

博士論文

ホヤ初期発生における
RNA結合タンパク質の役割に関する研究

2000年3月

甲南大学大学院
自然科学研究科 生命・機能科学専攻

田中 仁夫

①

博士論文

ホヤ初期発生における
RNA結合タンパク質の役割に関する研究

2000年3月

甲南大学大学院
自然科学研究科 生命・機能科学専攻

田中 仁夫

目次

第1章 要旨	1
第2章 研究の背景	
2-1 ホヤ胚における細胞質決定因子探索の背景	3
2-2 胚発生における母性mRNAの重要性	4
2-3 母性mRNAとRNA結合タンパク質	5
2-4 RNA結合タンパク質とは	5
2-5 細胞分化とRNA結合タンパク質	6
2-6 ホヤの利点	7
2-7 本研究の意義	7
第3章 材料および方法	9
第4章 結果	
4-1. <i>CiYB</i>	
4-1-1. Y-boxタンパク質とは	18
4-1-2. カタユウレイボヤからのY-boxタンパク質cDNAクローンの単離	18
4-1-3. <i>CiYB1</i> はカタユウレイボヤにおけるY-boxタンパク質である	19
4-1-4. <i>CiYB1</i> mRNAの時間的発現	20
4-1-5. <i>CiYB1</i> mRNAの空間的発現	20
4-1-6. <i>CiYB1</i> タンパク質の空間的な発現	21
4-1-7. 考察	21
4-2. <i>CiGRP1</i>	
4-2-1. カタユウレイボヤからのglycine-rich RNA-binding protein cDNAクローンの単離	23
4-2-2. 他の生物のglycine-rich RNA-binding proteinとの比較	23
4-2-3. <i>CiGRP1</i> mRNAの時間的発現	24
4-2-4. <i>CiGRP1</i> mRNAの空間的発現	24
4-2-5. 抗 <i>CiGRP1</i> 精製抗体の作製	25
4-2-6. <i>CiGRP1</i> タンパク質の時間的発現	26
4-2-7. <i>CiGRP1</i> タンパク質の空間的発現	26
4-2-8. 温度ショックによる発現誘導の有無	27
4-2-9. 考察	28
4-3. <i>CiRGG1</i>	
4-3-1. カタユウレイボヤからの <i>CiRGG1</i> cDNAクローンの単離	30
4-3-2. <i>CiRGG1</i> タンパク質の分子的特徴	30
4-3-3. 類似分子との比較	30
4-3-4. <i>CiRGG1</i> mRNAの時間的発現	31

4-3-5. <i>CiRGG1</i> mRNAの空間的発現	31
4-3-6. 2細胞期における <i>CiRGG1</i> mRNAの局在の解析	31
4-3-7. 考察	32
4-4. <i>CiMsi</i>	
4-4-1. <i>musashi</i> 遺伝子とは	34
4-4-2. カタユウレイボヤからの <i>CiMsi</i> cDNAクローンの単離	34
4-4-3. 他の生物のMusashiタンパクとの比較	34
4-4-4. <i>CiMsi</i> mRNAの時間的発現	35
4-4-5. <i>CiMsi</i> mRNAの空間的発現	35
4-4-6. 考察	36
4-5. 機能解析	
4-5-1. ゲルシフト解析	38
4-5-2. 合成mRNAの顕微注入による強制発現	39
4-5-3. 考察	40
第6章 総合考察	42
謝辞	44
参考文献	45
図と表	
論文リスト	
学会発表リスト	
添付論文	

第1章 要旨

ホヤ卵では、細胞分化や形態形成に関わる細胞質因子の存在が明確に示されており、それらの卵内における局在場所も同定されている。近年の分子生物学の発達により、細胞質決定因子には母性mRNAが中心的な役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかし、その母性mRNAが決定因子として働くには、その保護、局在化、翻訳調節などを司るRNA結合タンパク質の役割が必要不可欠である。

そこで本研究では、カタユウレイボヤ卵より、様々なRNA結合タンパク質を単離し、その発現解析と機能解析を行い、決定因子となる母性mRNAの解明と、それらが決定因子として働く分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

今回、解析を行ったおもなRNA結合タンパク質は、以下4つである。

① CiYB1; コールドショックドメインを持つY-boxタンパク質であり、*in vitro*でのRNA結合能が示された。CiYB1タンパク質は、受精卵ではマイオプラズムに、卵割期では胚後極のCABに局在していた。CABには、胚の前部の形成に重要な母性*Ci-pem* mRNAも局在しており、*in vitro*でのCiYB1タンパク質と*Ci-pem* mRNAの結合も確かめられたことから、CiYB1による*Ci-pem* mRNAの翻訳抑制と胚の前側形成との関与が強く示唆された。

② CiGRP1; glycine-rich RNA-binding proteinと高い相同性があり、そのmRNAとタンパク質は尾芽胚期の脳胞および間充織細胞で強く発現していた。既知の多くのglycine-rich RNA-binding proteinと異なり、CiGRP1は温度ショックによって誘導されないことを示し、神経系と間充織細胞の分化への関与を強く示唆した。RNAの強制発現による機能解析では、不十分ながら細胞分裂、細胞増殖との関連も示唆された。

③ CiRGG1; 3つのRRMと2つのRGG-boxを持つnucleorin様の構造をしたRNA結合タンパク質であった。このmRNAは、2細胞期に一過的に胚の前方へ偏ることがわかり、

2細胞期に胚前側への細胞質の流れが存在することを示した。

④ CiMsi; Musashiタンパク質のホモログであり、mRNAは、尾芽胚期で神経系細胞と間充織細胞で発現していた。RNAの強制発現による機能解析では、頭部から尾部へかけての形態異常が起こり、尾基部付近の細胞分化に関する機能が示唆された。

以上のように、カタユウレイボヤ卵から、様々なタイプのRNA結合タンパク質を単離し、その詳細な発現を解析するとともに、その機能に関する知見を得た。決定因子と直接関わる可能性が明確に示されたものはCiYB1のみであったが、多くのRNA結合タンパク質が卵内にあらかじめ蓄えられていることが明らかになった。今回の結果は、ホヤ卵におけるRNA結合タンパク質と母性mRNAが関与する様々な発生メカニズムを研究する上で重要な知見を与えるものとなった。また、本研究はホヤにおけるRNA結合タンパク質を多角的に解析した初めての研究である。

第2章 研究の背景

2-1 ホヤ胚における細胞質決定因子探索の背景

すべての生物は、1つの卵(細胞)から、複雑な発生過程を経て、様々な組織からなる完全な個体を形成する。言い換えれば、1つの卵細胞は分裂を繰り返し、その娘細胞が相互作用をおよぼしあい、性質の異なる多種多様な細胞に分化していく。この一連の発生過程を支える複雑な分子メカニズムの全貌を明らかにすることが現在の発生生物学のメインテーマである。このメカニズムには、①細胞が内在的に保持している情報に従って分化する細胞質因子によるメカニズムと、②細胞外からの何らかのシグナルにより分化の方向性が決められる細胞間相互作用によるメカニズム、の2つに大別することができる。私は、このうち細胞質因子による内在的メカニズムに興味を持ち解析を行ってきた。特に、ホヤ卵を材料に、卵内にあらかじめ配置された細胞質因子が初期発生過程で果たす役割とその分子メカニズムの解明を目指している。

ところでホヤには、マイオプラズムと呼ばれる細胞質領域が存在し、このマイオプラズムは受精後植物極側後方に局在し、最終的に筋肉細胞にまで受け継がれる(Conklin, 1905)。このことから、マイオプラズムには筋肉分化決定因子が含まれていると考えられてきた。このマイオプラズムに局在する筋肉分化決定因子は長年解析され続けてきたものの(Deno *et al.*, 1985; reviewed by Satoh, 1994)、その存在を明確に証明することはできなかった。しかし近年になり、Nishida (1992)は細胞融合を応用した細胞質移植実験により、このマイオプラズムに筋肉分化決定因子が存在することを明確に示した。さらに、内胚葉分化決定因子(Nishida, 1993)、表皮分化決定因子(Nishida, 1994a)、前後軸決定因子(Nishida, 1994b)、原腸陥入制御因子(Nishida, 1996)の存在と、それらの局在領域も明らかされた。このようにホヤ卵には、各組織に対

する分化決定因子や形態形成に関する決定因子があらかじめ卵内の正確な場所に配置されていることになる。

また、Marikawaら(1994)は、ユウレイボヤ卵を遠心し、黒、透明、茶、赤の4つの卵片に分離した。核を含む赤卵片は、媒精すると発生し、表皮細胞のみに分化することができる。この赤卵片に黒卵片を融合し、発生させると、筋肉細胞と内胚葉細胞への分化が認められた。すなわち、遠心により筋肉分化決定因子と内胚葉分化決定因子が黒卵片に集められたと考えられ(Marikawa and Satoh, 1996)、細胞質内にそれら決定因子としての分子の実体が存在することが示された。

このようにホヤを用いて、細胞質決定因子を探索し、その性質を明らかにするための研究が多くなされてきたが、その分子の実体を解明するには至っていない。

2-2 胚発生における母性mRNAの重要性

近年の分子生物学の発達によって、細胞質決定因子の実体の一部が明らかになってきた。

ユウレイボヤ卵の遠心処理によって得られる、黒卵片に紫外線を照射しておくと、赤卵片と融合させても筋肉細胞と内胚葉細胞への分化が認められなくなった(Marikawa *et al.*, 1995)。しかし、黒卵片から抽出したpoly(A)+RNAを注入することにより、赤卵片に筋肉分化が認められるようになった。よって、筋肉分化には黒卵片に含まれるpoly(A)+RNAの機能が重要であると予想された。そこでYoshidaら(1996)は黒卵片に豊富に含まれるmRNAを探索し、*pem* (*posterior end mark*) 遺伝子を単離した。この*pem* mRNAは受精後のマイオプラズムに局在するが、この遺伝子単体では、筋肉分化を引き起こすことはできなかった。しかし、後述するように*pem*遺伝子は胚の前側の形成に重要な機能を持つことが明らかにされている。

ホヤ以外でも、ショウジョウバエでは、卵の前方に局在する*bicoid*遺伝子と後方に

局在する*nanos*遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA)が、そのあとの遺伝子カスケードを活性あるいは不活性化することで、胚の前後のパターニングが決定される(St. Johnston, 1995)。またアフリカツメガエルでは、卵の植物極表層に局在する*Vg1* mRNAが中胚葉誘導に重要な役割を持っていることが分かっている(Kessler and Melton, 1995)。

このように細胞分化決定因子には、母性mRNAが中心的な役割を果たしていることが明確になっている。

2-3 母性mRNAとRNA結合タンパク質

しかし、卵においてmRNAが単体で存在しているとは考えにくく、RNA結合タンパク質等の分子が結合した形で蓄えられていると考えられている。

例えばショウジョウバエにおいて、胚の後極形成に重要な*oskar* mRNAは、二本鎖RNAに結合する能力を持つStaufenタンパク質と結合することで、胚の後極へ局在化し、胚の前後軸の決定に重要な働きをしていることが明らかになっている(St. Johnston *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1995; Ferrandon *et al.*, 1997)。

このようにRNA結合タンパク質は、mRNAの分解からの保護、翻訳の抑制や促進、輸送と局在化に機能しており、様々な生物の発生分化メカニズムにおいて、mRNAを制御する重要な役割を持つことが明らかにされつつある(Siomi and Dreyfuss, 1997)。

2-4 RNA結合タンパク質とは

RNA結合タンパク質は、RNAと結合するための構造として、特徴的なアミノ酸配列を持っている。これらのうち、もっともポピュラーなアミノ酸配列としてRNA recognition motif (RRM)が知られている。RRMは、生物種を越えてよく保存されているアミノ酸配列である。また、様々な生物でRNA結合タンパク質の研究が進むにつ

れて、様々なRNA結合能を有するアミノ酸配列が同定されてきた(Burd and Dreyfuss, 1994)。これまでに知られているRNA結合配列には以下のようなものがある。

- ・ hnRNA A1に代表されるRRMモチーフ
- ・ Nucleolinに代表されるRGGボックス
- ・ HIV Revに代表されるArginine-richモチーフ
- ・ hnRNP Kに代表されるKHモチーフ
- ・ Staufenに代表されるdouble strand RNA-bindingモチーフ
- ・ FRGY1に代表されるコールドショックドメイン

これらRNA結合タンパク質の役割には、mRNAやrRNAの合成、pre-mRNAのスプライシングや選択的スプライシング、mRNAの転写、翻訳、貯蔵、安定性への寄与、輸送やポリ(A)の付加などが挙げられる。

2-5 細胞分化とRNA結合タンパク質

これまでRNA結合タンパク質の研究は、RNAの生合成系についての研究が主であった。しかし近年、RNA結合タンパク質は細胞分化にも重要な働きを示すことが明らかにされてきた。

ショウジョウバエ*musashi*遺伝子はRNA結合タンパク質をコードし、神経細胞の分化において、その細胞系譜に異常を示す原因遺伝子であった(Nakamura *et al.*, 1994)。さらに、ショウジョウバエMusashiタンパク質はその下流の位置する転写因子の翻訳を調節することで、グリア細胞の分化に重要な役割を担っていることがわかっている。マウスの相同遺伝子である*mouse-musashi-1*も、神経細胞の分化に重要な役割を果たしていると考えられている(Sakakibara *et al.*, 1996)。また、ショウジョウバエのElavタンパク質もまた、RNA結合タンパク質であり、ショウジョウバエの神経分化に必要であることが分かっている(Robinow *et al.*, 1988)。このElavタンパク質と非常

に構造が類似している、ヒトのHuDタンパク質も神経特異的に発現している(Szabo *et al.*, 1991)。このように、神経分化においてRNA結合タンパク質が非常に重要な機能を持つことが分かりつつある。

そこで本研究では、RNA結合タンパク質に着目して、ホヤから様々なRNA結合タンパク質遺伝子を単離し、その機能の解析を行うことを目的とした。

2-6 ホヤの利点

実験動物としてのホヤの利点を以下にまとめる。

- ・ 胚発生が非常に早い。
- ・ 卵割パターンや細胞系譜に個体差がなく、細胞系譜が正確に記載されている(Conklin, 1905; Ortolani, 1955; Nishida, 1987)。

- ・ 幼生の体を構成する細胞数は約2500個と少なく、幼生の体は非常にシンプルな組織から構成される。

これらのことは、細胞の分化などの発生メカニズムを研究する上で大きな利点となる。

しかしなによりも、細胞質決定因子の存在およびそれらの局在が調べられており、さらに、決定因子の局在が目で見える点が、本研究にとっての最大の利点である。このことは、母性因子を解析する上で他に類を見ない利点である。

2-7 本研究の意義

現在までにホヤにおける決定因子を探る研究が数多く行われ、卵細胞質中に何らかの因子が局在していることは実証されているものの、まだその実体は明らかにされていない。近年、その候補として母性mRNAがとりあげられてきているが、決定因子としての母性mRNAはまだ見つかっていない。

本研究では、RNA結合タンパク質という、これまでにない新たな視点から研究を行った。RNA結合タンパク質は、母性mRNAとその局在化、さらにはその機能に関与する重要な分子である。様々なRNA結合タンパク質を単離し、その発現を解析し、もしこれが局在するならば、このリガンドを探すことで新たな局在母性mRNAを見つけることもできる。そしてRNA結合タンパク質の機能を解析することは、決定因子として働く分子メカニズムを明らかにすることにほかならない。また、これらの知見をもとに、細胞分化におけるRNA結合タンパク質の役割も明らかにしていく。

本研究ではまず、カタユウレイボヤ卵より様々なRNA結合タンパク質を単離し、その発現様式を明らかにし、細胞分化決定因子に関与するRNA結合タンパク質を見つけだす。さらにその機能を明らかにすることで、決定因子による細胞分化や形態形成の分子メカニズムを明らかにすることを目指している。

第3章 材料および方法

ホヤおよびホヤ胚

東京大学海洋研究所大槌臨海研究センター、東北大学農学部附属海洋生物資源教育研究センター、岡山大学理学部付属牛窓臨海実験所、広島大学向島臨海実験所、神戸商船大学および兵庫県御津町室津港港内において採取されたカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) を使用した。採取した成体のカタユウレイボヤは16°Cで常明条件下で飼育し放卵を抑制して卵を採取した。飼育2日目以降のホヤより卵を採取、水酸化ナトリウム(NaOH)で活性化させた精子を媒精し、濾過海水中で通常は16°Cのインキュベーター中で発生させた。この温度下で受精卵は約1時間後に第一卵割が起こり、幼生の孵化は約20時間後に起こる。

胚の温度ショック処理

温度ショックには胚を海水中で、4°C、6°C、8°C、24°Cの温度下、3時間または6時間処理することで温度ショックを行った。コントロールとしては、同じ発生ステージまで飼育したものと同一時間16°Cで通常飼育したものを用意した。

RNA抽出とcDNAの合成およびcDNAライブラリーの作製

トータルRNAは、TRIZOL Reagent (GIBCO BRL, Grand Island, USA)を用いて抽出を行った。RT-PCR用の1st-strand cDNAの合成にはtotal RNAを鋳型としてReady-To-Go T primed 1st-strand cDNA合成キット(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を使用した。poly(A)+ RNAの精製にはOligtex-dT beads (Japan Roche)を使用した。未受精卵cDNAライブラリーはλ ZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene, La Jolla, USA)を用い、Uni-ZAP XR vector (Stratagene)にて、pBluescript SK+(Stratagene)に組み込まれるように作製した。

スクリーニング

CiYBsのスクリーニングには、ディジェネレートプライマーを用いたPCRと5' RACE法で得たcDNA断片をdigoxigenin (DIG: Boehringer-Mannheim, GmbH, Germany)標識して用いた。ライブラリーは、カタユレイボヤ卵巣のものをを用いた。

CiGRP1、*CiRGG1*のスクリーニングのプロープには、B. Bowerman博士とK. A. Swan博士からいただいた*C. elegans*の*Cyk-1*遺伝子の全長をDIG標識したものをを用いた。ライブラリーは、カタユレイボヤ未受精卵のものをを使用した。*CiMsi*のスクリーニングのプロープには、ディジェネレートプライマーを用いて増幅した、RRMを含む約229塩基対(bp)のPCR断片をDIG標識して用いた。ライブラリーは、京都大学佐藤ゆたか博士からいただいたカタユレイボヤ中期尾芽胚のものをを用いた。

シーケンスとシーケンスデータの解析

塩基配列の決定には、Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham life science, Buckinghamshire, USA)を使用してシーケンスリアクションを行い、Auto Sequencer DSQ-1000L (Simadzu, Kyoto, Japan)により解析を行った。プライマーは、FITCで標識された5'-CGACGTTGTAAACGACGGCCA GT-3'と、FITCで標識された5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'を使用した。塩基配列の解析には、GENETYX-Mac (Version 8.0)を用いた。アミノ酸配列はBLAST (Altschul *et al.*, 1997)およびGENETYX-Mac (Version 6.0.1, Version 8.0)プログラムにより検索した。

プラスミドベクター

cDNAのクローニングにはpBluescript SK+ (Stratagene)を使用し、マルチクローニングサイトの*EcoRI*-*XhoI*間に導入した。cDNAのサブクローニング等には、pBluescript II SK+ (Stratagene)を使用し、マルチクローニングサイトの*EcoRV*サイトに平滑化した

cDNA断片を導入した。CiYB1融合タンパク質とCiGRP1融合タンパク質合成には、pET28 expression system (Novagen, Madison, USA)を使用し、pET28ベクターと*CiYB1 cDNA*と*CiGRP1 cDNA*を*EcoRI*、*XhoI*で消化して導入した。

融合タンパク質に対する精製抗体の作製

T7標識6xHis-CiGRP1融合タンパク質とT7標識6xHis-CiYB1融合タンパク質は、イソプロピル β -D(-)-チオガラクトピラノシド(IPTG: Boehringer-Mannheim)で発現を誘導した大腸菌を集菌し、超音波破碎後、His-tag resin (Novagen)で精製し、4°Cで20時間以上滅菌水で透析したのち、凍結乾燥する。この融合タンパク質を生理食塩水に溶かしRibiアジュバント(Ribi immuno chem research, Hamilton, USA)と共にマウスに免疫する。2週毎にマウスに数回免疫した後、最後の免疫より3日後に血清を採血し、アフィニティー精製を行い、精製抗体とする。モノクローナル抗体の作製はMita-Miyazawaら(1987)の方法に従った。

抗体染色

抗体染色に用いる卵や胚は冷メタノールで20分固定した。固定後エタノールで脱水し、ポリエステルワックス(BDH, England; Steedman, 1957)で包埋する。包埋した胚を2 μ mの厚さで切片にし、カバーガラスにマウントする。切片はそれぞれのモノクローナル抗体や精製抗体を一次抗体とし、二次抗体にはFITC標識抗マウスIgG+IgM抗体(American qualex, California, USA)を使用した。観察はOlympus epifluorescence microscope (BHS-RFC; Olympus, Tokyo, Japan)を使い、画像撮影にはSenSysカメラ(Photometrics, Tokyo, Japan)を用いた。

SDS-PAGEとウエスタンブロット解析

未受精卵、各発生ステージの胚、卵巣、T7標識6xHis-CiGRP1融合タンパク質およびT7標識6xHis-Cipros1融合タンパク質をSDSサンプルバッファー(0.0625 M トリスアミノメタン(Tris-HCl), pH 6.8、5 % 2-メルカプトエタノール、10 % グリセロール、0.5 μ M フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、2.3 % ドデシル硫酸ナトリウム(SDS); Laemmli, 1970)で溶かし、14 % ポリアクリルアミドゲルで分離した。ゲルをHybond N+ ナイロンメンブレン (Amersham life science) にブロットした。0.5 % ブロッキング剤(Boehringer-Mannheim)を含むPBS(-)でブロッキング後、抗T7標識6xHis-CiGRP1精製抗体または抗T7モノクローナル抗体(Novagen)を一次抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG+IgM (H+L)抗体 (American Qualex, California, USA)を二次抗体とした。発色には5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド(X-Gal; Wako, Osaka, Japan)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT; Dojin, Kumamoto, Japan)を使用した。

Oligo nucleotides

本研究で使用されたOligo nucleotidesを示す。

OYB-D1: 5'-GGNACNGTNAARTGGTTYAA-3'

OYB-D2: 5'-AARTGGTTYAAAYGTNMGNAAYGG-3'

OYB-D4: 5'-TCNCCYTCNACNACRTCRAAYTC-3'

OYB-D5: 5'-GCYTCNGCNCCYTTYTCNCCYTC-3'

OYB-6: 5'-ATCAACAAGCGAGGGAGAAC-3'

OYB-11: 5'-TTCACCAGACCGCCATCATC-3'

OYB1-r: 5'-CTTTGGGTTGTTTTTGATGATG-3'

Gr-1F: 5'-CAAATTCACAAAACATGGC-3'

Gr-1R: 5'-TTCAAACACAGCAGGTAGT-3'

TB2-TU: 5'-CCCTCGTCTCCACTTCTTCA-3'

TB2-TL: 5'-CTTGGATGGCTGTGCTGTTT-3'

msi-F: 5'-TNGAYAAYAARAARATHGAYCC-3'

msi-R: 5'-CRAANGTNACRAANCCRAANCC-3'

Msi-RT2AU: 5'-AACAGCCTACCCTCAACAAC-3'

Msi-RT2AL: 5'-TCCATAACTTCCYCCACCAG-3'

(N=A, C, G, T ; R=A, G ; Y=C, T ; W=A, T ; H=A, C, T)

PCR (polymerase chain reaction)

