



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 線虫 <i>C. elegans</i> 生殖顆粒の形成および生殖細胞特異的分配におけるPGLタンパク質の役割                                                                                         |
| Author(s)    | 米谷, 匡史                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2012, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/59456">https://hdl.handle.net/11094/59456</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                              |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | よね くに まさ ふみ<br>米 谷 匡 史                                                       |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理学)                                                                     |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 5 2 1 0 号                                                                |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 24 年 3 月 22 日                                                             |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物科学専攻                                              |
| 学 位 論 文 名     | 線虫 <i>C. elegans</i> 生殖顆粒の形成および生殖細胞特異的分配における PGL タンパク質の役割                    |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 西田 宏記<br>(副査)<br>教 授 岡田 雅人 特任准教授 木村幸太郎<br>東北大学大学院生命科学研究科教授 杉本亜砂子 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

生殖顆粒は、動物の生殖細胞系列に特異的に分配される RNA-タンパク質複合体 (RNP 顆粒) であり、生殖細胞の形成・分化・維持に不可欠であると考えられている。線虫の生殖顆粒は P 顆粒と呼ばれ、その構成因子として多数のタンパク質や RNA が含まれていることが明らかになっているが、P 顆粒がどのように形成され、生殖細胞系列特異的に分配されるのかについてはまだ不明な点が多い。

PGL-1 と PGL-3 (PGL タンパク質) は、P 顆粒に全発生段階を通して存在する主要構成因子であり、互いに高い相同性を示す (62% identity, 77% similarity)。筆者の所属研究室では、哺乳類培養細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 [CHO 細胞]) をアッセイ系として用いて、PGL タンパク質が自律的に RNP 顆粒を形成することを見出した。さらに、PGL タンパク質を線虫胚体細胞で異所発現すると、自律的に顆粒を形成することが示された。以上から、PGL タンパク質が P 顆粒形成の足場として機能していることが推測された。そこで、P 顆粒形成の足場であると推測される PGL タンパク質の P 顆粒形成における役割および顆粒形成の制御機構に焦点をあてて解析を行った。

まず、PGL タンパク質が P 顆粒形成の足場として機能しているかを調べるために、内在性の PGL タンパク質を欠失させた線虫初期胚において他の P 顆粒構成因子の局在を確認した。その変異胚では、他の P 顆粒構成因子が細胞質に拡散したことから、PGL タンパク質は P 顆粒の構築に重要な役割を持つことが示唆された。さらに、PGL タンパク質が RNP 顆粒形成を調節する分子メカニズムを理解するために、CHO 細胞および線虫胚内での PGL タンパク質のドメイン解析を行った結果、PGL タンパク質の二つの機能ドメインが P 顆粒の形成に寄与していることを発見した。一つは RNA や他の P 顆粒構成因子をリクルートするための RGG box、もう一つは顆粒形成を行うための自己会合ドメイン (I61-479aa) である。以上より、PGL タンパク質が自己会合するとともに RNA に結合することによって P 顆粒が形成されると結論した。

次に、PGL-1 と PGL-3 の、P 顆粒形成過程における異なった役割を調べるために、CHO 細胞と線虫初期胚の生殖細胞系列においてそれぞれの PGL タンパク質の顆粒凝集能を解析した。その結

果、PGL-1 よりも PGL-3 の方が顆粒凝集能力が顕著に高いことを見いだした。また、PGL-3 が生体内でリン酸化されていることを見い出した。PGL-3 の自己会合ドメイン内のいくつかの予測リン酸化残基のうち、322 番目のセリン (S322) をアラニンに置換した PGL-3 (S322A) のみで、CHO 細胞での顆粒形成能の顕著な低下がみられた。次に線虫の生体内で検討したところ、内在性の PGL-1 が存在しない状況下で、GFP::PGL-3 (S322E) は GFP::PGL-3 よりも有意に大きな顆粒を形成したのに対して、GFP::PGL-3 (S322A) は有意に小さな顆粒を作り細胞質に分散することが明らかになった。以上の結果から、PGL-3 の S322 のリン酸化によって P 顆粒の安定性が制御されている可能性が高いことが示唆された。

