

氏名	田原浩昭
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第213号
学位授与の日付	平成8年3月21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4条第1項該当
学位論文題目	C. elegans初期胚においてmRNAが生殖系列に局在化する母性遺伝子pos-1の研究
論文審査委員	主査教授 中辻憲夫 教授 廣瀬進 教授 桂勲 助教授 林茂生 名誉教授 岡田益吉（筑波大学）

## 論文内容の要旨

*C. elegans* の卵は受精後に不当分割を行い、体細胞系創始細胞のAB割球、生殖系列のP1割球を生じる。P1割球はその後3回幹細胞様の分裂をおこない、EMS, C, Dの3種の体細胞系創始細胞と生殖系列の前駆細胞P4を生ずる。これらの割球の運命決定は卵割に伴って局在化する母性因子（いわゆるデターミナント）と細胞間相互作用の両方によることが示唆されているが、そのデターミナントの実態は明らかになっていない。そこで、デターミナントの候補として初期胚の卵割に伴って局在化する母性mRNAを探索してその解析を行った。

卵割に伴って局在化する母性因子も含めて、*C. elegans* の胚発生における遺伝子発現パターンの効率的なスクリーニングを行うために、cDNAプロジェクトの一部としてwhole mountでの *in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて発現パターンを大量解析する方法を開発した。試行実験としてcDNAプロジェクトで集めたクローンから独立のクローンをランダムに約100種選び、対応するmRNAの分布を調べた。その結果おおよそ15クローンに1種の割合でステージ特異的又は細胞系譜特異的な発現パターンが得られた。

そのスクリーニングによって、第1卵割に伴って、mRNAが生殖系列の後割球P1へ移動し、4細胞期以降は非対称な分解によってmRNAが生殖系列割球P2, P3, P4へと局在化する母性遺伝子を発見し、*pos-1*と命名し解析を行った。中期や後期の胚ではmRNAの発現は確認されなかった。生殖巣においては、*pos-1*のmRNAは減数分裂に入る前のdistal領域では発現しておらず、減数分裂が始まる領域付近から発現が始まっていた。卵母細胞では一様に分布していることが確認された。ノーザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、転写産物の長さは約1.3kbであった。

cDNAの全長塩基配列の決定を行った結果、*pos-1*遺伝子は真核生物の *Tis 11* 様の zinc finger 構造をもっていることを明らかにした。*Tis 11*（別名 *Nup475*）は培養細胞においてFGFやTPAによって極めて初期に誘導される遺伝子であり、その蛋白は核に位置する。*pos-1*蛋白に対する抗体を作成して蛋白産物の分布を調べたところ、1細胞期では発現が確認されず、2細胞期以降でmRNAが存在する細胞と同じ生殖系列細胞において発現が見られた。しかし、予想に反して細胞質における蛋白の発現が確認された。

*pos-1*の機能を調べるために対応する突然変異体を探すことにした。まず*pos-1*のマッピングを行い、5番染色体の *her-1* の近くに位置することがわかった。そして、その近傍に位置する母性突然変異体で、まだ遺伝子のクローニングが成功していなかった *skn-2* に着目した。*skn-2* は生殖細胞が欠損する表現型を示す。そして *skn-2* の3つの突然変異について塩基配列解析を行った結果、*pos-1* のN末端領域よりの最初の zinc finger 領域に突然変異をそれぞれ見つけ、*skn-2* は *pos-1* の突然変異体であることを明らかにした。

*skn-2* の表現型を確かめるために、生殖顆粒を認識するモノクローナル抗体を用いて抗体染色を行った。その結果、*skn-2* の後期胚では染色が確認されなかった。それに対して、表皮のキューティクルの蛍光染色を行った結果、*skn-2* においても表皮は分化していることが示唆された。

*pos-1* と類似した zinc finger 構造を持っている *pie-1* も生殖細胞が欠損する表現型を示し、その蛋白は核に位置することが知られている。又、初期胚において接合体型の発現をする

遺伝子で、すべての体細胞系列で発現するが生殖系列では発現しないものとして *pes-10* や *4-3* などが知られている。*pie-1* の直接の機能として、これらの接合体型の遺伝子の転写を生殖系列の核内において抑制している可能性が示唆されている。*skn-2* と *pie-1* の間には、生殖細胞形成についての遺伝学的相互作用があることが報告されていることから、*pos-1* も接合体型の発現をする遺伝子の転写を生殖系列で抑制しているのかどうかを *in situ* ハイブリダイゼーションによって解析した。しかしながら、*4-3* の mRNA は、野性型の胚と同様に *skn-2* の胚においても生殖系列においての発現は確認されなかった。*pos-1* と *pie-1* の蛋白の細胞内分布も異なることから、*pos-1* は *pie-1* と異なった機能を持っていると考えられる。

以上の結果から、*pos-1* は生殖細胞の運命決定に関与する別の遺伝子の母性 mRNA の安定性又は翻訳制御に携わっているという仮説を立てた。

## 論文の審査結果の要旨

田原浩昭君の博士論文は線虫 *C. elegans* の胚発生において生殖細胞が分化する後端部位に局在する母性 mRNA を発見しその構造を明らかにして *pos-1* と命名したことと、その機能を知るために生殖細胞の形成異常を引き起こす複数の突然変異体との関係を詳細に解析したことが主な内容である。

田原君は当初から生殖系列細胞の分化決定にかかわる遺伝子の同定を目指して、後端部位の割球分離などの実験を行っていたが、所属する研究室で進められている cDNA ライブラリープロジェクトで多数列挙されつつあった cDNA のうち生殖系列細胞に局在するもののスクリーニングを行った。このために田原君は様々な発生段階の胚での *in situ* ハイブリダイゼーションについてこれまで線虫では困難であった多数の資料を効率良く解析する手法の開発を行い、これに成功した。この新たな方法を主な内容とする論文は現在欧文国際誌に投稿中である。

次に田原君はこの方法を用いて多数の cDNA の局在を調べた結果、生殖細胞を作り出す後端部位の割球に特異的に存在するものを見いだした。この cDNA 全長塩基配列を決定して zinc finger 構造をもつことなどを明らかにして、これを *pos-1* と名付けた。さらに *pos-1* 蛋白に対する抗体を作成して、生殖系列細胞に発現がみられることや、核内ではなく細胞質に存在することを発見した。

この遺伝子の染色体上のマッピングを行ったところ、ほぼ同じ位置に突然変異体遺伝子 *skn-2* が存在した。いまだクローニングされていなかった *skn-2* は生殖細胞欠損などを引き起こす母性突然変異であることから、*pos-1* と同一である可能性が存在した。そこで *skn-2* の複数の突然変異について塩基配列解析を行ったところ *pos-1* 部分において変異があることを確認した。

田原君の博士論文の評価としては、これまで比較的困難であった *in situ* ハイブリダイゼーション法に関して、画期的に効率の優れた方法を開発したことがひとつの点である。さらに生殖細胞形成などに関して重要である胚後端部位に局在する母性遺伝子としては初めての報告である *pos-1* を発見してその構造や発現様式を明らかにしたことが主な成果である。これらの研究は未だに詳細な解析がなされていない線虫における生殖細胞の決定と分化機構について解明するための重要な糸口になる可能性が高く、大きな意義を持つ研究であると判断できる。

博士論文の内容の細部についてはいくつか検討を加えるべき点もあるが、田原君は極めて主体的に研究を行い研究方向の決定や進め方についても自分自身で考えてこの研究課題に取り組んできたことが読み取れるので、その研究成果の意義が大きいことから考えても十分に博士論文に値するものと審査員全員一致で決定した。