

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18476

研究課題名(和文) マイクロRNAによる複雑な転写後抑制様式の理解に向けた *in vivo* 解析研究課題名(英文) *In vivo* analysis of microRNA-mediated post-transcriptional regulation

研究代表者

三嶋 雄一郎 (Mishima, Yuichiro)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：00557069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いた実験から、マイクロRNAによる転写後抑制にはTNRC6タンパク質が必要であると考えられている。本研究では、*tnrc6a*と*tnrc6b1*の二重変異ゼブラフィッシュを作成し、脊椎動物の初期発生過程においてTNRC6がマイクロRNAによる抑制に必須であることを明らかにした。またマイクロRNA以外にmRNAの安定性を制御する要因として、コドン使用の偏りが大きな影響を及ぼすことを発見した。さらにマイクロRNAによるmRNA分解に関わるDcp2とCnot7をゼブラフィッシュ胚で阻害した場合のmRNAプロファイリングを行い、初期発生における2つの酵素の貢献を網羅的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tnrc6 protein family had been considered as an essential factor in microRNA (miRNA)-mediated gene silencing based on previous researches using cultured cells. In this study, we established zebrafish genetic mutant of *tnrc6a* and *tnrc6b* and revealed that *tnrc6* proteins are indeed essential for miRNA-mediated gene silencing during vertebrate development. We also discovered that codon composition determines mRNA stability independently of miRNA-mediated silencing. Furthermore, we successfully inhibited Dcp2 and Cnot7, two enzymes involved in mRNA decay, in zebrafish embryos. By performing RNA-seq analysis, we revealed the genome-wide requirement of the two enzymes during early embryogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：発生 マイクロRNA ゼブラフィッシュ

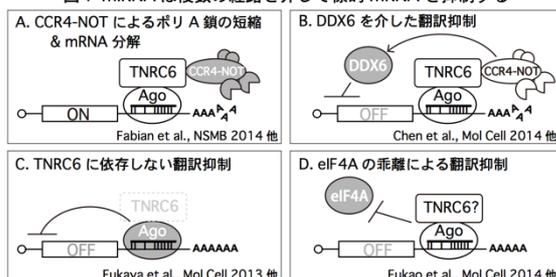
1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は、相補的な mRNA 上の配列に結合して遺伝子発現を負に制御する小分子 RNA である。脊椎動物のゲノムには数百から千種類以上ものマイクロ RNA 遺伝子が存在しており、タンパク質遺伝子の 30% から 50% を直接制御していると試算されている。実際、マイクロ RNA の影響は細胞周期などの細胞レベルの現象から個体発生、概日リズムに至るまでのあらゆる生命現象において報告されている。すなわち、マイクロ RNA は真核多細胞生物において最も普遍的かつ重要な転写後調節機構であると言える。

動物細胞では、マイクロ RNA は「ポリ A 鎖短縮を介した mRNA 分解」と「翻訳阻害」を独立に引き起こすことで抑制効果を発揮する。これらの作用は、マイクロ RNA に結合する Argonaute タンパク質 (Ago) と、Ago に結合する TNRC6 / GW182 タンパク質 (以下 TNRC6 とする) によってもたらされる。マイクロ RNA は TNRC6 を介して脱アデニル化酵素である CCR4-NOT 複合体と相互作用することにより、mRNA のポリ A 鎖を短縮すると考えられている (Fabian et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 2014 他、図 1A)。一方、翻訳抑制に関しては、TNRC6 が CCR4-NOT 複合体を介して翻訳抑制因子 DDX6 を呼び込む可能性と (Chen et al., Mol Cell. 2014 他、図 1B)、マイクロ RNA と Ago が TNRC6 を介さない未知のメカニズムにより翻訳を抑制する可能性 (Fukaya et al., Mol Cell. 2013、図 1C) が示されている。さらに最近、申請者を含む国内外の 2 つグループが、マイクロ RNA は翻訳開始因子 eIF4A を mRNA から乖離させることを報告している (Fukao et al., Mol Cell. 2014 他、図 1D)。

これらの一見相反する部分もある報告の数々は、マイクロ RNA が複数の作用点を介して標的 mRNA を抑制する、複雑かつ巧妙な転写後制御マシナリーであると暗示している。しかしながら、これら複数の抑制機構が、実際の in vivo 環境、特に個体レベルにおいてどのように協調あるいは機能分担しながら抑制効果を発揮しているのかは、マイクロ RNA の抑制活性と生理活性を同時に解析できる適切な個体モデル実験系が存在しないこともあり、これまでほとんど明らかになっていない。

図 1 miRNA は複数の経路を介して標的 mRNA を抑制する



2. 研究の目的

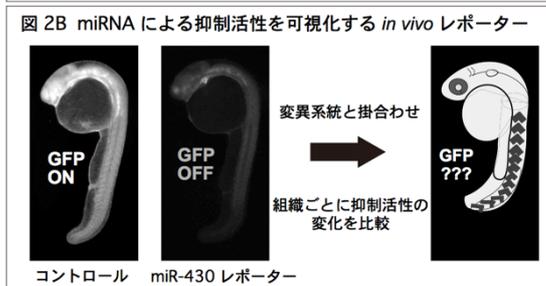
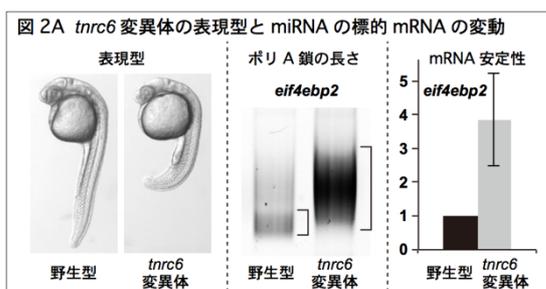
研究代表者は、小型熱帯魚ゼブラフィッシュの初期胚を in vivo モデルとして、マイクロ RNA の生理機能と作用機序の解析を行ってきた。その結果、これまでにマイクロ RNA によるポリ A 鎖短縮を発見し、ポリ A 鎖の短縮と翻訳抑制が独立に起こる現象であることを報告するなど、その分子機構の解明に貢献してきた。また予備的ながら、マイクロ RNA による抑制のコア因子である TNRC6 パラログのうち *tnrc6a* のゼブラフィッシュ 変異体や、マイクロ RNA の抑制効果を個体レベルで可視化できる GFP レポーター系統の作製に着手し、マイクロ RNA の動作原理を初期胚という個体レベルの環境において解析するための準備を進めてきた。そこで本研究では、研究代表者の上述のような技術的基盤を背景に、脊椎動物個体を用いた遺伝学的解析によって、TNRC6 タンパク質の機能を解明することを目的とする。マイクロ RNA による転写後抑制機構を個体発生のコンテキストにおいて検証することで、マイクロ RNA による転写後抑制における TNRC6 タンパク質の機能を解明することを目指す。同時に、初期発生において働くマイクロ RNA 以外の転写後制御機構についても解析を行い、マイクロ RNA の作用機序と比較することで、その特徴を浮き彫りにすることにも挑戦する。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに、TALEN と呼ばれる人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変技術により、ゼブラフィッシュに 7 つ (うち偽遺伝子と考えられるもの 2 つ) 存在する *tnrc6* パラログ遺伝子のうち、*tnrc6a* および *tnrc6b1* の変異系統をそれぞれ樹立作成している。これら 2 つのパラログは初期胚において特に高い発現を示すことから、その単独あるいは二重変異系統は、初期胚において TNRC6 タンパク質の機能が著しく損なわれた状態にあることが予想される。実際、*tnrc6a* の母性-接合子変異体は体軸が短小化するとともに、初期胚においてユビキタスに発現する miR-430 による標的 mRNA のポリ A 鎖の短縮・mRNA 分解が顕著に阻害されている (図 2A)。そこで、これらの変異系統の掛け合わせによって得られる初期胚においてマイクロ RNA による翻訳抑制を詳細に解析し、TNRC6 に依存する翻訳抑制形式の初期胚における必要性を検証する。そのために、miR-430 による抑制を可視化できる GFP レポーター系統 (Mishima et al., PNAS, 2012) との掛け合わせを行い、マイクロ RNA の TNRC6 依存性を生体内で可視化して評価する。