<ディジェネレートプライマーを用いたPCR>

1st-strand cDNA合成には、Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit (Pharmacia) を使用する。PCR反応液の組成は67 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM 塩化カリウム(KCl), 1 % Triton X-100 , 1.5 mM 塩化マグネシウム(MgCl₂) , 0.2 mM dNTP mixture , 0.4 μ M センズおよびアンチセンスプライマー , 2.5 U rTaq DNA polymeraseである。ASTEC Program Temp Control System PC-700 (ASTEC, Fukuoka, Japan)、TaKaRa PCR Thermal Cycler TP2000 (Takara, Kyoto, Japan)を用いてPCRを行った。CiYB1 cDNA断片の単離にはOYB-D1、OYB-D2、OYB-D4、OYB-D5プライマーを用い、ステップサイクルは94°C 1分、37°C 1分、72°C 2分で30サイクル反応を行い、72°C 4分の最終伸長を行った。CiMsi cDNA断片の単離にはmsi-F、msi-Rプライマーを用い、ステップサイクルは94°C 1分、37°C 1分、72°C 2分で30サイクル反応を行い、72°C 4分の最終伸長を行った。

＜定量的RT-PCR＞

PCRはディジェネレートプライマーを用いたPCRと同様に行った。*CiGRP1* 特異的プライマーとして、Gr-1FとGr-1Rを使用した。*CiMsi*特異的プライマーとして、Msi-RT2AUとMsi-RT2ALを使用した。鋳型量の内部コントロールとしてチューブリン(CiTTB2)のPCRを行った。*CiMsi*についてのPCR反応のステッププログラムは、94°C 1分、55°C 1分、72°C 2分で30サイクル反応を行い、72°C 4分の最終伸長を行った。*CiGRP1*については、94°C 1分、53°C 1分、72°C 1分で30サイクル反応を行い、72°C 4分の最終伸長を行った。

Rapid amplification of cDNA ends

5' RACE には、5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends (GIBCO BRL)を使用して行った。1st-strand cDNA合成には、OYB-5をプライマーとして使用し、増幅にはOYB-rを用いた。3' RACEのプライマーには、OYB-11を用いて増幅した。それぞれ得られたcDNA断片をpBluescript II SK+ベクターへライゲーションし、大腸菌DH5 α へ導入後、クローニングを行った。

電気泳動

PCR産物の泳動には、1.5%アガロースゲルを使用した。泳動バッファーは、0.5x TBE バッファー(0.045 M トリス-ホウ酸(Tris-borate)、0.001 M EDTA)を使用し、100Vで泳動した。また、サンプルは10 μ lのPCR産物に、6X サンプルバッファー(0.25 % キシレンシアノール、30% グリセリン、0.001M EDTA)を2 μ l添加したものを泳動した。

ノザンハイブリダイゼーション

各ステージ10 μ gのpoly(A)+RNAを1% アガロース変性ゲルで電気泳動をした。泳動後、Hybond N+ ナイロンメンブレン (Amersham) にアルカリトランスファーした。5X SSC, 50 % ホルムアミド, 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0), 7 % SDS, 2 % ブロッキング剤, 0.1 % N-ラウロイルサルコシン, 50 mg yeast total RNA, 50°Cでハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、洗浄バッファー1 (1X SSC, 0.1 % SDS) を室温で5分2回、洗浄バッファー2 (0.1X SSC, 0.1 % SDS)を50°Cで15分2回行った。プローブにはDIG標識したDNAを用いた。検出には、CSPD (TROPIX, Massachusetts, USA) による化学発光を用いた。*CiYBI* プローブは、ゲノム配列中の4566 bpから5071 bpまでの領域を、*CiGRP1*、*CiRGG1*、*CiMsi*については全長を用いた。

ホールマウントin situハイブリダイゼーション

Satouら(1995)の方法を用いた。プローブにはDIGで標識したRNAを用いた。*CiYBI*のプローブはノザンハイブリダイゼーションと同じ領域を、*CiGRP1*、*CiRGG1*、*CiMsi*については全長を用いた。

ゲルシフトアッセイ

pBluescript II SK+のT7プロモーターからT3プロモーターの間の5'-GGGAACAAAAG CUGGAGCUCCACCGCGGUGGCGGCCGCUCUAGAACUAGUGGAUCCCCGGGCUG CAGGAAUUCGAUAUCAAGCUUAUCGAUACCGUCGACC-3'の配列を鋳型とし、FITC RNAラベリングキット(Roche)により、蛍光標識した101ヌクレオチド(nt)のRNAをプローブとした。また、*Ci-pem*遺伝子の3'非翻訳領域の約300 bpを*Ci-pem* 3' UTRとして蛍光標識し、プローブとした。pET System (Novagen)により作製し、His-tag resin (Novagen) を用いて精製した*CiYBI*融合タンパク質0.5 μ gと蛍光標識したRNA

0.4 μ gを反応液10 μ l中で混合し室温にて結合反応させた。コントロールとして0.5 μ gのbovine serum albumin (BSA; Fraction V; Sigma, St. Louis, USA)または0.5 μ gヘパリン(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)をCiYB1タンパク質の代わりに用いた。binding bufferの組成は、15 mM HEPES-KOH (pH7.9), 0.4 mM EDTA (pH8.0), 20 mM KCl, 8 % グリセロール, 1 mM ジチオトレイトール(DTT), 1 mM PMSFである。反応液を1.5 %アガロースゲルで電気泳動を行った。競合するribohomopolymerとしてpolyadenylic acid [poly (A)], polyguanylic acid [poly (G)], polyuridylic acid [poly (U)], polythmidylic acid [poly (C)] (Sigma)、heteropolymerとして [poly (A, C)]; [poly (A, G)]; [poly (A, U)]; [poly (C, U)] (Sigma)を使用した。

顕微注入に用いるポリ(A)+RNAの合成

CiGRP1 cDNA、*CiRGG1* cDNA、*CiMsi* cDNAはpBluescript-RN3ベクター(Lemaire *et al.*, 1995)にサブクローニングし、5' cap analog (Boehringer-Mannheim)存在下において、T3 RNA polymeraseで転写を行うことによりRNA合成を行った。

顕微注入法

顕微注入は基本的にHikosakaら(1992)の方法に従い、マイクロマニピレーター(Model MN-151; MMO-220, Narishige, Tokyo, Japan)を用いて行った。注入に用いたガラスピペットはガラス管(Microcaps, Drummond Sci., Co., Broomall, USA)を微小ガラス針作製装置(Sutter Instrument, Novato, USA)を用いて作製した。マイクロピペットはシリコナイズ(Sigmacoat, Sigma)した後、乾熱滅菌した。マイクロガラスピペットに注入する溶液(1 mg/ml のファストグリーン(Wako)を含む)を充填し、圧力により顕微注入を行った。Mita-Miyazawaら(1985)の方法に従い、コリオンを除去した、未受精卵に注入を行った。注入した溶液のRNA濃度はすべて1 mg/ml (lacZは0.5 mg/ml)で、

注入した溶液量はともに注入されたファストグリーンの量から、卵の体積の1/100程度と見積もった。

第4章 結果

4-1 *CiYB*

4-1-1 Y-box タンパク質とは

Y-boxタンパク質は、Y-boxと呼ばれるCATボックスと逆向きの配列を含むDNA鎖上に結合する転写活性化因子として見つかった(Didier *et al.*, 1988)。これまでにヒト(Didier *et al.*, 1988)、マウス(Tafari *et al.*, 1993)、アフリカツメガエル(Darnborough and Ford, 1981; Tafari and Wolffe, 1990)、ニワトリ(Grant and Deeley, 1993)など様々な生物から単離されており、高く保存された領域を持っている。この高く保存された領域は、コールドショックドメイン(CSD)と呼ばれており、核酸と結合する能力を持つことが知られている(Doniger *et al.*, 1992)。アフリカツメガエルから単離されたFRGY2は、それまで知られていたY-boxタンパク質の機能とは別に、母性mRNAと結合してその翻訳を抑制するマスキングプロテインとして働いていた(Marello *et al.*, 1992)。またFRGY2は卵巣に特異的に存在しており、キンギョから得られたGFYP2も卵巣に特異的に存在している(Katsu *et al.*, 1997)。

これらの事実から、Y-boxタンパク質はmRNAの蓄積に関与する広く保存されたタンパク質であると考え、カタユウレイボヤからのY-boxタンパク質遺伝子の単離を試みた。

4-1-2 カタユウレイボヤからのY-box タンパク質cDNA断片の単離

非常によく保存されたヒト(YB-1)とカエル(FRGY1)のCSDのアミノ酸配列をもとに、ディジェネレートプライマーを作製した。これらのプライマーを用いて、カタユウレイボヤの卵巣から、RT-PCRによって約150 bpの長さのCSD領域のcDNA断片を得ることができた。単離したcDNA断片をもとに、まずは5' RACE (rapid amplification of

cDNA ends)を行ったところ、約150 bpの5'上流までを含むクローンを得ることができた。5' RACEによって得られたcDNA cloneをプローブとしてカタユウレイボヤ卵巣のcDNAライブラリーから2種類のY-boxタンパク質cDNAの全長を単離した。また、ライブラリースクリーニングと同時に3' RACEも行った。その結果、2種類のY-boxタンパク質cDNAクローンを得ることができた(Fig. 4.1.1, 4.1.2)。64細胞期胚のRNAを用いて3' RACEを行ったところ、卵巣より得られたクローンとは別に、さらに1種類の長さの違うY-boxタンパク質cDNAを得ることができた(Fig. 4.1.3)。卵巣のcDNAライブラリーおよび3' RACEより得られた長いクローンを*CiYB1*、短いクローンを*CiYB2*、そして64細胞期胚のRNAを使った3' RACEより得られたクローンを*CiYB3*と名付けた。*CiYB1* cDNAは、全長1799 bpで320アミノ酸(aa)をコードしていた。*CiYB2* cDNAは、全長1346 bpで246 aaをコードしていた。*CiYB3* cDNAは、全長763 bpで129 aaをコードしていた。得られた3つのY-boxタンパク質cDNAの塩基配列の1 bpから436 bpまでが*CiYB1*、2、3すべてで全く同一の塩基配列であったことから、これらのY-box遺伝子は選択的スプライシングによって転写されていることが示唆された。このことはゲノム配列の解析により明確にされた(Wada *et al.*, 1998)。

4-1-3 *CiYB1*はカタユウレイボヤにおけるY-box タンパク質である

*CiYB1*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、ヒト、マウス、アフリカツメガエルのY-boxタンパク質と比較した(Fig. 4.1.4)。CSDの部分では非常に保存性が高く、約80%のアミノ酸が同一であった。CSDより下流のテイルドメイン(TD)では、アミノ酸配列全体での相同性は、約40%と低かった。しかし、多くのY-boxタンパク質に共通に見られるアルギニンに富む領域や、basic/aromatic island (塩基性アミノ酸であるアルギニンが集中する繰り返し配列)、charge zipper (プラスとマイナスの電荷を持つ領域が交互に現れるくり返し構造)などの構造が見られた。さらに、*CiYB1*は、

その分子の大きさから見ても他の生物のY-boxタンパク質と似ており、カタユウレイボヤのY-boxタンパク質に間違いはないと考えられる。

4-1-4 *CiYB1* mRNAの時間的発現

CiYB1 mRNAの発現時期を調べるために、ノザンハイブリダイゼーションを行った(Fig. 4.1.5)。*CiYB1* mRNAは、約1.8 kbの位置にシングルバンドとして検出された。未成熟な卵巣で既に大量に発現しており、成熟途中の卵巣ではその発現が一旦減少するが、成熟した卵巣では再び発現が増加する。未受精卵、8細胞期胚、64細胞期胚、のう胚での発現は弱い、神経胚から発現が強まり、中期尾芽胚ではさらにその発現が増加する。

4-1-5 *CiYB1* mRNAの空間的発現

CiYB1 mRNAの発現領域を調べるために、*CiYB1*に特異的な領域をプローブにしてホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。マターナル(母性)な*CiYB1* mRNAは、未受精卵から初期卵割期では卵全体で発現していた(Fig. 4.1.6 A, B)。また、ゼイゴティック(胚性)な*CiYB1*の発現は、予定筋肉割球に限定していた。まず、のう胚期においてB8.15、B8.16、B9.13、B9.14、B9.15、B9.16割球対に発現していた(Fig. 4.1.6 C)。ホヤの筋肉細胞は、B系列、b系列、A系列の3つの系列の割球から由来する。B系列からは幼生の尾の前側14個の筋肉細胞ができ、b系列からは尾の一番後の5個の細胞ができ、A系列からはBとbの間の2個の筋肉細胞ができあがる。B系列の割球が筋肉細胞の運命の限定を受ける時期が64細胞期と早く、Aとb系列は110細胞期以降と遅い。最初に筋肉細胞として発生運命の限定を受けるB系列の筋肉細胞のことをプライマリーリネッジと呼び、その他のセカンダリーリネッジとは区別されている(Meedel *et al.*, 1997)。*CiYB1* mRNAのゼイゴティックな発現は、神経胚期、

初期尾芽胚期でもプライマリーリネッジの予定筋肉細胞で維持され続ける(Fig. 4.1.6 D, E)。

4-1-6 *CiYB1* タンパク質の空間的な発現

さらに*CiYB1*タンパク質の発現領域を調べるために、*CiYB1*タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いて免疫組織染色を行った(Fig. 4.1.7)。その結果、*CiYB1*タンパク質の発現は、未受精卵では細胞質全体に発現がみられるが、受精卵の2回目の細胞質再配置時に、卵の後極に存在するマイオプラズムと一致した局在を示した(Fig. 4.1.7A)。16細胞期胚では、細胞質全体にも存在するものの、ホヤの不等分裂に関わる構造物であるCAB (Centrosome-attracting body; Hibino *et al.* 1998)に強い発現が見られた(Fig. 4.1.7 B)。

4-1-7 考察

今回カタユウレイボヤから3種類のY-boxタンパク質mRNAが得られた。*CiYB*タンパク質には、Y-boxタンパク質が必ず持っているCSDが含まれており、その相同性も非常に高かった。特に*CiYB1*タンパク質のC末側のテイルドメインには、一般的なY-boxタンパク質の特徴が見られ、Y-boxタンパク質のカタユウレイボヤホモログであると言える。

カタユウレイボヤは、脊椎動物と無脊椎動物の間をつなぐ原索動物である。そのホヤより得られたY-boxタンパク質の*CiYB1*の構造は、CSDのN末側にマイナスチャージの領域を持ち、TDには、5回のくり返しからなるcharge zipperが存在していた。つまり*CiYB1*タンパク質は、アメフラシ等の無脊椎動物のY-boxタンパク質に共通に見られる構造であるN末側のマイナスチャージ領域と、脊椎動物の特徴である比較的長いcharge zipperの両方を持ち合わせた分子であった。*CiYB1*タンパク質のこれら

の構造とそれぞれの機能との関連を、無脊椎動物から脊椎動物への進化と照らし合わせて解析を行えば、興味深い結果が得られるかも知れない。

CiYB1 mRNAのザイゴティックな発現は、予定筋肉細胞および筋肉細胞に特異的に発現していた。また*CiYB1*タンパク質は、受精卵において、マイオプラズムの局在と一致することから、*CiYB1* 遺伝子は筋肉分化関わる細胞質因子に関与することが示唆される。

また16細胞期で、非対称胚分裂に重要な構造であるCABにタンパク質の局在が見られた。一方CABには、胚の前後のパターニングに重要な機能を持つ*pem* mRNAが局在することが知られている。RNA結合タンパク質である*CiYB1*が特定のRNAと局在が一致することは、これらの分子が直接結合することを示唆している。さらに、*CiYB1*が、*pem* mRNAの輸送、マスキングおよび翻訳調節を通じて、胚の前後のパターニングに関与している可能性が示唆される。このことについては、4-5-1で解析を行う。

4-2 *CiGRP1*

4-2-1 カタユレイボヤからのglycine-rich RNA-binding protein cDNAクローンの単離

オレゴン大学のSwanらは、卵の不等分裂に関与する新規のアクチン結合タンパク質である*Cyk-1*遺伝子を線虫から単離した(Swan *et al.*, 1998)。ホヤ胚不等分裂に関与する*Cyk-1*ホモログの単離を当初の目的として、*Cyk-1*遺伝子cDNAをSwan氏より供与いただいた。この*Cyk-1*遺伝子の全長3275 bpをDIG標識したプローブを用い、カタユレイボヤ未受精卵cDNAライブラリーをゆるやかな条件でスクリーニングを行った。

その結果、既知のglycine-rich RNA-binding proteinと高い相同性を示す最長669 bpのcDNAクローンを単離し、*CiGRP1* (*Ciona intestinalis* glycine-rich RNA-binding protein)と名付けた。このcDNAクローンはN末側に1つのRRMを、C末側にグリシンに富む領域を持つ158 aaのタンパク質をコードしており(Fig. 4.2.1)、予想される分子量は約15.6 kDaであった。

4-2-2 他の生物のglycine-rich RNA-binding proteinとの比較

現在、多くの植物からglycine-rich RNA-binding proteinが単離されている一方、動物からはヒト(Nishiyama *et al.*, 1997a)、マウス(Danno *et al.*, 1997)、アフリカツメガエル(Uochi and Asashima, 1998)の報告がされているだけである。これらの分子は、N末側にRRMを1つ、C末側にグリシンに富む領域という特徴的な構造を持っており、アミノ酸の数も約160 aaと比較的小さなタンパク質である。今回単離した *CiGRP1*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列も、やはりN末側にRRMを1つ、C末側にグリシンに富む領域という特徴的な構造を持ち、長さも158 aaと非常によく似ていた(Fig. 4.2.2)。グリシンに富む領域は各分子によって、長さや配列に違いが見られるが、

RRM内のRNP-1とRNP-2は特によく保存されていた。

CiGRP1タンパク質の全アミノ酸配列での相同性を調べると、ポテトのGRBPとは54.8%、タバコのRGP1aとは54.0% (Hirose *et al.*, 1993)、ヒトのCIRNPとは45.5% (Nishiyama *et al.*, 1997a)、マウスのrbm3 (Danno *et al.*, 1997)およびゼノパスのXCIRPとは43.0% (Uochi and Asashima, 1998)の相同性があった。このように動物のものより、植物のものに高い類似性が見られるという結果が得られた。

また、グリシンに富む領域のグリシン含有率を調べると、植物では58-63%、脊椎動物では30-35%となり、CiGRP1タンパク質の63%は、植物のグリシン含有率に近い値になった。

4-2-3 *CiGRP1* mRNAの時間的発現

CiGRP1 mRNAの発現時期を調べるために、ノザンハイブリダイゼーションを行った。*CiGRP1* 全長をDIG標識したプローブを用いて、未受精卵、8細胞期胚、64細胞期胚、中期のう胚、中期神経胚、中期尾芽胚について調べた(Fig. 4.2.3 A)。その結果、未受精卵から中期尾芽胚期にわたって、約0.8 kbのバンドが検出された。その発現パターンは未受精卵から8細胞期にかけて強く発現しているが、64細胞期から中期のう胚期にかけて減少し、再び神経胚期から中期尾芽胚期にかけて増加していた。このことから、卵にマターナルに蓄えられた*CiGRP1*の転写産物は、卵割期の間に分解されるが、神経胚期にはザイゴティックな転写産物が豊富に存在するようになると考えられる。

4-2-4 *CiGRP1* mRNAの空間的発現

CiGRP1 mRNAの発現領域を調べるために、ホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。プローブとして、*CiGRP1* 全長をDIG標識したアンチセンスRNA

を用い、対照にはセンスRNAを用いた(Fig. 4.2.3B)。*CiGRP1* mRNAは、未受精卵から卵割期にかけて細胞質全体に見られた。のう胚期付近から胚の前方にある予定神経細胞での発現が見られ始めるようになる。神経胚期では予定神経細胞、予定間充織細胞で発現が見られる。中期尾芽胚期では、間充織細胞と脳胞では強いシグナルが、体幹部の表皮細胞で弱いシグナルが検出された。対照に用いたセンスプローブではシグナルは全く検出されなかった。

4-2-5 抗*CiGRP1*精製抗体の作製

CiGRP1 mRNAの発現は以上のものであったが、実際に卵や胚で機能するCiGRP1タンパク質の分布を解析するためには、CiGRP1タンパク質を特異的に認識する抗体が必要である。そのために、CiGRP1タンパク質に対する精製抗体を作製した。まず、pET28 expression systemを用いて、大腸菌に強制発現させたT7-tag標識6xHis-CiGRP1融合タンパク質を作製した。それを免疫源としてマウスに数回注射した後、血清を採取し、CiGRP1融合タンパク質を用いたアフィニティー精製を行い、抗CiGRP1精製抗体を得た。

抗体の特異性を確認するために、同じベクターを用いて作製したT7-tag標識Cipros融合タンパク質(カタユウレイボヤ卵内で発現するプロテアソームサブユニットの1つで、CiGRP1とは無関係なタンパク質である; Wada *et al.*, 1999)とT7-tag標識CiGRP1融合タンパク質、卵巣の全タンパク質をSDS-PAGE後、ウエスタンブロットを行い、抗T7-tag抗体と抗CiGRP1精製抗体で検出した(Fig. 4.2.4 A)。抗T7-tag抗体では、T7-tag標識Cipros融合タンパク質とT7-tag標識CiGRP1融合タンパク質が認識され、卵巣のタンパク質は認識されなかった。抗CiGRP1精製抗体では、T7-tag標識Cipros融合タンパク質は認識されず、CiGRP1融合タンパク質と卵巣の約16 kDaの位置にシングルバンドが検出された。予想アミノ酸配列から算出されるCiGRP1の分子量は15.6 kDa

で、この卵巣に検出されるバンドの分子量とよく一致する。よって、今回作製した抗CiGRP1精製抗体は、カタユレイボヤのCiGRP1タンパク質を特異的に認識することが確かめられた。

4-2-6 CiGRP1タンパク質の時間的発現

今回精製した抗CiGRP1精製抗体を用いて、カタユレイボヤ胚におけるCiGRP1タンパク質の時間的な発現をウエスタンブロットにより解析した。その結果、CiGRP1タンパク質は胚発生を通じて、ほぼ一定に発現していることが明らかになった(Fig.4.2.4 B)。しかし、未受精卵には既に一定量のマターナルなCiGRP1タンパク質が蓄えられている。このマターナルなCiGRP1タンパク質は、卵割期を通じて徐々に減少するが、のう胚期からのザイゴティックな転写、翻訳によりCiGRP1タンパク質が増加することで一定量に保たれていると考えられる。

4-2-7 CiGRP1タンパク質の空間的発現

CiGRP1タンパク質の発現領域を調べるために、抗CiGRP1精製抗体を用いて、胚切片の免疫染色を行った。未受精卵では均一に分布しているが、徐々に核周辺の細胞質に集まってくる(Fig. 4.2.5 A)。のう胚期では、すべての割球の核および、胚の外側に偏って存在する核の周辺領域に染色が見られる (Fig. 4.2.5 B)。しかし、細胞質の染色は割球毎に異なり、比較的広い領域に存在するものから、予定内胚葉割球のように非常に狭い領域に限定され、ほとんど細胞質の染色が見られないようなものもある。中期尾芽胚期では、すべての核において強い染色が見られるとともに、細胞質の染色が脳胞と体幹部の間充織において観察された (Fig. 4.2.5 C, D)。これらの染色はホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションの結果によるmRNAの局在と一致する。筋肉細胞の細胞質においても発現が観察されるが、この理由は不明であ

る。ただ、筋肉細胞はnon-immune血清での染色においても、弱いバックグラウンドの染色が見られることから、何らかの非特異的染色である可能性も考えられる (Fig. 4.2.5 E)。

4-2-8 温度ショックによる発現誘導の有無

現在単離されている植物のglycine-rich RNA-binding proteinの多くは、コールドショックによって誘導されることが知られており(Dunn *et al.*, 1996)、ヒトやマウスのホモログもコールドショックで誘導されることが分かっている(Nishiyama *et al.*, 1997b)。そこで、今回単離したCiGRP1もコールドショックで発現が誘導されるかどうか検証した。

まず、コールドショックによる*CiGRP1* mRNA量の変化を調べるために、*CiGRP1* に特異的なプライマーを用いてRT-PCRによる解析を行った (Fig. 4.2.6 A)。未受精卵と中期のう胚に8°Cで3時間のコールドショックを与え、これらの胚を顕微鏡下で50個数えて、そこから全mRNAを抽出した。この条件では、未受精卵は2細胞胚に、中期のう胚は後期のう胚になり、ともにこの後正常に発生した。対照には、16°C 1時間育てた2細胞胚と後期のう胚を用いて、*CiGRP1* mRNA量を比較した。RT-PCRの対照としては、カタユレイボヤ胚において、発生を通じて一定量の転写産物が存在することが確かめられているチューブリン遺伝子(*CiTBB2*)に特異的なプライマーを用い、同じテンプレートによるRT-PCRを行っている。その結果、受精直後、中期のう胚期ともに、8°C 3時間のコールドショック後の*CiGRP1* mRNA量に変化は見られなかった。

次に、翻訳レベルによるCiGRP1タンパク質量の変化を調べるために、抗CiGRP1精製抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行った(Fig. 4.2.6 B, C)。まず、受精直後、中期のう胚期、中期尾芽胚期に8°C 3時間のコールドショックを与えて、それ

それが2細胞期胚、後期のう胚、後期尾芽胚になるまで育てた。これらの胚はその後正常に発生した。対照には、同じ発生ステージの胚と同じ時間16°Cで発生させた胚を用いて、CiGRP1タンパク質量を比較した。それぞれ顕微鏡下で胚を50個数えて、総タンパク質量を揃えた。その結果、どのステージで8°Cのコールドショックを与えても、CiGRP1タンパク質量に対照との差は見られなかった (Fig. 4.2.6 B)。

8°CでのコールドショックがCiGRP1タンパク質を誘導するのに十分でないという可能性があるので、さらに、16細胞期に4°Cで6時間、6°Cで6時間、8°Cで3時間のコールドショック、24°Cで3時間のヒートショックを与えた。対照には16°Cで3時間と6時間育てた胚を用いた。4°Cと6°Cで処理した胚は卵割期で発生が止まった。このような処理にも関わらず、CiGRP1タンパク質の増加は見られなかった (Fig. 4.2.6 C)。さらに、24°Cでのヒートショックを与えても変化は見られなかった (Fig. 4.2.6 C)。

これら一連のRT-PCRやウエスタンブロットを用いた解析から、CiGRP1遺伝子は、転写レベルでも翻訳レベルでも温度ショックでは誘導されないと考えられる。

4-2-9 考察

glycine-rich RNA-binding protein遺伝子は植物から数多く単離されているものの (Hirose *et al.*, 1993)、動物からは限られた数しか単離されていない (Nishiyama *et al.*, 1997a)。今回単離したCiGRP1は原索動物におけるglycine-rich RNA-binding proteinの初めての報告である。しかし、アミノ酸配列の比較からは、動物よりも植物のものと高い相同性が得られた。また、グリシンに富む領域に含まれるグリシン含有率も植物のものに近い値になった。これらのことからCiGRP1は、既知の動物のglycine-rich RNA-binding proteinとは別のサブファミリーに分類されるかもしれない。

ほとんどの植物のglycine-rich RNA-binding proteinはコールドショックにより誘導される (Dunn *et al.*, 1996; Horvath and Olson, 1998)。また、ヒトとマウスホモログもコ

ールドショックにより誘導されるタンパク質である (Nishiyama *et al.*, 1997a; Nishiyama *et al.*, 1997b; Danno *et al.*, 1998)。しかし本研究では、様々なコールドショックやヒートショックを与えても、CiGRP1遺伝子の発現誘導は、転写レベルでも翻訳レベルでも見られなかった。また成体の卵巣において、コールドショックによるCiGRP1タンパク質の誘導が起こるかを調べたが、4°Cと16°Cで24時間処理した卵巣におけるCiGRP1タンパク質量には差は見られなかった。これらのことから、ホヤにおいてCiGRP1遺伝子はコールドショックにより誘導されないものと考えられる。

その一方で、ザイゴティックなCiGRP1 mRNAはのう胚期から発現し始め、mRNAおよびタンパク質は神経系および中胚葉である間充細胞に限定された発現を示した。アフリカツメガエルのホモログであるXCIPもののう胚期で発現し始め、神経系および中胚葉組織の前腎管で発現し、それらの分化に重要な働きを持つと考えられている (Uochi and Asashima, 1998)。このような発現時期や発現組織の類似性から、アフリカツメガエルとホヤでは、ともにglycine-rich RNA-binding proteinが神経系と中胚葉の一部の組織の分化に重要な役割を持つことが予想される。

また、アフリカツメガエルの前腎管は幼生時の排泄器官である。しかし、ホヤには明確な排泄器官は存在せず、nephrocyteと呼ばれる血球が排泄に重要な役割を持つことが知られている (Goodbody, 1974)。ホヤ成体の血球細胞は幼生の間充細胞に由来することが分かっており (Hirano and Nishida, 1997)、もしCiGRP1タンパク質を発現する細胞がホヤの排泄システムに関与するならば、CiGRP1タンパク質は脊椎動物の排泄システムの進化を探る上での鍵となる分子になるかもしれない。

CiGRP1タンパク質とmRNAは未受精卵や卵割期にも存在しており、それらマターナルに蓄えられたRNA結合タンパク質のホヤの胚発生における役割は大変興味深い。

4-3 *CiRGG1*

4-3-1 カタユレイボヤからの*CiRGG1* cDNAクローンの単離

*CiGRP1*の単離と同様に、線虫*Cyk-1*遺伝子の全長3275 bpをDIG標識したプローブを用い、カタユレイボヤ未受精卵cDNAライブラリーをおだやかな条件でスクリーニングを行った。その結果、最長2020 bpのcDNAクローンを単離した。このcDNAは529 aaのタンパク質をコードしており、そのコードするタンパク質には3つのRRMと2つのRGGボックスがあることから、*CiRGG1* (*Ciona intestinalis* RNA binding protein contains RGG-box 1)と名付けた(Fig. 4.3.1)。

4-3-2 *CiRGG1*タンパク質の分子的特徴

*CiRGG1*タンパク質のアミノ酸配列をさらに詳しく調べてみると、N末側にリシンに富む領域を2カ所、グルタミン酸とアスパラギン酸に富む領域を2カ所、中央に3つのRRM、C末側に2つのRGGボックスを含んでいた(Fig. 4.3.2)。アミノ酸配列から算出される分子量は58 kDaであった。

4-3-3 類似分子との比較

*CiRGG1*タンパク質の相同分子を検索したところ、nucleolinと類似性があった。nucleolinはリボソームRNAの合成や代謝に関与する核タンパク質である。また近年、細胞増殖期のmRNAと結合し、リボヌクレオプロテインを形成する分子としても注目されている。現在、様々な生物のnucleolinが単離されているので、*CiGRP1*と構造を比較した(Fig. 4.3.3)。ヒトとアフリカツメガエルのnucleolinでは、N末側にリシンに富む領域、あるいはグルタミン酸とアスパラギン酸に富む領域、中央に4つのRRM、C末側にRGGボックスという構成がよく保存されており、アミノ酸の保存性も高い(53%)。しかしそれらを*CiRGG1*タンパク質と比較すると、RRMやRGGボックスの数

や位置も異なり、アミノ酸全体での類似性は、ヒトとは28%、アフリカツメガエルとは27%と低い値となった。これらのことを考慮すると、*CiRGG1*タンパク質はホヤのnucleolinであると結論づけるのは難しい。

4-3-4 *CiRGG1* mRNAの時間的発現

CiRGG1 mRNAの発現時期を調べるために、ノザンハイブリダイゼーションを行った(Fig. 4.3.4 A)。その結果、未受精卵から中期尾芽胚期にわたって、約2 kbのバンドが検出された。特に未受精卵には強い発現が見られるが、その後のステージでは比較的少量の発現が一定に保たれている。

4-3-5 *CiRGG1* mRNAの空間的発現

CiRGG1 mRNAの発現領域を調べるために、*in situ*ハイブリダイゼーションを行った(Fig. 4.3.4 B-G)。その結果、未受精卵では細胞質全体にシグナルが見られるが(Fig. 4.3.4 B)、2細胞期ではシグナルの明確な偏りが見られた(Fig. 4.3.4 C)。中期のう胚(Fig. 4.3.4 D)と中期神経胚(Fig. 4.3.4 E)では、予定間充織細胞、予定脳胞細胞、予定神経索細胞でのザイゴティックな発現が見られた。また予定内胚葉細胞でも弱いシグナルが見られた。中期尾芽胚期(Fig. 4.3.4 F)では脳胞、間充織、体幹部の内胚葉細胞で引き続き発現が見られた。さらに発色時間を長くすると、神経索と尾部の内胚葉索にも弱いシグナルが検出された(Fig. 4.3.4 G)。

4-3-6 2細胞期における*CiRGG1* mRNAの局在の解析

Yoshidaらはユレイボヤ遠心卵を用いた実験より、筋肉分化決定因子を含むと考えられる黒卵片に多く含まれる母性mRNAを単離した(Yoshida *et al.*, 1996)。この遺伝子は、受精卵から初期卵割期までマイオプラズムに局在し、その後は胚の後極に局

在したので、*pem* (*posterior end mark*)と名付けられた。同時に*pem*遺伝子のカタユウレイボヤホモログが単離され、*pem*と同様の挙動を示したので*Ci-pem*と名付けられた。*Ci-pem*のmRNAは胚の後極に局在し続けことから、カタユウレイボヤ胚の後極マーカースとして有用な分子である。そこで、2細胞期における*CiRGG1* mRNAの局在領域を明らかにするために、京都大学吉田章子博士らから*Ci-pem*遺伝子をご供与いただいた。*Ci-pem*を後極マーカースとして用い、*CiRGG1*との*in situ*ハイブリダイゼーションの2重染色を行った(Fig. 4.3.5 A, B)。その結果、*CiRGG1*のシグナルは、*Ci-pem*の発現とは反対の細胞質領域である動物極側前方に見られることが分かった。このような2細胞期におけるRNAの偏りは、いくつか他の遺伝子でも見られる。例えば、*Ciona* 14-3-3遺伝子では前側に片寄った発現が見られる(Fig. 4.3.5 C)。しかし、その偏りが前側であることを明確に示した例はこれまでになかった。他には、*Ci-pem*のように明らかに後極に局在する遺伝子(Satou and Satoh, 1997; Sasakura *et al.*, 1998)(Fig. 4.3.5 A, B)や、*CiYB1*のように細胞質全体に発現する遺伝子(Fig. 4.3.5 D)もあり、このようなRNAの分布にはそれぞれ何らかの特別なメカニズムが働いているはずである。

CiRGG1 mRNAの前方への局在は、2細胞期の非常に短い期間で起こり、4細胞期には無くなってしまう(Fig. 4.3.5 E-H)。第一卵割直前の卵では*CiRGG1* mRNAはわずかに後極側の細胞質でうすくなっている(Fig. 4.3.5 E)。しかし卵割後、*CiRGG1* mRNAは前後軸に沿って核周辺の細胞質を囲むように移動する(Fig. 4.3.5 F)。この前方への移動により、*CiRGG1* mRNAは動物極側前方に一過的に多く偏る(Fig. 4.3.5 G)。

4-3-7 考察

ホヤから新規のRNA結合タンパク質遺伝子を単離し、*CiRGG1*と名付けた。この遺伝子の予想アミノ酸配列には、リシンに富む領域、グルタミン酸とアスパラギン

酸に富む領域、RRMとRGGボックスが含まれ、nucleolinと構造上の類似が見られた。

しかし、*CiRGG1*タンパク質は、核タンパク質として核に存在するのか、また、リボヌクレオプロテインの構成物であるかなど、不明な点が多い。さらに無脊椎動物ではnucleolinはまだ単離されておらず、アミノ酸配列の特徴からだけでは、*CiRGG1*タンパク質がホヤのnucleolinであることを決定づけることは難しい。

*CiRGG1*の母体転写産物は一過性に2細胞期胚の前側に局在する。このような局在パターンは他の遺伝子でも見られることがあった。また2細胞期の*CiRGG1* mRNAの動きはConklin (1905)によって記載されたマイオプラズムの一部であるイエロープロトプラズムの移動と対応づけられる。この動きはマイオプラズムを特異的に認識する抗myoplasmin-C1モノクローナル抗体(Nishikata *et al.*, 1987)による免疫染色によって明確にできる(Fig. 4.3.4 I-L)。マイオプラズムは2回目の卵細胞質再配置の後、後極へ分配される。2細胞期では、マイオプラズムの一部が前側へと移動して核周辺の細胞質を囲み、これらが4細胞期の4つすべての割球に分配される。*CiRGG1* mRNAの一過性の前側への局在化メカニズムの詳細は不明であるが、このようなマイオプラズムの前方への移動と関連があると考えられる。

さらに、*CiRGG1* mRNAの前方への移動は、2細胞期の核周辺部において、前側への細胞質の流れがあると考えたと説明がつく。このような細胞質の動きは、*pem*のような後極に局在する細胞質の情報を胚の前側へ伝達する重要な機能を担っていると考えられる。

4-4 CiMsi

4-4-1 *musashi*遺伝子とは

*musashi*遺伝子は、ショウジョウバエの神経発生において細胞系譜に異常をきたす突然変異の原因遺伝子として単離されたRNA結合タンパク質をコードする遺伝子である(Nakamura *et al.*, 1994)。また、マウスの相同遺伝子である*mouse-musashi-1*は、分裂の盛んな神経系前駆細胞に強い発現が見られ、神経細胞の分化や決定に重要な役割を果たしていると考えられてる(Sakakibara *et al.*, 1996)。このようにこれまでに知られている*musashi*遺伝子は、ともに神経形成において重要な機能を持つRNA結合タンパク質である。Musashiタンパク質はN末側に2つのRRMを持ち、C末側にアラニンに富む領域を持っている。

4-4-2 カタユウレイボヤからのCiMsi cDNAクローンの単離

そこで、*musashi*遺伝子をカタユウレイボヤより単離する目的で、マウス、ショウジョウバエ、線虫のMsi遺伝子のRRM領域の塩基配列をもとにディジェネレートプライマーをデザインし、RT-PCR法、3' RACE法により遺伝子断片を得た。その断片をプローブとし、カタユウレイボヤ未受精卵cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、最長1374 bpのcDNAクローンを単離した(Fig. 4.4.1)。このクローンには、393 aaのORFがあり、その予想アミノ酸配列には、2つのRRMが存在した。このアミノ酸配列と相同な分子を検索すると、既知のマウス、ショウジョウバエ、線虫のMsi遺伝子と高い類似性があり、カタユウレイボヤ*musashi*ホモログと考えられたことからCiMsi(*Ciona intestinalis musashi*)と名付けた。

4-4-3 他の生物のMusashiタンパク質との比較

CiMsiの塩基配列から予想されるアミノ酸配列とマウスのMusashiタンパク質と比

較すると、類似性は41%であり、同じホヤの仲間であるマボヤの*musashi*ホモログ(*HrMsi1*)とは47%であった。また既知のMusashiタンパク質とRRMごとに、そのアミノ酸配列を比較してみた(Fig. 4.4.2 A)。RRM1とRRM2ともによく保存されており、マボヤと似ているのは勿論、マウスやショウジョウバエともよく似ていた。CiMsiのRRMのアミノ酸配列とマボヤのそれとでは60%、マウスとは48%の類似性であった。また、Musashiタンパク質のRRMを除く、C末側のアミノ酸配列での比較を行った(Fig. 4.4.2 B)。既知のMusashiタンパク質に見られるC末のアラニンに富む領域は、カタユウレイボヤ、マボヤともに見られなかった。しかし、カタユウレイボヤとマボヤにはチロシンとグリシンに富む領域が見つかった。

4-4-4 CiMsi mRNAの時間的発現

CiMsi mRNAの時間的発現を調べるために、CiMsi特異的プライマーを用いて、RT-PCRをおこなった(Fig. 4.4.3 A)。その結果、卵巣では検出されず、マターナルなmRNAは未受精卵から卵割期を通じて存在した。中期のう胚期で一度発現が減少することから、マターナルな発現からゼイゴティックな発現への転換がこの頃に起きていると思われる。神経胚期以降発現は高まり、中期尾芽胚でも高い発現が見られた。

4-4-5 CiMsi mRNAの空間的発現

次にCiMsi mRNAの発現領域を調べるために、ホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションを行った(Fig. 4.4.3 B-I)。その結果、未受精卵から卵割期にかけては、細胞質全体で発現が見られた。これら胚全体における細胞質のシグナルは初期のう胚期までに急速に減少し、中期のう胚では予定神経索細胞で新たな発現が見られるようになる。初期神経胚期では、予定神経索細胞、予定間充細胞での発現が強く見

られる。さらに神経管形成の進んだ中期神経胚期では、予定神経索細胞から、予定脳胞細胞まで、背側神経系全体で発現が見られるようになる。中期尾芽胚期では脳胞、間充織細胞で強い発現が見られるが、神経索での発現が弱まってくる。センスプローブで未受精卵を検出してもシグナルは見られなかった。

4-4-6 考察

今回単離した*CiMsi*遺伝子にコードされる*CiMsi*タンパク質は、RRMを2つ持ち、そのアミノ酸配列は、既知の*Musashi*タンパク質のRRMと高い保存性を示した。よって、*CiMsi*遺伝子はカタユウレイボヤの*musashi*ホモログと考えられる。

ショウジョウバエやマウスの*musashi*は、神経分化に関わる重要な分子として、神経細胞の分化に際して発現することが知られている。*CiMsi* mRNAのザイゴティックな発現は原腸胚期の予定神経索細胞で始まる。また、神経胚期、尾芽胚期と神経系での発現が保たれる。この発現様式も、今回単離した*CiMsi*遺伝子がカタユウレイボヤの*musashi*ホモログであるということを強く示唆している。

神経胚期の神経管形成における*CiMsi* mRNAの発現様式は、非常に興味深く、胚の後部から進んでくる神経管形成に伴い、神経索から脳胞へと神経系での発現が後から前へと移動していく。このような発現は、*CiMsi*がホヤの神経形成の鍵となる分子であることを示唆している。さらにホヤの系統学的位置を考慮すると、脊椎動物への神経形成メカニズムの進化の道筋を理解する上で、*CiMsi*が重要な分子となりうると期待される。

しかし、*CiMsi* mRNAの発現は、のう胚期から、神経系の細胞だけでなく間充織細胞でも発現が始まり、尾芽胚期でも強い発現が保たれる。このことから*CiMsi*は神経系だけでなく間充織細胞の分化にも関わっていることが予想される。また、幼生の神経系の細胞と間充織細胞は、変態を経て、成体の神経系である神経節を形成する。

つまり、*CiMsi*が成体の神経形成にも関与している可能性も考えられることになる。

4-5 機能解析

4-5-1 ゲルシフト解析

今回単離したRNA結合タンパク質が本当にRNAとの結合能を持ち、どのようなRNAと結合するのかを明らかにすることは、それらの機能を解析する上で重要な情報である。このようなRNAとタンパク質との相互作用を*in vitro*で調べる実験系として、ゲルシフト解析がある。

現在、ゲルシフト解析には放射性同位元素(RI)を用いた手法が主流であるが、安全性の問題や検出に時間がかかる等、問題が多かった。しかし、最近のnon-Ri技術の進歩により、RIを使わずに核酸を標識することができるようになったことから、DIG標識したDNAを用いたnon-Riのゲルシフト解析も報告されている(Sakai *et al.*, 1998)。本研究で私は、フルオレセインで標識したRNAプローブを用い、より簡便であり、応用範囲の広いnon-Riゲルシフト解析の手法を開発した。

この方法を用いて、6xHis-CiYB1融合タンパク質とフルオレセインで標識したRNAプローブを用いてゲルシフト解析を行い、CiYB1タンパク質のRNAとの結合能を調べた。

6xHis-CiYB1融合タンパク質とフルオレセイン標識RNAをbinding bufferで室温30分結合後、1.5%アガロースゲルで電気泳動すると、高分子量にシフトしたバンドが得られた(Fig. 4.5.1 A)。このようなバンドのシフトは子牛血清アルブミン(BSA)やヘパリンをRNAに加えたものでは見られない。また、競合RNAとして標識していないポリ(A)、ポリ(G)、ポリ(U)、ポリ(AC)、ポリ(AG)、ポリ(AU) RNAを反応に加えて、同様に電気泳動した。その結果、ポリ(A)、ポリ(U)、ポリ(AC)、ポリ(AU) RNAでは競合が起きず、大過剰に加えてもシフトバンドに変化はなかったが、ポリ(G)、ポリ(AG)では競合が起き、シフトバンドが減少した(Fig. 4.5.1 A)。このことから、CiYB1タンパク質はGに富む配列を持つRNAと結合する能力を持つことが予想される。こ

のことはゼノパスで単離されたY-boxタンパク質であるFRGY-2タンパク質がAとGに富む配列に結合する能力を持つという報告とも一致する(Malello *et al.*, 1992)。

また、CiYB1タンパク質と*Cipem* RNAの局在が卵後極において一致していたことから、卵内でCiYB1タンパク質が*Cipem* RNAと結合している可能性が示唆された。そこで、CiYB1タンパク質と*Cipem* RNAの結合能を確認するために、フルオレセイン標識した*Cipem* 3' UTR RNAをプローブに用いて、ゲルシフト解析を行った(Fig. 4.5.1B)。その結果、*Cipem* 3' UTR RNAに6xHis-CiYB1融合タンパク質を加えるとシフトバンドが得られた。このように*Cipem* RNAとCiYB1タンパク質は*in vitro*で結合することが確かめられた。よって*Cipem* RNAとCiYB1タンパク質が卵内で結合する可能性が示唆される。

4-5-2 合成mRNAの顕微注入による強制発現

ホヤにおいて遺伝子の機能を*in vivo*で解析する方法として、*in vitro*で合成したmRNAを卵に顕微注入して発生させ、胚内で強制発現させる方法が確立されている(Yoshida *et al.*, 1996)。そこで、今回単離したRNA結合タンパク質の機能を解析するために、合成mRNAの顕微注入による強制発現実験を行った。まず、5' cap構造を持つ合成mRNAを*CiGRP1* cDNA、*CiRGG1* cDNA、*CiMsi* cDNAをもとにそれぞれ*in vitro*で合成した。これを受精卵に顕微注入し、なにも顕微注入していない受精卵が中期尾芽胚期に至るまで発生させた。また顕微注入の対照実験として、同様に合成した大腸菌βガラクトシダーゼ(*lacZ*) mRNAを受精卵に顕微注入した。この*lacZ*タンパク質は、ホヤの発生になにも影響をおよぼさないことが分かっている(Yoshida *et al.*, 1996)。

CiRGG1 合成RNAを顕微注入した場合、強制発現胚には著しい形態変化は見られず、対照として用いた*LacZ*合成RNAを顕微注入した場合と同じような軽度の形態変

化しか示さなかった。しかし*CiGRP1*強制発現胚では、のう胚期付近で発生が停止してしまう胚が多く見られた(Fig. 4.5.2 A, B)。今回の実験では対照胚の発生が安定せず、明確な実験結果とは言いがたい面もある。しかし、全長mRNAの過剰発現では影響が現れない*CiRGG1*と比較して、*CiGRP1*では発生の停止を引き起こす傾向を認めることができる。

