

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20112002

研究課題名（和文） mRNA局在と翻訳制御における細胞質RNP顆粒動態

研究課題名（英文） Cytoplasmic RNA granules for intracellular mRNA localization and translational control

研究代表者

中村 輝（NAKAMURA AKIRA）

独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究室・特別主幹研究員）

研究者番号：90323245

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエ生殖質の動態解析を進め、新たなRNA制御機構を見出した。mRNAの局在と翻訳制御を行うRNP複合体の因子であるEdc3の解析から、RNP複合体の構成タンパク質の動的制御の重要性を浮き彫りにした。また、生殖質の繫留過程の解析から、膜輸送系とアクチン骨格系の制御を介したRNPの局在維持機構が明らかとなった。さらに、生殖質因子Pgcの解析から、miRNA経路を抑制することで生殖質RNAを安定化することが、動物種を超えて共通であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We conducted detailed analyses for germ plasm assembly and maintenance, and proposed several new ideas and concepts on RNA regulation. First, our analyses revealed that Edc3, a component of cytoplasmic RNP granules, mediates a dynamic remodeling of RNP components during localization and translation of germ plasm RNAs. We also found that the vesicle trafficking pathway promotes actin remodeling and plays a crucial role in the cortical anchorage of the germ plasm. Furthermore, our results show that the protection of germ plasm RNAs from the miRNA-mediated RNA degradation pathway is an evolutionally conserved process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2009年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2010年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2011年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2012年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
総計	74,800,000	22,440,000	97,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学・細胞生物学

キーワード：ショウジョウバエ、生殖質、生殖顆粒、生殖細胞、RNA局在、RNP、翻訳制御、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

細胞の極性は、しばしば mRNA の細胞質内

局在と、RNA 局在と連携した翻訳制御によって確立される。このような RNA 局在と翻訳制御との連携機構の解明は、発生・細胞生物学上の最重要課題の1つである。しかし、その分子基盤はいまだ良くわかっていない。このような mRNA の局在と翻訳制御には、mRNA とタンパク質とが RNP 複合体を形成することが重要である。さらに、RNP 複合体の構成タンパク質の核内及び細胞質内での再編成が、mRNA の局在と翻訳制御に重要であることがわかってきている。ショウジョウバエ胚後極には、生殖細胞及び腹部の形成制御する母性 RNA や タンパク質が局在しており、生殖質と呼ばれる。生殖質形成は、*oskar* (*osk*) mRNA の卵母細胞後極への局在によって開始される。興味深いことに、*osk* mRNA の翻訳抑制因子として同定された RNP 顆粒構成因子の多くは、体細胞 P ボディや神経 RNA 顆粒にも局在することが報告されており、これら RNA 顆粒が細胞種を超えて共通した生理機能を持つと予想されている (図 1)。

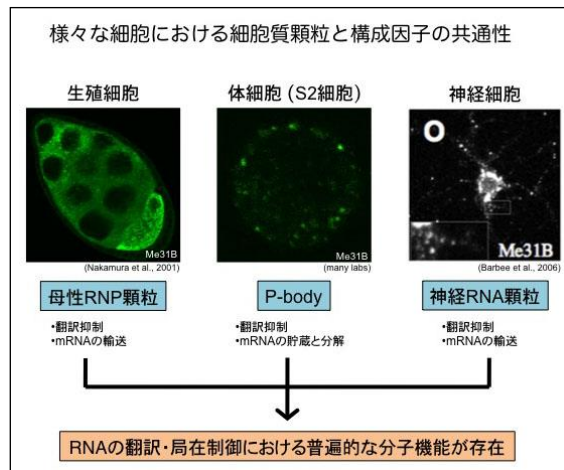


図 1 : 細胞質 RNP 顆粒の共通性

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞極性、RNA 局在、翻訳制御、RNP 動態制御を包括的に研究する上で理想的なモデル系の一つである、ショウジョウバエ生殖質形成を対象として、RNA レベルで行われる制御の普遍的分子基盤の実体解明を目指す。研究アプローチとしては、①すでに同定している細胞質 RNP 複合体の構成タンパク質の機能解析を推し進めた。具体的には、細胞質 RNP の構成タンパク質である Edc3 について、*osk* mRNA 制御に焦点を当てた解析を進める。②生殖質アッセムブリに異常をきたす突然変異体を多数単離しており、それらの責任遺伝子の同定と分子機能解析を進める。具体的には、生殖質の卵母細胞後極への局在維持 (繫留) に異常をきたす変異体として同定した *mon2* ならびに *sec5* について、分子機能解析を進めた。③生殖質には、特異

