

## 論文内容の要旨

論文題目 線虫の生殖細胞形成に関わる  
遺伝子群の検索と解析

氏名 花澤 桃世

有性生殖を行う生物にとって、配偶子は己の遺伝情報を次世代に引き継ぐという生物の根元の目的を果たすための媒介として必須である。また、生殖細胞は、永久分裂能や全能性、減数分裂という特殊な分裂様式など、体細胞の持たない様々な特徴を持つ。この特殊な細胞から配偶子を形成するまでには、予期しない事態が起きても誤った方向へ進まないように働く補正プログラムや重複した経路も含む、多数の因子による複雑な経路が整然と制御されて機能していると予想される。

本研究では線虫 *Caenorhabditis elegans* の生殖細胞において重要な働きをする遺伝子群の統括的な検索とその解析を行った。まず、減数分裂過程の細胞で満たされた生殖腺を持つ *glp-1* 変異株と生殖細胞をほとんど持たない *glp-4* 変異株との間で cDNA サブトラクションを行い、生殖腺において特異的に発現している遺伝子群由来の cDNA に富む F cDNA プローブ、および比較のための R cDNA プローブを作製した (図1)。続いてこれらの cDNA プローブを用いて、線虫の全遺伝子の約4割にあたる7584種類の EST (Expressed Sequence Tag) クローンがスポットされた high-density grid に対してディファレンシャルハイブリダイゼーションを行った。各スポットのシグナル強度を測定し、F cDNA プローブに対するシグナル強度と R cDNA プローブに対するシグナル強度の比が一定以上の値を示したスポットに対応する199の遺伝子を、生殖細胞において特異的に発現すると予想される候補遺伝子として選択した。この中には生殖腺における発現や機能が既に確認されている因子が多数含まれていた。21の候補遺伝子について、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、18の遺伝子が生殖腺において強い発現を示したことから、候補遺伝子群の

大半が期待通り生殖腺において発現していることが予想された。候補遺伝子群のうち、既知の遺伝子を除く168の遺伝子について順次RNA干渉法（RNAi）による機能破壊を施した結果、胚発生に必要な遺伝子や幼虫初期に必要な遺伝子の他、稔性に必須な15遺伝子を同定した（図2）。ランダムに遺伝子の機能破壊を行った場合には1%前後の頻度で不稔性を生じる遺伝子が現れると言われており、これに比べると今回のスクリーニングでは全体の約9%という高い頻度で不稔性が観察されたことから、cDNAサブトラクションおよびディファレンシャルハイブリダイゼーションが有効であったと考えられる。機能破壊の結果生じた不稔の表現型は大きく2種類に分類できた。子宮内に卵が形成され産卵が起こるが受精卵特有の卵殻が観察されない場合と、全く卵を産まない場合である。DAPI染色やノマルスキー顕微鏡観察によって詳細にそれぞれの表現型の解析を行った。卵殻が観察されないグループは、野生株の雄との交配によって受精卵を産むようになる場合と、未受精卵様の卵を産み続ける場合にさらに分類された。前者は精子形成の異常による不稔と考えられ、一方、後者の表現型を引き起こした遺伝子群には卵殻の主成分であるキチン合成系に関わる酵素の相同遺伝子が複数含まれていた。全く卵を産まないグループには、生殖細胞の増殖が起こらないもの、生殖細胞の核が崩壊するもの、卵形成へ移行せず精子を作り続けるもの、減数分裂の特定の過程で停止してしまうものなど、様々な異常が観察された。このグループにはRNAヘリケースなどのRNA結合因子に相同性を示す遺伝子が複数含まれており、配偶子形成過程における転写後制御に関わる可能性がある。

