

## 非対称分裂に関与する線虫 C3H 遺伝子群内での新たな機能

非対称変異体グループ 研究員

嶋田 益弥

線虫における生殖細胞の増殖と分化の過程では、C3H type zinc-finger 蛋白質が生殖顆粒の構成成分として機能している。我々は、ゲノムプロジェクトにより見出された C3H type zinc-finger 蛋白質群の中に生殖細胞の形成に関して新しい機能を持つ分子があるのではないかと考え、RNAi (RNA interference) 法により探索した。その結果、系統的位置関係だけでなく機能的にも近い 1 群を同定した。これらの多重 RNAi 実験では 3 分子のうち 1 つの組合せの場合に限り著しい産卵数の減少と不稔性の表現型が認められた。in situ hybridization と免疫染色解析によりこれら新規 C3H type zinc-finger 蛋白質は卵巣特異的に共発現し、卵形成過程において重複した機能を持つことが示唆された。

### 1. はじめに

線虫はゲノムの遺伝子構造の解析が最も進んだ真核多細胞生物であり、RNAi (RNA interference) という新しい手法が確立されたことにより、初期発生過程における分子機能の解明に最も有用な生物種となりつつある。さらに、初期発生過程において非対称分裂が繰り返されることも知られており、非対称分裂の研究に非常に適している。

我々はこの線虫をモデル生物として用い、非対称性の中でも特に、生殖細胞の形成に着目して研究を進めた。線虫は受精後、卵の後極に生殖顆粒が移動し、生殖細胞系列の細胞へと非対称分配をくり返しながらかき継がれる。この生殖顆粒の構成成分として、PIE-1, MEX-1, POS-1 が現在までに報告されており、これら C3H type zinc-finger 蛋白質は 1 細胞期後期から後極に局在し、生殖細胞系列の細胞へと受け継がれていることが既に確認されている。PIE-1 は体細胞特異的遺伝子を生殖細胞で抑制している転写調節因子として生殖系列割球の後方側中心体に非対称に局在している[1,2]。MEX-1 は細胞質にあり PIE-1 の局在を決定している分子[3]として、また POS-1 は生殖細胞に局在する maternal mRNA の翻訳調節に関与している[4]。これら分子は共通する C3H type の zinc-finger domain を持っており、この domain の機能は現在まだ解明されていないが、いずれの分子も生殖細胞に局在し生殖系列の決定に重要な役割を有していることが知られている。

総数 17 種におよぶ線虫 C3H zinc-finger 蛋白質ファミリーの中には、PIE-1, MEX-1, POS-1 以外にも系統的位置関係が非常に近い分子群があり、

これらはお互いに重複した機能を持っている可能性がある。その場合、その分子単独の機能を抑制しても効果が現れないことも考えられる。従って、これら分子群については、多重 RNAi 実験を行うことで、重複した機能を持つ分子でも機能阻害の効果が現れ、RNAi で効果のある分子群を探し出せるのではないかと考えた。我々は、PIE-1 など以外にも C3H type zinc-finger 蛋白質の中に生殖細胞の形成に関して新しい機能を持つ分子があるのではないかと考え、そのような因子が実際に生殖細胞に局在するか、非対称分配とどのように関係するのかを解明するため以下に述べる研究を展開した。

### 2. 実験結果と考察

#### 1) 線虫の卵形成に関与する新規 C3H type zinc-finger 蛋白質ファミリーの同定

我々は、線虫のゲノム配列から予測されている C3H type の zinc-finger domain を持つ分子を全て検索し、全長のアミノ酸配列から系統的に 7 群に大きく分類した。この中で PIE-1, MEX-1, POS-1, MEX-5[5]とは系統的に隔たっている機能未知の C3H zinc-finger 蛋白質群から RNAi の手法を用いて生殖細胞の形成に必須の分子を探索した。その結果、シングル RNAi 実験では PIE-1, MEX-1, POS-1, MEX-5 以外は胚性致死に至るものではなく、生殖細胞の形成にも影響を示さなかった。そこで、系統的に近い 1 群のファミリーについて多重 RNAi をおこなった結果、この 1 群のトリプル RNAi において産卵数が 25% 以下に減少していることを見出した。

さらに、3分子のうち1つの組合せの場合に限り50%以下の産卵数の減少と、減数分裂前期の卵母細胞の形態が異常になる不稔性の表現型が認められた。また、この3分子はシングルRNAiや上記以外の組み合わせのダブルRNAiでは産卵数に影響が見られなかったことから、この系統的位置関係が非常に近い3分子はお互いに重複した機能を持っていることが考えられた。

