



# 線虫Caenorhabditis elegansの18SリボソームRNAプロセシングに必要なRNA結合タンパク質RBD-1の解析

西條, 栄子

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2009-06-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3163

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003163>

※ 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。



# 博士論文

線虫 *Caenorhabditis elegans* の

18SリボソームRNAプロセッシングに必要な

RNA結合タンパク質RBD-1の解析

平成16年2月

神戸大学大学院自然科学研究科

西條栄子

## 目次

目次 .....	1
第一章 序論 .....	4
第一節 リボソーム .....	4
1-1. 原核生物のリボソーム .....	4
1-2. 真核生物のリボソーム .....	5
1-3. オルガネラリボソーム .....	6
第二節 真核生物のリボソーム生合成過程 .....	6
2-1. リボソーム RNA の転写 .....	7
2-2. リボソームタンパク質の核輸送 .....	7
2-3. SSU(small subunit processome)の集合 .....	8
2-4. リボソーム RNA のプロセッシング .....	9
2-5. リボソーム RNA の修飾 .....	10
2-6. リボソームの核外輸送 .....	11
第三節 リボソーム関連疾患、およびリボソームタンパク質の持つ複数の機能 .....	12
3-1. リボソーム関連疾患 .....	12
3-2. 複数の機能を持つリボソームタンパク質および生合成因子 .....	14
第四節 RBD タンパク質 .....	15
4-1. 出芽酵母 Mrd1p .....	15
4-2. ユスリカ Ct-RBD-1 .....	16
4-3. ゼブラフィッシュ Npo .....	16
第五節 本研究の概要 .....	17
第二章 線虫 RBD タンパク質の発現様式 .....	21
第一節 序 .....	21
第二節 RBD-1 の発現時期 .....	21
第三節 RBD-1 タンパク質の発現組織 .....	22
第四節 RBD-1 タンパク質の細胞内局在 .....	23
第五節 考察 .....	23
第三章 RBD-1 のリボソーム生合成における役割 .....	25
第一節 序 .....	25

第二節	40S サブユニット合成における役割の解析 .....	26
第三節	線虫 rRNA プロセシング経路の概要 .....	27
第四節	18S rRNA 生合成における <i>rbd-1</i> の役割の解析 .....	29
第五節	考察 .....	30
第四章	リボソーム生合成の抑制による線虫発生への影響 .....	32
第一節	序 .....	32
第二節	<i>rbd-1</i> 抑制による個体レベルでの表現型 .....	32
2-1.	胚形成への影響 .....	32
2-2.	最終表現型 .....	33
2-3.	電子顕微鏡による表皮構造異常の解析 .....	34
2-4.	下皮細胞形成への影響 .....	34
第三節	<i>rbd-1</i> 以外のリボソーム生合成因子の抑制による表現型 .....	36
第四節	翻訳抑制による表現型 .....	37
第五節	考察 .....	38
第五章	考察 .....	40
第一節	初期発生とリボソーム生合成 .....	40
第二節	胚形成以降の発生とリボソーム生合成 .....	41
第三節	RBD-1 タンパク質の分子機能 .....	42
第四節	線虫リボソーム RNA プロセシング経路 .....	43
第五節	リボソーム RNA の転写制御 .....	46
第六節	展望 .....	47
第六章	材料と方法 .....	50
第一節	線虫系統および取り扱い .....	50
第二節	データベース .....	52
第三節	大腸菌株、培地 .....	53
第四節	オリゴヌクレオチド .....	53
第五節	コンストラクト作製 .....	54
第六節	抗体作製 .....	58
第七節	ノーザンブロット解析 .....	59
第八節	ウエスタンブロット解析 .....	61
第九節	抗体染色 .....	62
第十節	蛍光顕微鏡観察 .....	62

第十一節 ショ糖密度勾配遠心 .....	63
第十二節 RNA 定量 .....	63
第十三節 電子顕微鏡観察 .....	63
謝辞 .....	65
参考文献 .....	66
図表 .....	75

## 第一章 序論

生体を形作る物質のほとんどはタンパク質である。このタンパク質は、「翻訳」という過程を経てはじめて合成される。したがって、翻訳を行うリボソームは生命活動の根幹を支える、最も基本的な存在である。リボソームは、RNAとタンパク質からなる巨大な複合体である。そして、細胞はリボソームの生合成に多大なエネルギーを割いている。例えば、原核生物では、乾燥重量の 1/4 をリボソームが占めており、真核生物の酵母では、全転写産物の 80%以上がリボソーム RNA(rRNA) である。生命活動にとって極めて重要なこのリボソーム生合成に関する研究は、生化学、遺伝学的な手法を用いることにより、まず大腸菌などの原核生物で、続いて真核生物の出芽酵母で行われてきた。近年、出芽酵母の変異体を用いた解析から、真核生物のリボソーム生合成の経路の解明が進んでいる。生合成因子の保存性の高さから、この経路自体も真核生物を通じて保存されていると考えられている。しかしながら、ヒトなどの多細胞生物では、リボソーム構成因子の異常により、ガンや貧血などの特異的な疾病が発症することが報告されている。このことは、多細胞生物では発生段階や組織分化過程、および周囲の環境に応じて、動的なりボソーム生合成の制御が行われていることを示唆している。したがって、多細胞生物におけるリボソーム生合成制御の研究を進めることにより、形態形成や疾病の発症といった、高次の生命現象の新たな制御機構を明らかにすることができるかもしれない。そのため、多細胞のモデル生物が必要とされている。また、時期別、組織別のリボソーム生合成制御が存在するとすれば、生合成の中でも可塑性の高い段階で行われているであろうと予想される。rRNA 前駆体は転写後、プロセッシングせずに蓄積しておくことが可能であると考えられるため、rRNA プロセッシングは可塑性の高い段階の一つであると予想される。そこで、本研究では、時期別、組織別のリボソーム生合成制御を行う可能性がある因子として、rRNA プロセッシング因子に着目した。

### 第一節 リボソーム

#### 1-1. 原核生物のリボソーム

原核生物のリボソームは、50S、および 30S の二つのサブユニットから成っている。どちらのサブユニットとも、rRNA および多種類の小さなタンパク質

から構成されている。50S サブユニットは、23S rRNA、5S rRNA という 2 種の RNA と、31 個のタンパク質からなり、30S サブユニットは 16S rRNA と 21 個のタンパク質からなっている。一種類のタンパク質を除き、すべての因子は 1 分子ずつ入っている。最もよく解析されている大腸菌の場合、rRNA 遺伝子はゲノム中に 7 コピー存在しており、1 コピーにつき 16S rRNA と 23S rRNA はひとつずつ入っている。それぞれの 16S rRNA と 23S rRNA の間のスペーサー領域には、tRNA や 5S rRNA が含まれるが、その種類や数は遺伝子領域によって異なっている。16S rRNA と 23S rRNA は一続きの前駆体として転写され、プロセスされて除かれる領域は塩基対合によりステム構造をとる。このステムを組んだ二本鎖 RNA 領域が、二本鎖特異的エンドヌクレアーゼ RNase III によって認識され、転写中に切断が始まる。rRNA の最終的な成熟のためには、リボソームタンパク質の集合、および RNase III 以外のエンドヌクレアーゼの活性が必要である。原核生物のリボソーム形成にいたる構成因子集合の順序や、エネルギーを要する過程を調べる目的で、各サブユニットの再構成実験が行われている。50S サブユニットでは、枯草菌(Nomura and Erdmann, 1970; Green and Noller, 1999)および好熱菌(Khaitovich et al., 1999)から精製した構成因子を用いて、30S サブユニットでは、大腸菌から精製した構成因子(Held et al., 1973; Held and Nomura, 1973)、およびすべて組み替えタンパク質で(Culver and Noller, 1999)、機能的なリボソームの *in vitro* での再構成が行われた。また、2000-2001 年に、リボソームの立体構造が、好塩性古細菌(Ban et al., 2000)、放射線耐性菌(Harms et al., 2001)、および高度好熱菌(Wimberly et al., 2000, Schluenzen et al., 2000)において解明されており、構造と機能の連関を調べる上での重要な土台が提供されている。

## 1-2. 真核生物のリボソーム

真核生物の細胞質リボソームは、大小ふたつのサブユニットから成っており、原核生物のリボソームと基本的な設計および機能は保存されている。真核生物の細胞質リボソームは原核生物のリボソームよりサイズが大きく、大サブユニットに含まれる rRNA の種類が 1 種類増えており、対応する rRNA が長い。また、含まれるタンパク質の種類も増加している。真核生物の細胞質リボソームサブユニットは 60S、および 40S の沈降係数を持つ。60S サブユニットは

25/28S rRNA、5.8S rRNA、5S rRNA という 3 種の RNA と、49 個のタンパク質因子から構成されている。40S サブユニットは、18S rRNA と 33 個のタンパク質因子から構成されている。したがって、真核生物では、リボソームの構造の複雑さが増している。

### 1-3. オルガネラリボソーム

真核生物は細胞質リボソーム以外に、オルガネラリボソームを持っている。オルガネラリボソームは原核生物リボソームと相同性を有しており、オルガネラ共生説の根拠の一つになっている。ミトコンドリアのリボソームは、酸化的リン酸化に関わるわずか 13 種のミトコンドリアタンパク質を翻訳するために存在している。ミトコンドリアのリボソームは原核生物のリボソームと相同性を有するが、沈降係数は 5.5S であり、70S の沈降係数を持つ原核生物リボソームと比較して全体的に小さい。また、ミトコンドリアのリボソームには 5S rRNA が存在しないことも特徴的である(Curgy, 1985)。ミトコンドリアリボソームのタンパク質は全て核ゲノムにコードされているため、翻訳後にミトコンドリア内に輸送されている。植物の葉緑体も独自のリボソームを持っている。葉緑体 rRNA は 16S、23S、5S から構成されており、ミトコンドリア rRNA よりも原核生物との相同性が高い。葉緑体のリボソームタンパク質は 56–60 種類存在しており、そのうちの 20 種は葉緑体ゲノムにコードされている(Hill et al., 1990)。葉緑体リボソームタンパク質は、細胞あたり 1000 個にもなる葉緑体と一つしかない核ゲノムから協調してつくられている。核と葉緑体ゲノムの転写、翻訳を協調させる機構は未知である。

## 第二節 真核生物のリボソーム生合成過程

真核生物のリボソーム生合成は、ほとんど核小体中で起こっている。核小体は、真核生物の核内に存在する構造体で、rRNA をコードする染色体領域、rRNA 前駆体、リボソームタンパク質、およびリボソーム生合成に関わる因子が含まれている。核小体は、機能的にはリボソームサブユニット前駆体形成の場である。rRNA の成熟とリボソームタンパク質の集合に関わる因子は、170 種類以上であると試算されている(Fromont-Racine et al., 2003)。この小さな区画で起こる様々な過程を以下に概説する。(図 1)

## 2-1. リボソーム RNA の転写

4つのrRNAのうち、18S rRNA、5.8S rRNA、25/28S rRNAの3種は、一続きの前駆体としてRNAポリメラーゼIによって転写される。18S rRNAは40Sサブユニットの構成因子となり、5.8Sおよび25S/28S rRNAは、核内の他の領域でRNAポリメラーゼIIIによって転写された5S rRNAとともに、60Sサブユニットの構成因子となる。rRNA遺伝子領域はタンデムアレイとして存在しており、そのコピー数は真核生物ではハプロイドゲノムあたり、およそ100–300コピーであると言われている。線虫は1番染色体上に、ハプロイドゲノムあたり55コピー保持している(Files and Hirsh, 1981)。出芽酵母は7番染色体上にrRNA遺伝子を100-200コピー保持しており、RNAポリメラーゼIによって35Sの沈降係数を持つrRNA前駆体が転写される。

RNAポリメラーゼIのプロモーターは種特異性があり、進化的に配列の保存性は低い。しかし、一般的には転写開始点より上流50bpの領域がコアプロモーターと呼ばれている(Paule and White, 2000)。転写開始点周辺にはTATA box様のAT-richな配列が存在し、実際に転写開始複合体内にはRNAポリメラーゼIIと共通の因子であるTBP (TATA box-binding protein)が含まれている(Grummt, 2003)。RNAポリメラーゼIの転写終結は、一般に25/28S rRNAの下流1000nt以内で起こる。終結に要するタンパク質も種によって特異性があり、マウスではDNA結合性ドメインであるMybドメインを持つTTF-1タンパク質がターミネーター領域に結合し、RNAポリメラーゼIの終結反応を仲介する(Mason et al., 1997)。出芽酵母ではDNA結合タンパク質Reb1pがターミネーター配列に結合し、同様に転写の終結を仲介している(Lang and Reeder, 1995)が、マウスとはターミネーター配列も結合タンパク質のアミノ酸配列も全く異なっている。したがって、終結のシステムは類似しているが、必要な因子は独立に進化してきたようである。線虫には、配列上はTTF-1ホモログもReb1pホモログも存在しないため、酵母、マウスとは異なるDNA結合タンパク質が終結反応を仲介しているのかもしれない。また、ターミネーター配列も明らかにはなっていない。

## 2-2. リボソームタンパク質の核輸送

真核生物の細胞は、核と細胞質に分かれている。リボソームの集合は核小体で起こるため、細胞質で翻訳されたリボソームタンパク質は核内に輸送される

必要がある。各リボソームタンパク質の分子量は、核膜孔を自由拡散で通過できる限界の大きさよりも小さい。にもかかわらず、リボソームタンパク質は輸送装置によってエネルギーを使用して能動的に核内に運び込まれている。増殖中の HeLa 細胞では、一つの核膜孔あたり、一分間に 100 個のリボソームタンパク質が輸送され、3 個の完成したサブユニットが核外輸送されている(Gorlich and Mattaj, 1996)。したがって、リボソームタンパク質の核輸送は、リボソーム生合成過程の中でも、エネルギーを要する過程の一つである。タンパク質の核輸送経路は、三種類に分けることができる。一般的な核移行シグナル NLS (nuclear localization signal)を持つタンパク質を輸送する Importin  $\alpha/\beta$  の経路、hnRNP を輸送する Transportin の経路、およびその他の Importin  $\beta$  様因子(RanBP5 など)が関わる経路が存在する。これらの経路のうち、リボソームタンパク質の核輸送にどの経路が使用されているのかについては、徐々に解析が進みつつある。浸透化処理をした HeLa 細胞を用いた解析から、L23a、S7、L5 タンパク質は、上記の 3 つの経路を全て使っていることが判明している(Jakel and Gorlich, 1998)。リボソームタンパク質は大量に核輸送される必要があるため、細胞は各輸送経路を総動員して運んでいるのであろう。一方、L12 タンパク質の大部分は Importin11 の経路のみで核輸送されている(Plafker and Macara, 2002)。L12 は 60S サブユニットの成熟過程で、後期に集合するタンパク質である。したがって、L12 はリボソーム 60S サブユニットの成熟のシグナルとして働いている可能性があり、L12 の輸送調節によって成熟速度の調節が行われている可能性が示唆されている。リボソームタンパク質の核輸送の段階を調節することによって、多細胞生物の発生過程での、リボソームの生合成調節が行われている可能性は大いに考えられる。

### 2-3. SSU(small subunit processome)の集合

リボソームの生合成は、核小体の中で rRNA の転写が起こることから始まる。1960 年代の解析により、転写中の rRNA には、末端に‘terminal knob’と呼ばれるこぶ状の構造体が結合していることが示されていた(Miller and Beatty, 1969)。2002 年に、Dragon らは二段階の精製法で 18SrRNA のプロセシングに必要な U3 コア複合体を精製し、マスペクトル解析を行って約 30 個の構成成分を同定した(Dragon et al., 2002)。その結果、この巨大な複合体は、既知の U3 結合タンパク質以外に 17 個の新規タンパク質を含んでいた。電子

顕微鏡上の terminal knob の大きさは、平均(42x34nm)でリボソームの平均の大きさ(28x30nm)とほぼ等しく、この大きさは U3 コア複合体ともほぼ同一の大きさであった。そのため、U3 コア複合体が電子顕微鏡上で同定されていた terminal knob の本体であると考えられた。一方、密度勾配遠心による実験から、rRNA 前駆体が転写直後に取り込まれる複合体の沈降係数は 90S であることが知られていた(Udem and Warner, 1972)。しかし、この 90S 複合体の構成因子は長い間同定されて来なかった。2002 年に、Grandi らは、遠心後、90S の沈降係数を持つ複合体に含有されるタンパク質で、かつ、rRNA 前駆体および U3 を共免疫沈降できるタンパク質 12 種類に TAP(tandem affinity purification)タグを付加して精製し、この 90S 複合体の構成成分を同定した(Grandi et al., 2002)。TAP タグ法とは、標的タンパク質に付加した二種類のアフィニティータグを用いることにより、高い精製度で標的タンパク質の相互作用因子を含む複合体を精製する方法である。その結果、この 90S 複合体には、40S の構成因子、および 35 種の非リボソームタンパク質が含まれていることがわかった。この実験で同定された非リボソームタンパク質は、Dragon らが同定した U3 コア複合体(Dragon et al., 2002)の構成成分と同一のものが非常に多かった。したがって、転写された rRNA 前駆体に集合するタンパク質は、U3 コア複合体および 40S 構成因子であり、その沈降係数は 90S であるということが明らかになった。しかし、驚くべきことに、90S プレリボソームにはほとんど 60S サブユニット構成因子は含まれていなかった。したがって、rRNA の転写中には、40S をつくる因子が主に集合し、rRNA 前駆体の切断が終わったのちに 60S をつくる因子が結合するということが明らかになった(Grandi et al., 2002)。

#### 2-4. リボソーム RNA のプロセッシング

rRNA のプロセッシング経路は、出芽酵母において詳細に調べられている(Venema and Tollervey, 1999) (図 2)。基本的なプロセッシングにおいては、いずれの真核生物も、18S を含む前半と、5.8S および 25/28S を含む後半をふたつに切断し、前半は前半、後半は後半部の経路で独立にプロセスするという方法をとっている。このプロセッシング経路には、明らかにエンドヌクレアーゼ活性が必須であるが、もっとも解析が進んでいる出芽酵母でさえも、18S を含む rRNA 前駆体の前半部のプロセッシングに関わるエンドヌクレアーゼは同定

されていない。しかしながら、前駆体と U3 snoRNA 双方に塩基対合を破壊する変異を導入する実験によって、rRNA と U3 snoRNA との塩基対合が切断に必須であることが示されている(Beltrame and Tollervey, 1995; Sharma and Tollervey, 1999)。5.8S および 25/28S rRNA を含む後半部に関しては、25/28S 下流の 3'ETS (3' extra transcribed spacer)を切断する Rnt1(Kufel et al., 1999)、A<sub>3</sub> サイトの切断を行う Rnase MRP(Chu et al., 1994)、および各部のトリミングを行うエキソヌクレアーゼ Rat1p および Xnr1(Kressler et al., 1999)が知られている。出芽酵母以外の単細胞生物では、原虫トリパノソーマにおいてプロセシング経路が解明されており、U3 snoRNA 機能の保存性が確かめられている(Hartshorne and Toyofuku, 1999; Hartshorne et al., 2001)。ショウジョウバエの場合、rRNA プロセシングは酵母の場合とは異なり、5.8S 以外に 2S の沈降係数を持つ rRNA が生成され、28S がさらに切断を受けて 18S の大きさになる(結果的に、18S の沈降係数を持つ rRNA が 3 分子出来ることになる)。また、18S プロセシングには選択的なふたつの経路がある(Long and Dawid, 1980)。脊椎動物においては、初期の研究においてラット、マウス、ヒトのプロセシング経路が、近年ではアフリカツメガエルにおいてプロセシング経路が同定されている(Savino and Gerbi, 1990; Borovjagin and Gerbi, 2001)。線虫では、詳細なプロセシング経路は不明であったが、本研究によって基本経路が明らかになった。これは、今後多細胞生物におけるリボソーム生合成制御因子の解析を行う上で、必須の情報である。

## 2-5. リボソーム RNA の修飾

rRNA は全体にわたって修飾を受けている。出芽酵母では、45 個のウリジン残基がシュードウリジン化され、65 個のリボースがメチル化されている。またヒトでは、100 個のシュードウリジン化と、110 個のリボースメチル化が起こっている(Maden and Hughes, 1997)。これらのシュードウリジン化、メチル化は、それぞれ異なる特徴を有する低分子 RNA (snoRNA) によって誘導される。まず、シュードウリジン化は、特徴的な配列、box H/ACA をもつ snoRNA が、rRNA と部分的に相補鎖を形成し、シュードウリジン合成酵素に修飾部位を指示することによって行われる。また、リボースのメチル化は、box C/D を持つ snoRNA によって指示される。これらの修飾の意義は必ずしも明確ではない。しかしながら、立体構造から修飾塩基はリボソームの機能に重要な部位に

集中していることが判明している(Decatur and Fournier, 2002)。したがって、修飾塩基は rRNA の構造保持や安定化などを通じて、リボソーム活性を直接的・間接的に上昇させていることが予想されている。

## 2-6. リボソームの核外輸送

核内で完成したリボソームは、翻訳の場である細胞質へ輸送される必要がある。一般的な核外輸送のレセプターは二種類知られており、一つは mRNA 輸送に関わる Mex67/TAP ファミリーであり、もう一つはロイシンリッチな NES(nuclear export signal)に結合する CRM1/Xpo1 ファミリーである(Weis, 2002)。LMB(leptomycin B)は CRM1 と NES の結合を阻害することによって CRM1 経路での核外輸送を阻害する薬剤であるが、この LMB によって、酵母およびアフリカツメガエルの卵母細胞で、40S および 60S サブユニットの輸送が阻害されることから、リボソームの輸送は CRM1 がレセプターと行われていることが判明している(Johnson et al., 2002)。一般的に、輸送を受ける「積み荷」とレセプターの間には、アダプタータンパク質が存在している。リボソーム 60S サブユニットにおいては、核-細胞質シャトルタンパク質 NMD3 がアダプターとなっている(Ho and Johnson, 1999)。NMD3 は、もともと出芽酵母で、ナンセンス変異が引き起こす mRNA の分解機構、NMD(nonsense mediated decay) が欠損する変異体から同定されたが、この変異体中では 60S サブユニットの安定性が低下することから、リボソーム輸送への関与が示唆されたタンパク質である。NMD3 は 60S サブユニット構成因子のひとつ、rpL10 (リボソームタンパク質 L10) と結合する(Karl et al., 1999)。L10 は PTC(peptidyltransferase center)近傍に位置する。PTC はペプチド転移反応の活性中心であり、L10 の結合は、リボソーム酵素反応の場である PTC が正確に組み上がっていることを示すため、NMD3 による輸送はリボソームの品質管理機構としても重要な役割を果たしているのだと考えられる。一方、40S サブユニットの輸送に関しては、60S サブユニットにおける NMD3 のようなアダプタータンパク質の存在が予想されているが、現状では同定されていない。出芽酵母においては、核質に存在し、40S への結合能を示す Enp1p タンパク質がアダプタータンパク質の候補と考えられている(Grandi et al., 2002)。

### 第三節 リボソーム関連疾患、およびリボソームタンパク質の持つ複数の機能

リボソーム構成因子の異常により個体に異常が起こる例として、ヒト遺伝病や、ショウジョウバエの変異体が知られている。これらは、リボソームという基本因子が、個体発生的一部分に特異的な機能を持っていることを示す興味深い例である。しかしながら、一部のリボソームタンパク質については、リボソーム以外の場所で異なる機能を果たすという報告もある。そのため、リボソーム関連疾患とリボソームタンパク質の持つ複数の機能は関連している可能性もある。これらについて次に述べる。

#### 3-1. リボソーム関連疾患

個別の rRNA 塩基修飾の意義は判明していないが、全体としての rRNA 修飾異常が疾病を引き起こす例が今までに二例知られている。早老、先天性角化異常、さらには多発性ガンを伴う Dyskeratosis congenita (DC)病は、DKC1 の変異によって発症する(Heiss et al., 1998)。DKC1 遺伝子はシュドウリジン合成酵素をコードしており、この酵素はウリジン残基をシュドウリジンに変換する活性を持つ。実際に DKC1 の変異によって、酵母やショウジョウバエでは、rRNA 修飾の低下、およびリボソーム生合成の減少が観察されている(Giordano et al., 1999)。DKC1 の機能低下マウス由来の細胞は、anisomycin, cyclohexamide, puromycin といった複数の翻訳阻害剤に高感受性を示すことから、リボソームの機能自体が異常になっていると考えられている(Ruggero et al., 2003)。しかし、DKC1 はテロメラーゼ複合体にも含まれる(Mitchell et al., 1999)ことから、発病にいたる機構は単純ではないようである。

また、B 細胞悪性リンパ腫の原因の一つとして、染色体 3 番と 6 番の間での染色体転座が同定された。この転座による切断点に存在する遺伝子の切断が B 細胞悪性リンパ腫を引き起こす原因であるとの予想に基づいて、切断点周辺の塩基配列解析の結果、染色体 3 番側では B 細胞悪性リンパ腫でしばしば変異が見られる *BCL6* が切断されており、染色体 6 番側では U50/U50' snoRNA の宿主遺伝子である *U50HG* が切断されていた (Tanaka et al., 2000)。BCL6 は、リンパ球の最終分化に必要な遺伝子の転写を抑制する転写因子であることが知られているため(Toney et al., 2000)、B 細胞悪性リンパ腫の主要な原因であることが予想されるが、一方では、snoRNA は rRNA 修飾の誘導役として

働くため、rRNA の修飾異常がリボソーム機能の異常を引き起こし、その結果として細胞のガン化が引き起こされている可能性がある。

また、リボソーム関連疾患の別の例として、Diamond-Blackfan anaemia (DBA)と呼ばれる、赤血球前駆細胞の減少および欠損によって生じる貧血がある。19番染色体に転座を持つ患者の、染色体切断部位の解析により、この患者の発病の原因がリボソームタンパク質 S19 遺伝子のエクソン 3 と 4 の間での切断であることがわかった。その後の家系解析により、40 の保因家系のうち、10 の家系で S19 遺伝子内にナンセンス、ミスセンス、スプライス部位の変異などの変異が見つかった(Draptchinskaia et al., 1999)。DBA は赤血球の細胞系譜特異的に分化の停止が起こる病気である。したがって、S19 が赤血球形成過程に重要な役割を果たしていることは明らかである。DBA は、リボソーム構成因子の欠損がヒト遺伝病の直接の原因となっていることを示す現在までで唯一の例である。

多細胞生物におけるリボソーム生合成と個体発生の関係を示すものとしては、他にショウジョウバエ *minute* 変異の研究がある。70 年以上前から同定されていた *minute* 変異体の特徴は、身体の矮小化、稔性の低下、そして劣性致死というものである。この変異体には 50 以上もの遺伝子座が存在するため、原因は長い間不明であった。そして、1980 年代以降の分子生物学の発展により、*minute* 変異の原因遺伝子が次々と同定された結果、この表現型の原因は個々のリボソームタンパク質遺伝子の変異によるものであることが明らかとなった。すなわち、*minute* 変異はリボソームの全体量が低下することによって生じる表現型であった(Lambertsson, 1998)。このことは、リボソーム全体量の低下は個体の死には直結せず、個体発生に全体的にダメージを与えるということを表している。多細胞生物では、個体発生全体だけではなく、個別組織においてもリボソームの生合成量の調節が行われている可能性がある。しかしながら、発生に必要なリボソーム量が、個別組織ごとに生合成調節を受けているかどうかについては明らかにはなっていない。