的な RNP 凝集体である生殖顆粒が存在する。生殖顆粒に局在する因子として同定した Polar granule component (Pgc) について分子機能解析を進めた。以上の研究を推進することにより、新たな概念の創出と、RNA 制御におけるこれら知見の普遍性の検証を目指した。

## 3. 研究の方法

既同定の新規因子の分子機能解析を中心に研究を進めた。生化学的に同定した因子については突然変異体の作成を行った。また、突然変異体として単離した因子については責任遺伝子の同定をすすめた。そして、各々の因子に対する特異的な抗体を作成し、免疫染色による細胞内局在の解析、免疫沈降-ウエスタン解析、ならびに既知の制御因子に対する突然変異との遺伝学的相互作用の解析など、発生遺伝学、細胞生物学、分子生物学、生化学的アプローチを総動員させて研究推進をはかった。さらに、ショ糖密度勾配遠心法など当研究室にとって新規の解析手法についても、本新学術領域研究班員の協力のもとに立ち上げ、研究の推進をはかった。

## 4. 研究成果

① *osk* RNP 複合体の新規構成タンパク質として同定した Edc3 について、突然変異体を作成し解析を進めた。その結果、*edc3* を欠く卵母細胞において、肥大化した母性 RNP 顆粒が哺育細胞の核膜近傍へ集積し、卵母細胞への輸送が低下していた。特に、*osk* mRNA の翻訳活性化因子として考えられている Orb の哺育細胞での母性 RNP 顆粒への集積が低下していた。さらに、*edc3* 突然変異体の卵母細胞では *osk* mRNA や Osk タンパク質の異所的集積が観察された。また、免疫沈降実験により Edc3 は既同定の *osk* mRNA 翻訳制御因子と会合していることを明らかにするとともに、*edc3* はこれら *osk* mRNA 制御因子の突然変異体との遺伝学的相互作用も示した。特に、*edc3* 突然変異体は *osk* RNP の輸送に関わるモータータンパク質であるダイニン、キネシンとも遺伝学的相互作用を示した。興味深いことに、*edc3* 突然変異体の異常は、*osk* RNP の哺育細胞-卵母細胞間の輸送に関わるダイニン重鎖 (*Dhc*) の遺伝子量減少により抑制され、逆に卵母細胞内での輸送に関わるキネシン重鎖 (*Khc*) の遺伝子量減少により増悪した。さらに、野生型及び Edc3 を欠く卵巣ライゼートをショ糖密度勾配遠心により分画し解析を行った。その結果、*osk* mRNA の翻訳抑制因子として *osk* mRNA の 3' UTR に直接結合するタンパク質である Bruno、および Orb が *osk* RNP のフラクションに分画されずに free form で存在していることが明らかになった。このような結果より、Edc3 は足場タンパク質

(scaffold) として、構成タンパク質間の相互作用の安定化や、因子の入れ替わりを仲立ちする機能を持っていると推定された。

②生殖質の卵母細胞後極への局在に異常を示す突然変異体の原因遺伝子として同定した *mon2* に関して解析を進めた。*mon2* 突然変異クローンを詳細に解析した結果、Mon2 は Oskar タンパク質の活性に応答して卵母細胞皮層から細胞質へと伸長するアクチン繊維束の形成に必要であり、F-アクチンに依存して繫留されていると考えられる生殖質が後極皮層にから拡散してしまっていることを見出した。すなわち、Mon2 は Oskar の下流で生殖質繫留に機能する新規の因子であった。興味深いことに、Mon2 は、ゴルジ体及びエンドソーム膜上に局在することを明らかにした。さらに、Mon2 がアクチン重合因子 (actin nucleator) である Cappuccino (Capu) ならびに Spire (Spir) と複合体を形成していること、これら重合因子の活性を制御する GTPase である Rho1 の卵母細胞後極側への蓄積に関わっていることを見出した。一方、Osk がエンドゾーム経路を活性化することを見出し過去に報告してきた。以上の結果から、Mon2 は Osk によって活性化されるエンドゾーム上において、アクチン骨格のリモデリングを制御することで、生殖質の卵母細胞後極皮層への繫留を指揮していると考えられた (図 2)。

