

ゼブラフィッシュ胚発生過程に発現するRNA結合性蛋白質の網羅的同定

●井上 邦夫

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

研究の目的と進め方

初期発生過程には、多くのRNA結合性蛋白質がさまざまな形で働くものと考えられる。遺伝学的解析の進んでいるショウジョウバエや線虫では、RNA結合性蛋白質が特定のRNAにおけるスプライシング、局在性、翻訳効率などの制御を介して、発生分化過程に重要な役割を果たしている事例が見つかっている。一方脊椎動物では、いくつかの組織特異的RNA結合性蛋白質が同定され、その役割が解析されているが、全体としてRNA結合性蛋白質群の時間的・空間的発現様式の情報は不十分であり、RNA情報発現制御システムが発生分化過程にどのような役割を担っているのか包括的理解を目指すにはほど遠い状況である。本研究では、ゼブラフィッシュを用い、RNA結合性蛋白質をコードする遺伝子群を効率的・網羅的に同定し、脊椎動物の胚発生過程における発現様式の情報を集積していくことを主な目的とする。具体的には、主としてESTデータベース情報を活用してRNA結合性蛋白質をコードするcDNAの同定・取得を進め、各cDNAについて胚発生過程での発現解析を進める。さらに、発現様式の興味深いものについて順次全長cDNAを同定し、各RNA結合性蛋白質の細胞内局在性や結合RNA配列の同定なども行う。

2001年度の当初の計画

ゼブラフィッシュESTデータベースからRNA結合性蛋白質をコードするcDNAクローンを選別・取得する。各クローンについてホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションなどを行い、胚発生過程における発現様式を検討する。

12年度に同定したRRM型RNA結合性蛋白質のうち組織特異的な発現が観察されたもの(seb, etr-3, hermes-1, hermes-2)について、cDNA全長配列の同定を行う。さらに、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った初期胚の切片作成や既知の遺伝子マーカーとの二重染色などにより、発現領域・時期の詳細な検討を行う。

12年度に同定したdsRBD型RNA結合性蛋白質 tenr-1は、ノーザンブロットによる解析から生殖巣に強く発現することがわかっているため、生殖巣について切片 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、発現細胞の特定を行う。

2001年度の成果

- ・ゼブラフィッシュにおいて、新規にnPTB相同遺伝子およびstaufer相同遺伝子を同定した。いずれも神経系などに発現が観察された。
- ・seb, etr-3, hermes-1について全長cDNAを同定した。
- ・sebは筋肉系、水晶体、耳胞等に発現しており、(GU)_n配列に結合することが示唆された。
- ・etr-3は主に神経系で発現する。BrulやEtr-1と同様にURE配列に結合し、選択的スプライシング制御因子として働くことを見いだした。
- ・hermes-1は心臓原基や網膜に発現しており、(CA)_n配列に結合することによって選択的スプライシング制御因子として働くことがわかった。また、翻訳制御因子としても働く可能性が示唆された。
- ・tenr遺伝子は、卵形成過程において、成熟の進んだ卵母細胞の表層領域に母性mRNAが存在することがわかった。

国内外での成果の位置づけ

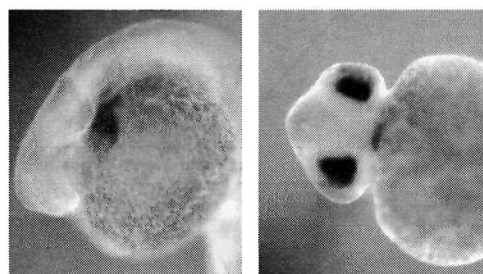
ゼブラフィッシュ初期発生機構の研究は国内外で活発に行われているが、RNA結合性蛋白質に着目した研究は殆どない。また、脊椎動物の選択的スプライシング制御因子はほとんど同定されておらず、本研究成果はRNA情報発現系の理解に大きく貢献するものである。

今後の課題

これまで主に同定してきたRRM型に加え、KH型蛋白質や二本鎖RNA結合性蛋白質についての同定することにより、脊椎動物の発生過程におけるRNA情報発現制御系の包括的に理解できるであろう。

成果公表リスト

1. Nakahata, S., Katsu, Y., Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y., & Yamashita, M. Biochemical identification of *Xenopus pumilio* as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a nanos homolog (Xcat-2) and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein (CPEB). *J. Biol. Chem.* 276, 20945-20953 (2001).
2. Suzuki, H., Jin, Y., Otani, H., Yasuda, K., & Inoue, K. Regulation of alternative splicing of α -actinin transcript by Bruno-like proteins. *Genes to Cells* (in press).



ゼブラフィッシュ hermes の発現様式

24 hr

48 hr