

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07405

研究課題名(和文) 減数分裂再開時に起こる母性mRNAトリミング機構

研究課題名(英文) Trimming of maternal mRNA during meiosis reinitiation

研究代表者

千葉 和義 (CHIBA, KAZUYOSHI)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：70222130

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)：ヒトデ卵母細胞の母性mRNAサイクリンBには、短いポリA鎖の3'端にオリゴUが結合している。通常オリゴU配列は、他の生物においてはmRNA分解に働くが、ヒトデでは分解されない。本研究によって、減数分裂再開時には、脱U化酵素活性がポリA化酵素の活性上昇と競合する結果としてトリミングが途中で終了し、ポリA伸長すると結論した。さらに、リボソームタンパク質mRNAも解析することで、U化は、分解が再利用かを選択する前シグナルとして働いていることを明らかにした。減数分裂再開時にポリA化を引き起こすために必要な細胞内pHの制御についても研究を進め、J.Cell Biol.2報が採択されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リボソームタンパク質mRNAの3'末端の長いポリA鎖が、ホルモン刺激後に短縮された後に、新たに塩基のオリゴUが結合すること、さらに驚くべきことに、胞胚期以降にオリゴUからポリA鎖が再伸長して、翻訳活性化することを明らかにした。すなわち、一度使われたmRNAのポリAが短縮し、再伸長することを明瞭に示した初めての例である。また、母性mRNAのU化意義が、動物胚の発生ステージ依存的に翻訳抑制からmRNA分解へと変わることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Maternal cyclin B mRNAs with short poly(A) tails are uridylylated in starfish oocytes. Generally, uridylylated tails mediate mRNA decay, but starfish cyclin B mRNAs are not destructed in oocytes. In this study, we concluded that the activity of exoribonuclease removing uridines competes with poly(A) polymerase, causing trimming block and poly(A) elongation. In addition, we found that uridylation may be the signal determining decay or reuse. We published two papers in JBC showing intracellular pH regulation during meiosis resumption involved in poly(A) elongation.

研究分野：発生生物学

キーワード：ヒトデ mRNA ウリジル化 ポリA 減数分裂 ホルモン 翻訳 母性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

初期発生には、卵内母性 mRNA のポリ A 鎖伸長による翻訳活性化が必須である。当分野の第一人者 Richter らはホルモン刺激したアフリカツメガエル卵で、『mRNA に結合した CPEB (cytoplasmic polyadenylation element (CPE) -binding protein) がリン酸化されると脱アデニル化酵素 (ポリ A 鎖を短くする酵素) が働かなくなる。その結果、ポリ A ポリメラーゼによりポリ A 鎖が伸長する』というモデルを提出している。現在ひろく信じられているこの説によれば、ホルモン刺激前の GV 卵でポリ A が伸びないのは、脱アデニル化酵素がポリ A 鎖を削っているからだ。しかし、どのような仕組みで GV 卵のポリ A 鎖長が 10 塩基程度に保たれているのか、なぜ脱アデニル化酵素によって、もっと削られないのかは、明らかでない。この問題は、アフリカツメガエル研究においても、申請者が知る限り、取り上げられていなかった。本質的な問題が未解決のまま取り残されているのだ。

そこで申請者らは、ホルモン処理 GVBD (卵核胞崩壊 = 核分裂 = 減数分裂再開) が速やかに起こるメリットをもつヒトデ卵を用い、カエル卵でのモデルを確認したところ、たしかにサイクリン B の mRNA では、アフリカツメガエルと同様に CPEB は GVBD 時にリン酸化され、ポリ A が伸長した (Ochi et al., 2016)。さらに申請者らは、GV 卵の短いポリ A 鎖には数塩基のウリジン (U) が結合しており、ホルモン刺激によって U が除去されポリ A 鎖が伸長することことを明らかにした (Ochi and Chiba, 2016)。申請者らは人工合成したサイクリン B の 3' UTR 領域に短い U をつけたものを、ヒトデ卵にマイクロインジェクションしたところ、先に述べた内在性の mRNA の 3' 変化を完全に再現した。すなわち、ホルモンなしでは注入された RNA は安定的に存在したが、ホルモンで処理すると速やかに U が除去され、ポリ A が伸長した (Ochi and Chiba, 2016)。さらに興味深いことに、この U を分解する酵素は、U だけでなく部分的には短いポリ A や、さらに上流部分もトリミングした。

