *nos-Gal4/+* (D) と *nos-Gal4>UAS-Set2.1R* (E) の卵巣小管を、スペクトロソーム (矢じり) とフューゾーム (矢印) を染色する 1B1 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。(F-H) コントロールクローン (F) と *Set2* クローン (G, H) を含む卵巣を anti-H3K36me3 抗体 (F, G, マゼンタ) または 1B1 抗体 (H マゼンタ) と GFP 抗体 (緑) で二重染色した。GFP を発現していない細胞がクローンである。H の矢印は断片化したフューゾームを示す。

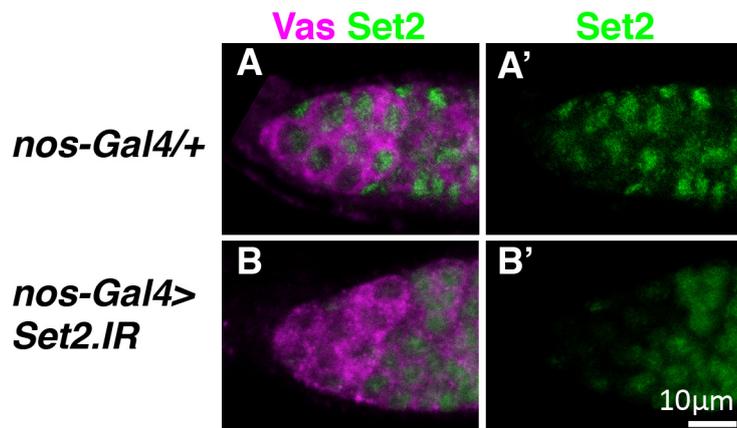


Fig. 4-4 *Set2* RNAi 発現による *Set2* 発現の低下

nos-Gal4/+ (A) と *nos-Gal4>UAS-Set2.IR* (B) の卵巢小管を anti-Vas 抗体 (マゼンタ) と anti-Set2 抗体 (緑) で二重染色した。*Set2* RNAi を生殖細胞中で発現することでシストプラストにおける *Set2* の発現が低下する。

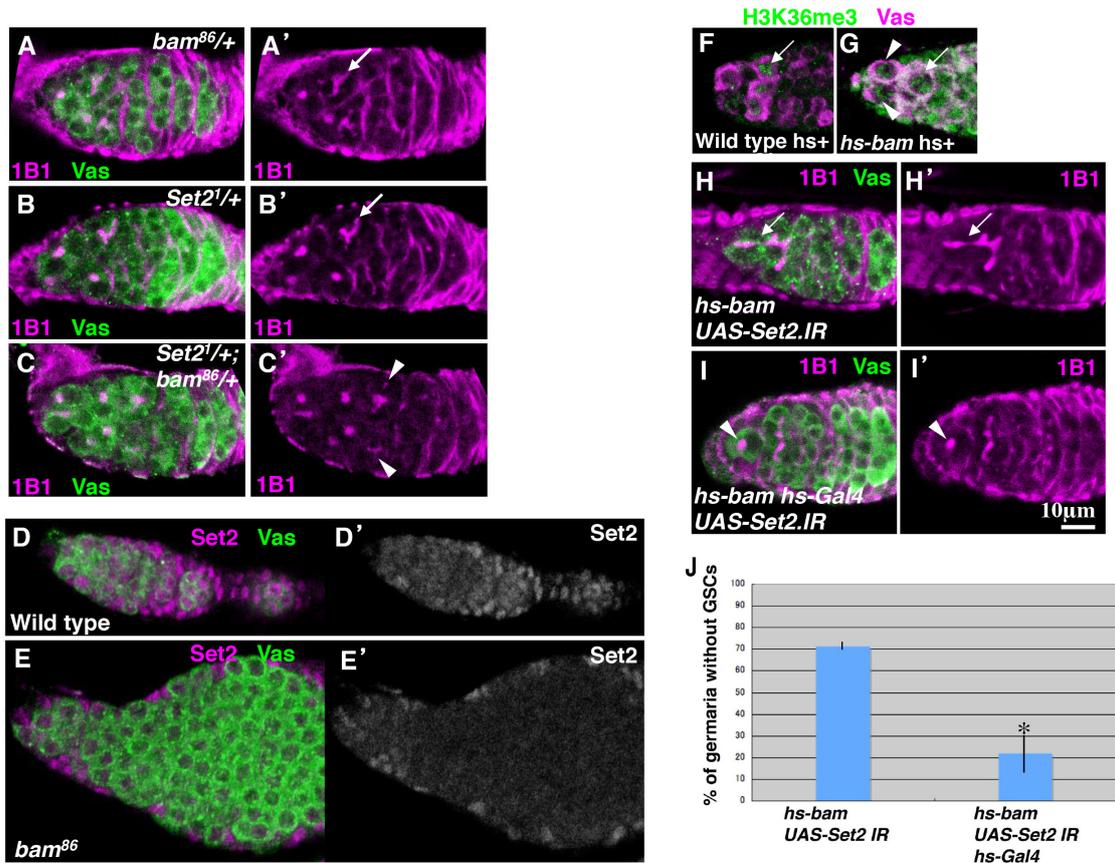


Fig. 4-5 *Set2* と *bam* との遺伝学的相互作用

(A-C) *bam^{86/+}* (A)、*Set2^{1/+}* (B)、*Set2^{1/+}; bam^{86/+}* (C) の卵巣小管を 1B1 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。(C)の矢じりは断片化したフューゾームを示す。(D と E) 野生型 (D) と *bam⁸⁶* 突然変異体 (E) の卵巣小管を anti-Set2 抗体 (マゼンタ)と anti-Vas 抗体 (緑) で染色した結果。(F と G) ヒートショックした野生型 (F) と *hs-bam* 系統の卵巣小管を anti-H3K36me3 抗体 (緑) と anti-Vas 抗体 (マゼンタ) で二重染色した。H3K36me3 の強いシグナルが *hs-bam* の卵巣小管の生殖幹細胞中で検出された (矢じり)。(H と I) *hs-bam, UAS-Set2.IR* (H) と *hs-bam, UAS-Set2.IR, hs-Gal4* (I) のヒートショック 24 時間後の卵巣小管を 1B1 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。(J) *bam* の発現誘導によって生殖幹細胞が分化して失われる表現型は、*bam* と同時に *Set2* RNAi を発現させることで抑制される。* $P < 0.02$