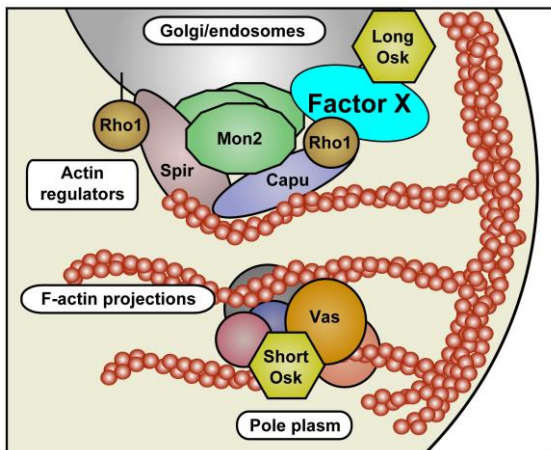


図 2 : 生殖質繫留における Mon2 の機能発現に関する分子間相互作用のモデル

一方、*mon2* 突然変異と同様に生殖質の繫留に異常を示す突然変異体として *sec5* を同定した。*Sec5* は、エクソシスト (Exocyst) の構成タンパク質の 1 つであり、リサイクリング小胞の細胞膜への繫留を制御する。興味深いことに、単離された *Sec5* 変異体では C 末端側半分の領域に突然変異が生じており、既に報告されている *sec5-null* とは表現型が異なった。このことから、私たちが同定した変異

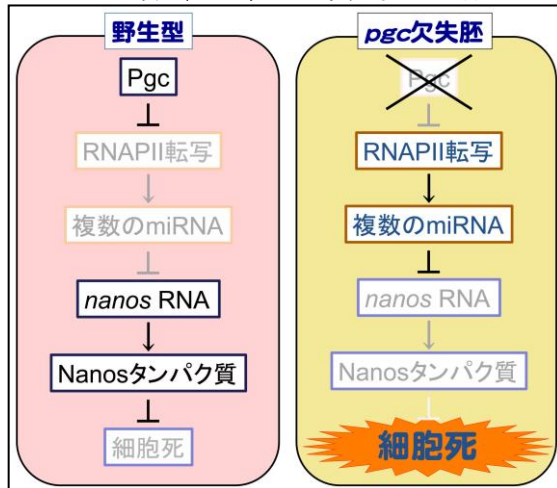
型 *Sec5* では、特定の Exocyst 構成因子との相互作用が失われることで、生殖質の繫留異常を引き起こしている可能性が予想された。リサイクリング小胞の細胞膜への輸送では、ミオシン V モータータンパク質とエクソシスト複合体との相互作用が重要である。興味深いことに、光受容細胞におけるロドプシンの輸送では、リサイクリング小胞の制御タンパク質である Rab11, ミオシン V, そして Rip11 が相互作用して機能する。同様の分子間相互作用が生殖質の繫留に関わっている可能性が予想された。

③生殖質には生殖細胞の形成分化に必要な十分や母性因子が集積しており、特異的なオルガネラである生殖顆粒が存在する。生殖顆粒は、RNP が多数集積した凝集物であり、生殖細胞決定因子群が局在していると予想されている。*polar granule component (pgc)* はこのような母性因子の一つで、mRNA が生殖質に局在する。今までの研究から、*pgc* RNA は 71 アミノ酸残基の小タンパク質をコードし、始原生殖細胞 (極細胞) での一過的な mRNA 転写抑制に必須の機能を担うことを明らかにしてきた。この生殖細胞形成過程における一過的な転写抑制は、体細胞の分化プログラムを始原生殖細胞中で抑制するための機構であると考えられており、さまざまな動物種の初期胚において観察される普遍的な現象である。*Pgc* は、その後の胚発生過程での極細胞の維持にも必要であるが、*Pgc* による転写抑制がどのように極細胞の維持に関わるのか、その分子機構については不明であった。*Pgc* を欠いた極細胞野挙動を詳細に解析した結果、母性 *nanos (nos)* mRNA が不安定化し、胚発生中期以降に *Nos* タンパク質が消失することを見出した。*Nos* は極細胞の生存に必須の因子であり、*Pgc* を欠いた極細胞は、*Nos* を欠く極細胞と同様、細胞死を起し消失することが明らかとなった。これらの結果から、*Pgc* は、*nos* mRNA を始めとする生殖質を構成する母性 RNA の安定化に関わると考えられた。

