

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370096

研究課題名（和文） 生殖質形成に関わる新規因子の解析

研究課題名（英文） Analysis for new factors involved in the assembly of the germ plasm

研究代表者

中村 輝 (NAKAMURA AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90323245

研究成果の概要：

細胞の極性は、しばしば mRNA の細胞質内局在によって確立される。ショウジョウバエ卵の生殖質形成過程は、RNA 局在研究の理想的モデル系の 1 つである。生殖質因子の一つである Vasa と GFP との融合蛋白質を発現する系統を用いて、生殖質形成が異常となる突然変異体を多数単離した。これらの内の 1 つは、エンドソーム蛋白質である Rabenosyn-5 の突然変異であった。詳細な解析により、Rabenosyn-5 等のエンドソーム蛋白質が、F アクチンの再編成を通して、生殖質因子の卵皮層への係留に関与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学 (5806)

キーワード： ショウジョウバエ, 生殖質, 細胞極性, 生殖細胞, RNA 局在, エンドソーム, 突然変異, 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

発生・分化過程では、細胞極性が重要である。細胞の極性は、しばしば mRNA の細胞内局在によって確立される。四半世紀におよぶ国内外の研究から、RNA 局在は、転写レベルと同様に、遺伝子産物が時間的・空間的に正しく産生され機能するために必須の制御機構であることが判明している。RNA 局在による細胞極性は、大きく(1) RNA 輸送、(2) 輸送過程における翻訳抑制、(3) 局在、(4) 局在の維持、そして(5) 局在領域における翻訳脱抑制の段

階を経て確立される。しかし、これらいずれの段階についても、その分子機構の詳細は不明である。

ショウジョウバエ卵形成における生殖質形成過程は、RNA 局在研究の理想的なモデル系の 1 つとして精力的に研究されている。生殖質は、卵母細胞後極に形成される特殊な細胞質領域のことを指し、生殖細胞形成因子・腹部形成因子が局在している。ショウジョウバエ生殖質形成は、oskar mRNA の卵母細胞後極への局在によって指揮される。そし

て、局在化領域で翻訳された Oskar 蛋白質が核となり、様々な母性 mRNA・蛋白質が局在することにより生殖質が形成される。しかし、*oskar* mRNA の局在・翻訳制御や生殖質形成の分子基盤については、依然良くわかっていない。そこで、遺伝学的手法から *oskar* mRNA の輸送・局在、あるいは生殖質アッセムリーに関わる新規因子の同定を試みた。具体的には、*oskar* RNA の局在・翻訳に依存して、卵母細胞後極に局在する Vasa-GFP 蛋白質をマーカーとして用い、ショウジョウバエゲノムの約 20% を占める第 2 染色体左腕を対象として EMS による突然変異を誘発し、5122 系統について生殖系列クローンを作成しスクリーニングを行った。その結果、GFP-Vasa の局在に異常を示す突然変異体を 66 系統得た。さらに、*oskar* mRNA と一致した挙動を示す Staufén-GFP 蛋白質を用いた解析から、これらの突然変異体のほとんどにおいて、*oskar* RNA 局在、あるいは局在の維持が異常となっていることを確認した。そして、得られた 66 系統の内 52 系統について責任遺伝子の同定に成功し、12 遺伝子座のアリルであることを明らかにした。

2. 研究の目的

興味深いことに、これら 12 遺伝子の内 3 つは小胞輸送系に関与することが報告されていた。これまで、ツメガエル卵や神経細胞において、RNA 局在に関わる蛋白質がしばしば小胞体フラクシオンに分画されるなど、RNA 局在と膜輸送系との関連性が暗示されてきた。しかし、両者を直接結びつける証拠はなく、その連携の有無は不明である。そこで本研究では、*oskar* mRNA 局在・係留に異常を示す 3 つの膜輸送関連因子について解析をすすめ、RNA 局在と膜輸送システムとの連携関係について新たな知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

