

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657139

研究課題名(和文)細胞タイプ特異的 RNAi を用いた個体発生を支える細胞動態調節解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the cell-type-specific RNAi method for the analysis of cellular dynamics during animal development

研究代表者

久保田 幸彦 (KUBOTA, YUKIHIKO)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：7033325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：私たちは、RNAiスクリーニングにより進化的に保存されたPAF1複合体の構成因子(CTR-9, PAF1, LEO-1, CDC-73, RTFO-1)が、線虫表皮形態形成に関与することを見いだした。これらのノックダウン胚では、細胞分化には異常が見られず、むしろ細胞のポジショニングや細胞変形に顕著な異常がみられた。PAF1複合体の構成因子は、表皮細胞を含む多くの細胞で発現していることがわかった。leo-1欠失変異体を用いた、細胞タイプ特異的なレスキュー実験から、PAF1複合体は表皮細胞で発現し、胚発生に必須であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We found that, in the nematode *C. elegans*, the PAF1C is involved in epidermal morphogenesis in late embryogenesis. In RNAi knockdown embryos of the components of the PAF1C (CTR-9, PAF1, LEO-1, CDC-73, RTFO-1), whereas the number and cell fate determination of epidermal cells were apparently unaffected, their position and shape were severely disorganized. PAF1::mCherry, mCherry::LEO-1 and GFP::RTFO-1 driven by the authentic promoters were detected in the nuclei of a wide range of cells. Epidermis-specific expression of mCherry::LEO-1 rescued embryonic lethality of the leo-1 deletion mutant. Thus, although the PAF1C is universally expressed in *C. elegans* embryos, its epidermal function is crucial for the viability of this animal.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：PAF1複合体 表皮形態形成 胚発生 線虫・*C. elegans* 細胞ポジショニング 細胞移動 細胞変形

## 1. 研究開始当初の背景

### 表皮形態形成の普遍性について

個体発生において、細胞は分裂・移動・形態変化を繰り返しながら体を作りあげていく。このとき、個々の細胞がダイナミックに変化するだけでなく、同種もしくは異種の細胞集団が協調的にふるまう。たとえば個体発生においては、上皮細胞（表皮細胞）が移動し形態が著しく変化することで、表皮組織が正しく体をおおい、次に胚が伸長し細長い個体を作り上げられる。このプロセスに異常が起ると、さまざまな個体発生異常や病態が引き起こされる。これらの現象は多細胞生物個体の発生過程で共通に起こる普遍的な現象であるが、個体レベルで解析できる実験系が少ないことから、その分子の実体の十分な解明には至っていない。

### モデル生物・線虫における表皮形態形成

本研究でモデル系として使用する、線虫・*C. elegans*は、胚（卵）が透明で小さく（卵の長径がおよそ50 μm）、顕微鏡下で細胞の形態変化や細胞内での分子ダイナミクスを個体全体で生きたまま解析するのに非常に優れた系である。線虫における表皮形態形成は、（1）表皮細胞が胚を包みこみ、（2）胚が前後軸方向に伸長することによって引き起こされる。このプロセスでは、細胞の移動、細胞のポジショニングおよび細胞変形が時空間的に制御されることが必須であるが、その分子機構は不明な点も多い。本研究では、細胞が透明で個体を構成する細胞すべての細胞の動態を生きたままモニターできる線虫胚を用い、表皮細胞の移動と細胞変形を制御するメカニズムに注目して、「個体の中での細胞動態を調節する遺伝子ネットワーク」を解明する。

### 胚性致死遺伝子に着目したRNAi機能阻害スクリーニングによる新規表皮形態形成因子の探索

研究代表者が所属する研究室ではすでに、研究室で開発したsoaking RNAi法（Maeda et al., 2001）を用いて大規模RNAiスクリーニングを行い、およそ800個の胚発生に必須な遺伝子（胚性致死遺伝子）を同定していた。私たちは、さらなる予備的な実験から、およそ60個の遺伝子が表皮形態形成期に致死に至る可能性を見いだしていた。これらの表皮形態形成に関わる候補遺伝子について、ライブイメージング解析とRNAiによる遺伝子機能破壊を組み合わせることで、高頻度に表皮形態形成期に形態形成異常がみられる遺伝子を同定し、表皮形態形成に関わる新規遺伝子の機能解析を行うことにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、予備的なスクリーニングにより得られた60個の遺伝子について、さらに解析を行う為に、DLG-1（表皮細胞境界部に局在する分子）にGFPを融合させたタンパク質を発現する株をまず用いる。この株を用いることで、細胞の形や位置の変化をライブイメージング解析できる。ライブイメージング解析は、申請者の所属研究室に設置された、高分解能スピニングディスクレーザー顕微鏡システム（Toya et al., 2010）により、個体中の細胞のふるまいや細胞内の分子動態を精度高く、定量的に検出・解析した。その結果、RNA polymerase II に結合し、転写レベルでの遺伝子発現制御やクロマチンリモデリングに関わるPAF1複合体(The Polymerase Associated Factor 1 complex)の構成因子CTR-9を同定した。PAF1複合体は、酵母からヒトまで真核生物で高度に保存されている。PAF1複合体は酵母では必須ではないが、線虫やゼブラフィッシュでは必須な遺伝子であることから

