

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440002

研究課題名(和文)精子形成異常を示す新規線虫変異体の原因遺伝子同定と作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification of the gene responsible for the spermatogenesis defects of a *C. elegans* mutant

研究代表者

牛田 千里 (Ushida, Chisato)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50250593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：線虫MT16939は、申請者が新規ncRNAの機能解析を行う過程で得た変異体である。この株はIV番染色体に616 bpの欠失をもつ。この領域には2つのタンパク質遺伝子の一部と一つの核小体低分子RNA (snoRNA)がコードされている。MT16939は精子形成と胚発生、野生株N2の雄を交配させた得た受精卵の形に異常を示す。本研究ではこれらの表現型と3つの遺伝子との関係を明らかにするために9種類の新規線虫株を作製し、遺伝学的解析を行った。その結果、それぞれの遺伝子単独では精子形成は回復しないこと、受精卵の形にはsnoRNA遺伝子が関与することの示唆を得た。

研究成果の概要(英文)：MT16939 is a *Caenorhabditis elegans* mutant which lacks a region of chromosome IV. There are parts of protein coding genes of unknown function and a small nucleolar RNA (snoRNA). MT16939 shows spermatogenesis defects, embryonic development defects and an egg-shape change. To understand the relationships between the genes and the phenotype alterations, nine novel strains of *C. elegans* were prepared by microinjection or MosSCI system. The spermatogenesis defects and the embryonic development defects could not be recovered by the introduction of each gene. It is possible that two or three of these genes are required for the recoveries. The change of egg-shape was rescued by the introduction of snoRNA gene.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム U8 snoRNA 精子形成 胚発生 受精卵 卵殻

## 1. 研究開始当初の背景

線虫 MT16939 は、申請者が新規 ncRNA の機能解析を行う過程で得た変異体である (Hokii, Y. et al. 2010)。この株は IV 番染色体に 616 bp の欠失をもつ。この領域には 3 つの遺伝子 T26A8.2, *cer-2a*, T26A8.4 が存在する。T26A8.2 と T26A8.4 はいずれも機能未知のタンパク質をコードする。MT16939 では両者とも 3' UTR の一部が欠失している。*cer-2a* は T26A8.2 と T26A8.4 の間にあり、核小体低分子 RNA (CeR-2a RNA) をコードしている。MT16939 ではこの遺伝子全体が欠失している。MT16939 は高温で培養した場合、成熟した精子が形成されず、未受精卵のみを輩出する。その原因は T26A8.2, *cer-2a*, T26A8.4 のいずれか、あるいはその中の 2 つまたはすべてが欠損したためと予想された。これらいずれの遺伝子もこれまで精子形成に関与するとの報告はなく、いずれが原因であっても精子形成に係る新規の遺伝子となる。

線虫を対象とした様々なオミックス研究の結果は T26A8.2 と T26A8.4 に関するいくつかの情報を提供している。T26A8.2 は膜貫通タンパク質をコードしており、その発現は神経細胞に見られる。T26A8.4 タンパク質は C3H 型 Zn フィンガーをもち、RNA に結合すると予想される。一方、*cer-2a* については申請者らのこれまでの研究から、その産物が無脊椎動物で初めての単離例となる U8 snoRNA ホモログであり、rRNA 前駆体のプロセッシングに機能することが示唆された (Hokii et al., 2010)。

T26A8.4 や *cer-2a* が原因遺伝子である可能性は生殖細胞の発生に関するこれまでの報告からも多分に考えられる。例えば、T26A8.4 と同様に C3H 型 Zn フィンガーをもつタンパク質が、翻訳や mRNA の安定性を制御することで生殖細胞の発生をコントロールすることが示唆されている (Moor, J. and Lasko, P. 2009)。また、rRNA の成熟に支障をきたした線虫変異体が生殖細胞の腫瘍化や減少を示す例が報告されている (Voutev et al. 2006; Kudron and Reinke, 2008)。T26A8.4 や *cer-2a* の欠損が MT16939 の精子形成異常の原因となっているのであれば、それらの分子機能を明らかにすることは、精子形成における新たな遺伝子ネットワークを発見し、その分子基盤を理解することにつながる。

## 2. 研究の目的

MT16939 の精子形成不全が T26A8.2, *cer-2a*, T26A8.4 のいずれの欠損に起因するのか明らかにする。また、特定した遺伝子の産物がどのように精子形成に関与するか遺伝学的・生化学的解析を行い、その作用機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) MT16939 において *cer-2a* の発現は消失し、T26A8.4 の発現は減少する。一方、T26A8.2 の発現は、転写産物レベルではあるが、野生