*CiMsi*合成mRNAを顕微注入した場合、強制発現胚には、対照胚には見られないような著しい形態変化を示した胚が見られた(Fig. 4.5.3 A, B)。このような胚は、尾部が短くなり広がってしまうという共通の形態をしていた。これらの形態変化が、どのような細胞分化の異常から引き起こされているのかを今後明確にしていく必要があるが、*CiMsi*は、尾部形成に影響をおよぼすような組織の分化に関与している可能性が考えられる。

4-5-3 考察

今回、*in vitro*での機能解析の方法として、RNA結合タンパク質の最大の特徴であるRNAとの結合能を調べるゲルシフト解析を行った。その結果、*CiYB1*タンパク質はRNAとの結合能を有し、その性質がアフリカツメガエルのY-Boxタンパク質であるFRGY2タンパク質による結果と類似していた。このFRGY2タンパク質はマターナルに存在し、卵内でマスキングタンパク質として機能していることが知られており、*CiYB1*タンパク質もマターナルに存在することからも、FRGY2タンパク質同様にマスキングタンパク質として働いている可能性が考えられる。また、*CiYB1*タンパク質は*pem* 3' UTR RNAに結合できることがわかった。これらのことから、*CiYB1*タンパク質は*pem*のマスキングタンパク質として働き、その翻訳を調節している可能性があり、胚の前後形成に関わる重要な因子の1つである可能性も考えられる。

*in vivo*での機能解析には、合成mRNAの顕微注入による強制発現系を用いた。

CiGRP1 mRNAの強制発現胚は、特定の組織分化に影響をおよぼさないようであったが、対照胚と比較して、のう胚期付近で発生が停止してしまうものも多く見られた。ヒトのglycine-rich RNA-binding proteinはコールドショックにより誘導され、低温下での細胞増殖を抑える機能を持つことが分かっている(Nishiyama *et al.*, 1997b)。もし、*CiGRP1*にもそのような機能があるとすれば、過剰に発現した*CiGRP1*タンパク質が、細胞周期に関わるような遺伝子の翻訳阻害等を引き起こし、発生を停止させてしまった可能性が考えられる。今回の結果では実験胚の数が少ないので、引き続き実験を繰り返してその再現性を調べる必要がある。

CiMsi mRNAの強制発現では、著しく形態変化を引き起こした胚が観察された。他のMusashiタンパク質の機能から、強制発現した*CiMsi*タンパク質は神経系の分化に何らかの影響をおよぼすことが予想されるが、胚の観察からだけでは、胚内部の組織分化の状態はよくわからなかった。しかし、このような著しい尾の変化は、なんらかの細胞分化の異常が引き起こした形態異常と考えられる。このような胚の分化状態を分子レベルで明確に把握するためには、遺伝子マーカーや分化マーカーが必要である。現在、各組織に特異的な遺伝子マーカーを単離中であり、このようなマーカーが各組織について揃えば、強制発現胚の遺伝子レベルでの細胞分化状態が判別でき、*CiMsi*強制発現胚の分化におよぼす影響も詳細に解析できるようになるだろう。

第6章 総合考察

本研究では、決定因子としての母性mRNAに結合し、その翻訳調節や局在化を司るRNA結合タンパク質を探しだし、その機能を明らかにすることを目指していた。しかし、今回カタユレイボヤ卵より単離し、解析した4つのRNA結合タンパク質遺伝子のうち、母性mRNAが卵内で局在していたものは1つとして見つからなかった。これは、タンパク質としての機能が重要なRNA結合タンパク質として当然の結果かも知れない。そこで、*CiRGG1*以外の翻訳産物に対する抗体を作製し、それぞれのタンパク質の発現様式を調べたのだが、*CiYB1*タンパク質以外は、特定の組織分化を推測させるような局在を示していなかった。つまり、西田らが明らかにしたいろいろな決定因子の局在場所に対応する局在を示すようなRNA結合タンパク質は見つからなかったということである。これは、*CiGRP1*の機能解析で弱いながらも示唆された、細胞分裂など、より普遍的な発生現象に関与するRNA結合タンパク質が予想以上にたくさん存在し、局在するようなRNA結合タンパク質が少ないことを物語っているのかも知れない。

一方で、今回単離したRNA結合タンパク質は図らずもすべてRRMを持つタンパク質であった。他にも様々なRNA結合能を有するアミノ酸配列が知られていることから、これら違ったタイプのRNA結合タンパク質が決定因子の機能により深く関わっているのかも知れない。今後さらに解析する分子の数を増やすことで、決定因子の機能に関わるRNA結合タンパク質を見つけられることは十分に考えられる。しかし、卵内にあらかじめ蓄えられているRNA結合タンパク質は、決定因子に関わるものや細胞分裂やスプライシングなどの普遍的なメカニズムに関わるものも含めて、私の予想をはるかに越えて多様であることが、今回の結果だけからも推察できた。

また、今回単離した4つのRNA結合タンパク質のすべてが、マターナルな産物の他

にザイゴティックな産物として胚発生の過程で利用されていた。このことは、ひとつのRNA結合タンパク質が、ごく短時間の初期発生過程の間において、全く異なる機能を発揮していることを示しており、RNA結合タンパク質の機能が多様でフレキシブルであることを物語っている。逆に、こういったRNA結合タンパク質の性質が、転写調節などの遺伝子発現の調節では対応しきれないような、生体の融通性を持たせるのに役立っていることも考えられる。

今回、*CiYB1*タンパク質がマターナルな*Ci-pem* RNAの翻訳抑制を行うことで、*Ci-pem*の胚前方形形成メカニズムに関与することが示唆され、母性mRNAの動的機能を具体的に解析する糸口が得られたことになる。今後*in vitro*、*in vivo*の両面から*CiYB1*タンパク質と*Ci-pem* RNAの関係を明らかにすることで、ホヤ胚における前方形形成の分子メカニズムが明らかにできると期待される。

これらの成果は、RNA結合タンパク質という新しい視点で望んだ本研究の成果として十分に評価できると考えている。

謝辞

本研究について終始適切な指導と助言をいただき、さらに本論文の精読と批評をしていただきました、甲南大学理学部、園部治之教授と、西方敬人助教授にお礼申し上げます。

実験材料の採集にあたりお世話になりました、東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センター、天野雅男助手、盛田孝一氏およびセンターの皆様、東北大学農学部附属海洋生物資源教育研究センター、木島明博教授、阿部勝夫氏およびセンターの皆様、岡山大学理学部付属牛窓臨海実験所、白井浩子教授、広島大学理学部付属向島臨海実験所、道端齊教授、宇山太郎講師、植木龍也助手にお礼申し上げます。

本研究におきまして、カタユレイボヤ卵巣のcDNAライブラリーを供与いただいた京都大学理学部、真壁和裕助手、カタユレイボヤ中期尾芽胚のライブラリーを供与いただいた京都大学理学部、佐藤ゆたか助手に深く感謝致します。マウス、ショウジョウバエ、線虫の*Msi*遺伝子の塩基配列を教示いただいた大阪大学医学部、岡野栄之教授、マボヤ*Msi*遺伝子の配列を教示いただいた京都大学理学部、真壁和裕助手、マボヤ*pem*遺伝子のカタユレイボヤホモログである*Ci-pem*遺伝子を供与いただいた京都大学大学院理学研究科、吉田章子博士、pBS-RN3プラスミドを供与いただいたマルセイユ大学、Patrick Lemaire博士、線虫*Cyk-1*遺伝子を供与いただいたオレゴン大学、Kathryn A. Swan博士に深く感謝致します。

論文投稿の際に、校閲および多くのご助言をくださいました、京都大学理学部、佐藤矩行教授、甲南大学理学部、大山隆助教授にお礼申し上げます。

阪神大震災の際、実験環境をご提供くださいました京都大学理学部、佐藤矩行教授をはじめ、研究室の皆様にお礼を申し上げます。そして研究室の復興に多大なる援助をいただきました多くの皆様に深く感謝いたします。

最後になりましたが、本論文をご校閲いただき、ご助言をくださいました、甲南大学理学部、松尾光芳教授、田中修教授、玉置克之教授、重松利彦教授、杉本直己教授にお礼申し上げます。

参考文献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Burd, C. G. and Dreyfuss, G. (1994) Conserved structure and diversity of function of RNA binding proteins. *Science* **265**, 615-621.
- Conklin, E. G. (1905) Organ-forming substances in the eggs of ascidians. *Biol. Bull.* **8**, 205-230.
- Danno, S., Matsuda, T. and Fujita, J. (1997) Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 804-807.
- Darnborough, C. H. and Ford, P. J. (1981) Identification in *Xenopus laevis* of a class of oocyte-specific proteins bound to messenger RNA. *Eur. J. Biochem.* **107**, 45-56.
- Deno, T., Nishida, H. and Satoh, N. (1985) Histo-specific acetylcholinesterase development in quarter ascidian embryos derived from each blastomere pair of the eight-cell stage. *Biol. Bull.* **168**, 239-248.
- Didier, D. K., Schifffenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M. and Schwartz, B. D. (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7322-7326.
- Doniger, J., Landsman, D., Gonda, M. A. and Wistow, G. (1992) The product of *unr*, the highly conserved gene upstream of N-ras, contains multiple repeats similar to the cold-shock domain (CSD), a putative DNA-binding motif. *New Biol.* **4**, 389-395.
- Dunn, M. A., Brown, K., Lightowlers, R. and Hughes, M. A. (1996) A low-temperature-responsive gene from barley encodes a protein with single-stranded nucleic acid-binding activity which is phosphorylated *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* **30**, 947-959.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. and Nüsslein-Volhard, C. (1997) RNA-RNA interaction is required for the formation of specific *bicoid* mRNA 3' UTR-STAUEN ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* **16**, 1751-1758.

- Goodbody, I.** (1974) The physiology of ascidians. *Adv. Mar. Biol.* **12**, 1-149.
- Grant, C. E. and Deeley, R. G.** (1993) Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4186-4196.
- Hikosaka, A., Kusakabe, T., Satoh, N. and Makabe, K. W.** (1992) Introduction and expression of recombinant genes in ascidian embryos. *Devl. Growth Differ.* **34**, 627-634.
- Hibino, T., Nishikata, T. and Nishida, H.** (1998) Centrosome-attracting body: A novel structure closely related to unequal cleavages in the ascidian embryo. *Devl. Growth Differ.* **40**, 85-95.
- Hirano, T. and Nishida, H.** (1997) Developmental fates of larval tissues after metamorphosis in ascidian *Halocynthia roretzi*. *Devl. Biol.* **192**, 199-210.
- Hirose, T., Sugita, M. and Sugiura, M.** (1993) cDNA structure, expression and nucleic acid-binding properties of three RNA-binding proteins in tobacco: occurrence of tissue-specific alternative splicing. *Nuc. Acids Res.* **21**, 3981-3987.
- Horvath, D. P. and Olson, P. A.** (1998) Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. *Plant Mol. Biol.* **38**, 531-538.
- Katsu, Y., Yamashita, M. and Nagahama, Y.** (1997) Isolation and characterization of goldfish Y box protein, a germ-cell-specific RNA-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **249**, 854-861.
- Kessler, D. S. and Melton, D. A.** (1995) Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development* **121**, 2155-2164.
- Kim-Ha, J., Kerr, K. and Macdonald, P. M.** (1995) Translational regulation of *oskar* mRNA by *bruno*, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**, 403-412.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lemaire, P., Garrett, N. and Gurdon, J. B.** (1995) Expression cloning of *Siamois*, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* **81**, 85-94.

- Lee, W. C., Xue, Z. X. and Melese, T.** (1991) The NSR1 gene encodes a protein that specifically binds nuclear localization sequences and has two recognition motifs. *J Cell Biol.* **113**, 1-12.
- Marello, K., LaRovere, J. and Sommerville, J.** (1992) Binding of *Xenopus* oocyte masking proteins to mRNA sequences. *Nuc. Acids Res.* **20**, 5593-5600.
- Marikawa, Y., Yoshida, S. and Satoh, N.** (1994) Development of egg fragments of the ascidian *Ciona savignyi*: The cytoplasmic factors responsible for muscle differentiation are separated into a specific fragment. *Devl. Biol.* **162**, 134-142.
- Marikawa, Y., Yoshida, S. and Satoh, N.** (1995) Muscle determinants in the ascidian egg are inactivated by UV irradiation and inactivation is partially rescued by injection of maternal mRNAs. *Roux's Arch. Devl. Biol.* **204**, 180-186.
- Marikawa, Y. and Satoh, N.** (1996) Ultraviolet-sensitive ooplasmic factors are responsible for the development of an endoderm-specific alkaline phosphatase in the ascidian embryo. *Devl. growth Differ.* **38**, 167-173.
- Mita-Miyazawa, I., Ikegami, S. and Satoh, N.** (1985) Histo-specific acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells isolated from 16-cell-stage ascidian embryos with respect to number of DNA replications. *J Embryo. Exp. Morphol.* **87**, 1-12.
- Mita-Miyazawa, I., Nishikata, T. and Satoh, N.** (1987) Cell- and tissue-specific monoclonal antibodies in eggs and embryos of the ascidian *Harocynthia roretzi*. *Development* **99**, 155-162.
- Meedel, T. H., Farmer, S. C. and Lee, J. J.** (1997) The single MyoD family gene of *Ciona intestinalis* encodes two differentially expressed proteins: Implications for the evolution of chordate muscle gene regulation. *Development* **124**, 1711-1721.
- Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J. A. and Montell, C.** (1994) Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* **13**, 67-81.
- Nishida, H.** (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Devl. Biol.* **121**, 536-541.

- Nishida, H.** (1992) Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Development* **116**, 521-529.
- Nishida, H.** (1993) Localized region of egg cytoplasm that promote expression of endoderm-specific alkaline phosphatase in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* **118**, 1-7.
- Nishida, H.** (1994a) Localization of egg cytoplasm that promotes differentiation to epidermis in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* **120**, 235-243.
- Nishida, H.** (1994b) Localization of determinants for formation of the anterior-posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* **120**, 3093-3104.
- Nishida, H.** (1996) Vegetal egg cytoplasm promotes gastrulation and is responsible for specification of vegetal blastomeres in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* **122**, 1271-1279.
- Nishikata, T., Mita-Miyazawa, I., Deno, T. and Satoh, N.** (1987) Monoclonal antibodies against components of the myoplasm of eggs of the ascidian *Ciona intestinalis* partially block the development of muscle-specific acetylcholinesterase. *Development* **100**, 577-586.
- Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Itoh, K., Danno, S., Matsuda, T. and Fujita, J.** (1997a) Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* **204**, 115-120.
- Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O. and Fujita, J.** (1997b) A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J. Cell Biol.* **137**, 899-908.
- Ortolani, G.** (1955) The presumptive territory of the mesoderm in the ascidian germ. *Experientia* **11**, 445-446.
- Rankin, M. L., Heine, M. A., Xiao, S., LeBlanc, M. D., Nelson, J. W. and DiMario, P. J.** (1993) A complete nucleolin cDNA sequence from *Xenopus laevis*. *Nuc. Acids Res.* **11**, 169.
- Robinow, S., Campos, A. R., Yao, K. M. and White, K.** (1988) The *elav* gene

product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motif. *Science* **242**, 1570-1572.

- Sakai, Y., Nakagawa, R., Sato, R. and Maeda, M.** (1998) Selection of DNA binding sites for human transcriptional regulator GATA-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 682-688.
- Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, D., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S., Miyata, T., Ogawa, M., Mikishiba, K. and Okano, H.** (1996) *Mouse-Musashi-1*, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Devl. Biol.* **176**, 230-242.
- Sasakura, Y., Ogasawara, M. and Makabe, K. W.** (1998) *HrWnt-5*: a maternally expressed ascidian *Wnt* gene with posterior localization in early embryos. *Int. J. Devl. Biol.* **42**, 573-579.
- Satoh, N.** (1994) *Developmental Biology of Ascidians*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Satou, Y.** (1999) *posterior end mark 3 (pem-3)*, an ascidian maternally expressed gene with localized mRNA encodes a protein with *Caenorhabditis elegans* MEX-3-like KH domains. *Devl. Biol.* **212**, 337-350.
- Satou, Y., Kusakabe, T., Araki, I. and Satoh, N.** (1995) Timing of initiation of muscle-specific gene expression in the ascidian embryo precedes that of developmental fate restriction in lineage cells. *Devl. Growth Differ.* **37**, 319-327.
- Satou, Y. and Satoh, N.** (1997) *Posterior end mark 2 (pem-2)*, *pem-4*, *pem-5*, and *pem-6*: maternal genes with localized mRNA in the ascidian embryo. *Devl. Biol.* **15**, 467-481.
- Siomi, H. and Dreyfuss, G.** (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Devl.* **7**, 345-353.
- Strivastava, M., Fleming, P. J., Pollard, H. B. and Burns, A. L.** (1989) Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett.* **250**, 99-105.
- Steedman, H. F.** (1957) Polyester wax. A new ribboning embedding medium for histology. *Nature* **179**, 1345.
- St. Johnston, D., Beuchle, D. and Nüsslein-Volhard, C.** (1991) *Staufen*, a gene

required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**, 51-63.

St. Johnston, D. (1995) The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**, 161-170.

Swan, K. A., Severson, A. F., Carter, J. C., Martin, P. R., Schnabel, H., Schnabel, R. and Bowerman, B. (1998) *cyk-1*: a *C. elegans* FH gene required for a late step in embryonic cytokinesis. *J Cell Sci.* **111**, 2017-2027.

Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G., Rosenfeld, M., Wong, E., Henson, J., Posner, J. B. and Furneaux H. M. (1991) HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* **67**, 325-333.

Tafari, S. T. and Wolffe, A. P. (1990) *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9028-9032.

Tafari, S. T., Familari, M. and Wolffe, A. P. (1993) A mouse Y box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes. *J Biol. Chem.* **268**, 12213-12220.

Uochi, T. and Asashima, M. (1998) *XCIRP* (*Xenopus* homolog of cold-inducible RNA-binding protein) is expressed transiently in developing pronephros and neural tissue. *Gene* **211**, 245-250.

Wada, M. R., Ohtani, Y., Shibata, Y., Tanaka, K. J., Tanimoto, N. and Nishikata, T. (1998) An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryos. *Dev. Growth Differ.* **40**, 631-640.

Wada, M. R., Murakami, A. R., Kawamura, H., Nakamori, R., Tanaka, K. J., Nakayama, H. and Nishikata, T. (1999) The expression of the protochordate homolog of the proteasome regulatory subunit Rpn12 is transcriptionally and post-translationally regulated during cleavage stage. *Zool. Sci.* **16**, 125-129.

Yoshida, S., Marikawa, Y. and Satoh, N. (1996) *Posterior end mark*, a novel maternal gene encoding a localized factor in the ascidian embryo. *Development* **122**, 2005-2012.

論文リスト

副論文

1, Wada, M. R., Ohtani, Y., Shibata, Y., Tanaka, K. J., Tanimoto, N. and Nishikata, T. (1998) An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo. *Dev. Growth Differ.* **40**, 631-640.

2, Tanaka, K. J. and Nishikata, T. (1999) A non-radioactive gel shift protocol enables to recover RNA-binding proteins. *Tech. Tips OnLine* <http://www.elsevier.com/locate/tto>, T01794.

3, Kawashima, T., Murakami, A., Ogasawara, M., Tanaka, K. J., Isoda, R., Sasakura, Y., Nishikata, T., Okano, H. and Makabe, K. W. (1999) Expression patterns of *musashi* homologs of the ascidians, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes and Evol.* **210**, 162-165.

4, Tanaka, K. J., Kawamura, H., Matugu, H. and Nishikata, T. (2000) The ascidian glycine-rich RNA-binding protein is not induced by a temperature-stress but expressed under the genetic program during embryogenesis. *Gene*, **243**, 207-214.

参考論文

- 1, Tanaka, K. J. and Nishikata, T. (1994) Specification in the primary lineage of ascidian muscle cells analyzed with a specific monoclonal antibody. *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.* **41**, 89-97.
- 2, Tanaka, K. J., Ogasawara, M., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1996) Expression of pharyngeal gill-specific genes in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Devl. Genes Evol.* **206**, 227-235.
- 3, Ogasawara, M., Tanaka, K. J., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1996) Expression of endostyle-specific genes in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Devl. Genes Evol.* **206**, 218-226.
- 4, Tanaka, K. J., Chiba, S. and Nishikata, T. (1996) Two distinct cell types identified in the ascidian embryo. *Zool. Sci.* **13**, 725-730.
- 5, Chiba, S., Miki, Y., Ashida, K., Wada, M. R., Tanaka, K. J., Shibata, Y., Nakamori, R. and Nishikata, T. (1999) Interactions between cytoskeletal components during myoplasm rearrangement in ascidian eggs. *Devl. Growth Differ.* **41**, 265-272.
- 6, Wada, M. R., Murakami, A., Kawamura, H., Nakamori, R., Tanaka, K. J., Nakayama, H., and Nishikata, T. (1999) The expression of the protochodate homologue of the proteasome regulatory subunit Rpn12 is transcriptionally and post-transcriptionally regulated during cleavage stage. *Zool. Sci.* **16**, 125-129.
- 7, Tanaka, K. J., Kawamura, H. and Nishikata, T. (1999) Anterior localization pattern and movement of an mRNA in the 2-cell stage of ascidian embryos. *Devl. Genes Evol.* in press.