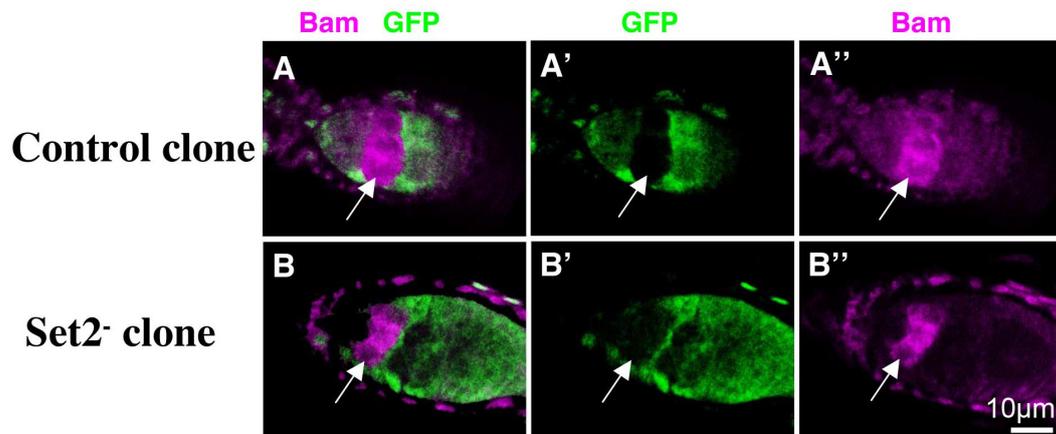


Fig. 4-6 *Set2* の機能を欠いた生殖細胞中での Bam の発現

(AとB) コントロールクローン (A) と *Set2*⁻クローン (B) を含む卵巣小管を anti-Bam 抗体 (マゼンタ) と anti-GFP 抗体 (緑) で二重染色した。Bam の発現が *Set2*⁻の生殖細胞中に検出される (Bの矢印)。

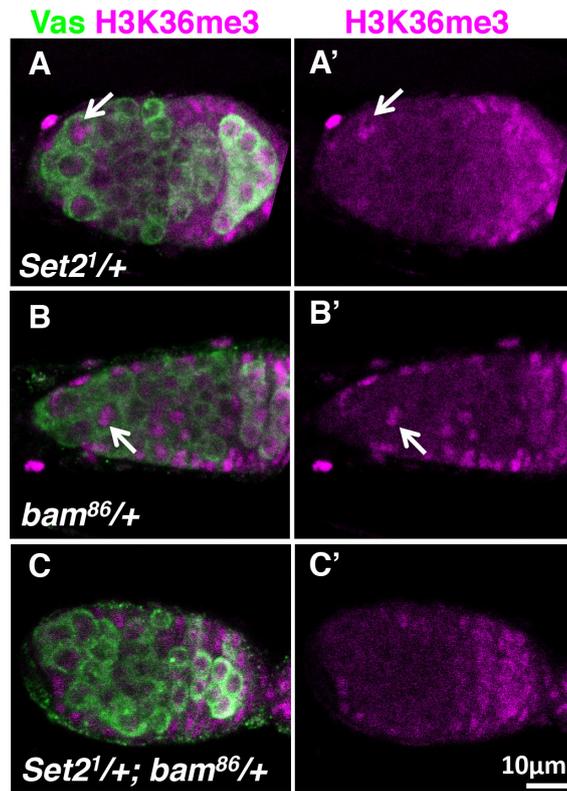


Fig. 4-7 *Set2*^{+/+}; *bam*^{86/+} 卵巣中における H3K36me3 修飾状態

Set2^{+/+} (A)、*bam*^{86/+} (B)、*Set2*^{+/+}; *bam*^{86/+} (C) の卵巣小管を anti-H3K36me3 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。

