

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19370054

研究課題名（和文） microRNA 制御システムによる生殖細胞・体細胞分化確立機構

研究課題名（英文） Regulation of soma/germ-line distinction by small RNAs.

研究代表者

井上 邦夫（INOUE KUNIO）

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40252415

研究成果の概要：小型淡水魚ゼブラフィッシュにおいて、生殖細胞形成に働く *nanos1* および *tldr7* mRNA は体細胞で小分子 RNA である miR-430 による発現抑制を受けるが、miR-430 は生殖細胞にも存在している。本研究では、ゼブラフィッシュ受精卵へのレポーター mRNA 微量注入実験系を用いた解析などから、生殖細胞では、RNA 結合蛋白質 DAZL がポリ A 鎖伸長化を介して miR-430 による *nanos1* や *TDRD7* mRNA の発現抑制をキャンセルし、生殖細胞分化を押し進めていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：機能性 RNA、生殖細胞、翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトをはじめとする高等生物のゲノム中に蛋白質をコードしない機能性 RNA 分子が多数コードされることが明らかとなり、ゲノム観を変容させるほどになっている。microRNA (miRNA) は、約 22 塩基鎖長の機能性一本鎖小分子 RNA であり、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなどの実験動物において、遺伝子発現制御に大きな役割を果たすことが明らかになってきた。

私達は小型淡水魚ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の生殖細胞形成・分化過程に働く RNA

情報発現制御機構の研究を進めてきた。生殖細胞は次世代を生む特別な細胞であり、胚発生初期に始原生殖細胞が形成される。ゼブラフィッシュでは、生殖細胞特異的に発現する *vasa* 遺伝子、*nanos1* 遺伝子などの母性 mRNA が 4 細胞期の卵割面両端に局在化する。私達はこの領域の外科的除去実験により、局在化 mRNA を含む細胞質が生殖細胞の母性決定因子「生殖質」であることを示した。しかし、実際には初期胚中で局在化していない余剰の *vasa* や *nanos1* mRNA が存在している。これら非局在因子については、胚発生過程に生殖細胞以外の細胞（体細胞）で発現抑制制御

が行われることが示唆されている。このような制御は体細胞における生殖細胞形成プログラムの誤作動を防ぐ保証機構としての役割を担うと考えられる。私達は非局在 mRNA の発現抑制機構について解析を行い、(i)ゼブラフィッシュ体細胞中で nanos1 mRNA は、miR-430 によってポリ A 鎖短縮化および翻訳抑制・分解促進制御を受けており、成熟 miRNA の生成に必須な dicer 遺伝子の変異胚では nanos1 のポリ A 短縮化・発現抑制が起こらないこと、(ii)一方、生殖細胞にも miR-430 は存在し、通常の標的 mRNA の発現を抑制するが、nanos1 においては何らかの生殖細胞特異的機構により miR-430 の発現抑制が解除されて発現が起こり、正常な生殖細胞分化が進むことを明らかにしていた。さらに、(iii)シヨウジョウバエ生殖細胞形成に働く tudor 遺伝子に類似のゼブラフィッシュ tdrd7 遺伝子を同定し、nanos1 と同様に初期胚の生殖質に mRNA 局在が観察されるとともに、miR-430 による発現制御を受けることなどを見出していた。

以上のように、ゼブラフィッシュの生殖細胞・体細胞分化確立過程には、体細胞側での miRNA による生殖細胞形成遺伝子の発現抑制、および、生殖細胞におけるその解除機構が働いていることから、miRNA 機能やその調節機構を解明するための好個のモデル系と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ゼブラフィッシュ生殖細胞・体細胞の分化確立過程に働く miRNA 翻訳制御システムをモデル解析系として、miRNA の生化学的な作用機序、および、miRNA による制御システムの生理的役割の両面について理解を目指すものである。具体的には、以下の3点について解明することを目的とする。

- (1) miRNA による翻訳抑制システムにおけるポリ A 鎖長の調節機構
- (2) 生殖細胞で miRNA による翻訳制御をキャンセルする機構
- (3) 魚類の生殖細胞・体細胞分化確立における miRNA 制御システムの普遍性

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ tdrd7 mRNA の 3' UTR を GFP の ORF に連結したレポーター mRNA について受精卵へのインジェクション実験を行い、

共発現した DAZL 蛋白質の効果も、GFP 蛍光観察、ノザンハイブリダイゼーション、ポリ A 鎖長解析 (図 1)、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションなどによって検討した。