単離した突然変異体の発生遺伝学的解析を中心に解析を進めた。生殖系列クローン作成は常套の方法に従った。抗 Rabenosyn-5 抗体は、全長蛋白質を大腸菌で発現、精製した組換え蛋白質を抗原に作成した。Rab5, Rab7, Rab11 に対する抗体は、特異的なペプチド配列に対する抗ペプチド抗体を作成した。突然変異体クローンは、相同染色体上に Ubi-GFPnls を組み込むことによって、核内に GFP シグナルが観察されない卵室として識別した。*oskar-bcd3'UTR* を発現する系統は、UASp ベクターに組み込みトランスジェニックショウジョウバエを作成し、*mat-α-GAL4-VP16* 系統をドライバーに用いた。

4. 研究成果

同定した因子の 1 つである CG8506 は、Rab5 のエフェクター蛋白質である Rabenosyn-5 のホモログとして、初期エンドソームの輸送調節に関与すると予想された。大腸菌で発現させた組み換え蛋白質を抗原にして、高い特異性を有する抗 Rabenosyn-5 抗体の作製に成功した。そして、*in vitro* における結合 (GST pull down) 実験から、ショウジョウバエ Rabenosyn-5 ホモログが GTP (GTP γ S) 結合型 Rab5 と選択的に結合すること、すなわち Rab5 のエフェクター蛋白質として機能することを明らかにした (図 1)。

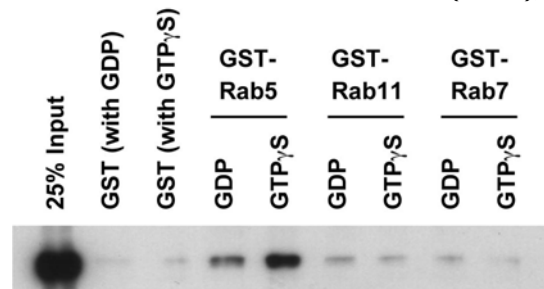


図 1

実際、*rabenosyn-5* 突然変異クローンは、*oskar* mRNA の局在異常ばかりでなく、卵黄顆粒の自家蛍光やエンドサイトーシスのトレーサー色素である FM4-64 の卵母細胞への取り込みが観察されなかった (図 2)。従って、Rabenosyn-5 は Rab5 と同様に初期エンドソームの構成蛋白質として、エンドサイトーシスに必須な新規蛋白質であると結論した。

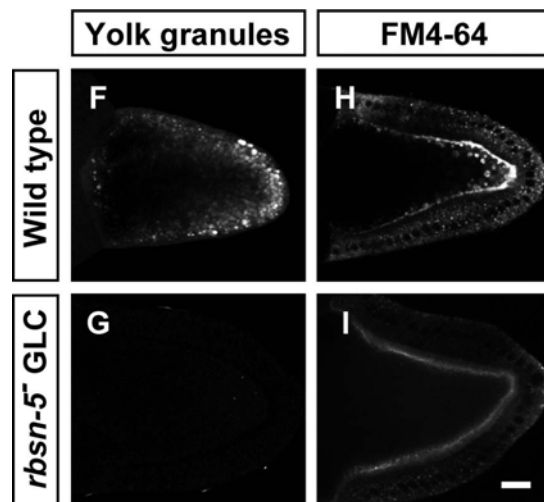


図 2

一方、微小管系の極性マーカーである Kinesin-lacZ (Kin-LacZ) の局在について *rabenosyn-5* 突然変異クローンにおいて検討した結果、Kin-LacZ 蛋白質の卵母細胞後極へ

の局在が安定に維持されないことが判明した。このことから, *rabenosyn-5* 突然変異クローンにおける *oskar* mRNA 局在異常は, 一義的には細胞骨格系の極性異常によって引き起こされていると考えられた。

しかし, 以下に挙げる観察結果から, 膜輸送系がもっと直接的に *oskar* mRNA 局在・生殖質形成に関わっている可能性が考えられた。第1に, 我々は, *Rabenosyn-5* の局在について興味深い結果を得た。*Rabenosyn-5* と *Staufen* (*oskar* RNP のマーカー) との2重染色の結果から, *Rabenosyn-5* が *Staufen* 蛋白質や *oskar* mRNA と共に卵母細胞後極に局在することを見いだした。さらに, 卵母細胞後極への局在に先立って *Staufen* 蛋白質や *oskar* mRNA が, *Rabenosyn-5*, *Rab5*, *Rab7*, *Rab11* 等のエンドソームマーカーと共に卵母細胞中央部に一過的に集積した後に卵母細胞後極へと局在することを見いだした (図3)。一方, 小胞体マーカー (抗 *KDEL* 抗体) やゴルジ体マーカー (抗 *gp120* 抗体) のはこのような分布パターンを示さなかったことから (図3), これらエンドソーム蛋白質の挙動は特異的なものであると結論した。このような結果から, エンドソームと *oskar* RNP とが, 密接に相互作用していることが示唆された。すなわち, エンドソームと RNP 複合体との相互作用により, *oskar* mRNA の卵母細胞後極への局在が制御されていると予想された。