株に比べてわずかに増加する。MT16939 の精子形成異常はこれらの遺伝子の発現変化に起因すると考え、*cer-2a* および T26A8.4 を顕微注入法と MosSCI 法により MT16939 に導入して精子形成を観察した。一方、T26A8.2 に関しては顕微注入法により野生株 N2 に導入して、通常より発現が増加した状態をつくり、MT16939 と同様の精子形成異常が観察されるか調べた。精子形成の観察については微分干渉顕微鏡により貯精囊の中にある精子の形態を観察することと、それらの DAPI 染色像を蛍光顕微鏡により観察することで行った。

(2) MT16939 の T26A8.2, *cer-2a*, T26A8.4 の欠損にともなって他の遺伝子の発現が変化していることを想定し、MT16939 のタンパク質遺伝子の発現解析を RNA-seq により行った。25°C で L1 から培養した野生株 N2 と変異株 MT16939 から RNA を抽出し、イルミナ TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit を用いて cDNA ライブラリーを作製し、MiniSeq システムを用いて配列解析を行った (千葉工業大学・河合剛太教授の協力による)。

(3) rRNA の成熟に支障をきたした線虫変異体が生殖細胞の腫瘍化や減少を示す例が報告されている (Voutev et al. 2006; Kudron and Reinke, 2008)。MT16939 の精子形成不全が *cer-2a* の欠損による rRNA 成熟不全に起因すると仮定し、MT16939 のリボソームの解析を行った。MT16939 の細胞抽出液をショ糖濃度勾配遠心法により分画し、40S サブユニット、60S サブユニット、80S リボソームの分布を野生株と比較した。また、MT16939 に MosSCI 法で *cer-2a* を導入した線虫株についても同様の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 本研究では新規に 9 種類の線虫株を作製した。野生株 N2, 変異株 MT16939, 変異株 EG4322 とともに合計 12 種類の線虫株を用いて実験を行った。表 1 に各株の名前と遺伝子型を示す。EG4322 は MosSCI 法を用いて II 番染色体に目的遺伝子を導入するための領域をもつ線虫変異株である。MTEG は MT16939 と EG4322 を交配して得た株で、II 番染色体に目的遺伝子を導入するための領域をもち、IV 番染色体に MT16939 と同様の欠失領域をもつ株である。MEcer は MTEG の II 番染色体に野生型 *cer-2a* を組込んだ株で、ME8.4 は MTEG の II 番染色体に野生型 T26A8.4 を組込んだ株である。MEMex8.4 は MEMex8.4 の II 番染色体に組込んだ T26A8.4 の上流に生殖細胞で働く *mex-5* プロモーターを組込んだものである。また、MEMex8.4GFP はその T26A8.4 の下流に *gfp* を融合させてその発現をモニターできるようにした株である。MEMex8.4tbb は II 番染色体に組込んだ T26A8.4 の 3'UTR をチューブリン遺伝子の

3'UTR と交換したものであり、MEMex8.4GFP<sub>tb</sub> は *gfp* を融合させてその発現をモニターできるようにした株である。MTcer, MT8.4 はそれぞれ *cer-2a* および T26A8.4 を染色体外にアレイとして保持させた (extrachromosomal array) 株である。なお、本研究で作製したこれら線虫株の名称はまだ正式なものではない。

表1 本研究で使用・作製した線虫株

株	遺伝子型
N2	(野生株)
MT16939	<i>t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
EG4322	<i>ttTi5605 II; unc-119 (ed9) III</i>
MTEG	<i>ttTi5605 II; unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
MEcer	<i>cer-2a (+) Cbr-unc-119 (+) II; unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
ME8.4	<i>t26a8.4 (+) Cbr-unc-119 (+) II; unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
MEMex8.4	<i>Pmex-5::t26a8.4(+)</i> <i>Cbr-unc-119(+)</i> II; <i>unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
MEMex8.4GFP	<i>Pmex-5::t26a8.4::gfp::3' UTR8.4(+)</i> <i>Cbr-unc-119 (+) II; unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
MEMex8.4tbb	<i>Pmex-5::t26a8.4::3'UTRtbb(+)</i> <i>Cbr-unc-119 (+) II; unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
MEMex8.4GFP <sub>tb</sub>	<i>Pmex-5::t26a8.4::gfp::3' UTRtbb(+)</i> <i>Cbr-unc-119 (+) II; unc-119 (ed9) III; t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV</i>
MTcer	<i>t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV; Ex1 [cer-2a (+)]</i>
MT8.4	<i>t26a8.2 cer-2a t26a8.4 IV; Ex1 [t26a8.4 (+)]</i>

