**Table1**　移植された極細胞の生殖腺への進入能力について

遺伝子標識した極細胞を野生型宿主胚（Oregon-R）に移植し、宿主での発生運命を検討した。ドナー胚はpumMsc/pumFC8、pumMsc/TM3、またはpumFC8/TM3雌とPLH∆23雄との交配に由来するものであった。PLH∆23コンストラクトを持つすべての胚細胞は熱処理後にβ-ガラクトシダーゼを発現するので、熱処理とβ-ガラクトシダーゼの染色によって胚発生中の移植極細胞の運命を追跡することができる。移植後、宿主は第14-17期まで発育し、熱処理後、β-ガラクトシダーゼ染色を行った。有意性はフィッシャーの正確確率検定により算出した。確率の比較（上から順に）：pumMsc/TM3とpumMsc/pumFC8、およびpumFC8/TM3とpumMsc/pumFC8

**Figure1**　 pum活性は、極細胞が生殖腺に移動し、遺伝子を制御するために不可欠である。

a, b, pumMsc/TM3 (a) と pumMsc/pumFC8 メス (b) に由来する胚から、極細胞を野生型宿主に移植した。移植された極細胞は、熱処理後、β-ガラクトシダーゼで染色し、青色細胞として同定した（Methods参照）。移植された極細胞を持つステージ15の胚をX-galで染色した。対照胚由来の極細胞（aの矢頭）は生殖腺に取り込まれたが（a, bの角括弧），pum胚由来の極細胞は生殖腺に全く取り込まれなかった．bの矢印は後腸内腔に移植された極細胞を示す。スケールバーは20μmを表す。 c, 極細胞の移動中にPZ198が早期に発現するのを防ぐには、pumの活性が必要である。pumMsc/pumFC8（黒四角）とpumMsc/TM3（コントロール；白四角）の雌とPZ198の雄との交配で生じた胚で極細胞におけるβガラクトシダーゼの段階依存的発現を調査した。極細胞におけるマーカーの発現は、X-galと極細胞のマーカーであるVasaタンパク質に対する抗体による二重染色で調べた。極細胞が染色された胚の割合を胚の段階に対してプロットした。対照胚では、β-ガラクトシダーゼの発現は13期に始まり、15期に生殖腺内の極細胞で最大となった（ステージは文献4による）。一方、pum変異体極細胞では、極細胞の移動中（ステージ7-12）にβ-ガラクトシダーゼの発現が早期に検出された。pumFC8/TM3雌の胚におけるβ-ガラクトシダーゼの発現パターン（データなし）は、pumMsc/TM3の胚で観察されたものと区別がつかなかった（開口四角印）。

生殖細胞初期発生における母体Pumの機能。

PumがNosと同様に胚発生中の生殖細胞の発達に作用しているかどうかを調べるために、我々は母方のpum変異が以下の3つの生殖細胞特異的な細胞事象に及ぼす影響を調べた。まず、極細胞の移動はNos11によって自律的に制御されていることから、Pumを欠損した極細胞（pum極細胞）の移動の挙動を検討した。Pumを欠損した胚で形成された極細胞（pum胚）を、野生型の宿主胚に移植した。その結果、Pumを欠損した胚で形成された極細胞は、中腸上皮を通過して血球内に正常に移動した（データは示さず）。しかし、移植されたPum極細胞はいずれも宿主の生殖腺内に取り込まれなかった（表1、図1b）。一方、対照的に胚から採取した正常な極細胞は生殖腺内に観察された（表1、図1a）。移植されたPumの極細胞は、すべて血球と腸管内腔にとどまっていた（図1b）。これらの結果は、Pumが生殖腺への移動のために極細胞において自律的に必要であることを示している。

**Method極細胞移植**

極細胞移植は記述11と同様に行われた。極細胞ドナー胚はpumMsc/ pumFC8、 pumMsc/TM3、またはpumFC8/TM3雌とPLH∆23雄の交配から得た45。PLH∆23コンストラクトを持つすべての胚細胞は熱処理後にβ-ガラクトシダーゼを発現するので、熱処理とβ-ガラクトシダーゼの染色により胚発生中の移植極細胞の運命を追跡することができる。宿主胚は、野生型 (Oregon-R) の雌に由来する。

**Method　X-galと抗体による二重染色**

胚を固定し，X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (Wako, Osaka, Japan) で記述45 のとおりに染色した．染色した胚を両面粘着テープに移し，100%メタノールで覆った後，タングステン針で脱繊維化した．次に，BA+T バッファー（0.2% Tween 20 in Block Ace，大阪，日本）中の 2.5% ヤギ血清（Vector Laboratory）で 1 時間ブロックし，ウサギ抗 Vasa 抗体（1:200 希釈，P. Lasko からのギフト）と共にインキュベートし，ビオチン化二次抗体 （1:200 希釈，Vector Laboratory）で後述するようにインキュベートした．シグナル検出は、vectastain ABC Eliteキット（Vector Laboratory）およびHisto Mark Orange（Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD）を用いて実施した。

次に、エンハンサートラップマーカーであるPZ198のpum極細胞における発現を調査した。PZ198の発現は、通常生殖腺内の極細胞で開始されるが、Nos欠損胚（nos胚）では極細胞の移動中に早期に開始される8,11。同様に、PZ198の発現は、対照胚の13期と比較して、pum変異体極細胞では7期と早期に始まった(Fig. 1c)。このように、Pumは極細胞におけるエンハンサートラップマーカーの早すぎる発現を抑制するためにも必要である。

**Figure 2** nosとpumの活性はともに極細胞の移動中に極細胞の分裂を防ぐのに必要である。

a-c、nosBN/TM3 (a), nosBN/nosBN (b), pumMsc/pumFC8 female由来の胚における移動する極細胞の共焦点画像 (c)．12期の胚をPH3（赤）およびVasa（緑）に対する抗体で二重染色した。矢印はPH3陽性の極細胞を示す。d, nosBN/TM3 (open circles), nosBN/nosBN (filled circles), pumMsc/TM3 (open squares), pumFC8/TM3 (open triangles) and pumMsc/pumFC8 (filled squares) female由来の胚の極細胞における PH3の段階依存的発現量. PH3陽性の極細胞を持つ胚の割合を胚の段階に対してプロットした。各ステージで調べた胚の数は11-80個（平均43個）であった。e, 極細胞におけるサイクリン E のステージ依存的な発現。胚は抗サイクリンE抗体で染色した。サイクリンE陽性の極細胞の割合は胚のステージに対してプロットした。各ステージで計数されたポールセルの数は15-578個（平均158個）であった。

最後に、pumとnosの変異が、極細胞の移動中の細胞周期停止に及ぼす影響を分析した。正常な発生では、ポール細胞はステージ7-15の間、細胞周期のG2期で静止している（参考文献10、24-26）。ステージ15でNosが検出されなくなった直後にポール細胞が細胞分裂を開始することから、NosとPumはポール細胞の有糸分裂への移行を抑制すると予想された。PH3は有糸分裂期には検出されるが、間期には検出されない。一方、サイクリンEはS期とG2期に特異的に発現している。後述のように、極細胞からのcyclin Eの消失は、G2期からG1期への細胞周期の進行と関連していることがわかったが、一方、cyclin Eは体細胞の細胞周期中には分解されない。野生型胚の移動する極細胞は G2 期に停止するという以前の観察と一致し、7-15 期胚のほぼすべての極細胞はサイクリン E 染色を示し（図 2e）、PH3 染色は示さなかった（図 2a,d）。一方、pumとnosの胚では、サイクリンEを発現する極細胞の割合は第7-15期に徐々に減少し（図2e）、PH3陽性の極細胞がこれらの段階で検出できるようになった（図2b-d）。このように、変異型極細胞はG2停止から早期に解放され、有糸分裂に移行することがわかった。これらのことから、PumとNosはともに移動性極細胞のG2/M遷移の抑制に必要であることが示された。