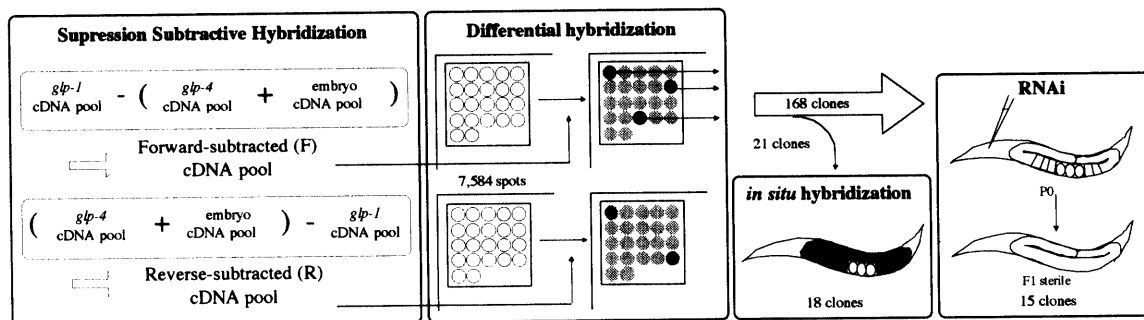


図1. スクリーニングの流れ

*glp-1*変異体、*glp-4*変異体、および野生株初期胚から回収したmRNAからそれぞれcDNAを合成し、図に示す2通りのcDNAの差し引きを行うことでF cDNAプールおよびR cDNAプールを作製した。差し引き後のcDNAプールをプローブとして、7584種の独立のcDNAクローンがスポットされたhigh-density gridに対してディファレンシャルハイブリダイゼーションを行った。F cDNAプールをプローブとした場合に強いシグナル強度を示したスポットに対応する21遺伝子について、*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、生殖腺における特異的な発現パターンを確認した後、168の候補遺伝子群について順次RNAi法により機能破壊を行い、その結果、不稔の表現型を示す15遺伝子を同定した。

スクリーニングで同定された配偶子形成に必要な遺伝子群のうち、eIF-5AおよびATP合成酵素b鎖の相同遺伝子についてさらに解析を進めた。

eIF-5A相同遺伝子は*in situ*ハイブリダイゼーションの結果、生殖細胞の増殖がおこる領域において発現が高く、変異体では生殖細胞数が減少する。生殖細胞が分化せず増殖のみを行い続ける変異株に対する機能破壊でも同様の表現型が観察されたことから、この遺伝子が生殖細胞の増殖自体に必須であることが示唆された。eIF-5Aはもともと翻訳開始因子として単離されたが、そ

の機能は現在では疑問視されており、最近の他生物での知見から、eIF-5Aは核膜孔に局在し、mRNAの核外輸送や分解を制御すると示唆されている。本変異体では生殖腺内のRNA全般の局在に異常は見られなかったものの、RNAの転写後調節への関与が示唆されているP顆粒の構成因子であるPGL-1の核膜孔への局在が失われていた。P顆粒には限られた種類のmRNAが局在していることが知られており、eIF-5A相同遺伝子がそれらの転写後調節に関与している可能性がある。また、ゲノム上にもう1つ存在するeIF-5A相同遺伝子は体細胞において発現し、変異体では成長遅延および体細胞性の一部の組織が欠如するという表現型が観察されたことから、相同遺伝子間で機能部位の分担が行われていると考えられる。

一方、ATP合成酵素b鎖相同遺伝子の機能破壊では、Ras-MAPK経路に属する*mpk-1* (MAPK相同遺伝子) や*mek-2* (MAPKK相同遺伝子) の機能欠損型変異と類似した表現型 (生殖細胞の減数分裂前期のパキテン期における停止、生殖細胞のアポトーシスの欠如) が観察され、Ras活性化型変異によりその表現型が部分的に抑圧された。b鎖相同遺伝子はもう1つゲノム上に存在するが、この遺伝子は体細胞において発現し機能破壊によって成長遅延が起こることから、相同遺伝子間での機能部位の分担が推定された。b鎖相同遺伝子がATP合成酵素のサブユニットとして機能していることを確認するために、他のサブユニットの相同遺伝子を網羅的にRNAiにより機能破壊した結果、ほとんどの場合において胚致死または幼虫致死が生じた。唯一、ゲノム上に2つのパラログが存在するg鎖相同遺伝子のうちの片方を機能破壊した場合に、b鎖相同遺伝子の機能破壊と同様な不稔性が観察された。これらの結果から2つの可能性が考えられる。1つはb鎖およびg鎖相同遺伝子がATP合成酵素とは独立に生殖細胞において機能する可能性であり、1つはb鎖およびg鎖相同遺伝子がどちらもATP合成酵素のサブユニットとして機能しており、体細胞において機能する型と生殖細胞において機能する型に機能分担がなされているという可能性である。後者の場合には、他のサブユニットが体細胞および生殖細胞両方で共通に機能しているために、RNAiによる機能破壊では発生初期において停止してしまい生殖細胞における影響を観察することができなかつたと考えられる。これまでの知見からパキテン期開始を促すシグナルが生殖腺鞘細胞から生殖細胞にむけて流れていると言われており、このシグナル伝達経路にb鎖相同遺伝子およびRas-MAPK経路が関与している可能性がある。b鎖やg鎖の相同遺伝子がATP合成酵素のサブユニットとして機能していると考えると、ATP合成酵素により供給されたATPを利用してRas-MAPK経路に属する因子を含む制御因子のリン酸化が一斉に起こることが、生殖細胞がパキテン期以降に進行するために必要なかもしれない。また、ATP合成酵素によるミトコンドリアの $\Delta\psi$ 制御活性が損なわれるために、パキテン期停止が起こる可能性も考えられる。他生物において、細胞死シグナルが入力されるとミトコンドリアの $\Delta\psi$ が変化し細胞死実行経路にスイッチが入る例が知られている。ATP合成酵素による $\Delta\psi$ 制御を介した細胞死への運命決定がなされないがために、死すべき細胞が生き延び、その影響により周囲の細胞全てが停止しているという可能性も考えられる。

