



# Physical interactions of Dmnk with Orb : implications in the regulated localization of Orb by Dmnk during oogenesis and embryogenesis

岩井, 健二

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2444

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002444>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 8 5 】

氏 名・(本 籍) 岩井 健二 (愛知県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1407号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

**Physical interactions of Dmnk with Orb:implications in the  
regulated localization of Orb by Dmnk during oogenesis and  
embryogenesis**

(Dmnk と Orb の物理的会合:卵形成及び胚発生過程  
における Dmnk による Orb の局在制御)

審 査 委 員

主査 教授 山村 博平

教授 南 康博

教授 横山 光宏

### 【緒言】

発生は時間的・空間的プログラムに従う遺伝子発現の反映であり、そのプログラムの始まりは未受精卵に既に書かれている。具体的には卵形成の間に母性遺伝子から転写され卵細胞質内に蓄えられた mRNA あるいは蛋白質等である。特にショウジョウバエにおける体パターン形成は未受精卵における母性 mRNA の分布に依存している。ショウジョウバエにおける胚後極の決定は posterior group genes と呼ばれる一群の母性効果遺伝子によって制御されている。これらの遺伝子から転写された mRNAs が適切な場所に位置することが腹部構造の発達と生殖細胞原基となる極細胞の形成とに必要である。

ショウジョウバエの母性遺伝子のひとつである *Dmnrk* (*Drosophila* maternal nuclear kinases) は核内セリン・スレオニンキナーゼをコードしており、卵形成過程においては卵母細胞に局在し、受精後は極細胞に局限した発現が認められる。*Dmnrk* 蛋白質には択一的スプライシングによって *Dmnrk*-L (long) と *Dmnrk*-S (short) の 2 つの形態があり、それぞれの発生過程における発現動態は異なるが、機能の違いは不明である。また *Dmnrk* は酵母の Rad53、Cds1、線虫の *Ce-cds-1*、哺乳動物の Chk2 の相同分子である。これらのキナーゼは特徴的な構造としてリン酸化特異的な蛋白質間相互作用モチーフである forkhead-associated (FHA) 領域を有し、細胞周期のチェックポイント制御、DNA 修復、減数分裂時の相同組換えといった様々な過程で必須の役割を担うことが示されている。*Dmnrk* の機能は殆ど未知であるが、卵形成過程、胚発生過程における特徴的な分布から減数分裂や生殖細胞系の樹立といった過程において機能する可能性が示唆される。そこで *Dmnrk* 蛋白質と物理的に会合する分子の探索・同定を行なうと共に、同定された分子と *Dmnrk* の相互作用の解析を行った。

### 【方法】

Yeast Two-Hybrid 法により *Dmnrk* と物理的に会合する分子を探索、同定を行った。キナーゼ活性を失活した *Dmnrk*-S の ORF をベクター pAS2-1 に挿入してプラスミドを作製し、*Drosophila* adult MATCHMAKER cDNA library (CLONTECH) と共に酵母 Y190 に導入した。酵母内でこの 2 つの蛋白質が会合するならばレポーター遺伝子発現によりヒスチジンを合成し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を持つようになることから、ヒスチジン欠損培地上でコロニー形成し、更に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵母を選択して、その酵母から cDNA library プラスミドを回収し、cDNA 塩基配列を決定して遺伝子を同定した。更に *Dmnrk* の様々な領域を欠損した変異体を作製して  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標とした同様の解析により、同定された遺伝子に対する

*Dmnrk* の会合部位を検討した。

Yeast Two-Hybrid 法により同定された分子と *Dmnrk* との生体内における会合の有無を検討するために培養細胞を用いた遺伝子導入ならびに免疫共沈降法を用いて解析を行った。導入した遺伝子は *Dmnrk* と Orb の全長をコードするもので、それぞれ HA、Flag のエピトープタグを付加している。*Dmnrk* は *Dmnrk*-L と *Dmnrk*-S、およびキナーゼ活性を失活した *Dmnrk*-S-DK の 3 種類を用いた。培養細胞 HEK293T にリン酸カルシウム法で *Dmnrk* および Orb の遺伝子導入を行い、48 時間後に lysis buffer で可溶化した。この溶液の遠沈上清を抗 Flag 抗体をつけた protein A-sepharose と 4℃、2 時間反応させてこの免疫沈降物から Laemmli 液を加えて結合した蛋白質を分離した。得られた検体を 10% SDS-PAGE により分離した後、PVDF membrane filter 上へ転写し、抗 Flag 抗体あるいは抗 HA 抗体を反応させた上で horseradish peroxidase (HRP) 標識した二次抗体を反応させて、chemiluminescence reagent を使い、目的とする蛋白質を可視化した。

COS-7 に前述の免疫共沈降法で用いたプラスミドをリボソーム法による遺伝子導入後、*Dmnrk*、Orb の細胞内局在を免疫染色法により解析した。具体的には遺伝子導入の 48 時間後に 3.7% ホルムアルデヒド溶液で固定し、0.1% TritonX-100 で処理した上で抗 Flag 抗体あるいは抗 HA 抗体を反応後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体およびストレプトアビジン HRP を反応させ、DAB を基質とした発色反応を行い、細胞内の *Dmnrk*、Orb を可視化した。

### 【結果・考察】

Yeast Two-Hybrid 法によるスクリーニングにより *Dmnrk* と会合する分子として Orb (ool18 RNA Binding Protein) が同定された。Orb は posterior group genes に属し、ショウジョウバエの極性決定や腹部、生殖細胞の成立に必須の RNA 結合蛋白質である。塩基配列の解析から、Orb の *Dmnrk* 会合領域はグリシン残基に富む領域とその周辺と判明した。一方で *Dmnrk* の様々な領域を欠損した変異体を用いた解析から *Dmnrk* の FHA 領域を含む N 端領域が Orb との会合に必要であることが判明した。これまでに行った *in situ* hybridization の結果から orb 遺伝子の卵形成過程、胚発生過程における発現動態は *Dmnrk* のものと著しく類似することを見い出している。

次に *Dmnrk* と Orb の培養細胞内における会合の有無について検討を行った。HEK293T 細胞に Orb および *Dmnrk*-S あるいは *Dmnrk*-L を遺伝子導入により発現させ、免疫共沈降の解析を行ったところ、*Dmnrk*-S、*Dmnrk*-L はいずれも Orb と物理的に会合し得ることが明らかとなった。これは、ショウジョウバエ未受精卵に存在する一群の

母性遺伝子において、RNA 結合蛋白質と蛋白質キナーゼが物理的に会合する初めての例である。

更に Dmnk と Orb の会合の持つ生物学的な意義について検討するために Dmnk と Orb 共発現時の培養細胞における Dmnk、Orb 蛋白質の局在について免疫染色法を用いて解析した。その結果、Orb 蛋白質は単独では細胞質に分布しているが、Dmnk-S が存在する場合には、Dmnk-S のキナーゼ活性依存的に Orb 蛋白質は核内に局在することが明らかとなった。一方、Dmnk-L が存在する場合には、Orb 蛋白質は細胞質にその局在が認められた。これらの知見から、Orb の局在制御過程において Dmnk-S と Dmnk-L は異なった機能を担うことが明らかとなり、Dmnk-S と Dmnk-L 蛋白質のショウジョウバエ発生過程における機能的差異が示唆された。

[まとめ]

本研究結果から、ショウジョウバエの卵形成過程、胚発生過程において Dmnk は Orb の局在を制御することによって生殖細胞の成立過程に関与すると考えられる。また Dmnk による Orb の局在制御は Dmnk のキナーゼ活性依存的であることから Dmnk は Orb をリン酸化することによりその局在を制御することが強く示唆される。Dmnk と Orb の会合はショウジョウバエ母性遺伝子においてキナーゼと RNA 結合蛋白質が物理的に会合する初めての例であり、Dmnk による Orb 制御の分子メカニズムの解明は、単に Dmnk を介するシグナル伝達の解明のみならず、多細胞生物における卵形成・生殖細胞の成立過程の観点からも極めて重要である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

| 論文審査の結果の要旨 |   |    |       |
|------------|---|----|-------|
| 受付番号       | 甲第 1410 号   | 氏名 | 岩井 健二 |
| 論文題目       | Physical interactions of Dmnk with Orb: implications in the regulated localization of Orb by Dmnk during oogenesis and embryogenesis<br><br>Dmnk と Orb の物理的会合: 卵形成および胚発生過程における Dmnk による Orb の局在制御 |    |       |
| 審査委員       | 主 査 山 本 隆 子<br>副 査 南 康 博<br>副 査 横 山 光 宏   |    |       |
| 審査終了日      | 平成 14 年 1 月 21 日  |    |       |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