本研究により、P 顆粒形成の足場タンパク質である PGL タンパク質の自己会合ドメインのリン酸化が細胞周期および細胞極性依存的な P 顆粒の動態制御に重要である可能性が示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生殖顆粒は、動物の生殖細胞系譜の細胞に普遍的かつ特異的に分配される RNA-タンパク質複合体 (RNP) 顆粒であり、生殖細胞の形成、分化、維持に不可欠であると考えられている。今までに多数の動物に生殖顆粒が存在していることが明らかになっており、線虫では特に P 顆粒と呼ばれている。その構成因子として、多数のタンパク質や RNA が含まれていることが明らかになっているが、P 顆粒がどのように形成され生殖細胞系列特異的に分配されるのかについては、まだ不明な点が多い。哺乳類培養細胞と線虫 *C. elegans* の胚細胞を用いて、PGL タンパク質が P 顆粒形成の足場として機能している可能性が高いことが示されていた。そこで、申請者は多細胞生物における生殖顆粒の形成および生殖細胞特異的分配機構の一端を明らかにすることを目指し、P 顆粒形成の足場であると推測されている PGL タンパク質の P 顆粒形成における役割および顆粒形成の制御機構に焦点を当てて解析を行った。

線虫 *C. elegans* において、PGL-1 と PGL-3 (PGL タンパク質) は、線虫の生殖顆粒である P 顆粒に全発生段階を通して存在する主要構成因子である。申請者は、本研究において PGL タンパク質が生殖顆粒形成における足場として機能していることを証明した。次に、哺乳類培養細胞における発現による解析から、PGL タンパク質 (PGL-1 と PGL-3) が自己会合し、RNP をリクルートする能力があることを発見した。PGL タンパク質を欠く線虫初期胚では、他の P 顆粒構成因子が細胞質に拡散したことから、PGL タンパク質は P 顆粒の構築に重要な役割を持つことが示唆された。さらに、*in vivo* でのドメイン解析を行った結果、PGL タンパク質の二つの機能ドメインが P 顆粒の形成に寄与していることを発見した。一つは RNA や RNA 結合タンパク質をリクルートするための RGG box であり、もう一つは球形の顆粒を形成するための自己会合ドメインである。以上の結果より、足場タンパク質である PGL タンパク質が自己会合すると共に RNA に結合することにより、P 顆粒が形成されることが示された。さらに、申請者は PGL タンパク質の顆粒凝集能の制御機構についての解析を行った。まず、PGL-1 よりも PGL-3 の方が顆粒凝集能力高いことを見だし、顆粒凝集に重要な領域を同定した。また、PGL-3 が *in vivo* でリン酸化されていることを発見し、PGL-3 の S322 のリン酸化によって顆粒安定性が制御されている可能性が高いことを見出した。申請者の研究は、線虫初期胚において P 顆粒が細胞周期および細胞極性によってその局在や安定性がダイナミックに制御されていることを示しており、本研究により、足場タンパク質である PGL タンパク質の自己会合ドメインのリン酸化が P 顆粒の細胞周期および細胞極性依存的な動態制御に重要であることが示唆された。

申請者が示した、生殖細胞における足場タンパク質としての二つの機能ドメイン (RNA への結合と自己会合) による生殖顆粒の形成メカニズム、足場タンパク質の自己会合ドメインのリン酸化による、生殖顆粒の動態制御メカニズムは新しい線虫の生殖顆粒形成の理解に資するところが大きい。また、どの生物においても生殖顆粒は特異的な多種類の mRNA とタンパク質からなる RNP 顆粒であることから、申請者が明らかにした生殖顆粒形成の分子メカニズムは、他の多細胞生物においても、生殖顆粒以外の RNP 顆粒においても普遍的なメカニズムである可能性が高く、重要性が高いと考えられる。

このように本論文は新奇性が極めて高く、胚発生における生殖細胞形成という一般的な分野にも大きなインパクトを与えるものであると考えられる。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値があるものと認める。