真核生物のリボソーム活性は、生合成量、およびリボソームタンパク質 S6 のリン酸化などの翻訳後修飾により調節を受けている。そして、最近の研究により、ガン化した細胞ではこのリボソーム活性の調節が異常になっていることが明らかになってきた。例えば、RB (retinoblastoma)や p53 などのガン抑制因子は、RNA ポリメラーゼ I のプロモーター結合タンパク質 UBF への結合を

通じて、rRNA 転写活性の抑制に関与しており、変異により転写量が増加する。また、抗ガン剤として用いられるラパマイシンの標的タンパク質 mTOR (mammalian target of rapamycin)は、S6K1(ribosomal protein S6 kinase-1)の活性を減少させることによって、リボソームタンパク質 S6 のリン酸化を減少させ、結果として増殖因子や他のリボソームタンパク質の翻訳量を減少させている。さらに、ガン化細胞株のマイクロアレイ解析によっても、数多くのリボソームタンパク質が過剰発現していることが示されている(Dua et al., 2001)。したがって、過剰なりボソームの生合成は異常な細胞増殖を引き起こすことが示唆されている(Ruggero and Pandolfi, 2003)。

### 3-2. 複数の機能を持つリボソームタンパク質および生合成因子

あるタンパク質の機能を考える際には、常に複数の機能を持つ可能性を念頭に置かねばならない。たとえば、リボソームタンパク質の成り立ちを考えると、およそ 80 種のタンパク質の中にはもともと別の機能を持っていたものが、進化の過程でリボソームに取り込まれたものもあると考えられる。そのようなタンパク質が今でも別の機能を持ち続けていることは大いにあり得る(Wool, 1996)。大腸菌では、10 種ほどのリボソームタンパク質が自身の mRNA に結合して翻訳を阻害したり、ファージの複製に必要なヘリカーゼ活性を担うものもある。真核生物では、ヒト S3、P10、およびショウジョウバエ S3 といったリボソームタンパク質が DNA 修復機能を持つ(Wool, 1996)。また、ヒト、ショウジョウバエ、シロイヌナズナでは、自己 mRNA のスプライシングや翻訳阻害を行うものや、発生異常と関連しているリボソームタンパク質が報告されている(Wool, 1996)。

200 種近くあるリボソームの生合成因子も、同様に生合成以外の機能を持つことが考えられる。酵母では、rRNA の転写やプロセシングを行う因子が、細胞質分裂(Oeffinger and Tollervey, 2003)、DNA 複製開始(Du and Stillman, 2002)、および G2 期進行(Kondoh et al., 2000)などの細胞周期進行にも機能を持つことが報告されている。リボソームは細胞のもっとも主要な産物であるので、その生合成と成長をリンクさせるために、これらの因子は存在しているのであろう。多細胞生物では、今までにこのような因子の報告はないが、生合成と発生、細胞周期をリンクさせる因子は必ず存在していると考えられる。

#### 第四節 RBD タンパク質

多細胞生物の発生、および分化過程における時期、組織別のリボソーム生合成制御過程の存在を検討するために、生合成速度の柔軟な調節が可能であると考えられる段階、rRNA プロセッシングに着目した。rRNA プロセッシング因子の一つ、RBD タンパク質は出芽酵母から植物、ヒトに至るまで、進化的に保存されている(図 3)。これは、RBD タンパク質の機能が必須であり、生命を維持する上で欠落することができなかつたということを示唆している。RNA 結合性モチーフである RBD (RNA-binding domain)(Siomi and Dreyfuss, 1997)を 6 つ持つことから、線虫では、データベース上で RBD-1 と名付けられている。後生動物の RBD タンパク質は RBD を 6 つ、酵母および植物では、RBD を 5 つ持っている。これらの生物では、後生動物における 2 つ目の RBD が欠損している。6 つもの RBD を持つタンパク質は他に報告されておらず、ひとつのタンパク質が持つ RNA 結合ドメインの数としては RBD タンパク質が最も多い。出芽酵母における RBD タンパク質の機能は rRNA プロセッシングであり(Jin et al., 2002)、また、複数の生物種で核小体への局在が報告されていることから(Jin et al., 2002)(Björk et al., 2002)、核小体で rRNA プロセッシングを行うという RBD タンパク質の機能は、真核生物を通じて保存されていると考えられる。

##### 4-1. 出芽酵母 Mrd1p

RBD タンパク質の中で、スウェーデンの Wieslander グループによって最初に報告されたタンパク質が出芽酵母 Mrd1p である(Jin et al., 2002)。Mrd1p は酵母の生育に必須であり、核および核小体に局在する。Mrd1p の発現を制限すると、U3 snoRNP (ribonucleoprotein)が必要とされる rRNA プロセッシングサイト(図 2、A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> サイト)の切断が抑制される。また、内在性の Mrd1p を GFP 融合 Mrd1p に置き換えた出芽酵母の抽出液に対して、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降実験を行うと、35S rRNA 前駆体、U3 snoRNA、および Nop1p を共沈することができる。これらの結果から、Mrd1p は 35SrRNA 前駆体のプロセッシングに関わる因子であると報告された。この報告によって、RBD タンパク質のリボソーム生合成に対する機能が明らかになった。しかし、U3 snoRNP のマスペクトル解析から(Dragon et al., 2002)、Mrd1p は U3 コア因子ではないことが報告された。このことから、Mrd1p は一過的に U3 snoRNP と相互

作用し、35S rRNA 前駆体の切断を助けていることが予想される。したがって、RNA 結合モチーフをもつ Mrd1p の物理的な標的 RNA は現在不明である。また、他生物における機能の保存性は明らかにはなっていない。

#### 4-2. ユスリカ Ct-RBD-1

Ct-RBD-1 は、昆虫双翅類ユスリカ(*Chironomus tentans*)における RBD タンパク質として報告された(Björk et al., 2002)。Ct-RBD-1 と *in vitro* 転写で調製された部分的な rRNA 前駆体との結合実験から、Ct-RBD-1 は rRNA 前駆体の中の、プロセッシングによって除かれる 18S と 5.8S の間のスペーサー領域(図 2、internal transcribed spacer1; ITS1)に結合することが示唆された。しかしながら、Ct-RBD-1 がリボソームのプロセッシング因子であるという根拠は明確には示されておらず、RBD タンパク質の機能の保存性は不明のままであった。また、Ct-RBD-1 が、rRNA プロセッシング因子である出芽酵母 Mrd1p と機能上の相同性も有するとすれば、rRNA 前駆体以外に U3 snoRNA や他の snoRNA と直接結合している可能性も大いに考えられる。

#### 4-3. ゼブラフィッシュ Npo

アメリカの Fishman らのグループは、ゼブラフィッシュを化学変異剤 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)で処理し、得られた劣性の変異体の中から、消化管の形成が不全になる変異体を顕微鏡下でスクリーニングし、劣性の変異体 *nil per os (npo)*を同定した(Mayer and Fishman, 2003)。この変異体は、消化管および膀胱、エラ、アゴの形成不全という組織特異的な表現型を示した。ポジショナルクローニングの結果、*npo* 変異体は、*npo* 遺伝子内部の点変異により、コーディング配列内にストップコドンが導入された変異体であることが判明した。抗 Npo 抗体による抗体染色の結果、他生物の RBD タンパク質が顕著に核小体に局在するにもかかわらず、ゼブラフィッシュ Npo タンパク質は細胞質に局在し、発現組織にも特異性があることが示された。そして、Npo とリボソーム生合成との関係は、依然不明のままである。したがって、Npo の持つ分子機能にはいくつかの可能性が考えられる。一つの可能性としては、Npo は二つの機能を持ち、一つの機能は組織特異的に細胞質で何らかの標的を制御しており、もう一つの機能がリボソーム生合成への関与であるということが考えられる。あるいは、ゼブラフィッシュには未同定の RBD タンパク質がもう一つ存在し、

一方は腸管分化に関わる Npo であり、もう一方が核小体に局在してリボソームの生合成に関与しているのかも知れない。または、ゼブラフィッシュにおいては、Npo は細胞質でリボソームの生合成に関与している可能性も考えられる。あるいは、ゼブラフィッシュのリボソーム生合成には、RBD タンパク質が関与しないのかも知れない。

## 第五節 本研究の概要

これまでに蓄積された真核生物におけるリボソーム生合成経路の知見は、生化学および分子遺伝学の系が確立された出芽酵母を材料とした研究によるところが多い。酵母は単細胞生物であるため、発生過程を観察することはできないが、真核生物のリボソーム生合成因子の保存性から、出芽酵母で蓄積された知見を多細胞生物に応用することは可能である。リボソームの生合成は細胞にとって必須の過程であるため、原核生物から真核生物、さらに単細胞生物から多細胞生物への進化の過程で、基本経路は維持されてきたであろう。その上で、進化の段階に応じて、徐々により複雑な制御機構を加えてきたと予想される。近年、ショウジョウバエやアフリカツメガエルを用いた生化学的な解析により、多細胞生物の経路も次第に明らかとなってきた。しかし、細胞を用いた解析が主要であり、発生との相関は不明であった。発生および分化の過程において、活発にタンパク質合成を行っている細胞と休止している細胞とでは、タンパク質の合成の場であるリボソームも、生合成などにより量的な制御を受けている可能性がある。しかしながら、これまで個体発生の分子生物学的研究は、実験系が構築されているという理由から、転写因子による mRNA の転写制御、あるいは転写後の mRNA の局在化や安定性制御に主眼が置かれていた。したがって、mRNA 転写後の翻訳制御の存在は判明していた。しかし、タンパク質合成の場であるリボソームの量により、発生および分化の過程が制御されているという報告はなかった。また、発生途中の多細胞生物からは生化学的解析に必要な、大量で均一な材料を得ることが難しいという理由から、個体発生におけるリボソーム生合成の制御はこれまであまり解析されてこなかった。

そこで、多細胞生物の発生とリボソーム生合成制御の相関を、動的な制御が可能であると予想される rRNA プロセシング 因子の動態を通じて明らかにするため、発生の異常に伴う形態異常の観察ができ、生化学的な解析も可能である多細胞生物、線虫 *C. elegans* を用いた。線虫はおよそ 1000 細胞からなる多細胞

生物である。線虫は身体が透明で表現型が観察しやすい上、特定の遺伝子機能を抑制するRNAi とよばれる手法を利用することができる。RNAi法は操作が簡便で抑制効果が高く、変異原で作製した変異体と異なり、標的遺伝子の発現だけを抑制できるので特異性も高い。さらに、線虫の世代時間は 3.5日と短いため、各発生段階の表現型を速やかに解析することができる。そのため、発生過程におけるリボソーム生合成解析が可能な生物であると予想した。

線虫ではこれまでにリボソーム生合成因子に関する報告はないが、配列上出芽酵母の生合成因子の相同遺伝子が数多く存在している。そこでリボソーム生合成の経路は保存されていると仮定した。出芽酵母Mrd1pは、18S rRNA プロセシングに必要なU3 snoRNPのコア因子ではない。にもかかわらず、Mrd1pは、18S rRNAのプロセシングに必須の因子であることが知られている。そのため、多細胞生物の発生過程においてリボソームの生合成制御が行われているとすれば、付加的な因子こそがより動的な制御を受け得ると仮定し、Mrd1pの相同遺伝子RBD-1を解析の標的とした。

発生段階によるリボソーム生合成制御を調べるため、第二章では、はじめに線虫各発生段階におけるRBD-1の発現パターンをウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、RBD-1は幼虫期から成虫期にかけては高発現しているが、胚形成期には発現が抑制されていることが明らかになった。そこで、さらに胚形成期での発現を、抗体染色法を用いて詳細に解析したところ、初期胚ではRBD-1の発現は抑制されており、細胞分裂速度の低下する形態形成期から発現が起こることが判明した。線虫rRNAの転写は1細胞期から起こっていることが報告されているので(Seydoux and Dunn, 1997)、胚形成の初期には、リボソームの生合成の鍵となる、リボソームRNAプロセシングが抑制されている可能性が示唆された。しかしながら、RBD-1機能の多細胞生物における保存性は不明であったため、RBD-1の発現がリボソーム生合成を反映しているかどうかを検討する必要性が生じた。

そこで、第三章では、線虫RBD-1とリボソーム生合成との関連を解析するため、RNAi法を用いてRBD-1の発現を抑制し、リボソームRNAおよびサブユニット生成への影響を調べた。まず、RBD-1を抑制した線虫における18S, および26S rRNA量を生化学的に定量した結果、18Sのみが減少しており、RBD-1は18S rRNA 生成に特異的に必要な因子であることが示唆された。また、ショ糖密度勾配遠心法を用いてリボソームサブユニット生成量を測定した結果、RBD-

1の抑制によって18S rRNA が含まれる40Sサブユニットの合成量が減少することが明らかになった。この結果から、RBD-1 は酵母Mrd1p同様、18S rRNA プロセシングに関わる因子であることが強く示唆された。そこで、18S rRNA 生合成におけるRBD-1の機能の解析を試みた。しかしながら、線虫rRNAのプロセシング経路に関する知見は本研究以前には非常に乏しかった。そこでまず、線虫におけるrRNAのプロセシング経路の解明を試み、その概要を明らかにした。線虫rRNAプロセシング経路では、rRNA前駆体はITS1領域内に二カ所の切断部位を持っていることが判明し(図2, 出芽酵母のA2、A3サイトに相当する位置)、III、およびIVと名付けた。そして次に、得られた情報と、野生型、およびRBD-1の発現を抑制した線虫でのrRNAプロセシング経路とを比較解析した。その結果、RBD-1は少なくともrRNA 前駆体の切断部位III (図2、出芽酵母のA2サイトに相当する位置)のプロセシングに必要なリボソーム生合成因子であることが明らかになった。RBD-1はrRNAプロセシング因子であり、かつ、初期胚での発現が抑制されていることから、線虫初期胚ではrRNAのプロセシングが抑制されていることが強く示唆された。

胚形成期は体積が一定のまま細胞数のみが増加する時期であるが、体積、細胞数共に成長する胚形成期以降では、リボソーム量の減少により、翻訳が必要な組織により重篤な障害を与えると予想される。そこで、第四章では、リボソーム生合成量の減少によって引き起こされる胚形成以降の表現型を調べた。成虫になるまでに4回の脱皮を経る線虫では、約2時間で終了する脱皮の度に全ての外皮を作り直さねばならない。したがって、外皮タンパク質の合成は、量および時間的に最も急激な翻訳を要する過程であると考えられる。RNAi法によりRBD-1の発現を抑制した結果、個体の成長が著しく遅延し、半数は幼虫期で死に至ることが明らかとなった。このことから、RBD-1は胚形成以降の時期において、胚形成以降の生育に必須のタンパク質であることが示された。さらにRBD-1を抑制した個体の表現型を実体顕微鏡、および電子顕微鏡を用いて詳細に解析した結果、脱皮異常や陰門形成の異常、外皮構造体*alae*の形態異常が観察された。このことから、全体的なりボソーム量の低下は、生育遅延や致死性を引き起こすだけでなく、特異的な組織の発達にも影響を及ぼすことが明らかになった。

リボソームの生合成は細胞の生育に必須の過程である。本解析では線虫*C. elegans*のrRNAのプロセシング経路の概略を明らかにし、その情報に基づいて、

RBDタンパク質のリボソームRNA生成における機能の多細胞生物での保存性を示した。さらにrRNAプロセッシング因子であるRBD-1の発現が初期胚で抑制されていることを発見し、多細胞生物の初期発生ではリボソーム生合成の各段階は協調しておらず、初期胚においてはrRNA前駆体が蓄積しているという可能性を示した。この解析によって、多細胞生物初期発生とリボソーム生合成制御の関連の一端が明らかになった。

## 第二章 線虫 RBD タンパク質の発現様式

### 第一節 序

多細胞生物の発生において、活発に増殖を行う細胞と不活性な細胞での翻訳量は非常に異なると予想されるが、その翻訳量を左右するリボソームの生合成制御に関しては未だ明らかではない。そこで、リボソーム生合成因子の発生過程における制御を明らかにするため、まず線虫の RBD-1 の発現パターンを解析した。

### 第二節 RBD-1 の発現時期

発生段階におけるタンパク質の存在量の変化は、その時期におけるタンパク質の機能の必要性を反映していると考えられる。そこで、RBD-1 の機能時期を推測するために、各発生段階の線虫からタンパク質を抽出し、抗 RBD-1 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った (図 5A)。その結果、L1 幼虫期から成虫期にかけて、RBD-1 はほぼ同一の発現量であったが、胚の時期での発現量は比較的少なかった。この結果から、RBD-1 の胚時期における機能の必要性は少ないことが示唆された。そして次に、胚時期での RBD-1 の発現を詳細に解析するために、抗 RBD-1 抗体を用いて線虫胚の抗体染色を行った (図 5B)。胚は DAPI を用いて核の共染色を行い、核の数によって発生段階を確認した。一細胞胚においては、RBD-1 のシグナルは細胞質全体に見られたが (図 5Ba、矢頭)、細胞分裂が始まった胚では、速やかにシグナルは減少した (図 5Ba)。発生が進み、後期胚になると再び RBD-1 のシグナルが観察されるようになった (図 5Bc)。この染色から、細胞分裂開始直後の初期胚では RBD-1 タンパク質が分解されていることが示唆された。

胚時期での RBD-1 の発現抑制が転写量によるものであるかどうかを確認するために、*rbd-1* プロモーター制御下に GFP を発現するコンストラクトを作製し、インジェクション法を用いて線虫に形質転換した。線虫生殖細胞では、多コピーで導入された外来遺伝子の発現は抑制されることが知られている (Kelly et al., 1997)。したがって、胚には母性的に持ち込まれた外来遺伝子由来の転写産物は存在せず、蛍光の発現パターンから、母性由来ではない目的遺伝子の発現開始時期を推測することができる。普遍的なプロモーターを持つ外来遺伝子からの GFP 発現は、遅くとも 20-30 細胞期から観察される (Kawano et al.,

2000)。線虫の胚形成期は、発生上のイベントによって3つに分類されている(図4)。*rbd-1* プロモーターからの GFP 発現は、線虫胚形成期としては最終期に当たる形態形成期、約300細胞より観察され始めた(図5C)。したがって、RBD-1の初期胚における発現は、転写レベルによっても抑制されていることが判明した。以上の結果より、RBD-1の発現はタンパク質の安定性、およびプロモーター活性によって初期胚では抑制されていることが明らかになった。

線虫胚では、一細胞期から既に rRNA の転写が起こっていることが報告されている(Seydoux and Dunn, 1997)。RBD-1はrRNAのプロセッシングに必要な出芽酵母 Mrd1p のホモログであるにもかかわらず、初期胚では発現していない。このことから、初期胚では rRNA の転写産物がプロセッシングを受けずに蓄積していると予想される。この予想を検証するために、RBD-1以外のリボソーム生合成因子の発現時期を RBD-1と同様に解析した。他生物で rRNA プロセッシングに必須であることが明らかであり(Tollervey et al., 1991; Tollervey et al., 1993)、線虫でも核小体への局在が示されている(MacQueen and Villeneuve, 2001)タンパク質、FIB-1の胚での発現パターンを抗体染色で確認したところ、RBD-1と同一の発現パターンを示した(図5D)。この結果から、rRNAのプロセッシングが初期胚では不活性であることが強く示唆された。

### 第三節 RBD-1 タンパク質の発現組織

タンパク質の発現時期、組織の解析は、そのタンパク質の機能が必要な時期、組織を知る手がかりになる。胚形成以降の *rbd-1* の転写パターンを知るために、胚形成以降の時期で、*rbd-1* プロモーター制御下に発現する GFP の蛍光を観察した。その結果、幼虫期から成虫にいたるまで、すべての時期、組織で GFP 蛍光が確認された(図6A)。しかしながら、このコンストラクトは、多コピーで導入した外来遺伝子であるため、生殖系列での発現は確認できなかった。また、外来遺伝子によるプロモーター解析では、転写される時期、組織を予想することはできるが、必ずしも内在性タンパク質が存在している場所を反映しているとは言い切れない。そこで、全身での発現パターンをさらに確認するために、抗体染色法を用いて線虫の様々な時期、組織での RBD-1 の発現を解析した。その結果、L1 幼虫期(図6B, a, b)、成虫体細胞(図6B, c, d)、および生殖系列(図6B, e, f)など、様々な時期、組織での発現が確認された。これらの結果から、RBD-1は胚形成以降、全身で発現するタンパク質であることが明らか

になった。したがって、RBD-1 の発現が抑制されているのは初期胚の時期のみであることが示された。

#### 第四節 RBD-1 タンパク質の細胞内局在

RBD-1 は胚の時期以降、全身で発現するタンパク質であることが明らかになった。リボソームの生合成は、rRNA の転写からサブユニット集合までのほとんどの過程が核小体の中で起こる。したがって、RBD-1 がリボソーム生合成因子であれば、核小体内に局在する可能性が高いと考えられる。そこで、RBD-1 の細胞内局在を GFP 融合タンパク質、および抗体染色法を用いて解析した。まず、約 2kbp の *rbd-1* プロモーターの制御下に RBD-1::GFP 融合タンパク質を発現する形質転換体の作製を試みた。おそらく、過剰発現すると有害であるなどの理由で、安定的に外来遺伝子を保持する形質転換体は得られなかったが、形質転換された細胞と野生型細胞のモザイクになった個体において、GFP 蛍光の局在によって細胞内局在を解析した。その結果、核内の核小体と思われる一部領域に強いシグナルが検出された (図 7A, a)。この RBD-1 局在領域が核小体であることを確認するために、全身の核小体が肥大化している変異体、*ncl-1(e1865)* に対して同様の形質転換体を作製した。その結果、RBD-1 が局在する領域が野生型に比べて著しく肥大化したため、RBD-1 は核小体局在タンパク質であることが確認された。また、腸の核は倍数性が高いため、他の組織の核に比べて核、核小体構造の観察を行いやすい。そこで、さらに核小体マーカー、および抗 RBD-1 抗体を用いて腸細胞の染色を行い、細胞内局在を解析した。その結果、RBD-1 は核小体マーカー FIB-1 と共局在した (図 7B)。これらの結果から、RBD-1 は核小体に局在するタンパク質であると結論づけた。リボソーム生合成のほとんどは核小体で起こり、また、出芽酵母 RBD-1 ホモログ Mrd1p は核小体に主に局在する。したがって、線虫 RBD-1 はリボソーム生合成因子である可能性が非常に強く示唆された。

#### 第五節 考察

RBD-1 は進化的に保存された配列を持つタンパク質であり、出芽酵母の RBD-1 ホモログ Mrd1p は 18S rRNA プロセッシングに必須のリボソーム生合成因子である。多細胞生物でのリボソーム生合成と発生との関連を調べるために、RBD-1 の初期胚での発現を観察した結果、初期胚での発現は抑制されていた。

この結果から、初期胚発生では、rRNA のプロセッシングが抑制されている可能性が示唆された。また、胚形成期以降では、RBD-1 は全身で発現しており、核小体に局在していた。発生過程におけるリボソーム生合成量の調節が存在しているとすれば、胚形成期では、RBD-1 を含む生合成因子の量で行われており、胚形成期以降では、RBD-1 の量以外の制御が行われていると予想できる。しかしながら、RBD タンパク質の rRNA プロセッシングにおける機能が、多細胞生物においても保存されているかどうかは不明である。そこで、RBD-1 がリボソーム生合成因子として機能しているかどうかを調べるため、RBD-1 を RNAi によって抑制し、18S rRNA 生成、および 18S rRNA を核として集合する 40S サブユニット集合に対する影響を調べることにした。

### 第三章 RBD-1 のリボソーム生合成における役割

#### 第一節 序

前章では、線虫 RBD-1 の発現解析から、初期胚中では rRNA の転写とプロセシングが協調していないことが示唆された。そこで、RBD-1 の発現パターンがリボソーム生合成を反映しているかどうかを調べるために、RBD-1 の機能解析を行うことにした。

線虫において、現在までにリボソームの生合成因子を解析した報告はなされていない。また、他の多細胞生物においても、解析されているのは、培養細胞、あるいは卵母細胞といった細胞レベルである。個体を用いた報告は、リボソームタンパク質が原因となるいくつかのヒト遺伝病(Drapchinskaia et al., 1999)、およびショウジョウバエ変異体の解析(Lambertsson, 1998)が報告されているが、実際にリボソーム生合成が異常になっているかについての報告はない。単細胞生物である出芽酵母においては、rRNA プロセシング経路が詳細に調べられており(図 2)(Venema and Tollervey, 1999)、さまざまな生合成因子の変異体が単離され、解析が行われている。出芽酵母 RBD タンパク質である Mrd1p については、プロセシングで除かれる部位に作製したプローブを用いたノーザンブロッティングにより、変異体中でのプロセシング中間体の蓄積を調べる実験や、抽出液をショ糖密度勾配遠心にかけ、260nm の吸光度を指標にリボソーム各サブユニットの量を調べる実験などが行われており、その結果から Mrd1p が U3 snoRNP が関わる rRNA 前駆体のプロセシングに必須であることが判明している(Jin et al., 2002)。しかしながら、RBD タンパク質の多細胞生物における機能の保存性は不明であり、まず、解析する系の開発が必須であった。そこで、線虫を用いて、個体抽出液からリボソーム生合成の変化を解析することのできる系を開発した。また、RBD-1 の rRNA プロセシングへの関与を調べる必要が生じたが、本研究以前には線虫 rRNA プロセシング経路に関する知見は非常に乏しかった。そこで、線虫 rRNA プロセシング経路を明らかにし、この情報に基づいて、RBD-1 の rRNA プロセシングにおける機能を解析した。これらの結果から、RBD タンパク質の rRNA プロセシング機能が出芽酵母同様、多細胞生物の線虫においても保存されていることを確かめた。

## 第二節 40S サブユニット合成における役割の解析

出芽酵母における RBD タンパク質 Mrd1p の役割は U3 snoRNP の関わる 18S rRNA プロセッシングを促進することである。遺伝子の機能を調べる上では、変異体の利用は有用であるが、線虫では、変異体作製以外にも、より簡便な遺伝子機能を抑制できる RNAi の手法が確立している。そこで、RBD タンパク質の rRNA プロセッシング機能の線虫における保存性を調べるために、soaking RNAi 法を用い、*rbd-1* の機能を抑えた線虫を大量に調製した。そして、野生型および RNAi を行った線虫からそれぞれタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行って RNAi の効果を調べた (図 8A)。その結果、RBD-1 のタンパク量は有意に減少しており、soaking RNAi 法が十分に効果的であることが確かめられた。次に、これらの線虫から RNA を抽出し、RBD-1 の抑制による 26S および 18S rRNA の存在量をエチジウムブロマイド染色によって確認した (図 8B)。その結果 18S rRNA の量だけが減少していた。この減少の割合をトルイジン染色によって定量した結果、18S rRNA の減少量は 60%程度であった (図 8C)。この結果から、線虫 RBD-1 は 18S rRNA の生合成に必要であることが判明した。

そして次に、18S rRNA の減少による 40S 生成への影響を調べるために、シヨ糖密度勾配法を用いて、線虫抽出液中の各サブユニットの存在量を調べた。リボソームの 40S サブユニットは、18S rRNA を核として集合する (図 1 参照)。シヨ糖密度勾配中で遠心分離を行うと、沈降係数の大きい複合体ほど密度勾配の中を早く移動するため、複合体の沈降係数によって分離することができる。260nm の吸光度を測定してプロファイルを得た結果、野生型の線虫抽出液では、軽い側から順に 40S、60S、そして 40S と 60S が一体となることができる 80S のピークが検出できることが判明した (図 8D 左)。一方、*rbd-1* の RNAi を行った線虫の抽出液を用いた解析では、40S のピークが検出できなくなり、異常に大きい 60S ピークと、比較的小さな 80S ピークが検出された (図 8D 右)。この結果から、*rbd-1* の RNAi によって 18S rRNA の生合成が抑えられた結果、40S サブユニットの生合成も異常になったことが明らかになった。80S の複合体は、40S と 60S が結合して生成する。そのため、*rbd-1* の RNAi を行った線虫では、少量存在する全ての 40S が、割合として多く存在する 60S と結合し、80S になっていると考えられる。ゆえにこのようなパターンを示すのであろう。

### 第三節 線虫 rRNA プロセシング経路の概要

前項では、*rbd-1* の RNAi によって 18S rRNA の生成量が低下することが明らかとなった。18S と一続きで転写される 26S rRNA は生成しているため、18S rRNA 減少の原因は、転写量の減少ではなく、18S rRNA のプロセシングの異常によるものと考えられる。では、異常が生じているのはプロセシング経路のどのステップであろうか。線虫においては、rRNA の遺伝子領域の配列、および 1 リピートあたりの長さが 7196bp であることは報告されている (Ellis et al., 1986) が、プロセシング経路に関しては全く不明であり、rRNA の転写開始点、および転写終結点も報告されていない。そのため、線虫 rRNA プロセシング経路を明らかにしなければ、*rbd-1* が関わりと予想されるプロセシングのステップを調べることはできない。そこで、報告されている rRNA 遺伝子の配列のうち、プロセシングによって除かれる領域にプローブを設計して、ノーザンブロットティングを行い、線虫プロセシング経路を推測した (図 9)。プローブ作製領域と検出される中間体の大きさから、およそそのプロセシング経路を推測することができる。

前駆体 a は、18S, 5.8S, 26S を含む転写産物、b, d は 18S rRNA を含む前駆体、c, c' は 26S rRNA を含む前駆体を表す (図 9A, B)。個別のノーザンブロットティングの結果より、1-3 プローブは前駆体 a, d, b を認識した (図 9B、レーン 1-3)。この 1-3 プローブが同一のパターンを示すことから、1-3 領域はプロセシング過程で挙動を共にしていることが判明した。したがって、18S の 3' 側と 5' 側、サイト I と II の切断はほぼ同時に起こっていることが示唆される。18S 内部配列を用いたノーザンブロット解析でも、a, b, d のバンドが検出されたことから (データ示さず)、これらのバンドは 18S rRNA の前駆体であることを確認している。

4 プローブは前駆体 a, c', d を認識し、前駆体 b は認識しない (図 9B、レーン 4)。3 プローブと 4 プローブのパターンの違いは、切断部位 III が 3 プローブと 4 プローブの間に存在することを示している。5 プローブは前駆体 a, c' を認識し、前駆体 b, d は認識しない (図 9B、レーン 5)。4 プローブと 5 プローブのパターンの違いは、切断部位 IV が 4 と 5 の間に存在することを示す。したがって、18S と 5.8S の間の領域には、少なくとも二カ所の切断部位 (III, IV) が存在することが明らかになった。6 プローブは前駆体 a, c', c を認識する (図 9B、レーン 6)。c' は c と比較して著しく量が少ないため、この露光時間での

c'バンドは非常に薄い。7, 8 プローブは前駆体 a を認識する (図 9B、レーン 7, 8)。異なる調製で得た RNA では、7,8 プローブはバンド c を弱く認識できることから (データ示さず)、26S の 3'側を認識するプローブであると考えられる。9 プローブは非常に弱く前駆体 a を認識する (図 9B、レーン 9) が、b や c などの他の前駆体を検出することはできなかった。9 プローブの検出感度は著しく悪く、また、8 プローブと 1 プローブのパターンが違うことから、9 プローブ内の大部分は非転写領域であると予想される。したがって、線虫 rRNA の転写終結点および開始点は 9 プローブ領域を挟む、8 プローブから 1 プローブの間に存在することが強く示唆された。

そこで、この領域内において RNA ポリメラーゼ I の転写終結点、および転写開始点を予想した (図 9C)。RNA ポリメラーゼ I のターミネーター配列は生物種によって異なる配列を持ち、転写終結に必要なターミネーター-DNA 結合タンパク質も、生物種によって異なる (Reeder and Lang, 1997) ため、配列の相同性からは線虫のターミネーターを予測することはできなかった。しかしながら、酵母およびマウスでは、RNA ポリメラーゼ I 転写産物の最後の 10-15 塩基は upstream element と呼ばれており、T 残基に富んでいることが知られている (Paule and White, 2000)。これらの情報に基づいて、線虫の 8 プローブから 1 プローブまでの間を調べた結果、T 残基に富んだ配列が 9 プローブ領域後半に存在していた (図 9C、下線)。T 残基に富んだ upstream element は、終結因子の異なる酵母とマウス間でも保存されているため、この領域が線虫 rRNA の転写終結点であると予想した。また、RNA ポリメラーゼ I の転写開始点周辺には TATA 様配列が存在することが知られている (Paule and White, 2000)。転写開始点を予想するため、8 プローブから 1 プローブの間で TATA 様配列を調べた結果、この領域には TATA 様配列が二カ所存在した (図 9C、黒枠)。したがって、線虫 rRNA の転写開始点はおそらくこのどちらかであると思われる。

ノーザンブロッティングの結果から予想される線虫 rRNA プロセッシング経路の概略を、図 9A にまとめた。線虫 rRNA プロセッシング経路では、切断部位が成熟 rRNA の両端部を含め、少なくとも 8 箇所あることが判明した。進化的なプロセッシング経路の保存性より、18S 上流の 5'ETS (5' extra transcriptional spacer) 領域、および 26S 下流の 3'ETS (3' extra transcriptional spacer) 領域にも、切断部位が存在する可能性は大いにあり得るが、今回の解析では発見

することができなかつた。これらの切断が非常に早い時期に起こるとすれば、中間体の量は微量であり、ノーザンブロットィングでは検出できないと考えられるため、今回の結果とも矛盾しない。さらに詳細なプロセッシング経路、および実際の転写開始点、終結点を決定するには、RNase プロテクションや、プライマーエクステンションなどのさらなる実験が必要である。

出芽酵母の知見より、18S と 5.8S の間の領域の切断には、RBD タンパク質が必須の役割を果たしている(Jin et al., 2002)。そこで、この領域の切断に関する線虫 RBD-1 の機能を調べることにした。

#### 第四節 18S rRNA 生合成における *rbd-1* の役割の解析

第二節に示したとおり、*rbd-1* の抑制によって 18S rRNA 量が減少することが明らかになった。この原因は、*rbd-1* の抑制を行った線虫で 26S rRNA 量が増加していないこと、および出芽酵母 Mrd1p 機能との類推から、18S rRNA プロセッシングが異常になったためだと考えられる。また、第三節では線虫 rRNA プロセッシング経路の概要を決定し、rRNA プロセッシング異常の起こっている段階を検出するための情報を得た。そこで、*rbd-1* の RNAi を行った線虫から RNA を抽出し、中間体がどこまで切断を受けているのかをノーザンブロットィングによって検討した (図 10)。

18S 領域、もしくは rRNA プロセッシングによって除かれる領域に作製したプローブを使用し、18S rRNA 周辺のプロセッシング中間体をノーザンブロットィングにより検出した。まず、18S rRNA 内部に相補的なプローブを用いたノーザンブロットィングでは、*rbd-1* の RNAi を行った線虫の 18S rRNA 量が減少しており、前項の 18S 減少を示す定量結果が確認された (図 10B、18S プローブ)。また、バンド a は、18S、5.8S、および 26S rRNA を含む前駆体を表すバンドである (図 10A)。前駆体を検出するいずれのプローブにおいても、*rbd-1* の RNAi を行った線虫から得た RNA では、野生型から得た RNA に比べて、バンド a の量が増加していた (図 10B、プローブ 1, 3, 4, 6)。この結果から、全長 rRNA 前駆体のプロセッシング速度自体が遅れているか、あるいは、プローブ 1 領域内の未同定のプロセッシング部位の切断も遅れているということを示している。

また、プローブ 1, 3, 4 を用いたノーザンブロットィングでは、*rbd-1* を抑制した線虫では、バンド d が蓄積していることが明らかとなった (図 10B、プ

ローブ 1, 3, 4)。バンド d は、切断部位 III の切断が起こらない時に蓄積する前駆体を示すバンドである。したがって、*rbd-1* の抑制により、切断部位 III の切断が阻害されることを示している。この結果から、*rbd-1* は切断部位 III の切断に必要であることが明らかになった。また、プローブ 6 を用いたノーザンブロットングでは、26S rRNA を含む前駆体を示すバンド、c, c' の量に変化は見られなかった (図 10B、プローブ 6)。このことから、*rbd-1* の抑制は、切断部位 IV 以降のプロセッシングには影響しないことが判明した。

以上の結果から、*rbd-1* の抑制によって切断部位 III のプロセッシングが抑制され、そのプロセッシング抑制を通じて 18S rRNA の量、および 40S rRNA 量が減少していることが明らかとなった。したがって、RBD タンパク質の機能は出芽酵母、および線虫で一致しており、RBD タンパク質の多細胞生物における rRNA プロセッシング機能がはじめて示された。

## 第五節 考察

RBD タンパク質の機能は、出芽酵母では 18S rRNA のプロセッシングであると報告されている (Jin et al., 2002)。ユスリカ、およびゼブラフィッシュにおいても、RBD タンパク質が見いだされている (Björk et al., 2002; Mayer and Fishman, 2003)。しかしながら、RBD タンパク質の rRNA プロセッシングやリボソーム生合成に対する機能は報告されておらず、多細胞生物における分子機能は不明であった。そこで RNAi 法を用いて線虫の RBD-1 を抑制し、多細胞生物における 18S 生成、40S 集合、および rRNA プロセッシングにおける機能を調べたところ、線虫 RBD-1 は 18S rRNA 生成および 40S 集合に必要であり、切断部位 III における rRNA プロセッシングに必要であることが明らかになった。これらの結果から、RBD タンパク質の rRNA プロセッシング機能が多細胞生物においても保存されていることが明確に示された。また、今回同定された線虫 rRNA の切断部位 III は、他生物との比較から、U3 snoRNP が切断に必要とされる部位であると考えられる。このことから、線虫 RBD-1 は、出芽酵母の場合と同様に、U3 snoRNP と相互作用して切断部位 III の切断に関わっていると推測される。

また、本研究までは、RNAi を行った線虫のリボソーム解析には技術的な問題が存在していた。RNAi を行った線虫は大量に得ることが難しい上、一般的な液体窒素と乳鉢を用いる線虫粉碎法では、乳鉢への付着などの損失が大きか

ったため、結果的に RNAi を行った線虫からの抽出液の調製は困難であった。しかし、今回の実験では、破碎用ビーズと少量の線虫、および抽出バッファーをチューブに加えて内容物を粉碎することができる FastPrep 攪拌装置を用いた。この装置によって、RNAi を行った線虫からでも効率よくタンパク質および RNA を抽出することが可能となった。

RBD-1 は rRNA プロセシングに必要なリボソーム生合成因子であり、かつ、その発現は初期胚では抑制されていた。この結果より、初期胚では rRNA のプロセシングが抑制されていることがさらに強く示唆された。一方、胚形成期以降には、RBD-1 は全身の核小体に存在する。RBD-1 はリボソーム生合成因子であるため、発現を抑制すると、全身のリボソーム量が減少すると予想される。線虫の発生過程において、翻訳が必要な組織でリボソーム生合成が積極的に行われているとすれば、そのような組織では、RBD-1 の発現を抑制した時に、強い表現型が観察されるであろうと考えられる。そのため、次に RBD-1 の RNAi を行った時に生じる表現型を詳しく解析することにした。

## 第四章 リボソーム生合成の抑制による線虫発生への影響

### 第一節 序

第三章のノーザンブロットィングの結果より、線虫 RBD-1 は 18S rRNA プロセッシングに関与するリボソーム生合成因子であることが明らかになった。したがって、RBD-1 を抑制し、その表現型を解析することによって、リボソーム量が一定量以上必要な組織が明らかになると考えられる。では、線虫において、大量のリボソーム生合成が必要な組織はどこであろうか。線虫は、成虫になるまでに 4 回の脱皮を行い、そのたびに新たな外皮タンパク質を非常に限られた時間内で大量に合成する必要がある。そのため、外皮を作り出す下皮細胞では、リボソームの高い活性が必須であると予想される。この予想に基づいて、RBD-1 の抑制を行った線虫の表現型を詳細に解析した。また、線虫 *C. elegans* を総合的に解説した本 "The nematode *C. elegans*" によると、下皮細胞に特異的な電子顕微鏡レベルの構造体として、リボソーム様の顆粒が蓄積した層状の膜構造体が紹介されている (Wood, 1988)。この構造は stacked apical membrane と呼ばれ、急速な翻訳が必要な下皮細胞で、速やかにタンパク質の合成、および分泌を行うための細胞内小器官であると考えられている。しかしながら、実際に膜内の顆粒がリボソームであるかどうかは明らかにはなっていない。そこで、*rbd-1* の発現を抑制した線虫の下皮細胞を電子顕微鏡で観察し、この構造体とリボソームとの関連の解析も試みた。

また、第二章の解析により、初期胚では RBD-1 は発現していないことが明らかになったが、RBD-1 の胚形成における必要性をより明確にするために、RBD-1 の発現抑制をした胚の致死率を測定した。

### 第二節 *rbd-1* 抑制による個体レベルでの表現型

#### 2-1. 胚形成への影響

*rbd-1* の胚形成における機能を調べるために、*rbd-1* の発現を抑制した線虫での胚致死率を測定した。線虫で行われる標準的な RNAi 法は、親世代を高濃度の二本鎖 RNA にさらし、次世代の表現型を観察するというものである。一般的に、胚形成時に必要な遺伝子を RNAi で抑制すると、胚致死の表現型を示す。第二章の結果より、RBD-1 および FIB-1 といったリボソーム生合成因子は

初期胚では発現していないことが判明している。したがって、リボソーム生合成因子は胚形成には必要ではないか、あるいは胚形成の後期より必要とされるのではないかと予想される。この予想に基づき、外来遺伝子 *gfp* をコントロールとして胚致死率を測定したところ、*rbd-1* の発現を抑制した線虫の胚致死率は、*gfp* とほぼ同一であり、胚致死性は示されなかった（表 1）。この結果は、*rbd-1* の発現は受精から孵化までの胚形成の間には重要ではないことを示唆しており、RBD-1 の発現が初期胚では観察されないという結果とよく一致する。

## 2-2. 最終表現型

第三章の結果より、RBD-1 がリボソーム生合成因子であることは明らかであるが、多細胞生物において、リボソーム生合成量の抑制が組織の発生や形態形成などの高次生命現象に及ぼす影響は不明である。そこで、*rbd-1* の抑制によりリボソームの生合成を抑制して表現型の現れる時期、組織を観察し、多細胞生物における翻訳が必要な時期、組織の同定を試みた。これらの情報を得るために、実体顕微鏡によって RNAi 虫の表現型の観察を行った。870 匹の RNAi 虫の表現型を調べたところ、すべての線虫において、はじめに成長遅延の表現型が観察された（表 2 Gro; growth defect）。また、約 25%の *rbd-1* (RNAi) 線虫は、幼虫期に生育を停止した（表 2 Lvl; larval lethal, Lva; larval arrest）。これらの結果は、RBD-1 が生育に必須であることを示している。RNAi 法は浸透度のばらつきを伴う遺伝子の抑制法である (Fraser et al., 2000; Gonczy et al., 2000)。したがって、幼虫期に生育を停止した線虫では、RNAi の浸透度が高かったために RBD-1 がほとんど合成されず、発生過程で必要なリボソームが得られなかったのだろうと考えられる。RBD-1 の抑制による成長遅延、および幼虫期での致死性は、全体的なりボソーム量の減少によって生じた表現型と考えられる。

次に、個別組織での表現型を観察した結果、約 21%の虫が脱皮異常の表現型を示した（表 2 Mlt; molting defect、図 11b）。この脱皮異常の線虫は、脱皮を開始しても古い皮から抜け出ることができず、その皮の中で数日間伸縮を繰り返し、おそらくエサが食べられないために弱って死ぬ。脱皮異常の表現型を示す理由は、おそらく *rbd-1* の抑制によってリボソーム量の減少し、急激、大量に翻訳される必要がある外皮タンパク質の合成が遅延したためと考えられる。脱皮異常は、外皮形成に関する表現型である。外皮に関するもう一つの表

現型として、約 13%の *rbd-1(RNAi)*線虫が陰門部の異常融合を示した(表 2 Pvl; protruding vulva、図 11d)。陰門は、線虫雌雄同体が持っている産卵器官で、12 個の上皮細胞から構成されており、正確な細胞分裂と融合により、L4 幼虫への脱皮の段階で機能的な陰門が形成される。Pvl の表現型を示した線虫では、リボソーム量の減少により、陰門部での外皮形成が不全となり、機能的陰門の形成ができなくなったと考えられる。*rbd-1* の抑制によるリボソーム生合成量の低下により、脱皮異常と陰門形成異常を合わせ、約 34% の虫に外皮に関連する異常が観察された。

rRNA プロセシング因子 RBD-1 の発現量の低下により、成長遅延や致死といった全身での表現型だけでなく、外皮という特異的な組織の形成異常が誘導されたことから、多細胞生物の形態形成において、リボソーム量が積極的に制御されている可能性が示唆された。

### 2-3. 電子顕微鏡による表皮構造異常の解析

*rbd-1* の抑制による表現型の解析により、*rbd-1* の機能は正常な外皮形成に必要なことが明らかになった。外皮構造の表現型をより詳細に解析するため、走査型電子顕微鏡を用いて外皮を観察することとした。野生型線虫の L1 幼虫、耐性幼虫、および成虫の左右体側部には alae と呼ばれる線状の隆起構造がある。alae の機能は不明であるが、その構造は観察しやすく、外皮形成の良い指標となる。成虫の alae は平行な 3 本の筋として観察される(図 12A, a)。*rbd-1* の発現を抑制した成虫を観察すると、隆起の構造が変形し、部分的な不連続性を示す個体(図 12A, b)や、alae の筋の数が増加する個体(図 12A, c)、および alae が無秩序な突起状に変化する個体(図 12A, d)などが観察された。また、alae 以外の表皮部分もなめらかではなくなった。この観察から、成虫に達した個体においても、*rbd-1* の抑制によって外皮形成が異常になっていることが明らかになった。

### 2-4. 下皮細胞形成への影響

*rbd-1* の抑制を行った線虫の表現型の解析から、外皮形成異常に関する表現型が多く観察された。この結果は、リボソーム量の減少の影響が、外皮を産生する下皮細胞において特に強く現れていることを示している。White らの電子顕微鏡の解析より(Wood, 1988)、下皮細胞に特異的な構造体として、stacked

apical membrane というオルガネラの存在が示されており、この構造体にはリボソーム様の顆粒の存在が観察されている。RBD-1 はリボソームの生合成因子であるため、その抑制を行った線虫ではリボソーム量が減少し、下皮細胞においては stacked apical membrane の構造が異常になる、あるいは蓄積された膜間のリボソーム量が減少することが予想される。この予想に基づき、野生型、および *rbd-1* の抑制を行った成虫の下皮細胞を透過型電子顕微鏡で観察した(図 12B)。その結果、予想に反して野生型、および *rbd-1(RNAi)* の線虫どちらにも stacked apical membrane が観察され、構造上の異常は観察されなかった。そして、どちらの線虫にも膜内部の顆粒が存在していた。したがって、*rbd-1* の抑制によっては、膜構造の異常は検出されなかった。しかし、この顆粒がリボソームであるかどうかは明確には同定されていないため、この結果が下皮細胞にリボソーム量の減少が起こっていないことを示すかどうかの判別はできなかった。そこで、膜間の顆粒がリボソームであるかどうかを調べるために、抗リボソーム P0 タンパク質抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行ったが、有意な免疫染色像を得ることはできなかった (データ示さず)。したがって、下皮細胞中の膜構造体とリボソーム機能との関連が明らかではないため、透過型電子顕微鏡を用いた解析では、*rbd-1* 抑制による下皮細胞への影響を判断することはできないと判断した。そこで、別の方法として、*rbd-1* 抑制による下皮細胞形成への影響を検討することにした。

線虫外皮の隆起構造、*alae* を産生する細胞は、*seam* 細胞と呼ばれる一部の下皮細胞であることが、発生途上で特定の細胞をレーザー照射により除去する実験により同定されている(Singh and Sulston, 1978)。*rbd-1* 抑制による *alae* の異常は、この *seam* 細胞の性質の異常により起こっている可能性も考えられる。そこで、外皮の異常が下皮細胞の異常に起因するものかどうかを検討するために、*rbd-1* を抑制した線虫の *seam* 細胞を観察した。*seam* 細胞の観察を容易にするために、*su93* 系統の線虫を用いた。この線虫系統は、*ajm-1::gfp* という外来遺伝子がゲノム内に組み込まれており、この遺伝子と GFP の融合タンパク質は、下皮細胞体表側のタイトジャンクションに局在する(Mohler et al., 1998)。したがって、*su93* 系統では、*seam* 細胞をはじめとする下皮細胞の輪郭を GFP 蛍光で観察することができる。この *su93* 系統に対して *rbd-1* を抑制し、*seam* 細胞の状態を観察した。孵化直後の野生型 L1 幼虫では、10 個の *seam* 細胞が左右体側部に連続して並んでいる (図 13 上段の描画、および a)。

しかし、*rbd-1* の抑制を行った L1 幼虫では、細胞の連続性が損なわれていた (図 13b)。したがって、*rbd-1* の抑制を行うと、少なくとも L1 幼虫期より seam 細胞の性質が損なわれることが示唆された。また、野生型の成虫では、隣同士 seam 細胞がそれぞれ融合して細長い多核の細胞となり、その輪郭は平行な 2 本の線として観察できるようになる (図 13 下段の描画、および c)。しかし、*rbd-1* の抑制を行った成虫では、非常に乱れた融合パターンを示した (図 13d)。したがって、*rbd-1* の抑制により、成虫期では外皮 alae 構造を生み出す下皮細胞、seam 細胞の融合が乱れることが明らかになった。この結果から、成虫 alae 形態の異常は、seam 細胞の融合異常に起因することが示唆された。

幼虫期に不連続な seam 細胞が観察される原因にはいくつかの可能性が考えられる。seam 細胞が存在しているとすれば、リボソーム量の低下によってマーカー遺伝子 *ajm-1::gfp* の発現量のみが減少し、結果として seam 細胞のフチの蛍光が観察できないという可能性が考えられる。seam 細胞の存在自体がなくなっているとすれば、細胞を分化させるためのタンパク質の発現が減少しているという可能性が考えられる。もう一つの重要な可能性は、RBD-1 には rRNA プロセッシング以外に、seam 細胞の性質を保つための機能が存在し、その機能が抑えられたためにリボソーム量とは無関係に seam 細胞が失われたという可能性である。成虫期に seam 細胞の融合が乱れる原因は、やはり seam 細胞が存在しているかどうかによって複数考えられる。*ajm-1::gfp* 以外のマーカーによって seam 細胞の有無を確認することが必要だろう。

### 第三節 *rbd-1* 以外のリボソーム生合成因子の抑制による表現型

*rbd-1* の発現抑制により、外皮という特定の組織に形態の異常が起こることが明らかになったが、この理由には二つの可能性を考えることができる。一つは、RBD-1 が rRNA プロセッシング以外に、外皮形成に対して異なる機能を持っており、*rbd-1* の抑制により外皮形成に関するほうの機能が失われたために、形態が異常になったという可能性である。もう一つは、リボソームの生合成量が低下したために、急激かつ大量のタンパク質翻訳が必要な脱皮時の外皮形成が阻害されたという可能性である。この二つの可能性を検討するために、*rbd-1* 以外の rRNA プロセッシング因子の発現抑制を行い、観察される表現型を *rbd-1* 抑制による表現型と比較することにした。線虫では、本研究以前には報告された rRNA プロセッシング因子はなかったので、rRNA プロセッシングに關与する

出芽酵母 U3 複合体構成因子の相同遺伝子の中で、特に線虫との間で保存性が高い二つの遺伝子について解析した(表3)。一つ目は、出芽酵母 Imp4p と 96.6% の相同性を持つ *imp-4*(ZK795.3)であり、二つ目は出芽酵母 Sof1p と 98.9% の相同性を持つ *sof-1*(ZK430.7)である。いずれの分子も、出芽酵母においては U3 複合体のコア因子である(Lee & Baserga, 1999, Jansen et al., 1993)。Soaking RNAi による発現抑制の結果、*rbd-1* の抑制の結果と同様に、いずれの遺伝子の抑制においても胚致死性は示されなかった (データ示さず)。この結果から、胚形成期においては rRNA プロセッシングが重要ではないことが強く示唆された。次に、遺伝子発現抑制による胚形成以降の表現型を観察した結果、*imp-4* の抑制による表現型は、外皮の形成異常を表す Mlt (molting defect; 脱皮異常)を含め、*rbd-1* 抑制による表現型と非常によく似ていた。このことから、*rbd-1* の抑制による外皮形成の異常は、リボソーム生合成量が低下したためであるという可能性が強く示唆された。しかしながら、*sof-1* の抑制による表現型は Gro のみであった。この理由は、*sof-1* に対しては RNAi 法の効果が弱かったために軽度の表現型しか観察されないのか、それとも *rbd-1* と *imp-4* が非常によく似た外皮形成に関する機能を持っているか、どちらかであると考えられる。そこで、さらにリボソームの翻訳活性を阻害する薬剤、シクロヘキシミド(CHX)を用いて、*rbd-1* 抑制による表現型との比較を行うことにした。