顕微注入法により *cer-2a* および T26A8.4 を MT16939 に導入した株 (MTcer 株, MT8.4 株) でそれぞれの発現を RT-PCR により確認したところ、前者は発現が確認できたが、後者はできなかった。MT8.4 株で導入した DNA の設計は T26A8.4 のコード領域とその上流約 1 kbp および下流約 200 bp を PCR で増幅しベクターに組込んだものである。T26A8.4 の発現が確認できなかった原因は導入した DNA にプロモーターが存在しないか、存在しても働かない、もしくは RNAi により発現が抑えられた等の可能性が考えられた。顕微注入法では導入する遺伝子のコピー数を制御することが難しい。そこで遺伝子の導入方法を MosSCI 法に変えた。また、プロモーターに

生殖細胞での働きが確認されている *mex-5* プロモーターを用いた。その発現をタンパク質レベルでモニターするために *gfp* を T26A8.4 に融合させた。こうして得た MEMex8.4GFP 株では GFP が生殖細胞の核に検出され、T26A8.4 の核局在が示された (図1)。

残念なことに *cer-2a* および T26A8.4 を発現させたどの株においても精子形成は回復しなかった。

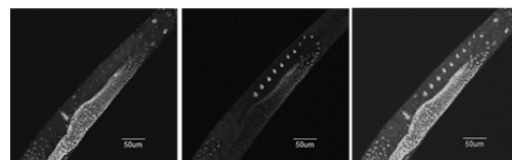


図1. T26A8.4 の発現.

左 : 成虫の DAPI 染色像.

中央 : T26A8.4::GFP の発現.

右 : DAPI 染色像と T26A8.4::GFP 像を重ね合わせた像.

T26A8.2 は MT16939 において増加している。したがってこれを MT16939 に導入して発現させても精子形成不全は回復しないと予想した。そこで、かわりに野生株 N2 で T26A8.2 を過剰発現させ、その精子を観察した。しかし、この場合も精子形成の回復は見られなかった。

以上の結果から、MT16939 の精子形成異常には T26A8.2, *cer-2a*, T26A8.4 の 3 つの遺伝子のうち複数に関与している可能性がある。

(2) MT16939 におけるタンパク質遺伝子の発現変化を把握するために mRNA に対する RNA-seq を行った。野生株に比べて 2 倍以上の発現変動を示す遺伝子の中に精子形成に関与する遺伝子が複数含まれており、MT16939 の変異がこれらの遺伝子の発現変化を引き起こし、精子形成異常に結びついたと考えられる。これらの遺伝子と T26A8.2, *cer-2a*, T26A8.4 との関係を精査することで、精子形成に関する新たな遺伝子ネットワークの発見につながるものと期待できる。

(3) *cer-2a* は U8 snoRNA ホモログであり、rRNA 前駆体のプロセッシングに関与することが強く示唆されていた。実際、MT16939 では 5.8S rRNA と 26S rRNA を含む rRNA の前駆体 *c'* (pre-rRNA *c'*) が蓄積する (図2)。ただし MT16939 では T26A8.2 および T26A8.4 も部分的に欠失しており、rRNA 前駆体のプロセッシングの不具合が *cer-2a* によるものであるとの確証は未だ得られていなかった。MEcer 株の IV 番染色体は MT16939 株に由来し、*cer-2a* を欠損している。しかし、その II 番染色体に *cer-2a* を 1 コピー挿入してあり、この遺伝子の発現に関しては野生株 N2 とほぼ同じ状況にある。MT16939 の pre-rRNA *c'* の蓄積が *cer-2a* の欠損に起因することを確か

めるため、MEcer, MT16939, N2 における pre-rRNA c' のノザンハイブリダイゼーションによる検出を行った。その結果、MT16939 で増加した pre-rRNA c' の蓄積は cer-2a を導入した MEcer で N2 と同程度にまで減少することを確認できた (図 2)。

