

論文の内容の要旨

論文題目

線虫遺伝子機能の体系的解析によって同定された生殖細胞形成に必要な遺伝子 *hmg-3* の解析

氏名 前田 郁麻

線虫 *C. elegans* ではゲノムプロジェクトにより約 19,000 の遺伝子が予測されているが、大多数の予測遺伝子は依然として機能不明であり、ゲノム情報を利用した体系的な遺伝子機能解析が必要とされている。そこで、近年急速に普及した RNAi 法を用いて体系的に遺伝子機能破壊を行う系を構築した。通常 *C. elegans* で RNAi を行うときは RNA を個体に導入する手段として微量注入を用いるが、網羅的に RNAi を行うにはその方法では負担がかかりすぎる。そこで本研究では微量注入に代わる簡便な RNA 導入法として、RNA 溶液に線虫を浸けておくだけの RNAi-by-soaking 法を確立した。*C. elegans* では EST プロジェクトにより予測遺伝子の過半数について cDNA が同定されている。これにもとづいた非重複 cDNA セットを鋳型として二本鎖 RNA を合成し、RNAi-by-soaking 法によって各遺伝子の RNAi を行った (図 1(a))。本研究では全遺伝子の 13% に当たる約 2,500 遺伝子の解析を行い、それらのうち 27% で何らかの表現型を認め (図 1(b))、それらの中から生殖細胞特異的に機能している遺伝子を同定することを目的として、F1 世代に不稔性をもたらした遺伝子について詳しい解析を行った。これまでに、生殖細胞の増殖・卵形成・卵成熟・生殖腺形成などに関与する遺伝子を同定した (図 2)。

同定できた遺伝子のうち、HMG box ファミリーに属するヒト SSRP1 (Structure-Specific Recognition Protein 1) の相同遺伝子、*hmg-3* の解析をさらに進めた。*hmg-3* に対して RNAi を行い機能破壊を詳しく解析したところ、生殖細胞の増殖が少なく不稔であったが、体細胞には影響が見られなかった。さらに染色体上の *hmg-3* 遺伝子を欠いた欠失変異体も取得したが、その表現型は RNAi を行った場合とほぼ同じであった (図 3 (a))。したがって、*hmg-3* の機能は生殖細胞特異的であると予想された。一方、*hmg-3* には *hmg-4* という paralog が存在するが、*hmg-4* に対して RNAi を行うと幼生致死になった。ほとんど全ての F1 個体と同じステージで成長停止したのち動きが鈍くなり、