学会発表リスト

国際学会

- 1, Wada, M. R., Ohtani, Y., Shibata, Y., Tanaka, K. J. and Nishikata, T.
Molecular cloning of the Y-box protein gene expressed in the ascidian egg.
第13回国際発生生物学会、ポスター発表、
アメリカ合衆国、ユタ州、スノーバード、1997年7月

国内の学会

- 1, 田中仁夫、西方敬人
カタユウレイボヤ胚脊索細胞の細胞系譜を区別するモノクローナル抗体
日本発生生物学会第28回大会、名古屋、1995年5月
- 2, 田中仁夫、小笠原道生、真壁和裕、佐藤矩行
マボヤ鰓嚢特異的遺伝子の単離とその発現
日本動物学会第67回大会、札幌、1996年9月
- 3, 小笠原道生、田中仁夫、真壁和裕、佐藤矩行
マボヤの内柱特異的遺伝子の単離とその発現
日本動物学会第67回大会、札幌、1996年9月
- 4, 加賀敏宏、田中仁夫、西方敬人
カタユウレイボヤ卵内で発現する β -tubulin 遺伝子の単離
日本発生生物学会第30回大会、筑波、1997年5月
- 5, 柴田由美子、大谷善昭、和田倫子、田中仁夫、谷本直美、西方敬人
ホヤ卵内で発現する Y-box protein 遺伝子の単離と発現解析
日本発生生物学会第30回大会、筑波、1997年5月

- 6, 大谷善昭、和田倫子、田中仁夫、柴田由美子、磯田竜司、西方敬人
ホヤ卵内に存在するRNA結合タンパク質の探索と決定因子との関わり
第1回RNA研究若手の会、神戸、1997年8月
- 7, 和田倫子、田中仁夫、柴田由美子、大谷善昭、西方敬人
カタユウレイボヤに存在する3つのY-box protein
日本動物学会第68会大会、ポスター発表、奈良、1997年9月
- 8, 和田倫子、田中仁夫、柴田由美子、大谷善昭、西方敬人
カタユウレイボヤ胚における母性mRNAについて
ホヤの生物学会、むつ、1997年10月
- 9, 田中仁夫、磯田竜司、西方敬人
カタユウレイボヤ卵内に存在する様々なRNA結合タンパクの解析
日本発生生物学会第31回大会、熊本、1998年5月
- 10, 村上明一、磯田竜司、田中仁夫、西方敬人
ホヤ卵内に存在するRNA結合タンパク質の単離と解析(I)
第2回RNA研究若手の会、福岡、1998年7月
- 11, 大谷善昭、田中仁夫、西方敬人
ホヤ卵内に存在するRNA結合タンパク質の単離と解析(II)
第2回RNA研究若手の会、福岡、1998年7月
- 12, 村上明一、田中仁夫、和田倫子、大谷善明、柴田由美子、川村博史、
磯田竜司、西方敬人
カタユウレイボヤ卵内に存在するRNA結合タンパク質
第31回日本分子生物学会年会、横浜、1998年12月

図と表


```

5' ATTCCATCAACAAGCGAGGGAGAACGAGACGAGCGTAAAAATCTATTAACATCCAAGATC 60
TAACATCATGTCGGAGCAGGCCGGGCAGCTCGAACAGGTCACTGAAAATGCCCTGTCGA 120
1 M S E Q A G Q L E Q V T E N A P V E
GAGAAAAGTTCTCGCATCCCATTGCTCTGGAGTTGTCAAGTGGTTTAATGTGAGAAACGG 180
19 R K V L A S H C S G V V K W F N V R N G
TTACGGTTTCGTTAACC GCGACGACAACAAGGAGGACGTGTTCAATCACCAGACCGCCAT 240
39 Y G F V N R D D N K E D V F I H Q T A I
CATCAAAAACAACCCAAAGAAATATCTTCGAAGTGTGGTGATGGAGAAAACGTAGAGTT 300
59 I K N N P K K Y L R S V G D G E N V E F
CGATGTAGTGGAAGGTGAAAAGGGTTTGCTGAAGCTGCAAATGTAACCGGACCGAATGG 360
79 D V V E G E K G L P E A A N V T G P N G
TGAGCCTGTAAAAGGCAGCAAGTATGCTGCTGATAGACGAGATACAAACCACGCTACAA 420
99 E P V K G S K Y A A D R R R Y K P R Y K
ACCAGGACCAAGGAGCATACTCCGGAGGGAAATGAGAACCAAGAGGGTGAGACTGAAAA 480
119 P G P K E H T P E G N E N Q E G E T E N
TGTTAGCCCTGAGGGAATGGCCCGTAATCAGCAGCGTCCACGCCGCTATTACAGAAGACC 540
139 V S P E G M A R N Q Q R P R R Y Y R R P
TTTTTGATCCGAAGGGGGCCTAGAAAACACAGCAGATAAAAGGGGAGGATGGAGAGAA 600
159 F W I R R G P R K P Q Q I K G E D G E N
TGAAAGAGCGGAGGACGGTGATCCGGAGCAAAAACGAGAACAACGAAGAAGACCACGTAA 660
179 E R A E D G D P E Q K P E Q R R R P R K
GCCGAGACCTCGTCGTCCTCGTAGAGAACGGAGGAAGGAGAAGCAAAGGAGAATGGAGT 720
199 P R P R R P R R E P E E G E A K E N G V
GGTTGCTGATCATGTTGAAGGGGAAGATGGCGAACACCTCAACGACAACGTAGACCAAG 780
219 V A D H V E G E D G E Q P Q R Q R R P R
AAAGCCACGTTACCGACCAAAACGGTCCCCACAAGACGGGGAAGCTGAGGTAAATGGTGA 840
239 K P R Y R P K R S P Q D G E A E V N G E
GGTCCCGCATGAGAATGGAGAGGAGGGTGAACAACGGCCAGCTCGTCGCCGACGTCCCG 900
259 V P H E N G E E G E Q R P A R R R R P R
CAACCGCCCGAAGGGACCAAGACGCCCAAAACCCACGGAGAATGAGAACGGCAATGCTGT 960
279 N R P K G P R R P K P T E N E N G N A V
ACCAAATGGACAAGAGAATGCTGATGCACCTGTGCGCAGAGCCAGGTTCCAGTACCAAA 1020
299 P N G Q E N A D A P V A Q S Q V P V P K
ATCAGAGTAAAAAGCGCGATCAGCGCTCGGTGGAGGGGTGGTTGTTTCGTCATATTGTTG 1080
319 S E *
TAGCGTCAGGACAATATCGCTTTTTAAGTTTTCTTGTGTGCATGGCCACCGTCCCTTA 1140
GCTTGCAACCGTAGATTTAGTTAACACCCCAACAGCAGCAAGAACCCTGACCGATAAATA 1200
CTGCTTCTCTAACACCTTCTCGAATTTCTGTAATTTGGTCGACCCTGCGCATGCGGTCGCA 1260
CTGATATCACTGAATGTTTCCACCACGTAATTTTGAAAATTTAAGCTCTAAGCGCATTAA 1320
CATCACAAGCATTTTAAAGCAGCACCTGTGCCTGTAATTCACAGTGCTGATAAAGGTAA 1380
CATCTAGTTTATGAAGTAAATTCTGTGTCTGAGACGTTTACCACGGGCCTGTCTCTGCA 1440
CACGGACCACAATAAAAGGCCCTTTAACGAGTTATACTTGAATAAGCGTCCACAGAACGC 1500
CCCTCGCCCGAAATTTTCATCGTTGGTTGTTGTTGTTGGGTTAATATTTAGTTCTCATCT 1560
GATACATTTAGTTGTTTACACCAAAACGATAACGTGGCGTTGATTCCGGCCGGGAACACC 1620
AAAACGTTACTCGTTATCAACTCCACTTGATTGTGCTGTTGTAACGAGTGCGTTTGCAA 1680
TCAATATTGCTGTTTTCTTTGCTGCTTGTTGAGTTTAATTTAGTTCACTGTAAATTA 1740
ATTCGGTTGTTCCAGCCAAAATAAACCATACCATTTCAAAAAAAAAA 3' 1788

```

Fig. 4.1.1 *CiYBI* cDNAの塩基配列と予想アミノ酸配列

CiYBI cDNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列を記した。網掛けの領域は、CSDである。全長1788 bpで320 aaをコードしていた。アスタリスクは終止コドンを示す。


```

5'  ATTCCATCAACAAGCGAGGGAGAACGAGACGAGCGTAAAAATCTATTAACATCCAAGATC  60
    TAACATCATGTCTGGAGCAGGCCGGGCAGCTCGAACAGGTCACTGAAAATGCCCTGTCTGA  120
1   M S E Q A G Q L E Q V T E N A P V E
    GAGAAAAGTTCTCGCATCCCATTGCTCTGGAGTTGTCAAGTGGTTTAATGTGAGAAACGG  180
19  R K V L A S H C S G V V K W F N V R N G
    TTACGGTTTTCGTTAACCGCGACGACAACAAGGAGGACGTGTTTCATTACCAGACCGCCAT  240
39  Y G F V N R D D N K E D V F I H Q T A I
    CATCAAAAACAACCCAAAGAAATATCTTCGAAGTGTTGGTGATGGAGAAAACGTAGAGTT  300
59  I K N N P K K Y L R S V G D G E N V E F
    CGATGTAGTGGAAGGTGAAAAGGGTTTGCCTGAAGCTGCAAATGTAACCGGACCGAATGG  360
79  D V V E G E K G L P E A A N V T G P N G
    TGAGCCTGTAAAAGGCAGCAAGTATGCTGCTGATAGACGAGATACAAACCACGCTACAA  420
99  E P V K G S K Y A A D R R R Y K P R Y K
    ACCAGGACCCAAGGAGCATACTCCGGAGGGAAATGAGAACCAAGAGGGTGAGACTGAAAA  480
119 P G P K E H T P E G N E N Q E G E T E N
    TGTTAGCCCTGAGGGAATGGCCCGTAATCAGCAGCGTCCACGCCGCTATTACAGAAGACC  540
139 V S P E G M A R N Q Q R P R R Y Y R R P
    TTTTGGATCCGAAGGGGGCCTAGAAAACCACAGCAGATAAAAGGGGAGGATGGAGAGAA  600
159 F W I R R G P R K P Q Q I K G E D G E N
    TGAAAGAGCGGAGGACGGTGATCCGGAGCAAAAACCAGAACAACGAAGAAGACCACGTAA  660
179 E R A E D G D P E Q K P E Q R R R P R K
    GCCGAGACCTCGTCGTCCTCGTAGAGAACCGGAGGAAGGAGAAGCAAAGGAGAATGGAGT  720
199 P R P R R P R R E P E E G E A K E N G V
    GGTTGCTGATCATGTTGAAGGGGAAGATGGCGAACCACTCAACGACAACGTAGACCAAG  780
219 V A D H V E G E D G E Q P Q R Q R R P R
    AAAGCCACGTTACCGACCAAAACGTAAGCTAACTCCTACACAGAAAAATGAAGTCGAAA  840
239 K P R Y R P K R *
    TACACTGATTTTAGAATGTACTAAATGTTTGTGGAGCGTTAAACGGCAGTTAGATTAT  900
    GGAATGTTTATTGTACCATTTTTGCAAGTGATATAAGTTCTTTAACTCTGAATCTCTG  960
    CAACCTGCAAGAAATGGGTTGAAATGTCGTTCAAAGGTATGTGTATATGAAGGGCGAAGG  1020
    CACTTCATATATATCTTTCAAATACGATGTTAACTGTTTTTGCCTTGAGTGACACTGACA  1080
    TGCCCTAAACTGATGTTCCAGCAAATTTGTATTTCTTACAAATGTTTGATGCCTTATAG  1140
    TTTGCCCTGATAAATACGATCTGTATATGTATACTATATGCGACATAGAAATGTTTGT  1200
    TCAACTTTTCACCACCATATTTTACATTTGTTTTAAATGTATATTTGTGTAAAGGTCCCC  1260
    ATGATACGTATATTGTATATACGATGTACAAAAATGTTTAAGAACCGAATAAATTTGCGA  1320
    CAACAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  3'

```

Fig. 4.1.2 *CiYB2* cDNAの塩基配列と予想アミノ酸配列

CiYB2 cDNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列を記した。網掛けの領域は、CSDである。全長1346 bpで246 aaをコードしていた。アスタリスクは終止コドンを示す。


```

5' ATTCCATCAACAAGCGAGGGAGAACGAGACGAGCGTAAAAATCTATTAACATCCAAGATC 60
TAACATCATGTCCGAGCAGGCCGGGCAGCTCGAACAGGTCAGTAAAAATGCCCTGTCTGA 120
1 M S E Q A G Q L E Q V T E N A P V E
GAGAAAAGTTCTCGCATCCCATTGCTCTGGAGTTGTCAAGTGGTTTAATGTGAGAAACGG 180
19 R K V L A S H C S G V V K W F N V R N G
TTACGGTTTCGTTAACC GCGACGACAACAAGGAGGACGTGTT CATT CACCAGACCGCCAT 240
39 Y G F V N R D D N K E D V F I H Q T A I
CATCAAAAACAACCCAAAGAAATATCTTCGAAGTGTTGGTGATGGAGAAAACGTAGAGTT 300
59 I K N N P K K Y L R S V G D G E N V E F
CGATGTAGTGGAAGGTGAAAAGGGTTTGCCTGAAGCTGCAATGTAACCGGACCGAATGG 360
79 D V V E G E K G L P E A A N V T G P N G
TGAGCTGTAAAAGGCAGCAAGTATGCTGCTGATAGACGCAGATACAAACCACGCTACAA 420
99 E P V K G S K Y A A D R R R Y K P R Y K
ACCAGGACCCAAGGAGGTATTTGATTATGCGACCTAAATATTCTATTCTGAGCTACTACA 480
119 P G P K E V F D Y A T *
TGTAATGGTATTAATACTCAATCGAATATATTCTCAATATATT CAGTGCTAGCAATA 540
CTATTTCTATAGGGCTCTATGGCTTAGCTTACATAGCAGCCTATTTAGTTTACCATTTTA 600
ACAATATCAGTTATCATTTGCATGTAGTATGATAAGTTATCAGGTTTTATTGCAAAAAC 660
CATGCGTGCAACCATTTAATATTTTCTGTCAACTGAAAAAAGGATAAGTTATCACTGTT 720
GTCATGTTTTTGGTGAATGGCATTAAAGACTTGAATATTCGGCAAAAAAAAAAAAAA 3' 777

```

Fig. 4.1.3 *CiYB3* cDNAの塩基配列と予想アミノ酸配列

CiYB3 cDNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列を記した。網掛けの領域は、CSDである。全長777 bpで129 aaをコードしていた。アスタリスクは終止コドンを示す。

CiYB1	1:M-SE-OA--GQLE--QV-----TENAP--VE-----R-----KVLASHCS	27
YB-1	1:MSSEAETQQPPAAPPAPALSAADTKPGTTGSGAGSGGPGGLTSAAPAGGDKKVIATKVL	60
MSY-1	1:MSSEAETQQPPAA-PAA-ALSAADTKPGSTASGAGSGGPGGLTSAAPAGGDKKVIATKVL	58
FRGY1	1:-----MS-SEVETQQQPDPA-LEGKAG-QEPAATVGDKKVIATKVL	38
FRGY2	1:M-SEAEA--QEPE--PVP-----QPESEP-EIQKPGI-AAARNQANKKVLATQVQ	43
CiYB1	28:GVVWVFNVRNGYGFVNRDDNKEDVFIHQTAIKNNPKKYLRSVGDGENVEFDVVEGEKGL	87
YB-1	61:GTVKWFNVRNGYGFVNRDDNKEDVFIHQTAIKNNPKKYLRSVGDGETVEFDVVEGEKGL	119
MSY-1	59:GTVKWFNVRNGYGFVNRDDNKEDVFIHQTAIKNNPKKYLRSVGDGETVEFDVVEGEKGL	117
FRGY1	39:GTVKWFNVRNGYGFVNRDDNKEDVFIHQTAIKNNPKKYLRSVGDGETVEFDVVEGEKGL	97
FRGY2	44:GTVKWFNVRNGYGFVNRDDNKEDVFIHQTAIKNNPKKFLRSVGDGETVEFDVVEGEKGL	102
CiYB1	88:PEAANVTGPNGEVVKGSKYAADRRRYKPR-YKP--G-PKEHTPEG-N-EN-QEGE-TENV	139
YB-1	120:EEAANVTGPGGVPVQGSKYAADRNH-YRR-YPRRRGPPRNYQQNYQNSGESGEKNEGSE-S	176
MSY-1	118:AEAANVTGPGGVPVQGSKYAADRNH-YRR-YPRRRGPPRNYQQNYQNSGESGEKNEGSE-S	174
FRGY1	98:AEAANVTGPEGVPVQGSKYAADRNH-YRR-YPRRRGPPRNYQQNYQNSGESGEKAEENE-S	154
FRGY2	103:AEAANVTGPGGVPVKGSRFAPNRRRFRRRFYRPRADTAGESGGEGVSPEQMSEGERGEET	162
CiYB1	140:SPGEMARNQORRRYYR-RPFWIRRGPRKPOQIKGEDGENERAEDGDP-EQKPEORRRPR	197
YB-1	177:APEG-QAQQRRPYRRRFPPYMRPYGRRPQYSNPPVQGEVMEGADNQGAGEQGRPVQR	235
MSY-1	175:APEG-QAQQRRPYRRRFPPYMRPYARRPQYSNPPVQGEVMEGADNQGAGEQGRPVQR	233
FRGY1	155:APEGDDSNQORPYHRRRFPPYMRPYGRRPQYSNAPVQGEAEAGADSQGTDEQGRPARQ	214
FRGY2	163:SPQQRPPRRRPPFFYR-RRF--RRGPRPNQONQGAEVTEQSENKDPVAPTSEALASGD	219
CiYB1	198:KP-RPRRPR-REPEEGEAKENGVVADHVEGEDGE-QPORRRPRKPRYRPKRSPQDGEAE	254
YB-1	236:NMYRGYRPRFRRGPPRQRPREDGNEEDKENQGD-ETOGQPPQRRYRRNFNYRRRRPEN	294
MSY-1	234:NMYRGYRPRFRRGPPRQRPREDGNEEDKENQGD-ETOGQPPQRRYRRNFNYRRRRPEN	292
FRGY1	215:NMYRGFRPRFRRGPPRQRPREEGNEEDKENQGD-ETOSQPPQRRYRRNFNYRRRRPEN	273
FRGY2	220:DPQRPPRRFRQRRFRPRPRPAPQQTPEGGDGETKAESGEDPRPEPQRQRNRPYVQRRR	279
CiYB1	255:VNGEVPHENGEEGEORPARRRRPRNRPKGPRRPKPTENENGNAVPNGOENADAPVAQSQV	314
YB-1	295:PK-PQDGKETKAADPPAENSRSRG-----	317
MSY-1	293:PK-PQDGKETKAADPPAENSAPAEQGGAE-----	322
FRGY1	274:PK-SQDGKETKAAETSAENTSTPEAEQGGAE-----	303
FRGY2	280:ROGATQVAATAQGEKGAEPQTQHP-ASEEGTPSDSPTD-D-G-A-P-VQSSAPDP-GIADT	332
CiYB1	315:PVPKSE	320
YB-1	318:-----	
MSY-1	323:-----	
FRGY1	304:-----	
FRGY2	333:PAPE--	336

Fig. 4.1.4 Y-boxタンパク質のアミノ酸配列の比較

CiYB1の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、ヒト、マウス、アフリカツメガエルのY-boxタンパク質と比較した。CSDの部分では保存性が高く、約80%のアミノ酸が同一であった。CSDより下流のTDでは、アミノ酸配列全体での相同性は約40%と低くなるが、塩基性アミノ酸領域においてアルギニンを中心によく保存されていた。

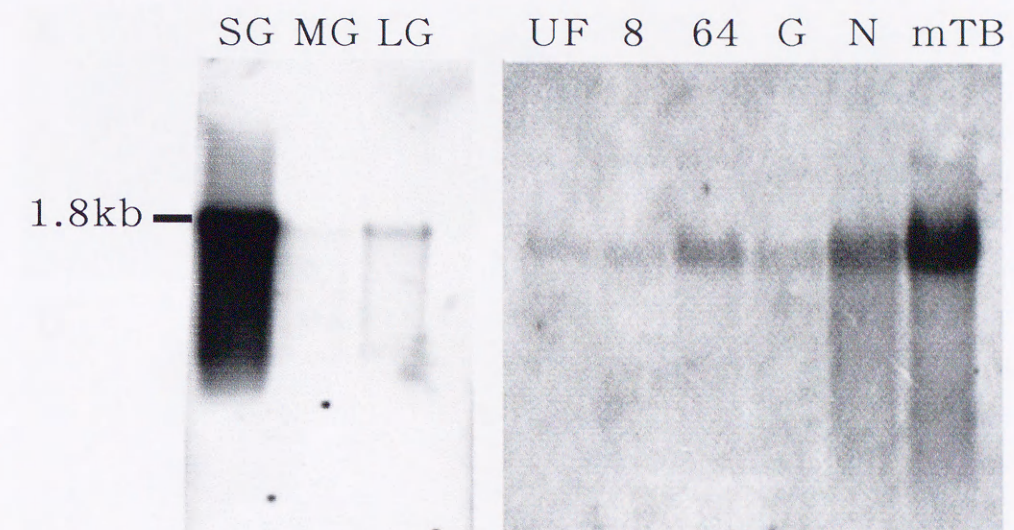


Fig. 4.1.5 *CiYB1* mRNAのノザンハイブリダイゼーションによる時間的発現

CiYB1 mRNAの発現時期を調べるために、ノザンハイブリダイゼーションを行った。レーン左から、未成熟な卵巣(SG)、成熟途中の卵巣(MG)、成熟した卵巣(LG)、未受精卵(UF)、8細胞期胚(8)、64細胞期胚(64)、のう胚(G)、神経胚(N)、中期尾芽胚(mTB)の各ステージから抽出したポリ(A)+RNAをプロットしてある。未成熟な卵巣と中期尾芽胚において1.8 kbのシングルバンドが検出される。

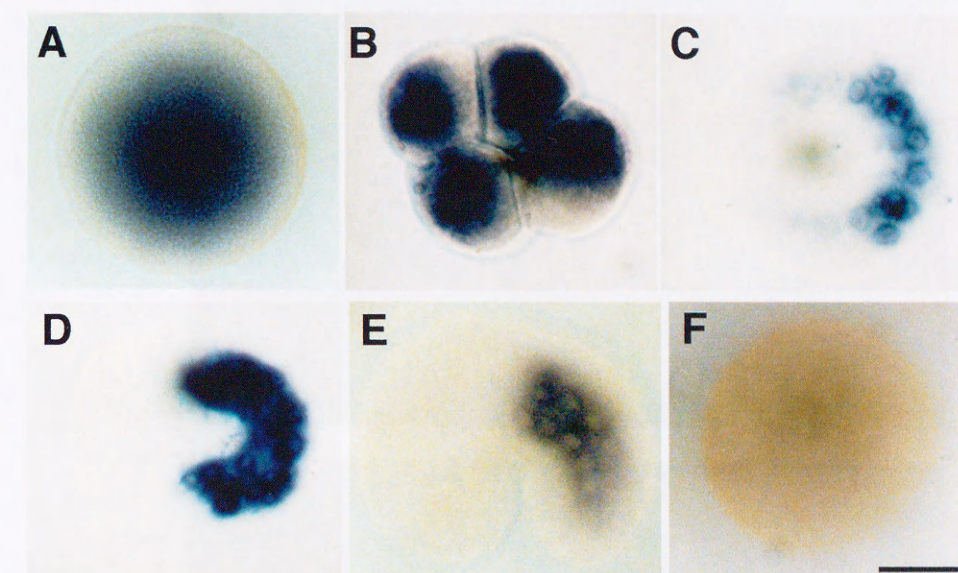


Fig. 4.1.6 *CiYB* 1mRNAの空間的発現

CiYB 1mRNAのホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによる結果を示す。未受精卵(A)、8細胞期胚(B)では、細胞質全体でシグナルが見られた。サイゴティックな *CiYB* 1mRNAの発現は、のう胚期(C)から予定筋肉細胞で見られる。神経胚期(D)では予定筋肉細胞のみに強いシグナルが見られ、初期尾芽胚期(E)でも予定筋肉細胞にのみシグナルが見られる。未受精卵をセンスプローブで検出してもシグナルは見られなかった(F)。スケールバーは50 μ m。B-Eは、胚の前側を左に揃えている。

