

発生ゲノミクス研究チーム

Laboratory for Developmental Genomics

チームリーダー 杉本 亜砂子

SUGIMOTO, Asako

受精卵から複雑な構造を持つ個体に至るまでの発生プログラムは、それぞれの生物が持つゲノム上に記載されている。当研究チームでは、全ゲノム配列が決定された線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデル生物としてゲノム機能解析を行うことにより、発生プログラムの統合的な理解を目指している。これまでに、遺伝子機能破壊法である RNAi 法の改良とハイスループット化を行い、体系的な遺伝子機能解析を進めている。この手法により、発生過程に重要な役割を果たす遺伝子群を網羅的に同定することが可能である。これまでに同定した必須遺伝子のうち、生殖細胞形成・初期卵割に関わるものについては詳細な解析を開始している。

また、プログラム細胞死の制御機構の理解をめざした研究も行っている。細胞死の分子機構は線虫から哺乳類まで保存されていることが明らかとなっているが、個々の細胞の生死がどのように決定されているかについては不明な点が多く残っている。そこで、細胞系譜が明らかにされている *C. elegans* の利点をいかし、胚発生期の細胞死の起きるパターンに異常を示す変異体のゲノムワイドなスクリーニングを行い、複数の細胞死異常変異体を分離している。これらの変異体の原因遺伝子を同定することにより、細胞死制御に関わる新規因子が得られると期待される。

なお、本年度の研究は、発生・再生科学総合研究センターが建設中であったため、東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻において山本正幸教授との共同研究として行った。

1. プログラム細胞死と形態形成に異常を示す *cdl-1* 変異体の解析 (児玉, 杉本)

C. elegans cdl-1 (cell death lethal) 変異体は、死細胞の過剰な蓄積とともに形態形成異常を示し、胚性致死となる変異体として J. H. Rothman によって分離された。(1992) 我々は、四次元録画システム (経時的に三次元画像を取得するシステム) を用いて *cdl-1* 変異体の胚発生過程を詳細に観察することにより、*cdl-1* 胚では死細胞が現れる時期が野生型と比較して顕著に遅延し、さらに、死細胞が長時間分解されずに残存することを見いだした。

cdl-1 の遺伝子クローニングを行ったところ、脊椎動物のステムループ結合タンパク質 (stem-loop binding protein: SLBP) のステムループ結合領域と相同性の高い部分を持つ因子をコードしていることが明らかになった。SLBP は他生物において、コアヒストン mRNA の 3'-非翻訳領域に存在するステムループ構造に特異的に結合し、ヒストン mRNA のプロセッシング・核-細胞質輸送・翻訳調節に関与していることが示唆されている。我々は、酵母 3'-ハイブリッド法によって、CDL-1 タンパク質が *C. elegans* のコアヒストン mRNA 3'-非翻訳領域に存在するステムループ構造に特異的に結合することを確認した。

cdl-1 の初期胚における機能を RNAi 法によって破壊したところ、細胞分裂期における染色体凝縮が阻害された。4 種のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) それぞれの発現を RNAi によって抑制したところ、いずれの場合にも *cdl-1* (RNAi) と同様の染色体凝縮不全が観察された。このことは、CDL-1 が *in vivo* でヒストンの発現調節を行っているという仮説と合致する。

哺乳動物細胞においては細胞死の際にクロマチン構造の動的な変化が起きることが知られている。*cdl-1* 変異体ではヒストン量の減少のためにクロマチン構造変化に異常が起き、そのために細胞死の正常な進行が妨げられていると推測された。

2. プログラム細胞死に異常を示す染色体欠失変異体の解析 (古屋, 鴻, 杉本)

プログラム細胞死の制御に関わる新規因子を同定することを目的として、*C. elegans* の染色体欠失変異体コレクションを用いて、細胞死の起きるパターンに異常を示す変異体のゲノムワイドなスクリーニングを行った。これまでに約 20 の染色体欠失変異体を同定しており、そのなかで特に興味深い表現型を示すものを選択し、表現型解析および遺伝子クローニングを進めている。その 1 つである *qDf3* 染色体欠失変異体については、四次元録画システムによる解析から、胚発生期を通じて細胞死の観察される頻度が顕著に低下していることが明らかになった。すなわち、*qDf3* は細胞死の誘導に重要な役割を果たしている遺伝子を欠失していると考えられる。現在、原因遺伝子の遺伝学的マッピングを進めており、その存在領域をゲノム上の約 200 kb にまで狭めている。今後は YAC クローンおよびコスミドクローンによる表現型レスキュー実験、および、RNAi で表現型を再現する遺伝子を探索することにより、原因遺伝子の同定を行う予定である。

また、胚発生後期に特異的に死細胞数が増加する *nDf24* 染色体欠失変異体についても四次元録画システムによる表現型解析、および、遺伝子マッピングを開始している。

3. ハイスループット RNAi 法の改良 (丸山, 前田, 杉本)

RNAi 法は二本鎖 RNA の導入により標的遺伝子の mRNA が選択的に分解される現象を利用した遺伝子機能破壊法であり、*C. elegans* で広く用いられている。我々は RNAi 法を改良することにより、ハイスループットに RNAi を行うのに適した “RNAi-by-soaking” 法を確立し、体系的な遺伝子機能解析を行っている。これまでに約 2,800 遺伝子についての RNAi 表現型の解析を終えている。今回、さらなるハイスループット化をめざし、ラボラトリーオートメーション