胚致死			幼虫致死			
Clone no.	Clone name	CDS ID	Clone no.	Clone name	CDS ID	表現型
1	yk37e9	C26E6.4	14	yk490e12	K02F2.2	
15	yk499g10	W06F12.1	17	yk556g5	F09F7.3	
16	yk538a12	F26B1.3	51	yk293a7	C47D12.6	
20	yk602f11	F52E1.1	123	yk391b7	F20D12.4	
23	yk41h6	T22F3.3	153	yk578a1	C56A3.8	
26	yk118h8	M03F8.3	156	yk585c12	T01C3.7	
112	yk507f10	T05G5.7	164	yk605b2	M28.5	
123	yk391b7	F20D12.4	168	yk670b1	K07C5.4	
126	yk486e10	T20G5.1	その他			
134	yk540f8	-	32	yk199f3	C31C9.2	Slow growing
157	yk585e12	W02A2.h	50	yk286h12	-	Bursting
161	yk595h12	C28C12.2	80	yk383f7	F11G11.8	Dpy
164	yk605b2	M28.5	111	yk506a7	-	Pvu
			128	yk529f3	ZK1151.2	Bursting
不稔 (未受精卵様の卵を産む場合)						
Clone no.	Clone name	CDS ID	相同性	表現型	浸透度 %	
9	yk385e11	W09C3.6	Serine/threonine protein phosphatase PP1	Type I	100	
10	yk437b3	C25G4.6	PDZ domains	Type I	100	
42	yk233g4	F32A11.3	-	Type I	58	
47	yk270c1	T25G3.2	Chitin synthase	Type II	100	
121	yk292d2	T21E3.1	Protein tyrosine phosphatase	Type II	100	
131	yk534e2	F07A11.2	Aminotransferase	Type II	67	
148	yk574e1	H02I12.1	-	Type III	71	
不稔 (卵を産まない場合)						
Clone no.	Clone name	CDS ID	相同性	表現型	浸透度 %	
12	yk445a8	T05G5.10	Eukaryotic initiation factor 5A Glp		100	
50	yk286h12	-	-	Glp	54	
111	yk506a7	-	-	Degenerative nuclei	100	
116	yk519f1	F35G12.10	ATP synthase b chain	Pachytene arrest	100	
127	yk520f4	C05D2.5	-	Degenerative nuclei	75	
134	yk540f8	-	Pumilio repeat family	Mog, Diakinesis defects	43	
153	yk578a1	C56A3.8	-	Glp	57	
160	yk590b8	C07H6.5	ATP-dependent RNA helicase	Diakinesis defects	100	

## 図2. RNAi結果

Clone no.は実験の便宜上使用した番号である。対応するcDNAクローン名、CDS ID (ゲノムプロジェクトによる遺伝子名)、および分子的特徴を示した。Dpy : Dumpty (体が短く、太い)、Pvu : Protruding vulva (陰門が突出する)、Glp : Germline proliferation defect (生殖細胞の数が低下する)、Mog : Masculinization of germline (生殖腺が雄化する)。未受精卵様の卵を産んだ場合には、RNAiを行った個体 (P0) の表現型および野生株の雄との交配による稔性の回復の有無で分類した。Type IはF1でのみ表現型が観察され、雄との交配で稔性が回復したものの、Type IIはP0でもF1でも表現型が観察され、雄との交配で回復しなかったもの、Type IIIはP0でもF1でも表現型が観察され、雄との交配で回復したものである。