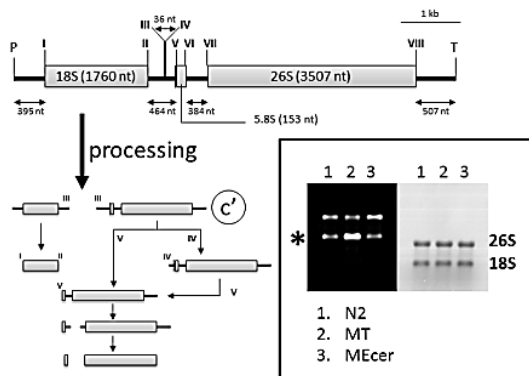


図 2. MT16939 における pre-rRNA c' の蓄積と cer-2a の導入による蓄積の解消。右下の四角の中にノザンハイブリダイゼーションの結果を示す。左の写真；ノザンハイブリダイゼーションの結果。アスタリクスは pre-rRNA c' のバンドを示す。右の写真；メンブレンのメチレンブルー染色の像。

(4) MT16939 の精子形成に関する表現型解析を進めていく中で、これが胚発生にも異常を示すことを見出した。25°C で L1 から培養し成熟した精子をつくらない MT16939 の雌雄同体と N2 の雄を交配して受精卵を得た。この受精卵は 100-300 細胞期の時期で胚発生を停止した。さらに、その受精卵の形態が、楕円形である N2 の受精卵に比べて円に近いことも明らかにした。その形は cer-2a を導入した MEcer の雌雄同体と N2 の雄の交配により得られた受精卵で回復した。受精卵の形は卵殻の形成により規定される。cer-2a の機能と卵殻形成との間にどのような関係があるか明らかにすることは今後の課題の一つである。

## 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 1 件)

牛田 千里. small structured ncRNA の機能ゲノミクス、日本マイコプラズマ学会雑誌、第 41 巻、15-18 ページ、2014 年。

[学会発表] (計 9 件)

① Takashi Koyama, Megumi Endo, Daii Ozaki, Takehiro Chiba, Chisato Ushida. A novel mutant of *Caenorhabditis elegans* showing spermatogenesis and embryogenesis defects, UGAS symposium, 2016 年 12 月 17 日, Morioka.

② 小山 昂志、長島 哲治、尾崎 大意、遠藤愛、牛田 千里、線虫 CeR-2a RNA 遺伝子欠損株における 60S リボソームサブユニットの減少、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、横浜市。

③ Tetsuharu Nagashima, Takashi Koyama, Daii Ozaki, Chisato Ushida. A putative *C. elegans* U8 snoRNA gene mutant shows the defect in ribosome biogenesis, 2016 年 6 月 30 日, RNA2016, Kyoto.

④ 小山 昂志、長島 哲治、尾崎 大意、牛田 千里、線虫 CeR-2a 核小体 RNA の欠損によるリボソーム生合成異常、2016 年 5 月 21 日、日本生化学会東北支部第 82 回例会、弘前市。

⑤ 小山 昂志、遠藤 愛、尾崎 大意、千葉剛大、牛田 千里、精子形成異常および初期胚発生異常を示す線虫新規変異体の解析、2015 年 12 月 2 日、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸市。

⑥ 小山 昂志、尾崎 大意、遠藤 愛、牛田 千里、線虫核小体 RNA 遺伝子欠損株 MT16939 が示す精子形成異常と胚発生異常、第 3 回リボソームミーティング、2015 年 3 月 17 日、宮崎市。

⑦ 小山 昂志、遠藤 愛、保木井 悠介、尾崎 大意、牛田 千里、線虫核小体低分子 RNA 遺伝子および周辺遺伝子の欠損変異体が示す精子形成異常と初期胚発生異常、第 16 回日本 RNA 学会年会、2014 年 7 月 23 日、名古屋市。

⑧ 牛田 千里、small structured ncRNA の機能ゲノミクス、第 41 回日本マイコプラズマ学会、2014 年 5 月 22 日、東京都文京区。

⑨ Takashi Koyama, Megumi Endo, Yusuke Hokii, Chisato Ushida. Novel spermatogenesis-defective gene candidates, 2013 年 6 月 27 日, California, USA.

[図書] (計 1 件)

小山 昂志、牛田 千里。その他の安定低分子 ncRNA。廣瀬哲郎、泊幸秀編、ノンコーディング RNA : RNA 分子の全体像を俯瞰する。2016 年、pp. 50-58. 化学同人。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛田 千里 (USHIDA, Chisato)

弘前大学・農学生命科学部・准教授  
研究者番号：50250593

(2)研究分担者

武藤 あきら (MUTO, Akira)  
弘前大学・農学生命科学部・研究員  
研究者番号：80034635

姫野 俵太 (HIMENO, Hyouta)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号：80208785

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし