

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07242

研究課題名(和文) 卵形成から個体形成過程における翻訳の実態と役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular nature and function of translational machineries during the course of oogenesis and development

研究代表者

小谷 友也 (Kotani, Tomoya)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70419852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子産物が正確な時期と部位で機能することは、あらゆる生命現象の進行に重要である。本研究は、卵形成と胚発生過程においてmRNAが時期・部位特異的に翻訳される制御機構の解明を目指した。その成果は、卵形成における翻訳制御機構と胚発生における翻訳制御機構に多くの共通点があること、一方で、両者の制御機構には相違点も存在することを明らかにした。これらの成果は、個体形成の仕組みを解明するために極めて重要な発見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子の形成と受精後の個体形成は、ほぼすべての生物にとって極めて重要な現象である。その進行には、卵子に蓄えられたmRNAが決まった時期に正確な場所で翻訳される必要がある。にも関わらず、その仕組みはよく分かっていない。本研究の成果は、卵子形成と個体形成に欠かせない翻訳を制御する仕組みの一端を解き明かしたものであり、すべての生物がどのように誕生し個体を形成するのか、その仕組みの解明に迫るものである。

研究成果の概要(英文)：To promote biological processes, gene products must function at appropriate timings and sites. This study aimed to elucidate the mechanisms by which gene products are produced at the appropriate timings and sites at the translational level. Our results demonstrated that mechanisms of translational regulation in oogenesis are largely coincided with those in embryogenesis. However, our results also showed that there is several differences in the mechanisms of translational regulation. These findings provide novel insights into the mechanisms of regulation of oogenesis and development.

研究分野：卵形成と発生の分子細胞生物学

キーワード：翻訳 mRNA局在 RNA顆粒 分子複合体 卵形成 初期発生 脊椎動物 高次構造

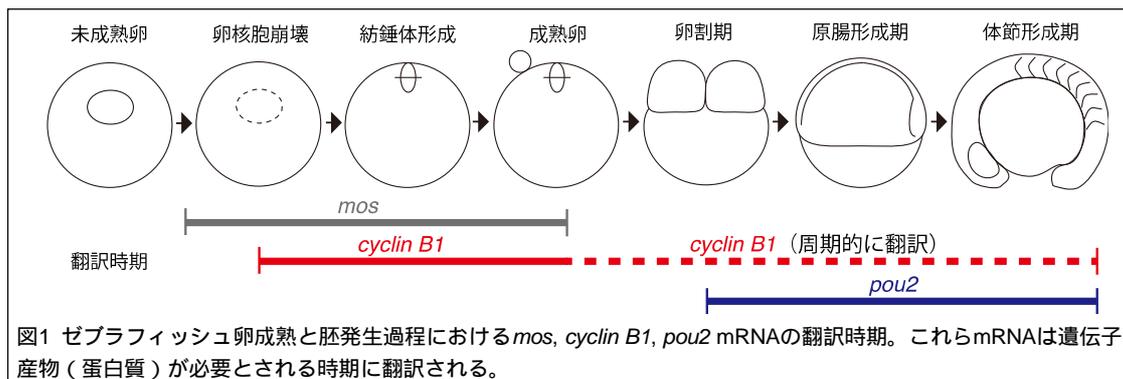
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) あらゆる生命現象は遺伝子産物が正確な部位と時期に働くことで成り立つ。遺伝子産物の機能は転写・翻訳・蛋白質の修飾で制御される。翻訳による遺伝子機能制御は、ごく一部の細胞、かつ、少数の限られた遺伝子でのみ働くと考えられてきた。しかし、最新の技術の進歩で細胞内の RNA 発現を高感度に検出することが可能となり、この技術を用いた網羅的な研究から、ショウジョウバエの胚で発現する全 mRNA の 70% が細胞内で特異的な局在を示し、ヒト培養細胞で発現する全 mRNA の 10% が微小管に局在し翻訳制御を受けることが見いだされた。これは、生物のあらゆる組織・器官において、翻訳による遺伝子機能制御が重要な役割を果たすことを示唆する。翻訳が担う役割を明らかにすることは困難だが、ごく最近、神経細胞における mRNA の局在とその翻訳制御が神経細胞のネットワーク形成、および幹細胞の維持に必須であることが示された。しかし、翻訳の分子機構を解析する方法は未だに限られており、翻訳制御の研究はその生物学的意義も含め未知の領域が多く残されている。