以上まとめれば、Richter のカエル卵母性 mRNA のポリ A 伸長モデルは、ヒトデにおいては適用できない。すなわち、GV 卵では 3' 端オリゴ U が結合した母性 mRNA は安定であり、ホルモン刺激に伴って未知の脱 U 化酵素によるトリミングが起こり、引き続いてポリ A 化酵素の活性化がポリ A 伸長を引き起こす。この母性 mRNA の翻訳活性化モデルはこれまでに報告されたことがない全く新しいものである。

### 2. 研究の目的

哺乳類を含む脊椎動物などでは、mRNA が U 化されると、分解・代謝される (Chang et al. 2018; Lim et al. 2014)。すなわち、U 化は mRNA 分解シグナルとしてはたらいていることは広く受け入れられている。しかし、前述のように、ホルモン処理前のヒトデ卵では U 化されていても mRNA は安定であり、さらにホルモン処理によって U はトリミングされるが mRNA そのものは安定的に存在し、むしろポリ A 伸長するために翻訳が活性化される。では、ヒトデは特殊な生物であって、U 化は mRNA 分解シグナルとしてはたらいていないのであろうか、もしくは状況によって (発生段階によって) U 化は mRNA 分解シグナルとしても、はたらいているのだろうか。この大きな問題にとりかかると、まずは、ヒトデの母性 mRNA の翻訳活性化機構を明らかにする。すなわち (1) トリミングが途中で終了して、ポリ A が伸長するために必要な 3' UTR 構造の解明、さらにその構造を手掛かりに、(2) トリミングに関わる分子の同定、(3) トリミング終了とポリ A 鎖伸長に関わる分子の同定、を行う。それらを含めて、オリゴ U を付加または除去する反応機構、そしてヒトデにおける U 化の意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、「U 化 = 分解シグナル」説が、ヒトデ卵では「U 化 = トリミング」としてはたらいている可能性がある。すなわち、「U 化 = 部分分解 = トリミング」では、母性 mRNA において、分解を途中で抑制する機構があれば、トリミング停止が実現されていることになる。(トリミングが終了しなければ発生・細胞分裂に不可欠なサイクリン B が、分解され尽くされて、致死となってしまふ。) よってこのトリミング停止機構は、初期発生の理解のために大変重要なテーマであるといえる。

トリミングが終わる領域に Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) が結合する「AAUAAA」配列が存在するので、仮説「トリミング酵素が CPSF によって mRNA から解離することで、トリミングが終了する」の真偽を明らかにする。具体的には、CPSF 結合配列 (AAUAAA) を、含む、または含まない、mRNA 3' 領域 RNA を *in vitro* で合成し、それを卵母細胞にマイクロインジェクションした後に、卵をホルモンで処理した時に、完全分解が起こるか部分分解 (トリミング) が起こるのかを明らかにする。もしも CPSF 結合配列無で完全分解されれば、トリミング停止という新たな機能を CPSF 結合配列が保持していることを証明することができる。仮説通り、CPSF が、このトリミング終了に関わっているならば、無細胞系でのトリミングアッセイシステムの開発にとりかかる。予備的な実験では、ホルモン刺激済の GVBD 卵の抽出液中で、人工合成 mRNA がトリミングされたので、*in vitro* アッセイ系を確立する。抗 CPSF 抗体を用いた免疫沈降で、CPSF を除去した卵抽出液を用いてトリミングアッセイを行うことも可能である。しかし、もしも予想とは異なり、「AAUAAA」配列にはトリミング終了機能がなければ、3' 5'への分解 (トリミング) に拮抗するポリ A 伸長活性のために、分解が抑制される可能性も考えられる。その場合は、戦略を修正して、サイクリン B だけでなく、他の

mRNA における U 化の関与や、発生段階において U 化の生理的意義の変化があるかどうかについて明らかにする。

#### 4. 研究成果

短いポリ A 末端から 20 塩基上流に存在する、CPSF 結合配列 (AAUAAA) を、含む、または含まない、mRNA 3' 領域 RNA を *in vitro* で合成し、それを卵母細胞にマイクロインジェクションした後に、卵をホルモンで処理した。その結果、mRNA トリミングは起こるが、予想に反して分解は亢進されなかった。すなわち、20 塩基上流 CPSF 結合配列 (AAUAAA) にはトリミング終了機能がないことが明らかになった。この結果は、mRNA の構造によってトリミングが停止するのではなく、むしろ減数分裂再開時には、脱 U 化酵素活性がポリ A 化酵素の活性上昇と競合する結果としてトリミングが途中で終了し、ポリ A 伸長することを示唆する。実際、CPSF 結合配列の 3' 側やそれを通り越してのトリミング停止が、内在性 mRNA においても起こっている結果が得られたので、上記の可能性が高いと考えている。これらの結果は、CPSF によってトリミングは制御されていないことを意味するので、当初の計画を変更し、U 化と脱 U 化反応を、より直接的に減数分裂再開過程で観測できる mRNA を探索した。すなわち、サイクリン B mRNA においては、卵母細胞において、すでに U 化されており、U 化機構を明らかにすることは困難である。