発生は時間的・空間的プログラムに従う遺伝子発現の反映であり、そのプログラムは卵形成の間に母性遺伝子から転写され卵細胞質内に蓄えられた mRNA あるいは蛋白質等によって成り立っている。特にショウジョウバエにおける体パターン形成は未受精卵における母性 mRNA の分布に依存しており、その胚後極の決定は posterior group genes と呼ばれる一群の母性効果遺伝子によって制御されている。これらの遺伝子から転写された mRNAs が適切な場所に位置することが腹部構造の発達と生殖細胞原基となる極細胞の形成とに必要である。ショウジョウバエの母性遺伝子のひとつである *Dmnc* (*Drosophila* maternal nuclear kinase) は核内セリン・スレオニンキナーゼをコードしており、卵形成過程においては卵母細胞に局在し、受精後は極細胞に局限した発現が認められる。*Dmnc* 蛋白質には択一的スプライシングによって *Dmnc-L* (long) と *Dmnc-S* (short) の2つの形態があり、それぞれの発生過程における発現動態は異なるが、機能の違いは不明である。また *Dmnc* は酵母の Rad53、Cds1、線虫の Ce-cds-1、哺乳動物の Chk2 の相同分子である。これらのキナーゼは特徴的な構造としてリン酸化特異的な蛋白質間相互作用モチーフである forkhead-associated (FHA) 領域を有し、細胞周期のチェックポイント制御、DNA 修復、減数分裂時の相同組換えといった様々な過程で必須の役割を担うことが示されている。*Dmnc* の機能は殆ど未知であるが、卵形成過程、胚発生過程における特徴的な分布から減数分裂や生殖細胞系列の成立といった過程において機能する可能性が示唆される。そこで本研究では *Dmnc* 蛋白質と物理的に会合する分子の探索・同定を行なうと共に、同定された分子と *Dmnc* の相互作用の解析を行った。

Yeast Two-Hybrid 法によるスクリーニングから *Dmnc* と会合する分子として Orb (oo18 RNA Binding Protein) が同定された。Orb は posterior group genes に属し、ショウジョウバエの極性決定や腹部、生殖細胞の成立に必須の RNA 結合蛋白質である。塩基配列の解析から、Orb の *Dmnc* 会合領域はグリシン残基に富む領域とその周辺と判明した。一方で *Dmnc* の様々領域を欠損した変異体を用いた解析から *Dmnc* の FHA 領域を含む N 端領域が Orb との会合に必要なことが判明した。これまでにを行った *in situ* hybridization の結果から *orb* 遺伝子の卵形成過程、胚発生過程における発現動態は *Dmnc* の場合と著しく類似することが見いだされた。

次に *Dmnc* と Orb の培養細胞内における会合の有無について検討を行った。HEK293T 細胞に Orb および *Dmnc-S* あるいは *Dmnc-L* を遺伝子導入により発現させ、免疫共沈降の解析を行ったところ、*Dmnc-S*、*Dmnc-L* はいずれも Orb と物理的に会合し得ることが明らかとなった。これは、ショウジョウバエ未受精卵に存在する一群の母性遺伝子産物において、RNA 結合蛋白質と蛋白質磷酸化酵素が物理的に会合する初めての例である。

更に *Dmnc* と Orb の会合の生物学的な意義について検討するために、*Dmnc* と Orb 共発現時の培養細胞における *Dmnc*、Orb 蛋白質の局在について免疫染色法を用いて解析した。その結果、Orb 蛋白質は単独では細胞質に分布しているが、*Dmnc-S* が存在する場合には、*Dmnc-S* のキナーゼ活性依存的に Orb 蛋白質は核内に局在することが明らかとなった。一方、*Dmnc-L* が存在する場合には、Orb 蛋白質は細胞質にその局在が認められた。これらの知見から、Orb の局在制御過程において *Dmnc-S* と *Dmnc-L* は異なった機能を担うことが明らかとなり、*Dmnc-S* と *Dmnc-L* 蛋白質のショウジョウバエ発生過程における機能的差異が示唆された。

本研究はショウジョウバエの卵形成過程、胚発生過程における *Dmnc* の機能について、その会合する蛋白質を同定し、それらの相互作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったショウジョウバエ母性遺伝子産物群において蛋白質磷酸化酵素と RNA 結合蛋白質が物理的に会合するという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。