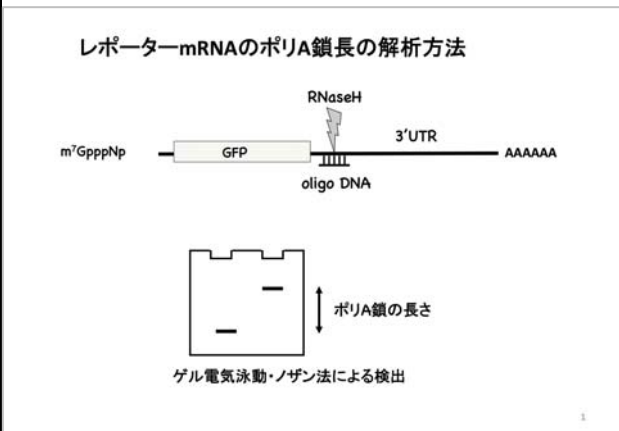


図 1. RNase H を用いた mRNA のポリ A 鎖長の解析手法

また、メダカのゲノムデータベースにおいて miR-430 を網羅的に同定し、各 miR-430 を染色体上にマッピングするとともに、ノザンハイブリダイゼーション・in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析、レポーター mRNA のインジェクション実験による機能解析を行い、ゼブラフィッシュにおける知見との比較検討を行った。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュ受精卵へのレポーター mRNA インジェクション実験系を用い、RNA 結合蛋白質である DAZL 蛋白質を強制発現すると、体細胞においても tdrd7 mRNA の翻訳が活性化されることを明らかにするとともに、DAZL 蛋白質がレポーター mRNA や内源性 tdrd7 mRNA の安定化を促進することを示した。このような効果は RNA 結合活性を欠く変異体 DAZL 蛋白質や、DAZL モチーフを欠失した変異体 DAZL 蛋白質の場合には観察されなかった。

miRNA は標的 mRNA のポリ A 鎖の短縮化を介して mRNA 分解促進・翻訳抑制制御を行う。これに対して、DAZL 蛋白質が tdrd7 mRNA のポリ A 鎖を伸長化することで miR-430 による抑制を解除することを明らかにした。また、miRNA 認識配列を持たない mRNA においても、DAZL 蛋白質の結合によってポリ A 鎖伸長化が引き起こされることが示唆された。

これらの結果から、ゼブラフィッシュ生殖細胞では、DAZL 蛋白質がポリ A 鎖伸長化を介して miR-430 による nanos1 や tdrd7 mRNA の発現抑制をキャンセルし、生殖細胞分化を押し進めていることが明らかとなった (図 2)。

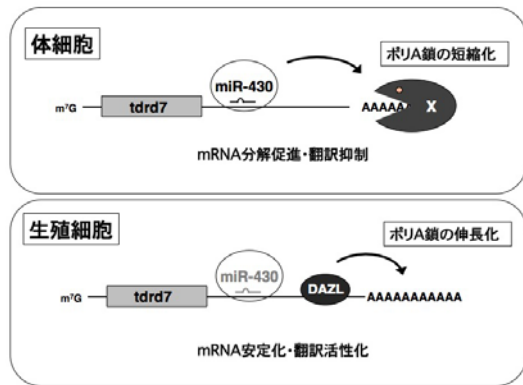


図 2. ゼブラフィッシュ生殖細胞・体細胞分化確立に働く miRNA 制御システムの分子基盤

一方、メダカにおいて miR-430 を同定し、ゲノム上にマッピングした。その発現様式を解析した結果、ゼブラフィッシュと同様に、胞胚中期から初期胚の胚体全域で強い発現が観察された (図 3)。

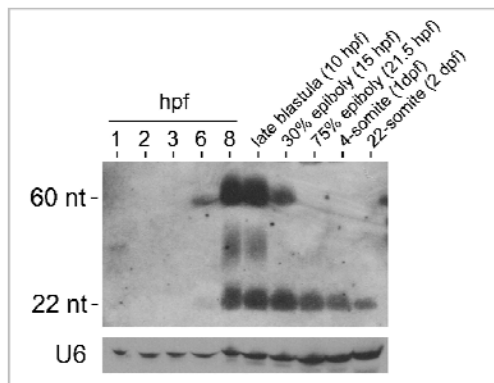


図 3. メダカ初期発生過程における miR-430 の発現

また、tdrd7 の 3' UTR を有するレポーター mRNA のインジェクション実験により、メダカにおいても miR-430 によって生殖細胞特異的な発現性の制御が行われていることが強く示唆された。従って、miRNA 制御システムによる生殖細胞・体細胞の分化確立機構は、さまざまな魚種で幅広く保存されている可能性があるものと考えられる。

本研究で得られた知見は、細胞種特異的因子や細胞環境に応答した機構により、miRNA による発現制御機構がさまざまな調節を受ける可能性を示唆しているものであり、今後ゲノム情報発現機構やその破綻による疾患の分子基盤を理解していく上で重要な意味を持っていると言えよう。

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 Suzuki, H., Tsukahara, T., and Inoue, K. (2009) Localization of c-mos mRNA around the animal pole in the zebrafish oocyte with Zor-1/Zorba. *BioScience Trends* (in press) Refereed

② Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H., and Inoue, K. (2007) Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech. Dev.* 124, 279-289. Refereed

[学会発表] (計 5 件)

① 井上 邦夫. ゼブラフィッシュ miRNA 制御システムによる生殖細胞形成機構. 第 41 回日本発生生物学会・サテライトワークショップ. 2008 年 5 月 27 日. 徳島.

② 井上 邦夫. miRNA 制御システムによる生殖細胞・体細胞分化確立機構. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会. 2007 年 12 月 11 日. 横浜.

③ 井上 邦夫. ゼブラフィッシュ生殖細胞形成過程に働く RNA プログラム. 日本発生生物学会 秋季シンポジウム. 2007 年 11 月 5 日-7 日. 岡崎

④ 井上 邦夫. ゼブラフィッシュ生殖細胞形成過程に働く RNA プログラム. 第 9 回日本 RNA 学会年会. 2007 年 7 月 28 日-31 日. 名古屋.

⑤ Kunio Inoue. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. 第 40 回発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会. 2007 年 5 月 28 日-30 日. 福岡.

[その他]

ホームページ

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-rna/>

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/staff/kunio.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 邦夫 (INOUE KUNIO)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：40252415

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし