

## 論文内容の要旨

論文題目: 線虫 *C. elegans* の生殖細胞の性決定における *Deleted in Azoospermia* 相同遺伝子の役割

The role for the *C. elegans* orthologue of *Deleted in Azoospermia* in germ cell sex determination

氏名 : 鴻 宗義

卵子と精子が融合して次世代の新しい生命を作る有性生殖は、多細胞動物が種を維持するために必須の過程である。有性生殖で見られる2つの重要な現象として、①DNA合成を伴わない2回の連続した分裂により生殖細胞の染色体構成が2倍体から1倍体になる減数分裂と、②卵子になるか精子になるかの運命を選択し、未分化の生殖細胞が形態変化を行い卵子や精子を形成する配偶子形成がある。これらは非常に複雑で劇的なプロセスであるが、この過程を制御する分子機構には解明されていない点が多く、さらなる解析が必要である。

*Deleted in Azoospermia* (DAZ) ファミリータンパク質は多細胞動物で広く保存されたRNP型RNA結合タンパク質であり、標的mRNAの翻訳を促進することで配偶子形成を実現させると推測されている。しかし、DAZファミリータンパク質の具体的な生理的、分子的機能に関しては未だ明らかでない点が多い。このファミリーをコードする遺伝子として最初に同定されたDAZ遺伝子は、ヒト無精子症患者の多くで欠失が見られるY染色体DAZ領域に見出された遺伝子の1つである。DAZ遺伝子と相同な遺伝子は、多くのセキツイ動物、ショウジョウバエ、線虫 *C. elegans* といった多岐にわたる動物種で見出されている。そのため、DAZファミリー遺伝子の機能解析を進めることで、配偶子形成を司る分子機構の動物間で保存された局面を明らかにできると期待される。

*C. elegans* の *daz-1* 遺伝子は、*C. elegans* のゲノムがコードする唯一のDAZ相同遺伝子である。*daz-1* 遺伝子の働きは他の多くの動物種とは異なり、雌の配偶子形成(卵形成)には必要であるが、雄の配偶子形成(精子形成)には必要でない。*daz-1* 変異体雌雄同体は、染色体の異常凝縮、卵形成時特有の生殖腺の細胞質の蓄積が起こらない、核小体の縮小といった異常を卵形成時に示し、最終的には減数分裂第一分裂前期パキテン期以降への進行が阻害されて不妊となる。DAZ-1タンパク質は、雌雄同体生殖腺

で生殖細胞が体細胞分裂を行う部位から減数分裂に移行する部位、そして減数分裂の初期を行う部位にかけて発現する。これらのことは、DAZ-1 タンパク質が減数分裂の開始から初期にかけての過程で重要な働きを持つことを示唆する。しかし、DAZ-1 タンパク質がどのような mRNA に結合して卵形成に寄与しているかは、他の DAZ ファミリータンパク質の場合と同様に未知であった。

本研究では、まず *C. elegans* の近縁線虫種 *C. briggsae* および *C. remanei* から DAZ 相同遺伝子 (*Cb-daz-1* および *Cr-daz-1*) を同定した(図1)。予測アミノ酸配列の比較の結果、標的 RNA と結合すると考えられる RRM ドメインは3 種間で高い相同性を示した。しかし、タンパク質全体の一次構造は多様化しており、特に RRM ドメインより C 末端側の領域では大きな差異があった。進化速度が速い DAZ ファミリー遺伝子の特質が、3 種の線虫間でも見られたことになる。