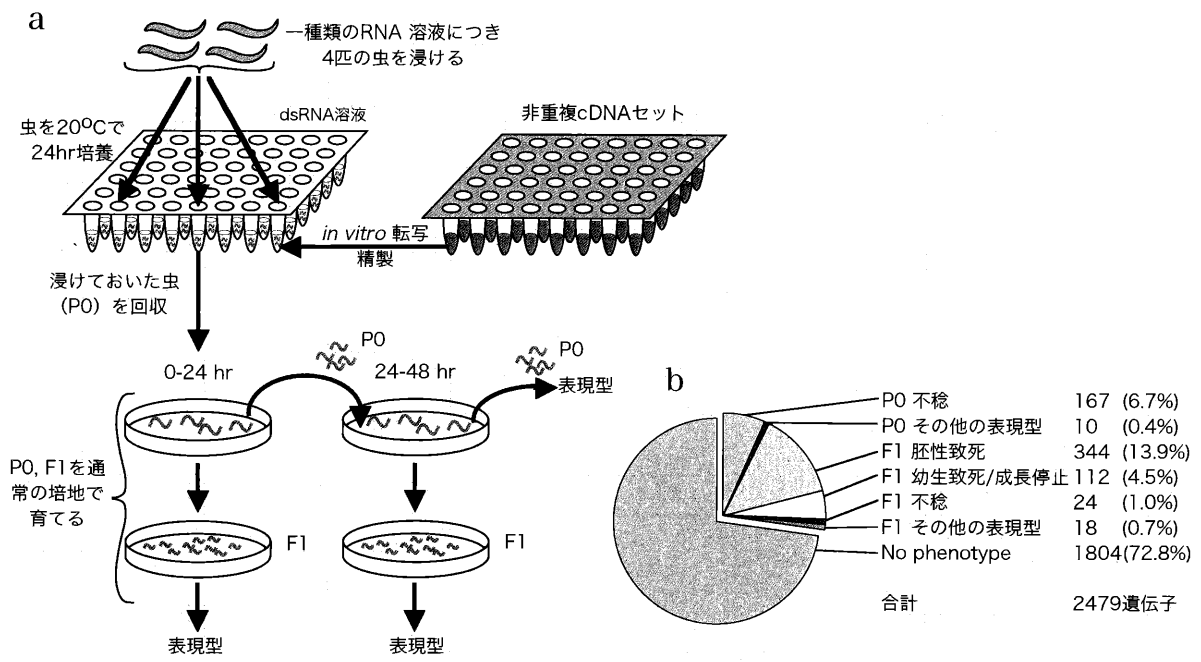


図 1 (a) 本研究で行われた体系的 RNAi スクリーニングの概略。各 cDNA クローン を T3/T7 プロモーター配列を含むプライマーで PCR 増幅したものを鋳型とし、*in vitro* で合成した dsRNA を RNAi に用いる。精製した dsRNA 溶液に野生型の線虫を 24 時間浸けて dsRNA を体内に導入してから通常の培地に戻し、浸けておいた線虫 (P0) とその次世代 (F1) の表現型を実体顕微鏡で観察する。RNA 合成から線虫を浸ける作業を全て 96 穴のフォーマットで行えるようにし、効率化を図った。(b) 体系的スクリーニングで見られた各表現型の割合

やがて死に至った。幼生致死となった個体は形態的にはほぼ正常であった (図 3 (b))。さらに、*hmg-3* と *hmg-4* の機能を同時に破壊すると胚性致死となった。成長停止した胚を詳しく観察したところ、細胞増殖はかなり起きているものの、形態形成を開始することができずに細胞塊となったままであった (図 3(c))。ただし、腸や筋肉などの組織への分化はある程度見られた。以上の結果から、*hmg-3* と *hmg-4* は胚発生時には redundant に働き、胚発生以降は生殖系列と体細胞系列で独立に働いていることが示唆された。

ヒト SSRP1 は Spt16 というタンパク質と FACT と呼ばれるヘテロダイマーを形成して、ヌクレオソームを鋳型とした RNA ポリメラーゼ II による転写の伸長や DNA の複製といった基本的な生命現象に関与することが知られている。*C. elegans* にも Spt16 は保存されており、この遺伝子を *Ce-Spt-16* と名付けて機能解析を行った。*Ce-Spt-16* に対して RNAi を行ったところ *hmg-3* と *hmg-4* に対して二重 RNAi を行ったときとよく似た表現型の胚性致死を示した。このことから、*C. elegans* においても FACT 複合体は保存されており、胚発生において重要な役割を担っていることが示唆された。

次に、*hmg-3* が単純に生殖細胞の生存や細胞分裂などの基本的な現象に必須の役割をしているのか、それとも何らかのシグナル伝達系路に関与しているかを確かめるため、生殖細胞で腫瘍を引き起こす *gld-1gld-2* 二重変異体に対して *hmg-3* の RNAi を行った。*gld-1* と *gld-2* は減数分裂の開始に redundant に働く遺伝子で、*gld-1gld-2* 二重変異体では生殖細胞で体細胞分裂だけが起きるといふ腫瘍的な表現型を示す。*gld-1gld-2* の上流でそれらの機能を押さえるように働いて、減数分裂への移行を阻害し体細胞分裂を促しているのが *C. elegans* の Notch 経路である *glp-1* 経路である。*glp-1* 単独の変異では全ての生殖細胞が増殖することなく減数分裂に移行してしまうため、若干の精子のみが作られるという表現型が見られるが、*glp-1* 変異は *gld-1gld-2* 二重変異の腫瘍を抑圧することはできない。一方、

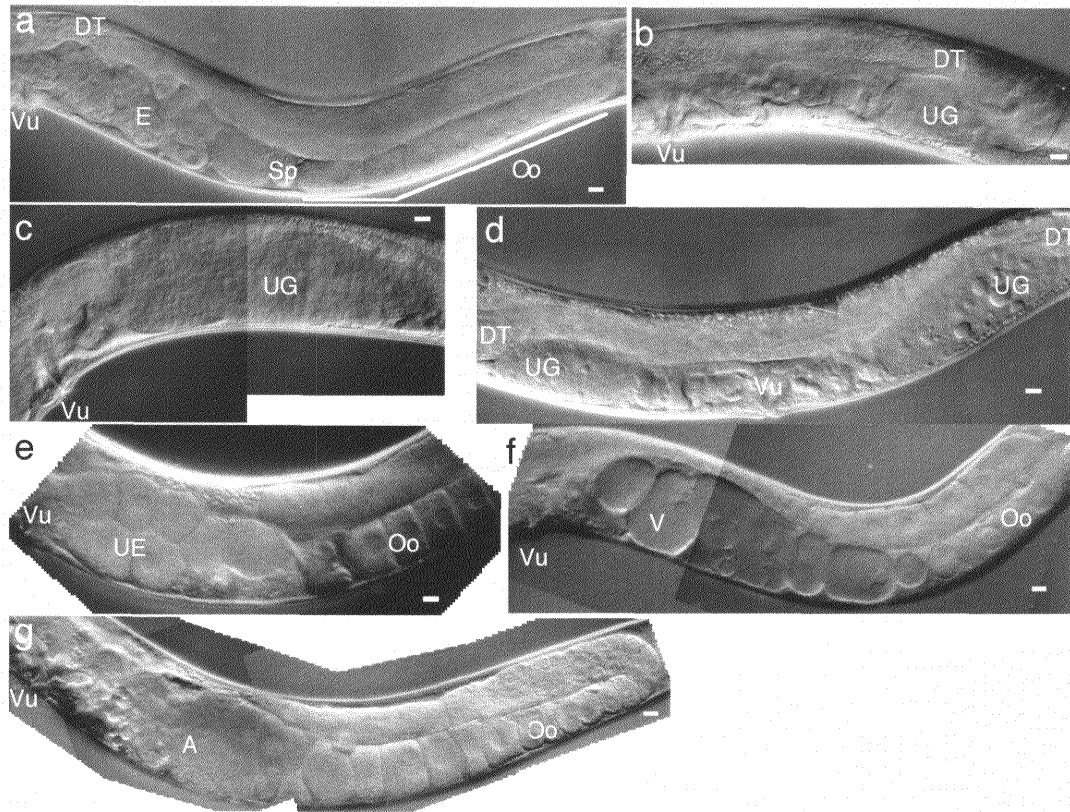


図 2 不稔性を示した表現型の例。成虫雌雄同体の微分干渉顕微鏡像を示す。(a) 野生型雌雄同体。(b-g) RNAi で見られた表現型。(b) *yk187a3* (F1 世代), 生殖細胞の量が少ない, 配偶子は見られない。(c) *yk260b7* (F1), 一部の F1 個体が生殖細胞の過剰な増殖を示した。(d) *yk213d3* (F1), 生殖腺の形態に異常が見られる。配偶子は形成されない。(e) *yk218f9* (F1), 未受精卵が子宮に蓄積する。(f) *yk267a9* (F1), 生殖腺基部に空胞化した卵細胞が見られる。(g) *yk201d3* (P0), 排卵が見られず, 卵細胞が卵巣に蓄積する。Vu, 陰門; DT, 生殖腺の先端部; Oo, 卵細胞; Sp, 精子; E, 受精卵; UG, 未分化状態の生殖細胞; UE, 未受精卵; V, 空胞化した卵細胞; A, 蓄積した卵細胞。

体細胞分裂などの基本的な現象に関わる遺伝子の機能を抑えれば *gld-1gld-2* 二重変異の腫瘍は抑圧できると予想される。結果として, *hmg-3* は *gld-1gld-2* の腫瘍を部分的にのみ抑圧した。このことから, *hmg-3* は *glp-1* 経路に何らかの形で関与することが予想されたが, それ以外の体細胞分裂の進行過程にも何らかの役割を果たしていることが示唆された。

C. elegans の近縁の線虫である *C. briggsae* にも SSRP1 の相同遺伝子が 2 つ存在することが分かったので, それぞれ *Cb-hmg-3*, *Cb-hmg-4* と名付けて機能解析を行った。*Cb-hmg-3* に対して RNAi を行ったところ, F1 個体は不稔となったが, *C. elegans* の場合とは逆に細胞増殖は十分に起きていた。しかし, 減数分裂に移行して配偶子を形成することができず, かわりに体細胞分裂が起き続けてしまうという腫瘍的な表現型を示した。一方, *Cb-hmg-4* の機能はあまり重要ではないらしく, RNAi では F1 個体が野生型に比べてやや体が小さいという傾向が見られたが, 稔性や生存には影響がなかった。さらに, *Cb-hmg-3* と *Cb-hmg-4* の機能を同時に欠損すると胚性致死の表現型が見られた。このことから, 表現型の細部で違いが見られるものの, *C. briggsae* でも, *C. elegans* で見られたような体細胞と生殖細胞における SSRP1 の使い分けという機構は保存されていることが分かった。

