

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290076

研究課題名(和文)細胞質の生殖顆粒による核内ゲノム情報発現制御機構

研究課題名(英文) Regulation of gene expression by the cytoplasmic germ granules in primordial germ cells

研究代表者

井上 邦夫 (INOUE, KUNIO)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40252415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュ初期胚における始原生殖細胞形成過程において、dead-end (dnd) 遺伝子の発現阻害によって正常な始原生殖細胞形成を阻害した初期胚(dnd発現阻害胚)と野生型胚のRNAを次世代シーケンサーを用いて比較解析し、発現量が変化する遺伝子群を網羅的に同定した。このうち特に転写制御関連因子についてさらに解析を進めている。また、DNDタンパク質の機能解析を行ったところ、これまでの報告と異なり、ゼブラフィッシュDNDタンパク質が標的mRNAの翻訳抑制因子として働くことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism underlying how germ cell-specific gene expression is regulated by the cytoplasmic determinant "germ granules" that is maternally supplied remains to be elucidated. In this study, we performed RNA-seq analyses of the wild type and germ cell-deficient embryos and identified many candidates that may act in germ cell-specific transcriptional regulation. In addition, we showed that a germ cell-specific RNA-binding protein DND has the ability to repress translation of target mRNAs in zebrafish.

研究分野：分子生物学・発生生物学

キーワード：生殖細胞 RNA ゲノム情報

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代を生む特別な細胞であり、その特性の理解や形成・分化機構の解明は、生命科学の最重要課題の一つである。

胚発生過程における始原生殖細胞の形成には、マウスなどの胚誘導による形成機構、および、ショウジョウバエやツメガエルなど、卵内の一部に局在する母性細胞質「生殖質」による決定機構が存在するが、これら形成様式や生物種を問わず、生殖細胞を特徴づける「生殖顆粒」やヌアージ (nuage) など類似した細胞質内の顆粒状構造の存在が知られており、生殖細胞関連遺伝子も種間で共通するものが多い。生殖顆粒は特定の mRNA やタンパク質を含む巨大な顆粒状構造であることから、生殖顆粒による生殖細胞の決定には、mRNA 局在、分解、翻訳制御などの RNA 制御機構が中心的役割を果たすと考えられる。また、ゲノム品質管理に働く piRNA の生合成の場としても注目されている。

私達は、これまでに、脊椎動物のモデル実験生物として汎用される小型淡水魚ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の始原生殖細胞形成過程が、mRNA 制御を主要な分子基盤とする4つの機構、すなわち、「生殖顆粒の形成」「生殖顆粒による始原生殖細胞決定」と、「体細胞で生殖顆粒因子の誤作動を防ぐ保証機構」および「この保証機構を始原生殖細胞で解除する機構」から成立していることを示してきた。しかしながら、脊椎動物における生殖顆粒の形成機構や、生殖顆粒の生理機能については依然として不明な点が多い状況である。

2. 研究の目的

本研究は、ゼブラフィッシュ胚をモデル系とし、細胞質に存在する生殖顆粒の情報がどのようにして核内へと伝えられ、転写レベルでの生殖細胞特異的なゲノム情報発現制御活性が獲得されるのか、について解明することを目的とするものである (図1)。

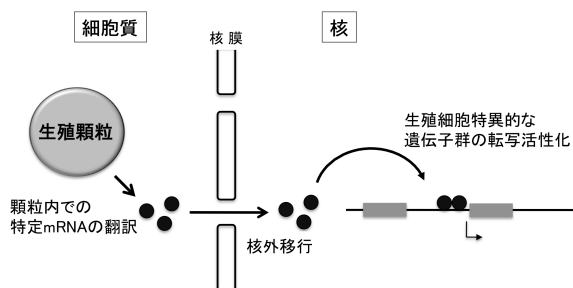


図1. 細胞質の生殖顆粒による核内ゲノム情報発現制御機構の作業仮説

具体的には、ゼブラフィッシュ初期胚の始原生殖細胞で転写活性化される遺伝子群の

探索を行い、核内におけるゲノム情報発現様式の情報を集積するとともに、始原生殖細胞特異的なゲノム情報発現制御に関与するタンパク質をコードする生殖顆粒構成 mRNA について探索を行い、生殖細胞における発現時期や細胞内局在性、始原生殖細胞形成における役割を検証する。これらの知見を統合して、細胞質の生殖顆粒による核内ゲノム情報発現制御機構について解明する。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ生殖細胞特異的な RNA 結合タンパク質をコードする dead-end (dnd) 遺伝子について、mRNA の翻訳開始領域に設計したアンチセンスモルフォリノオリゴを受精卵にインジェクションし、翻訳阻害を行うことによって生殖細胞欠損胚を作製した。

