

氏 名 杉森 聖子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2016 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 ショウジョウバエ始原生殖細胞における母性 Nanos タンパク質  
の新規機能の同定

論文審査委員 主 査 教授 吉田 松生  
教授 高田 慎治  
教授 新美 輝幸  
教授 向 正則 甲南大学 理工学部  
教授 小林 悟 筑波大学 生命領域学際研  
究センター

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

In *Drosophila*, a specialized cytoplasm, or germ plasm localized in the posterior pole region of early embryos is partitioned into the primordial germ cells (PGCs). Germ plasm contains the maternal factors required for germline development. One of the maternal factors, *nanos* (*nos*) mRNA encodes an evolutionarily conserved CCHC-type zinc finger protein that plays an essential role in germline development in various animal species. Maternal Nos protein is partitioned into PGCs and remains detectable in these cells throughout embryogenesis. In PGCs, Nos is required to repress somatic differentiation, and to induce germline development. Previous studies have demonstrated that Nos, along with Pumilio (Pum), acts as a translational repressor for specific RNA targets by binding to their 3' untranslated region (3' UTR). However, little is known about the targets of maternal Nos in PGCs. The preliminary result in my laboratory suggests that *CG32425* 3'UTR acts as an RNA region that enhances protein production from mRNA that contains it in normal PGCs, but not in PGCs lacking maternal Nos (*nos* PGCs). Since this result was in contrast to the prevailing role of Nos, which binds to the 3' UTR of target mRNAs to repress their protein production in PGCs, I focused on the role of *CG32425* 3'UTR.

1) *CG32425* 3'UTR mediated Nos-dependent upregulation of RNA and protein expression in PGCs

I generated a fusion gene, which carries *CG32425* 3'UTR at a location downstream of EGFP-coding region (*UAS-EGFP-CG32425 3'UTR*). This fusion gene was transcribed in PGCs by using Gal4/UAS system, and EGFP protein expression was examined in PGCs of late embryos (stage 12-15). I found that EGFP expression from *UAS-EGFP-CG32425 3'UTR* was much lower in *nos* PGCs than in normal ones. Furthermore, mRNA expression from *UAS-EGFP-CG32425 3'UTR* was significantly reduced in *nos* PGCs compared to normal ones. Therefore, it is reasonable to conclude that *EGFP-CG32425 3'UTR* mRNA is stabilized in PGCs in a Nos-dependent manner via its 3' UTR.

2) Identification of regions required for Nos-dependent upregulation of RNA and protein expression in *CG32425* 3'UTR

*CG32425* 3' UTR was deleted to produce three regions, R1, R2, and R3, and these regions were tested for their effects on RNA and protein expression in the EGFP-reporter assay system described above. RNA and protein expression from *UAS-EGFP-R3* was reduced in *nos* PGCs, compared with that in normal PGCs. In contrast, RNA and protein expression from *UAS-EGFP-R1* and *-R2* were slightly higher in *nos* PGCs than in normal ones. In R3, four Nos-binding sites were present, and only one Pum-binding site that overlapped partially with one of the four Nos-binding sites was observed. The above observations suggest that R3 is required for Nos-dependent RNA stabilization in PGCs.

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

### 3) Expression of endogenous *CG32425* mRNA and its protein product in PGCs

*CG32425* mRNA was distributed throughout cleavage and syncytial blastodermal embryos at stage 4. RNA signal rapidly decreased in the somatic region, but was enriched in PGCs of cellular blastodermal embryos at late stage 5. During the rest of embryogenesis, the signal remained detectable in PGCs. *CG32425* protein expression was almost undetectable in PGCs from embryonic stages 4 to 8. The protein expression was later increased in PGCs from stage 9 until the end of embryogenesis. In contrast, in *nos* PGCs, expression of *CG32425* mRNA and its protein product was much lower than that observed in normal ones. Considering that predominantly-expressed *CG32425* mRNA in PGCs was maternal in origin, these observations strongly suggest that maternal Nos stabilizes maternal *CG32425* mRNA in PGCs, which in turn causes expression of its protein product in these cells. However, in this study, I failed to clarify the role of *CG32425* in PGCs.

### 4) Endogenous *ovo* mRNA is stabilized by Nos in PGCs

Maternal *ovo* is known to be essential for PGC development. *ovo* mRNA, like *CG32425* mRNA, is maternally supplied and is enriched in PGCs to produce Ovo protein in these cells. Moreover, *ovo* 3'UTR contains Nos-binding sites. In the absence of maternal Nos, expression of *ovo* mRNA and its protein product was significantly reduced in PGCs, compared with that in normal ones. These observations suggest that *ovo* mRNA is stabilized in PGCs in a Nos-dependent manner. Thus, I speculate that maternal Nos stabilizes *ovo* mRNA to supply its protein product in PGCs, that is essential for germline development.