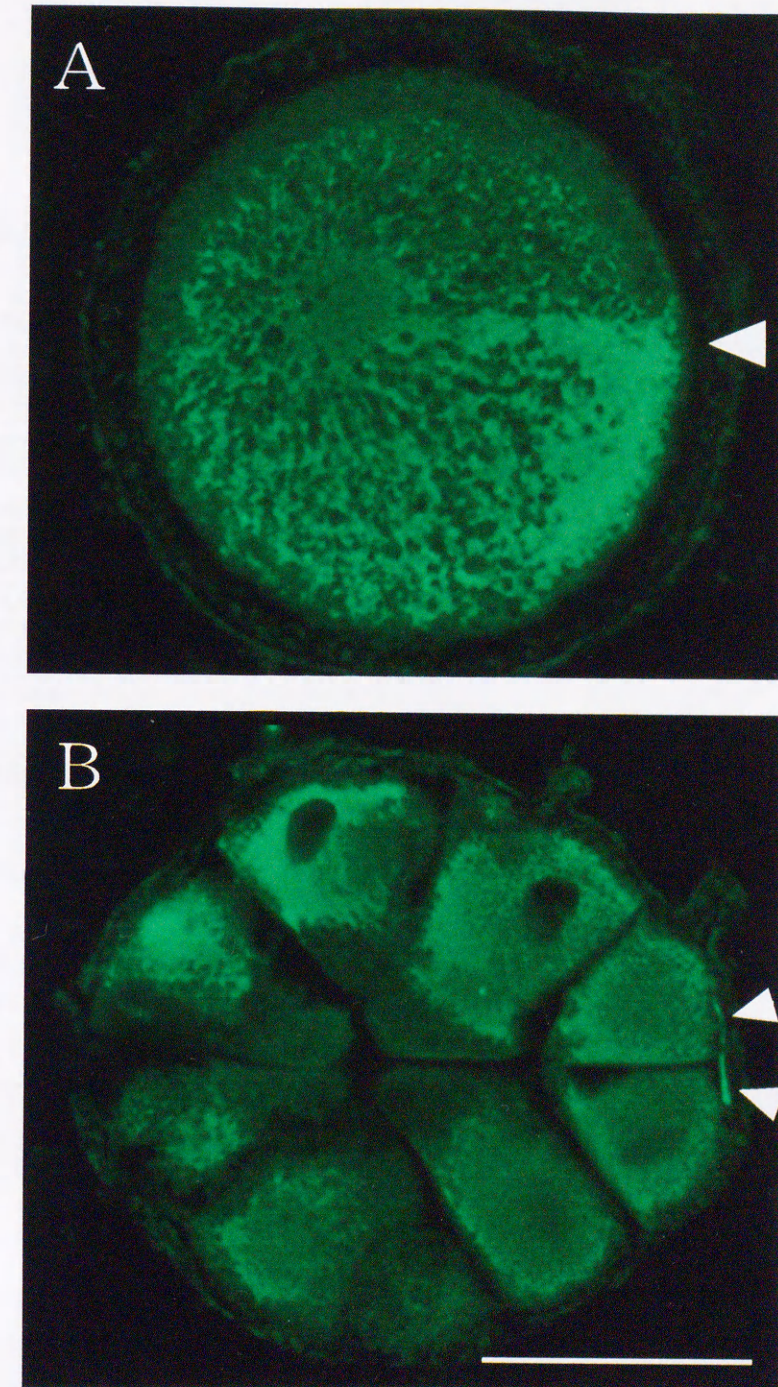


Fig. 4.1.7 CiYB1モノクローナル抗体による蛍光染色

(A) カタユレイボヤ受精卵(2回目の細胞質再配置時)の正中断面の染色像。CiYB1タンパク質の発現はマイオプラズムの位置と一致する(矢尻)。右が胚の後極側、下が胚の植物極側である。(B) 16細胞期胚植物半球の水平断面の染色像。細胞質全体の染色に加えて、後極に存在するCABが強く染色される(矢尻)。右が胚の後極側である。スケールバーは50 μm 。

1	GTTTTTCAAATTAACAAAACATGGCAAATTGTAAAGTTTTTGTGGTAATCTATCGTAC	60
1	M A N C K V F V G N L S Y	13
61	AATGCTACTGAAGATGACTTGAGGAAACATTTTCAGTGAAGCGgCAAGTTGAAGAAGTC	120
14	N A T E D D L R K H F S G S G Q V E E V	33
121	GCCATAATTTGTGATCGTGAAAcTGGCCGGTCCCGTGGTTTTGCTTTTGTACGTTTTCC	180
34	A I I C D R E T G R S R G F A F V T F S	53
181	TCTGAAGGAGAAGCTAATGACGCCATTGAAAATTTAAACGAGTCCGATGTAGCTGGACGT	240
54	S E G E A N D A I E N L N E S D V A G R	73
241	AATGTCTCCGTGAGGCAAGCGCAATCAAAACGTGATGGTGGCGGCGGAGGTCGTGGAGGT	300
74	N V S V R Q A Q S K R D G G G G G R G G	93
301	GGAGGTTATGGGGCGGTGGCTACGGAGGTGGCGGCGGCGGTGGCTACGGAGGTGGTGGT	360
94	G G Y G G G G Y G G G G G Y G G G G	113
361	GGCGGCGGAGGTAGATACGGCGGCAGTAGTGGTTATGGAGGCGGTGGCCGAAGATACAAT	420
114	G G G G R Y G G S S G Y G G G G R R Y N	133
421	GATGACCGCGGCAGTTATGGAGGAGGTGACTATGGTGGCGGACGAAGTGGagGCGGAGGA	480
134	D D R G S Y G G G D Y G G G R S G G G G	153
481	AGAAGTGACCGATATTAAACAGATCCTGGCTGAGAGTTATGATCTGCCAACATGCAGCAA	540
154	R S D R Y *	158
541	CTACCTGCTGTGTTTGAACATTTTCTAACATGCTCCGCTCCCAGTTAATCTGGAATCGAT	600
601	TTTATTCTTTCATCGAATAAACTACAAATGTACATAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	660
661	AAAAAA	667

Fig. 4.2.1 *CiGRP1* cDNAの塩基配列と予想アミノ酸配列

*CiGRP1*の塩基配列を上段に、そこから予想されるアミノ酸配列を下段に記した。
cDNAの全長は667 bpで158 aaをコードしていると予想された。網掛けの領域はRRM
を、下線はグリシンに富む領域を、アスタリスクは終止コドンを示す。

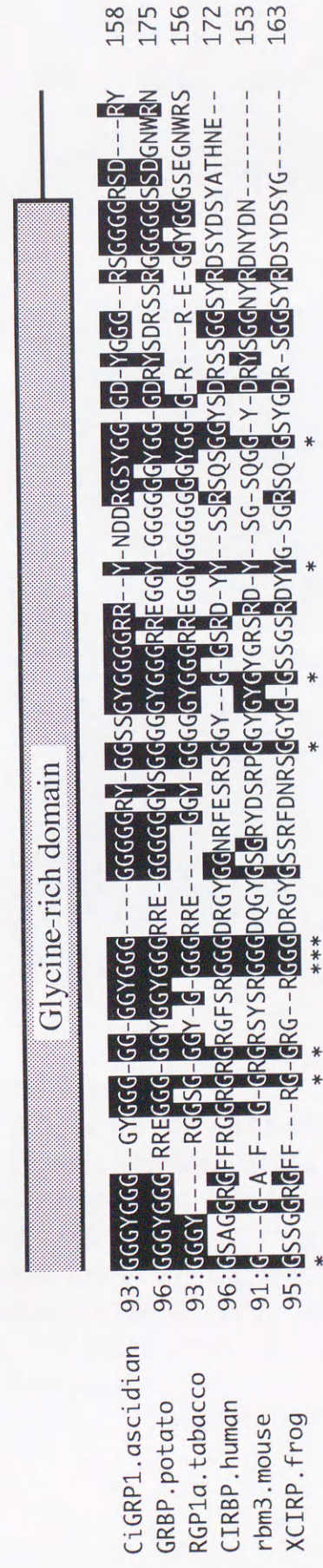
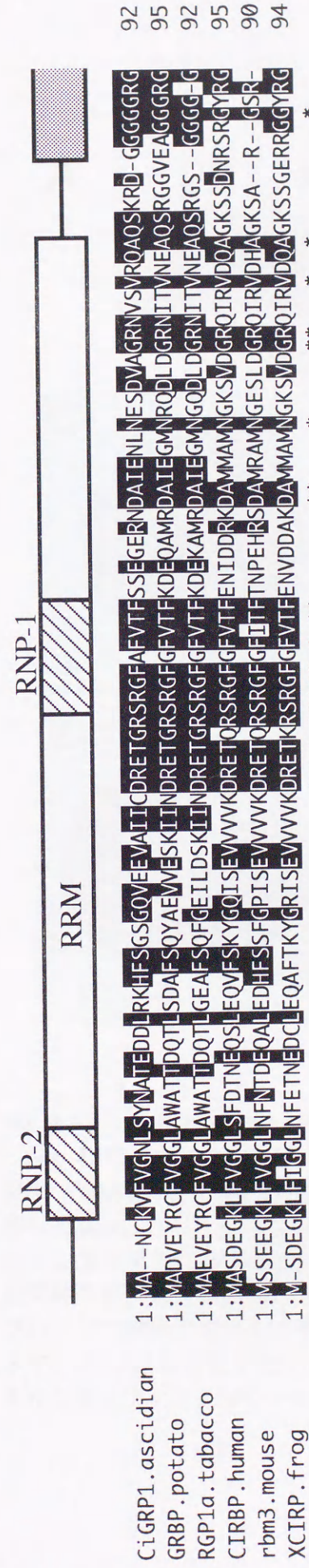


Fig. 4.2.2 glycine-rich RNA-binding proteinの構造とアミノ酸配列の比較
*CiGRP1*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列はN末側に1つのRRRMを、C末側にグリシンに富む領域(glycine-rich domain)を含んでいた。*CiGRP1*タンパク質のアミノ酸配列を既知のボテト(GRBP)、タバコ(RGP1a)、ヒト(CIRBP)、マウス(rbm3)、カエル(XCIRP)のglycine-rich proteinと比較した。*CiGRP1*タンパク質と相同なアミノ酸を網掛けで、6分子すべてに共通なアミノ酸をアスタリスクで示した。配列を最もよく一致させるために挿入したギャップはダッシュで示した。

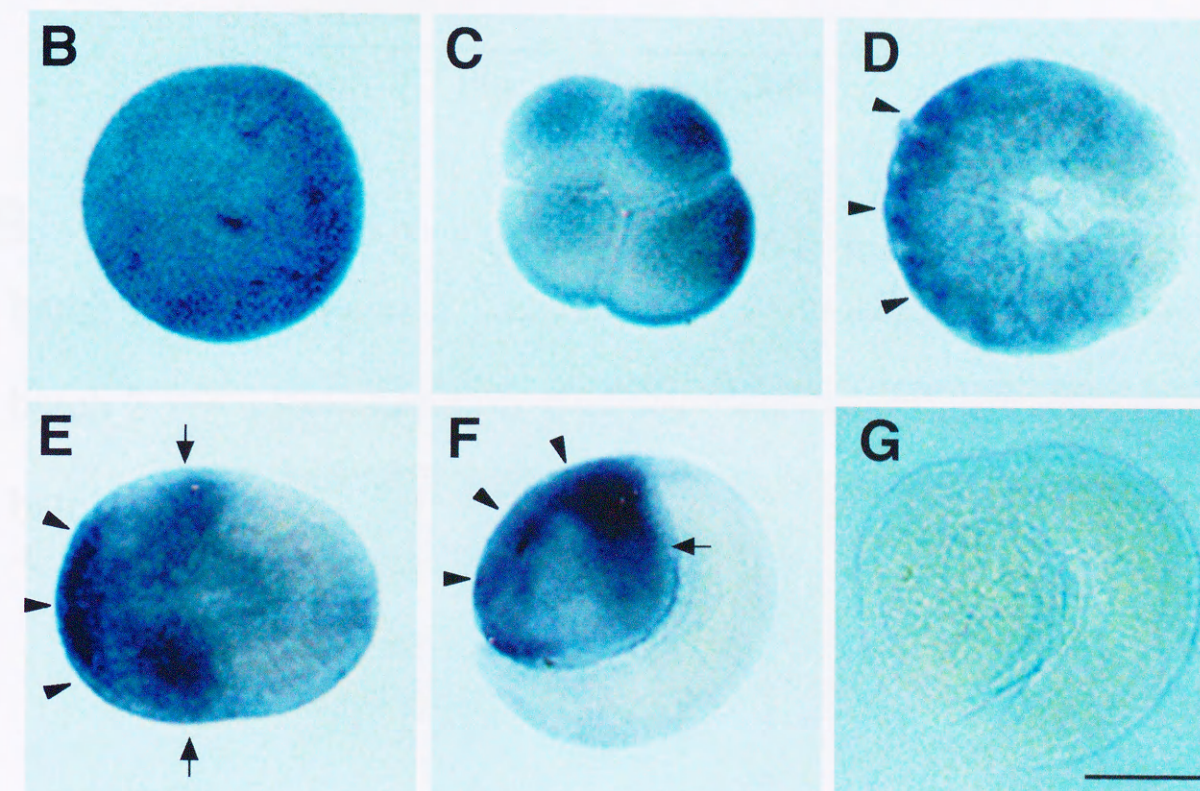
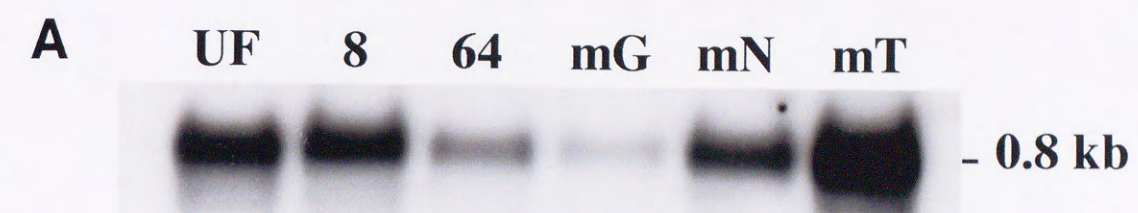


Fig. 4.2.3 *CiGRP1* mRNAの時間的空間的発現

(A) ノザンハイブリダイゼーションによる*CiGRP1* mRNAの時間的発現。未受精卵(UF)、8細胞期胚(8)、64細胞期胚(64)、中期のう胚(mG)、中期神経胚(mN)、中期尾芽胚(mT)の各ステージから抽出した10 μ gのポリ(A)+RNAをプロットしてある。*CiGRP1* mRNAは約0.8 kbの位置にシングルバンドとして検出される。(B-G) ホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションによる*CiGRP1* mRNAの空間的発現。未受精卵(B)、8細胞期胚(C)、のう胚(D)、神経胚(E)、中期尾芽胚(F)をアンチセンスプローブで検出している。予定脳胞細胞と脳胞を矢尻で、予定間充細胞と間充細胞を矢印で示す。(G)中期尾芽胚をセンスプローブで検出しても、シグナルは検出されない。C-Eは胚の前側を左に揃えている。スケールバーは50 μ m。

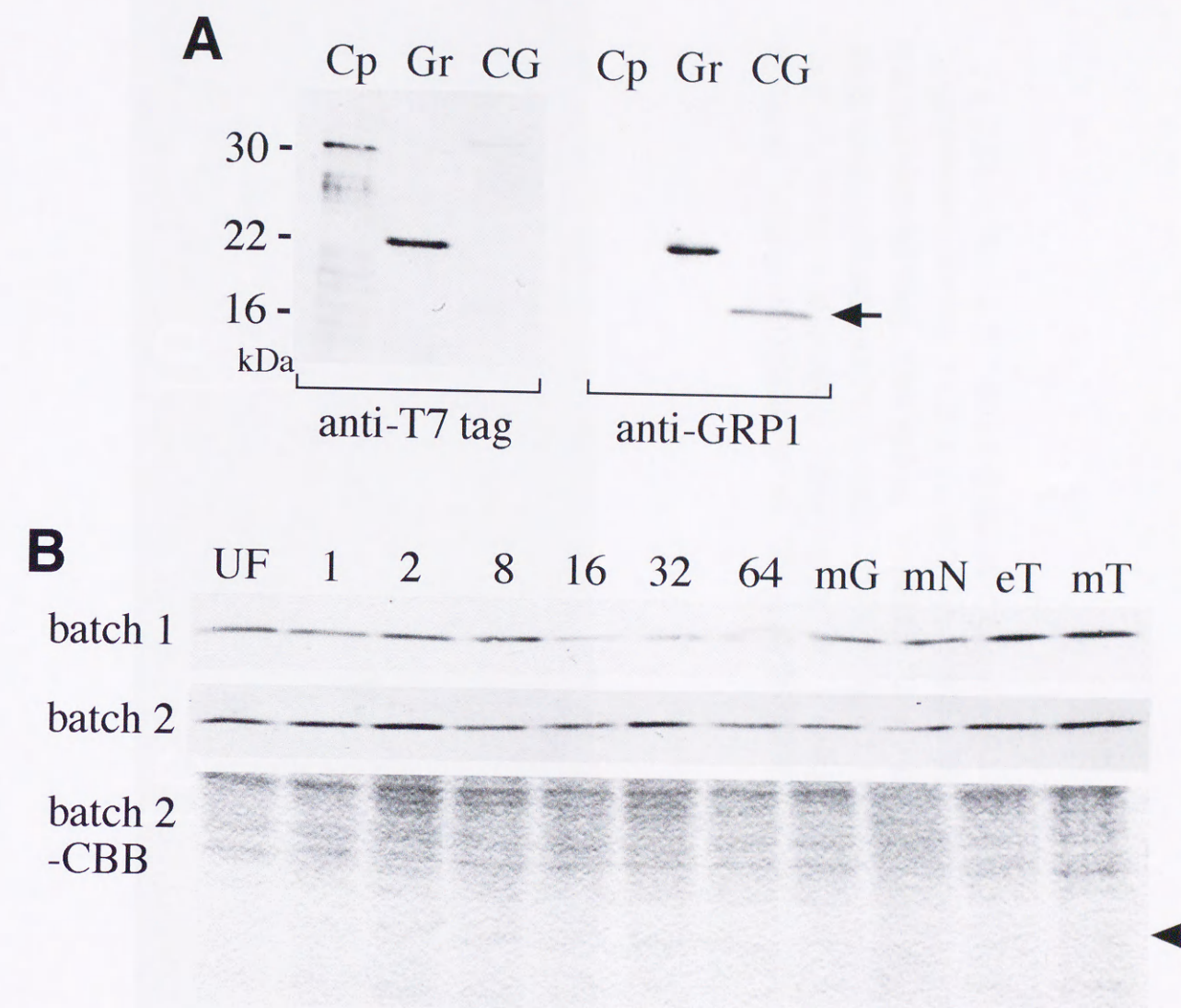


Fig. 4.2.4 抗CiGRP1精製抗体を用いたウエスタンブロット解析

(A) ウエスタンブロット解析による抗CiGRP1精製抗体の確認。各レーンにはそれぞれCipros1融合タンパク質(Cp)、CiGRP1融合タンパク質(Gr)、カタユレイボヤ卵巣総タンパク質(CG)をブロットし、抗T7-tag抗体と抗CiGRP1精製抗体により検出した。抗CiGRP1精製抗体は、CiGRP融合タンパク質と卵巣の約16 kDaのバンドを検出した(矢印)。(B) 抗CiGRP1精製抗体を用いたウエスタンブロット解析によるCiGRP1タンパク質の時間的発現。未受精卵(UF)、受精卵(1)、2細胞期胚(2)、8細胞期胚(8)、16細胞期胚(16)、32細胞期胚(32)、64細胞期胚(64)、中期のう胚(mG)、中期神経胚(mN)、初期尾芽胚(eT)、中期尾芽胚(mT)のそれぞれ50個の胚の総タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ブロットを行った。2つのバッチをそれぞれ独立に解析した。下段にバッチ2のクーマシー・ブリリアント・ブルー(CBB)染色像を示す。矢印は、CiGRP1タンパク質の検出される位置を示す。

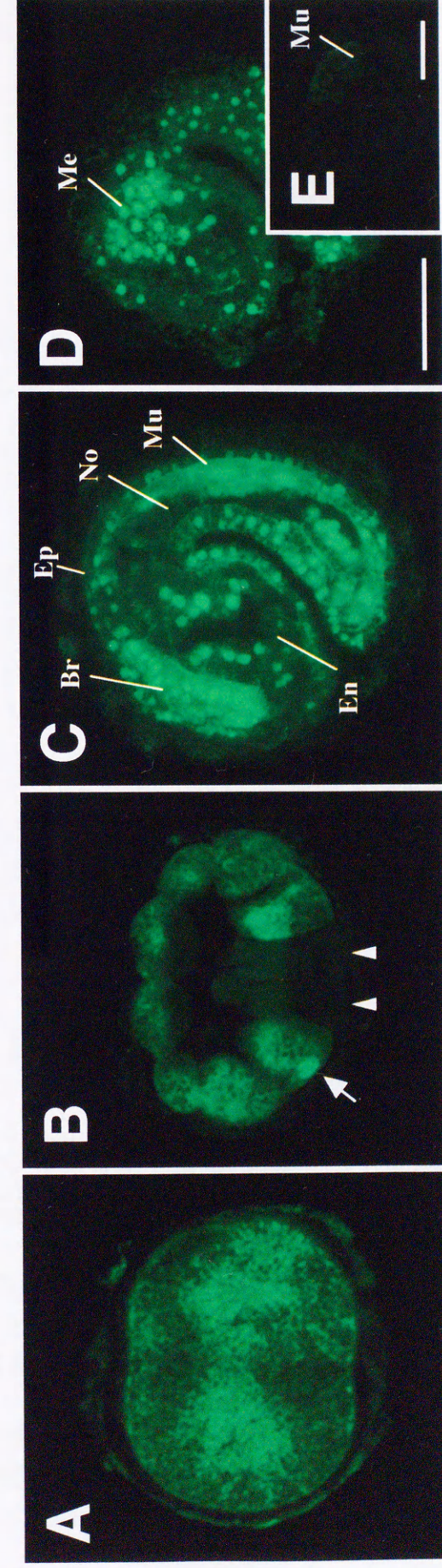


Fig. 4.2.5 CiGRP1タンパク質の空間的発現

抗CiGRP1精製抗体を用いて、カタユウレイボヤ切片の免疫組織染色を行った。(A) 第1卵割直前の受精卵。核周辺部と細胞質全体に染色が見られる。(B) のう胚。上側が動物極側である。核(矢印)と割球の外側の位置する核の周辺部に染色が見られる。予定内胚葉割球の細胞質はほとんど染色されていない(矢尻)。(C-D) それぞれ中期尾芽胚の正中断面および矢状断面で、左側が前側である。すべての核で染色が見られる。脳胞(Br)、間充質(Me)、筋肉(Mu)細胞の細胞質で強い染色が見られるが、表皮(Ep)、脊索(No)、内胚葉(En)細胞では弱い染色しか見られない。(E) non-immune抗体で中期尾芽胚を染色したもの。筋肉細胞(Mu)の細胞質に染色のバックグラウンドが観察される。スケールバーはどちらも 50 μm 。