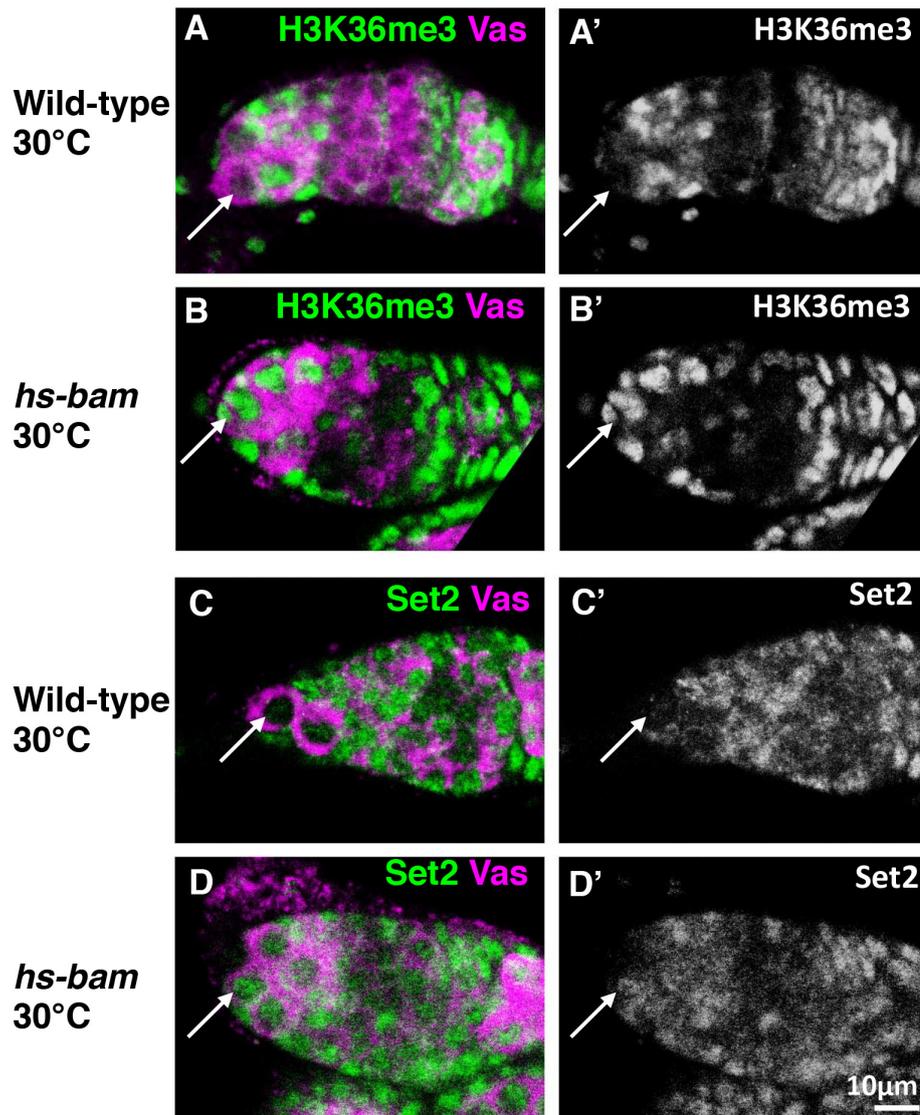


Fig. 4-8 *bam* 強制発現による Set2 の核局在の促進

(A と B) 30°Cで飼育した野生型 (A) と *hs-bam* 系統 (B) の卵巢小管を anti-H3K36me3 抗体 (緑) と anti-Vas 抗体 (マゼンタ) で二重染色した。(C と D) 30°Cで飼育した野生型 (C) と *hs-bam* 系統 (D) の卵巢小管を anti-Set2 抗体 (緑) と anti-Vas 抗体 (マゼンタ) で二重染色した。矢印は生殖幹細胞を示す。

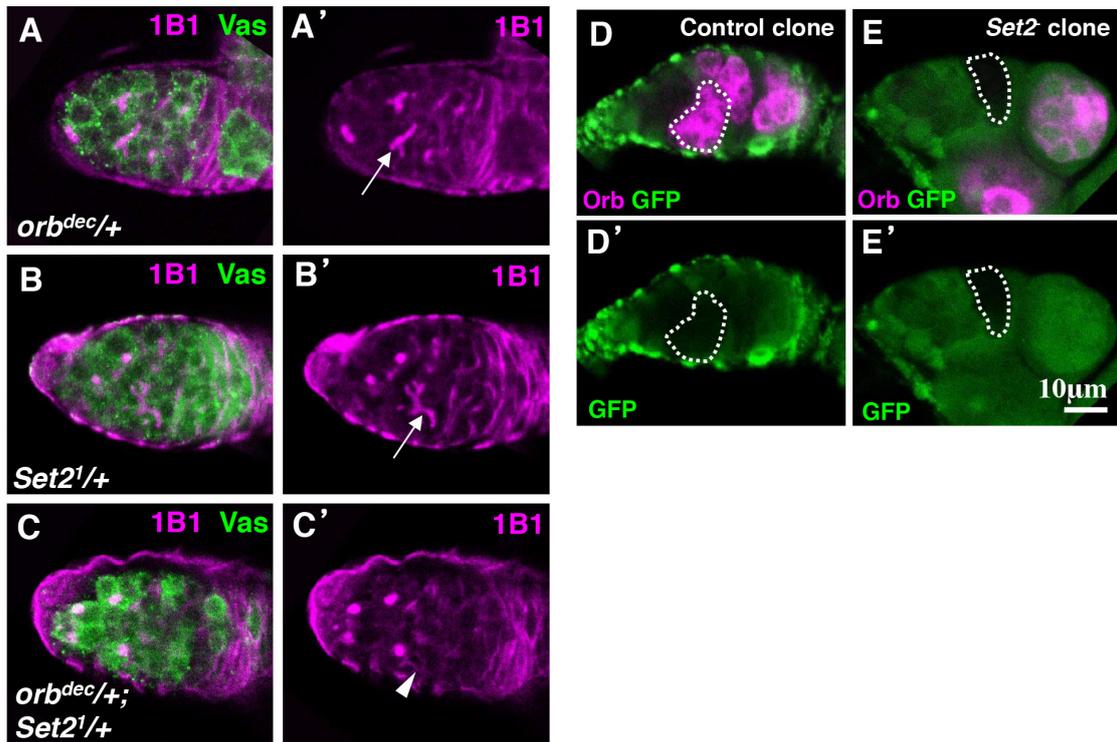


Fig. 4-9 *Set2* による *orb* 発現の活性化

(A-C) *orb^{dec/+}* (A)、*Set2^{1/+}* (B)、*Set2^{1/+}; orb^{dec/+}* (C) それぞれの卵巣小管を 1B1 抗体 (マゼンタ) と anti-Vas 抗体 (緑) で二重染色した。矢じり (C) は断片化したフューゾームを示す。
(D と E) コントロールクローンを含む卵巣小管 (D) と *Set2⁻* のクローンを含む卵巣小管を anti-Orb 抗体 (マゼンタ) と anti-GFP 抗体 (緑) で二重染色した。Orb のシグナルが *Set2⁻* のクローンで低下する (E の点線で示した部分)。