**Method 免疫染色**

胚の免疫蛍光染色は，記載の方法で行った8．胚への抗体の浸透性を高めるため，固定・脱繊維化した胚の前部にタングステン針でニックを入れた．PH3 と Vasa，またはサイクリン E と Vasa の二重染色を行う場合，一次抗体も胚と同時に BA+T バッファー中で4℃，1-3 日間インキュベートした．ウサギ抗PH3抗体（1：200希釈、Upstate Biotechnology）、ラット抗サイクリンE抗体（1：100希釈、H. Richardsonからの贈り物）およびニワトリ抗Vasa抗体（1：10,000希釈、K. Howardからの贈り物）が使用された。2つの二次抗体を，2.5%のヤギ血清を含む10% BA+T バッファー（10% Block Ace, 0.2% Tween 20）中で胚と同時に4℃で一晩インキュベートした．二次抗体は，テキサスレッド標識抗ウサギIgG（1：50希釈，Jackson Immuno Research），テキサスレッド標識抗ラットIgG（1：50希釈，Cappel），フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識抗ニワトリIgG（1：10希釈，Kirkegaard ＆ Perry Laboratories）であった．染色した胚を洗浄液（0.2% Tween 20 in PBS）で 2 回，それぞれ 10 分間洗浄し，Vectashield（Vector Laboratory）でマウントした後，共焦点レーザー顕微鏡（Leica）で観察した．胚をサイクリン B と Vasa について二重染色する場合，まずマウス抗サイクリン B 抗体（1：4 希釈；C. Lehner からの寄贈）単独で 4℃にて一晩インキュベートし，次に FITC 標識二次抗体（1：20 希釈，Cappel） で 4℃にて一晩インキュベートした．その後、胚をウサギ抗Vasa抗体（1：200希釈）と共に4℃で一晩インキュベートし、続いてテキサスレッド標識二次抗体（1：20希釈、Amersham）と共に4℃で一晩インキュベートした。極細胞の数を調べるために、胚をウサギ抗Vasa抗体（1:200希釈）と共に4℃で一晩インキュベートした。ビオチン化二次抗体

これらの結果は、ref. 11の結果と合わせて、pum変異体の表現型は生殖細胞発生の初期においてnos変異体のそれと区別がつかないことが示された。したがって、PumはNosと共に生殖細胞特異的な細胞イベントを制御するために働くと結論づけた。PumとNosはサイクリンBの産生を抑制することによって極細胞分裂を阻害する。次に、PumとNosがどのようにしてこれらの生殖細胞特異的な細胞内イベントを制御しているのか、という疑問が生じた。両タンパク質が体細胞においてNREを含むmRNAの翻訳を抑制することを考慮すると、PumとNosは生殖細胞特異的な細胞イベントに関与する制御因子をコードするmRNA（複数可）の翻訳を抑制していると予想された。標的分子の候補の一つは、母体のサイクリンB mRNAである。このmRNAは生殖質内に局在し、極細胞に分配されるが、その翻訳は第15期まで抑制されている（参考文献30）。さらに、母体サイクリンB mRNAは、その3′UTR内にNRE様エレメントを含んでいる。

**Figure3　 nosとpumの活性はともに極細胞でのサイクリンBの早期発現を防ぐのに必要である。 a-i**

nosBN/TM3（a-c）、nosBN/nosBN（d-f）、pumMsc/pumFC8（g-i）雌由来の胚における極細胞の共焦点画像。a、d、gは5期の胚盤胞、b、e、hは9期の胚、c、f、iは15期の胚である。胚はサイクリンB（a-i）およびVasaに対する抗体で染色した（データは示していない）。矢印はVasa陽性細胞を示す。スケールバーは20μmを表す。j, ステージに依存した極細胞におけるサイクリンBの発現。ステージに対してサイクリンB陽性の極細胞を持つ胚の割合をプロットした。jの記号はFig.2dに示す通りである。各ステージで3-46個の胚（平均14個）を調査した。

