

令和元年6月10日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07383

研究課題名(和文)母性効果因子によるRNA制御とリプログラミングに関する研究

研究課題名(英文)Research on RNA regulation and reprogramming by maternal effect factors

研究代表者

品川 敏恵 (Toshie, Shinagawa)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・部長

研究者番号：70344041

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)：受精からしばらくの間RNAの転写は起こらず、この間の胚発生は、受精前に卵子に蓄えられたRNAと蛋白質によって制御されていると考えられているが、その機構は良く分かっていない。私達は受精後の接合子ゲノム活性化に必要な母性効果因子zygote arrest 1 (Zar1) がどのようなRNAの制御に関わっているのか調べた。その結果Zar1は卵子の減数分裂に関わるmRNAの3' UTRに多く結合することが明らかとなった。本研究の結果は、減数分裂に関わるmRNAの制御が初期胚の発生の進行に重要であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化した卵子では減数分裂の異常がしばしば観察される。卵子中のZar1の発現量は年齢が高くなるにつれ減少することが知られており、Zar1の減少と減数分裂の異常、卵子の老化は密接に関わっていると考えられる。本研究の結果は、卵子の老化メカニズム解明に大きなヒントを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Zygotic genomes are transcriptionally silent for a while after fertilization. Pre-implantation embryo development is dependent on RNAs and proteins stored in oocyte but it is yet unknown how they are regulated. In this study, we found that zygote arrest 1 (Zar1), a maternal effect factor required for zygotic genome activation, is enriched on 3' UTR of mRNAs that are involved in oocyte meiosis. The results suggest that regulation of meiosis-related genes is important for development of early embryos.

研究分野：発生学

キーワード：母性効果因子 Zar1 Zar2 RNA結合因子 減数分裂

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

1. 研究開始当初の背景

受精からしばらくの間 RNA の転写は起こらず、mRNA 合成を阻害しても自律的に二細胞期へと発生が進行する。この間の胚発生は、受精前に卵子に蓄えられた RNA と蛋白質によって制御されていると考えられているが、その機構は良く分かっていない。卵子中の因子のうち、母方の遺伝子欠損のみで胚の初期発生に異常が見られるものは母性効果因子と呼ばれている。代表的母性効果因子である zygote arrest 1 (Zar1) は、受精後の接合子ゲノム活性化に必要な RNA 結合蛋白質で、Zar1 を欠損した卵子は野生型の精子と受精しても発生が二細胞期で止まってしまう。Zar1 がどのような RNA との相互作用を介して接合子ゲノム活性化を制御しているのかは不明である。

私達はこれまでに、卵子中に大量に蓄積されているヒストンバリエーションの TH2A/TH2B が、受精後の雄性前核の活性化に重要で、山中四因子による iPS 細胞作製効率を著しく上昇させることを報告してきた (Cell Stem Cell, 2014)。TH2A/TH2B が母性効果因子であったことから、母性効果因子の中にはリプログラミング促進効果を有するものが他にも存在する可能性がある。Zar1 と Zar2 はリプログラミング因子 Lin28 とマウス受精卵の細胞質に共局在し、RNA を介して Lin28 と結合していることが示されており (Hu, 2010)、受精後に起こるリプログラミングに何らかの役割を果たしているのではないかと推察された。また、Zar1 の卵巣での発現は、年齢が高くなるにつれ減少することが報告されており (Sharov, 2008)、加齢に伴う卵子機能の低下とも関連している可能性が考えられた。このように、Zar1/Zar2 は受精後に起きる接合子ゲノム活性化やリプログラミングに深く関係していると考えられ、Zar1/Zar2 がどのような RNA を標的にして機能を発揮しているのか大変興味深い。

2. 研究の目的

本研究では、Zar1 および Zar2 の標的 RNA を同定し、これらが接合子ゲノム活性化やリプログラミングにどのように関わっているのかが明らかにすることを目的とした。ES 細胞で発現しているリプログラミング因子として、Oct4 や Sox2、Klf4 をはじめとする転写因子群が同定されており、体細胞のリプログラミングには、これらの転写因子群によって多能性幹細胞の維持に必要な転写因子ネットワークが再構築される必要があると考えられている。一方で、受精や体細胞核移植の際のリプログラミングは、転写がオフの状態で行われる。このことは、転写因子を基本とするリプログラミング系とは全く異なる機構が、受精や体細胞核移植の際に働いていることを示している。受精や体細胞核移植の際のリプログラミングでは、高い多分化能を有する細胞をごく短時間で得られるという特徴があり、これを *in vitro* で再現出来れば自分の細胞を用いたオーダーメイド再生医療への足がかりになると期待される。

3. 研究の方法

Zar1 や Zar2 が mRNA に結合するかどうか調べるために、HA タグ付きのマウス Zar1 または Zar2 を NIH3T3 細胞に過剰発現させ、細胞抽出液からオリゴ dT 磁気ビーズを用いて mRNA に結合する蛋白質を回収し、ウエスタンブロットを行って Zar1 や Zar2 が含まれているか調べた。また、Zar1 または Zar2 を過剰発現させた NIH3T3 細胞の抽出液からショ糖密度勾配で mRNP やポリリボソームを分画しどの分画に Zar1 と Zar2 蛋白質が存在するかウエスタンブロットで確認した。標的 RNA を調べるために RNA 免疫沈降と次世代シーケンスを組み合わせた PAR-CLIP-sequence をおこない、Zar1 に結合した RNA 配列を解析した。レトロウイルスベクターを用いて Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc を過剰発現させた iPS 細胞誘導系に Zar1/Zar2 を過剰発現させ核のリプログラミング効率が上昇するか調べた。

4 . 研究成果

NIH3T3 細胞にマウスの Zar1 や Zar2 を過剰発現させ、細胞抽出液を磁気ビーズに結合させた mRNA と反応させたところ、Zar1 も Zar2 も mRNA に結合することが分かった。さらにこの細胞抽出液をショ糖密度勾配で分画することにより、Zar1 と Zar2 が主にポリリボソーム画分にある mRNA に結合していることが分かり、翻訳調節に関わっている可能性が考えられた。免疫沈降と次世代シーケンスを組み合わせた PAR-CLIP- sequence の解析から Zar1 は卵子の減数分裂に関わる遺伝子の mRNA の 3' UTR に多く結合していることが明らかとなった。Zar1/Zar2 には iPS 細胞作製の促進効果がほとんど無かった。したがって Zar1/Zar2 は核のリプログラミング因子ではなく、mRNA の 3' UTR にある標的配列に結合して減数分裂に関わる mRNA を制御している因子であると考えられた。Zar1/Zar2 による mRNA 制御が翻訳調節によるものなのかどうか今後さらに詳しく調べる必要がある。本研究の結果は、減数分裂に関わる mRNA の制御が初期胚の発生の進行に重要であることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Padavattan S, Thiruselvam V, Shinagawa T, Hasegawa K, Kumasaka T, Ishii S, Kumarevel T. Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. *Biophys Chem.* 2017; 221: 41-48. 査読有
DOI: 10.1016/j.bpc.2016.11.013.

〔学会発表〕(計 2 件)

品川 敏恵, Huynh L. M., 石井 俊輔, 高齢マウスにおける精原幹細胞維持にヒストンバリエント TH2A と TH2B が貢献している、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017

Huynh L. M., Shingawa T, Ishii S. Two histone variants TH2A and TH2B facilitate human iPS cell generation. *Cell Symposia: 10 Years of iPSCs, California, USA, 2016.*

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。