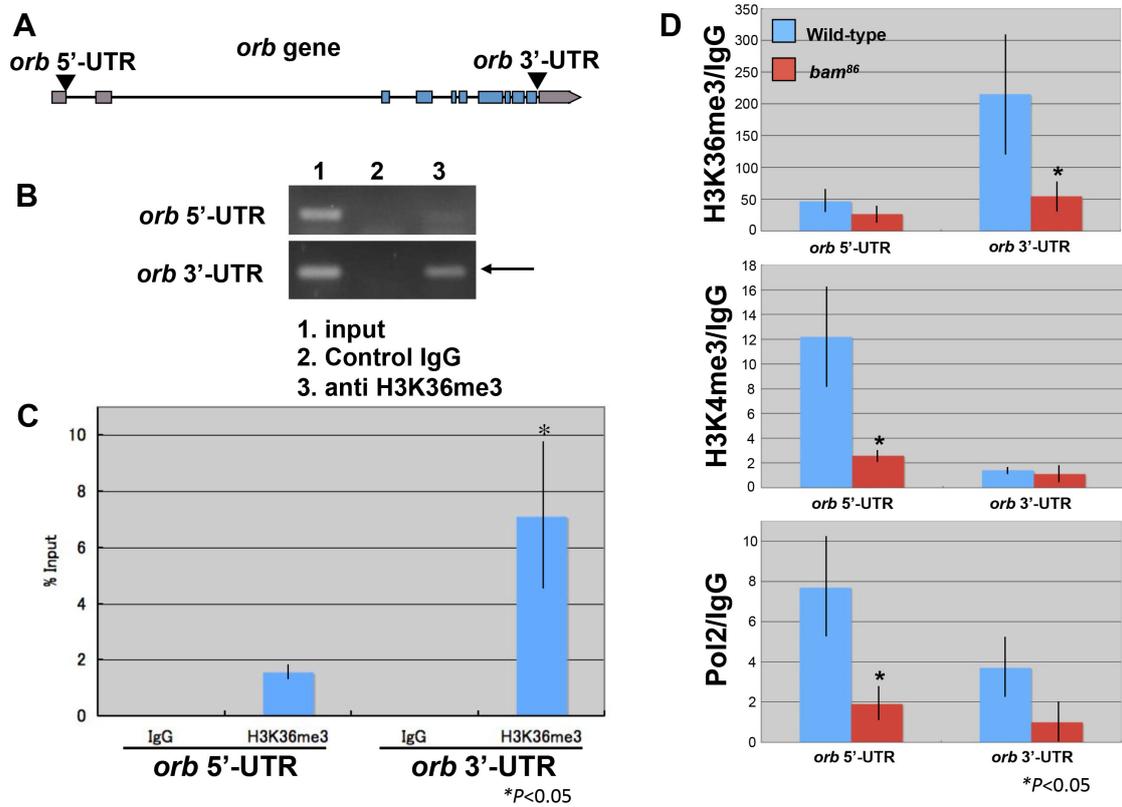


Fig 4-10 *orb* 遺伝子座の 5'-UTR 及び 3'-UTR 領域における H3K36me3 修飾状態

(A) *orb* 遺伝子座の模式図。*orb* 遺伝子座 5'-UTR と 3'-UTR のヒストン修飾状態を調べた。(B と C) ChIP 解析によって、野生型卵巣における *orb* 遺伝子座の H3K36me3 修飾レベルを、ChIP によって得られた DNA を PCR (B)、さらに定量 PCR (C) を用いて解析した。(D) 野生型と *bam*⁸⁶ 突然変異体卵巣を材料として ChIP 解析を行った。*orb* 遺伝子座の H3K36me3, H3K4me3 修飾レベルと RNA ポリメラーゼ II (Pol2) のリクルート状態を定量 PCR を用いて調べた。

第5章

結論

本研究から、ショウジョウバエの生殖細胞中の遺伝子発現の活性化に、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が関わることが明らかになった。生殖細胞の分化過程を考える上で、(1) 胚期に始原生殖細胞中で生殖細胞の性質を特徴づける遺伝子発現が *zygotic* に開始すること、(2) 成虫卵巣において、生殖幹細胞から卵母細胞、哺育細胞を作り出す 16 細胞シストが形成される過程で、減数分裂に関連した遺伝子群の発現、卵母細胞の成熟に関わる遺伝子プログラムが活性化されることが、重要な転写制御のポイントになる。本研究により、この2つの時期の転写制御に、それぞれヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が関わることが明らかになった。

第2章と第3章においては、ショウジョウバエの始原生殖細胞中で生殖細胞性遺伝子の発現が活性化する分子機構の解明を目的として、Mamo タンパク質の機能解析を行った。第2章の研究から、Mamo タンパク質が核内に局在し、多糸染色体に直接結合する性質をもつことが分かった。さらに、Mamo は生殖細胞特異的なクロマチン構造の構築に影響を与えることが明らかになった。また、生化学的実験から、Mamo の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメイン (MZD) が特定の DNA と直接結合すること、さらに、MZD の DNA 結合に必要なコンセンサス配列 (TGCGT) が明らかになった。これらの結果から、Mamo タンパク質が特定の塩基配列あるいは標的遺伝子に直接結合し、クロマチン構造を変化させる性質をもつことが示された。このことは、Mamo がクロマチン制御因子として始原生殖細胞中の遺伝子発現を制御することを強く示唆する。この可能性

を検証するために、第3章では、Mamo の標的遺伝子の同定を試みた。その結果、母性 Mamo を欠いた始原生殖細胞中で生殖細胞関連遺伝子 *vas* 遺伝子の発現が低下すること、Mamo や Mamo の C₂H₂ 型 Zn フィンガードメインをもつ MZD の強制発現により *vas* 遺伝子の発現量が増加することが判明した。さらに、MZD 強制発現胚を材料とした ChIP 解析によって、MZD が *vas* 遺伝子座のイントロン中の特定の領域と直接結合すること、MZD が結合領域周辺のヒストン H3 のアセチル化の状態 (H3K27ac) を高めることが明らかになった。H3K27ac 修飾を触媒するヒストンアセチル化酵素 CBP と *vas* 遺伝子の発現の関連を解析した結果、母性 CBP を欠いた胚の始原生殖細胞中では *vas* 遺伝子の発現が低下することが判明した。さらに、MZD 単独の強制発現と比較して、MZD と CBP の強制発現がより強く *vas* 遺伝子の発現を誘導することが分かった。これらの結果から、MZD が *vas* 遺伝子座に CBP をリクルートすることで、*vas* 遺伝子座のヒストンアセチル化状態を高め、*vas* 遺伝子の発現を活性化する、つまりエピジェネティックな制御機構が *vas* 遺伝子発現の活性化に関与することが示唆された。

第4章では、成虫卵巣での、生殖幹細胞から 16 細胞シストへの分化過程におけるヒストン修飾状態を免疫組織化学的に解析し、生殖細胞の分化過程で特定のヒストン修飾 (H3K36me3) のレベルが上昇すること、このヒストン修飾の制御にヒストンメチル化酵素 Set2 が関与すること、Set2 が生殖細胞の分化に必要であることが明らかになった。さらに、Set2 が分化促進因子 Bam の下流で作用すること、Bam が Set2 の核移行を促進すること、Set2 が生殖細胞分化に関わる *orb* 遺伝子の発現の活性化に関与することが分かった。