#### 第四節 翻訳抑制による表現型

リボソームの翻訳活性を阻害した場合における線虫の表現型を観察するために、CHX を用いた。CHX は真核生物の細胞質リボソーム 60S に結合して伸長因子 EF-2 に依存するトランスロケーションの過程を阻害する薬剤であり、タンパク質合成阻害剤として用いられる。作用させる濃度が高ければ線虫は死に至り、濃度が低すぎれば何の効果もない。そこで、翻訳が抑制され、かつ生存する濃度を検討したところ、100-200 $\mu$ g/ml の濃度でプレートに添加すれば、線虫が致死にならず、Gro(growth defect;成長遅延)になることが判明した。この結果に基づいて、線虫に L1 幼虫期から CHX を濃度(200 $\mu$ g/ml)で作用させ、表現型を観察した。その結果、*rbd-1* の発現を抑制した場合と異なり、CHX によりリボソームの翻訳活性を阻害した線虫は、Gro 以外の表現型は示さず、Mlt(molting defect; 脱皮異常)や Pvl(protruding vulva; 陰門部の形成異常)などの外皮形成の異常は観察されなかった (データ示さず)。そこで、成虫の外

皮の構造を走査型電子顕微鏡で詳細に観察した結果、CHX の作用により、線虫外皮の特徴的構造 *alae* の本数が部分的に増加していたが、*rbd-1* の抑制ほどの重大な外皮の異常は観察されなかった (図 14)。したがって、*rbd-1* の RNAi による rRNA プロセッシング阻害の結果と、CHX によるリボソームの翻訳活性の阻害の結果は異なるということが判明した。この結果は、リボソームの生合成の阻害、翻訳の阻害いずれも、リボソームの活性阻害であるが、両者は質的に異なっているということを示唆している。つまり、生合成の抑制では、リボソームの量自体の低下が起こるが、翻訳抑制では、リボソーム量は変化せずその機能だけが阻害され、活発に翻訳が起きる細胞には大量のリボソームが供給されているため、外皮形成に欠損が起こらないのだろう。

## 第五節 考察

第二章、第三章の結果より、リボソーム生合成因子 RBD-1 の発現が初期胚において見られないことから、初期胚発生においてはリボソーム生合成が起こっていないことが示唆されていた。そして、*rbd-1* の発現を抑制した胚は、胚性致死の表現型を示さないことが判明した。rRNA プロセッシング因子が胚形成には必須でないという結果は、リボソームの生合成が初期胚で起こっていないという仮説とよく一致する。胚形成以降の時期では、*rbd-1* の抑制により、幼虫期で生育を止めるものが 25% 存在した。このことから、RBD-1 は胚形成期以降の発達に必須であることが明らかになった。胚形成期には線虫の体積は増加せず、また、母性的に持ち込まれたリボソームが多量に存在するため、リボソームの生合成を抑制しても重大な問題は生じなかったと考えられるが、体積増加を伴う幼虫期以降の成長には、新しいリボソームの生合成が必須であるためであろうと考えられる。また、*rbd-1* の抑制による孵化後の表現型として、100% の線虫が成長遅延の表現型を示した。ショウジョウバエのリボソーム構成因子の一連の変異体 *minute* は、やはり成長遅延などの表現型を示す (Lambertsson, 1998)。したがって、成長遅延の表現型は、その原因が生合成因子であるか、リボソーム構成因子であるかに関わらず、機能的なリボソーム量の減少による共通の表現型であると考えられる。また、*rbd-1* 発現抑制によって、脱皮異常などの外皮の異常が起こることが明らかになった。脱皮は約 2 時間で終了する過程であり、新規の外皮タンパク質合成には時間制限があると考えられる。したがって、猶予された時間内に次の外皮をすべて作り終えられ

なければ、脱皮を完遂できなくなるのであろう。また、この結果は、外皮の形成には急激な翻訳が必要であるという仮説を強く支持する。*rbd-1* 以外の rRNA プロセシング因子の抑制によっても、外皮形成に異常が見られたため、外皮という急激な翻訳が必要な組織の形成には、一定量以上のリボソーム量が必要という可能性は非常に高まった。CHX によるリボソームの翻訳活性阻害実験では、ほとんど外皮形成の異常が観察されなかったことから、外皮形成にとっては、リボソームの量が一定以上存在することが重要であるということが示唆された。*rbd-1* の抑制によって、リボソーム合成の異常が起こること、および、リボソームの翻訳能が必要な外皮タンパク質の合成に異常が起こることは明らかである。しかし、*rbd-1* の抑制によって、seam 細胞に不連続性が生じたことから、リボソーム量、もしくは *rbd-1* の量が細胞の運命決定にも関与する可能性が示唆された。*ajm-1::gfp* はマーカー遺伝子であるため、発現が見られない部位に本当に seam 細胞が存在していないかどうかは明らかではないので、今後他のマーカー遺伝子を利用した解析を行う必要があると考えられる。

## 第五章 考察

### 第一節 初期発生とリボソーム生合成

線虫の胚発生過程とは、全体としての体積は変化せず、細胞数が 1 細胞から 550 細胞に増加する特殊な過程である(図 4)。胚発生過程の前半では、急速に細胞分裂が起こるが、後半ではほとんど細胞数に変化せず、組織の分化、および形態形成が起こる。胚発生の前半はさらに、体軸形成期 (1-28 細胞)、および陥入期 (28-300 細胞) に分けられる。少なくとも 20 細胞期からは普遍的なプロモーターからの遺伝子発現が起こっていることが知られている(Kawano et al., 2000)。この翻訳に使われるリボソームはいったいどこから来るのだろうか。少なくとも最初に起こる翻訳は、母性的に持ち込まれたリボソームが使われているはずである。しかし、いずれは新規に組み立てたリボソームを使う必要がある。多細胞生物のリボソーム生合成の動的な制御を知る上で、リボソームの生合成が発生段階のいつから始まるかについて知ることは非常に重要であるが、現在までにほとんど報告されていない。本研究によって、線虫 rRNA のプロセシングが、形態形成期以降より起こることがはじめて示唆された。rRNA のプロセシングが初期胚発生では起こっていないという仮説は、胚の時期には核小体構造が観察されないこと、および RBD-1 の発現を RNAi によって抑制しても胚発生には影響がないことから支持される。現在まで、リボソームの生合成では、rRNA の転写から、リボソームサブユニットの構成まで、連続した一連の過程として行われていると考えられてきた。しかし、前駆体をプロセスするための因子が存在しなくなる 1 細胞期から線虫 rRNA 前駆体の転写が起こっていることが報告されているため (Seydoux and Dunn, 1997)、初期胚では rRNA 転写とプロセシングの過程が協調していない可能性が高い。初期胚で連続的なリボソーム生合成が起こっていない理由は、初期胚の細胞は非常に速い速度で分裂しているため、核小体を形成し、リボソームの複雑な集合過程を行っている時間的余裕がないためかも知れない。おそらく初期胚では、rRNA の転写のみを行って前駆体を蓄積しておき、細胞分裂速度が低下してきたところで、速やかにプロセシングと集合を開始するという戦略を取っているのだろう。培養細胞を使った研究では、細胞周期の M 期には、CDK の働きによりリボソームの生合成が抑制されていることが判明している(Okuwaki et al., 2002)。このことも、M 期と S 期しか存在しない初期胚の細胞周期では、リボソームの

生合成が高いレベルでは起こり得ないことを示している。RBD-1 以外の rRNA プロセシング因子、FIB-1 の発現が、RBD-1 と同様に初期胚では見られないということも (図 5D) この考えを支持する。初期胚のリボソーム生合成戦略をさらに検証するためには、さらに別の生合成因子やリボソーム構成因子が、RBD-1 同様に陥入期以降に発現を開始するかどうかを観察する必要がある。また、技術的な困難が存在するが、実際に初期胚で rRNA 前駆体が蓄積しているかどうかを検証する必要がある。

リボソームの生合成に関して、線虫の興味深い変異体として *ncl-1* 変異体がある。この変異体は非常に大きな核小体を持っており、初期胚にも核小体が存在する。線虫 NCL-1 の機能は、RNA ポリメラーゼ I および III の転写抑制であると報告されている (Frank and Roth, 1998)。しかし、*ncl-1* は、ショウジョウバエの翻訳抑制因子 *brat* の相同遺伝子でもある (Frank et al., 2002)。ショウジョウバエ Brat は、特定の mRNA の 3'-UTR 領域に Nanos らとともに結合して翻訳の抑制を行っている (Sonoda and Wharton, 2001)。Brat が mRNA の翻訳を抑制していることと、リボソーム生合成因子の発現が初期胚で抑制されている現象から、NCL-1 の初期胚における機能には、リボソーム生合成因子や構成因子 mRNA の発現抑制もあることが想像される。今後、*ncl-1* 変異体の初期胚の抗体染色などを通じて、初期胚でのリボソームの生合成因子の発現調節の機構に迫れるかも知れない。

## 第二節 胚形成以降の発生とリボソーム生合成

RBD-1 を阻害した線虫の胚形成以降の表現型を観察した結果、すべての虫で成長の遅延、また約半数の虫では幼虫期での致死性がもたらされることが示された。したがって、RBD-1 は胚形成以降の生育に必須であることが明らかになった (表 2)。RNAi は遺伝子の種類や個体により効果にばらつきを伴う遺伝子発現抑制法であるため (Fraser et al., 2000; Gonczy et al., 2000)、より浸透度の高い線虫が致死性を示したのだと考えられる。さらに、RBD-1 発現を抑制した虫の興味深い表現型として、約 21%が脱皮異常、約 13%が陰門部形成異常の表現型を示した (表 2)。このことから、リボソーム生合成量の減少が、急激なタンパク質合成を必要とする外皮形成に異常を引き起こすことが強く示唆された (図 11, 12)。しかしながら、RBD-1 発現が減少した線虫では、下皮 seam 細胞のフチを示す *ajm-1::gfp* マーカー遺伝子の発現が部分的に欠失した (図

13)。この原因には、二つの可能性が考えられる。一つは、単純にリボソーム量の低下によってマーカータンパク質の発現量が減少したため、seam 細胞が欠失したように見えているという可能性である。もう一つは、RBD-1 には、下皮形成に関連した付加的な機能が存在するという可能性である。実際に、出芽酵母の rRNA プロセシング因子には、プロセシング以外の機能を持つものが知られている。たとえば、Nop15p は 26S rRNA 生合成以外に、細胞質分裂に必須の機能を持っており(Oeffinger and Tollervey, 2003)、Yph1p は 5.8S rRNA 生合成以外に、DNA 複製開始複合体 ORC の構成因子として働いている(Du and Stillman, 2002)。これらの事例が存在するため、RBD-1 が複数の機能を持つか否かという問題にはまだ結論を出すことができない。しかしながら、U3 コア構成因子 Imp4p の線虫相同遺伝子を RNAi で抑制したところ、RBD-1 の場合と非常に良く似た脱皮異常の表現型を示した(表 3)。このことから、外皮形成異常の表現型は、リボソーム生合成因子量減少の共通の表現型であると推測される。

### 第三節 RBD-1 タンパク質の分子機能

出芽酵母においては、U3 snoRNA と rRNA 前駆体との塩基対合の欠失によって rRNA 前駆体の A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 部位のプロセシングが起こらなくなることから、U3 snoRNA が 18S rRNA のプロセシングに必須であることが判明している(Sharma and Tollervey, 1999)。また、出芽酵母の核小体に局在する複数のタンパク質因子のうち、欠失すると A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 部位のプロセシングが起こらなくなり、免疫沈降を行うと U3 snoRNA を特異的に共沈する因子を U3 snoRNP の特異的な構成因子と呼びならわしてきた(Wiederkehr et al., 1998)。しかし、2000 年に Filipowicz らのグループが Rcl1p タンパク質を同定してから、U3 構成因子の概念に変化が生じた。Rcl1p は A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 部位の切断に必要であり、U3 snoRNA を共沈することができるが、グリセロール密度勾配遠心では U3 snoRNA と挙動が一致しなかったのである(Billy et al., 2000)。この報告以降、U3 構成因子は、U3 snoRNA に緊密に結合している U3 コア因子と、U3 snoRNA に直接は結合してはいないが、その機能に必要な U3 付随因子の二つの分類が行われるようになった。U3 snoRNP の全貌は長らく未同定であったが、2002 年に Baserga らのグループがおよそ 2MDa からなる U3 コア複合体を精製し、マスペクトル解析を行った(Dragon et al., 2002)。新規の 17 タンパク質を

含む 28 個のタンパク質が同定されたが、しかし、この中には出芽酵母 RBD-1 ホモログである Mrd1p は含まれていなかった。したがって、Mrd1p は A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 部位の切断に必要であり、U3 snoRNA を共沈することができるが、U3 snoRNP のコア因子ではないため、付随因子の分類に含まれるのであろう。このような U3 付随因子は他に Rcl1p, Lcp5p, Bms1p などが知られている(Wiederkehr et al., 1998; Billy et al., 2000; Wegierski et al., 2001)。

U3 snoRNP が rRNA 前駆体の部位特異的切断に重要なのは確かであるが、直接 A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 部位の切断を行う機能を何が担っているかは未だに判明していない (Kressler et al., 1999)。RBD-1/Mrd1p にも、調べた限りでは保存された RNase ドメインは存在しない。U3 snoRNP のエンドヌクレアーゼ活性は、U3 snoRNA もしくは rRNA 前駆体自身が決まった構造を取った時にのみリボザイムとして働き発揮されるのかも知れない。あるいは、保存された配列を持たない RNase が、既に同定されている U3 snoRNP 構成因子の中に存在しているのかも知れない。もしくは、まだ同定されていない U3 付随因子のひとつが RNase である可能性も考えられる。

出芽酵母 Mrd1p と線虫 RBD-1 のアミノ酸配列、および rRNA プロセシング機能の類似性から、線虫においても RBD-1 が U3 snoRNP と相互作用しているのは間違いないと思われる。RBD-1 は、線虫核小体内において、複数の RNA 結合ドメインを通じて rRNA 前駆体、もしくは snoRNA と相互作用することで U3 snoRNP の切断活性を補助しているのだろう。U3 snoRNA は、出芽酵母から昆虫、植物、ヒトに至るまで、数多くの生物種で同定されている。しかし、不思議なことに、線虫ではまだ U3 snoRNA の同定はなされていない。そのため、RBD-1 と U3 snoRNA との結合を実験的に検証することは現在不可能である。しかしながら、RBD-1 の分子機能を知る上で、RBD-1 の物理的な結合標的 RNA が U3 snoRNA であるのか、rRNA 前駆体なのか、あるいは他の snoRNA なのかを調べることは重要であると考えられる。

#### 第四節 線虫リボソーム RNA プロセシング経路

リボソーム生合成因子の機能を解析する上で、リボソーム生合成経路は必須の情報である。rRNA プロセシング経路の古典的研究は原核生物、引き続いて哺乳類細胞で行われた。遺伝子工学の発展に伴って、分子生物学的、生化学的な解析が容易な出芽酵母を用いた解析が盛んとなり、真核生物の rRNA プロセ

シング経路の解析は著しく発展した。現在では、最も詳細に rRNA プロセシング経路が決定されている生物は出芽酵母である(図 2) (Venema and Tollervey, 1999)。近年、ショウジョウバエ(Long and Dawid, 1980)やアフリカツメガエル(Borovjagin and Gerbi, 2001)を用いた生化学的解析により、多細胞生物のプロセシング経路も解析が進みつつあり、プロセシング経路の保存性、および差違を議論することが可能になりつつある。今回、線虫の rRNA プロセシング経路の概要を決定したことにより、線虫リボソーム生合成因子解析のための基礎情報を得た。この情報は、酵母、昆虫、脊椎動物以外で、真核生物 rRNA プロセシング経路を明らかにした初めての例であり、プロセシング経路の進化的保存性を検討する上でも重要な知見である。

これまでにプロセシング経路が報告された真核生物においては、rRNA 前駆体の 5'側の 5'ETS (external transcribed spacer)領域、および 18S をコードする領域の 3'側の ITS1 (internal transcribed spacer1)領域(図 2、出芽酵母では、A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> サイトに相当する部位)の切断に、U3 snoRNP が必須であることが判明している。また、U3 snoRNP を形成する因子の阻害によってこれらの部位の切断は阻害されるが、25S/28S rRNA を含む rRNA 前駆体下流側のプロセシングは影響を受けない。今回の解析で、線虫 RBD-1 が出芽酵母の A<sub>2</sub> サイトに相当する切断部位 III に必須であり、また RBD-1 の阻害により切断部位 III のプロセシングが阻害されても、26S を含む下流領域の切断は正常に進むことが明らかになった。したがって、線虫においても U3 snoRNP が存在し、RBD-1 は U3 snoRNP の機能を補助することを通じて、18S rRNA 生成に関与することが予想される。

今回の解析では、線虫 5'ETS 内に切断部位を発見することができなかった。しかしながら、複数の真核生物において、U3 snoRNP によって 5'ETS 領域内の A<sub>0</sub> と呼ばれる部位が切断されることが報告されている(図 2)。この切断部位は A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 部位よりも早期に切断を受け、さらに、A<sub>0</sub> 部位の切断が抑制されると、A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> の切断も遅延することが判明している。RBD-1 を抑制した線虫では、A<sub>2</sub> に対応する部位 III の切断が抑制されるだけでなく、全長の rRNA 前駆体量が増加することから、線虫にもおそらく U3 snoRNP に仲介される A<sub>0</sub> に相当する切断部位が存在すると予想される。線虫に A<sub>0</sub> に相当する切断部位があるとなれば、ノーザン解析の結果より、プローブ 1 領域内であると考えられる(図 9)。

rRNA プロセッシング経路の解析が最も進んでいる単細胞生物の出芽酵母では、前駆体 ITS1 領域内に二つの切断部位、 $A_2$ 、および  $A_3$  が存在することが判明している (図 2)。一方、多細胞生物のショウジョウバエ、およびアフリカツメガエルでは、 $A_3$  様の切断部位しか存在しない (図 15)。そのため、多細胞生物の ITS1 領域内には一カ所しか切断部位がないと考えられてきた。しかし、今回の解析の結果、線虫には  $A_2$ 、 $A_3$  様の二つの切断部位が存在することが判明した (図 9, III、IV)。この結果は、ITS1 内のプロセッシング部位の数は、単細胞生物であるか、多細胞生物であるかによって決まっているのではないということを示している。線虫以外の多細胞生物がなぜ  $A_2$  様の切断部位を欠失したのかについては興味を持たれる。

他の真核生物との類推より、rRNA 前駆体の 3'ETS 内にも切断部位があると予想される。この部位は、出芽酵母においては  $B_0$  と呼ばれており、二本鎖特異的エンドヌクレアーゼ RNase III 様のヌクレアーゼ、Rnt1p によってプロセッシングの最も初期に切断を受ける部位である (Kufel et al., 1999)。今回の解析では、 $B_0$  に対応する切断部位を発見することはできなかった。しかしながら、前駆体 3'側に設定したプローブ 9 によるバンドが著しく弱かったことから、プローブ 9 に対応する領域が早期に切り落とされている可能性が非常に高い。今後、ノーザンブロット以外の解析、たとえば RNase プロテクション解析およびプライマー伸長解析を用いることにより、rRNA 前駆体の正確な 3'、および 5'ETS 領域の切断部位を決定できると思われる。

今回の解析では、線虫 rRNA プロセッシングの最も主要な経路を明らかにした。しかし、切断の順序や部位に選択的な別の経路が存在する可能性は否定できない。実際に、これまで例に挙げた真核生物では、複数の rRNA プロセッシング経路の存在が報告されている (Long and Dawid, 1980; Borovjagin and Gerbi, 1999; Venema and Tollervey, 1999)。線虫 rRNA プロセッシング経路が一通りしか存在しないのであれば、第三章、図 9 にまとめた線虫 rRNA プロセッシング経路が、今回の結果から予想される最も有力な経路である。しかしながら、もし複数の rRNA プロセッシング経路が存在するとすれば、他にも幾通りかの経路が予想できる。線虫 rRNA プロセッシングの選択的経路の一つとして考えられるのが、ITS1 領域内の切断部位 IV と III が同じ経路にのっていない可能性である (図 16)。前駆体 a が III でまず切断を受け、はじめから b が生成する主要な経路と、まず IV が切れて d が生成する少数の経路があり、b, d 両方とも、その後

I、IIで切断され成熟するという二つの経路があっても、今回の解析結果と矛盾しない。もし、切断部位IVが4プローブ内に存在せず、4および5プローブの間の領域に存在するとすれば、ITS1内の切断パターンに二つの経路があることは疑いの余地が無くなる。しかしながら、実際の線虫のrRNAプロセッシングが、図9で提示している主要な経路で起こっていても、図16で示した二種類の経路で起こっていても、*rbd-1*の抑制によって部位IIIが切断されなくなるという事実は確実である。

### 第五節 リボソーム RNA の転写制御

線虫のrRNA遺伝子は、ゲノム中に55コピー繰り返して存在している。このrRNAのプロモーター領域に多型が存在すれば、その配列の違いにより転写因子の相互作用効率が変動し、RNAポリメラーゼIの転写開始効率が異なる可能性がある。そのため、発生および分化の段階に応じたリボソームの生合成制御は、異なるプロモーター配列を通じた転写効率の制御によって行われている可能性も考えられる。そこで、遺伝子コピーごとのrRNAプロモーター配列を含むETS配列を比較することにした。しかしながら、線虫のrRNA遺伝子の繰り返し配列は、ゲノムプロジェクトでは2コピー分弱しか配列が解読されていない。そこで、ゲノムプロジェクトで解読された2コピー分のETS領域の配列と、1986年に報告されているrRNA遺伝子のETS領域の配列(Ellis et al., 1986)をアラインメントした(図17)。その結果、933bpのETS領域の配列はほぼ同一であった。ゲノムプロジェクト由来の配列の1コピーにはA残基の1塩基欠失が見られたが、この原因が多型によるものであるか、あるいは配列解析時のミスによるものであるかは判別できない。また、多型によるものだとしても、欠失部位は予想転写終結点よりも上流のため、次のコピーのプロモーター活性には影響しないと考えられる。したがって、現在報告されている配列からは、塩基配列の多型によるrRNAの転写効率の制御は存在しないと予想される。しかし、rRNA遺伝子が1番染色体のテロメア近傍に位置することから、テロメア位置効果(TPE; Telomere Position Effect)が存在する可能性が考えられる。出芽酵母(Gottschling et al., 1990)、およびヒト培養細胞(Baur et al., 2001)において、テロメア近傍の遺伝子のmRNA転写は、クロマチン構造の影響でサイレンシングを受けることが報告されている。この現象が、RNAポリメラーゼIによる線虫rRNA転写にどこまで応用できるかは不明だが、線虫の

rRNA の転写にコピーごとの制御 があるとすれば、テロメアからの距離による位置効果が考えられる。また、出芽酵母においては、対数増殖期の細胞のヌクレオソーム構造の解析より、活発に転写される rRNA 遺伝子と不活性な rRNA 遺伝子の割合は約半数ずつであり、培地の組成によってこの割合が変化することが報告されている(Dammann et al., 1993)。また、アフリカツメガエルを用いた同様の解析により、近傍のクロマチン構造により、rRNA の転写活性が影響を受けることが報告されている(Lucchini & Sogo., 1992)。したがって、線虫 rRNA 遺伝子がテロメア近傍に位置するために、クロマチン構造の変化にともなって、rRNA 転写量が変動する可能性も大いに考えられる。

## 第六節 展望

リボソームの生合成には多大なエネルギーが必要であり、また、リボソームの量は細胞の翻訳量のある程度規定し得るため、細胞が置かれている状況に応じてリボソームの生合成は適切に制御されるべき過程である。本研究では、リボソーム生合成制御が多細胞生物の生育のみならず、形態形成などの高次現象を支配し得るという可能性を提示することができた。リボソーム生合成の基本経路は進化的に維持されているが、単細胞から多細胞への進化過程で、生物は組織や器官の発達に対応したリボソームの生合成制御機構を獲得してきたかもしれない。

単細胞生物である出芽酵母においても、周囲の環境に応じたリボソームの生合成制御機構の存在が示唆されはじめている。たとえば、リボソームタンパク質遺伝子の転写が停止する温度感受性変異株の解析より、原因遺伝子として細胞膜分泌に必要な遺伝子が同定されている(Mizuta and Warner, 1994)。このことから、細胞膜を作れない状況で、リボソームの生合成を停止させる機構の存在が示唆されている。出芽酵母における外界環境に応じたリボソーム生合成制御機構の研究から、今後多細胞生物に応用できる知見も増加すると思われる。

線虫 *C. elegans* は、形態的な観察が容易で、遺伝子特異的発現抑制法である RNAi 法を簡便な操作で使用できることから、リボソームの生合成制御を解析することが可能な多細胞生物である。今後、線虫を用いたさらなるリボソーム生合成因子の解析により、発生などの高次現象とリボソームの生合成制御の関連を詳細に解明していくことが可能だと思われる。さらに発生との関連を調べていくためには、他の多細胞生物におけるリボソーム生合成制御と発生との関

連も同様に解析し、発生過程におけるリボソームの量的な制御の普遍性を明らかにしていくことも重要であると予想される。このような目的には、ショウジョウバエが良いモデル生物の一つになると考えられる。ショウジョウバエは、線虫同様に個体を用いた RNAi 法が確立しており、また、取り扱いが簡便な培養細胞株も存在するため、細胞レベルであれば生化学的な解析が容易である。もう一つ、有用なモデルとしては、ヒトの病気の解析も考えられる。現在、様々な疾病と原因となる遺伝子との関連が解析されつつある。この解析がさらに進められれば、rRNA 修飾異常による先天性角化不全症（DC 病）や、リボソームタンパク質 S19 の転座によるダイヤモンドブラックファン貧血（DBA）以外の疾病においても、リボソームの生合成との関連性が示されるかもしれない。

本研究では、リボソーム生合成制御が起こり得る段階を、前駆体の蓄積と切断を切り替えることで調節ができる rRNA プロセシングの段階と仮定し、さらに、rRNA プロセシング因子の中でも、より動的な制御を受けられると思われる U3 snoRNP の付属因子、RBD-1 を解析の標的とした。そして、外皮という特異的な組織の形成には、リボソームの生合成量が一定量以上あることが必要であるという結果を得た。しかしながら、rRNA プロセシングの段階が、多細胞生物特異的なリボソーム生合成制御段階であるかどうかについては結論できなかった。この点については、今後他の rRNA プロセシング因子などを用いたさらなる解析が必要である。また、リボソーム生合成制御が起こり得る段階として、rRNA プロセシング以外にも核輸送による制御の可能性が考えられる。その理由は、核膜孔より小さなリボソームタンパク質の核輸送が、あえてエネルギーを要する能動輸送で行われており、ここに積極的な制御機構が存在し得ると考えられるためである。また、輸送の停止と再開を切り替えることで、速やかにリボソームの生合成速度を調節できると予想されることも一つの理由である。リボソームの生合成は細胞にとって非常に重要な過程であるため、おそらく制御機構は単一のものではなく、複数が並列して存在しているであろう。このような制御機構の発見、および主要な制御機構の同定は、今後の課題である。

rRNA プロセシングがリボソーム生合成制御機構の一つとして働いているとすれば、RBD-1 は細胞の状況に応じて rRNA プロセシングを調節する一種のセンサーとして働いている可能性も考えられる。胚形成期においては、RBD-1 タンパク質はその有無により rRNA プロセシングの制御を行い、孵化後の下皮細

胞においては、これからタンパク質合成が必要になることを伝える何らかのシグナルによって rRNA プロセシングの制御を行っているのかもしれない。RBD-1 は細胞の周囲の状況とリボソームの生合成を関連づけるためのセンサー因子候補のひとつである。RBD-1 を含めたリボソーム生合成因子の中で、組織や器官の形成とリボソームの生合成を関連づける因子の探索によって、多細胞生物が獲得してきた洗練された発生過程をいっそう多面的に理解することが可能になると思われる。

## 第六章 材料と方法

### 第一節 線虫系統および取り扱い

基本的な取り扱いは Brenner らの方法を参考に行った(Brenner, 1974)。

#### 線虫系統

本研究に使用した線虫系統を以下に列挙する。表記は CGC (Caenorhabditis Genetics Center)の記述を引用した。

**Bristol type N2** Genotype: *C. elegans* wild type.

**CB3388** Genotype: *ncl-1 (e1865) III*. Description: Abnormal large nucleoli in all cells.

**JR667** Genotype: *unc-119 (e2498::Tc1) III; wls51*. Description: WT strain. Integrated strain of the seam cell::GFP marker. Co-injected with *unc-119(+)*. *wls51* is pMF1; pDP#MM106B(*unc-119*).

