

氏 名 野口 浩毅

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1057 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 **Studies on localization mechanisms of the maternal  
*pos-1* mRNA in *Caenorhabditis elegans* embryos**

論文審査委員 主 査 教授 桂 勲  
教授 廣瀬 進  
教授 城石 俊彦  
助教授 川上 浩一  
チームリーダー 杉本 亜砂子(理化学研究所)

## 論文内容の要旨

多くの多細胞生物において、受精直後の初期発生は主として母性遺伝子によって制御されている。母性遺伝子の産物は母性 mRNA や母性タンパク質の形で卵母細胞に蓄えられ、特定の時期に、特定の割球で機能を発現して個々の細胞に独自の性質を与える。この母性遺伝子の時空間的発現制御機構の一つとして mRNA の局在化が多くの動物で観察されており、母性遺伝子の発現制御上、重要な働きをしている事が示唆されているが、その詳細な機構については不明な点が多い。

本研究では線虫の母性 mRNA である *pos-1* mRNA の局在化機構の解明を目指した。母性胚性致死遺伝子である *pos-1* 遺伝子の mRNA は卵母細胞内には一様に分布するが、受精後第一卵割中に後極へ局在化を始める。線虫では生殖細胞系譜へ局在化する母性 mRNA が他にも知られているが、それら mRNA の多くは 4 細胞期以降に局在を開始しており、*pos-1* mRNA の局在にはそれらとは異なる独自の制御機構が働いている事が期待される。また、POS-1 タンパク質は *pos-1* mRNA の局在開始と同じ時期に発現し始め、その発現が後極に局在していることから、*pos-1* mRNA の局在は POS-1 タンパク質の局在をも制御している事が期待される。

本研究を始めるにあたり、まず 10-15 匹程度の線虫を対象とした再現性の高い少数胚 *in situ* hybridization のプロトコルを確立した。本研究では RNA を顕微注入した個体等、ごく少数のサンプルを解析したため、少数の胚を再現性良く染色出来る *in situ* hybridization のプロトコルの確立は必要不可欠であった。

続いて、シス因子解析のために内在性 *pos-1* mRNA の局在パターンを再現出来る *in vivo* assay 系を構築する事にした。この *in vivo* assay 系として、まず *in vitro* で合成したレポーター RNA (タグ配列と検討対象の 3' UTR など遺伝子配列を含む) を顕微注入し、その後の局在パターンを *in situ* hybridization で調べる方法を試みた。この結果、レポーター RNA は *pos-1* の 3' UTR 依存的に分解されるという意外な現象を見出した。レポーター RNA の分解は *pos-1* 3' UTR に特異的な現象で、また、レポーター RNA の分解は NMD 経路に依存しなかった。これらの結果と、レポーター RNA の分解が *pos-1* mRNA の局在化や翻訳が開始する 1 細胞期中に起こる事から、レポーター RNA 分解活性は内在性 *pos-1* mRNA の転写後調節の一端を反映している事が示唆されたが、しかし、胚全体で 1 細胞期に分解される点は内在性 *pos-1* mRNA の挙動と違っており、この系では内在性 *pos-1* mRNA の局在パターンを再現出来なかった。

次に *in vivo* assay 系として試したのが、形質転換体にタグ配列と *pos-1* 配列の融合 mRNA を発現させ、その局在パターンを *in situ* hybridization で調べる方法である。通常、線虫で外来遺伝子を母性発現させる事は困難なため、まず、外来遺伝子を母性発現させる事に適した形質転換法の biolistic transformation 法を習得した。また、biolistic transformation 法は効率が悪く、時間がかかる事で知られていたが、条件検討を行い、世界的に見ても非常に高い効率で形質転換体を獲得出来る条件を見つけた。さらに、初期胚で mRNA の存在量が多い事が知られている *pos-1* 遺伝子の promoter を利用した、発現量の多い母性発現用プラスミドを開発し、従来の発現プラスミドでは発現量の少なさから不可能だった、内在性 *pos-1* mRNA の局在パターンの再現を可能にした。以上の技術開発を行った後、形質転換

体を用いる方法が内在性の *pos-1* mRNA の局在パターンを再現出来るか調べるため、GFP::*pos-1* 3 UTR 融合 mRNA を発現する形質転換体を獲得したところ、GFP 融合 mRNA は 2 細胞期には生殖細胞系譜へ局在化しており、この系では内在性 *pos-1* mRNA の局在パターンを再現出来る事が分かった。その後の解析で、GFP 融合 mRNA 上の他の配列(SL1、*pos-1* 5' UTR、GFP、3 Linker 配列)には GFP 融合 mRNA の局在化に十分な活性が無い事、*pos-1* 3' UTR 配列は GFP 融合 mRNA の局在化に必要な事が分かった。以上の結果から、この形質転換を用いる方法が *in vivo* assay 系として *pos-1* mRNA の局在化活性の評価に使える事が分かった。また、*pos-1* mRNA の局在化において 3' UTR 配列が主要な制御配列として働いている事が強く示唆された。

そこで、次にこの *in vivo* assay 系を用いて *pos-1* 3' UTR による局在化制御機構についてくわしく調べる事にした。*pos-1* 3' UTR に対して deletion 解析を行った結果、3 側 122nt を欠失させると局在化活性が失われる事、5 側 140nt を欠失させても内在性 *pos-1* mRNA と同様に局在化する事が分かった。