ヒストン修飾を介したクロマチン制御と生殖細胞の分化制御

真核生物において、ヒストン修飾は、細胞周期、DNAの複製、修復、転写制御や染色体の構造、安定性などの多様な生命現象の制御に関わることが知られている (Allis et al., 2007)。また、近年、生殖細胞の分化とヒストン修飾の関係を示す研究報告も増加している。マウスの始原生殖細胞の発生過程や卵母細胞の分化過程で、ヒストン修飾の種類や状態がダイナミックに変化することが報告されている (Seki et al., 2005; Gu et al., 2010)。始原生殖細胞中のヒストン修飾の変動が、全能性獲得に関連したゲノムレベルのリプログラミングに関わるというアイデアが提唱されている。また、ヒストン修飾が、減数分裂過程で起こる大規模な染色体構造の変化や、染色体の分配に関わるクロマチン制御に重要な役割をもつことが示されている。しかし、生殖細胞中のヒストン修飾がどのような分子機構によって制御されているか、それに関する研究報告は多くない。本研究により、始原生殖細胞に特異的に供給される **Mamo** や生殖細胞特異的に発現する分化促進因子 **Bam** がヒストン修飾酵素と共同して作用することで、生殖細胞の特定の分化過程の促進に関わることが明らかになった。また、いくつかの遺伝子の発現を解析した結果、これらの制御因子 (**Mamo**、**Bam**) によって、特定の生殖細胞関連遺伝子 (*vas*、*orb*) の発現が制御されることが判明した。しかし、**Mamo** や **Bam** を中心としたエピジェネティックな制御が遺伝子発現プログラム全体にどれくらいの影響を与えるのかは、現在不明である。しかし、本研究から始原生殖細胞中で *vas* と同様に *zygotic* 発現し、生殖細胞の発生に必要な *nos* は、**MZD-FLAG OE** で発現量が増加しないことが分かった。こ

のことから、Mamo は生殖細胞関連遺伝子全てに影響するわけではなく、何らかの特異性をもって標的遺伝子を活性化すると考えられる。このことに答えを出すためには、網羅的な発現解析や ChIP-seq 解析が必要である。また、Mamo が始原生殖細胞中のクロマチン構造や減数分裂過程のクロマチン構造を制御する分子機構を理解するためにも、Mamo の標的遺伝子やコファクターの探索が必要である。

生殖細胞の分化と転写伸長反応の制御

本研究により、H3K27ac、H3K36me3 ヒストン修飾が生殖細胞中の遺伝子発現制御に関わることが判明した。これらのヒストン修飾は転写の伸長反応の促進に関与する (Krogan et al., 2003; Stasevich et al., 2014)。ショウジョウバエの形成直後の始原生殖細胞中において母性因子 Pgc が転写伸長反応を促進する P-TEFb の作用を阻害し、始原生殖細胞中の転写伸長反応を抑制することが報告されている (Hanyu-Nakamura et al., 2008)。このことと本研究結果とを合わせて考えると、生殖細胞の発生過程の重要なポイントで、転写伸長反応が大きく変化するという特徴が明らかになる。形成直後の始原生殖細胞中では、Pgc の作用で RNA ポリメラーゼ II の CTD の Ser2 のリン酸化が起こらないため、全体的な転写伸長反応が抑制される。ステージ 9 の初期胚中の始原生殖細胞においては、Mamo の作用で *vas* 遺伝子などの特定の遺伝子の転写伸長反応が活性化される。成虫卵巣中の生殖幹細胞の分化過程において、Bam の働きによって卵形成に関わる遺伝子 (*orb* 遺伝子) の転写伸長反応が活性化される。生殖細胞のそれぞれの分化段階において、転写伸長反応が段階的に制御 (不活性化あ

るいは活性化) されることで生殖細胞中の遺伝子発現プログラムの制御に関与するのかもしれない。これまでに、始原生殖細胞中で減数分裂関連遺伝子の発現が検出されることが報告されている (Mukai et al., 2006)。このことは、初期胚の始原生殖細胞が、後胚発生過程において必要な遺伝子を発現する能力をすでに部分的に獲得していることを示唆する。本研究の結果を合わせて考えると、始原生殖細胞において、転写開始反応のレベルで、生殖細胞分化に必要な遺伝子の発現が準備されており、その後、適切な時期に Mamo や Bam などの制御因子の働きによってヒストン修飾を介して転写伸長反応が促進され、遺伝子発現が活性化されることが予想できる。つまり、Mamo や Bam によって生殖細胞の分化に必要な遺伝子座 (*vas*, *orb*) に発現に適したクロマチン構造が構築され、このクロマチン構造を形成、維持することが生殖細胞の発生に重要であると考えられる (Fig. 5-1)。

生殖細胞の形成機構の多様性と普遍性

動物種によって、始原生殖細胞の形成機構には多様性がある。ショウジョウバエでは、生殖質に含まれる母性因子が始原生殖細胞の形成に重要な働きをもつが、マウスの卵には生殖質がなく、発生過程における誘導により始原生殖細胞が形成される。しかし、胚発生が進行すると、2つの動物種の始原生殖細胞の挙動に共通性が見られるようになる。始原生殖細胞は、将来、生殖巣が形成される領域に向かって移動を始める。また、始原生殖細胞の移動過程において、生殖細胞関連遺伝 *vas* 遺伝子の *zygotic* な発現が開始する (Noce et al., 2001)。これまでに、多くの動物種において *vas* 遺伝子の研究が行われており、*vas* 遺伝

子のホモログが生殖細胞特異的に発現すること、生殖細胞の形成に必要なことが明らかになっているが、*vas* 遺伝子の発現がどのようにして生殖細胞中で活性化されるのか、その分子機構は不明である。本研究から、ショウジョウバエの *vas* 遺伝子の *zygotic* な発現活性化にヒストンアセチル化酵素 *CBP* を介したエピジェネティックな制御機構が関わることが明らかになった。著者の知る限りにおいて、*vas* 遺伝子の発現の活性化とヒストンアセチル化を介したエピジェネティックな制御機構との関係を直接示す報告はない。しかし、*vas* 遺伝子を含めた生殖細胞関連遺伝子の発現とエピジェネティックな遺伝子発現機構との関連性を示す研究成果が報告されている。ES 細胞と始原生殖細胞では共通して、細胞の分化全能性に関連した遺伝子の発現が検出されるが、ES 細胞では生殖細胞関連遺伝子は発現していない。ES 細胞中で始原生殖細胞の分化が抑制される可能性が考えられた。この抑制機構の解析から、次のような結果が得られた。ES 細胞中の *Max* 遺伝子の発現をノックダウンすることで、ES 細胞中で *vas* 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった (Maeda et al., 2013)。Max タンパク質はヒストン H3K9 のメチル化酵素と相互作用し、生殖細胞関連遺伝子のプロモーター領域のヒストンをメチル化し、その発現を抑制する。Max をノックダウンするとプロモーター領域のメチル化が減少し、生殖細胞関連遺伝子の発現が活性化されることが判明した。この結果から、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構がマウスの *vas* 遺伝子の発現制御に関わることを示唆される。また、マウスの始原生殖細胞では ES 細胞と比べて、高レベルの *CBP* 発現が検出され、*CBP* が始原生殖細胞の維持に必要であることが報告されている (Elliott, et al., 2007)。これらの結果は、ショウジョウバエ以