また、野生型および *tnrc6* 変異胚から経時的に RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な mRNA 定量法 (RNA-seq) を行う。このアプローチにより、初期胚における

mRNA 動態の全体像を理解した上で、miR-430 による mRNA 分解に特に着目して、その過程における *tnrc6* タンパク質の必要性を明らかにする。また、マイクロ RNA に依存しない mRNA 分解現象に関する高精度なデータも同時に得られることが期待されるので、それらの解析も並行して進めることで、マイクロ RNA 以外の転写後抑制機構についての知見を蓄積し、マイクロ RNA との比較によってその作動原理の共通点や相違点を明らかにすることを試みる。



#### 4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ *tnrc6a* 遺伝子の母性一接合子変異体 (MZ*tnrc6a* 変異体) を用い、マイクロ RNA による転写後抑制における TNRC6 の必要性を検証した。miR-1 により抑制されるルシフェラーゼレポーター mRNA を miR-1 とともに MZ*tnrc6a* 受精卵にインジェクションし、6 時間後にその活性を測定したところ、野生型で見られる miR-1 によるレポーターの抑制が、MZ*tnrc6a* 変異胚では効率よく起こっていないことが確認された。さらに、ポリ (A) 鎖の末端に C を 10 塩基付加し、CCR4-NOT 複合体によるポリ A 鎖の短縮化を阻害したレポーター mRNA を用いて同様の実験を行ったところ、このレポーターにおいても MZ*tnrc6a* 変異胚では miR-1 による抑制が効率よく起こっていなかった。MZ*tnrc6a* 変異胚ではマイクロ RNA 経路に関わる TNRC6 以外の主要な因子のタンパク質量は低下していなかったことから、MZ*tnrc6a* 変異胚における miR-1 の抑制活性の減少は、マイクロ RNA による抑制に関わる他のタンパク質因子の発現不全による二次的影響である可能性は考えにくい。以上の結果から、TNRC6A がポリ A 鎖の短縮を介した標的 mRNA の分解以外に、マイクロ RNA による翻訳レベルでの抑制に必要であることが強く示唆された。

(2) マイクロ RNA による転写後抑制における TNRC6 タンパク質の役割をより厳密に解析するために、*tnrc6a* と同様に初期胚で高レベルに発現している *tnrc6b1* の変異体との掛け合わせにより *tnrc6a*/*tnrc6b1* 二重変異系統を樹立した (以下二重変異体とする)。この二重変異体は生存率がかなり低いものの、一部は稔性のある成体へと成長できたため、さらに掛け合わせにより MZ 二重変異体の胚を得ることができた。MZ 二重変異胚は MZ*tnrc6a* 胚より重度の発生遅延と体軸の短小化を示したことから、*tnrc6* の機能がより損なわれた状態にあると考えられる。そこで、この MZ 二重変異胚においてマイクロ RNA による抑制活性を解析するために、miR-430 による抑制を検出する GFP レポーター (miR-430 センサー) を発現する系統と *tnrc6* 変異系統の掛け合わせを行い、二重変異体のバックグラウンドに miR-430 センサーを持つ系統を作成した。この系統の胚において GFP 蛍光を観察したところ、miR-430 による抑制がほぼ完全に解除されていた。さらに、TNRC6 の必要性をゲノムワイドに確認するために、受精後 6 時間の野生型胚と MZ 二重変異胚から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行なった。その結果、MZ 二重変異胚では 200 以上の miR-430 の標的 mRNA が特異的に上昇していることが明らかとなった。以上の結果から、個体レベルにおいて TNRC6 がマイクロ RNA による転写後抑制活性に必須であると結論した。