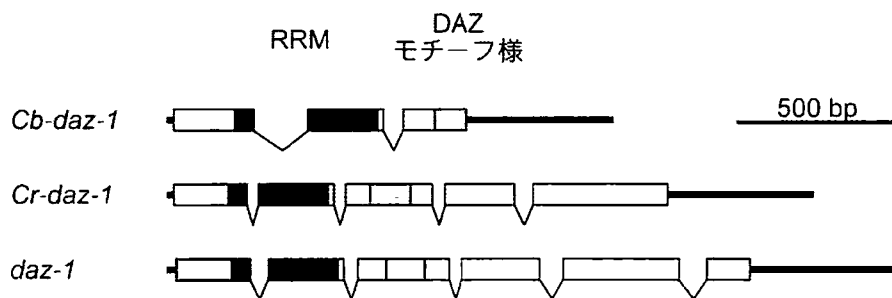


図1 *C. elegans* と近縁線虫種における *daz-1* 遺伝子

次に、各々の線虫種の DAZ 相同遺伝子の機能を RNA 干渉法により阻害することで検討した。*Cr-daz-1* の RNA 干渉を行った *C. remanei* の雌の生殖腺は、*C. elegans* の *daz-1* 変異体と同様に、卵形成の減数分裂の進行がパキテン期で停止し不稔となる表現型を示した(図2)。一方、*Cb-daz-1* の RNA 干渉を行った *C. briggsae* の雌雄同体の生殖腺は、成虫になっても卵形成を行えずに精子のみを形成のみを続けるために不稔となる表現型を示した(図2)。この *Cb-daz-1(RNAi)* の表現型は Mog (Masculinization of germline: 生殖腺の雄化) 表現型と呼ばれ、一般に生殖細胞の性決定の不全によるものである。

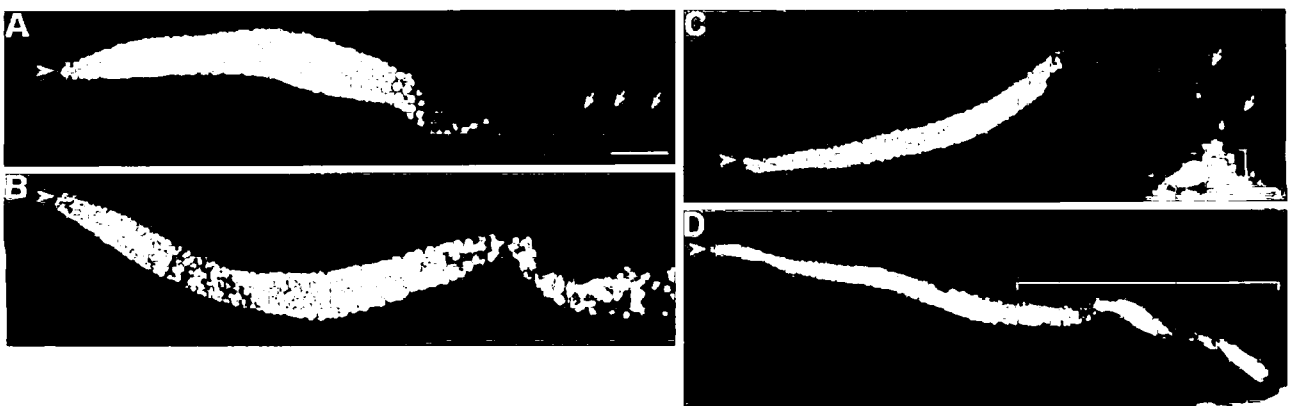


図2 *Cr-daz-1(RNAi)* および *Cb-daz-1(RNAi)* の表現型 (切り出した生殖腺の DAPI 染色)  
 A) *C. remanei* 野生型雌、B) *C. remanei* *Cr-daz-1(RNAi)* 雌、C) *C. briggsae* 野生型、D) *C. briggsae* *Cb-daz-1(RNAi)* 雌雄同体。矢印は卵子の核、かっこ内は精子の核をそれぞれ示す。A と B、C と D がそれぞれ同じ縮尺である。バー; 50 $\mu$ m (以下の図でも同様)。

*C. briggsae* での知見に基づき、*C. elegans* の *daz-1* も生殖細胞の性決定に関与するかどうかを、遺伝学

的かけ合わせ実験により検証した。*fem-3(q20)*変異は、*fem-3* 遺伝子の機能獲得型の高温感受性変異であり、許容温度 15°C ではほぼ正常であるが、制限温度 25°C では Mog 表現型を示し不稔となる。*daz-1(tj3); fem-3(q20)*二重変異体を作製したところ、*fem-3(q20)*変異の許容温度 15°C でも Mog 表現型を示した(図3)。この制限温度の低下は、*C. elegans* の *daz-1* 遺伝子も生殖細胞の性決定に関与していることを示している。また、15°C ですでに卵形成への切り替えが起きた後の *fem-3(q20)*変異体の成虫個体に *daz-1* 遺伝子の RNA 干渉を行ったところ、卵形成を停止して精子形成を再開した。このことは、*daz-1* 遺伝子が個体の発生段階に関わらず卵形成を維持し精子形成を抑制するように機能することを示している。*daz-1(tj3)*変異体での精子形成の様子を経時的に観察したところ、対照と比べて *daz-1(tj3)*変異体では精子形成の終結が遅れることが見られた。従って、*daz-1* 変異単独でも確かに精子形成から卵形成への切り替えに欠損を生じた。