**SU93** Genotype: *jcls1 IV*. Description: SU93 contains an integrated array expressing *jam-1::GFP*. *jam-1* (Junction Associated Protein) was formerly known as "the gene encoding the antigen recognized by the monoclonal antibody MH27." *jcls1* consists of pJS191, pRF4 and C45D3 (*unc29(+)*) DNAs. See also CGC #4961.

#### 線虫培養の基本的な試薬類

(NGM agar plate)

NaCl 3g

Agar 17g

Peptone 2.5g

H<sub>2</sub>O 975ml

オートクレーブ後、以下の試薬を加える。

cholesterol (5mg/ml in ethanol) 1ml  
CaCl<sub>2</sub> (1M) 1ml  
MgSO<sub>4</sub> (1M) 1ml  
potassium phosphate (1M) pH6 25ml

プレートに分注し、室温で数日保存した後、大腸菌 OP50 を塗布し線虫のエサとする。液体培地として使用する際は Agar を添加しない。シクロヘキシミド(CHX)を添加する場合は、オートクレーブ後に 200μg/ml になるよう添加する。

(M9 バッファー)

0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0.5% NaCl  
1mM MgSO<sub>4</sub>

(麻醉液)

1% 1-phenoxy-2-propanol in M9 バッファー

### ステージ別培養

線虫の同調培養は、Hope の本を参考に行った(Hope, 1999)。まず、成虫を basic hypochloride ( 0.25M KOH, 1-1.5% 次亜塩素酸ナトリウム) で溶解し、M9 バッファーで数回洗浄して胚を集めた。この胚を液体 NGM 培地 (組成) 内で 20°C、終夜培養して孵化させたのち、大腸菌 OP50 を与えて成長を開始させた。ステージごとに、およそ 400μl の線虫ペレットを回収した。線虫ペレットは M9 バッファーで数回洗浄し、解析するまで-80°C に保存した。

### 形質転換

線虫の形質転換は、Epstein らの方法を参考に行った(Epstein et al., 1988)。具体的には、構築した GFP 融合発現プラスミドの濃度が 100ng/μg、選択マーカー pRF4 プラスミド (*rol-6(su1006)*) の濃度が 10ng/μl になるように溶液を調製し、この溶液を若い雌雄同体の生殖巣にインジェクションし、形質転換体に現れる *rol* の形質を指標に外来遺伝子を持つ個体を同定、維持した。

## RNA 干渉法 (soaking method)

Soaking 法による RNAi は、前田らの方法を参考に行った(Maeda et al., 2001)。RNA センス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ転写し、精製後に両鎖を混ぜてアニールした。こうして得られた二本鎖 RNA を 2-4 $\mu$ g/ $\mu$ l になるように soaking buffer (3mM spermidine を含む 0.25xM9 バッファー) に溶解した。この soaking solution 4 $\mu$ l を PCR チューブに取り、ここに L4 幼虫期の雌雄同体を 16-24 時間浸し、OP50 を塗布した NGM プレート上で 12 時間回復させた後、新しいプレート上で 12 時間産卵させて、ここで産み落とされた後代の表現型を観察した。

## RNA 干渉法 (Injection method)

Injection 法は以下のように行った。Soaking 法と同様に転写、アニールさせた二本鎖 RNA を 1 $\mu$ g/ $\mu$ l になるように蒸留水に溶解し、若い成虫期の雌雄同体の生殖巣に注入した。その後、OP50 を塗布した NGM プレート上で 12 時間回復させた後、新しいプレート上で 12 時間産卵させて、ここで産み落とされた後代の表現型を観察した。

## 第二節 データベース

### WormBase

<http://www.wormbase.org/>

### Caenorhabditis elegans WWW server

<http://elegans.swmed.edu/>

### Caenorhabditis Genetics Center (CGC)

<http://biosci.umn.edu/CGC/CGChomepage.html>

### The Nematode Expression Pattern DataBase (NEXTDB)

<http://nematode.lab.nig.ac.jp/>

### PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

### Pfam

<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>

### 第三節 大腸菌株、培地

線虫のエサ、形質転換、GST 融合タンパク質作製などに用いた大腸菌株は以下の通り。

OP50            *Uracil auxotroph. E. coli B.*  
XL2-Blue        *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1*  
                  *lac [F' proAB lac<sup>P</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>].*

大腸菌の完全培地としては主に 2xYT 培地を用いた。また、抗生物質として ampicillin を 50μg/ml、kanamycin を 25μg/ml の濃度になるように加えた。

### 第四節 オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド類は、エスベックオリゴ、Invitrogen、Genset Oligos (PROLIGO)、または Sigma genosys に依頼した。

T7                    5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'  
T3                    5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'  
SP6                   5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAG-3'  
T23F6.4f76BamHI    5'-TAGGATCCGAAGAATGTCGTCCATTTGG-3'  
T23F6.4r399BamHI   5'-GCGGATCCTTATTTCTGTTCATCTTTCTCCTC-3'  
T23F6.4f565BamHI   5'-CTGGATCCCCTGCAGAAGATAAGACTGC-3'  
T23F6.4rNotI        5'-AAGCGGCCGCTTAATCCTTTTCATCATCGGC-3'  
NT23F5898SphI      5'-TTGCATGCTAATGGTGAGTAGCTTTATCCTGAAA  
                          TAAGAACAC-3'  
T23F6r7988XbaI     5'-GGTCTAGAGCTTGTTTTTGACAATTAATCGAG  
                          TTGTCATG-3'  
NT23F10788SalI     5'-AAGTCGACATCCTTTTCATCATCGGCAATTTG  
                          CAACTGTTGC-3'  
ama1f127            5'-GTTTCCAGAAGTCTACGAGAACGG-3'  
ama1r560            5'-ACACGGCGGTATGATGGTTG-3'  
CeETSf511           5'-AATACTCCCTCCCCGCACACTC-3'  
CeETSr609           5'-ACACACACTACCATCACCAACAC-3'  
CeETSf846           5'-GTTTACGAGAATAAACCCCTGTATG-3'  
CeETSr933           5'-TACGCAGACATATAGTCTAGCGAG-3'  
CelTS1f2736         5'-CGACTGGCTTCACGGTC-3'

CelTS1r2791	5'-GGCATCTCAACTGGAACG-3'
CelTS1f2969	5'-GGCTTCTTCTTCTTTGC-3'
CelTS1r3036	5'-GCCGAAACCGAACCACG-3'
CelTS1f3050	5'-CAAAAACACATAAGCACCTTTTC-3'
CelTS1r3157	5'-TACGTATTATCGAGATGCAAATCTC-3'
CelTS2f3342	5'-GTCTTCGGCTTGTCGG-3'
CelTS2r3427	5'-GACTTGTGATGCTTCTGGAC-3'
CeETSf1	5'-TTTCCTTTTCCTACACTCATGTC-3'
CeETSr210	5'-CCCCTTCACCAGCCTCTG-3'
CeETSf311	5'-CAGCCGCAGTGCTGGTGG-3'
CeETSr410	5'-TTCTCAGCCGTCTCTCTGGAG-3'
CeETSf411	5'-AAACGGTGTCTCGAGGAAGG-3'
CeETSr510	5'-ATAAAAACCACGGAAAGCCG-3'
CeKpnT7-18Sf	5'-GCGGTACCTAATACGACTCACTATAGGATACC TGATTGATTCTG-3'
CeSal-18Sr744	5'-TTGTGCGACTCTGATTTATTCAAGGT-3'
AE003551-F	5'-ATGTCACGAATTATAGTCAAACAGCTGCCC-3'
AE003551-R	5'-CTATTGCTCCTCCTCTTCGTCGTCATCTTG-3'

## 第五節 コンストラクト作製

### ベクター類

pGEX4T-3 (Amarsham Bioscience)

IPTG により GST 融合タンパク質を発現する大腸菌用ベクター。

pPD79.44 (Dr. Andrew Fire よりご供与)

pBluescript (Stratagene) のマルチクローニングサイトに野生型 *gfp* 遺伝子を持つプラスミド。これを鋳型に RNAi のネガティブコントロール用 RNA を転写することができる。

pPD95.77 (Dr. Andrew Fire よりご供与)

プロモーターのない *gfp* 遺伝子を含む線虫用ベクター。プロモーターを組み

込むことにより線虫での発現解析を行うことができる。

pEGFP-N2 (Clontech)

CMV のプロモーター下に C 末 EGFP 融合タンパク質を発現させることのできる哺乳類培養細胞用ベクター。

pUC119 (Novagen)

標準的なクローニング用ベクター。

pSP73 (Promega)

標準的なクローニング用ベクター。マルチクローニングサイトの両側に T7 および SP6 プロモーター配列を持つ。

pGEM-T Easy (Promega)

TA クローニング用ベクター。クローニングサイトの両側に T7 および SP6 プロモーター配列を持つ。

### 融合タンパク質発現用コンストラクト

pGEX-4T-3/N

線虫 1st strand cDNA より T23F6.4f76BamHI、および T23F6.4r399BamHI プライマーを用いて RT-PCR で *rbd-1* 遺伝子の N 末領域(タンパク質として 76 から 399 残基)を増幅し、プライマー部の BamHI で切断後、pGEX-4T-3 ベクターの BamHI 部位に挿入した。

pGEX-4T-3/C

線虫 1st strand cDNA より T23F6.4f565BamHI、および T23F6.4rNotI プライマーを用いて RT-PCR で *rbd-1* 遺伝子の C 末領域(565 から 872 残基)を増幅し、プライマー部の BamHI、NotI で切断後、pGEX-4T-3 ベクターの BamHI、NotI 部位に挿入した。

### GFP 発現解析用コンストラクト

pPD95.77/*rbd-1P*

線虫ゲノム DNA より NT23F5898SphI、および T23F6r7988XbaI プライマーを用いて PCR で *rbd-1* 遺伝子プロモーター領域 (ORF 開始位置を 1 とした時、-1931 から+30 塩基) を増幅し、プライマー部の SphI、XbaI で切断後、pPD95.77 ベクターの SphI、XbaI 部位に挿入した。

#### pKZ1/*rbd-1*

線虫ゲノム DNA より NT23F5898SphI、および NT23F10788Sall プライマーを用いて PCR で *rbd-1* 遺伝子プロモーター領域を含む遺伝子全長 (ORF 開始位置を 1 とした時、-1931 から+6911 塩基) を増幅し、プライマー部の SphI、Sall で切断後、pKZ1 ベクターの SphI、Sall 部位に挿入した。

### ノーザン解析プローブ用コンストラクト

#### pGEM-T Easy/probe-1

線虫ゲノム DNA より CeETSf511、および CeETSr609 プライマーを用いて PCR で線虫 5'ETS 領域(線虫 rDNA リピートとして、511-609bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シーケンスにより挿入方向を確認したところ、T7 より順向きに挿入されていた。マルチクロニングサイトの NcoI で切断することにより、SP6 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-2

線虫ゲノム DNA より CeETSf846、および CeETSr933 プライマーを用いて PCR で線虫 5'ETS 領域 (線虫 rDNA リピートとして、846-933bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シーケンスにより挿入方向を確認したところ、SP6 より順向きに挿入されていた。マルチクロニングサイトの SpeI で切断することにより、T7 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-3

線虫ゲノム DNA より CeITS1f2736、および CeITS1r2791 プライマーを用いて PCR で線虫 ITS1 領域 (線虫 rDNA リピートとして、2736-2791bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位

に挿入した。シークエンスにより挿入方向を確認したところ、 T7 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの NcoI で切断することにより、SP6 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-4

線虫ゲノム DNA より CeITS1f2969、および CeITS1r3036 プライマーを用いて PCR で線虫 ITS1 領域 (線虫 rDNA リピートとして、2969-3036bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シークエンスにより挿入方向を確認したところ、 T7 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの NcoI で切断することにより、SP6 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-5

線虫ゲノム DNA より CeITS1f3050、および CeITS1r3157 プライマーを用いて PCR で線虫 ITS1 領域(線虫 rDNA リピートとして、 3050-3157bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シークエンスにより挿入方向を確認したところ、 T7 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの NcoI で切断することにより、SP6 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-6

線虫ゲノム DNA より CeITS2f3342、および CeITS2r3357 プライマーを用いて PCR で線虫 ITS2 領域(線虫 rDNA リピートとして、 3342-3357bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シークエンスにより挿入方向を確認したところ、 T7 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの NcoI で切断することにより、SP6 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-7

線虫ゲノム DNA より CeETSf1、および CeETSr210 プライマーを用いて PCR で線虫 3'ETS 領域(線虫 rDNA リピートとして、 1-210bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。

シークエンスにより挿入方向を確認したところ、SP6 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの *SpeI* で切断することにより、T7 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-8

線虫ゲノム DNA より CeETSf311、および CeETSr410 プライマーを用いて PCR で線虫 3'ETS 領域(線虫 rDNA リピートとして、311-410bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シークエンスにより挿入方向を確認したところ、T7 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの *NcoI* で切断することにより、SP6 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pGEM-T Easy/probe-9

線虫ゲノム DNA より CeETSf411、および CeETSr510 プライマーを用いて PCR で線虫 3'ETS 領域(線虫 rDNA リピートとして、411-510bp)を増幅し、A のオーバーハングを利用して pGEM-T Easy ベクターの T の突出部位に挿入した。シークエンスにより挿入方向を確認したところ、SP6 より順向きに挿入されていた。マルチクローニングサイトの *SpeI* で切断することにより、T7 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。

#### pSP73/Ce18Sprobe

線虫ゲノム DNA より CeKpnT7-18Sf、および CeSal-18Sr744 プライマーを用いて PCR で線虫 18S 領域 (線虫 rDNA リピートとして、933-1677bp)を増幅し、プライマー部の *KpnI*、*SalI* で切断後、まず pUC119 ベクターの *KpnI*、*Sall* 部位に挿入した。このプラスミドを *KpnI*、*Sall* で切断後、18S 配列を切り出し、pSP73 ベクターの *KpnI*、*Sall* 部位に挿入した。このプラスミドを *NcoI* で切断すると、T7 RNA ポリメラーゼでアンチセンス鎖 RNA を転写することができる。*NcoI* サイトは 18SrDNA 配列の内部にあるため、こうして得られるプローブは 416nt の長さを持つ。

## 第六節 抗体作製 融合タンパク質の発現

まず、抗原タンパク質を得るために、大腸菌 XL-2 blue 株に pGEX-4T-3/N, および pGEX-4T-3/C をそれぞれ形質転換した。この大腸菌を ampicillin を含む 50ml の 2xYT 培地で 37°C、終夜培養した後、ampicillin を含む 500ml の 2xYT 培地に加えた。これを 37°C、2 時間培養した後、最終濃度 1mM の IPTG を加え、37°C、3 時間タンパク質の過剰生産を行った。この大腸菌を回収後、buffer A (50mM Tris-HCl (pH8.0), 2mM EDTA, 5% glycerol, 0.1% triton X-100) 中で破碎し、上清を Glutathione Sepharose 4B カラムを用いてアフィニティー精製した。

## 免疫

約 4mg の精製タンパク質を生理食塩水に置換し、それぞれ二匹のウサギに免疫し、抗血清を得た（スカ・フラットに委託）。

## アフィニティー精製

まず、抗血清に 50% 硫酸アンモニウムを加え、血清アルブミンを沈殿させて除いた。上清は TBS (50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl) に透析後、New Steradisc 25 0.2 $\mu$ m (クラボウ) で濾過した。アフィニティー担体としては、説明書に従って活性化 CH-Sepharose 4B (Amersham Bioscience) に GST、または抗原タンパク質をそれぞれ 1mg 共有結合させたものを用意した。透析した抗血清は、まず GST アフィニティーカラムに 3 回通し、GST に対する抗体を除去した後、抗原カラムに 3 回通し、特異的な抗体をカラムに吸着させた。カラムを TBS 洗浄した後、抗体を 0.1M Glycine (pH2.5) で溶出し、直ちに 1M Tris-HCl (pH8.0) を加えて中和した。精製した抗体は、硫酸沈殿後、TBS に透析し、分注して、解析するまで -80°C に保存した。こうして得られた精製抗体を、それぞれ CeN1 抗体、CeN2 抗体、CeC1 抗体、CeC2 抗体と名付けた。

## 第七節 ノーザンブロット解析

線虫 rRNA プロセシング経路の決定、および RBD-1 タンパク質の減少による rRNA プロセシングの異常の検出をノーザンブロットで行った。

## 線虫の破碎および RNA の抽出〈FastPrep 法〉

soaking 法によって *gfp* および *rbd-1* 遺伝子の RNAi を行った線虫を-80°C で凍結し、Lysing Matrix D (Bio101) および Micro-to-Midi RNA Purification System (Invitrogen) の RNA extraction solution と混合し、FastPrep (Bio101) を用いて、speed 6.0、20 秒間線虫を破碎した。この上清を同 RNA 抽出キットのカラムに吸着させ、wash バッファーで洗浄後、水で溶出した。この方法は前述の液体窒素法に比べ、乳鉢への付着などの損失が少なく、少量の試料から RNA を抽出するのに有効である。また、抽出にかかる時間が短いので、液体窒素法よりも RNA の分解を抑えることができる。

### 電気泳動とプロッティング

電気泳動には、6.8%ホルムアルデヒドを含む 1.2%アガロースゲルを用いた。泳動バッファーとして、1xMOPS (20mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (pH7.0), 5mM CH<sub>3</sub>COONa, 1mM EDTA) バッファーを用い、1 レーンあたり 4μg ずつアプライした。ミュールピッドで 4°C、50V、5 時間泳動を行った後、プロッティングバッファーとして 20xSSC を用いて、Nylon Membranes, positively charged (Roche Diagnostics) に一晩キャピラリートランスファーした。RNA とメンブレンは UV クロスリンクをした。

### プローブ作製

rRNA プロセッシング経路の解析においては、まず、線虫の rDNA 配列から TATA 様配列を探し、線虫における転写開始位置を予測した (図 9)。この予想を元に、18S および rRNA 前駆体の一部に相補的な 10 種のプローブをクローニングした。このプラスミドをそれぞれ NcoI で切断したものを鋳型に、DIG RNA Labelling mix (Roche Diagnostics) 存在下で SP6 RNA ポリメラーゼ(probe1 から 9)または T7 RNA ポリメラーゼ(18S probe)を用いて転写反応を行った後、ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Bioscience)によって精製した。

### ハイブリダイゼーション

メンブレンを DIG ハイブリダイゼーションバッファー中、65°C で 30 分から 3 時間振とうし、プレハイブリダイゼーションを行った。DIG ハイブリダイゼーションバッファーに、ラベルしたプローブを加え、65°C、16~18 時間振とうした。その後、2xSSC, 0.1% SDS で室温、10 分間の洗浄を 2 回行った

後、0.1xSSC, 0.1% SDS で 65°C、30 分間の洗浄を 2 回行った。このメンブレンを室温で 1 分間、バッファー1 に浸し、次に、バッファー2 中で室温、30 分間ブロッキングを行った。その後、バッファー2 に (1:10000) の希釈率で AP ラベル抗 DIG 抗体を加え、室温、30 分間抗体を反応させた。このメンブレンを洗浄バッファーで室温、15 分間、2 回洗浄し、バッファー3 中で室温、5 分間振とうした後、メンブレンに発色基質である 1% CSPD をかけ、X 線フィルムに 1 秒間から 80 分間露光してバンドを検出した。

(DIG ハイブリダイゼーションバッファー)

50% formamide  
5x SSC  
2% blocking reagent  
0.1% N-lauroylsarcosine  
0.02% SDS  
200µg/ml yeast tRNA

(バッファー1)

0.1M maleic acid  
0.15M NaCl  
NaOH で pH を 7.5 に調製して使用する。

(10x ブロッキング溶液)

10% blocking reagent in バッファー1

(バッファー2)

10x 濃度のブロッキング溶液をバッファー1 で (1:10) に希釈して使用。

(洗浄バッファー)

0.3% Tween 20 in バッファー1

(バッファー3)

0.1M Tris-HCl (pH9.5)  
0.1M NaCl

## 第八節 ウェスタンブロット解析

RNAi の遺伝子発現抑制効率を調べるために、および、線虫発生段階ごとの

RBD-1 タンパク質の発現様式を調べるためにウエスタンブロット解析を行った。線虫抽出液は、それぞれ TNE バッファー (20mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP-40, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l Aprotinin, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l Leupeptin, 1mM PMSF, 1mM DTT ) 中に調製し、Protein Assay (Bio-Rad)で濃度を測定した。SDS 入り 10%アクリルアミドゲルに、1 レーンあたり 10 $\mu$ g の total タンパク質を載せ、泳動を行った。このゲルを Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore) にトランスファーし、CeN1 抗体を (1:1000-1:2000) の希釈率で使用し、ウエスタンブロット解析を行った。

### 第九節 抗体染色

RBD タンパク質の発現の時期、組織、および細胞内局在を確認するために抗体染色を行った。浸透化 (permeate) はフリーズクラック法によって行い (Epstein et al., 1988)、固定は methanol/acetone 法を用いた (Ahn and Fire, 1994)。一次抗体には、CeN1 抗体 (1:100) および抗 Nop1p/FIB-1 マウスモノクローナル抗体 D7 (Aris and Blobel, 1988) (1:100)を用いた。二次抗体としては、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit immunoglobulin G (H+L) (Molecular Probes) (1:1000)、および Alexa Fluor 488 goat anti-mouse immunoglobulin G (H+L) (Molecular Probes) (1:1000)を使用した。試料は 0.5  $\mu$ g/ml DAPI を含む Slow Fade<sup>®</sup> Antifade Kit (Molecular Probes) を用いてマウントし、カバーガラスの端をマニキュアでシールし、蛍光顕微鏡で観察した。

### 第十節 蛍光顕微鏡観察

#### プロモーター解析

線虫 *rbd-1* 遺伝子プロモーターの発現開始時期を調べるため、および成虫での発現組織を調べるため、経時的に初期胚を観察した。スライドガラス上に 10 $\mu$ l の M9 バッファーを載せ、その中に pPD95.77/*rbd-1P* を持つ成虫を 5-6 匹載せ、25 ゲージの注射器の先で腹部を切り裂き、初期胚を放出させた。その後、カバーガラスを載せ、マニキュアで端をシールし、一時間ごとに GFP 蛍光の観察を行った。観察には OLYMPUS BX51 顕微鏡を使用し、U-25 ND25 フィルターで減光した 470-490 nm の励起光を照射し、510-550 nm の光を、露光時間 4 秒間に固定して観察した。

## 第十一節 ショ糖密度勾配遠心

soaking 法によって大量に RNAi を行った線虫を Lysing Matrix D (Bio101) と混合し、密度勾配バッファーA (50mM Tris-HCl (pH7.5), 25mM KCl, 5mM MgCl, 0.5% Triton X-100, 250mM sucrose) を加えて FastPrep (Bio101) を用いて破碎した。上清は新しいチューブに移し、4°C, 13000xg, 30 分間遠心してミトコンドリアと細胞残渣を除いた。その後、10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl を含む 10-30%のショ糖密度勾配溶液に載せ、ベックマン MLS50 ローターで 4°C, 40000rpm, 2 時間遠心した。遠心終了後、試料はピストン・グラジエント・フラクショネーター (152 型) (TOWA ラボ) を用いて分画し、260nm の吸光度を測定した。この画分は 96well プレートに上部から順に回収し、RNA およびタンパク質の解析を行った。

## 第十二節 RNA 定量

*rbd-1* の抑制による 18S rRNA 生合成量の減少を測定するために、26S と 18S のバンドごとに RNA の定量を行った。まず、定量性のある範囲を確認するために、0.1µg, 0.2µg, 0.5µg および 1µg の野生型線虫 total RNA を変性 4%ポリアクリルアミドゲルで泳動し、Toluidine Blue O (Division Chroma) で染色し、NIH イメージでバンドの濃さを測定した。0.5µg までは定量性が得られることを確認したのち、0.2µg の野生型、*gfp(RNAi)*、および *rbd-1(RNAi)* 線虫の total RNA をそれぞれ同様のゲルで泳動、染色し、18S/26S の比を定量した。

## 第十三節 電子顕微鏡観察

### 走査型電子顕微鏡観察

線虫を M9 バッファーで数回洗浄したのち、Parductz の固定液 (2% OsO<sub>4</sub> 6 容、飽和 HgCl<sub>2</sub> 水溶液 1 容)(Small and Marszalek, 1969)で室温、30 分間固定した。水で洗浄後、ethanol で脱水し、その後 amylacetate に置換した。試料は HCP-2 臨界点乾燥装置 (日立) を用いて乾燥し、金を蒸着後、S-2150N 走査型電子顕微鏡 (日立) によって観察を行った。

### 透過型電子顕微鏡観察

線虫を M9 バッファーで数回洗浄したのち、GA 固定液 (3% glutaraldehyde, 50mM cacodylate buffer, 10 $\mu$ M MgSO<sub>4</sub>, 1mM sucrose) で室温、30 分間固定した。試料を洗浄後、ethanol で脱水し、spurr 樹脂に置換し、70°C、8 時間保温して樹脂を重合させた。100nm 厚に薄切した切片に酢酸ウラニウム、クエン酸鉛の二重染色を施し、H-7100 透過型電子顕微鏡 (日立) で観察した。

## 謝辞

指導教官である坂本博教授には本研究を遂行するに当たり、研究方針や、結果の解析、論文のとりまとめに関して数多くの助言とご意見をいただきました。未熟な私を博士課程からラボに入れてくださり、研究面だけでなく精神面も育てていただきました。ここに深く感謝いたします。また、井上邦夫助教授には要所要所での的確なコメントをいただきました。ここにお礼申し上げます。藤原俊伸助手には、実験、研究の進め方、学位論文のとりまとめ方を幅広く、力強くご指導いただきました。非常に感謝いたしております。また、本論文の副査を快く引き受けてくださった米澤一仁教授、川井浩史教授に深くお礼申し上げます。電子顕微鏡写真に関しましては、洲崎敏伸助教授との共同研究として行いました。洲崎助教授には、電子顕微鏡の原理から操作方法まで大変親切に教えていただき、結果の解析にも数多くの助言をいただきました。小菅桂子助教授には、微量線虫からのタンパク質および RNA の抽出のために、FastPrep 装置をご貸与いただきました。抗 FIB-1 抗体はフロリダ大学の John Aris 博士よりご供与いただきました。線虫ベクターキットはスタンフォード大学の Andrew Fire 博士よりご供与いただきました。国立遺伝学研究所の小原雄治博士からは線虫 cDNA クローンをご供与いただきました。*Caenorhabditis elegans* Genetics Center からは線虫および大腸菌をいただきました。ここにお礼申し上げます。