(3) マイクロ RNA による転写後抑制機構に関する基盤的知見を得る目的で、マイクロ RNA による mRNA 分解に関わるとされる Dcp2 と Cnot7 をゼブラフィッシュ胚で阻害した場合の RNA-seq 解析を実施した。その結果、これら 2 つの因子はマイクロ RNA 経路において全ての mRNA の分解に同様に貢献しているのではなく、むしろ不均一に貢献していることが示唆された。次に MZ 二重変異胚において同様の阻害実験を試みたが、非常に重篤な発生異常が起こったため、野生型の発生時期に相当する胚から RNA サンプルを得ることが困難であった。そのため、Dcp2 と Cnot7 に関しては野生型でのデータのみで論文としてとりまとめ、Genes to Cells 誌に掲載された (Mishima and Tomari, Genes to Cells 2017)。また、Cnot7 を阻害したゼブラフィッシュ胚では miR-430 による抑制が部分的に解除されることを、miR-430 センサー系統を用いた可視化実験においても確認することができた。

(4) ゼブラフィッシュ 初期胚におけるマイクロ RNA を含めた全ての転写後制御の全体像を明らかにする目的で、ゼブラフィッシュ卵割期 (受精後 2 時間) と原腸胚期 (受精後 6 時間) から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行なった。この際に、miR-430 をアンチセンスモルフォリノ

オリゴで特異的に阻害した場合を同時に解析することで、miR-430 に依存する転写後抑制と依存しない転写後抑制を非常に精度よく分けて解析することに成功した。その結果、卵割期から原腸胚期の間数千の母性 mRNA が分解されること、そのうち miR-430 に依存する分解は 10%程度に過ぎないことが明らかとなった。miR-430 に分解を依存しない mRNA についてさらに詳細な配列解析を行ったところ、miR-430 以外のマイクロ RNA の標的配列や、RNA 結合タンパク質の既知の結合配列が有意に濃縮されていることは確認できなかった。しかし非常に興味深いことに、miR-430 に分解を依存しない mRNA は ORF 中のコドン使用が大きく偏っていることが明らかとなった。すなわち、不安定な母性 mRNA ではゲノム中での出現頻度が低いコドンが多く使われていた。そこで、レポーター mRNA によりコドンが mRNA の安定性に及ぼす影響を実験的に検証し、実際にコドン組成がポリ A 鎖の短縮と mRNA の不安定化を引き起こすことを証明することに成功した。これは本研究の当初の目的から考えると副次的な成果ではあるが、初期発生における mRNA 制御を理解する上で極めて重要な発見であることから、予定の一部を変更して重点的に研究を進めた。その結果は国際学会の発表時にも高く評価され、最終的には *Molecular Cell* 誌に論文として掲載された (Mishima and Tomari, *Mol Cell*. 2016)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Mishima Y and Tomari Y. (2017)  
Pervasive yet nonuniform contributions of Dcp2 and Cnot7 to maternal mRNA clearance in zebrafish.  
*Genes to Cells* 22(7):670-678.  
doi: 10.1111/gtc.12504.  
査読あり
- (2) Mishima Y and Tomari Y. (2016)  
Codon usage and 3' UTR length determine maternal mRNA stability in zebrafish.  
*Molecular Cell* 61(6):874-885.  
doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.027.  
査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 三嶋 雄一郎  
Codons encode the mRNA stability code that shapes gene expression patterns via the CCR4-NOT complex  
第 89 回日本生化学会大会  
2016 年

- (2) 三嶋 雄一郎  
Hidden function of the genetic code during the maternal to zygotic transition  
第 22 回小型魚類研究集会  
2016 年
- (3) Yuichiro Mishima  
The role and mechanism of codon-mediated mRNA decay in animal development  
The 21st Annual Meeting of the RNA Society  
2016 年
- (4) 三嶋 雄一郎  
コドン適応度と 3' UTR の長さが母性 mRNA の安定性を決定する  
第 17 回日本 RNA 学会年会  
2015 年
- (5) Yuichiro Mishima  
Codon optimality and 3' UTR length determine maternal mRNA stability in zebrafish  
Protein Synthesis and Translational Control  
2015 年
- (6) 三嶋 雄一郎  
mRNA の翻訳・安定性制御をゼブラフィッシュ胚で可視化する  
第 38 回日本分子生物学会年会  
2015 年

[図書] (計 1 件)

- (1) 三嶋雄一郎ほか  
羊土社  
ノンコーディング RNA テキストブック  
2015 年 p44-45

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

UTokyo Research  
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/index.html>

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
三嶋 雄一郎 (Mishima, Yuichiro)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号: 00557069