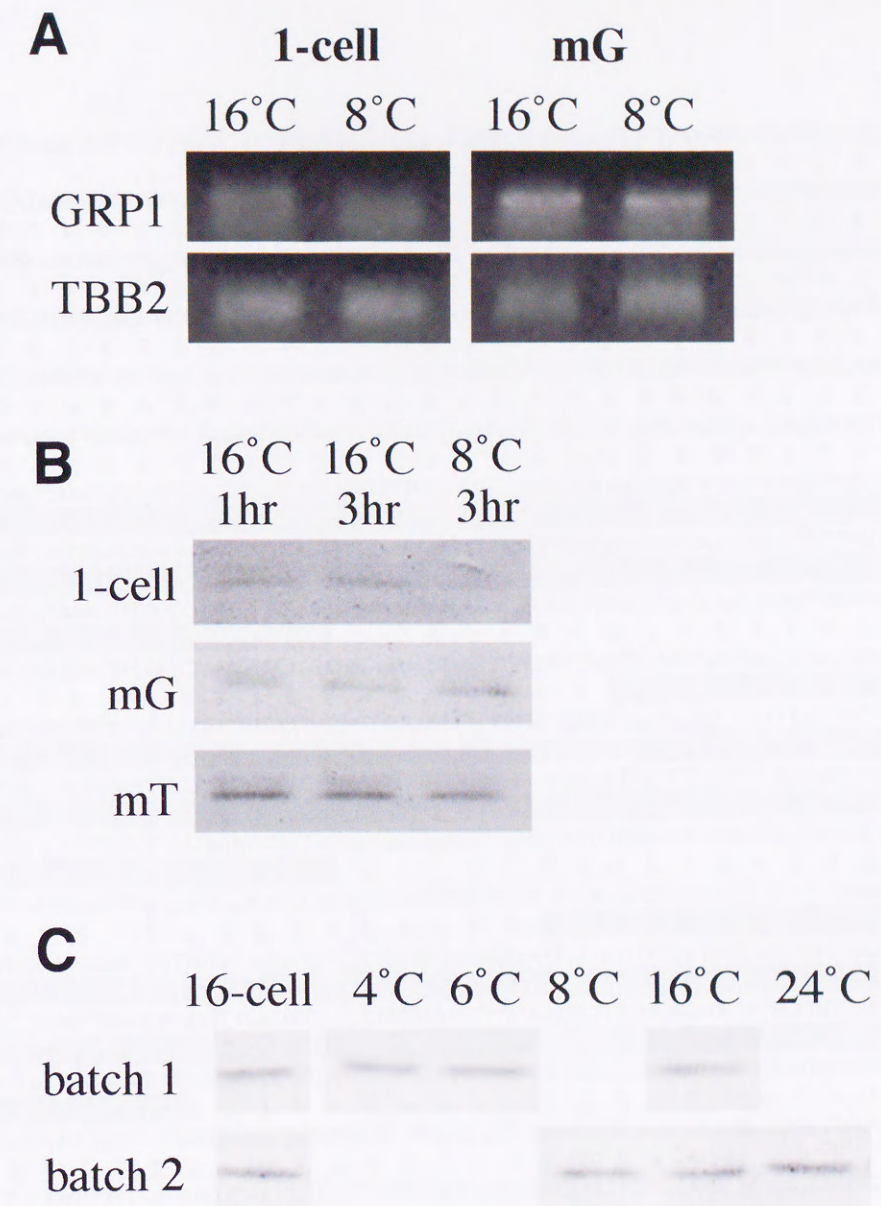


Fig. 4.2.6 *CiGRP1* mRNAと*CiGRP1*タンパク質は温度ショックによって誘導されない。
 (A) コールドショック後の*CiGRP1* mRNA量を定量的RT-PCRにより比較した。受精直後(1-cell)と中期のう胚期(mG)に、3時間コールドショックを与えた胚(8°C)と、与えなかった胚(16°C)からそれぞれRNAを抽出し、*CiGRP1*特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。*CiTBB2*は定量性の対照として増幅した。(B) ウェスタンブロッティングにより、コールドショック後の*CiGRP1*タンパク質量を比較した。受精直後(1-cell)、中期のう胚期(mG)と中期尾芽胚期(mT)に、3時間コールドショックを与えた胚(8°C 3hr)と、与えなかった胚(16°C 3hr)と1時間16°Cで育てた胚(16°C 1hr)の50個の総タンパク質をプロットし、抗*CiGRP1*精製抗体を用いて検出した。(C) ウェスタンブロッティングにより、様々な温度ショックを与えることによる*CiGRP1*タンパク質の増減を検証した。バッチ1では16細胞期から、6時間のコールドショックを与えた胚(4°C, 6°C)、与えなかった胚(16°C)を、バッチ2では16細胞期から、3時間のコールドショック(8°C)とヒートショック(24°C)を与えた胚、与えなかった胚(16°C)を(B)と同様にして検出した。


```

1  GATAATATTTAAATTTTCTGGTTGGTTCTTCTGATTTATTCAAACAAAACAATGGTTCAACTGAAGAAAAATCAAAGAGTGATAAA 90
1  M V Q L K K K S K S D K 12
91  ACATCAGTGATAAAACAGTGAAGTAACAAAGGCTAAAAAGAGAACGTTGAAATGAAAAGGGAAAGAAAAGCAAAAAGTTGCCGCC 180
13  T S V I K P V K V T K A K K E N V E M K K G K K S K K V A A 42
181  GAACCTGAAGCAACAAACGAagAAATGAATTACTGAAGCAAGAAGTTGAGAATGAGGAAAATGATGAAAAAGTTGAAAACTGAAGAC 270
43  E P E A T N E E N E L L K Q E V E N E E N D E K V V K T E D 72
271  TCCGATGATGAGCAAGAGGAAAGTGCAGTGAAGTTCTGATGATGACGATTGCGAAGAAGAAGAAAAAGTAAAGCCAAAAGTAGCAAAG 360
73  S D D E Q E E S A D E S S D D D D S E E E E K V K P K V A K 102
361  AAAGAAAGTAAAGTAAGGCTAAAAAGTTGTCAAAGAAAGTATGAAGAATCTGATGATGATGATGATTCTGAGGAAGAAGAAGAT 450
103  K E S K S K A K K V V K E S D E E S D D D D D S E E E E D 132
451  GATGAGAAAGAGGATGAGAGTATGAGGAGAGTGAAGATGAAGATGAAGACGACGATGATGATGATGATGAGGAAAATGAGGAAGAG 540
133  D E K E D E S D E E S E D E D E D D D D D D E E N E E E 162
541  GTGAAGTTAGTCAAGCGGAAAGCAACTGAACTGAAGAAGTTCGACGAAAGTCAAACTTGATCCATCAGAAGTTGCCACCTTACTT 630
163  V K L V K R K A T E T E E V A T K K V K L D P S E V A T L L 192
631  TTCCTGAGCTACAGAGGGACTGAATGACGCAgtTTTCAACAAATTTTAAAAAGtAgAGAAATTAATGCGTTGCTTGCCTGCGCAAC 720
193  F T E L P E G L N D A V F N K F L K S K E I K C V A C R A N 222
721  TATGGAAGACAGAAAGCTTACGTTGATGTTGCGGCTGAAGATAAAGATGCGGCTCTTCAGCTCCACCAAGTGAAGTGAAGGGACAAGAG 810
223  Y G R Q K A Y V D V R A E D K D A A L Q L H Q V E W K G Q E 252
811  ATTCAAGTAACAGAAGCTCAATCTAAGCACAGGATAGAAAAGTGATTTGCATCAAAACGAAACGATAAAGATGAAAGAACAATTGTTT 900
253  I Q V T E A Q S K A Q D R K G D F A S N R N D K D E R T L F 282
901  GTGAAAAATCTTCCGTACAGTGCAGGATGAGAATGCGATCGCCGAGCTCTTGTATGGGGTAAAGAAGTTCGTTTACTTAAGTACAGGGAA 990
283  V K N L P Y S A D E N A I A E L F D G V K E V R L L T D R E 312
991  AGTGAAGACCTAAAGGAATGGCATTCAATTGAGTTTGATTCAACTGCTGAAAAAGAAACGGCTTTTGGTTTGAAGATGAGCTGGAGATG 1080
313  S G R P K G M A F I E F D S T A E K E T A F G L K D E L E M 342
1081  GACGGAAGATCTTTGTATCTTGATAATGTTACTGGTGGTGGTGGTGGTGAAGAGGTCGTGTAATCGAGGTGAAGAGGAGGGTTTGGC 1170
343  D G R S L Y L D N V T G G G G G G R G R G N R G G R G G F G 372
1171  CGTGGAGGCGGTGGATTTGGTGTGGGAGAGGCAGAGGGGGAAGAGGTCCATCTGCACCGAGCAAAACACTTTTGTGAAAGGAATCACA 1260
373  R G G G G F G A G R G R G G R G P S A P S K T L F V K G I T 402
1261  GAGGACATGACACGAGATCTTTGTATGAAACCTTCTCTGGTGCAACAGACATTCTGATTTCCCGAGGATCGAGACACTGGAAAAATAAA 1350
403  E D M T R D T L Y E T F S G A T D I R I P Q D R D T G K N K 432
1351  TTCTTTGCTTATGTTGAATATCAATCTGAGAGCTCGGCAACAGAAGTTTATAAAAGTTCGAAAGGAGGTATGCATGTTGATGGAGTAGA 1440
433  F F A Y V E Y Q S E S S A T E V Y K S S K G G M H V D G S R 462
1441  TTGACCATCGATTatgAGCGGAACGCAGCAATGATGGTGGTGGTGGTGGAGGTGGACGAGGAGGTCGTGGTGGTGGATTTCTGGAGGT 1530
463  L T I D Y A A E R S N D G G G R G G G R G G G R G G G F R G G 492
1531  CGCGGCGGACGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 1620
493  R G G R G G R G G G R G G H S A A K H K G S I Q S F E G K R 522
1621  ACGAAGTTTGAAGATCCGACTGATTTAATGGTCGTCGACGTCATGCACCTTGCCTAATCATCGAACCTGACGTCAGTGGTCTGTGAGCT 1710
523  T K F E D S D * 529
1711  CAATGCGCTCTCAATGACGTCATAACTCGTTTTTTTATGGAATTCGTGTCGAGTTTATGTTTCCATTATGATACCAGCGATATCGTGAGC 1800
1801  GCCATTTTAAATCGACGCTTTTCGATCAATTCGTTTCCAGTTATTTGGTTGAATTAACGCTTTGGGTTCTTTACTATCAATACTGCCA 1890
1891  CTATGTGTGGGCATAATTTGCTCCGATATTTCTCAACAGTTTTACATACCACTGCTGAGTTTATGTTGACCACTTgtTGTCACCTGTCTC 1980
1981  AAAATAAATGAACACCAAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2020

```

Fig. 4.3.1 *CiRGGI*の塩基配列と予想アミノ酸配列

CiRGGI cDNAの塩基配列を上段に、そこから予想されるアミノ酸配列を下段に記した。cDNA の全長は2020 bpで529 aaをコードしていると予想された。網掛けの領域はRRMを、下線はRGGボックスを、アスタリスクは終止コдонを示す。


```

mvqlkkksdktsvikpvvtkakkenvemkkgkkskvaapeatneenellkqeven 60
eendekvvktedsddeeasadesdddddseeeekvkpkvakkeskakkvvkesdees 120
dddddseeeedekedesedededddddddeeneeevklvrkateteevatkk 180
vkldpsevatllftelpeglndavfnkflkskeikvacranygrqkayvdvraedkdaa 240
lqlhqvewkgqeiqvteaqskaqdrkgdfasnrndkdertlfvknlpysadenaiaelfd 300
gvkevrlldresgrpkgmafiefdstaeketafglkdelemdgrslyldnvtggggggr 360
grgnrggggfggggfgagrgggrggsapsktlfvkgitedmtrdtlyetfsgatdi 420
ripqdrdtgknkfayveyqsessatevyksskggmhvdgsrltidyaaersndggggrgg 480
grgggggfrgggrgggrgggrgghsaakhkgsiqsfegkrtkgedsd 529

```

Fig. 4.3.2 CiRGG1タンパク質のアミノ酸配列の特徴

CiRGG1タンパク質のアミノ酸配列を記した。2重の下線はリシンに富む領域を、点線の下線はグルタミン酸とアスパラギン酸に富む領域を、四角囲みはRRMを、太文字はRNP-1とRNP-2を、波線の下線はRGGボックスを示す。

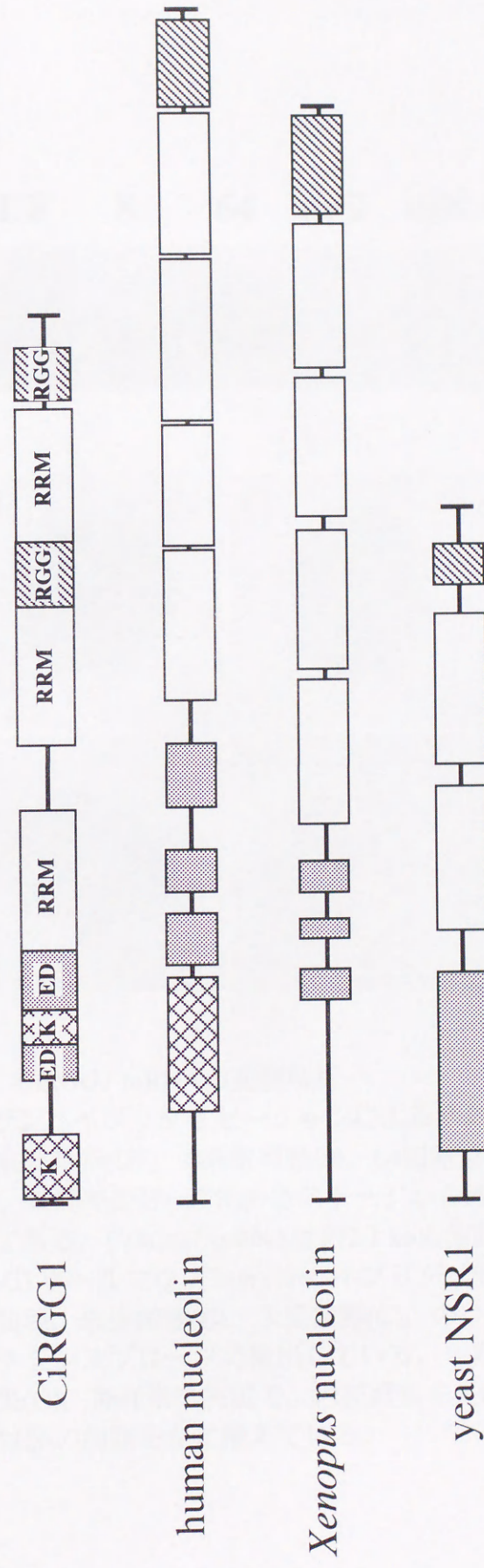


Fig. 4.3.3 nucleolinとの構造上の比較

上から、CiRGGタンパク質、ヒトのnucleolin (Strivastava *et al.*, 1989)、アフリカツメガエルのnucleolin (Rankin *et al.*, 1993)、酵母のNSR1 (Lee *et al.*, 1991)の構造を模式的に並べた。☒はリシンに富む領域(K)を、☒はグルタミン酸とアスパラギン酸に富む領域(ED)を、☐はRRM (RRM)を、☒はRGGボックス(RGG)を示す。

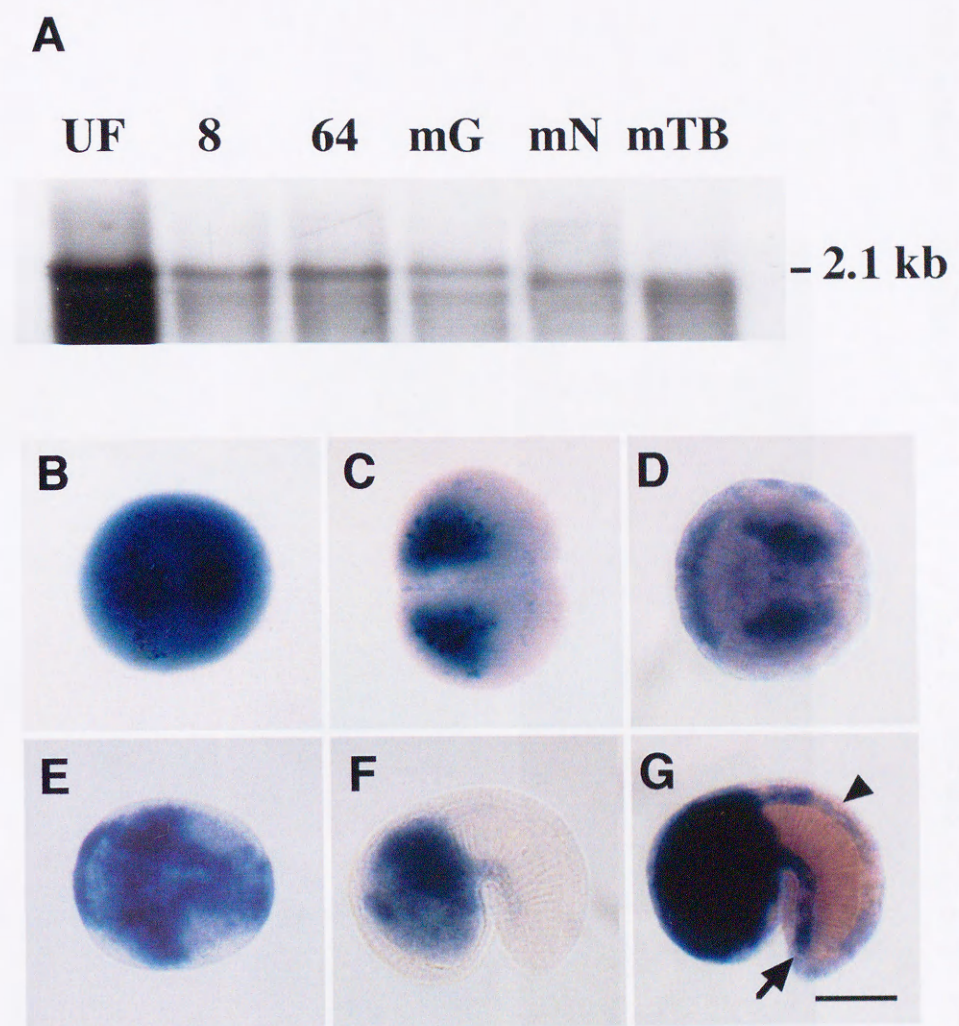


Fig. 4.3.4 *CiRGGI* mRNAの発現解析

(A) ノザンハイブリダイゼーションによる*CiRGGI* mRNAの時間的発現。左から、未受精卵(UF), 8細胞期胚(8), 64細胞期胚(64), 中期のう胚(mG), 中期神経胚(mN), 中期尾芽胚(mTB)の各ステージから抽出した10 μ gのポリ(A)+RNAをブロットしてある。*CiRGGI* mRNAは約2.1 kbの位置にシングルバンドとして検出される。(B-G) ホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションによる*CiRGGI* mRNAの空間的発現。未受精卵(B), 未受精卵(C), のう胚(D), 神経胚(E), 中期尾芽胚(F, G)をアンチセンスプローブで検出している。中期尾芽胚の発色時間を長くして検出した結果(G)。神経索を矢尻で、内胚葉索を矢印で示す。スケールバーは50 μ m。C-Gは胚の前側を左に揃えている。

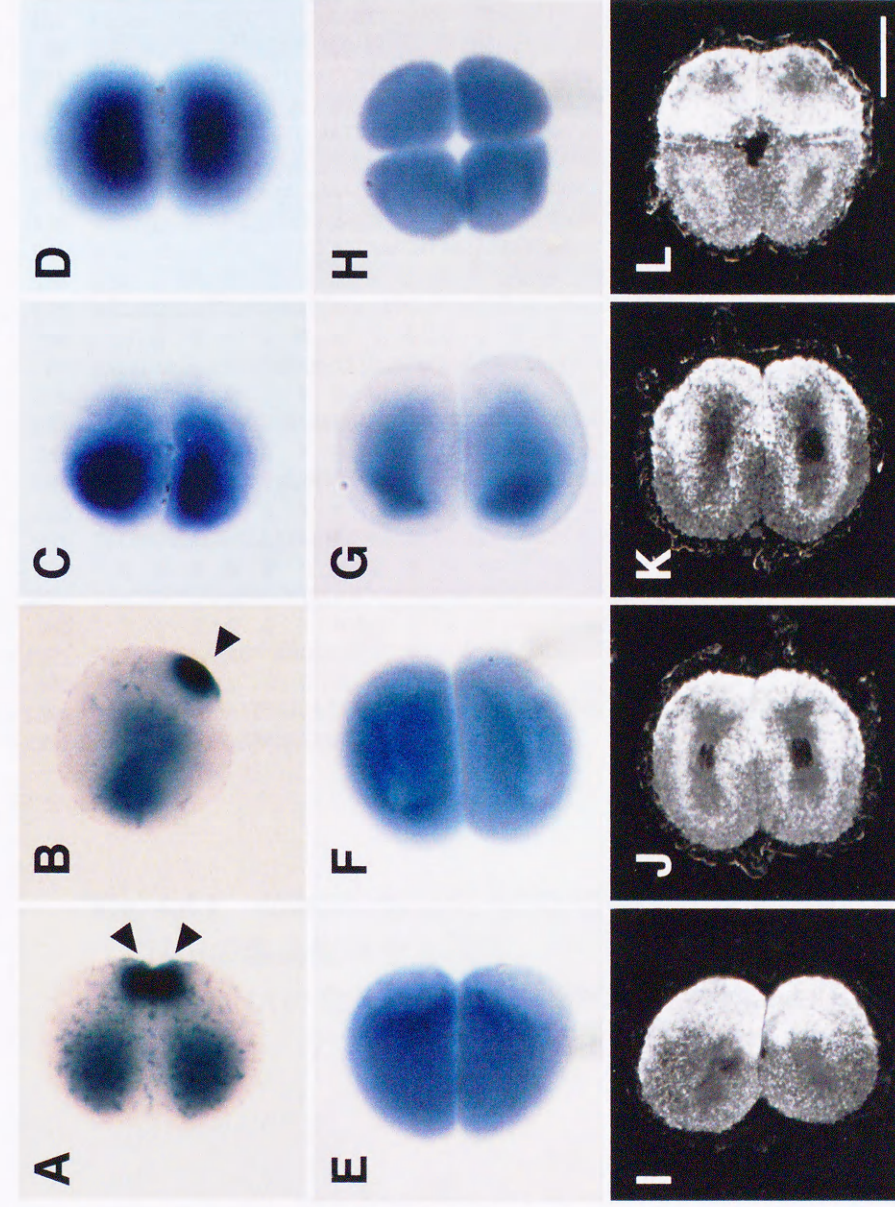


Fig. 4.3.5 2細胞期における*CiRGG1* mRNAの挙動

(A, B) *CiRGG1*と*Ci-pem*による2細胞期胚のホルマリンマウントin situハイブリダイゼーションの2重染色。植物極後方に*Ci-pem* mRNAの発現が見られる(矢尻)。 (C) *Ciona* 14-3-3 と (D) *CiYBI* の2細胞期胚におけるホルマリンマウントin situハイブリダイゼーション。 (E, F) *CiRGG1*のホルマリンマウントin situハイブリダイゼーション。2細胞期中期(F)、2細胞期後期(G)、4細胞期(H)をアンチセンスプローブにより検出した。(I-L) 抗myoplasmin-C1抗体で染色した胚切片。(I-L) 2細胞期初期(I)、2細胞期中期(J)、2細胞期後期(K)、4細胞期(L)。スケールバーは50 μ m。すべて胚の前側を左に揃えてある。


```

1 gtTACGTGATTAATTTTATCGATTCTAGTAACATCTGTACATAAACATGTCACAAACGATGGCGAagAAGCAGGAAAAATCTTTGTTG 90
1 M S Q N D G E E A G K I F V G 15
91 GTGGTCTTCCCCGACAACTACATTAGAAGGTCTCAGAAGTTACTTTGAAAACATGGAGAAGTCTCGGATTGTGCTTAATGAAGGATA 180
16 G L A R Q T T L E G L R S Y F E N Y G E V S D C V L M K D K 45
181 AAGAGACTGGGTTCTCCCGAGGGTTCGGTTTTGTAACTTTCACAAATCCATCAAGTGTTCAGCTGTAGTAAAAGCTAGACCCCACT 270
46 E T G F S R G F G F V T F T N P S S V A A V V K A R P H N L 75
271 TGGATAATAAAATGATTGACCCAAAGCCATGTACAACAAAAGCTGCACAACAACAAAAGAAAGTGAAGTTCAACAAATTACAGCAAGCTC 360
76 D N K M I D P K P C T T K A A Q Q Q K K V S S T N Y S K A H 105
361 ATAAATATTTCATTGGTGAATTTCAATGGAAGCATCTGAAGCCGACGTACAAGCTATTTTGAAGCTTATGGAACCGTGGTGAAGTTG 450
106 K I F I G G I S M E A S E A D V Q S Y F E R Y G T V V E V V 135
451 TGTTTGTGTGAACAAAGAAGACACAAGCAACCAAGGGTTTGGTTTCGTAACATTTGAAGACGAATCATCCGTAGATCAAGCAA 540
136 F V V N K E D T S K P H K G F G F V T F E D E S S V D Q A I 165
541 TCGCgaAACATTACCATATCATCAAAGATAAAAGAGTTGAAGCTAAAAAGCGGAGTCAAGAGACAAAATGGGAGGGGGCAGgAaCGATC 630
166 A K H Y H I I K D K R V E A K K A E S R D K M G G G R N D Q 195
631 AACAGCAGGGTTATGGGATGGGatATGGACAAGGGAACaAcATGATGTATAACCAAGGTATGAATCAAGCAGGTGGAACCGGATGGGAG 720
196 Q Q G Y G M G Y G Q G N N M M Y N Q G M N Q A G G N R M G G 225
721 GACAGAACATGATGGGTAACATGGATACGGGAACCAgaATTtCCAACAGCCTACCCTCAACAACAAGGTACCGTGGCAATCAAGGCT 810
226 Q N M M G N Y G Y G N Q N F P T A Y P Q Q Q G Y G G N Q G Y 255
811 ATGTTACGGATATGGGTATGGAGGCAACATGGGTGGCAACATGCCTGGCCAAATGGGTGGGATGCAAGGTGGGCAAATGGGGGAATGC 900
256 G Y G Y G Y G G N M G G N M P G Q M G G M Q G G Q M G M P 285
901 CCAACCAGATGGGAGGGAATATGCAAGGGGTCAGATGGGTGGAAACATGGGAAACATGCAGGGTGGATATCAACCAGGCATGATGGGAA 990
286 N Q M G G N M Q G G Q M G G N M G N M Q G G Y Q P G M M G M 315
991 TGCAAGGGAGAGGGTTAATAATGGAATGGAGCTCAACCAATGCTGCGAGCACGTATCCGAAAACCCACAAGTTACGGACCAATGC 1080
316 Q G R G V N N G N G A Q P N A A S T Y P Q N P T S Y G P M P 345
1081 CAACATCTGGAGGAGGATACAACCAAGGCAACACTGGTtCAACAACCTCAGTGGTCAAGCAAACTGGCAACACTGGTGGAGGAAGTT 1170
346 T S G G G Y N Q G N T G S N N S S G Q A N T G N T G G G S Y 375
1171 ATGGACAGAAGAGTGGAGGAGTTCTAACAACCTCGGGCTACCATCCTTACCGAAGATAAAACAATAAACATTGTATTCAAATTGTCAAAC 1260
376 G Q K S G G G S N N S G Y H P Y R R * 393
1261 TTTTAATCATGATCTTACATATGTACAATAGATTACGCCAGGCCAACACCTTTTATTTTCGCTTTTATAATAAAACAGTGAACCAAC 1350
1351 ACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1374