(Nguyen et al., 2010; Langenbacher et al., 2011)、多細胞生物に進化する過程で新たな機能を獲得している可能性が考えられた。そこで本研究では、PAF1 複合体による表皮形態形成の制御機構を解析することにした。具体的には、5つのPAF1複合体の構成因子(CTR-9, PAF0-1, LEO-1, CDC-73, RTFO-1)について、RNAi法により機能阻害した線虫胚の表現型を解析することにより機能解析をおこなった。さらに、PAF1複合体の構成因子の一つであるLEO-1を欠損した変異体 *leo-1(gk1081)* 変異体を用いた解析を行い、PAF1複合体がどの細胞で機能しているかの解明をおこなった。また、ゲノム断片に蛍光タンパク質であるGFPまたはmCherry融合した遺伝子を導入したトランスジェニック線虫を作成し、PAF0-1, LEO-1, RTFO-1タンパク質がいつどの細胞で働くかについても解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

スクリーニングによって同定したPAF1複合体に着目してさらなる解析を行った。PAF1複合体の5つの構成因子(CTR-9, PAF0-1, LEO-1, CDC-73, RTFO-1)について、RNAi法により機能阻害した線虫胚の表現型を解析することにより機能解析をおこなった。さらに、構成因子の1つであるLEO-1を欠損した *leo-1(gk1081)* 変異体を用いた解析をおこなった。ゲノム断片に蛍光タンパク質(GFPまたはmCherry)をコードする領域を融合した遺伝子を導入したトランスジェニック線虫を作成し、PAF0-1, LEO-1, RTFO-1タンパク質の発現パターンを解析した。

### 4. 研究成果

#### PAF1 複合体は、線虫胚の表皮形態形成に必要である

PAF1 複合体の構成因子(CTR-9, PAF0-1, LEO-1, CDC-73, RTFO-1)をRNAi法により機能阻害した結果、5つの構成因子の機能阻害

胚すべてにおいて、高頻度に形態形成異常が起こり致死となった。ライブイメージング解析から、機能阻害胚のほとんどは、表皮細胞の移動と変形に異常を起こして致死に至ることが判った。さらに表皮組織の一部の集団に発現するHOXタンパク質(CEH-16)陽性細胞の細胞総数と細胞の位置を解析することによって、PAF1 複合体は、表皮細胞の増殖にはほとんど関与せず、むしろ表皮細胞のポジショニングに関与する可能性が明らかとなった。一方、表皮細胞、神経細胞、筋細胞といった主要な細胞種の分化マーカーが機能阻害個体においても正常個体と同様に発現していたことから、線虫胚における、表皮細胞、神経細胞、筋細胞の初期の細胞分化にはPAF1 複合体は必要ではないことが判った。機能阻害個体のさらなる解析から、PAF1 複合体は表皮細胞における微小管細胞骨格動態の時空間制御に関与することで細胞の移動や変形を調節している可能性が示唆された。

#### PAF1 複合体は、細胞自立的に表皮形態形成を制御する

次に、PAF1 複合体の構成因子LEO-1の欠失変異体を用いた解析を行った。その結果、*leo-1(gk1081)* 変異体は、RNAi法により遺伝子ノックダウンした *leo-1(RNAi)* 胚と同様に表皮形態形成異常が起こることが判った。この変異体を用いて、*leo-1* 遺伝子を特定の細胞でのみ発現させることで、表皮形態形成異常が回復するか解析した結果、*leo-1* 遺伝子を表皮細胞で発現させると胚性致死の表現型が顕著に回復したのに対して、神経細胞や筋細胞で発現させた場合は、表皮形態形成期における致死率がまったくレスキューしなかった。これらの結果から、PAF1 複合体は表皮細胞で発現することで細胞自立的に表皮形態形成を制御している可能性が示唆された。