RNA 情報発現研究室の皆様には、日々有益なディスカッションをしていただきました。河野泰三博士、および高崎輝恒さんには実験に関して、また線虫の扱いやデータベース解析に関して当を得た有用な助言をいただきました。笹野有未さんには、情報検索、および線虫大量培養に関して協力していただきました。齋藤都暁さんには、タンパク質、および細胞に関する実験を教えていただきました。神唯さん、三嶋雄一郎さんには、ノーザンブロットングに関して的確な助言をいただきました。ラボの皆様には深く感謝いたします。

最後に、いつでも私を応援し、幸福を願ってくれている両親に心からの感謝を捧げます。

2004年2月10日

## 参考文献

- Ahnn J, Fire A** (1994) A screen for genetic loci required for body-wall muscle development during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **137**: 483-498
- Aris JP, Blobel G** (1988) Identification and characterization of a yeast nucleolar protein that is similar to a rat liver nucleolar protein. *J Cell Biol* **107**: 17-31
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA** (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920
- Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE** (2001) Telomere position effect in human cells. *Science* **292**: 2075-2077
- Beltrame M, Tollervey D** (1995) Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J* **14**: 4350-4356
- Billy E, Wegierski T, Nasr F, Filipowicz W** (2000) Rcl1p, the yeast protein similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is required for 18S rRNA biogenesis. *EMBO J* **19**: 2115-2126
- Björk P, Bauren G, Jin S, Tong YG, Burglin TR, Hellman U, Wieslander L** (2002) A novel conserved RNA-binding domain protein, RBD-1, is essential for ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **13**: 3683-3695
- Borovjagin AV, Gerbi SA** (1999) U3 small nucleolar RNA is essential for cleavage at sites 1, 2 and 3 in pre-rRNA and determines which rRNA processing pathway is taken in *Xenopus* oocytes. *J Mol Biol* **286**: 1347-1363
- Borovjagin AV, Gerbi SA** (2001) *Xenopus* U3 snoRNA GAC-Box A' and Box A sequences play distinct functional roles in rRNA processing. *Mol Cell Biol* **21**: 6210-6221
- Brenner S** (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94
- Chu S, Archer RH, Zengel JM, Lindahl L** (1994) The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 659-663

**Culver GM, Noller HF (1999)** Efficient reconstitution of functional Escherichia coli 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins. *RNA* **5**: 832-843

**Curgy JJ (1985)** The mitoribosomes. *Biol Cell* **54**: 1-38

**Dammann R, Lucchini R, Koller T, Sogo JM (1993)** Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 2331-2338

**Decatur WA, Fournier MJ (2002)** rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* **27**: 344-351

**Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlage RE, Shabanowitz J, Osheim Y, Beyer AL, Hunt DF, Baserga SJ (2002)** A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**: 967-970

**Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N (1999)** The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* **21**: 169-175

**Du YC, Stillman B (2002)** Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell* **109**: 835-848

**Dua K, Williams TM, Beretta L (2001)** Translational control of the proteome: relevance to cancer. *Proteomics* **1**: 1191-1199

**Ellis RE, Sulston JE, Coulson AR (1986)** The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. *Nucleic Acids Res* **14**: 2345-2364

**Epstein HF, Berliner GC, Casey DL, Ortiz I (1988)** Purified thick filaments from the nematode *Caenorhabditis elegans*: evidence for multiple proteins associated with core structures. *J Cell Biol* **106**: 1985-1995

**Files JG, Hirsh D (1981)** Ribosomal DNA of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* **149**: 223-240

**Frank DJ, Edgar BA, Roth MB** (2002) The *Drosophila melanogaster* gene *brain tumor* negatively regulates cell growth and ribosomal RNA synthesis. *Development* **129**: 399-407

**Frank DJ, Roth MB** (1998) *ncl-1* is required for the regulation of cell size and ribosomal RNA synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **140**: 1321-1329

**Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J** (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**: 325-330

**Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F** (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42

**Giordano E, Peluso I, Senger S, Furia M** (1999) *minifly*, a *Drosophila* gene required for ribosome biogenesis. *J Cell Biol* **144**: 1123-1133

**Gonczy P, Echeverri C, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, Duperon J, Oegema J, Brehm M, Cassin E, Hannak E, Kirkham M, Pichler S, Flohrs K, Goessen A, Leidel S, Alleaume AM, Martin C, Ozlu N, Bork P, Hyman AA** (2000) Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**: 331-336

**Gorlich D, Mattaj IW** (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**: 1513-1518

**Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA** (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**: 751-762

**Grandi P, Rybin V, Bassler J, Petfalski E, Strauss D, Marzioch M, Schafer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervey D, Gavin AC, Hurt E** (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* **10**: 105-115

**Green R, Noller HF** (1999) Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry* **38**: 1772-1779

**Grummt I** (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* **17**: 1691-1702

**Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A (2001)** High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679-688

**Hartshorne T, Toyofuku W (1999)** Two 5'-ETS regions implicated in interactions with U3 snoRNA are required for small subunit rRNA maturation in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* **27**: 3300-3309

**Hartshorne T, Toyofuku W, Hollenbaugh J (2001)** *Trypanosoma brucei* 5'ETS A'-cleavage is directed by 3'-adjacent sequences, but not two U3 snoRNA-binding elements, which are all required for subsequent pre-small subunit rRNA processing events. *J Mol Biol* **313**: 733-749

**Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I (1998)** X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* **19**: 32-38

**Held WA, Mizushima S, Nomura M (1973)** Reconstitution of *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunits from purified molecular components. *J Biol Chem* **248**: 5720-5730

**Held WA, Nomura M (1973)** Rate determining step in the reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits. *Biochemistry* **12**: 3273-3281

**Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR, eds (1990)** THE RIBOSOME  
structure, function, & evolution,

**Ho JH, Johnson AW (1999)** NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 2389-2399

**Hope I (1999)** *C. elegans*: A Practical Approach. Oxford University Press, NY

**Jakel S, Gorlich D (1998)** Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* **17**: 4491-4502

**Jansen R, Tollervey D, Hurt EC (1993)** A U3 snoRNP protein with homology to splicing factor PRP4 and G beta domains is required for ribosomal RNA processing. *EMBO J* **12**: 2549-2558

**Jin SB, Zhao J, Björk P, Schmekel K, Ljungdahl PO, Wieslander L (2002)** Mrd1p is required for processing of pre-rRNA and for maintenance of steady-state levels of 40 S ribosomal subunits in yeast. *J Biol Chem* **277**: 18431-18439

**Johnson AW, Lund E, Dahlberg J (2002)** Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* **27**: 580-585

**Karl T, Onder K, Kodzius R, Pichova A, Wimmer H, Th r A, Hundsberger H, Loffler M, Klade T, Beyer A, Breitenbach M, Koller L (1999)** GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically. *Curr Genet* **34**: 419-429

**Kawano T, Fujita M, Sakamoto H (2000)** Unique and redundant functions of SR proteins, a conserved family of splicing factors, in *Caenorhabditis elegans* development. *Mech Dev* **95**: 67-76

**Kelly WG, Xu S, Montgomery MK, Fire A (1997)** Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* **146**: 227-238

**Khaitovich P, Tenson T, Kloss P, Mankin AS (1999)** Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA. *Biochemistry* **38**: 1780-1788

**Kondoh H, Yuasa T, Yanagida M (2000)** Mis3 with a conserved RNA binding motif is essential for ribosome biogenesis and implicated in the start of cell growth and S phase checkpoint. *Genes Cells* **5**: 525-541

**Kressler D, Linder P, de La Cruz J (1999)** Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 7897-7912

**Kufel J, Dichtl B, Tollervey D (1999)** Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* **5**: 909-917

**Lambertsson A (1998)** The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv Genet* **38**: 69-134

**Lang WH, Reeder RH (1995)** Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9781-9785

**Lee SJ, Baserga SJ** (1999) Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. *Mol Cell Biol* **19**: 5441-5452

**Long EO, Dawid IB** (1980) Alternative pathways in the processing of ribosomal RNA precursor in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* **138**: 873-878

**Lucchini R, Sogo JM** (1992) Different chromatin structures along the spacers flanking active and inactive *Xenopus* rRNA genes. *Mol Cell Biol* **12**: 4288-4296

**MacQueen AJ, Villeneuve AM** (2001) Nuclear reorganization and homologous chromosome pairing during meiotic prophase require *C. elegans* chk-2. *Genes Dev* **15**: 1674-1687

**Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A** (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* **11**: 171-176

**Maden BE, Hughes JM** (1997) Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma* **105**: 391-400

**Mason SW, Sander EE, Grummt I** (1997) Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *EMBO J* **16**: 163-172

**Mayer AN, Fishman MC** (2003) Nil per os encodes a conserved RNA recognition motif protein required for morphogenesis and cytodifferentiation of digestive organs in zebrafish. *Development* **130**: 3917-3928

**Miller OL, Jr., Beatty BR** (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**: 955-957

**Mitchell JR, Wood E, Collins K** (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**: 551-555

**Mizuta K, Warner JR** (1994) Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Mol Cell Biol* **14**: 2493-2502

**Mohler WA, Simske JS, Williams-Masson EM, Hardin JD, White JG** (1998) Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis. *Curr Biol* **8**: 1087-1090

**Nomura M, Erdmann VA** (1970) Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. *Nature* **228**: 744-748

**Oeffinger M, Tollervey D** (2003) Yeast Nop15p is an RNA-binding protein required for pre-rRNA processing and cytokinesis. *EMBO J* **22**: 6573-6583

**Okuwaki M, Tsujimoto M, Nagata K** (2002) The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell* **13**: 2016-2030

**Paule MR, White RJ** (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* **28**: 1283-1298

**Plafker SM, Macara IG** (2002) Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Mol Cell Biol* **22**: 1266-1275

**Reeder RH, Lang WH** (1997) Terminating transcription in eukaryotes: lessons learned from RNA polymerase I. *Trends Biochem Sci* **22**: 473-477

**Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, Rego E, Mari F, Rao PH, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP** (2003) Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* **299**: 259-262

**Ruggero D, Pandolfi PP** (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* **3**: 179-192

**Savino R, Gerbi SA** (1990) In vivo disruption of Xenopus U3 snRNA affects ribosomal RNA processing. *EMBO J* **9**: 2299-2308

**Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A** (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615-623

**Seydoux G, Dunn MA** (1997) Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**: 2191-2201

**Sharma K, Tollervey D** (1999) Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Mol Cell Biol* **19**: 6012-6019

**Singh RN, Sulston JE** (1978) Some observations on moulting in *Caenorhabditis elegans*. *Nematologica* **24**: 63-71

- Siomi H, Dreyfuss G** (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 345-353
- Small EB, Marszalek DS** (1969) Scanning electron microscopy of fixed, frozen, and dried protozoa. *Science* **163**: 1064-1065
- Sonoda J, Wharton RP** (2001) Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev* **15**: 762-773
- Spahn CM, Beckmann R, Eswar N, Penczek PA, Sali A, Blobel G, Frank J** (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**: 373-386
- Tanaka R, Satoh H, Moriyama M, Satoh K, Morishita Y, Yoshida S, Watanabe T, Nakamura Y, Mori S** (2000) Intronic U50 small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene of no protein-coding potential is mapped at the chromosome breakpoint t(3;6)(q27;q15) of human B-cell lymphoma. *Genes Cells* **5**: 277-287
- Tollervey D, Lehtonen H, Carmo-Fonseca M, Hurt EC** (1991) The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J* **10**: 573-583
- Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC** (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* **72**: 443-457
- Toney LM, Cattoretti G, Graf JA, Merghoub T, Pandolfi PP, Dalla-Favera R, Ye BH, Dent AL** (2000) BCL-6 regulates chemokine gene transcription in macrophages. *Nat Immunol* **1**: 214-220
- Udem SA, Warner JR** (1972) Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **65**: 227-242
- Venema J, Tollervey D** (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **33**: 261-311
- Wegierski T, Billy E, Nasr F, Filipowicz W** (2001) Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *RNA* **7**: 1254-1267

**Weis K** (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 328-335

**Wiederkehr T, Pretot RF, Minvielle-Sebastia L** (1998) Synthetic lethal interactions with conditional poly(A) polymerase alleles identify LCP5, a gene involved in 18S rRNA maturation. *RNA* **4**: 1357-1372

**Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V** (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327-339

**Wood WB**, ed (1988) *THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS*, NY

**Wool IG** (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* **21**: 164

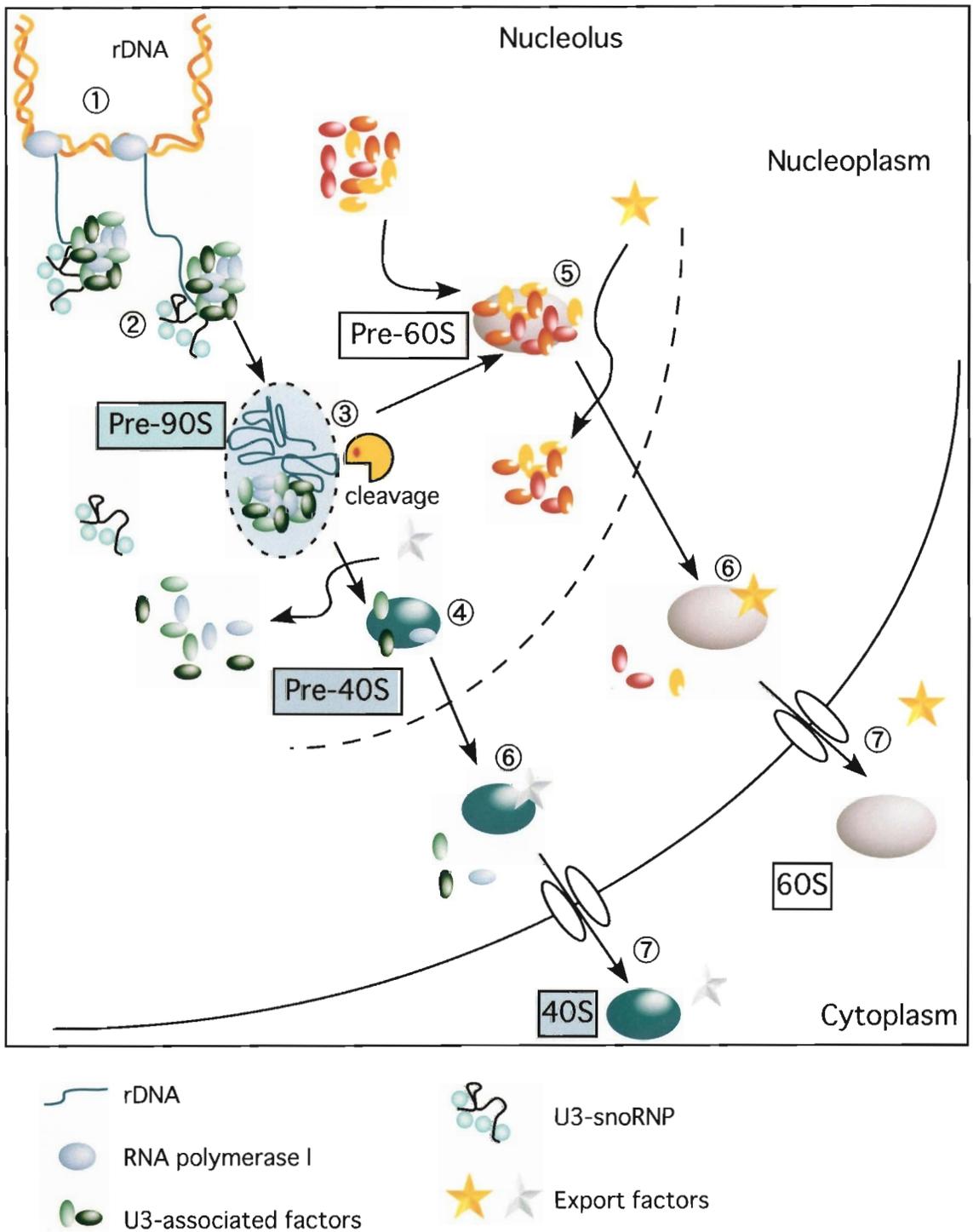
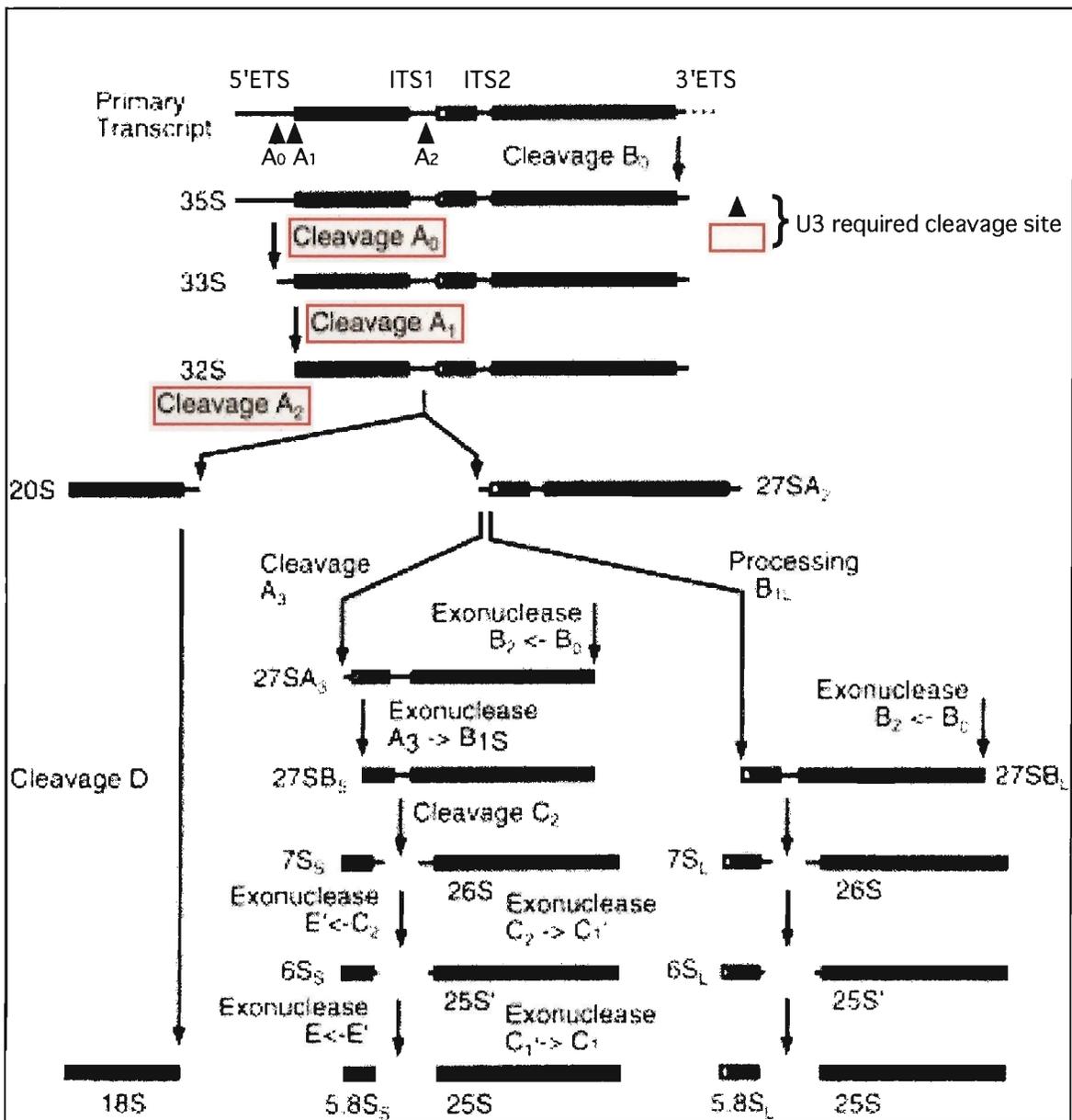


図1 リボソーム生合成過程の概略図。

1. 核小体内でのRNAポリメラーゼIによるrRNA前駆体の転写。2. U3 snoRNPおよび付随因子 (associated factor) のrRNA前駆体への集合。3. rRNA前駆体のプロセッシングおよび修飾。4. 40Sサブユニット前駆体の集合。5. 60Sサブユニット前駆体の集合。6. 輸送因子の結合。7. 輸送、成熟。

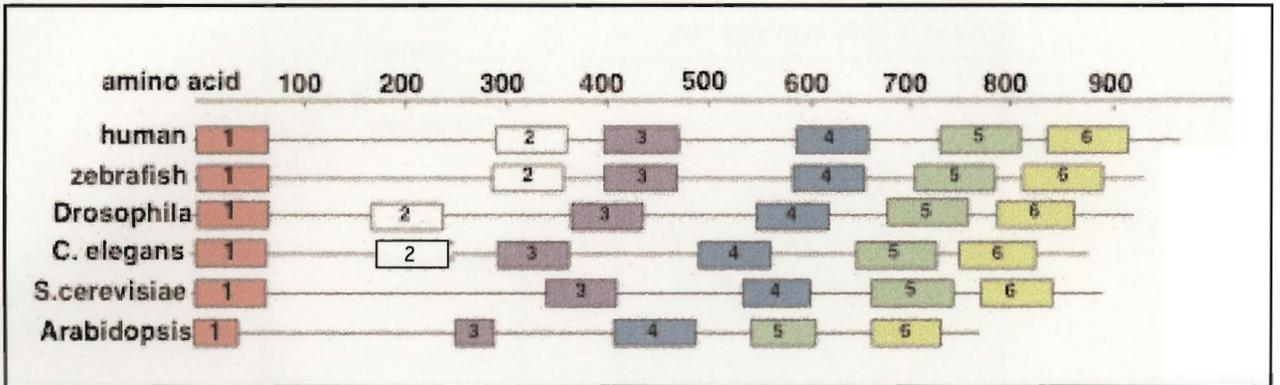


Drawing is modified from Fatica A et. al. (2003).

## 図2 出芽酵母のrRNAプロセッシング経路。

黒枠は18S, 5.8S, 25S rRNAをコードする領域を示す。細線はプロセッシングによって除かれる領域を示す。U3 snoRNPが関与する切断部位を赤枠、および矢頭で示す。初期転写産物はB<sub>0</sub>サイトで切断され、35S前駆体になる。35S前駆体はA<sub>0</sub>サイトで切断を受け、33S前駆体になり、33S前駆体は速やかにA<sub>1</sub>サイトで切断を受け32S前駆体になる。32S前駆体はA<sub>2</sub>サイトで切断され、それぞれ40Sサブユニット前駆体と60Sサブユニット前駆体に含まれる、20S前駆体と27SA<sub>2</sub>前駆体に分かれる。27SA<sub>2</sub>前駆体のプロセッシングには二つの選択的経路がある。主要な経路では、27SA<sub>2</sub>前駆体はRNaseMRPによってA<sub>3</sub>サイトで切断され、27SA<sub>3</sub>前駆体を生じ、27SA<sub>3</sub>前駆体はエキソヌクラーゼRat1p、およびXnr1pによってトリミングされ、27SB<sub>5</sub>前駆体になる。もう一方の経路では、27SA<sub>2</sub>前駆体は未同定の経路で27SB<sub>L</sub>前駆体になる。27SB<sub>5</sub>前駆体と27SB<sub>L</sub>前駆体は、同じ経路で5.8S、および25S rRNAになる。B<sub>2</sub>サイトまでのトリミングによって成熟した25S rRNAの3'末端が作られる。5.8S rRNAの3'末端はC<sub>2</sub>サイトからEサイトまでのトリミングによって作られる。U3による切断部位に必要なエンドヌクラーゼは同定されていない。

A



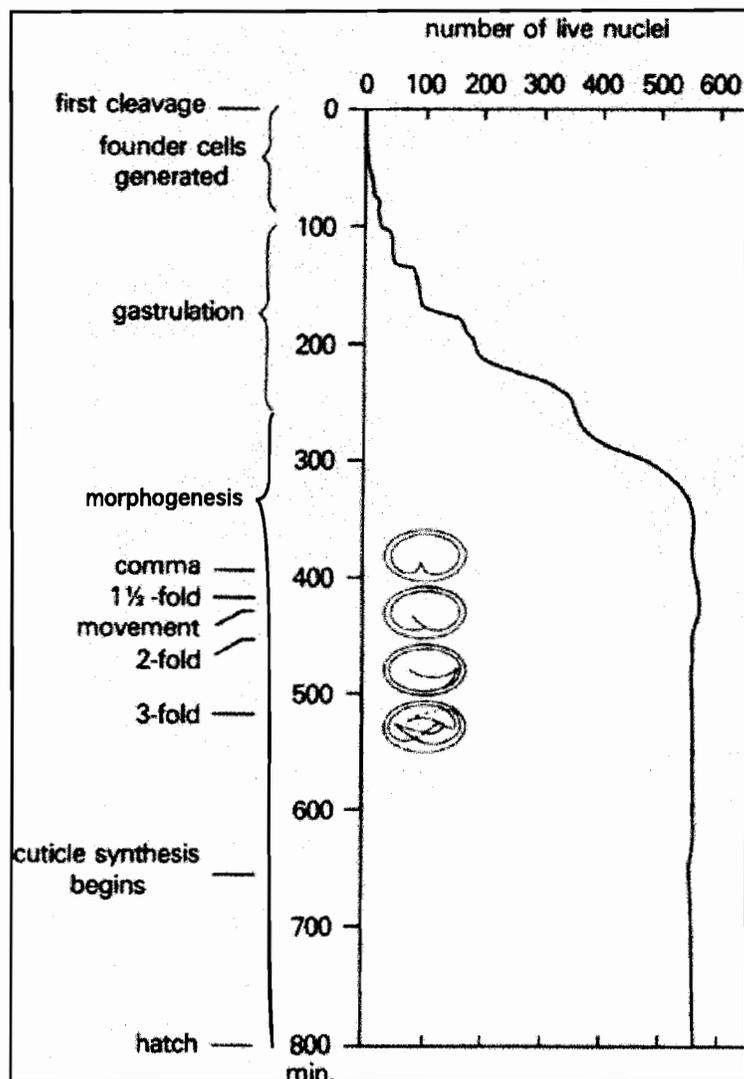
Drawing is modified from Mayer AN and Fishman MC (2003).