(2) 我々は RNA を高感度に検出する新規技術を用い、翻訳を抑制された *cyclin B1* mRNA が卵母細胞において多数の顆粒を形成し局在することを見いだしてきた (Kotani et al., 2013)。*cyclin B1* mRNA の翻訳抑制は、卵母細胞が受精可能となる過程 (卵成熟過程) で解除される。合成された Cyclin B1 蛋白質は卵母細胞に存在する Cdc2 キナーゼと複合体を形成し、卵核胞崩壊、紡錘体形成、DNA 複製なしの減数第一・第二分裂移行を進行させ、最終的に卵母細胞を受精可能な成熟卵とする。翻訳抑制を受けない *cyclin B1* mRNA を微量注入した卵母細胞は卵核胞崩壊を起こすが、正常な紡錘体を形成しない。すなわち、*cyclin B1* mRNA が時期特異的に翻訳されることが受精可能な卵の形成に重要である。我々は、1) *cyclin B1* の RNA 顆粒が翻訳の活性化と同時期に消失すること、2) 顆粒を拡散させた卵母細胞では翻訳時期が早まり、反対に、顆粒を安定化させた卵母細胞では翻訳が阻害されることを示した。すなわち、卵母細胞は顆粒を形成することで *cyclin B1* mRNA の翻訳抑制を安定化し、顆粒を拡散させることで時期特異的な翻訳を制御すると考えられる。

我々はさらに、翻訳を抑制された *mos* と *pou2* mRNA が *cyclin B1* mRNA と同様に動物極細胞質において顆粒を形成すること、しかし、これら mRNA は互いに異なる顆粒を形成することを見いだした。*cyclin B1* の RNA 顆粒は細胞質においてクラスターを形成するが、*mos* と *pou2* の RNA 顆粒は細胞質に一樣に分布した。*mos* mRNA は卵成熟開始後に翻訳され卵成熟の進行に重要な役割を果たすが、受精後の胚発生では全く翻訳されない (図 1)。*cyclin B1* mRNA は卵成熟のみでなく、受精後の胚発生過程において周期的に翻訳され、細胞分裂を推進する。一方、*pou2* mRNA は受精後に活発に翻訳され、中胚葉誘導や原腸形成に重要な役割を持つ。それぞれの翻訳制御は卵形成と個体形成において極めて重要な役割を持つが、その翻訳制御の違いがどのような仕組みで生み出されるのかは、ほとんど分かっていない。



### 2. 研究の目的

本研究は、卵形成と胚発生の進行に重要な mRNA の翻訳制御機構の実態を明らかにし、その制御機構がどのように作用し卵形成と個体形成を進行させるのかの解明を目的とした。具体的な目的は、下記の通りである。

(1) *mos* と *pou2* mRNA は *cyclin B1* mRNA と異なる時期に翻訳される。これら mRNA が *cyclin B1* と同様に顆粒構造の形成とその拡散によって翻訳制御を受けるか、あるいは異なる仕組みが存在するのかを解明する。同様に、*mos* と *pou2* mRNA が *cyclin B1* mRNA と同じく polyA 鎖の伸長によって翻訳制御を受けるか、あるいは異なる制御が存在するかを解明する。

(2) 翻訳制御の役割を変異体の回復実験によって解明する。*cyclin B1* 遺伝子の変異体は受精後 2 日ほどで胚致死となる。BAC を用い、*cyclin B1* 変異体の表現型の回復を試みる。BAC における *cyclin B1* mRNA 上のシス配列に変異を入れ、変異体の表現型が回復するか解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) *mos*, *cyclin B1*, *pou2* mRNA の局在と分布の解析

我々は RNA を高感度に検出する方法を改良し、数種類の mRNA を同時に検出することを可能にした。本研究において次の解析を行い、これら 3 種類の mRNA が卵形成と胚発生過程において同様の变化を示すのか、あるいは全く異なる变化を示すのかを明らかにする。それぞれの mRNA において polyA 鎖の伸長を解析し、mRNA の分布の変化と翻訳の開始に関連が見られるかを明らかにする。

卵母細胞が成長する過程において、*mos*, *cyclin B1*, *pou2* mRNA がどのように細胞質に蓄積されるのかを詳細に解析する。動物極細胞質への局在が同様のメカニズムで起こるのか、異なるメカニズムが存在するのかを明らかにする。

卵が成熟する過程において、*mos*, *cyclin B1*, *pou2* mRNA の局在の変化を詳細に解析する。同時に polyA 鎖の伸長の時期をそれぞれについて詳細に解析する。翻訳の活性化と RNA 顆粒の変化に共通性はあるのか、あるいは異なる機構が存在するのかを明らかにする。

胚発生過程において、*mos*, *cyclin B1*, *pou2* mRNA の局在の変化を詳細に解析する。同時に polyA 鎖の伸長の時期をそれぞれについて詳細に解析する。翻訳の活性化と mRNA 分子の状態の変化に共通性はあるのか、あるいは異なる機構が存在するのかを明らかにする。また、卵成熟過程で明らかとなった機構と共通性はあるのか、あるいは胚発生では異なる機構が用いられるのかを明らかにする。

#### (2) BAC による *cyclin B1* 変異体の回復実験

ツメガエル卵母細胞を用いた生化学的な解析から、翻訳を制御する分子機構の一端が解明されて来た。しかし、生命現象において翻訳制御が果たす役割は未だにほとんど分かっていない。ゼブラフィッシュで同定された *cyclin B1* 変異体は、胚発生の初期に細胞死を起こし致死となる。本研究において、*cyclin B1* 遺伝子を含む BAC (bacterial artificial chromosome) クローンを変異体のゲノムに挿入し、その発現を再現することで表現型を回復させる。

トランスポゾン転移システムを用い、*cyclin B1* 遺伝子を持つ BAC クローンを変異体のゲノムに挿入する。BAC クローンによって変異体の表現型が回復することを確認する。

BAC クローンにおける、*cyclin B1* 遺伝子の新規シス因子に変異を導入する。この変異は、卵母細胞における *cyclin B1* mRNA の局在と翻訳制御機構を変化させる。変異を入れた BAC クローンを *cyclin B1* 変異体のゲノムに挿入し、表現型が回復するか解析する。胚致死の表現型が回復した場合、mRNA の局在と翻訳制御機構は卵母細胞特異的な役割を持つ。反対に、胚致死の表現型が全く回復しない、あるいは部分的にのみ回復した場合、新規シス因子を介した mRNA の局在と翻訳制御機構が胚発生においても重要な役割を持つ。胚発生過程と卵母細胞形成過程における詳細な解析を行い、翻訳制御機構が果たす役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) *mos*, *cyclin B1* mRNA の局在と分布の変化、翻訳制御機構の共通点と相違点

キンギョの卵母細胞において、Mos 蛋白質は卵成熟の開始直後に合成されることが示されている (Kajiura-Kobayashi et al., 2000)。本研究において我々は、*mos* mRNA がゼブラフィッシュ卵母細胞の動物極細胞質に局在し、*cyclin B1* mRNA と同様に顆粒状の構造をとることを明らかにした。*mos* mRNA と *cyclin B1* mRNA を同時に検出した結果、これら mRNA は動物極細胞質において異なる顆粒を形成し、さらに分布様式が異なることが示された。ショ糖密度勾配遠心法によってこれら RNA 顆粒を分画した結果、いずれも非常に密度の高い画分に回収されるものの、*mos* と比較し *cyclin B1* の RNA 顆粒はより高密度の画分に多く存在することが明らかとなった。以上の結果は、*mos* と *cyclin B1* mRNA が異なる巨大分子複合体を形成することを示唆する。さらに、RNA 顆粒の変化を詳細に解析した結果、*cyclin B1* の RNA 顆粒は卵核崩壊までの特定の時期に急激にその数を減少させるのに対し、*mos* の RNA 顆粒はそれより早い時期に徐々にその数を減少させること、それぞれの mRNA の polyA 鎖の伸長が顆粒消失の時期と一致することが明らかとなった。また、*cyclin B1* の RNA 顆粒消失はアクチン繊維の脱重合に依存するのに対し、*mos* の RNA 顆粒は大部分がアクチン繊維に関係なく消失した。以上の結果から、RNA 顆粒ごとに異なる制御機構が存在し、これが卵形成過程における時期特異的な翻訳を実現すると考えられる。

#### (2) *dazl*, *cyclin B1* mRNA の局在と分布の変化、翻訳制御機構の共通点と相違点

*dazl* mRNA はゼブラフィッシュ卵母細胞の植物極に局在し、受精後に翻訳されることで生殖細胞形成に重要な役割を果たすと考えられる。本研究において、ゼブラフィッシュ・マウスの卵巣で二種類の mRNA を同時に高感度・高解像度で検出する技術を確立し、*dazl* と *cyclin B1* mRNA が異なる顆粒構造を形成し、局在することを明らかにした。具体的には、ゼブラフィッ

シユ卵母細胞で*cyclin B1* mRNAは動物極細胞質に、*dazl* mRNAは植物極細胞質に顆粒構造として局在し、一方、マウス卵母細胞では*Cyclin B1*と*Dazl* mRNAは卵細胞質全体で異なる顆粒構造として分布した。これは、種を超えて保存される現象(顆粒の形成)と種によって異なる現象(異なる領域への局在と同じ領域における局在)を明らかにしたもので、それぞれの生物種における*Dazl*蛋白質の働きの違いを反映していると考察される。

### (3) *pou2*, *cyclin B1* mRNAの局在と分布の変化、翻訳制御機構の共通点と相違点

*pou2* mRNAはゼブラフィッシュ卵母細胞の動物極に局在し、受精後に翻訳されることで細胞の分化と背腹軸の形成に重要な役割を果たす。ゼブラフィッシュ卵母細胞で、*cyclin B1*と*pou2* mRNAはどちらも同じ動物極細胞質で顆粒構造をとり分布するものの、これらmRNAは異なる顆粒として存在することが明らかとなった。さらに、*cyclin B1*のRNA顆粒が卵の成熟に伴い消失したのに対し、*pou2*のRNA顆粒は成熟卵においても維持された。さらに、*pou2* mRNAのpolyA鎖の伸長を解析した結果、卵成熟過程でpolyA鎖の長さに変化はないものの、受精後2時間から伸長することが明らかとなった。興味深いことに、*pou2*のRNA顆粒はpolyA鎖が伸長する時期においてもその数を減少させることがなかった。これは、卵母細胞で形成される2種類の顆粒が異なる制御を受けること、卵成熟と胚発生における翻訳制御機構は多くの点で共通するものの、一部に異なる機構を有することを示唆する。

### (4) *cyclin B1* mRNAに特異的に結合するPumilio1蛋白質のリン酸化解析

Pumilio1蛋白質は、酵母からヒトまで高度に保存された配列特異的RNA結合蛋白質である。ツメガエル、ゼブラフィッシュ、マウス卵母細胞において、Pumilio1は*cyclin B1* mRNAに特異的に結合し、その翻訳時期を制御するとされてきた。しかし、Pumilio1がどのように標的mRNAの翻訳を制御するのか、そのメカニズムは全くわかっていない。我々は、ゼブラフィッシュ卵母細胞においてPumilio1が複数部位でリン酸化を受けることを示した。詳細なタイムコースの解析から、リン酸化が起こる時期は標的mRNAの翻訳が開始される約60分前であることを明らかにした。我々はアクチン繊維の脱重合によって*cyclin B1* mRNAの顆粒構造が消失し、これがmRNAの翻訳時期を早めることを示してきた。アクチン繊維の脱重合はPumilio1のリン酸化を促すとともに、*cyclin B1* mRNAのpolyA鎖の伸長をもたらし、反対に、RNA結合領域を欠損したPumilio1の発現は、内在のPumilio1のリン酸化と*cyclin B1* mRNAの翻訳を阻害した。これらの結果は、Pumilio1のリン酸化が標的mRNAの翻訳促進に重要であることを示唆する。

### (5) BACによる*cyclin B1* 変異体の回復実験

本研究において、我々はBACクローンの効率的な組換え技術を研究室において確立し、*cyclin B1* 遺伝子を含む130 kbpのBAC配列をトランスポゾン配列に組み込むことに成功した。このBAC配列をゼブラフィッシュ受精卵の細胞質に微量注入し、成魚まで育てた。これら個体から得られた稚魚からゲノムDNAを抽出し、PCRによってBAC配列が挿入されたか否かを判定した。200匹を超える個体から得られた稚魚を解析したが、BAC配列をもつ個体を得ることは出来なかった。

次に、BAC配列を微量注入した個体を5日間と1ヶ月間育て、すべての稚魚からゲノムDNAを抽出し、BAC配列の有無を検出した。50匹を超える稚魚を解析した結果、5日目の稚魚のゲノムDNAにBAC配列が存在することを確認できたものの、1ヶ月まで成長した稚魚の中でBAC配列を持つ個体は存在しなかった。以上の結果から、*cyclin B1* 遺伝子を含むBAC配列はゼブラフィッシュの発生において有害であると結論した。*cyclin B1* 遺伝子におけるシス配列の生物学的意義を明らかにするため、現在はゲノム編集による変異導入を試みている。

### <引用文献>

Kotani T, Yasuda K, Ota R, Yamashita M. Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules. **Journal of Cell Biology**, vol.202, p1041-1055, 2013.

Kajiura-Kobayashi H, Yoshida N, Sagata N, Yamashita M, Nagahama Y. The Mos/MAPK pathway is involved in metaphase II arrest as a cytostatic factor but in neither necessary nor sufficient for initiating oocyte maturation in goldfish. **Development Genes and Evolution**. 210, 416-425, 2000.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Saitoh A, Takada Y, Horie M, \*Kotani T. (\*Corresponding author). Pumilio1 phosphorylation precedes translational activation of its target mRNA in zebrafish oocytes. **Zygote**, (査読あり) vol.26, p372-380, 2018. DOI: 10.1017/S0967199418000369.

Takei N, Nakamura T, Kawamura S, Takada Y, Satoh Y, Kimura A.P, \*Kotani T. (\*Corresponding author). High-sensitivity and high-resolution *in situ* hybridization of coding and long non-coding RNAs in vertebrate ovaries and testes. **Biological Procedures Online**, (査読あり) vol.20, issue.6, 2018. DOI: 10.1186/s12575-018-0071-z.

Horie M, \*Kotani T. (\*Corresponding author). Formation of *mos* RNA granules in the zebrafish oocyte that differ from *cyclin B1* RNA granules in distribution, density and regulation. **European Journal of Cell Biology**, (査読あり) vol.96, p563-573, 2016. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.10.001.

〔学会発表〕(計 11 件)

高田裕貴, 小谷友也: 哺乳類の卵形成と胚発生における Pou5f1/Oct4 の発現解析. 第 63 回日本動物学会北海道支部大会, 2019 年 3 月, 北海道大学理学部 (札幌市)

小谷友也: ゼブラフィッシュとマウス卵形成における翻訳調節機構. 第 89 回日本動物学会札幌大会, 2018 年 9 月, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

高田裕貴, 小谷友也: マウス卵形成および胚発生における Pou5f1/Oct4 発現解析. 第 89 回日本動物学会札幌大会, 2018 年 9 月, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

武井夏海, AZ Balboula, 高橋昌志, 小谷友也: マウス卵母細胞における *Emi2* mRNA の時期特異的な翻訳制御機構. RNA フロンティアミーティング 2017, 2017 年 11 月, 比叡山延暦寺会館 (大津市)

武井夏海, AZ Balboula, 高橋昌志, 小谷友也: マウス卵母細胞における RNA 顆粒形成を介した *Emi2* mRNA の翻訳制御機構の解明. 第 88 回日本動物学会富山大会, 2017 年 9 月, 富山県民会館 (富山市)

Takei, N., Balboula, AZ., Takahashi, M., Kotani, T. Disassembly of *Emi2* RNA granules in meiosis II is coupled with translational activation of mRNA in mouse oocytes. 18th International Congress of Developmental Biology, June 2017, University Cultural Centre, National University of Singapore, Singapore

川村翔平, 齋藤篤, 小谷友也: 卵成熟における翻訳制御に重要な RNA 顆粒形成の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月, パシフィコ横浜 (横浜市)

川村翔平, 齋藤篤, 小谷友也: 卵母細胞の減数分裂進行における RNA 顆粒形成を介した翻訳制御機構. RNA フロンティアミーティング 2016, 2016 年 9 月, 北海道ニセコいこいの湯宿いろは (ニセコ町)

川村翔平, 齋藤篤, 小谷友也: マウス卵母細胞において *Mad2* mRNA の翻訳を制御するメカニズム. 日本動物学会北海道支部第 61 回大会, 2016 年 8 月, 旭川医科大学 (旭川市)

武井夏海, AZ balboula, 高橋昌志, 小谷友也: 卵母細胞において減数分裂第二分裂で翻訳される *Emi2* mRNA の制御機構解析. 日本動物学会北海道支部第 61 回大会, 2016 年 8 月, 旭川医科大学 (旭川市)

<sup>11</sup> 前畑香織, 小谷友也: ゼブラフィッシュ *pou2* mRNA の卵成熟から初期発生における翻訳制御機構の解析. 日本動物学会北海道支部第 61 回大会, 2016 年 8 月, 旭川医科大学 (旭川市)

〔図書〕(計 1 件)

\*Kotani T., Maehata K, Takei N. (\*Corresponding author) Regulation of translationally repressed mRNAs in zebrafish and mouse oocytes. In: Klock, M., ed. Oocytes: Maternal information and functions. **Results and Problems in Cell Differentiation**, vol.63, Chapter 13, p297-324, 2017.

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。