

論文内容の要旨

論文題目

線虫の RNA 結合タンパク質 CPB-3 が制御する 配偶子形成機構の分子遺伝学的解析

(Molecular genetic analysis of the germline development regulated by
RNA-binding protein CPB-3 in *C. elegans*)

氏名 長谷川恵理

すべての動物種は次世代の個体を作るための細胞、生殖細胞を持つ。先ず胚発生初期に生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞が生じる。始原生殖細胞は体細胞から別れて発生中の生殖腺内へ移動し、その後生殖幹細胞となり、体細胞分裂により増殖する。生殖幹細胞は発生後期になると非対称分裂を行い、片方の娘細胞は減数分裂と形態変化とを経て精子または卵子になる。雄の精子と雌の卵子とが受精して行われる有性生殖は、親とは異なる新しい遺伝子のセットを持った個体をつくることができるという利点を持つ一方で、体細胞分裂から減数分裂への切り替えや、生殖細胞の性（精子になるか卵子になるかの運命決定）などの複雑な制御を必要とする。現在までに、この制御の中核をなすのは種々の RNA 結合タンパク質による mRNA の翻訳制御であることが、モデル生物における研究から示唆されている。ただし、それらの制御機構の全体像はほとんど不明である。本研究では、分子生物学・遺伝学の代表的なモデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて、保存された mRNA 結合タンパク質である CPEB (Cyttoplasmic Polyadenylation Element-Binding) ファミリータンパク質による配偶子形成の制御メカニズムを解析した。

C. elegans の生殖細胞は幼虫期の初期には体細胞分裂のみを行って増殖し、幼虫期の後期に減数分裂を開始する。さらに 4 齢幼虫期には一部の生殖細胞は減数分裂を完了して精子を形成する。4 齢幼虫期から成虫になると、精子形成から卵形成への切り替えが起こり、成虫は卵形成のみを行う。成虫の生殖腺には配偶子形成を行う生殖細胞が発生の順に規則正しく並んでいる (図 1B)。例えば成虫雌雄同体の生殖腺の最も遠位側では、生殖細胞は体細胞分裂を行って増殖し、近位側に移動するにつれて減数分裂を開始し、卵子を形成する。各々の生殖細胞の発生段階は、その染色体の形態によって容易に判別でき