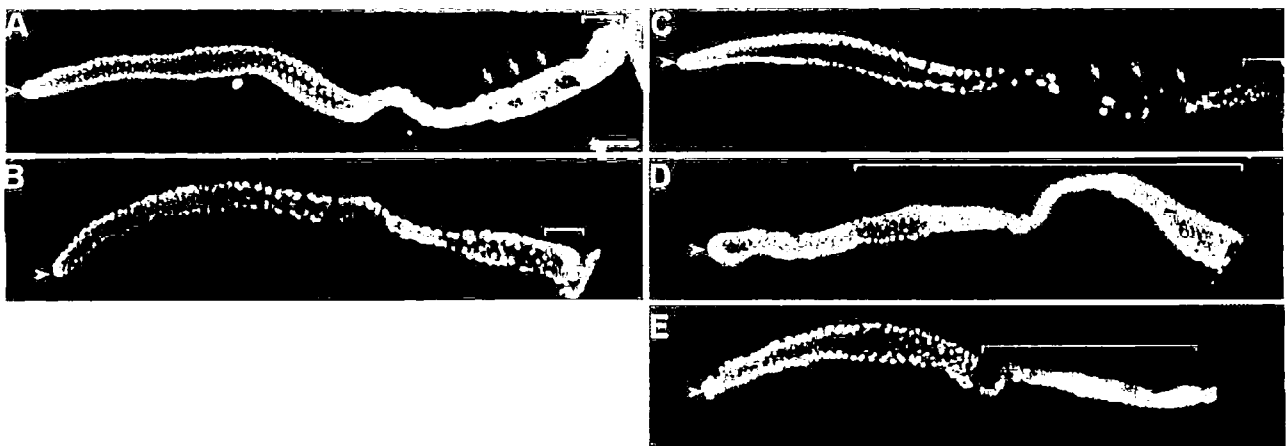


図3 *daz-1* 変異による合成的な生殖腺の雄化(切り出した生殖腺の DAPI 染色)

A)野生型 N2 雌雄同体、B)*daz-1(tj3)*雌雄同体、C)*fem-3(q20)*雌雄同体 15°C、D)*fem-3(q20)*雌雄同体 25°C、E)*daz-1(tj3); fem-3(q20)*雌雄同体 15°C。矢印は卵子の核、括弧内は精子の核をそれぞれ示す。

本研究者の所属する研究室では、*fbf-1/-2* (*fbf*と総称) 遺伝子の mRNA が DAZ-1 タンパク質の標的として同定されており、*daz-1* 変異体で FBF タンパク質の総量が減少することが示唆されていた。*fbf*がコードする FBF タンパク質は、そもそも雌雄同体の生殖腺で *fem-3* mRNA と結合することで *fem-3* 遺伝子の活性を抑制し、精子形成を抑制して卵形成を行わせる因子として同定された。抗 FBF 抗体を用いたウェスタンブロット実験を行い、FBF タンパク質の発現量を野生型と *daz-1* 変異体とで比較した。その結果、*daz-1* 変異体での FBF タンパク質の発現量の減少が、精子形成から卵形成への切り替えが起きる L4 幼虫期に起きていることが再現性良く確認された。(図4)。さらに、ノザンブロットによる *fbf* mRNA 量の比較では、野生型と *daz-1(RNAi)* 個体で *fbf* mRNA の量に差は見られなかった(図4)。よって、*daz-1* 遺伝子は *fbf* mRNA の翻訳制御を介して FBF タンパク質の発現を促進していると考えられる。

生殖細胞の性決定において *fbf* と対立して機能する遺伝子として、*gld-3* 遺伝子が知られている。*daz-1; gld-3* 二重変異体を作製し表現型を観察したところ、*daz-1* 単独変異体ではほとんど観察されない成熟した卵子様の細胞が存在した(図5)。この卵子様の細胞は、成熟した卵子で特異的に発現する OMA-2 タンパク質を発現していたことから、正常な卵子に近い状態にある。*fbf* と対立して働く遺伝子 *gld-3* の阻害により *daz-1* 変異体の卵形成が部分的に回復したことは、*daz-1* 遺伝子による FBF の発現促進が卵形成にとって重要であることを意味している。

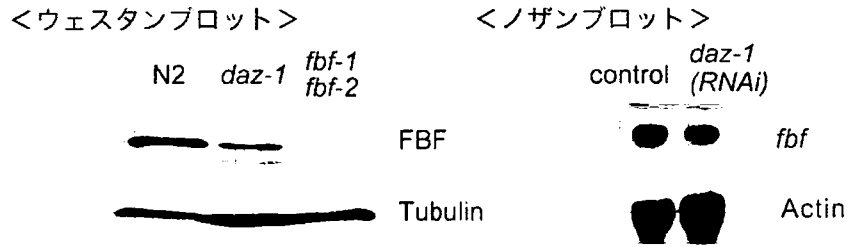


図4 FBF タンパク質のウェスタンブロットおよび *fbf* mRNA のノザンブロット

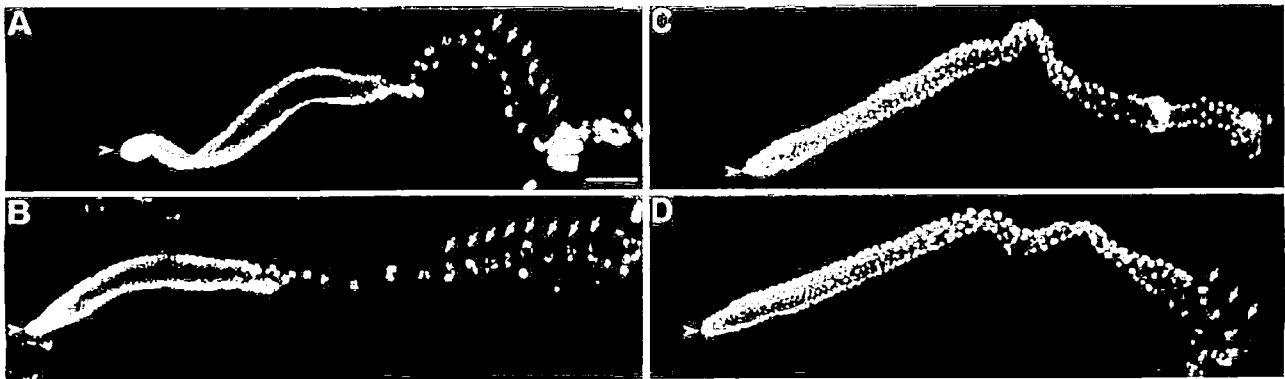


図5 *gld-3* 変異による卵形成不能の部分的な回復 (切り出した生殖腺の DAPI 染色)  
 A)野生型 N2 雌雄同体、B)*gld-3(ok308)*雌雄同体、C)*daz-1(tj3)*雌雄同体、D) *daz-1(tj3) gld-3(ok308)*  
 雌雄同体。矢印は卵子の核を示す。

以上の結果から、*C. elegans* の *DAZ* 相同遺伝子である *daz-1* が生殖細胞の性決定に関与し、精子形成から卵形成への切り替えを促進する方向に働くことが明らかとなった。また、*daz-1* 遺伝子が精子形成から卵形成への切り替えを司る FBF タンパク質の発現を翻訳制御により促進することも示唆された。すなわち、*daz-1* 遺伝子は FBF タンパク質の発現を促進することによって、生殖細胞の性決定に関与していると推察される。

*fbf* 遺伝子よりも下流の性決定経路に *daz-1* 変異が影響を及ぼしているかの検証はまだできていない。*fbf* 遺伝子が発現を抑制する性決定因子として、*fem-3*、*fog-1*、*fog-3* が同定されている。これらの発現にも *daz-1* 変異が影響を及ぼすのかどうかを確認する必要がある。DAZ-1 タンパク質のどのような分子活性が翻訳促進を実現しているかも、まだ不明である。これまでに、DAZ ファミリータンパク質の作用機序としてはポリアデニル鎖結合タンパク質 (PABP) との結合を介してであるということや、標的 mRNA のポリソーム画分への局在を促しているということが提唱されている。*C. elegans* DAZ-1 がこのような機構を通じて作用しているのか、あるいは他の別の分子機構を介しているのか明らかにすることに意義があるだろう。