PumとNosの両方が、移動する極細胞のサイクリンBタンパク質の生産を抑制するのに必要であるかどうかを調べるために、pumとnosの胚をサイクリンBに対する抗体で染色した。対照胚では、サイクリンBは14ステージで極細胞に蓄積し始めた（図3a-c, j）。一方、変異体胚では、サイクリンBは第5-13期の間、極細胞で早期に発現した（Fig.3d-j） これらの胚では、ほぼすべてのポールセルがサイクリンBを発現していた（Fig.3） これらの結果は、PumとNosが生殖腺への移動中の極細胞において、サイクリンBの産生を抑制していることを示している。

このことから、移動性極細胞のサイクリンB産生が抑制されることにより、G2期での細胞周期停止が引き起こされると考えられた。サイクリンBはG2/M移行に必要な因子であるため。この可能性を検討するために、静止期ポール細胞におけるサイクリンBの誤発現が、これらの細胞を有糸分裂に追い込むのに十分であるかどうかを決定した。サイクリンBをコードするRNAをnosプロモーターの制御下で発現させ、nos 3′ UTRを用いて極性形質と極細胞に局在させた（E. R. Gavis, personal communication）。サイクリンBのmRNAの3′UTRをnosの3′UTRに置き換えると、得られたmRNAは移動する極細胞でサイクリンBを産生する（データは示していない）。

**Figure4** サイクリンBの発現を誘導することで、静止状態の極細胞を有糸分裂に導くことができる。

サイクリンB-nosの3′UTRを持つ（b-e, g）、持たない（a, f）雌由来の胚の極細胞におけるPH3（a-e）およびサイクリンE（f, g）の発現 a-e, ステージ10-11の胚をPH3（赤）およびVasa（緑）の抗体で二重染色したもの。b-eの矢印は、プロフェーズ（b）、メタフェーズ（c）、アナフェーズ／テロフェーズ（d、e）におけるPH3陽性の極細胞を示している。f, g, 16期の胚をサイクリンE（赤）およびVasa（緑）に対する抗体で二重染色した。h、i、サイクリンB-nos 3′UTR構築物を有する（i）及び有しない（h）雌由来の胚における生殖腺。ステージ17の胚を抗Vasa抗体で染色した。両胚とも、極細胞は生殖腺内に正常に取り込まれていた。サイクリンB-nos 3′UTRを導入した雌の胚では、導入していない雌の胚（h）と比較して、生殖腺内に取り込まれた極細胞の数が増加した（i）。サイクリンB-nos 3′UTRを持つ雌に由来する胚は、極細胞の細胞周期制御異常（本文参照）にもかかわらず、生存可能で繁殖力のある成体になるという意味で、正常に発達した。e（c-e）およびi（a, b, f-i）のスケールバーは20μmを表す。

サイクリン B-nos 3′UTR融合遺伝子を2コピー持つ雌から産まれた胚では、PH3染色で評価したところ、極細胞が早期に有糸分裂に入った（Fig. 4）。PH3 陽性極細胞は胚の 10.3%（N = 78、8-14 期）に観察され、融合遺伝子を持たない雌の対照胚で得られた 0%（N = 176、P < 0.001 、フィッシャーの正確確率検定）より有意に増加した（図 4a、 b）。PH3陽性の極細胞は、プロフェーズ（図4b）、メタフェーズ（図4c）、アナフェーズ／テロフェーズ（図4d、e）において有糸分裂細胞として明確に識別でき、サイクリンB-nos 3′UTR胚の移動する極細胞が有糸分裂を経て進行することが確認された。

ステージ16-17のサイクリンE陽性極細胞の割合は、対照胚（75.3%; n=291; P<0.001, Fisherの正確確率検定）に比べ、サイクリンB-nos 3′ UTR胚（40.0%; n（調査極細胞数）=30）において著しく減少した（図4f、g）。サイクリンEシグナルを持たない極細胞がG1期のポストミトーシス状態にあるかどうかを調べるために、サイクリンE陰性および-陽性の極細胞のDNA量をDNA蛍光サイトメトリーでカウントした（方法参照）。対照胚では，G1期における体細胞のDNA蛍光量に対するサイクリンE-陰性および-陽性極細胞のDNA蛍光量の値はそれぞれ1.12および2.05であった（P<0.01，U-検定；サイクリンE-陰性，n=5；サイクリンE-陽性，n=16）．サイクリンB-nos 3′UTR胚では，サイクリンE陰性および陽性の極細胞の相対値はそれぞれ1.01および1.97であった（P<0.01，U-test；サイクリンE陰性，n＝12；サイクリンE陽性，n＝10）．これらの結果は、極点細胞からのcyclin Eの消失が、G2期からG1期の後成熟状態への細胞周期の進行と密接に関連していることを示すものである。これらの結果は、サイクリンBの誘導が、有糸分裂を経てG1期へとポールセルを駆動することができることを示している。PumとNosはサイクリンBの産生を抑制することで、移動するポール細胞のG2期から有糸分裂への移行を抑制していると結論づけた。

**Method　DNAの定量化**

ステージ15-16の胚は、上記のようにニワトリ抗Vasa抗体とラット抗サイクリン-E抗体で二重染色した。二次抗体は、FITC標識抗ニワトリIgGおよびCy5標識抗ラットIgG（1:60希釈、Jackson Immuno Research）を使用した。染色した胚は，100μg ml-1 RNase Aを含む洗浄用緩衝液中で37℃，15分間インキュベートした．次に、10μg ml-1 ヨウ化プロピジウム（Sigma）を含む10% BA+Tバッファーで30分間染色し、Vectashieldでマウントした。共焦点レーザー顕微鏡（Leica）で、生殖腺の連続光学切片（0.7µm）を得た（極細胞核あたり約7切片）。DNA 蛍光の定量は、まず各切片について TCS-NT ソフトウェア（Leica）を用いて核の占める領域からの蛍光強度を求め、それを合計した。各胚について，サイクリン E シグナルを持つ，または持たない極細胞 1～3 個と G1 期 の体細胞 3 個から核を同一焦点面内で無作為に選択した．脂肪体細胞は 11 期に分裂を終了し、胚発生後に倍数体となるため、体細胞 G1 細胞として使用した48。このようにして測定された蛍光強度は，胚内の各クラスの核に対して一定であったが，胚ごとに変動した．このため、まず各胚の DNA 蛍光の値を体細胞 G1 核の値（1.00 とする）に正規化し、4-6 個の胚の平均値を算出した。サイクリンEシグナルのある極細胞から得られた値とない極細胞から得られた値の間の有意性は、Mann-Whitney U-testによって算出された。

PumとNosによるサイクリンBの抑制が他の生殖腺特異的細胞事象に必要であるかどうかを調べるために、極細胞のサイクリンBの誤発現がその移動とPZ198発現に及ぼす影響について調べた。サイクリンB-nos 3′UTR胚では、極細胞は正常に生殖腺にコロニーを形成した（図4h, i）。生殖腺内の極細胞の平均数は，サイクリンB-nos 3′UTR胚（N＝50）で12.1，対照胚（N＝58）で9.3，サイクリンBを欠くnosプロモーター-3′UTR構築物を持つ雌からの胚（N＝35）では7.5であった．PZ198の発現はサイクリンB-nos 3′UTR胚の極細胞で正常であった（表2）。これらのことから、極細胞におけるPumとNosの制御標的はサイクリンBだけではない可能性が示唆された。

**Table2 cyclin B-nos 3′ UTR 胚の極細胞における PZ198 の発現**

\* サイクリンB-nos 3′UTR構築物を持つ、または持たないyw雌をエンハンサートラップ系統PZ198の雄と交配し、その子孫の極細胞におけるマーカー発現を調査した。

†ステージ7-13およびステージ14-17の胚をβ-ガラクトシダーゼおよびVasaの二重染色を行った。β-ガラクトシダーゼを発現している極細胞を持つ胚の割合を示す。

‡ これらの胚のうち、12/13期に極細胞でPZ198の発現が見られたのは2個だけであった。正常な胚でも、12/13期にPZ198の発現が時々見られる程度であった（図1c）。

**Table3 変異体胚の極細胞の数**

\* nos/nos、nos/TM3、pum/pum、pum/TM3雌、およびcyclin B-nos 3′ UTR constructを持つまたは持たないyw雌をOregon-R雄と交配し、その子孫の全極細胞数を計数した。