また、ダブルRNAiで不稔性を示した親虫は、近位部の卵巣が著しく肥大しており、この部位の卵母細胞の形態に様々な異常がみられた。この卵母細胞の核の形態から減数分裂前期のダイアキネシス期までは進行しているように見える一方で、一部の卵母細胞においては巨大核と染色体の配置異常が生じていた。この様な卵母細胞の形態異常が、細胞骨格系と関与しているか否かを解析した結果、卵母細胞内の $\alpha$ -tubulinの配向異常が見られたことから、微少管の構造変化の結果、卵母細胞の形態異常が生じた可能性が考えられる。

## 2) 線虫新規C3H type zinc-finger 蛋白質の発現

3種のC3H type zinc-finger 蛋白質に特異的なプローブを用いた *in situ* hybridization 解析より、3分子とも卵巣特異的に発現していることが明らかとなった。また、特異的ペプチド抗体を作成し、それを用いた免疫染色を行った結果、*in situ* hybridization の結果と一致して、卵巣に強い発現が観察された。従って、この3種のC3H type zinc-finger 遺伝子群は卵巣特異的に発現しており、そのうち2種は卵形成過程において重複した重要な機能を持つことが示唆される。卵母細胞においては、2種のC3H zinc-finger 蛋白質は全て細胞質全体にドット状に分布しており、2種の蛋白質の局在が完全に一致したことから、この一群の分子は複合体を形成している可能性も考えられる。この内1種のC3H type zinc-finger 蛋白質は、初期胚にも局在していたことから、減数分裂前期から初期卵割胚での機能制御に関与することが示唆された。今後、卵成熟過程の卵母細胞の分化と成熟においての役割を解析する予定である。

## 3) Two-hybrid 法による中心体関連蛋白質の検索

中心体は旧と新の中心粒対から構成され、染色体複製に伴い半保存的複製を行う。新中心粒は旧中心粒と徐々に分離しながら新しい娘細胞の中

心粒へと成熟していく。中心体は構造的非対称性を持ち、細胞分裂時にどの方向に配置されるかによって細胞の分裂面の決定、ひいては発生運命の決定に重要な役割を担っているが、この過程は分子レベルではよく解明されていない。

我々は、中心体構成成分の一つである $\gamma$ -tubulinに着目し、これをbaitにして線虫の新しい中心体関連蛋白質の探索をtwo-hybrid法を用いて行った。その結果、出芽酵母の中心体の構成成分であるSPC98と類似性のある分子が得られた。今後、two-hybridの結合特異性を検証すると共に、中心体構成成分として局在するか否か、また、この分子を足掛かりに線虫発生の非対称分裂に関与する構成成分を探索する予定である。

## 3. おわりに

現在までに解析されている線虫におけるC3H type zinc-finger 蛋白質は、受精後の生殖顆粒の分配に関与するものばかりであった。今回得られた分子群は受精以前の卵成熟過程で主に機能するという点で全く新しいタイプのC3H type zinc-finger 蛋白質である。また、この1群は共局在しながら重複した機能を持つこと、さらに細胞骨格系分子に直接ではないが作用し、染色体の配置異常をも引き起こしている可能性が考えられる。また、我々は、これらの新規C3H type zinc-finger 蛋白質が受精後には非対称分配されることを見出し、卵母細胞の成熟だけでなく、生殖系列細胞の分化など新たな別の機能を持つことが予測される。今後、受精後の生殖細胞の分化の過程でいかなる制御に関わっているかを解析して行く必要が有ると考えられる。

## 4. 参考文献

- [1] Mello, C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R. and Priess, J.R. (1996) *Nature* 382 : 710-712
- [2] Tenenhaus, C., Schubert, C. and Seydoux, G. (1998) *Dev. Biol.* 200 : 212-224
- [3] Guedes, S. and Priess, J.R. (1997) *Development* 124 : 731-739
- [4] Tabara, H., Hill, R.J., Mello, C.C., Priess, J.R. and Kohara, Y. (1999) *Development* 126 : 1-11.
- [5] Schubert, C.M., Lin, R., Vries, C.J., Plasterk, R.H.A. and Priess, J.R. (2000) *Mol. Cell* 5 : 671-682