

2014年度 博士研究員研究成果報告書

氏名（所属研究室） 高野 智美（理工学研究科 西脇研究室）
研究課題 ADAMTS プロテアーゼによる器官形成の制御機構
研究期間 2014年4月1日～2015年3月31日
研究成果概要

線虫生殖巣はチューブ状上皮でできており、L1 幼虫期の腹側中央付近でできた2つの生殖巣リーダー細胞 DTC (Distal Tip Cell) が、前側と後ろ側の反対方向へ生殖巣を誘導しながらU字型に移動し2つのU字型に伸長した生殖腕からなる生殖巣を形成する。

研究室では、これまでに遺伝学的解析により生殖巣形成異常を示す変異体 (DTC の移動の異常など) の原因遺伝子が ADAMTS-10 のオルソログである *mig-17* で、そのサプレッサーとして基底膜構成要素であるフィブリン (*fbl-1*) や typeIV コラーゲン (*let-2*) など複数の遺伝子を同定している(Y Kubota, et al.(2004) Curr. Biol., Y Kubota, et al. (2008) PNAS)。このことから、基底膜分子は生殖巣伸長に重要な役割を果たしていることがわかる。また、他の研究室からも、ADAMTS-9 や ADAMTS-20 のオルソログである *gon-1* 遺伝子が生殖巣伸長異常の原因遺伝子で(R Belloch & J Kimble (1999) Nature)あることと、*gon-1*、*fbl-1* いずれの変異体も生殖巣伸長異常を示すが、*fbl-1gon-1* 二重変異体では生殖巣が伸長できるようになり、遺伝学的に FBL-1 と GON-1 が拮抗的に働く (D Hesselson, et al.(2004) Curr. Biol.) ことが報告されている。その後、*fbl-1* 欠損変異体の遺伝的サプレッサーとして、typeIV コラーゲン遺伝子 (*emb-9*) の機能獲得型変異が同定され、*fbl-1* 欠損変異体では EMB-9 タンパク質の減少が見られたが、EMB-9 の機能獲得型変異を同時に持つ二重変異体ではタンパク質が回復していることがわかった (Y.Kubota, et.al.,2012 Genetics)。このことから、FBL-1 と GON-1 は生殖巣上で EMB-9 タンパク質の量を調節しているのではないかというモデルが示されている。しかし、*gon-1* と *fbl-1* 変異体で、実際に EMB-9 タンパク質量の比較はされていない。そのため、本研究では、生殖巣伸長異常を示す *fbl-1*、*gon-1* や *fbl-1gon-1* 変異体を用いて、FBL-1 や GON-1 が生殖巣伸長過程において、基底膜上の EMB-9 タンパク質量に影響を与えているのか調べ、生殖巣形成過程における ADAMTS メタロプロテアーゼの基底膜の制御機構を明らかにすることを目指している。

昨年度までに、① EMB-9 タンパク質に Dendra (UV 照射により不可逆的に緑色から赤白に変換する蛍光タンパク質) を融合したタンパク質を使って、*gon-1(e1254)* 変異体、*fbl-1(tk45)* 変異体や *fbl-1(tk45)gon-1(e1254)* 二重変異体の生殖巣基底膜上に UV を照射し、その後 0,4,8 時間後の EMB-9 タンパク質の緑色と赤色のタンパク質の蛍光強度を測定した。その後、② 赤色の蛍光強度の減少と緑色の蛍光強度の増加から、タンパク質の分解と蓄積の比率を計算していた。結果、野生型では 8 時間後のタンパク質の分解と蓄積の比率はそれほど変わらないパターンを示したのに対して、*gon-1(e1254)* 変異体では分解比率が野生型よりも低く、逆に *fbl-1(tk45)* 変異体では蓄積比率が野生型よりも低く、*fbl-1(tk45)gon-1(e1254)* 変異体では分解と蓄積のいずれも比率も野生型よりも低い、野生型と同じようなパターンを示していた。これらから、分解と蓄積のバランスが生殖巣伸長には必要なのだろうと考えている。しかし、その後検証過程において、蛍光強度のばらつきが多く、原因として使用している *emb-9::dendra* の虫が染色体に多コピー挿入されている虫で遺伝子サイレンシングが起きているのではないかと考えられた。