システム Biomek2000 (ベックマン・コールター社)を導入し、鋳型となる非重複 cDNA ライブラリー (遺伝研・小原雄治博士より提供) から二本鎖 RNA を合成するステップの自動化を行った。この自動化により、体系的 RNAi 法のさらなる効率化が期待でき、今後 1 年半以内に非重複 cDNA ライブラリーに含まれる約 10,000 遺伝子の表現型解析を完了できると考えている。

4. RNAi 法による細胞分裂・減数分裂制御機構の解析
発生過程において、体細胞分裂および減数分裂は厳密に制御されている必要がある。細胞数が少なく、細胞系譜に個体差がない *C. elegans* は発生における細胞分裂の制御機構の研究のモデル系として適している。我々は RNAi 法を用いて *C. elegans* における細胞分裂制御に関与する遺伝子群の機能解析を行っている。

(1) 中心体成熟に必須なプロテインフォスファターゼ 4 の解析 (住吉, 杉本)

我々が行った第 3 染色体右腕領域の体系的 RNAi から、プロテインフォスファターゼ 4 (PP4) 相同遺伝子の機能欠損により初期卵割の異常が引き起こされることが見いだされた。この遺伝子を *pph-4.1* と名付けてさらなる解析を行った。抗 PPH-4.1 ポリクローナル抗体を作成し免疫染色を行ったところ、哺乳類やショウジョウバエ PP4 の場合と同様に、PPH-4.1 は細胞分裂期の中心体に局在することが明らかになった。RNAi により *pph-4.1* 遺伝子機能を破壊すると、体細胞分裂および精子形成期の減数分裂における紡錘体形成が顕著に抑制された。一方、中心体に依存しない紡錘体形成を行う卵細胞の減数分裂 (極体放出) には影響が見られず、PPH-4.1 の機能は中心体に依存した紡錘体形成のみに必須であることが示唆された。

中心体は 2 つの中心小体 (centriole) およびそれらを取り囲む中心小体外周物質 (pericentriolar material, PCM) から成る。細胞分裂期が近づくと、 γ -チューブリンをはじめとする PCM のタンパク質の局在量の増加が見られ、それに伴って中心体の微小管形成活性が劇的に増大する。この現象は中心体の成熟と呼ばれる。PPH-4.1 機能を破壊した細胞においては、PCM 構成成分である γ -チューブリンおよび POLO 様プロテインキナーゼ PLK-1 の中心体への局在が観察されなかった。これらの結果から、PPH-4.1 が PCM の構成物質の中心体への局在化に必要であり、中心体成熟に重要な役割を果たす中心体タンパク質であることが示された。

また、*pph-4.1* 遺伝子機能を阻害した卵母細胞において相同染色体間のキアズマ形成の欠損が見られた。このことから、PPH-4.1 は紡錘体形成以外に、減数第一分裂前期におけるキアズマの形成またはその維持にも関与すると考えられる。

(2) 染色体接着因子コヒーシンの構成成分 Rad21 ホモログの解析 (三戸, 杉本)

コヒーシンは細胞分裂時の染色体分配に必須なタンパク質複合体であり、その構成サブユニットは真核生物で高度に保存されている。*C. elegans* ではコヒーシンのサブユニットの 1 つである Rad21/Scc1 相同遺伝子が 2 種類 (*coh-1*, *coh-2*) 存在するが、それぞれがどのような機能分担をしているかは不明であった。そこで、これらの Rad21 相同遺伝

子の発現解析および機能解析を行った。それぞれのタンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し免疫染色によって胚発生期におけるタンパク質の局在を解析したところ、COH-2 は次のような細胞周期依存的な染色体への局在を示した。間期の核に蓄積された COH-2 は、分裂前期から中期にかけて、凝縮し始めた染色体から徐々に解離し、中期・後期の染色体にはシグナルが観察されなかった。終期の脱凝縮し始めた染色体上には COH-2 が再び局在していた。また、COH-2 は幼虫期においても細胞分裂を継続して行う細胞系譜において発現が観察された。これに対して COH-1 は、細胞周期にかかわらず、後期胚と幼虫期において生殖細胞を除くすべての染色体に局在していた。

coh-2 の胚発生における遺伝子機能を RNAi 法によって破壊したところ胚性致死となった。また、孵化後の *coh-2* 機能を破壊すると後胚発生で分裂する細胞系譜で異常が観察された。したがって、*coh-2* は発生を通じて細胞分裂に必須であることが示唆された。一方、*coh-1* の機能を RNAi 法で破壊したところ、孵化直後に発生を停止し、主に幼虫初期の発生に必須であることが示された。これらの結果から、*C. elegans* の 2 種類の Rad21 相同遺伝子は発生過程において異なる機能を持つと考えられた。

Research Subjects and Members of Laboratory for Developmental Genomics

1. Analysis of the *cdl-1* Mutants that Show Defects in Programmed Cell Death and Morphogenesis in *C. elegans*
2. Analysis of Chromosomal Deletion Mutants that Show Defects in the Processes of Programmed Cell Death
3. Development of a High-Throughput RNAi Methodology
4. Studies of Regulation of Mitosis and Meiosis in *C. elegans*

Team Leader

Dr. Asako SUGIMOTO

Trainees

Ms. Miwa FURUYA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Ms. Yuki KODAMA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Mr. Ikuma MAEDA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Ms. Rika MARUYAMA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Ms. Yoshiko MITO (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Mr. Muneyoshi OTORI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Mr. Eisuke SUMIYOSHI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

口頭発表 Oral Presentations

(国内会議)

丸山理香, 遠藤幸子, 杉本亜砂子, 山本正幸: “線虫 *daz-1* 遺伝子の欠損により生殖細胞の核小体が異常に縮小する”, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 1 月 (2001).