## PAF1 複合体は、サブコンプレックスを形成し核に移行する

ゲノム断片に蛍光タンパク質 (GFPまたは mCherry) を融合した遺伝子を導入したトランスジェニック線虫を作成し、PAFO-1, LEO-1, RTFO-1タンパク質の発現パターンを解析した。その結果、PAFO-1タンパク質、LEO-1タンパク質および RTFO-1タンパク質はともに、表皮細胞を含むほとんどの細胞核に発現した。次に、細胞核への移行 (局在) の相互依存性を調べたところ、4つの構成因子 (CTR-9, PAFO-1, LEO-1, CDC-73) は、相互依存的に核移行するが、RTFO-1は、単独で核移行できることが判った。この結果は、ヒト細胞を用いた PAF1 複合体構成因子の生化学的な解析結果とともに (Rozenblatt-Rosen et al., 2005)、4つの構成因子はサブコンプレックスを作って核移行し、単独で核移行した RTFO-1タンパク質と核内で相互作用することで機能する機構の存在が示唆され興味深い。

## おわりに

本研究により、PAF1 複合体が細胞自立的に表皮形態形成を制御している可能性が明らかとなった。PAF1 複合体は、多細胞生物で高度に保存されていることから、我々ヒトにおいても同様な機構が存在する可能性も考えられる。高等脊椎動物を用いた今後の PAF1 複合体の表皮形態形成における機能解析に興味もたれる。

「PAF1 複合体が、表皮細胞で特異的なターゲット遺伝子の発現を制御することで表皮形態形成を制御する」未知の遺伝子ネットワークが存在する可能性が考えられるが、PAF1 複合体のターゲット遺伝子については現時点では不明のままである。今後は、当初予定していた細胞タイプ特異的な遺伝子機能ノックダウン法による解析を行うことで PAF1 複合体のターゲット遺伝子を同定し、さらに解析をすすめることで、我々ヒトを含む多細

胞生物で進化的に保存された PAF1 複合体による形態形成制御機構の解明をめざしていきたい。

## 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1件)

Yukihiko Kubota, Kenji Tsuyama, Yusuke Takabayashi, Nami Haruta, Naoko Iida, Rika Maruyama, Asako Sugimoto  
The PAF1 complex is involved in embryonic epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*  
査読有、*Dev Biol*, 391-1 巻、2014 年、43-53  
doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.04.002

[学会発表] (計7件)

津山 研二, 久保田 幸彦, 高林 佑輔, 丸山理香, 飯田 直子, 杉本 亜砂子  
「線虫 *C. elegans* 胚の表皮形態形成に関与する PAF1 複合体の発現パターンおよび核内局在制御解析」  
日本分子生物学会第 35 回年会  
2013 年 12 月 3 日  
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

Yukihiko Kubota, Yusuke Takabayashi, Kenji Tsuyama, Nami Haruta, Rika Maruyama, Asako Sugimoto  
The PAF1 complex is essential for epidermal morphogenesis in *C. elegans* embryos.  
19<sup>th</sup> international worm meeting  
2013 年 6 月 29 日  
アメリカ・ロスアンゼルス・UCLA

久保田 幸彦, 高林 佑輔, 丸山 理香, 杉本 亜砂子  
「線虫 *C. elegans* の表皮形態形成に PAF1 複合体は必須の役割を果たす」  
日本分子生物学会第 35 回年会  
2012 年 12 月 12 日  
福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

久保田 幸彦, 高林 佑輔, 丸山 理香, 杉本 亜砂子  
「線虫 *C. elegans* の表皮形態形成に PAF1 複合体は必須の役割を果たす」  
日本動物学会第 83 回大会  
2012 年 9 月 13 日  
大阪大学 (大阪府大阪市)

Yukihiko Kubota, Yusuke Takabayashi,  
Rika Maruyama, Asako Sugimoto  
The PAF1 complex is essential for  
epidermal morphogenesis in *C. elegans*  
embryos.  
EMBO meeting: Morphogenesis and Dynamics  
of Multicellular Systems  
2012年9月8日  
ドイツ・ハイデルベルク

Yukihiko Kubota, Yusuke Takabayashi,  
Rika Maruyama, Asako Sugimoto  
The PAF1 complex is essential for  
epithelial morphogenesis in *C. elegans*  
embryos.  
5th East Asia *C. elegans* Meeting  
2012年6月29日  
台湾・台北

高林 佑輔, 久保田 幸彦, 丸山 理香,  
杉本 亜砂子  
RNAi screening of genes involved in  
epithelial morphogenesis in *C. elegans*  
日本分子生物学会第34回年会  
2011年12月13日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保田 幸彦 (KUBOTA YUKIHIKO)  
東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号: 70333325

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし