

遺伝学的手法を用いたホヤ母性 mRNA 研究の展開

佐藤 瑛生 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 笹倉 靖徳 (筑波大学 生命環境系)

・背景・目的

動物の卵には、母親由来の mRNA やタンパク質などの分子が蓄積されており、これらを総称して母性因子という。これらの分子は、発生過程において胚性の遺伝子発現が始まる以前から分化制御や形態形成などに重要な役割を果たしていることが知られており、動物の発生を理解する上でそれらの機能解明は欠かせない。また母性因子には卵や初期胚の特定の領域に局在して機能するものがあり、特にそのような因子は初期発生において中心的に働くため、その局在メカニズムや機能に興味を持たれている。脊索動物であるホヤの卵は典型的なモザイク卵であることで 100 年以上も前から発生の好材料として研究が進められてきた。このホヤ卵の中では特徴的な局在パターンを示す一群の mRNA が見つかっており、postplasmic/PEM RNA 群と呼ばれている。この RNA 群は未受精卵では卵表層に存在しているが、受精後の細胞質再配置によりまず植物極側に、ついで後極へと輸送される。この過程にはアクチン繊維や微小管等の細胞骨格が必須であることが示されているが、実際に mRNA を卵の中で移動させる分子の実態については未だ分かっていない。私は細胞骨格上を移動して物質の輸送を行うモータータンパク質に注目して mRNA 局在メカニズムに関わる因子の解明を目指している。本研究の達成のためには、ホヤの卵で発現しているモータータンパク質を同定する必要があり、本研究ではゲノム情報を元にしてその同定を試みた。

また、卵での発現が確認されたモータータンパク質に関しては、その遺伝子を機能阻害することを通じて局在への機能を検討する。この遺伝子機能阻害には、当研究室で確立されている母性での遺伝子機能を特異的に阻害する遺伝学的手法を用いる。しかしこの技術に関しては不明な点が多い。そのため、この手法において母性での遺伝子機能阻害を起こすために必要な条件について検討した。

・方法・結果

1. mRNA 局在に関わる因子の同定

ホヤの一種カタユレイボヤではゲノム配列が解析されている。ホヤの遺伝子データベースにおいて、カタユレイボヤのモータータンパク質関連遺伝子の検索を行った。検索結果のリストから、actin や tubulin など、既に機能が判明している遺伝子ならびに mRNA 局在への関連がないと強く予想される遺伝子を除いた。続いて EST 情報を利用して、卵で EST が確認されていない遺伝子(すなわち卵で発現しないことが強く示唆される遺伝子)を候補から除外した。その結果、17 遺伝子を得た。

これら 17 遺伝子が実際に卵で発現していることを確かめるため、これらの遺伝子の発現の様態を whole-mount in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH) により解析した。WISH のサンプルには受精卵と 8 細胞期胚を用いた。その結果、10 種類の遺

伝子について卵及び初期胚における発現を確認できた。そのうち、6 種類が myosin ファミリー、2 種類が kinesin ファミリーの遺伝子であった。kinesin とは対照的に、今回の実験では卵における dynein の発現は確認されなかった。また、motor activity への関与が示唆されている DACH1、PIK3C2 の遺伝子も発現が確認された。

2. 遺伝子機能阻害に向けた条件検討

現在確立されている遺伝子機能阻害方法では、標的とする遺伝子の転写調節領域並びに 5' UTR の下流に GFP をコードする遺伝子を繋いだ DNA をホヤに導入してトランスジェニック系統を作成することでノックダウンを起こす。この手法において、レポーター遺伝子 GFP への依存度を確かめる目的で、GFP を他のレポーター遺伝子に換えた場合にノックダウンが起こるか検討した。GFP を DsRed, Kaede, Azami Green のそれぞれに換え、pem 遺伝子を標的としてノックダウンの有無を観察したところ、これらの系統において pem 遺伝子のノックダウンが確認された。

・考察

postplasmic/PEM RNA に関して、「背景」にも書いたように局在は 2 ステップで生じることが判明している。最初のステップである植物極側への移動にはアクチン繊維を介していると考えられており、その後の後極への輸送は微小管を介して行われる。今回の実験では卵における myosin と kinesin の発現が確認された。この結果は、植物極側への mRNA 輸送には myosin が、後極への輸送には kinesin がそれぞれ関わっている可能性を示唆する。また、今回 dynein の発現が確認されなかったが、このことは、微小管のマイナス端方向へ移動する性質の dynein が一般的に細胞の中心方向への輸送に関わっていることを踏まえ、postplasmic/PEM RNA が細胞表層に局在することと矛盾しない。

機能阻害の条件検討については、ノックダウンを起こすために GFP が必須で無いことが示された。ノックダウンの起こるメカニズムに関しては依然不明であるが、組み込んだ遺伝子の転写産物が何らかの理由で断片化されて small RNA 様の機能を果たした結果、標的遺伝子の転写抑制が起こるのではないかという仮説が考えられる。

・今後の実験計画

今回の実験で、mRNA 局在メカニズム関連遺伝子の候補をいくつか絞り込んだ。今後はこれらの遺伝子の母性発現をノックダウンする系統を作製することを通じて、母性 mRNA の局在メカニズムを解明したい。また、当研究室の母性遺伝子機能阻害法がなぜ生じるのかについてもアプローチしたい。