*Pgc* が極細胞で発現する時期、体細胞領域では母性 - 胚性遷移 (maternal-to-zygotic transition) に伴い、母性 mRNA の分解が起こる。体細胞領域での母性 RNA の分解に関わることが報告されている因子の発現を調べた結果、6 種の miRNA を産生する *mir-309* クラスター遺伝子が *Pgc* を欠いた極細胞では異所的に転写されていることを見いだした。さらに、*mir-309* クラスター遺伝子の他にも、胚発生初期 (胞胚期) より体細胞領域で発現を開始する複数の miRNA 遺伝子 (*mir-1*, *mir-2a*, *mir-9a*, *mir-10* など) が、*pgc* を欠く極細胞では異所的に発現していた。また、ショウジョウバエ培養細胞を用いたレポーター



アッセイの結果、*nos* の 3' UTR が *miR-1* ならびに *miR-10* miRNA の標的となることが確認された。さらに、*pgc* 突然変異体のバックグラウンドで *Dcr-1*, *AGO1*, *Gawky* (*gw182*) 等 miRNA 経路の遺伝子機能を低下させると、極細胞の *nos* RNA の安定性向上が観察され細胞死が一部抑制されることを見出した。以上の結果から、Pgc を欠いた極細胞では、複数の miRNA が異所的に発現するために、*nos* mRNA をはじめとする生殖質を構成する母性 RNA が分解され、生殖質が安定に保たれ



なくなると結論した (図3)。

図3 : Pgc を介した転写抑制と生殖質 RNA (*nanos* RNA) の安定化・生殖細胞の維持

興味深いことに、ゼブラフィッシュにおいても体細胞における母性 RNA の分解に *miR-430* miRNA が関わること、ならびに生殖質 mRNA に結合する生殖質因子が *miR-430* による RNA 分解経路を遮断することで始原生殖細胞に取り込まれた生殖質 RNA を安定化していることが報告されている。すなわち、ショウジョウバエとゼブラフィッシュでは分子メカニズムは異なるが、生殖細胞形成過程において miRNA 経路を抑制することが、生殖質因子によって生殖細胞が形成される動物種では普遍的に重要である可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ①. Pradhan, S. J., Nesler, K. R., Rosen, S. F., Kato, Y., Nakamura, A., Ramaswami, M. and Barbee, S. A. (2012). The conserved P body component HPat/Pat1 negatively regulates synaptic terminal growth at the larval *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Cell Sci.* 125, 6105-6116. 査読有り
- ②. Kato, Y. and Nakamura, A. (2012). Roles of cytoplasmic RNP granules in intracellular

RNA localization and translational control in the *Drosophila* oocyte. *Develop. Growth Differ.* 54, 19-31. (総説) 査読有り

- ③. Tanaka, T. and Nakamura, A. (2011). Oskar-induced endocytic activation and actin remodeling for anchorage of the *Drosophila* germ plasm. *BioArchitecture* 1, 122-126. (総説) 査読有り
- ④. Shirae-Kurabayashi, M., Matsuda, K. and Nakamura, A. (2011). Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. *Development* 138, 2871-2881. 査読有り
- ⑤. Tanaka, T., Kato, Y., Hanyu-Nakamura, K., Matsuda, K. and Nakamura, A. *Drosophila* Mon2 couples Oskar-induced endocytosis with actin remodeling for cortical anchorage of the germ plasm. *Development* 138, 2523-2532. 査読有り
- ⑥. Yamada, K., Fuwa, T., Ayukawa, T., Tanaka, T., Nakamura, A., Baron, M. and Matsuno, K. Roles of *Drosophila* Deltex in Notch receptor endocytic trafficking and activation. *Genes Cells* 16, 1365-2443. 査読有り
- ⑦. Nakamura, A., Shirae-Kurabayashi, M. and Hanyu-Nakamura, K. (2010). Repression of early zygotic transcription in the germline. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 709-714. (総説) 査読有り
- ⑧. Abe, M., Setoguchi, Y., Tanaka, T., Awano, W., Takahashi, K., Ueda, R., Nakamura, A. and Goto, S. (2009). Membrane protein localization-dependent regulation by PI3K(III) and Rabenosyn-5 in *Drosophila* wing cells. *PLoS ONE* 4, e7306. 査読有り
- ⑨. Nakamura, A. and Seydoux, G. (2008). Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development* 135, 3817-3827. (総説) 査読有り
- ⑩. 加藤容子, 中村 輝 (2009). ショウジョウバエの生殖質形成における母性 RNA の翻訳・局在制御, 蛋白質核酸酵素 54, 2159-2164. (総説) 査読無し
- ⑪. 田中 翼, 中村 輝 (2009). ショウジョウバエ生殖質形成における膜輸送系の役割, *生化学* 81, 995-998. (総説) 査読無し
- ⑫. 羽生-中村 賀津子, 中村 輝 (2009). 生殖細胞形成過程における体細胞遺伝子発現抑制機構, *実験医学* 27, 362-367. (総説) 査読無し

[学会発表] (計 26 件)

- ①. 羽生賀津子, 松田一起, 中村 輝 Pgc はショウジョウバエ始原生殖細胞での microRNA の発現を抑制し, 母性 RNA を

- 保護している。第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日 (招待講演)
- ②. Nakamura, A. Protection of germ plasm RNAs from miRNA-mediated degradation in *Drosophila* primordial germ cells. The EMBO meeting on “Intracellular RNA Localization & Localized Translation” 2011. 8. 7-12. Il Ciocco, Barga, Tuscany, Italy. (招待講演)
  - ③. Nakamura, A. Germline Transcriptional Repression in *Drosophila* and *Ciona* Embryos. 第 58/60 回 NIBB コンファレンス Germline-Specification, Sex, and Stem Cells. 2012. 7. 17-20. 岡崎カンファレンスセンター, 岡崎. (招待講演)
  - ④. Nakamura, A. Pgc Protects Germ Plasm RNAs from MicroRNA-Mediated Degradation in *Drosophila* Primordial Germ Cells. The 22nd CDB meeting on “RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II” 2012. 6. 11-13. Kobe, Japan. (招待講演)
  - ⑤. Nakamura, A. Repression of early zygotic transcription in *Drosophila* primordial germ cells. The 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference. 2011. 5. 22-25. Taipei, Taiwan.
  - ⑥. Nakamura, A. Repression of early zygotic transcription in *Drosophila* primordial germ cells. 2010 SDB-JSDB Joint Meeting (The 69th Annual Meeting of the Society of Developmental Biology), Satellite Symposium on “Germ Cells” 2010. 8. 5-9. Albuquerque, New Mexico, USA. (招待講演)
  - ⑦. Nakamura, A. Roles of the endocytic pathway in the polarized transport and cortical anchoring of germ cell determinants in the *Drosophila* oocyte. The 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology on “From Cells to Organs” 2010. 5. 26-28. Paris, France. (招待講演)
  - ⑧. Nakamura, A. Repression of zygotic transcription and maternal RNA degradation in *Drosophila* primordial germ cells. The 19th CDB meeting on “RNA Sciences in Cell and Developmental Biology” 2010. 5. 10-12. Kobe, Hyogo. (招待講演)
  - ⑨. Nakamura, A. Roles of the endocytic pathway in *oskar* mRNA localization and germ plasm anchoring. FASEB Summer Research Conferences on “Intracellular mRNA Transport and Localized Translation” 2009. 7. 12-17. Saxtons River, Vermont, USA. (招待講演)
  - ⑩. 中村 輝, ショウジョウバエ *oskar*

mRNA の局在と生殖質形成におけるエンドソーム経路を介した F-アクチン再編. 第 82 回日本生化学会年会, 2009. 10. 21-24. ポートアイランド, 神戸. (招待講演)

[図書] (計 1 件)

- ①. 中村 輝 (2012). 第 7 章 転写後調節 (英文翻訳) 遺伝情報の発現制御 (David S. Latchman: Gene Control の翻訳) (五十嵐和彦, 深水昭吉, 山本雅之 監訳, メディカル・サイエンス・インターナショナル) pp201-243.

[その他]

ホームページ等

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/germline\\_development/index.html](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/germline_development/index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 輝 (NAKAMURA AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・生殖系列研究室・特別主幹研究員

研究者番号: 9 0 3 2 3 2 4 5

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

- 加藤 容子 (理研・研究員)
- 羽生-中村 賀津子 (理研・研究員, 日本学術振興会・特別研究員 RPD)
- 白江-倉林 麻貴 (理研・研究員)
- 松田 一起 (理研・テクニカルスタッフ)