探索の結果、リボゾームタンパク質 mRNA の 3' 末端は、ホルモン処理以前では長いポリ A であり、翻訳活性が高いが、ホルモン刺激後、速やかにポリ A 鎖は短縮し、U 化され、不活性化されることが分かった。ホルモン刺激前は卵形成過程であり、カエルを含む多くの動物卵においても、リボゾームタンパク質 mRNA のポリ A 鎖は長く、活発に翻訳されていることは知られている。またホルモン刺激によって、リボゾームタンパク質 mRNA のポリ A 鎖は短縮し、翻訳が不活性化され、分解されることも報告されている (U 化されているかどうかは報告されていない)。ところが、驚くべきことに、ヒトデ卵リボゾームタンパク質 mRNA は U 化されるが分解されず、受精後の胞胚期でポリ A が伸長されることが明らかになった。この結果は、人工的に合成したリボゾームタンパク質 mRNA の 3' 領域を卵にマイクロインジェクションして受精させた時にも再現されたので、母性 mRNA のポリ A が再伸長したものであることが、確認できた。すなわち、翻訳に使われた mRNA のポリ A が短縮し不活性化されるが、分解を受けず、発生過程で再伸長することを明瞭に示した初めての例となった。

以上の結果は、サイクリン B だけでなくリボゾームタンパク質 mRNA においても 3' 末端の U 修飾が mRNA の分解を引き起こすものではなく、新たなポリ A 化を引き起こすまでの翻訳阻害として働いていることを示している。それでは、ヒトデにおいて U 化は、分解の引き金となることはないのだろうか。このことを確かめるために、他の生物において胞胚期以降に分解されるサイクリン B mRNA に着目して、ヒトデにおいても分解されるのかどうか、そして分解されるなら U 化が先んじて起こっているかどうか、を確かめた。その結果、ヒトデ胚サイクリン B mRNA は確かに分解され、分解前には U 化が起こっていることが明らかになった。

これらの知見から、U 化には RNA 分解誘導シグナル以外に、短縮したポリ A 鎖を持った mRNA を分解せずに維持して、必要な時期に再伸長させる意義があることが明らかになった (図)。他の生物において、このポリ A 再伸長がこれまで報告されていなかった理由としては、新規の mRNA 合成によるポリ A 化と、分解過程の短いポリ A をもつ mRNA のポリ A 再伸長の区別が、困難であるためなのかもしれない。今回、新規の mRNA 合成が抑制されているヒトデ母性 mRNA に着目することで、初めてポリ A 鎖再伸長を明瞭に明らかにできた。今後、他の生物においても、このモデルに適合する事例が出てくることが期待できるだろう。

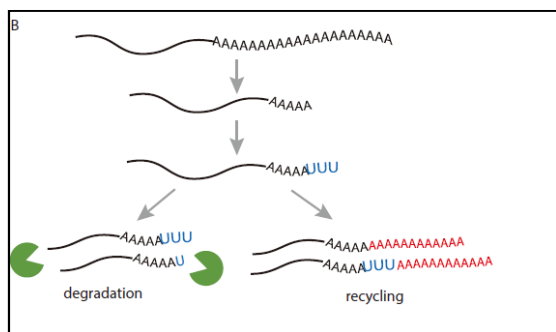


図 U 化には、分解と再利用の 2 つの意義がある。

なお本成果については、現在、原著論文を作成しており、近日中に投稿予定である。

さらに、減数分裂再開時にポリ A 化を引き起こすために必要な細胞内 pH の制御についての研究についても研究を進め、*J. Cell Biol.*において 2 報 (Hosoda et al., 2019; Hiraoka et al., 2019) が採択されている。本研究以前には、サイクリン B mRNA ポリ A 化には、ホルモン刺激によって cdk1 の活性化が必要であり (Ochi et al., 2016)、そのために三量体 G タンパク質の活