This study provides the first evidence that supports a role for Nos in stabilizing RNA in PGCs. Thus, I propose that Nos protein has dual functions in translational repression and stabilization of specific RNAs to ensure proper germline development. My data provides the first step toward elucidating the novel function of maternal Nos in germline development of various animals.

生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞である。ショウジョウバエの生殖細胞は、初期胚に形成される始原生殖細胞に由来する。始原生殖細胞は、胚の後端に位置する極細胞質を取り込むように形成される。極細胞質中には生殖細胞の発生に必要な十分な母性因子が含まれており、生殖系列特異的な遺伝子の発現を活性化させる機能を持つと考えられてきた。極細胞質に含まれる母性因子の一つである母性 *nanos* mRNA がコードする母性 Nanos (Nos) タンパク質は、CCHC 型の Zn フィンガーモチーフを有する RNA 結合タンパク質であり、母性 Pumilio (Pum) タンパク質と共に、標的 mRNA の 3'UTR に結合し、その翻訳を抑制することが知られていた。母性 Nos タンパク質は、このような翻訳抑制機構を介して、生殖細胞分化の促進を行っていると考えられてきたが、母性 Nos タンパク質の標的 mRNA は十分に明らかになっていない。母性 Nos タンパク質の標的 mRNA を同定するため、Pum タンパク質と結合する 43 種類の mRNA の 3'UTR を EGFP コード領域の下流に結合し、その mRNA を始原生殖細胞中で転写させ EGFP タンパク質の発現を解析したところ、6 種類の mRNA の 3'UTR を有する場合には、母性 Nos タンパク質依存的に EGFP タンパク質の発現が減少することが明らかにされた。この結果は、母性 Nos タンパク質により mRNA の翻訳が抑制されていることを示唆している。しかし、この先行研究では、予想に反して、母性 Nos タンパク質依存的に EGFP タンパク質の発現が上昇する 1 種類の 3'UTR が同定された。本研究では、母性 Nos タンパク質の新たな機能に迫れると予想し、*CG32425* 3'UTR に注目し、以下の解析が行われた。

第一に、先行研究の結果の再現性を確認した。*CG32425* mRNA の 3'UTR を EGFP をコードする領域の下流に結合し、後期胚の始原生殖細胞において融合遺伝子を Gal4/UAS システムを用いて転写させた。*CG32425* 3'UTR を結合させた場合、正常胚と比べて、*nos* 変異胚で EGFP タンパク質の発現が著しく低下していた。さらに、正常胚に比べて *nos* 変異胚では mRNA の発現も顕著に低下していた。この融合遺伝子の転写には Gal4/UAS システムが用いられており、正常胚と *nos* 変異胚の間で転写レベルの差は観察されない。以上の結果は、始原生殖細胞内において母性 Nos タンパク質は、*CG32425* 3'UTR を介して mRNA の転写後調節、すなわち安定化に寄与していることを強く示唆している。

第二に、同様の EGFP レポーターアッセイを用いて、*CG32425* 3'UTR の 3'側 211bp の領域が mRNA の安定化に関わることを明らかにした。この領域には 4 つの Nos 結合配列が存在し、1 つのみ存在する Pum 結合配列は Nos 結合配列とオーバーラップしていた。

第三に、始原生殖細胞に取り込まれる内在性の母性 *CG32425* mRNA も母性 Nos タンパク質により安定化されることを明らかにした。しかし、始原生殖細胞における母性 *CG32425* の役割を RNAi 法を用いて明らかにすることはできなかった。

最後に、始原生殖細胞内で母性 Nos タンパク質が安定化する *CG32425* mRNA 以外の母性 mRNA を探索したところ、母性 *ovo* mRNA も母性 Nos により安定化されることが明らかとなった。この mRNA は、Zn フィンガーモチーフを有する転写因子をコードしており、始原生殖細胞内において生殖系列遺伝子の発現活性化の機能を有し、始原生殖細胞の発生に必要であることが報告されている。この結果は、母性 Nos タンパク質が、生殖系列遺伝

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

子の発現活性化に関わるタンパク質をコードする mRNA を安定化させることで生殖細胞分化の促進を行っていると考えられる。

Nos タンパク質の新たな機能を見出した本研究は、始原生殖細胞内における mRNA 安定化機構の研究の基盤となると考えられ、基礎生物学専攻の博士に値することが全員一致で合意された。