```

Fig. 4.4.1 *CiMsi*の塩基配列および予想アミノ酸配列

*CiMsi*の塩基配列を上段に、そこから予想されるアミノ酸配列を下段に記した。cDNAの全長は1374 bpで393 aaをコードしていると予想された。網掛けはRRMを、アスタリスクは終止コドンを示す。

A

RRM1

H.roretzi	10	KIFIGGLARQTEDDGLRAYFESFGEVVESIVMKDKVTFGRGFGFVMEFSDQSVSKVLKNGHSLDNKKIDPHPCITPKGI	89
C.intestinalis	11	KIFVGGIARQTLEGLRSYFENYGEVSDCVLMKDKEIFGRGFGFVFTNPSSAAVMKARFNLNMMIDPHPCITAA	90
mouse	21	KMFIGGLSWQTQEGLREYFGFGEVKECLVMDPLTKRSRGFGFVTFMDQAGVQVLAQSRHELDSTIDPHVAFERRA	100
fruit fly	176	KLFVGGIWSQTSDDKLEKEYFNMFGTVTDVLMKDPTQRSGRFGFVTFEQEPTVEKVLKVPIETLDCKKIDPHHATPNR	255

Consensus K F GGL QT GLR YF FGEV MKD T SRGFGFVTF V KVLK F LD K IDPK TPK

RRM2

H.roretzi	105	KIFIGGLIAQSSTTEDVKKYFEEGFGTVNEVFWINEDN--RIKGGFGVTFANEQANKAVDMHFHEIGDQIEAPRTTPEK	185
C.intestinalis	106	KIFIGGLISMEASEADVQSYFER-YGVVVEVFWNEDTSKPKGGFGVTFEESVDQAIKHYITKDNRYEAKKAEERDK	187
mouse	110	KIFVGGISVNTTVEDVNH-YFEQFGKVDAMLMDITTN--RIKGGFGVTFESEDIVKVCIEHFHEINNMVECKKAQFKEV	189
fruit fly	264	KIFVGGISQDTSAEFVNAYFSQFGFVEETVLMMDQQT--RIKGGFGVTFEEDVDVRCIEHFHTKNNKVECKKAQFKEA	343

Consensus KIFGG E EDVK YFE FGVEV K RHGGFGVTFE E V HFE T K VE KKA F E

B

H.roretzi	193	NNQGMNDAYGYGYG-----QGP-QGGGWMOGPAGANAMMGYGYGYGGGFP	238
C.intestinalis	195	QQQYG---MGYGOQNNMMYNQGMNQAGGNRMG--GQNMGMNGYGYGN-QNFP	240
mouse	195	SARGRSR-VMPYGMDFMLG-IGMLGYPGFQATTYASRSYTGAPGYTYQFP	244
human	195	SARGRSR-VMPYGMDFMLG-IGMLGYPGFQATTYASRSYTGAPGYTYQFP	244

H.roretzi	239	TSYP--QGYG--QGGYGYGYN-----PGAYGGM--GQMN-----	267
C.intestinalis	241	TAYPQQQGYGNGQGYGYGYGGNMGGNMPGQMGGMGGQMGGMNQMGGNM	292
mouse	245	EFRVERSPLPSAPVLPeltaIPLTAYG--PMAAAAAAAVVRG-----	285
human	245	EFRVERTPLPSAPVLPeltaIPLTAYG--PMAAAAAAAVVRG-----	285

H.roretzi	268	-----KGDAGKGTNYSN-----MGSYQQTTSGYGPA	293
C.intestinalis	293	QGGQMGGNMGMNQGGYQPGMMGMOGRGVNNGNGAQPNAASTYPQNPTSYGPM	344
mouse	286	-----TGSHPWTMAPPPGSTPSRTGGFLGTTS-PGPM	316
human	286	-----TGSHPWTMAPPPGSTPSRTGGFLGTTS-PGPM	316

H.roretzi	294	RAN-QSYG-GGSDYNNGYGKNGGDASGGG-----GGGRSSSQGYHPYKR	335
C.intestinalis	345	PTSGGGYNQGN TGSSNNSSQANTGNTGGGS-YGQKSGGGSNNSGYHPYRR	393
mouse	317	AELYGAANQDSGVSSYISAASPSTGFGHSLGGPLIATAFTNGYH----	362
human	317	AELYGAANQDSGVSSYISAASPSTGFGHSLGGPLIATAFTNGYH----	362

Fig. 4.4.2 Musashiタンパク質アミノ酸配列の比較

(A) Musashiタンパク質のRRMにおけるアミノ酸配列の比較。N末側のRRM (RRM1)、C末側のRRM (RRM2)ごとに比較した。上からマボヤ、カタユウレイボヤ、マウス、ショウジョウバエのMusashiタンパク質について並べた。3分子に共通なアミノ酸に影付けをし、下に記した。(B) Musashiタンパク質のRRMを除いたアミノ酸配列の比較。上からマボヤ、カタユウレイボヤ、マウス、ヒトのMusashiタンパク質を並べた。マボヤとカタユウレイボヤに共通なアミノ酸に影付けをしている。A、Bとも配列を最も一致させるために挿入したギャップはダッシュで示した。

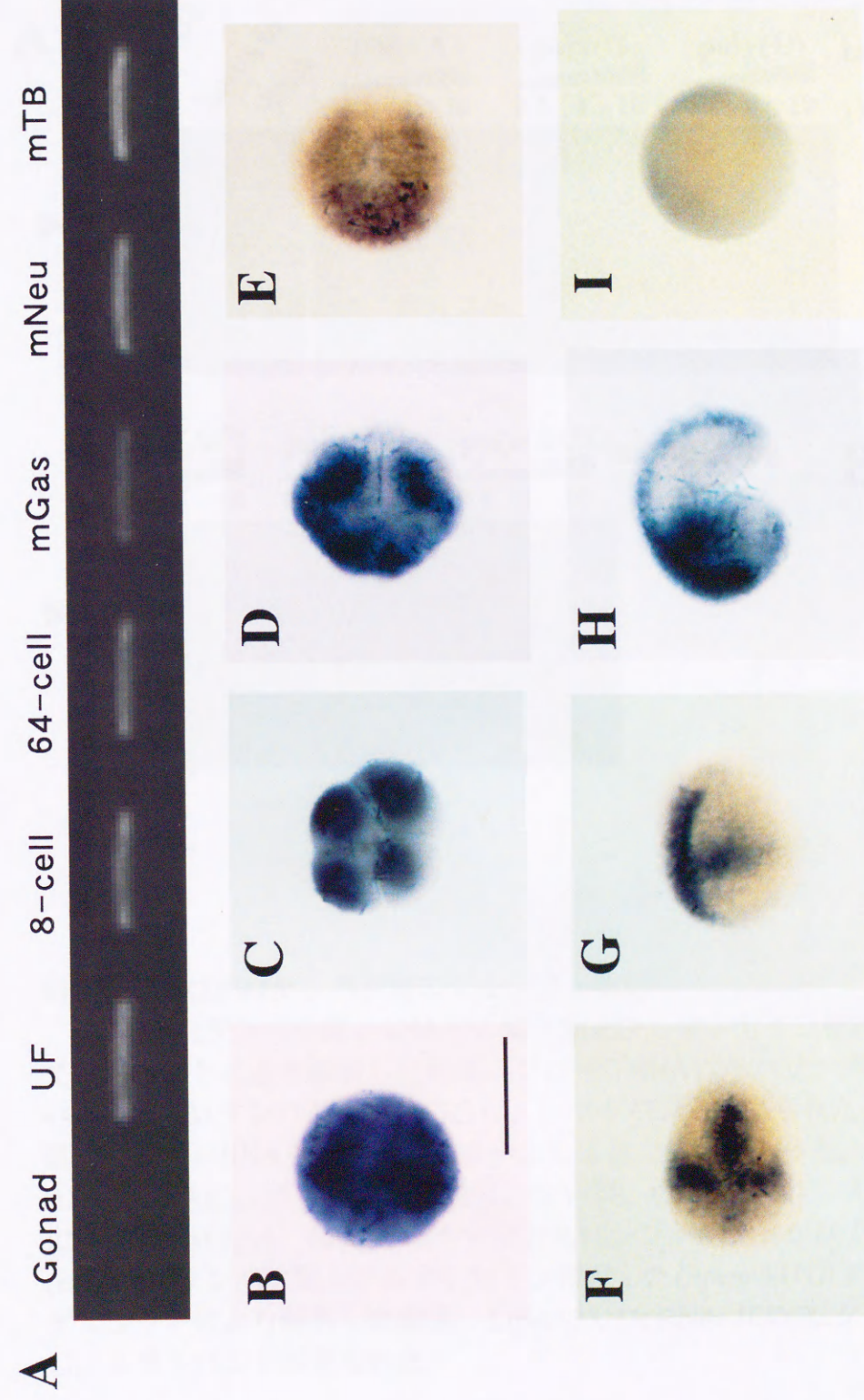


Fig. 4.4.3 *CiMsi* mRNAの発現

(A) RT-PCRによる*CiMsi* mRNAの発現の解析。カタウレイボヤ卵巣(Gonad)、未受精卵(UF)、8細胞期胚(8-cell)、中期のう胚(mGas)、中期神経胚(mNeu)、中期尾芽胚(mTB)の各ステージからmRNAを抽出し、*CiMsi*特異的プライマーを用いてRT-PCRをおこなった。(B-H) ホールマウント *in situ* ハイブリゼーションによる*CiMsi* mRNAの空間的発現。受精卵(B)、8細胞期胚(C)、32細胞期胚(D)、中期のう胚(E)、初期神経胚の背側(F)、中期神経胚の横側(G)、中期尾芽胚(H)をアンチセンスプローブにより検出した。受精卵をセンスプローブで検出した(I)。(C-H)は胚の前側を左に揃えてある。スケールバーは100 μ m。

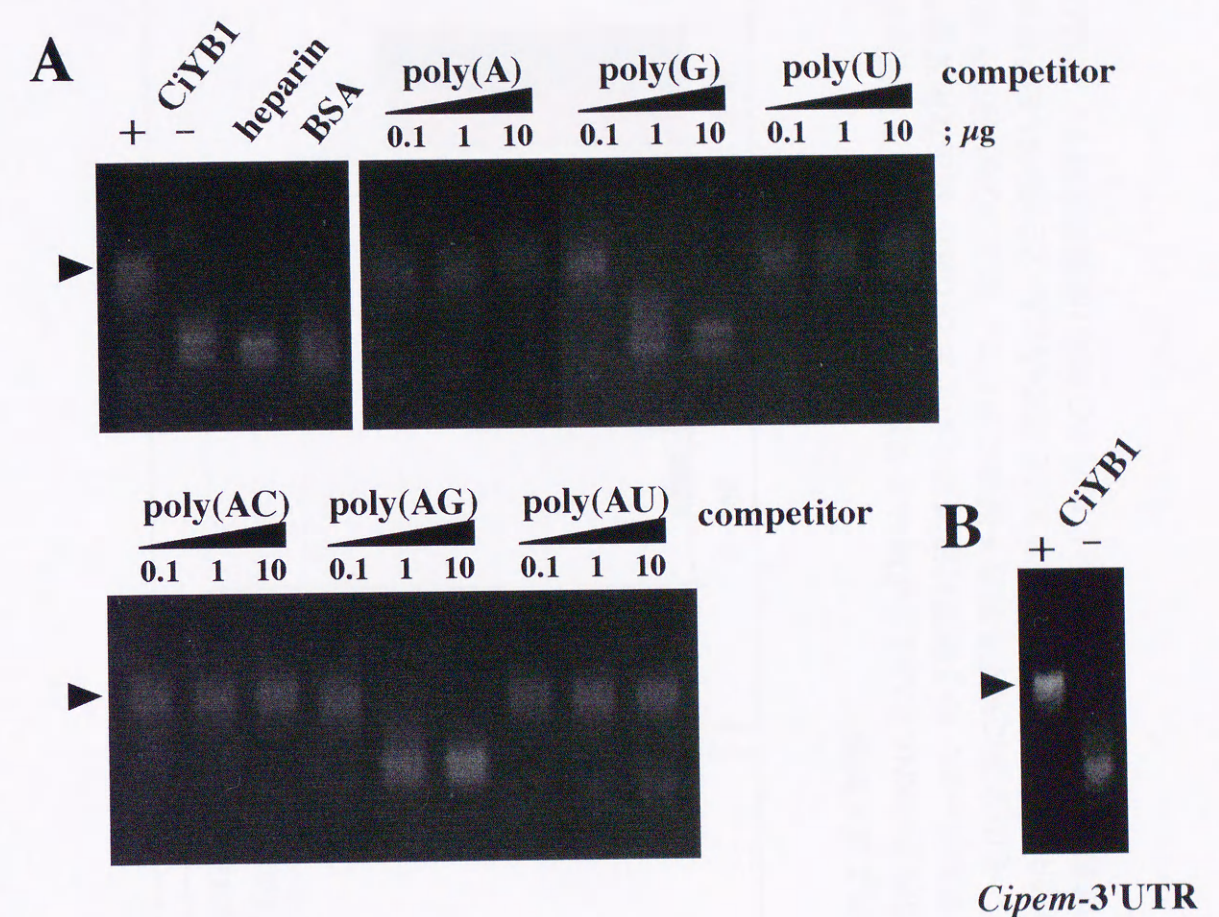


Fig. 4.5.1 CiYB1タンパク質のゲルシフト解析

(A) CiYB1タンパク質とRNAとの結合能をフルオレセイン標識したRNAを用いてゲルシフトにより解析した結果。プローブRNAはヘパリンやBSAとは結合しないが、CiYB1タンパク質とは結合し、シフトバンドが見られた(矢尻)。さらに標識していないRNAをコンペティターとして競合実験を行った。ポリ(A)、ポリ(U)、ポリ(AC)、ポリ(AU)とは競合しないが、ポリ(G)、ポリ(AG)と競合し、競合RNAの量を0.1, 1, 10 μg と増やすとともにシフトバンドが減少した。

(B) CiYB1タンパク質とフルオレセイン標識した*Cipem-3'UTR* RNAとの結合能をゲルシフトにより解析した結果。*Cipem-3'UTR* RNAはCiYB1タンパク質と結合し、シフトバンドが見られた。

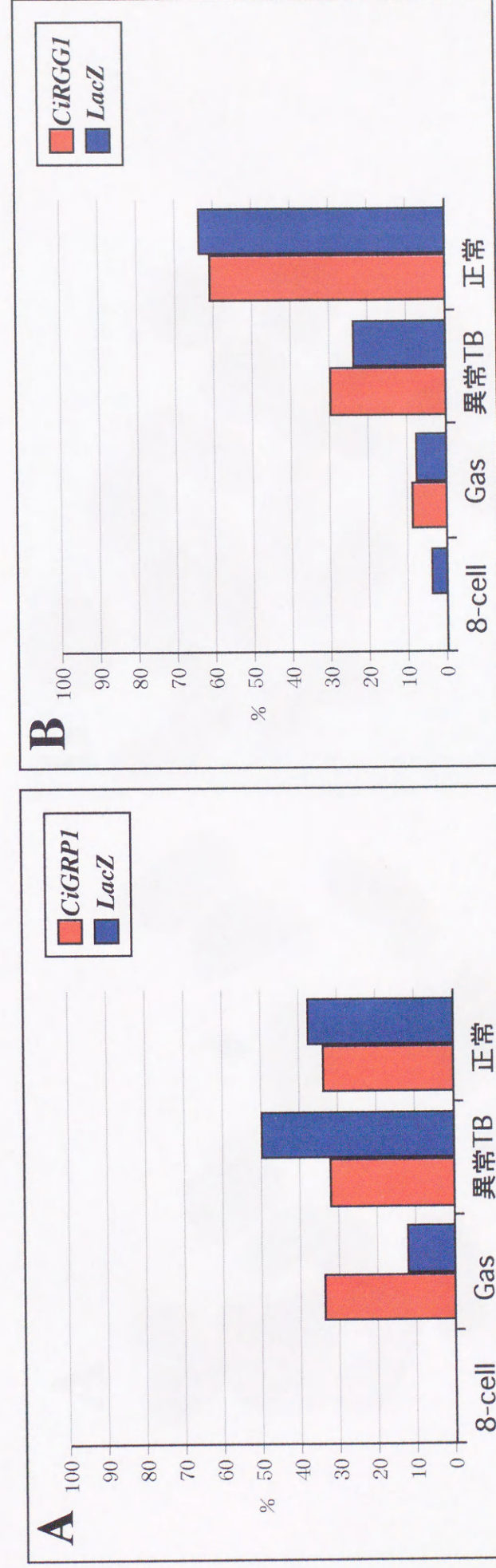


Fig. 4.5.2 CiGRP1およびCiRGGI強制発現の発生におよぼす影響

(A) CiGRP1 強制発現の発生におよぼす影響。CiGRP1合成RNAとLacZ合成RNAを受精卵に顕微注入し、中期尾芽胚になるまで発生させた。その影響を初期卵割で発生が止まる(8-cell)、のう胚期付近で発生が止まる(Gas)、異常な尾芽胚になる(異常TB)、正常な尾芽胚になる(正常)の4段階に分け、その全体に対する割合を縦軸に表した。赤はCiGRP1強制発現胚を、青はLacZ強制発現胚を示す。(B) CiRGGI強制発現の発生におよぼす影響。CiRGGI合成RNAとLacZ合成RNAを受精卵に顕微注入し、中期尾芽胚になるまで発生させた。その影響を(A)と同様にして示した。赤はCiRGGI強制発現胚を、青はLacZ強制発現胚を示す。

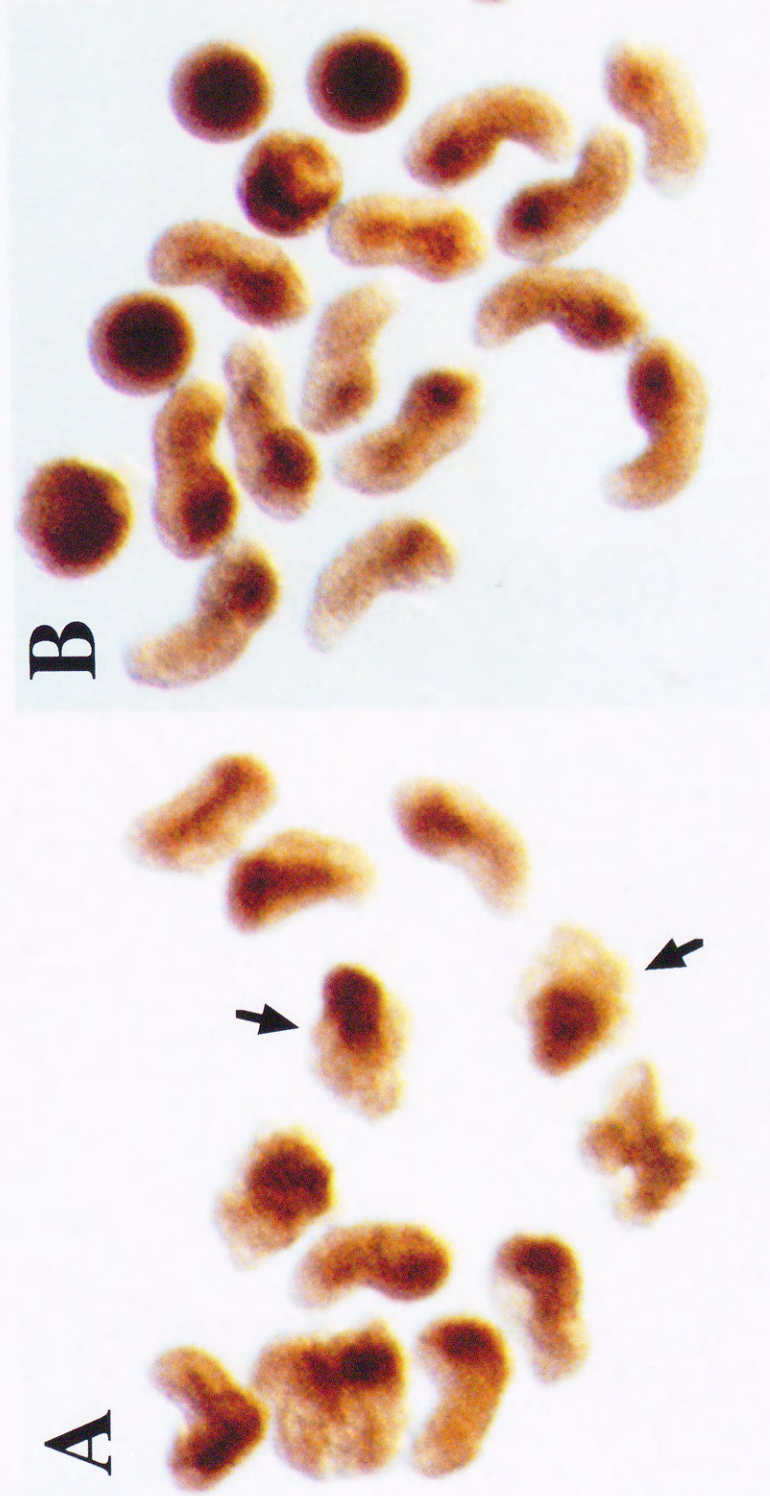


Fig. 4.5.3 *CiMsiI* 強制発現の発生におよぼす影響

(A) *CiMsiI* RNA の強制発現胚。 *CiMsiI* の合成RNA を受精卵に顕微注入し、中期尾芽胚になるまで発生させた。(B) 対照胚。強制発現した胚と同じ個体から取り出した受精卵を、なにも顕微注入せずに中期尾芽胚まで育てた。