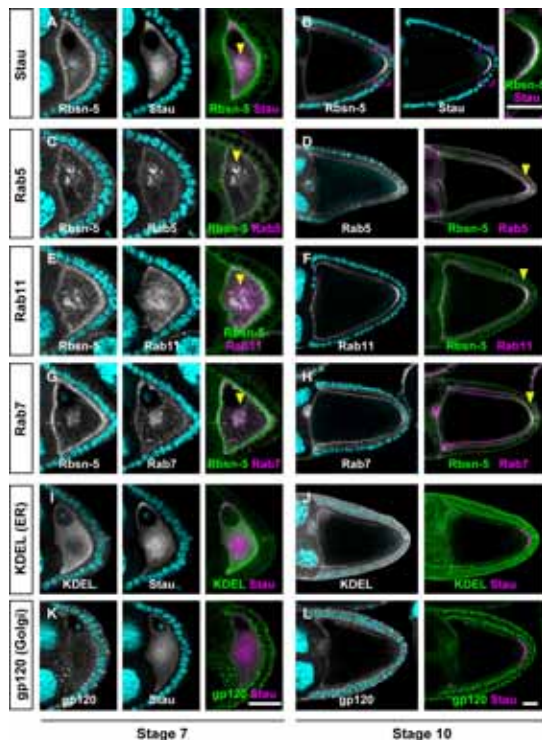


図3

第2に, 卵黄顆粒やエンドサイトーシスのトレーサー色素 FM4-64 の取り込み, すなわちエンドサイトーシスが卵母細胞後極側より活発であることを見いだした。一方, *oskar* 突然変異体においては, 卵母細胞後極側でのエンドサイトーシス亢進もエンドソーム蛋白質の局在も観察されなくなった。つまり, このような膜輸送の極性が, *Oskar* 蛋白質に依存していることが明らかとなった。さらに, *osk-bcd3* 'UTR 系統を用いて *Oskar* を卵母細胞前極側に異所的に発現させると, *Rabenosyn5*, *Rab5*, *Rab7*, *Rab11* 等のエンドソーム蛋白質が卵母細胞前極にリクルートされること, FM4-64 の取り込みが卵母細胞前極側でも亢進することを見いだした。以上の結果から, 膜輸送系が *Oskar* の下流で生殖質アッセムブリーにも関与している可能性が考えられた。

oskar mRNA は, in frame の2つの ATG コドンからの翻訳開始により long isoform (long *Oskar*) と short isoform (short *Oskar*) の2つの蛋白質が発現することが知られている。さらに, これら2つのアイソフォームは, short *Oskar* 領域を完全共有しているにもかかわらず, 生殖質アッセムブリーの過程で全く異なった活性を持つことが指摘されている。すなわち, short *Oskar* は生殖質構成因子のリクルートに, long *Oskar* は生殖質因子の局在維持に必要であると報告されている。そこで, long *Oskar*, short *Oskar* のどちらか一方のみを特異的に卵母細胞前極に発現させ, エンドソーム蛋白質の局在を検討した。その結果, long *Oskar* にエンドソーム蛋白質をリクルートする活性とエンドソーム経路の活性化を引き起こす活性があることが判明した。以上の結果から, エンドソーム経路が long *Oskar* の下流で働き, 生殖質因子の卵母細胞皮相への係留に関わっている可能性が示唆された。

rabenosyn-5 の変異クローンにおいては, *oskar* mRNA の後極への輸送が異常となり, 卵母細胞後極での生殖質形成過程を解析することは不可能であった。一方, *rabenosyn-5* の変異クローンにおいても *bicoid* mRNA の卵母細胞前極への局在は正常であった。そこで, *osk-bcd3* 'UTR 発現系を用いて卵母細胞前極で異所的に生殖質形成を誘導した場合における *Rabenosyn-5* の機能を解析した。その結果, *rabenosyn-5* 変異クローンにおいて *osk-bcd3* 'UTR を発現させた場合に, *Oskar* 蛋白質や *Vasa* 蛋白質など生殖質因子が卵母細胞前極に安定に維持されずに拡散していることが観察された。すなわち, *Rabenosyn-5* は, 生殖質因子が安定に局在維持されるため