以上の結果から, *hmg-3* は, 生殖系列特異的に転写や DNA 複製のような基本的な生命現象に関与するというよりは, 特定の複数の標的遺伝子を制御するレギュレーターとしての機能を持つと予想される。*C. briggsae* の相同遺伝子が, 一般的な転写や DNA 複製の効率低下からは説明できない腫瘍的

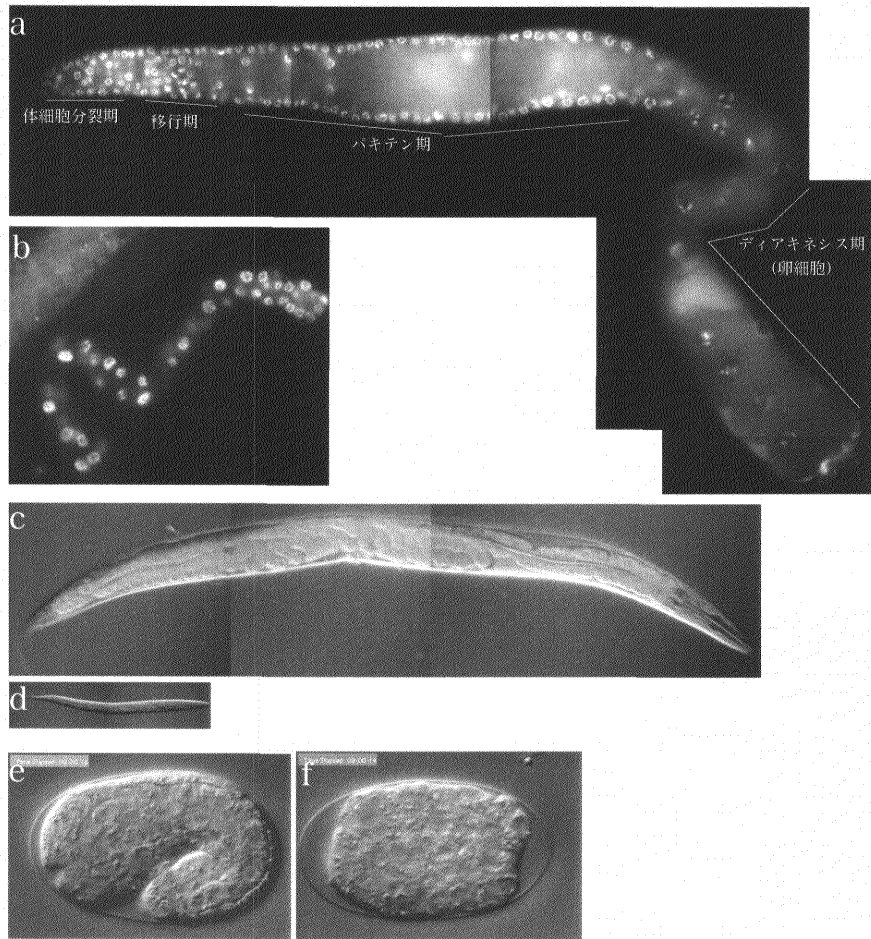


図 3 *hmg-3* および *hmg-4* の機能を破壊したときに見られた表現型。(a-b) 雌雄同体の生殖腺を切り出して hoechst33342 で DNA を染色した蛍光顕微鏡像 (a)野生型雌雄同体 (b)*hmg-3* に対して RNAi を行った F1 個体。おそらく未分化と思われる細胞がわずかにのみ見られる (c-d) 野生型雌雄同体成虫(c)と *hmg-4* に対して RNAi を行った F1 個体(d)を同一倍率で示したもの。*hmg-4* はごく若い幼虫の段階で成長停止する。(e-f) 野生型(e)と *hmg-3hmg-4* 二重 RNAi 個体(f)の胚発生過程。野生型では胚の伸長が起きるが(e), 二重 RNAi 個体(f)では胚の伸長は観察されない。

な表現型を示したこともこれを支持する。現在標的の一つとして考えられるのは *glp-1* 経路に関わる遺伝子群であるが、*hmg-3gld-1gld-2* 三重変異体の解析結果から、それ以外にもいくつかの標的があることが示唆された。一方、2つの SSRP1 を生殖系列と体細胞で使い分けるという機構は大変興味深い。現在分かっている限りでは、SSRP1 を二種類持っている動物は線虫だけであり、*C. elegans* だけでなくその近縁種の *C. briggsae* でも同じ様であった。線虫の生殖系列では特殊な転写制御が行われていることが知られており、そのためにこのような機構が進化した可能性も考えられる。