† ステージ14-17の胚をVasaタンパク質に対する抗体で染色した。極細胞はVasa染色を有する細胞として同定された。生殖腺内外のVasa陽性極細胞の総数がカウントされた。胚内のVasa陽性細胞の平均数を示す。

‡確率はフィッシャーの正確確率検定で算出した。確率の比較（上から下へ）：nosBN/TM3とnosBN/nosBN；pumMsc/TM3とpumMsc/pumFC8；pumFC8/TM3とpumMsc/pumFC8；ywとサイクリンB-nos 3′ UTR6；yw とサイクリン B-nos 3′ UTR5.

これらの実験の間、我々は生殖細胞の初期発生におけるPumとNosのもう一つの役割に注目した。サイクリンB-nos 3′UTRの胚では、極細胞の数がコントロールで観察されたものに比べて増加した（表3）。この極細胞数の増加は、極細胞の早すぎる有糸分裂に起因すると思われる。しかし、pumとnosの胚では、突然変異体の極細胞は早すぎるとはいえ有糸分裂に入ったが、Vasa陽性極細胞の数は対照胚のそれよりも有意に少なかった（表3）（Fig.2）。これらの結果は、変異体胚ではかなりの割合の極細胞が失われていることを示唆している。このように、PumとNosはサイクリンBの抑制とは独立した経路で、極細胞の生存を保証しているのかもしれない。

**Discussion**

PumとNosは生殖細胞および体細胞の様々な発生プロセスに必要である。PumとNosは腹部形成に至る経路では互いに協力しているが、卵形成初期には、Pumが生殖幹細胞の維持に、Nosが生殖巣の形成という遅いステップに影響するため、別々に作用しているように見えた。PumとNosはそれぞれ生殖細胞幹細胞と嚢胞細胞で高レベルで検出される。これらの違いは、NosとPumが卵形成時に異なる相手と相互作用している可能性を示している。しかし、卵形成時の作用様式とは対照的に、pumとnosの変異は胚の生殖細胞発生において本質的に同一の表現型スペクトルを示すようになる。Pumの変異はNosの発現、分布、安定性に影響を与えず、逆にNosの変異はPumに影響を与えないことから、Pumは生殖細胞の初期発生においてNosと共同で作用していると結論づけた。

pumとnosの変異は、極細胞におけるサイクリンBタンパク質の早すぎる発現を引き起こす。これらの変異は母体のサイクリンB mRNAの後方局在や極細胞への分配に影響を与えないことから（データは示していない）、サイクリンB mRNAの翻訳は通常極細胞においてPumとNosによって抑制されていると結論づけた。サイクリンB mRNAは、その3′UTRに翻訳制御要素（TCE）と呼ばれるNRE様配列を含む。エピトープタグをつけたサイクリンB mRNAの3′UTRからTCEを欠失させると、nosやpumの変異によるものと同様の表現型になる (Fig. 3)。これらの観察から、Pum/Nos依存的なサイクリンB mRNAの翻訳抑制はTCEが媒介すると結論づけられる。Pumがin vitroでNREに結合することから、PumはTCEに直接結合すると考えるのが妥当であろう。これは、生殖細胞前駆細胞において母性因子が特定のmRNAの翻訳を制御していることを示す初めての例である。

この結果は、PumとNosが母方のサイクリンB mRNAの翻訳を抑制することにより、移動する極細胞の分裂を阻害している可能性を示している。正常な発生過程では、第15期の生殖腺内の極細胞でNosが分解された後、極細胞の分裂が始まる（参考文献10、14）。しかし、生殖腺内の極細胞ではサイクリンBとサイクリンB3（文献32）が接合性に発現しているため、必ずしも母体サイクリンBの翻訳が有糸分裂の開始の引き金となるとは限らない。これらの因子の接合体発現が生殖腺内の極細胞分裂を開始させるのに必須である可能性がある。