に必要であると推定された。一方, *rabenosyn-5* 変異クローンにおいても, Rab5, Rab7, Rab11 の前極へのリクルートは観察された。すなわち, 単なるエンドソーム蛋白質のリクルートではなく, 局所的なエンドソーム経路の活性化が生殖質因子の卵皮相への係留に必要であると推測された。

生殖質因子の皮相への係留には, F アクチン細胞骨格系が関与していることが知られている。Oskar は卵母細胞後極において, F アクチンの再編成を引き起こし, 皮相から細胞質へ向かうアクチン繊維束を誘導することが報告されている。*osk-bcd3* 'UTR を発現する卵母細胞においては, 卵母細胞前極にもアクチン繊維束が誘発されることを確認した(図4)。一方, *rabenosyn-5* 変異クローンにおいて *osk-bcd3* 'UTR を発現させた場合には, 前極におけるアクチン繊維束が誘発されず, F アクチンは生殖質因子と共に細胞質中に凝集体を形成した(図4)。

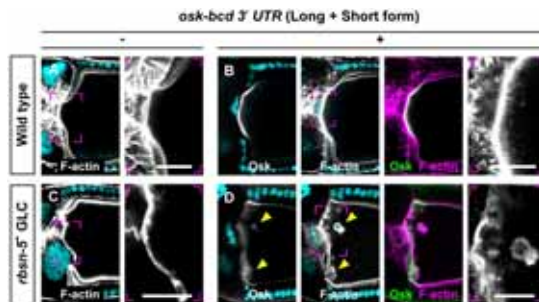


図4

以上の結果から, エンドソーム経路は, 生殖質アッセムブリーの複数の過程に関与していることが明らかとなった(図5)。特に, エンドソーム経路は, Oskar の下流で F アクチンの再編成を介して生殖質因子の卵皮相への係留に関わっていることを見いだした。

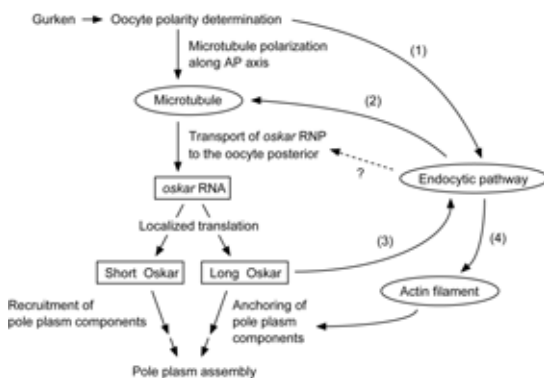


図5

これまで, ツメガエルや神経細胞において, RNA 局在に関わる蛋白質がしばしば小胞体

フラクションに分画されるなど, RNA 局在と膜輸送系との関連性が暗示されてきた。しかし, 両者を直接結びつける証拠はなく, その連携の有無は不明であった。従って, 本研究成果は RNA 局在機構研究・生殖質形成機構研究に対して全く新しい概念を提供する可能性を秘めていると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Tanaka, T., and Nakamura, A. The endocytic pathway acts downstream of oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. *Development* 135, 1107-1117 (2008). 査読有り

Hanyu-Nakamura, K., Sonobe-Nojima, H., Tanigawa, A., Lasko, P., and Nakamura, A. *Drosophila* Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. *Nature* 451, 730-733 (2008). 査読有り

Aratani, S., Kageyama, Y., Nakamura, A., Fujita, H., Fujii, R., Nishioka, K. and Nakajima, T. MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila*. *Int. J. Mol. Med.* 21, 469-476 (2008). 査読有り

Nakamura, A., and Seydoux, G. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression (総説). *Development* 135, 3817-3827 (2008). 査読有り

羽生(中村)賀津子, 中村 輝 生殖細胞形成過程における体細胞遺伝子発現抑制機構(総説), *実験医学* 27, 362-367 (2009). 査読なし

[学会発表](計17件)