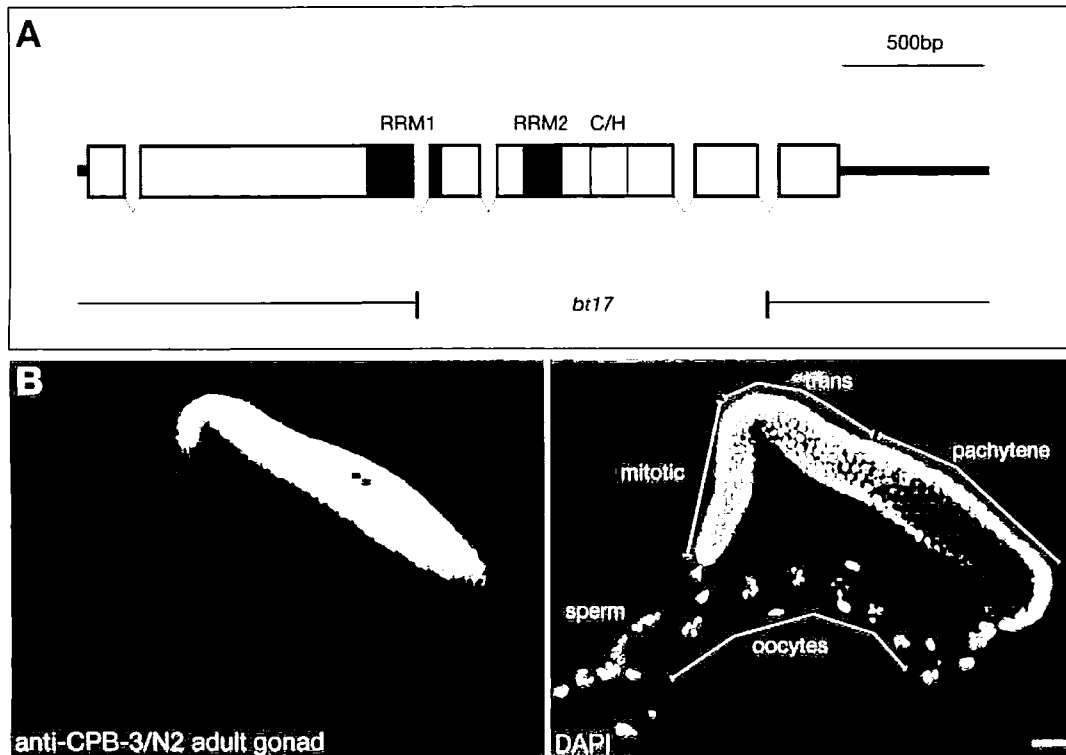


図1. *cpb-3* 遺伝子の構造と CPB-3 タンパク質の発現

(A) *cpb-3* 欠失変異体の欠失部位を遺伝子構造の下に示す。エキソンをボックスで示し、ふたつの RNA 認識モチーフは黒いボックスで、C2H2, C4 zinc finger は灰色のボックスで示す。(B) 切り出した野生型成虫の生殖腺 (N2 adult gonad) を固定し、抗 CPB-3 抗体で染色した (左パネル)。生殖細胞の染色体を DAPI 染色することにより、生殖細胞の発生段階を示す (右パネル)。mitotic: 体細胞分裂領域、trans: 減数分裂への移行期、pachytene: 減数分裂第一分裂前期のハキテン期、oocytes: 卵子、sperm: 精子。矢頭: distal tip。スケールバー: 20um。

る。現在までに、*C. elegans* の配偶子形成過程の制御に重要な RNA 結合タンパク質が複数同定されている。特に、生殖細胞の性決定と、体細胞分裂から減数分裂への切り替えに関しては具体的な遺伝学的経路が明らかになりつつある。

本研究者の所属する研究室では、ヒト無精子症の原因遺伝子 *Deleted in Azoospermina (DAZ)* の *C. elegans* における相同遺伝子、*daz-1* が単離され、解析されてきた。*daz-1* 遺伝子がコードする DAZ-1 タンパク質は体細胞分裂期と減数分裂初期の生殖細胞の細胞質に多く発現し、卵形成時の減数第一分裂の進行に必須である。DAZ-1 タンパク質は特定の mRNA の翻訳を促進することにより卵形成を実現させることが示唆されているが、その際に DAZ-1 がどのようなタンパク質と結合して機能しているのかは謎であった。本研究では two-hybrid スクリーニングにより、DAZ-1 と相互作用するタンパク質として CPB-3 を得た。CPB-3 は線虫に 4 つ存在する CPEB の一つである。CPEB は多細胞動物において保存された RNA 結合タンパク質で、特定の mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) 中に存在する CPE 配列 (UUUUUAU) に結合して、主に poly(A) の長さを正に調節することで mRNA の翻訳を制御する。CPB-3 以外の *C. elegans* の 3 つの CPEB は精子の運命決定または精子形成時に重要であることが示唆されていた。*cpb-3* mRNA

は卵形成を行う生殖細胞で発現が多いことが知られていたが、それ以上の詳しい解析は行われていなかった。

まず抗 CPB-3 抗体を作製して抗体染色を行い、CPB-3 の局在を観察した。CPB-3 は胚発生期から成虫期にかけての生殖腺の細胞質で発現しており、特に雌雄同体の生殖腺では、減数分裂初期の生殖細胞の細胞質で強い発現が観察された。また、免疫沈降実験では、線虫の細胞抽出液から CPB-3 タンパク質と DAZ-1 タンパク質とが共沈降することが確認された。