性化から PI3 キナーゼの活性化が誘導されることはすでに明らかになっていた。しかし、何が cdk1-サイクリン B 活性化を担っているのかは不明なままであった。本研究では、あらたに serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK)を同定し、TORC2 と PDK1 によってリン酸化された SGK が cdc25 をリン酸化することで活性化し、cdc25 が cdk1 を脱リン酸化することで活性化し、GVBD が引き起こされることを明らかにした。なお SGK は細胞内 pH 上昇に関わる NHE をリン酸化することで、サイクリン B mRNA のポリ A 鎖伸長が起こる (Ochi et al., 2016)。また本研究では、GVBD 以降の紡錘体形成には細胞内 pH の上昇が必要であることも、明らかにした。これまで、カエルやマウスなど多くの生物で、卵母細胞の減数分裂再開過程が研究されてきたが、ホルモンから cdk1 までの経路は、未だ完全には解明されていない。本研究によって、ヒトで最も詳細に分子経路を解明できたといえるだろう。

今後は、ホルモンによる PI3K の脂質代謝活性化がどのように SGK の活性化につながり、翻訳が制御されるのかについて、さらに研究を進めたい。

#### 参考文献

Chang H., Yeo J., Kim J.G., Kim H., Lim J., Lee M., Kim H.H., Ohk J., Jeon H.Y., Lee H. et al. 2018.

Terminal uridylyltransferases execute programmed clearance of maternal transcriptome in vertebrate embryos.

Mol. Cell. 2018; 70:72–82.

Lim J, Ha M, Chang H, Kwon SC, Simanshu DK, Patel DJ, Kim VN. 2014

Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation.

Cell 159, 1365–1376.

Ochi H, Aoto S, Tachibana K, Hara M., and Chiba K. 2015

Block of Cdk1-dependent poly(A) elongation of cyclin B mRNA in MI-arrested starfish oocytes is released by intracellular pH elevation upon spawning

Mol Reprod Dev 83. 79-87.

Ochi, H, and Chiba, K. 2016

Hormonal stimulation of starfish oocytes induces partial degradation of the 3' termini of cyclin B mRNAs with oligo(U) tails, followed by poly(A) elongation.

RNA 22. 822-829.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tamura, R., Takada, M., Sakaue, M., Yoshida, A., Ohi, S., Hirano, K., Hayakawa, T., Hirohashi, N., Yura, K., and Chiba, K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Starfish Apaf-1 activates effector caspase-3/9 upon apoptosis of aged eggs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19845-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hosoda Enako, Hiraoka Daisaku, Hirohashi Noritaka, Omi Saki, Kishimoto Takeo, Chiba Kazuyoshi	4. 巻 218
2. 論文標題 SGK regulates pH increase and cyclin B-Cdk1 activation to resume meiosis in starfish ovarian oocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3612 ~ 3629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201812133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiraoka Daisaku, Hosoda Enako, Chiba Kazuyoshi, Kishimoto Takeo	4. 巻 218
2. 論文標題 SGK phosphorylates Cdc25 and Myt1 to trigger cyclin B?Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3597 ~ 3611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201812122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Kazuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Oocyte Maturation in Starfish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 476 ~ 476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9020476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 CHIBA Kazuyoshi
2. 発表標題 Meiosis reinitiation and apoptosis of starfish oocytes/eggs
3. 学会等名 Fifth International Oocyte Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YAMAZAKI Haruka , KAJITANI Reii, ITO Takehiko , CHIBA Kazuyoshi
2. 発表標題 Uridylation of ribosomal protein mRNA in starfish oocytes
3. 学会等名 Fifth International Oocyte Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 AIDA Sakurako, HIRAOKA Daisaku, HOSODA Enako, CHIBA Kazuyoshi
2. 発表標題 Hormone-induced pathway for cortical granule exocytosis in starfish oocyte
3. 学会等名 Fifth International Oocyte Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎はるか, 梶谷嶺, 伊藤武彦, 千葉和義
2. 発表標題 イトマキヒトデ卵におけるリボソームタンパク質のU修飾
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高岡 幸恵、竹田 浩之、岩崎 隆宏、澤崎 達也、千葉 和義
2. 発表標題 コムギ胚芽無細胞系を用いたヒトデcaspase-3/9とsfApaf-1の合成
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉和義
2. 発表標題 ヒトデ卵母性mRNAの翻訳活性化機構
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 千葉和義
2. 発表標題 ヒトデ卵SGK (serum- and glucocorticoid-regulated kinase) による細胞内pHと減数分裂再開制御機構
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎はるか, 梶谷嶺, 伊藤武彦, 千葉和義
2. 発表標題 イトマキヒトデ卵における母性mRNAのU修飾とRNA再利用
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相田桜子、平岡大作、細田絵奈子、千葉和義
2. 発表標題 イトマキヒトデ卵における受精膜形成能獲得機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島真夏、千葉和義
2. 発表標題 イトマキヒトデにおけるcaspase候補配列の探索とcaspase-3 likeの機能解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----