サイクリンBと構成的に活性なCdc2（Cdc2AF）の共発現は、ほとんどの極細胞を同時に有糸分裂に移行させる。しかし、サイクリンBまたはCdc2AF単独では、両タンパク質が一緒になった場合よりも有糸分裂を誘導する効率は低い（図4）。このように、サイクリンBの過剰発現は、静止状態のポールセルを有糸分裂に導くことはできるが、効率的な有糸分裂を誘導することはできない。おそらく、G2期におけるポールセルの静止状態は、サイクリンBと活性型Cdc2の量の制限に起因しており、サイクリンBのレベルが増加すると、ポールセルの分裂を開始するために少量の活性型Cdc2がリクルートされると思われる。

PumまたはNosを欠損した極細胞では、早すぎる有糸分裂はS期に続かない。これは、変異極細胞が有糸分裂後にサイクリンEを再蓄積しないことで示されている（Fig. 2e）。同様の結果は、ポール細胞でサイクリンBを過剰発現させた場合にも得られている。これらの結果は、ポール細胞が有糸分裂後にG1期に停止する可能性があること、そしてこの停止はPum/Nosの機能とは無関係であることを示唆している。このように、移動するポール細胞の継続的かつ連続的な細胞周期は、複数の細胞周期チェックポイントを通じてブロックされる。

この議論から、順次細胞循環の阻害が生殖細胞の初期発生において重要な役割を担っていることが推測される。一つの可能な役割は、極細胞内に取り込まれた母性因子の希釈を防ぐことである。PumとNosはG2/M遷移を抑制して、極細胞の移動と接合遺伝子の制御に十分な濃度を保っているのだろう。極細胞の静止は、他の母性因子によってG1期で停止することによって確保されるのかもしれない。生殖細胞の発生が母性因子によって制御されている線虫胚において、生殖細胞前駆細胞が分裂を停止していることは興味深い。一方、生殖細胞の発生に母方の関与が少ないマウス胚では、生殖細胞前駆細胞の増殖が継続する。

その結果、極細胞の移動は、サイクリンBの誤発現や有糸分裂の1回分には影響されないことが示された。おそらく、PumとNosは、極細胞の移動を妨げるサイクリンB以外の転写産物の翻訳を抑制しているのであろう。

nosとpumの極細胞は、中腸上皮を通過して血餅に入った後、適切に移動することができない。また、変異型極細胞では、中腸の袋から出た後の遺伝子制御も変化しており、生殖腺内で通常活性化されるエンハンサートラップマーカーを早期に発現する（Fig.1）。したがって、変異極細胞が正しく移動できないのは、これらの細胞における早すぎる遺伝子発現に起因している可能性がある。この遺伝子発現の早さは、あたかもこれらの極細胞が生殖腺への移動を完了したかのように振る舞うことを意味し、NosとPumがエンハンサー活性化に関与する制御因子の産生を抑制できないことによって説明することが可能である。両タンパク質とも、エンハンサー活性化因子をコードするmRNAの翻訳を直接抑制しているのかもしれない。

PumとNosのRNA結合ドメインが脊椎動物および無脊椎動物で保存されていることから、生殖細胞の発生において広範囲かつ中心的な役割を担っている可能性がある。一方、腹部形成におけるPum/Nosの機能は、母方のnosとhbの両方のmRNAを欠いた胚が腹部を形成することから、補助的なものである可能性もある。これらの議論は、様々な動物においてNos関連タンパク質をコードするmRNAが生殖細胞系列と関連しているという観察によってさらに支持される。多様な双翅目昆虫やXenopus胚では、nos関連mRNAは生殖質内に局在し、後に生殖前駆細胞に見いだされるようになる。さらに重要なことは、PumがNREに結合する能力も、NREの配列自体も、保存されているように見えることである。ヒトのPumのRNA結合ドメインはhbのNREに配列特異的に結合することができる。線虫では、glp-1 mRNAにNRE様配列が見られ、生殖細胞の前駆細胞でその翻訳が抑制される。これらのことから、PumとNosによる翻訳制御は、多くの動物群の生殖細胞の発生に必須である可能性が示唆された。この結果は、生殖細胞発生の制御機構を理解するための重要な第一歩となる。