今年度はこの問題を解決し、再現性を検証することにした。まず、染色体に遺伝子が1コピーのみ挿入される株を作製するため、mosSCIシステムとminiMosシステムを用いた。しかし、1コピーになると蛍光強度が弱くなる可能性が考えられたため、dendraよりも蛍光強度が強く、同様にUV照射により不可逆的に緑色から赤色に変換するmkikGR (monomeric kikume Green-Red) を使って、emb-9::mkikGRを作製し同様に挿入株を作製した(図1参照)。すべての株において多コピー挿入された株よりもばらつきが少ないことがわかった。しかし、多コピー挿入された株よりも緑色の蛍光が弱いことがわかった。そこで、サイレンシングが起こりにくそうな染色体の真ん中あたりに挿入され、かつ蛍光強度が明るかった emb-9::mkikGRのlineのひとつ tkTi11 を用いて再現性を見ることにした。野生型では、8時間後、多コピーが挿入された株で見られたのと同様に、生殖巣伸長先端(DTC細胞)上の基底膜での分解と蓄積比率があまり変わらなかったが、gon-1(e1254)変異体では分解比率は野生型よりも低かったが蓄積比率が野生型よりも高かった。これについては、1コピーを挿入した株で蛍光強度を見ることで、よりばらつきが少ない状態で計測することができ差が見られるようになった可能性を考えている。また、生殖巣を取り囲むように存在するsheath細胞の基底膜では、gon-1(e1254)変異体は分解と蓄積の比率は少し下がっているが野生型と同様のパターンを示していた(図2参照)。

現時点において、変異体間(gon-1(e1254)、fbl-1(tk45)やfbl-1gon-1(tk45e1254))で比較できておらず再現性を見る必要はあるが、生殖巣伸長先端(DTC細胞)でEMB-9タンパク質の分解が起こりつつ新たに合成されたEMB-9が蓄積することが生殖巣伸長に必要で、分解と蓄積比率のバランスが重要なかもしれないと考えている。ここで、ひとつ懸念される問題として、伸長が止まった結果としてEMB-9の分解や蓄積が異常になっている可能性、つまり、伸長(DTCの移動)とEMB-9の分解や蓄積が非独立という可能性を残している。これには、基底膜に無関係で生殖巣伸長が止まる(もしくは遅くなる)変異体を用いて、生殖巣が止まっている(もしくは遅くなっている)ときのEMB-9タンパク質の分解や蓄積比率を見ることにより、伸長の異常によりEMB-9タンパク質の分解や蓄積の比率に異常があるのか、分解や蓄積の比率の異常の結果、生殖巣伸長ができていないのかが見えてくるかもしれない。

以上

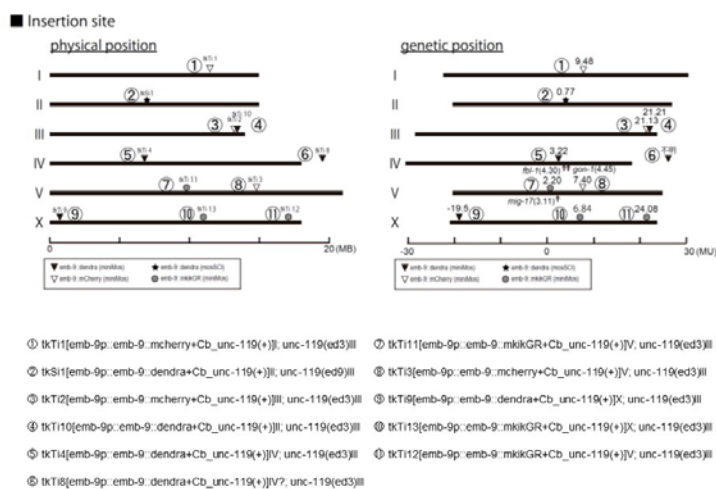


図1 mosSCIまたはminiMosシステムを用いて作製したsingle copy insertionの株のリスト

Turnover rates of collagen IV (0-8時間)

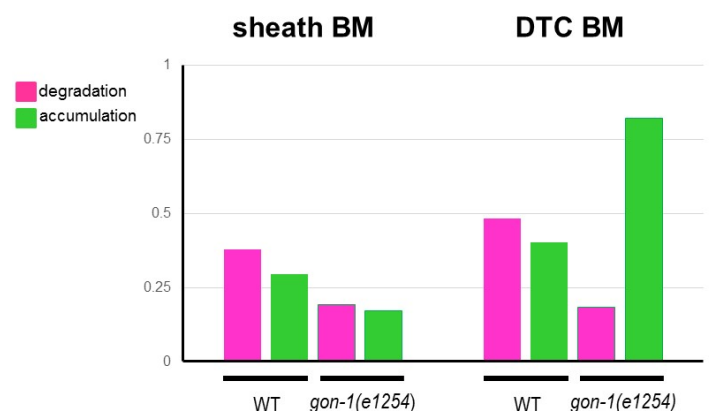


図2 野生型とgon-1(e1254)変異体のsheath細胞の基底膜(sheathBM)と生殖巣伸長端の基底膜(DTC BM)におけるEMB-9::mkikGRの分解と蓄積の比率