次に、*cpb-3* 遺伝子の欠失変異体を単離した。*cpb-3(b117)*変異体は RNA への結合に必須である RNA 認識モチーフの大部分と zinc finger ドメインを欠いているため、機能欠失型の変異体であると考えられる (図 1A)。*cpb-3* 変異体は 20°C で産卵数の減少を示したが、この表現型は高温 (25°C) でより顕著であった。*cpb-3* 変異体のホモ接合体は、野生型 N2 株が 25°C で約 170 個の受精卵を産むのに比べて約 30 個の受精卵しかうまず、さらに *cpb-3* 変異体の自家受精卵の半数が胚性致死性を示した。*cpb-3* 変異体の生殖腺の DAPI 染色を行って観察したところ、*cpb-3* 変異体は、幼虫期や成虫の初期には野生型 N2 株とほぼ同様の生殖腺を持っていたが、時間経過とともに生殖細胞数が減少し、パキテン期からディアキネシス期への移行に欠損を示した (図 2B)。すなわち、*cpb-3* 遺伝子は生殖細胞の増殖と減数分裂の進行に重要である。

以上の結果から、CPB-3 が DAZ-1 と相互作用し、卵形成において類似の機能を果たすことが示唆された。*cpb-3* 遺伝子と *daz-1* 遺伝子が協調的に機能するのか、それとも拮抗的に機能するのかを確かめるために、*cpb-3; daz-1* 二重変異体を作製した。*daz-1* 変異体は、卵形成の減数分裂前期パキテン期の進行が不能であり、また精子形成から卵形成への切り替えにも異常を示す。*cpb-3; daz-1* 二重変異体の生殖腺は、N2 株および *cpb-3* 変異体よりも少数の生殖細胞しか含んでいなかった。さらに、成虫期でも卵形成の代わりに引き続き精子形成が行われていた。これらの表現型は *cpb-3* 変異体と *daz-1* 変異体での表現型が強まったものであることから、*cpb-3* と *daz-1* は生殖細胞の性決定と増殖に関して一部重複した機能を持つと考えられる。

daz-1 は精子形成から卵形成への切り替えに関与することが知られている。精子形成から卵形成への切り替え時には、Puf (Pumilio and FBF) ファミリーの RNA 結合タンパク質である FBF-1 と FBF-2 が *fem-3* mRNA の翻訳を抑制することが知られている。*daz-1* は、*fbf-1* および *fbf-2* mRNA に結合してその翻訳を活性化することが示唆されていたため、*cpb-3* と *fbf-1* との遺伝学的相互作用を検討した。*fbf-1* 変異体はほとんど野生型と同様の生殖腺を持つが、*daz-1; fbf-1* 変異体の生殖腺は完全に雄化しており、成虫期でも精子形成しか行われていない。*cpb-3; fbf-1* 二重変異体を作製したところ、*cpb-3; fbf-1* 変異体も成虫期に精子形成のみを行っていた。このことから、*cpb-3* は *fbf-1* と重複して精子形成から卵形成への切り替えに機能を持つと考えられる。

最後に、減数分裂の開始と進行を制御する既知の遺伝子経路と *cpb-3* との関係を検討した。減数分裂の開始と進行には、*gld-1/nos-3* と *gld-2/gld-3* の二つの遺伝学的経路が平行して機能している。GLD-1 は

翻訳抑制因子として機能する STAR/GSG/quaking 型の RNA 結合タンパク質であり、NOS-3 はショウジョウバエ Nanos のホモログである。Atypical poly(A) polymerase の触媒サブユニットである GLD-2 は RNA 結合ドメインを持つ GLD-3 (ショウジョウバエの Bicaudal-C ホモログ) と複合体を形成して、poly(A) 伸長を触媒する poly(A) polymerase として機能すると考えられている。これらの遺伝子の変異と *cpb-3* 変異との二重変異体を作製したところ、*cpb-3; gld-3* 変異体で顕著な表現型が見られた。*gld-3* 変異体の生殖細胞は減数分裂を行うことができるが (図 2C)、*cpb-3; gld-3* 変異体の生殖細胞は体細胞分裂を繰り返し行っており、生殖腺が腫瘍化していた (図 2D)。生殖腺の腫瘍化は、生殖細胞が体細胞分裂から減数分裂への切り替えを行えない変異体で見られる表現型であり、減数分裂開始の欠損を意味している。他の変異と *cpb-3* 変異との二重変異体では腫瘍化した生殖腺は見られなかったことから、*cpb-3* 遺伝子は主に *gld-3* 遺伝子と重複した経路で、体細胞分裂から減数分裂への進入を促進していると考えられる。

