

研究課題別評価

1. 研究課題名 線虫における生殖顆粒の機能解析

2. 研究者氏名 川崎 一郎

3. 研究の狙い：

多細胞動物において、世代間の遺伝情報の伝達は全能性と不死性という特別な性質を持った生殖系列によって営まれている。様々な動物の生殖細胞には生殖顆粒と呼ばれる特異的な構造が見られるが、生殖系列が体細胞系列に見られない特別な性格を持つために、この生殖顆粒が重要な働きをしていると考えられている。本研究では線虫 *C. elegans* の生殖顆粒の分子実体をより明らかにし、その構成成分が、どのような分子機構で機能し、また相互作用しているかを解析する。そして、それらの積み重ねにより、生殖顆粒が全体として生殖系列の発生にどのような生物学的役割を果たしているのかを分子機構的に明らかにしていくことを目指す。

4. 研究結果：

線虫 *C. elegans* の生殖顆粒「P 顆粒」の構成成分である PGL-1 と相互作用する蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングし、同じ蛋白質ファミリーに属する PGL-2 と PGL-3、さらに mRNA の 5' cap 結合蛋白質で翻訳開始制御因子である eIF4E のひとつ、IFE-1 を検出した (線虫には他の真核生物と異なり5つの eIF4E、IFE-1 が存在する)。さらに抗体を用いた解析により、PGL-2 と PGL-3 も PGL-1 と同様に P 顆粒の構成成分であること、また IFE-1 も PGL-1 の存在に依存して P 顆粒に局在できることを明らかにした。IFE-1 は生殖系列に特異的に発現する eIF4E のひとつで、その機能を阻害すると精子機能が異常になる。PGL-1 と IFE-1 の相互作用の発見は、PGL-1 が精子形成に必要な mRNA の翻訳制御に関与している可能性を示すものである。加えて、PGL-1 と別の翻訳開始制御因子 IFF-1 (生殖系列に特異的に発現する eIF5A のひとつ) の相互作用も発見され、PGL ファミリー蛋白質の翻訳制御への関与の可能性がますます強くなると示唆された。さらに PGL ファミリー蛋白質のうち、少なくとも PGL-3 は孵化後の生殖系列の発生において PGL-1 と重複して機能していることも逆遺伝学的解析から明らかになった。

次に、RNA 結合蛋白質である PGL ファミリー蛋白質に結合する生殖顆粒の RNA 成分 (または生殖系列に特異的な mRNA) を同定するために、酵母 tri-hybrid 法を用いて線虫 cDNA ライブラリーから PGL-1, PGL-3 と相互作用する mRNA(cDNA) クローンをスクリーニングし、これまでに PGL-1 または PGL-3 と結合し、生殖系列で発現、機能する mRNA クローンを複数同定した。現在、野生型および *pgl-1; pgl-3* 二重変異体の粗抽出液から抗 PGL-1 抗体を用いて免疫共沈法により PGL 蛋白質/RNA 複合体を回収し、それぞれの共沈複合体から定量的 RT-PCR により上記の mRNA クローンが検出できるかどうかを確認中である。そして、それらが PGL ファミリー蛋白質や、IFE-1、IFF-1 によって実際にどのような (翻訳) 制御を受けているかを、今後、分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

5. 自己評価：

当初の研究計画のうち、PGL-1 と相互作用する蛋白質に関しては、新たに幾つかのものが同

定でき、またそれらの機能とPGL-1との相互作用についても新たな知見を得ることができた。PGLファミリー蛋白質に結合するRNAの単離同定に関しては、Yeast tri-hybrid法という新たな手法を用いることにより複数のクローンを得ることができたが、その正当性や機能、さらにそれらのRNAのPGLファミリー蛋白質による制御のメカニズムに関しては、ほとんど解析することができなかった。本研究期間終了後も、それらの研究を継続していくつもりである。

6. 研究総括の見解：

発生生物学の古典的な重要課題のひとつである生殖顆粒の分子実態を、その構成成分として知られていたPGL-1に着目し解析を試みた。PGL-1と相互作用するタンパク質やPGLファミリーに結合するRNAを複数発見し一通りの成果を得た。その意味では、目的を概ね達成したと評価する。今後方法論の改善に意を用い、得られた成果を生かして当初の目標に肉迫して欲しい。

7. 主な論文等：

原著論文

1. Kawasaki, I., A. Amiri, Y. Fan, N. Meyer, S. Dunkelbarger, T. Motohashi, T. Karashima, O. Bossinger, Y. Kohara, and S. Strome
2. The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *C. elegans* germline development.
3. Submitted to *Genetics* in October 2003.
4. Hanazawa, M., I. Kawasaki, H. Kunitomo, K. Gengyo-Ando, K. L. Bennett, S. Mitani, and Y. Iino
5. The *C. elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1.
6. Submitted to *Mech. Dev.* in August 2003 (Revised on December 22, 2003).
7. Iwahashi, J., I. Kawasaki, Y. Kohara, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, Y. Ohshima, N. Hamada, K. Hara, T. Kashiwagi, and T. Toyoda
8. *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis.
9. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 293: 698-704 (2002).
10. Amiri, A., B. D. Keiper, I. Kawasaki, Y. Fan, Y. Kohara, R. E. Rhoads, and S. Strome
11. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*.
12. *Development* 128: 3899-3912 (2001).

総説・著書

1. 川崎一郎 「特殊化された生殖細胞の形成」 飯野雄一 / 石井直明 編 「線虫 究極のモデル生物」 (シュプリンガー・フェアラーク東京) pp.65-77 (2003)
2. 川崎一郎 「線虫初期胚で生殖質の局在化を制御する分子機構」 松居靖久監修 特集 「生殖細胞形成の根本原理を求めて」 *細胞工* Vol.22 No.10 (秀潤社) pp.1061-1064 (2003)