外の動物種においても、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな制御機構が生殖細胞関連遺伝子の発現制御に関与する可能性を示唆する。本研究で明らかになった知見は、ショウジョウバエのみならず、他の動物の生殖細胞中の遺伝子発現制御機構を解明する上で基礎になると考えている。

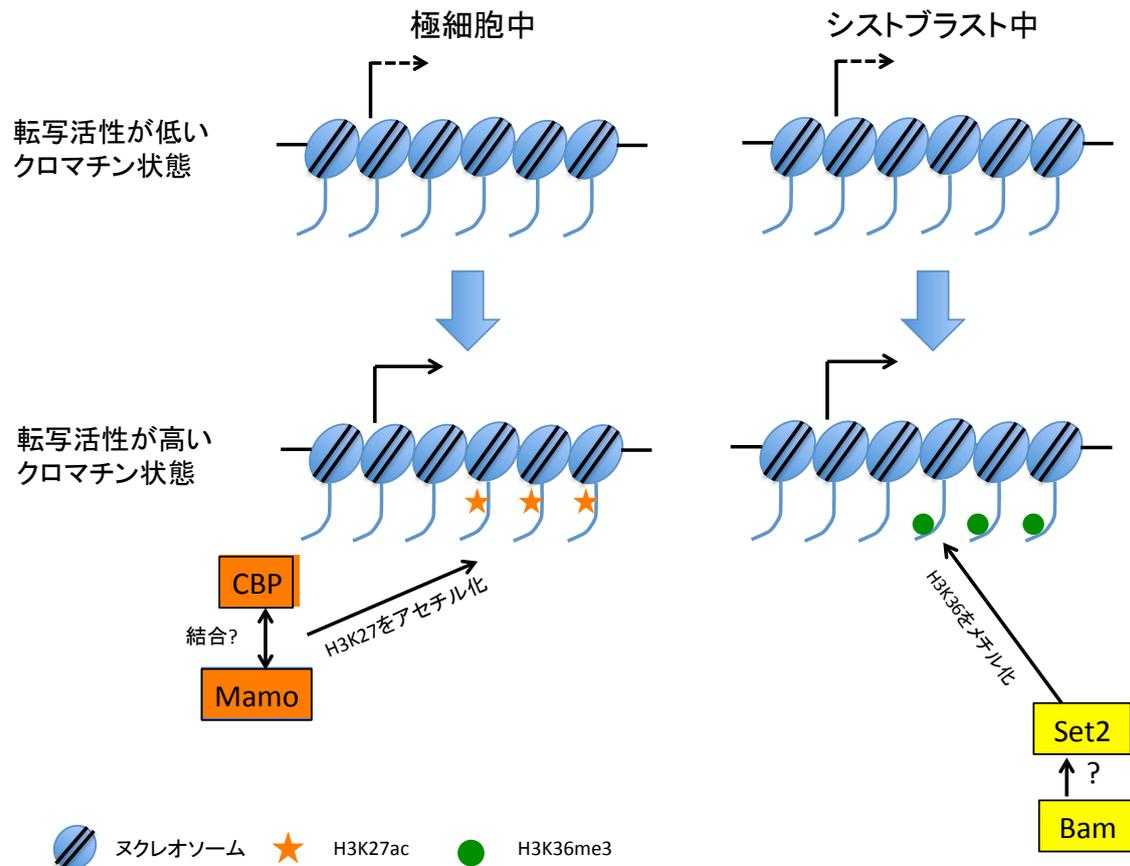


Fig. 5-1 本研究で明らかになった生殖細胞中におけるヒストン修飾を介した遺伝子発現の活性化機構のモデル図

始原生殖細胞中では、Mamo と CBP が *vas* 遺伝子座のヒストン H3K27ac レベルを高めることで *vas* 遺伝子が発現しやすいクロマチン構造を構築する。シストブラスト中では Bam の下流で Set2 が機能し、*orb* 遺伝子座のヒストン H3K36me3 レベルを高めることで *orb* 遺伝子が発現しやすいクロマチン構造を構築する。

謝辞

本研究で用いた抗体、系統、解析は Lehman 博士、木村博士、小林博士、Kumar 博士、Kuroda 博士、Bell 博士、McKearin 博士、重信博士にお世話になりました。

本研究は JSPS 科研費 21570233、特別研究員奨励費 25-10063、新学術研究領域‘動物における配偶子産生システムの制御’ (#25114002) の支援を受けたものです。

また、甲南大学の皆様には研究を遂行する上で多くの助言を頂きました。感謝申し上げます。

参考文献

Adam MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon

K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM and Venter JC (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** **287**: 2185-2195

Allis CD, Jenuwein T and Reinberg D (2007) EPIGENETICS. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I and Zhao K (2007) High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. **Cell** **129**: 823-837

Baxley RM, Soshnev AA, Koryakov DE, Zhimulev IF and Geyer PK (2011) The role of the Suppressor of Hairy-wing insulator protein in *Drosophila* oogenesis. **Dev. Biol.** **356**: 398-410

Beam GW and Kessel RG (1974) The Problem of Germ Cell Determinants.

Int. Rev. Cytol. **39**: 413-479

Bell O, Wirbelauer C, Hild M, Scharf AN, Schwaiger M, MacAlpine DM, Zilbermann F, van Leeuwen F, Bell SP, Imhof A, Garza D, Peters AH and Schübeler D (2007) Localized H3K36 methylation states define histone H4K16 acetylation during transcriptional elongation in *Drosophila*. **EMBO J.** **26**: 4974-4984

Berg JM (1992) Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 11109-11110

Bloushtain-Qimron N, Yao J, Shipitsin M, Maruyama R and Polyak K (2009) Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells. **Cell Cycle** **8**: 809-817

Buszczak M, Paterno S and Spradling AC (2009) *Drosophila* stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease Scrawny. **Science** **323**: 248-251

Chen D and McKearin DM (2003a) A discrete transcriptional silencer in the *bam* gene determines asymmetric division of the *Drosophila* germline stem cell. **Development** **130**: 1159-1170

Chen D and McKearin D (2003b) Dpp Signaling Silences *bam* Transcription Directly to Establish Asymmetric Divisions of Germline Stem Cells. **Curr. Biol.** **13**: 1786-1791

Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA and Jaenisch R (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **107**: 21931-21936

Dahmus ME (1996) Reversible Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II. **J. Biol. Chem.** **271**: 19009-19012

Deshpande G, Calhoun G and Schedl P (2003) Overlapping mechanisms function to establish transcriptional quiescence in the embryonic *Drosophila* germline. **Development** **131**: 1247-1257

Deshpande G, Calhoun G, Jinks TM, Polydorides AD and Schedl P (2005) Nanos downregulates transcription and modulates CTD phosphorylation in the soma of early *Drosophila* embryos. **Mech. Dev.** **122**: 645-657

Eddy EM (1975) Germ Plasm and the Differentiation of the Germ Cell Line. **Int. Rev. Cytol** **43**: 229-280

Elliott AM, de Miguel MP, Rebel VI and Donovan PJ (2007) Identifying genes differentially expressed between PGCs and ES cells reveals a role for CREB-binding protein in germ cell survival. **Dev. Biol.** **311**: 347-358

Extavour CG and Akam M (2003) Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. **Development** **130**: 5869-5884

Fuchs SM, Kizer KO, Braberg H, Krogan NJ and Strahl BD (2012) RNA Polymerase II Carboxy-terminal Domain Phosphorylation Regulates Protein Stability of the Set2 Methyltransferase and Histone H3 di- and Trimethylation at lysine 36. **J. Biol. Chem.** **287**: 3249-3256

Fukuyama M, Rougvie AE and Rothman JH (2006) *C. elegans* DAF-18/PTEN Mediates Nutrient-Dependent Arrest of Cell Cycle and Growth in the Germline. **Curr. Biol.** **16**: 773-779

Fragnerlund R, Mélen K, Kinnunen L and Julkunen I (2002) Arginine/Lysine-rich Nuclear Localization Signals Mediate Interactions between Dimeric STATs and Importin $\alpha 5$. **J. Biol. Chem.** **277**: 30072-30078

Gu L, Wang Q and Sun QY (2010) Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. **Cell Cycle** **9**: 1943-1950

Günesdogan U, Magnúsdóttir E and Surani MA (2014) Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** **369**

Hanyu-Nakamura K, Kobayashi S and Nakamura A (2004) Germ cell-autonomous Wunen2 is required for germline development in *Drosophila* embryos. **Development** **131**: 4545-4553

Hanyu-Nakamura K, Sonobe-Nojima H, Tanigawa A, Lasko P and Nakamura A (2008) *Drosophila* Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. **Nature** **451**: 730-733

Hay B, Jan LY, Jan YN (1988) A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. **Cell** **55**: 577-587

Hayashi Y, Hayashi M and Kobayashi S (2004) Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **101**: 10338-10342

Illmensee K and Mahowald AP (1974) Transplantation of Posterior Polar Plasm in *Drosophila*. Induction Germ Cell at the Anterior Pole of the Egg. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **71**:1016-1020

Illmensee K and Mahowald AP (1976) The autonomous function of germ plasm in a somatic region of the *Drosophila* egg. **Exp. Cell Res.** **97**: 127-40

Illmensee K, Mahowald AP and Loomis MR (1976) The ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*. **Dev. Biol.** **49**: 40-65

Ito H, Sato K, Koganezawa M, Ote M, Matsumoto K, Hama C and Yamamoto D (2012) Fruitless Recruits Two Antagonistic Chromatin Factors to Establish Single-Neuron Sexual Dimorphism. **Cell** **149**: 1327-1338

Jiang H, Shukla A, Wang X, Chen WY, Bernstein BE and Roeder RG (2011) Role for Dpy-30 in ES Cell-Fate Specification by Regulation of H3K4 Methylation within Bivalent Domains. **Cell** **144**: 513-525

Jongens TA, Ackerman LD, Swedlow JR, Jan LY and Jan YN (1994) *Germ cell-less* encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. **Genes Dev.** **8**: 2123-2136

Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N and Nozaki N (2008) The Organization of Histone H3 Modifications as Revealed by a Panel of Specific Monoclonal Antibodies. **Cell Struct. Funct.** **33**: 61-73

Kobayashi A, Yamagiwa H, Hoshino H, Muto A, Sato K, Hayashi N, Yamamoto M and Igarashi K (2000) A Combinatorial Code for Gene Expression Generated by Transcription Factor Bach2 and MAZR (MAZ-Related Factor) through the BTB/POZ Domain. **Mol. Cell. Biol.** **20**: 1733-1746

Kobayashi S, Amikura R and Okada M (1994) Localization of mitochondrial large rRNA in germinal granules and the consequent segregation of germ line. **Int. J. Dev. Biol** **38**: 193-199

Kobayashi S, Amikura R, Nakamura A, and Lasko P (1999) Techniques for analyzing protein and RNA distribution in *Drosophila* ovaries and embryos at structural and ultrastructural resolution. In a comparative methods approach to the study of oocyte and embryos, Edited by Joel D. Richter, **Oxford University Press**: 426-445

Kobayashi S, Sato K and Hayashi Y (2005) The Role of Mitochondrial rRNAs and Nanos Protein in Germline Formation in *Drosophila* Embryos. **Zoolog. Sci.** **22**: 943-954

Kolesnikova TD, Posukh OV, Andreyeva EN, Bebyakina DS, Ivankin AV and Zhimulev IF (2013) *Drosophila* SUUR protein associates with PCNA and binds chromatin in a cell cycle-dependent manner. **Chromosoma** **122**: 55-66

Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Emili A, Boone C, Shilatifard A, Buratowski S and Greenblatt J (2003) Methylation of Histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Linked to Transcriptional Elongation by RNA polymerase II. **Mol. Cell Biol.** **23**: 4207-4218

Kunwar PS, Sano H, Renault AD, Barbosa V, Fuse N and Lehman R (2008) Tre1 GPCR initiates germ cell transepithelial migration by regulating *Drosophila melanogaster* E-cadherin. **J. Cell Biol.** **183**: 157-168

Larschan E, Alekseyenko AA, Gortchakov AA, Peng S, Li B, Yang P, Workman JL, Park PJ and Kuroda MI (2007) MSL Complex Is Attracted to Genes Marked by H3K36 Trimethylation Using a Sequence-Independent Mechanism. **Mol. Cell** **28**: 121-133

Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE and Corbett AH (2007) Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with importin α . **J. Biol. Chem.** **282**: 5101-5105

Lantz V, Chang JS, Horabin JI, Bopp D and Schedl P (1994) The *Drosophila orb* RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. **Genes Dev.** **8**: 598-613

Lasko PF and Ashburner M (1988) The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. **Nature** **335**: 611-617

Leatherman J, Levin L, Boero J and Jongens TA (2002) *germ cell-less* Acts to Repress Transcription during the Establishment of the *Drosophila* Germ Cell Lineage. **Curr. Biol.** **12**: 1681-1685

Lee S and Garfinkel MD (2000) Characterization of *Drosophila* OVO protein DNA binding specificity using random DNA oligomer selection suggests zinc finger degeneration. **Nucleic Acids Res.** **28**: 826-834

Li Y, Minor NT, Park JK, McKearin DM and Maines JZ (2009) Bam and Bgcn antagonize *Nanos*-dependent germ-line stem cell maintenance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **106**: 9304-9309

Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A and Matsui Y (2013) Max is a repressor of germ cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. **Nat. Commun.** **4**: 1754

Martinho RG, Kunwar PS, Casanova J, Lehmann R (2004) A Noncoding RNA Is Required for the Repression of RNAPol II -Dependent Transcription in Primordial Germ Cells. **Curr. Biol.** **14**: 159-165

Mukai M, Kitadate Y, Arita K, Shigenobu S and Kobayashi S (2006) Expression of meiotic genes in the germline progenitors of *Drosophila* embryos. **Gene Expr. Patterns** **6**: 256-266

Mukai M, Hayashi Y, Kitadate Y, Shigenobu S, Arita K and Kobayashi S (2007) MAMO, a maternal BTB/POZ-Zn-finger protein enriched in germline progenitors is required for the production of functional eggs in *Drosophila*. **Mech. Dev.** **124**: 570-583

Mukai M, Kato H, Hira S, Nakamura K, Kita H and Kobayashi S (2011) Innexin2 gap junctions in somatic support cells are required for cyst formation and egg chamber formation in *Drosophila*. **Mech. Dev.** **128**: 510-523

Nakai K and Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends Biochem. Sci.** **24**: 34-36

Nakamura A, Amikura R, Mukai M, Kobayashi S and Lasko PF (1996) Requirement for a Noncoding RNA in *Drosophila* Polar Granules for Germ Cell Establishment. **Science** **274**: 2075-2079

Noce T, Okamoto-Ito S and Tsunekawa N (2001) Vasa Homolog Genes in Mammalian Germ Cell Development. **Cell Struct. Funct.** **26**: 131-136

Ohlstein B and McKearin D (1997) Ectopic expression of the *Drosophila* Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. **Development** **124**: 3651-3662

Pavletich NP and Pabo CO (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. **Science** **252**: 809-817

Pavletich NP and Pabo CO (1993) Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. **Science** **261**: 1701-1707

Rho HE, Lee MN, Jeon BN, Choi WI, Kim YJ, Yu MU and Hur MW (2007) Regulation of Pokemon 1 Activity by Sumoylation. **Cell Physiol. Biochem.** **20**: 167-180

Rubin GM, Spradling AC (1982) Genetic Transformation of *Drosophila* with Transposable Element Vectors. **Science** **218**: 348-353

Sano H, Nakamura A and Kobayashi S (2002) Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of *vasa* gene in *Drosophila melanogaster*. **Mech. Dev.** **112**: 129-139

Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M and Matsui Y (2005) Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. **Dev. Biol.** **278**: 440-458

Schaner CE, Deshpande G, Schedl PD and Kelly WG (2003) A Conserved Chromatin Architecture Marks and Maintains the Restricted Germ Cell Lineage in Worms and Flies. **Dev. Cell** **5**: 747-757

Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. **Trends Genet.** **19**: 629-639

Stabell M, Larsson J, Aalen RB and Lambertsson A (2007) *Drosophila dSet2* functions in H3-K36 methylation and is required for development. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **359**: 784-789

Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG and Kimura H (2014) Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. **Nature** **516**: 272-275

Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP and Housman DE (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. **Proc. Natl. Acad. USA** **97**: 6763-6768

Tastan OY, Maines JZ, Li Y, McKearin DM and Buszczak M (2010) *Drosophila* Ataxin 2-binding protein 1 marks an intermediate step in the molecular differentiation of female germline cysts. **Development** **137**: 3167-3176

Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC and Harte PJ (2009) CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomp silencing. **Development** **136**: 3131-3141

Unezaki S, Nishizawa M, Okuda-Ashitaka E, Masu Y, Mukai M, Kobayashi S, Sawamoto K Okano H and Ito S (2004) Characterization of the isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of *Drosophila* Ovo, as transcription factors. **Gene** **336**: 47-58

Van Doren M, Williamson AL and Lehmann R (1998) Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. **Curr. Biol.** **8**: 243-246

Wang X, Pan L, Wang S, Zhou J, McDowell W, Park J, Haug J, Staehling K, Tang H and Xie Y (2011) Histone H3K9 Trimethylase Eggless Controls Germline Stem Cell Maintenance and Differentiation. **PloS Genet.** **7**: e1002426

Williamson A and Lehmann R (1996) GERM CELL DEVELOPMENT IN *DROSOPHILA*. **Annu Rev Cell Dev. Biol.** **12**: 365-391

Yatsu J, Hayashi M, Mukai M, Arita K, Shigenobu S and Kobayashi S (2008) Maternal RNAs encoding transcription factors for germline-specific gene expression in *Drosophila* embryos. **Int. J. Dev. Biol.** **52**: 913-923