更に比較ゲノム科学的な観点からも *pos-1* 3' UTR を解析した。近縁線虫の *C. briggsae* と *C. elegans* の間では *pos-1* 3' UTR 配列が保存されている事が知られており、*C. briggsae* の 3' UTR も mRNA の局在化活性を示す事が期待された。そこで、*C. briggsae* の内在性 *pos-1* mRNA の局在について調べた所、*C. briggsae* においても *pos-1* mRNA は *C. elegans* 同様、生殖細胞系譜へ局在化している事が分かった。また、*C. elegans* に GFP::*Cb pos-1* 3' UTR 融合 mRNA を発現させた所、この融合 mRNA は *C. elegans* の内在性 *pos-1* mRNA 同様の局在パターンを示した。この事は *C. elegans* と *C. briggsae* の間で *pos-1* mRNA の局在化シス因子が保存されている事を強く示唆している。*C. elegans* において mRNA の局在に必要な事が分かった 3 側の 122nt の領域には種間で完全に保存された 30nt の配列が存在しており、この配列内に mRNA 局在化制御のシス因子が存在する事が期待される。

トランス因子については、母性致死、母性不妊変異体の内、RNA 結合タンパク質をコードする事が知られているものを対象とした小規模なスクリーニングを行い、*mex-5*, *mex-5*; *mex-6* 変異体で初期胚における *pos-1* mRNA の局在が異常になる事が分かった。初期胚において、MEX-5 タンパク質は *pos-1* 遺伝子産物とは逆に体細胞系譜へ局在化する。この時期、体細胞系譜では *pos-1* mRNA が分解されており、MEX-5 タンパク質は *pos-1* mRNA の分解を直接、又は間接的に制御して *pos-1* mRNA を局在させていると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

動物の初期発生は、受精前に合成された母性の mRNA やタンパク質によって制御される。したがって、細胞分裂により生じた割球が互いに異なる運命をたどるためには、これらの mRNA やタンパク質の局在化が、割球特異的な翻訳や翻訳後修飾と並んで、重要な役割を果たすと考えられる。この中で mRNA の局在化は、さまざまな生物の発生で重要なことはわかっているが、その機構はまだ十分には解明されていない。

線虫 *C. elegans* では初期胚で局在化した分布を示す mRNA はそれほど多くないが、*pos-1* 遺伝子の mRNA はその中の 1 つである。この mRNA は、卵母細胞中では一様に分布し、2 細胞期からは生殖系列を生じる割球に局在する。野口浩毅君はこれに注目し、そのメカニズムを解明しようと考えた。*pos-1* mRNA が他の多くの母性 mRNA と異なって局在化した分布を示すには、mRNA 上の特定のシス配列と、そこに働くトランスの因子があるはずだと考え、それらを探索するという方針をとった。まず最初に、試験管内でレポーターとなる RNA を合成し、これを卵巣に顕微注入して *in situ* hybridization により、初期発生での運命を追跡した。すると、RNA が *pos-1* の 3' UTR を含む場合にのみ、第 1 卵割期に分解されることがわかった。これは *pos-1* 3' UTR に特異的な現象として興味深いが、生体内での実際の現象を再現していない。野口君は、おそらく RNA が核内で合成されることなく、いきなり細胞質内に注入されたためのアーティファクトと考えた。

そこで、野口君はレポーター DNA を導入したトランスジェニック線虫を作り、そこから合成される RNA を追跡することに方針を転換した。しかし、線虫で遺伝子導入に通常使われている顕微注入法では、多数の遺伝子がタンデムにつながった状態で導入されるため、導入遺伝子の転写が生殖系列で強く抑制されてしまう。これを考慮して、野口君は、遺伝子が少数のコピーとして導入される particle gun 法を選択した。この方法は効率が悪く時間もかかるが、野口君はさまざまな条件を検討して遺伝子導入の効率を上げ、また短時間が結果が得られるように実験法を改良して研究を行った。その結果、導入した GFP::*pos-1* 3' UTR 融合遺伝子が、*pos-1* 3' UTR に依存して 2 細胞期から生殖系列を生じる割球に局在することがわかった。そこで、この実験系を使って *pos-1* mRNA 局在化に関わるシス配列の同定するための実験を行った。その結果、(1) *pos-1* 3' UTR の 3' 側 122 ヌクレオチドは必要だが 5' 側 174 ヌクレオチドは不要なこと、(2) *C. elegans* の近縁種である *C. briggsae* の *pos-1* 3' UTR も、*C. elegans* に導入した時に RNA 局在化を起こす機能をもつこと、を明らかにした。*C. elegans* の *pos-1* 3' UTR の 3' 側 122 ヌクレオチドには、近縁種である *C. briggsae* と *C. remanei* でも完全に保存された 30 ヌクレオチドの配列があり、これが局在化のシス配列である可能性が示唆された。次に野口君は、局在化に働くトランスの因子を同定するために、初期発生で働く様々な RNA 結合タンパク質の変異体で *pos-1* mRNA の局在化を調べた。その結果、*mex-5* 変異体で *pos-1* mRNA の局在が異常になることがわかり、MEX-5 タンパク質がトランス因子として直接 *pos-1* mRNA の 3' UTR に働くか、あるいは間接的に局在化を制御することが示された。

このように、野口君は、*C. elegans* の母性 mRNA 局在化の研究を行うことのできる実験系を確立し、局在化のシス配列が *pos-1* 3' UTR の 3' 側 122 ヌクレオチドに存在すること、*mex-5* 遺伝子が局在化の制御に関わっていることを発見した。これは、線虫の母性 mRNA

の局在化メカニズムに関する最初の発見であり、優れた成果を挙げたと言える。またこの過程で、野口君は particle gun 法による遺伝子導入の改良を行っただけでなく、少数の胚で *in situ* hybridization を行うための方法も改良し、生殖系列で強い発現を行うプロモーターを見つける等、様々な実験技術の改良を行った。これらは、野口君が独立した研究者として研究を行える力量を示すものと言える。以上の理由で、審査委員会は全員一致で、この博士論文が博士号取得に十分であるとの結論に達した。