B



### 図3 RBDタンパク質の進化的な保存性。

(A)様々な真核生物におけるRBDタンパク質のRNA結合ドメイン(RBD, RNA-binding domain)の配置。黒枠はRBDを表し、対応するRBDにそれぞれ同じ色を付けている。GeneBank Accession No.は、それぞれヒト(NP\_055667)、ゼブラフィッシュ(AY 299514)、ショウジョウバエ(AAM29657)、線虫(NP\_502432)、出芽酵母(NP\_015437)、シロイヌナズナ(CAB40378)である。(B)線虫RBD-1のドメインの配置、および抗体作製部位。作製された抗体の特異性は(図8A)参照。



Drawing is modified from the *C. elegans* II book(1997).

#### 図4 20°Cにおける線虫*C. elegans*の胚形成過程。

左側に胚形成の時期、および形態形成の段階を示す。右側にそれぞれの時期の生存核の数を示す。線虫の胚形成期は大きく3つに分類され、一つ目が体軸形成期（別名：始原細胞形成期）、二つ目が陥入期、三つ目が形態形成期である。受精後の数回の分裂は全て不等分裂であり、28細胞期までにすべての始原細胞が形成される。28細胞期から300細胞期までは陥入期と呼ばれ、器官の原基が形成される。300細胞期以降は細胞分裂がゆっくりとなり、550細胞になると細胞分裂は停止する。これ以降、さらに精密な組織の分化が起こり、幼虫としての体勢が調えられる。

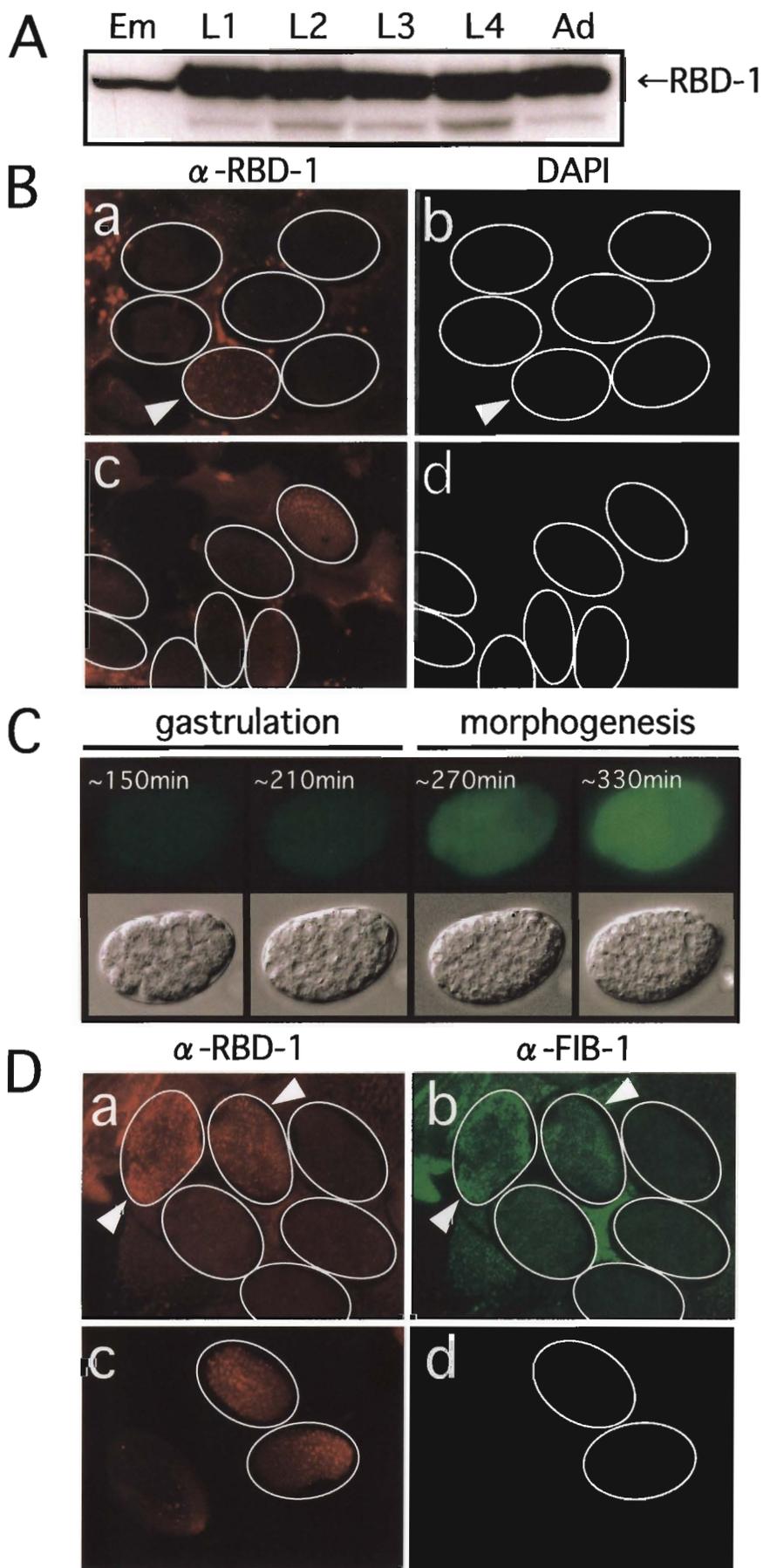


図5 線虫発生過程におけるRBD-1の発現。

(A)抗RBD-1抗体によるウエスタンブロット解析。RBD-1は胚形成期には低発現であり、胚形成期以降は高発現である。同調培養した野生型線虫より抽出液を調製し、等量ずつ解析に用いた。Em, 胚、L1からL4, L1幼虫期からL4幼虫期、Ad,成虫。(B)抗RBD-1抗体による線虫胚の抗体染色。a, b、抗RBD-1抗体で染色した線虫胚。b,d、同じ胚をDAPIで染色した像。矢頭は1細胞期の胚を示す。(C)胚形成期における $rbd-1::GFP$ の発現。第一回目の細胞分裂からの時間を上のパネルの中に示す。同一の胚におけるGFP蛍光(上)、およびノマルスキー像(下)の変化を時間を追って観察している。(D)線虫胚におけるRBD-1とFIB-1の発現。胚は抗RBD-1抗体(a,c)と抗FIB-1抗体(b,d)で共染色している。(a,b)矢頭の胚は1細胞期、それ以外の胚は6-30細胞期。(c,d)形態形成期の胚。

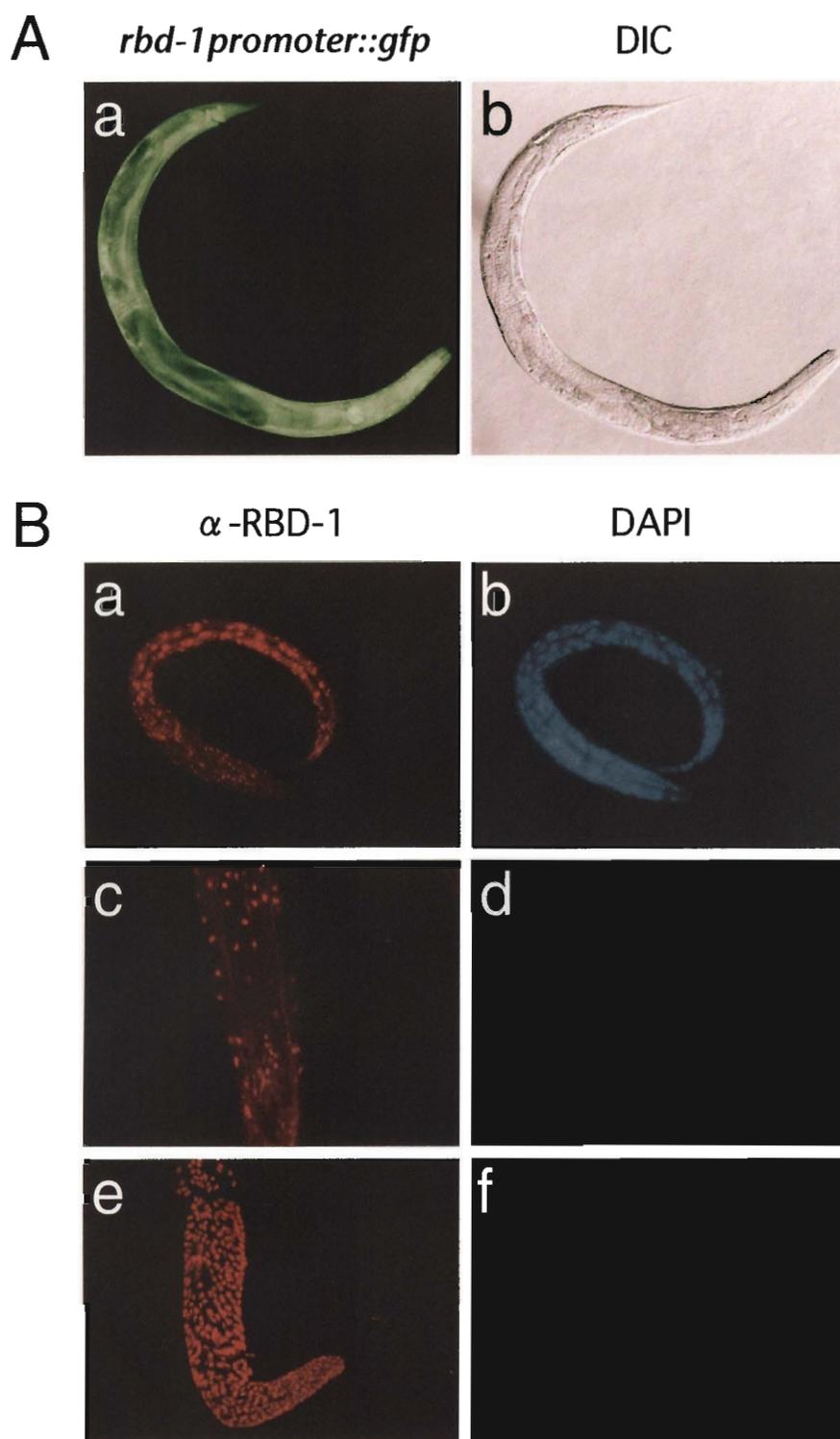


図6 胚形成期以降のRBD-1の発現。

(A)若い成虫における*rbd-1*::GFPの発現。同一の線虫におけるGFP蛍光(a)、および微分干渉像(b)。(B)抗RBD-1抗体による線虫の抗体染色像。L1幼虫期(a)、成虫の身体後半部(c)、成虫の生殖巣(e)。a, c, eと同一のサンプルをDAPI染色して核を示したもの(b, d, f)。

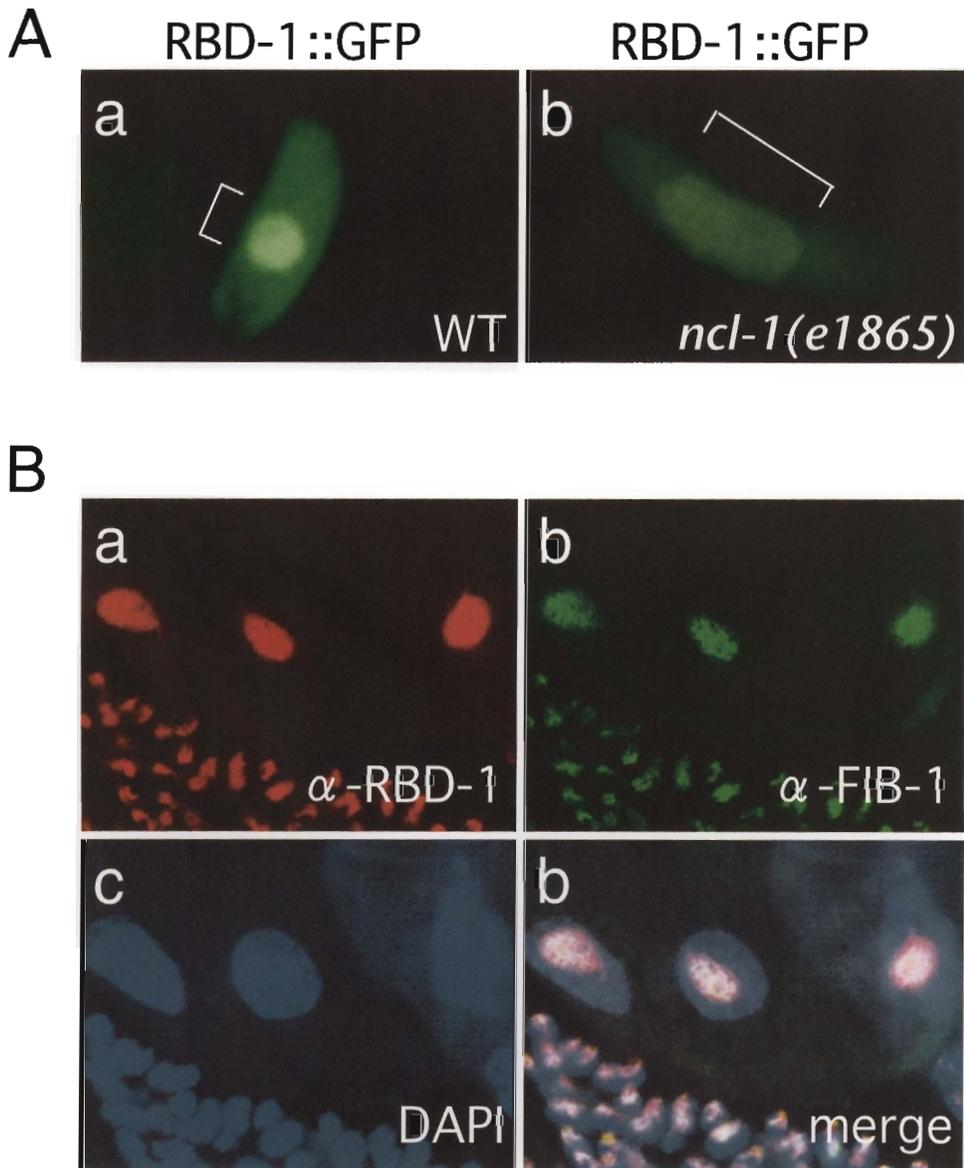


図7 RBD-1の細胞内局在。

(A)RBD-1::GFPの細胞内局在。GFP蛍光は核に弱く存在し、核小体様領域（カギ括弧）に強く存在する。野生型(a)、*ncl-1(e1865)*(b)。(B)腸細胞内のRBD-1の局在。腸細胞は、抗RBD-1抗体(a)、抗FIB-1抗体(b)、および核を示すためDAPI(c)で染色した。重ね合わせ像(d)。

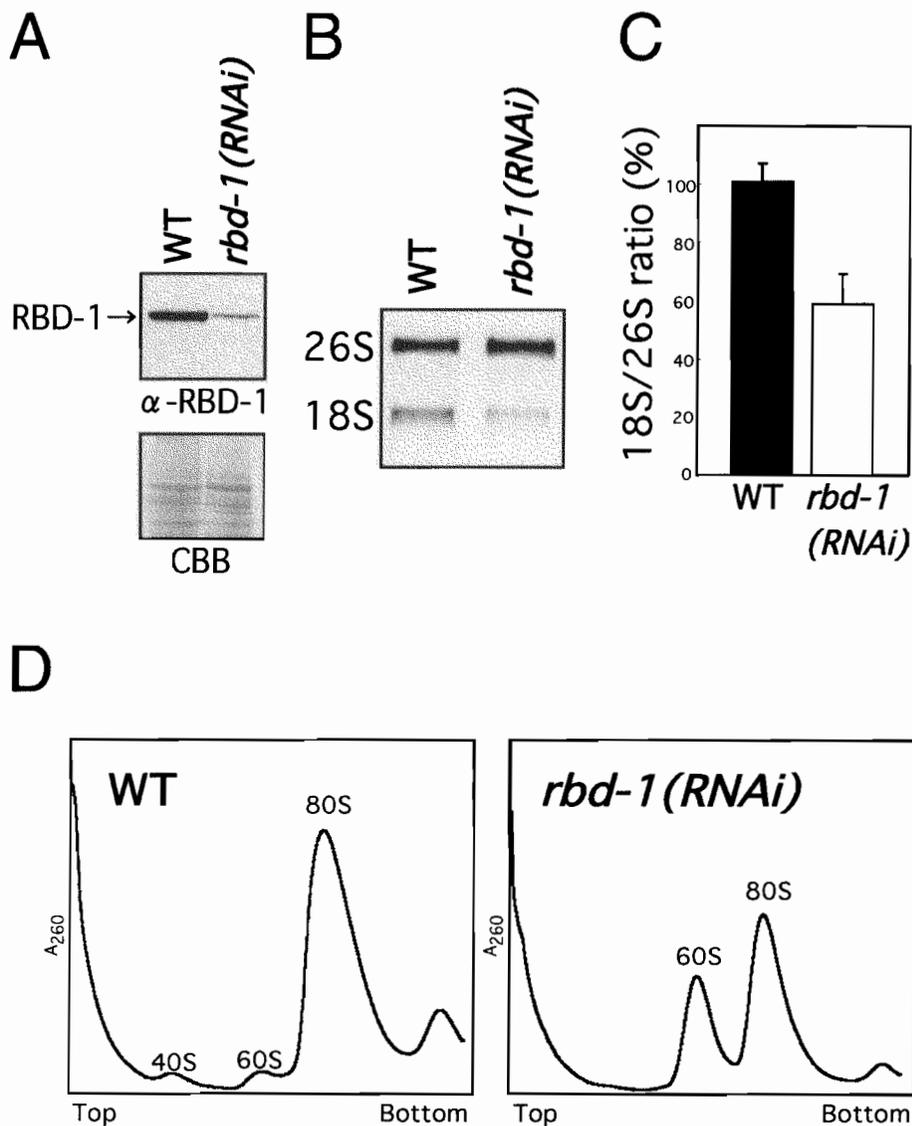


図8 *rbd-1*のRNAiによる18S rRNAの合成阻害。

(A) RNAiによるRBD-1の発現抑制効果。野生型(WT)およびRNAiを行った線虫(*rbd-1*(RNAi))から抽出液を調製し、等量ずつ泳動した。上のパネルはウエスタンブロット解析、下のパネルは同じサンプルのCBB染色。(B) RNAiによる18S rRNA特異的な生合成の抑制。野生型(WT)およびRNAiを行った線虫(*rbd-1*(RNAi))からRNAを調製し、等量ずつ変性アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色した像。(C) RNAiによる18S rRNA減少の割合。Bと同じRNAをそれぞれ変性アクリルアミドゲルで泳動し、トルイジンブルーで染色し、NIH imageプログラムを用いて定量し、グラフ化した。(D) RNAiによる40Sサブユニットおよび80Sサブユニットの減少。野生型(WT)およびRNAiを行った線虫(*rbd-1*(RNAi))から抽出液を調製し、等量ずつ10-30%ショ糖密度勾配遠心にかけて、260nmの吸光度を測定してリボソームのプロファイルを得た。

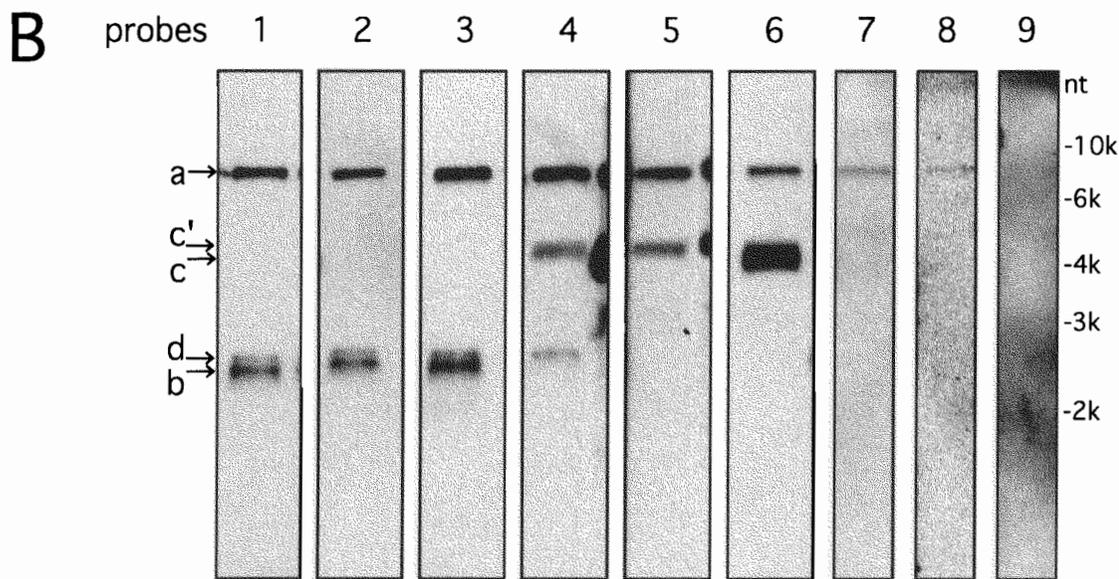
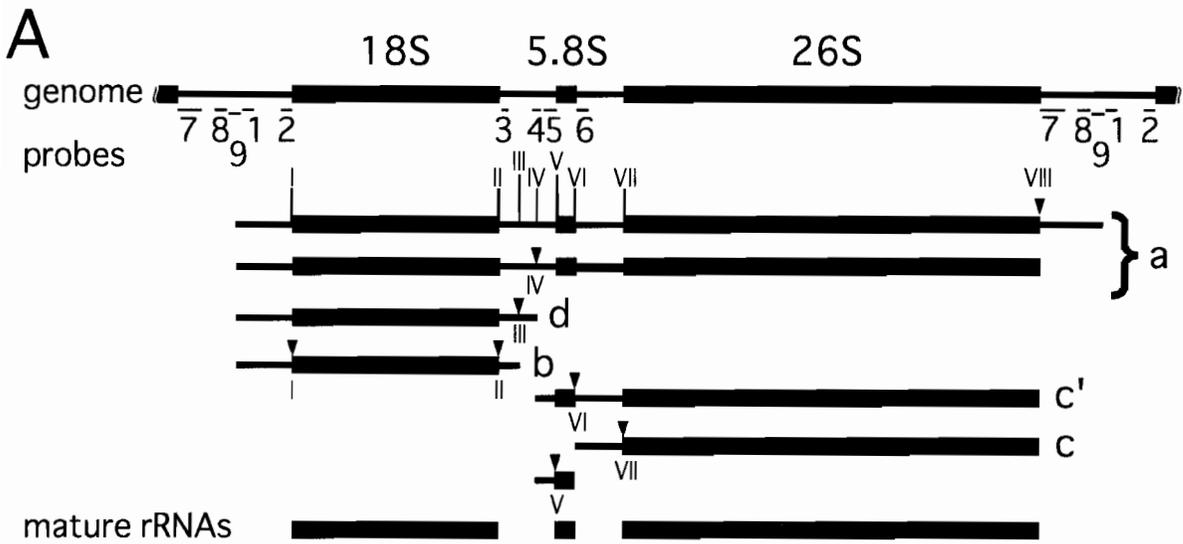
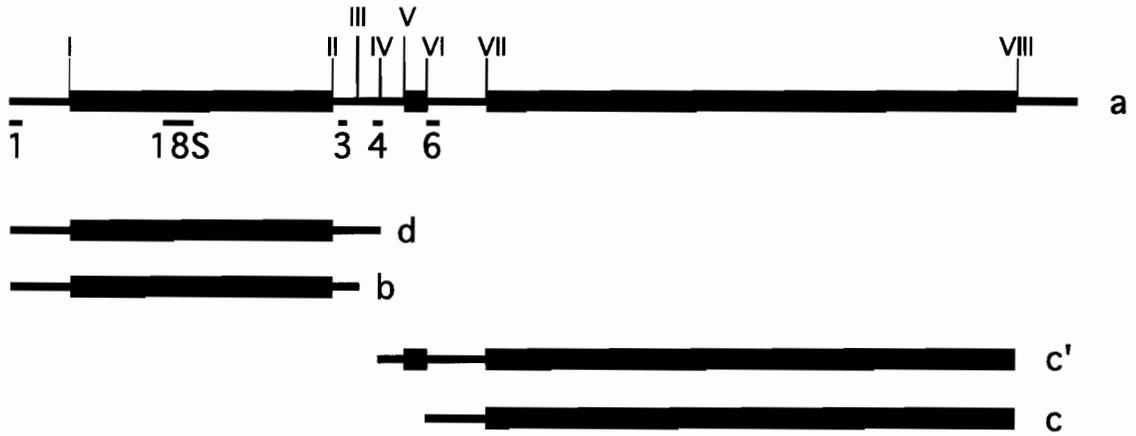


図9 線虫rRNAプロセッシング経路の解析。

(A)線虫rRNAをコードするゲノム領域、初期転写産物、プロセッシング中間体、および成熟rRNAの概略図。黒枠は18S, 5.8S, 26S rRNA領域を示す。IからVIIIの切断部位は初期転写産物上に示す。ノーザンプロット解析に使用したプローブ領域はゲノム領域上に示す。(B)rRNA前駆体、およびプロセッシング中間体の同定。Aに示した特異的プローブを用いて行ったノーザンプロット解析の結果を示す。(C)3'および5'ETS領域の予想される境界の核酸配列。プローブ9および1はAに示した部位。二カ所の黒枠はTATA様配列を示す。下線はTに富んだ配列を示す。

A



B

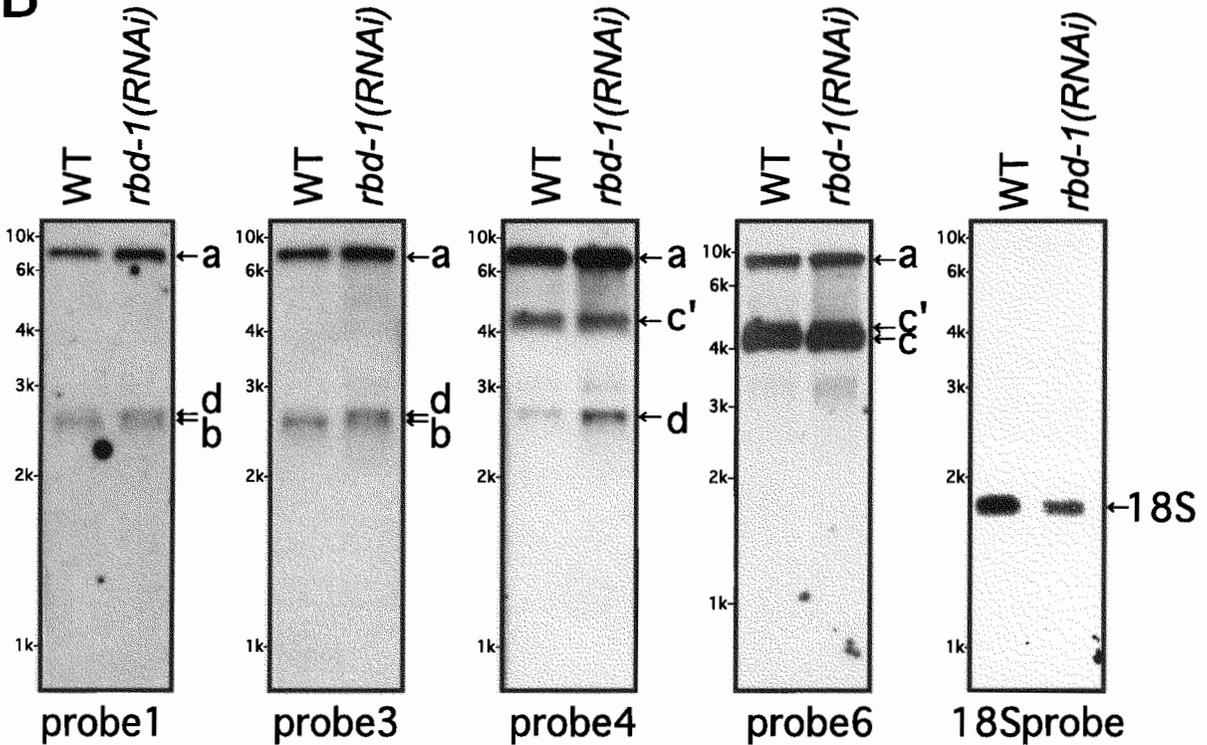


図10 *rbd-1*のRNAiによるrRNA前駆体切断部位の切断阻害。

(A)線虫rRNA初期転写産物、およびプロセッシング中間体の概略図。ノーザンプロット解析で使用したプローブ領域(1, 18S, 3, 4, 6)は、初期転写産物の下に示す。(B)初期転写産物、プロセッシング中間体、および18S rRNAの割合の比較。野生型(WT)およびRNAiを行った線虫(*rbd-1*(RNAi))からRNAを調製し、等量ずつ変性アガロースゲルで泳動し、Aに示したプローブを用いて行ったノーザンプロット解析。