以上のことから、*C. elegans* の CPEB 相同タンパク質 CPB-3 が生殖細胞において配偶子形成の複数の段階を制御しており、特に減数分裂に関しては Bicaudal-C 相同タンパク質 GLD-3 と平行した経路で減数分裂への進入・進行を促進することが明らかになった。また、CPB-3 は生殖細胞の性決定と増殖に関して、*C. elegans* の DAZ 相同タンパク質 DAZ-1 と重複した機能を持つと考えられる。今後、CPB-3 がどのような mRNA に結合して機能するかの知見を得ることは、これらのタンパク質が制御する動物の配偶子形成の分子機構の理解をさらに深めるために重要である。

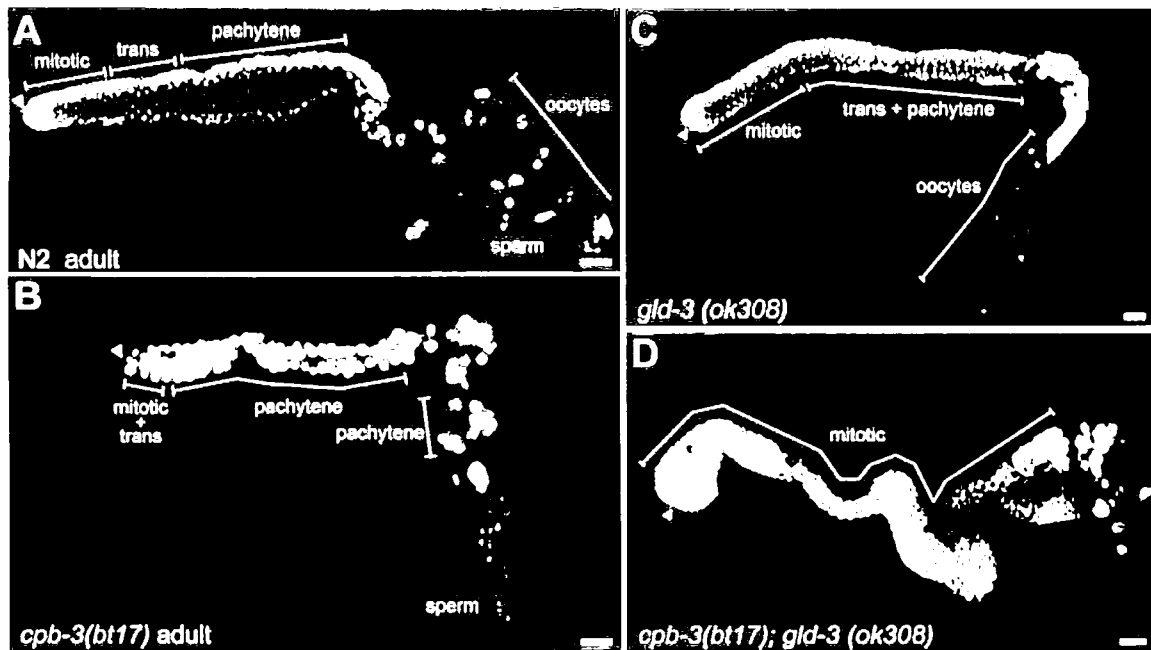


図 2. *cpb-3* 遺伝子の変異による配偶子形成異常

各株から切り出した生殖腺の DAPI 染色像。受精卵をえさのない状態で孵化させることで 1 齢幼虫期の途中で発生を停止させた後、25°C で約 72 時間飼育した。(A) 野生型 N2 株、(B) *cpb-3(bt17)* 変異体、(C) *gld-3(ok308)* 変異体、(D) *cpb-3(bt17); gld-3(ok308)* 変異体。矢頭: distal tip, スケールバー: 20um