Hanyu-Nakamura, K. (Nakamura, A.), Global repression of mRNA transcription and the maintenance of germline fate in *Drosophila* embryos. The 7th MBSJ Spring Symposium, 23-24 April 2007, 淡路夢舞台国際会議場

Nakamura, A. RNA localization and translational control in *Drosophila* germ plasm assembly. EMBO Workshop on "Intracellular RNA Localization and Localized Translation", 1-7 July 2007, Il Ciocco, Tuscany, Italy

Tanaka, T. (Nakamura, A.), Rab11-mediated endocytic pathway acts downstream of Oskar in germ plasm assembly during *Drosophila* oogenesis. EMBO Workshop on "Intracellular RNA

Localization and Localized Translation”, 1-7 July 2007, Il Ciocco, Tuscany, Italy
後藤 聡(後藤 聡), ショウジョウバエ生殖細胞形成における体細胞遺伝子発現抑制機構. 第40回日本発生生物学学会年会, 平成19年5月28日~30日, 福岡国際会議場.

羽生-中村 賀津子(中村 輝), ショウジョウバエ生殖細胞形成における体細胞遺伝子発現抑制機構. 第40回日本発生生物学学会年会, 平成19年5月28日~30日, 福岡国際会議場.

田中 翼(中村 輝), ショウジョウバエ卵母細胞においてエンドサイトーシス経路は極性形成および生殖質形成に必須である. 第40回日本発生生物学学会年会, 平成19年5月28日~30日, 福岡国際会議場.

杉村 勇(中村 輝), Bruno and orb are required for prophase I arrest of *Drosophila* oogenesis. 第40回日本発生生物学学会年会, 平成19年5月28日~30日, 福岡国際会議場.

阿部将人(後藤 聡), ショウジョウバエにおけるフォスファチジルイノシトール3リン酸及びそのエフェクターにより制御される接着分子群の局在機構. 第40回日本発生生物学学会年会, 平成19年5月28日~30日, 福岡国際会議場.

中村 輝, エンドソーム経路によるショウジョウバエ卵母細胞極性・生殖質形成の制御. 第9回日本RNA学会年会, 平成19年7月28日~31日, 名古屋国際会議場.

中村 輝, ショウジョウバエ生殖質形成に関わる新規因子の探索. 第30回日本分子生物学学会年会, 平成19年12月11日~15日, パシフィコ横浜.

阿部将人(後藤 聡), ホスファチジルイノシトール3リン酸(PI(3)P)による細胞接着・細胞極性の制御. 第30回日本分子生物学学会年会, 平成19年12月11日~15日, パシフィコ横浜.

Nakamura, A., The endocytic pathway acts downstream of Oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. Howard Hughes Medical Institute Workshop on “RNA granules”, March 30-April 2, 2008, HHMI Conference Center, Chevy Chase, USA.

Hanyu-Nakamura, K. (Nakamura, A.), Nanos stabilization requires *pgc*-mediated transcriptional repression in *Drosophila* primordial germ cells. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 28-30,

2008, Tokushima.

Tanaka, T. (Nakamura, A.), The endocytic pathway regulates the Oskar-mediated F-actin reorganization during *Drosophila* germ plasm assembly. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 28-30, 2008, Tokushima.

Nakamura, A., Germ plasm assembly and germ cell development in *Drosophila*. EMBO workshop: *Drosophila* Crete Meeting, June 22-28, 2008, Crete, Greece.

Nakamura, A., The endocytic pathway acts downstream of Oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. 第60回日本細胞生物学会大会, 2008年6月29日~7月1日, パシフィコ横浜.

羽生-中村賀津子(中村 輝), ショウジョウバエ極細胞におけるNanosの維持には*pgc*による転写抑制が必要である. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 2008年12月9~12日, 神戸ポートアイランド.

〔図書〕(計1件)

園部(野嶋)浩子, 中村 輝, 羊土社, 3-章: ショウジョウバエ胚のWhole mount *in situ* hybridization. 無敵のバイオテクニカルシリーズRNA実験ノート上巻(稲田利文, 塩見春彦編)(2008) pp70-82.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cdb.riken.jp/jp/02_research/0202_creative05.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 輝(NAKAMURA AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 90323245