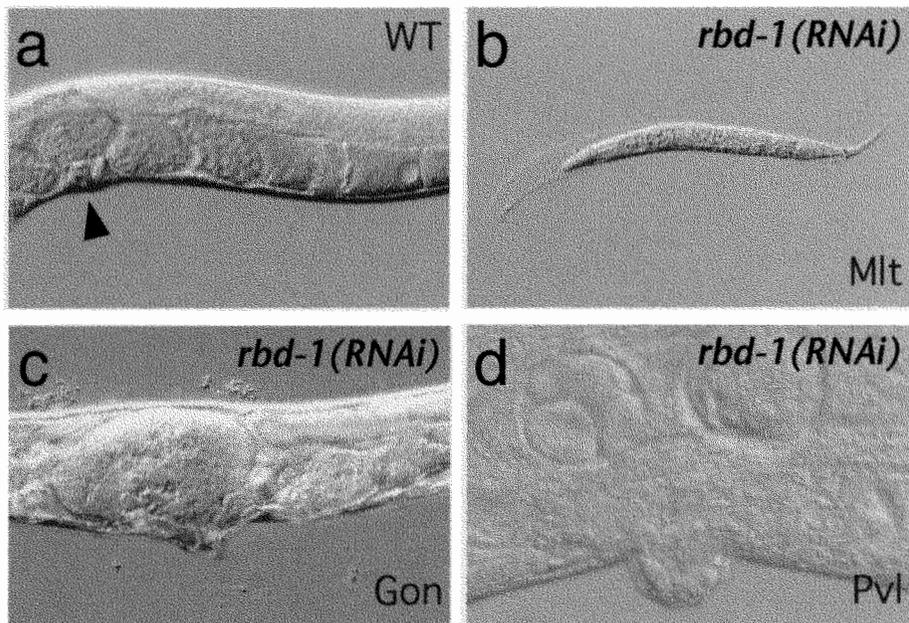


図11 *rbd-1*を抑制した線虫の典型的な表現型の微分干涉像。  
 (a)野生型成虫の腹部。矢頭は陰門を示す。(b)脱皮異常(Mlt; molting defect)、  
 (c)生殖巣発達異常(Gon; gonad development abnormal)、(d)陰門部の形成異常(protruding vulva)。

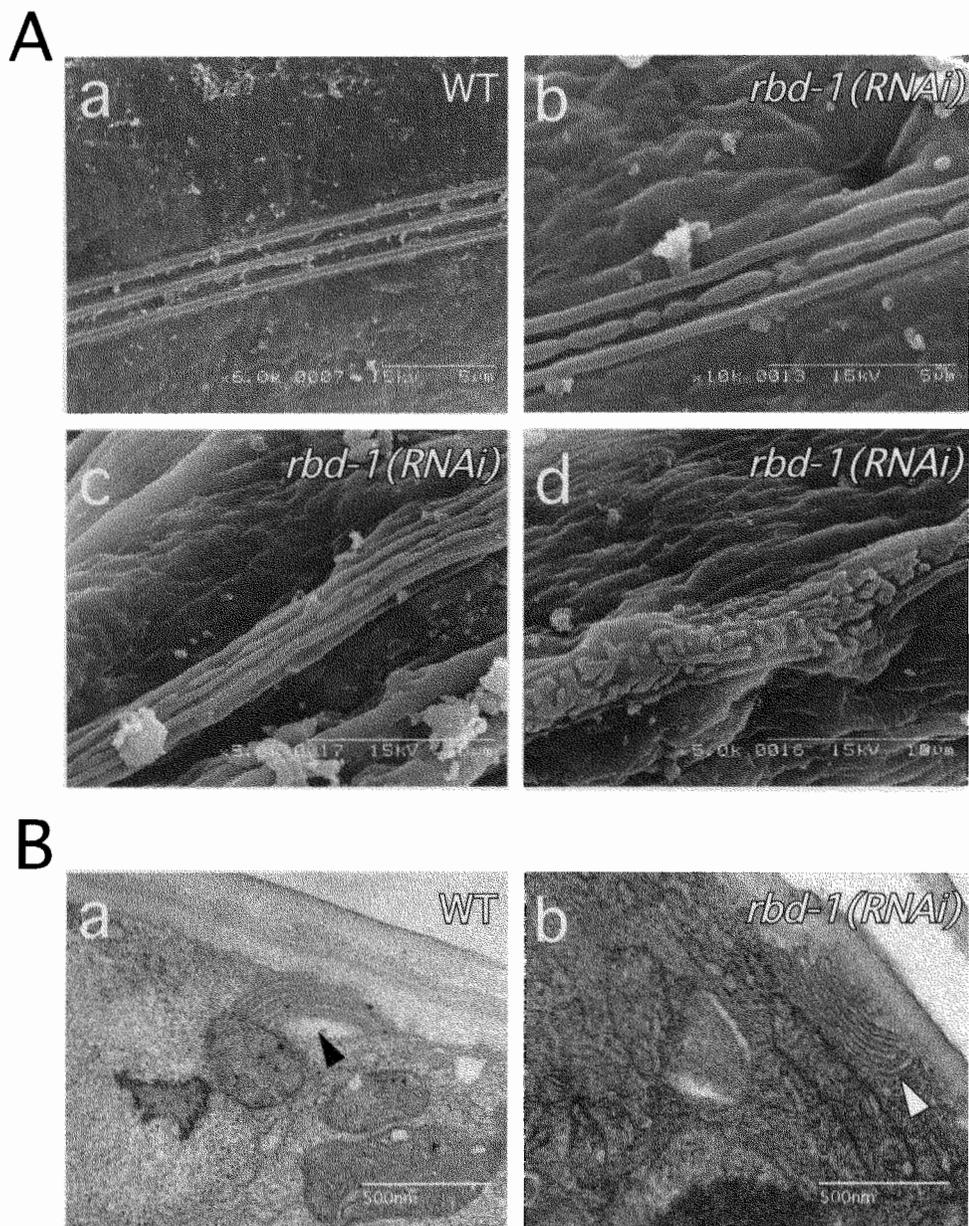


図12 *rbd-1*を抑制した線虫の電子顕微鏡写真。

(A)成虫alae領域表皮の走査型電子顕微鏡写真。野生型のalae (a)は平行な3本の筋として観察されるが、*rbd-1*を抑制した線虫のalae (b-d)はさまざまな異常を示す。(B)成虫下皮細胞の透過型電子顕微鏡写真。野生型(a)および*rbd-1*を抑制した線虫(b)の両方でstacked apical membrane構造(矢頭)が観察される。

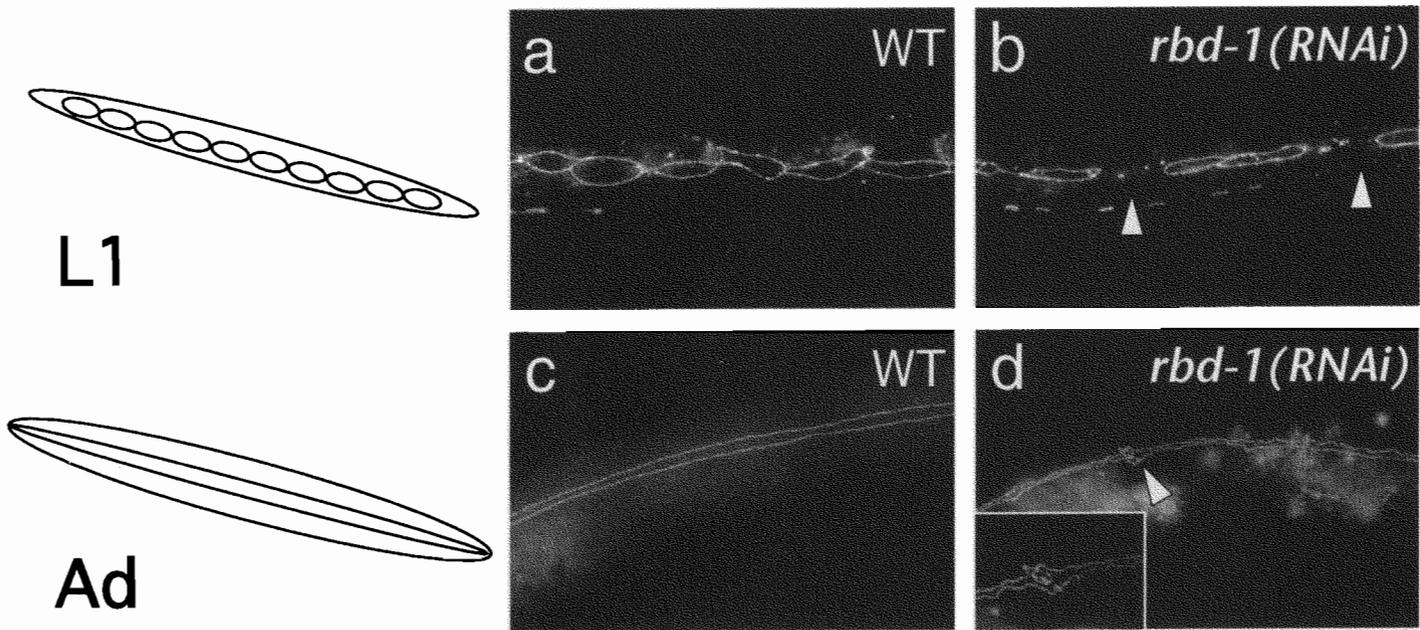
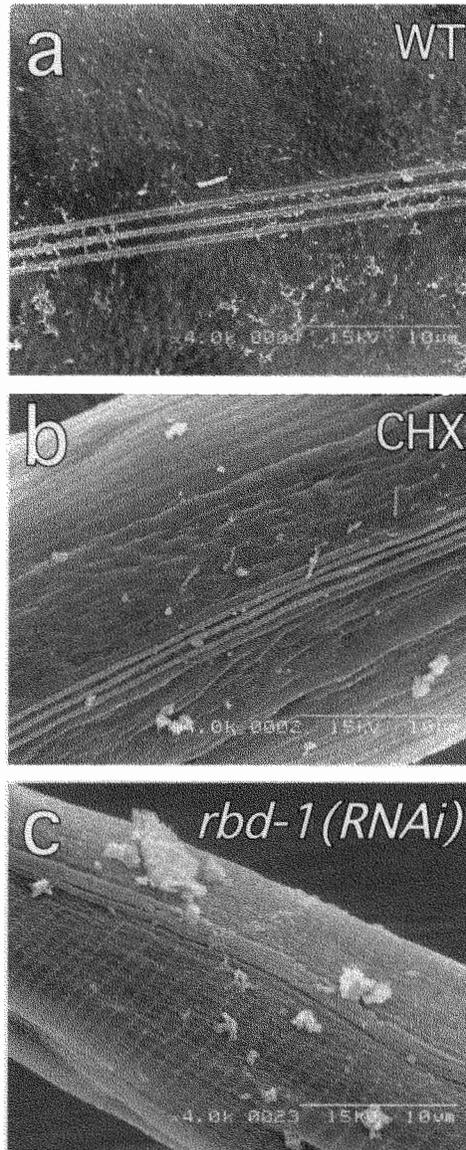


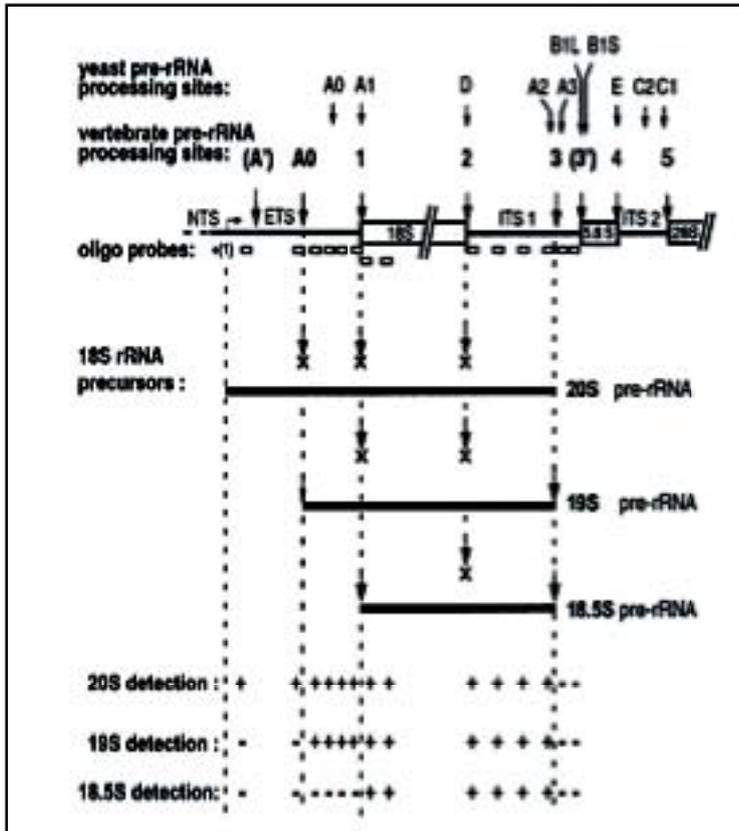
図13 *rbd-1*のRNAiによる上皮細胞形成の影響。  
 L1幼虫期(a, b)および成虫期(c, d)の*ajm-1::gfp*の発現。  
 野生型(a, c)、*rbd-1(RNAi)*(b, d)。



**図14 CHXで翻訳を阻害したときの線虫の外皮構造。**

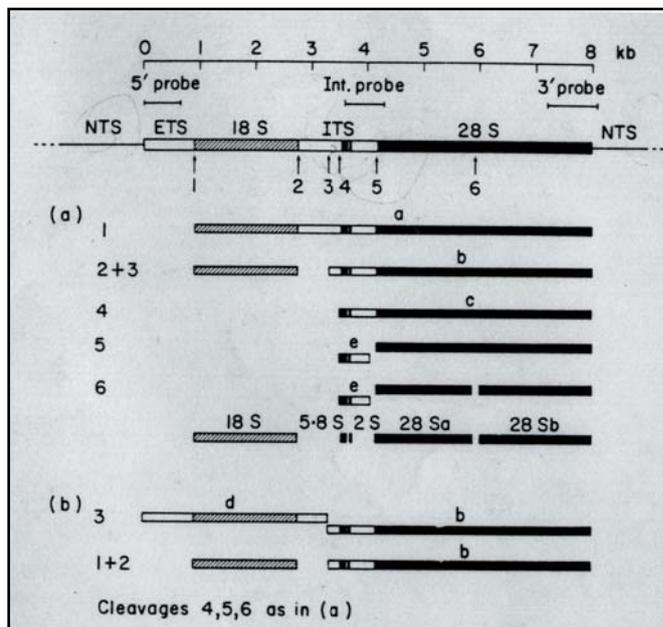
走査型電子顕微鏡により撮影した成虫のalae。野生型のalae(a)、胚の時期よりCHX入プレート(200ug/ml)上で成虫にした線虫のalae(b)。一部alaeが4本になっている。インジェクション法で*rbd-1*のRNAiを行った線虫。alaeが一部4本になっている。

A



Reprinted from Borovjagin AV and Gerbi SA (2003).

B

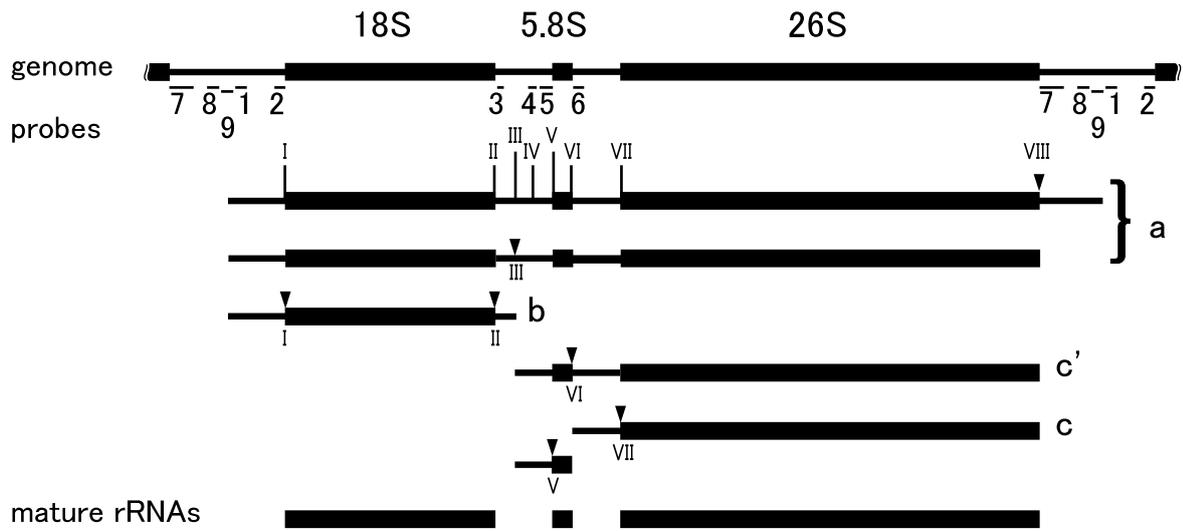


Reprinted from Long EO and Dawid IB (1980).

図15 高等真核生物のrRNAプロセッシング経路。  
 (A)アフリカツメガエルのrRNAプロセッシング経路。出芽酵母のA<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>サイトに相当するITS1内の切断部位は、「3」のみ。(B)ショウジョウバエのrRNAプロセッシング経路。出芽酵母のA<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>サイトに相当するITS1内の切断部位は、アフリカツメガエル同様に、「3」のみ。

A

<possible major pathway>



B

<possible minor pathway>

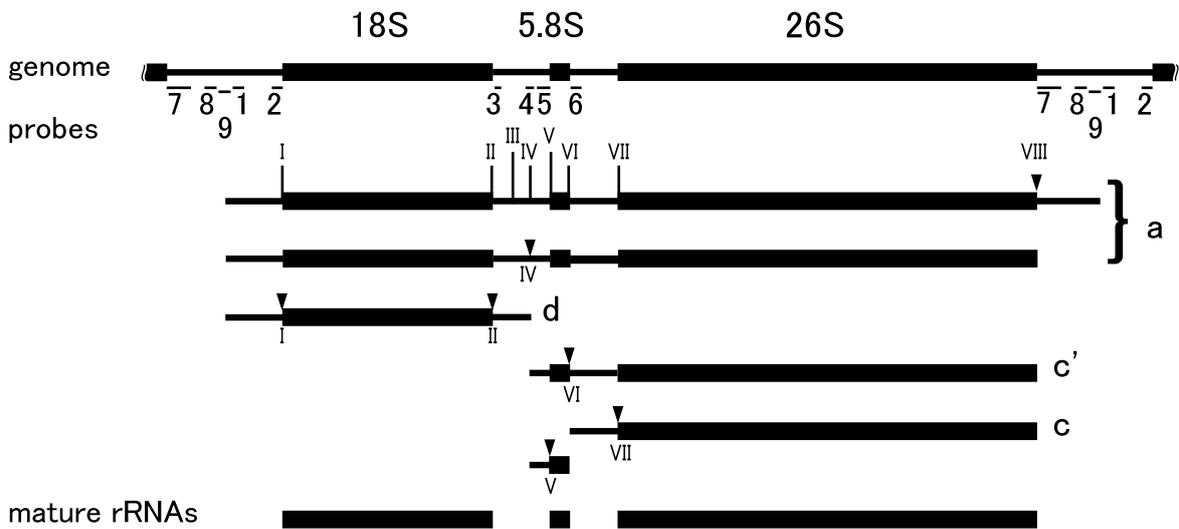


図16 (図9)以外に予想される線虫のrRNAプロセッシング経路。  
 (A)ITS1内の切断に、異なる二つ経路が混在すると仮定した場合の主要な経路。  
 前駆体aはまず・で切断され、bができる。これ以降は図9と同じ。(B) 二つ経路  
 が混在する場合のもう一方の経路。前駆体aはまず・で切断され、dができる。  
 dはbを経ることなく、直接成熟18Sになる。

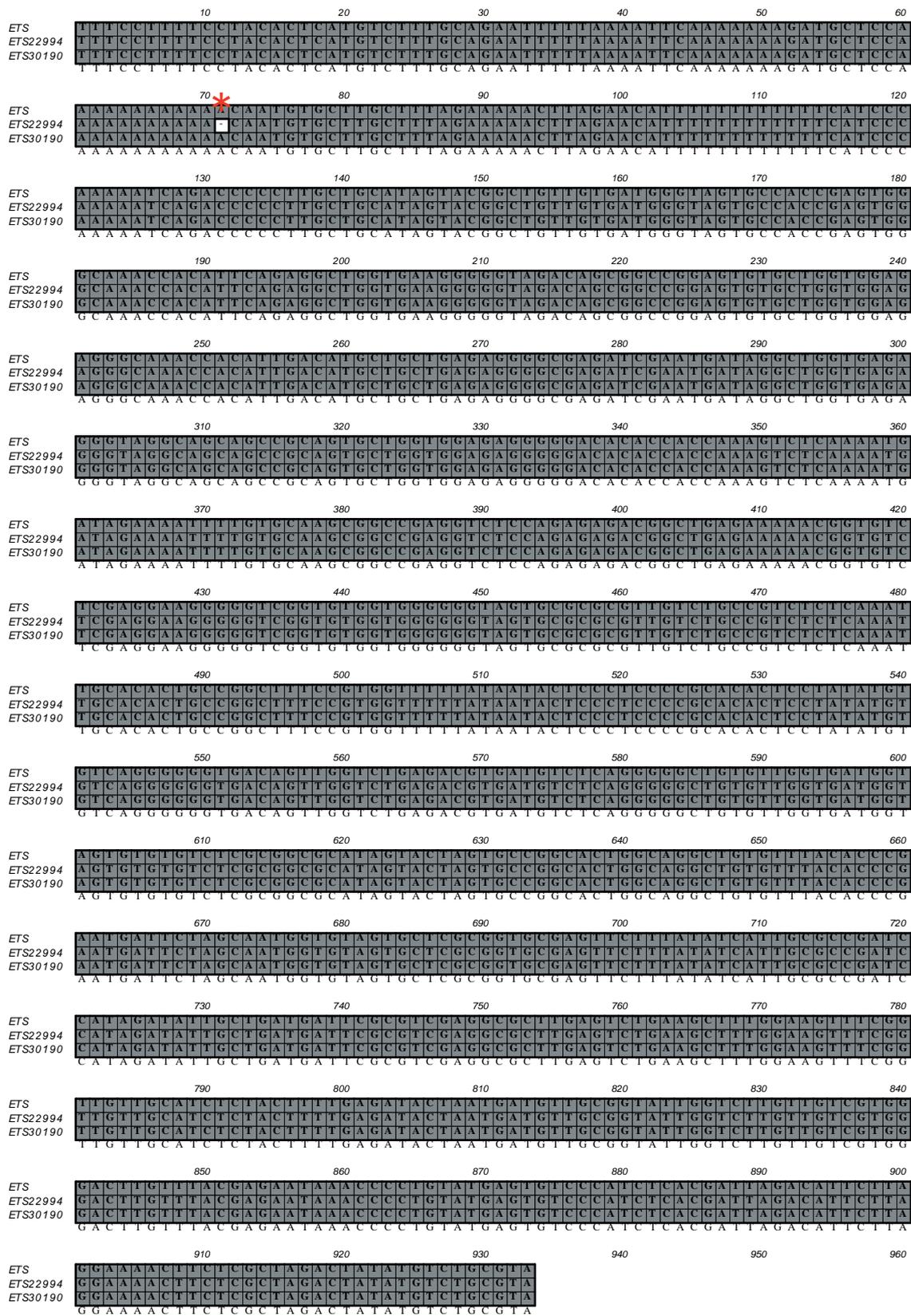


図17 線虫*C. elegans*のゲノムrRNAのETS領域ETS領域のアラインメント。  
*C. elegans*ゲノム内の26S rRNAをコードする領域の次の塩基から18S rRNAをコードする領域の一つ前の塩基までのアラインメントをしたもの。この3個が現在手に入る配列の全てである。  
 ETS;1986年に最初に報告された*C. elegans*のETS領域(Ellis et al., 1986)。ETS22994,および30190;1998年、*C. elegans*ゲノムプロジェクト(The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)によって決定されたETS領域のうちのそれぞれ一つ。\*;Aの一塩基欠失。多型であるか、配列決定時のミスであるかの判断はできない。

表1 *rbd-1*のRNAiによる胚致死率。

dsRNA	embryonic lethality (%)	n
gfp	1.4	955
<i>rbd-1</i>	1.5	531

表2 *rbd-1*のRNAiによる表現型の分布。

phenotype	(%)
Gro	100
Lvl+Lva	24.8
Mlt	20.7
Gon	24.9
Pvl	12.9
n=870	

Gro, Growth defect(成長遅延)、Lvl, Larval lethal(幼虫期の死)、Lva, Larval arrest(幼虫期の生育停止)、Mlt, Molting defect(脱皮異常)、Gon, Gonad development abnormal(生殖巣発達異常)、Pvl, Protruding vulva(陰門部の形成異常)。

表3 リボソーム生合成因子のRNAiによる表現型。

dsRNA	phenotypes
<i>gfp</i>	WT
<i>rbd-1</i>	Gro, Lva, Lvl, Mlt
<i>imp-4</i> (ZK795.3)	Gro, Lva, Lvl, Mlt
<i>sof-1</i> (ZK430.7)	Gro

Gro, Growth defect (成長遅延)、Lvl, Larval lethal (幼虫期の死)、Lva, Larval arrest (幼虫期の生育停止)、Mlt, Molting defect (脱皮異常)。