ゼブラフィッシュの野生型初期胚と生殖細胞欠損胚 (それぞれ、受精後6時間胚、および、24時間胚) から抽出した全 RNA を用いた RNA-seq 解析を行い、野生型胚と生殖細胞欠損胚で発現量が変動する転写産物を洗い出すことによって、始原生殖細胞で発現する遺伝子群のカタログ化を行った。RNA-seq 解析によって得られた結果は、半定量的な RT-PCR によって確認した。

DND タンパク質により直接 mRNA 安定性や翻訳レベルの制御を受けると推測される標的候補 mRNA については、Dnd 発現阻害胚や強制発現胚における内在 mRNA の存在量の検討を行うとともに、標的候補 mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) を連結したレポーター mRNA を作製し、受精卵へのインジェクション実験などによる解析を行った。

Dnd タンパク質の翻訳制御活性については、N タンパク質を用い、レポーター mRNA に人為的に結合してその効果を検討する tethering 実験を行った。また、デアデニレーション酵素のドミナント・ネガティブ変異体タンパク質を共発現し、レポーター mRNA の安定性や翻訳活性に対する効果について検討した。

また、生殖顆粒構成タンパク質について、タグを付加し、生殖細胞で発現するトランスジェニック系統を作成するとともに、生殖顆粒構成因子について、TALEN 法による機能欠損変異体作成などによって始原生殖細胞形成における役割を検証した。なお、TALEN 法を用いた解析に関しては、米国ユタ大学の星島一幸博士と情報交換や共同研究を行った。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ野生型胚と始原生殖

細胞欠損胚におけるトランスクリプトームの比較解析

ゼブラフィッシュ生殖細胞特異的に発現する dead-end (dnd) 遺伝子に対するアンチセンスモルフォリノオリゴを受精卵にインジェクションにより導入して翻訳を阻害し、始原生殖細胞が欠損もしくは著しく減少した初期胚（受精後 24 時間胚）を得た。受精後 6 時間胚では、モルフォリノオリゴを導入した胚においても始原生殖細胞の現象は観察されなかった。そこで、野生型の 6 時間胚、24 時間胚、および、dnd の発現阻害を行った 6 時間胚、24 時間胚について、RNA-seq による比較解析を行い、発現量が 2 倍以上変動する遺伝子群を同定した（図 2）。

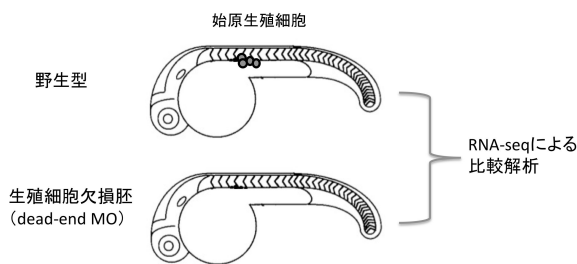


図2. RNA-seq解析を用いた実験のスキーム

Dnd 発現阻害を行った 24 時間胚において発現量が減少する遺伝子群の中には、転写制御関連因子が多数含まれていたため、始原生殖細胞特異的な遺伝子発現制御に関与するものを同定するためにさらに絞り込みを進めている。

また、興味深いことに、始原生殖細胞に関係する *dazl* 遺伝子などいくつかの既知遺伝子や、多能性維持などに関係すると考えられる *nanog* の mRNA が Dnd 発現阻害を行った初期胚で増加することが明らかになった。

(2) ゼブラフィッシュ生殖細胞特異的に発現する DND タンパク質の翻訳制御活性の解析

ゼブラフィッシュ初期胚において、DND は生殖細胞形成に関与する *nanos* や *tdrd7* mRNA に結合し、miRNA である *miR-430* による抑制（mRNA 分解促進や翻訳抑制）を解除し、mRNA 安定化や翻訳活性化を行う働きがあることが報告されている。これに対して、私達が受精卵に Dnd を強制発現させても、これらの mRNA の異所的な翻訳活性化が観察されなかった。

そこで、ゼブラフィッシュ胚において、レポーター mRNA の 3' UTR に人為的に DND（N 融合タンパク質）を結合させて tethering する実験を行ったところ、レポーター mRNA の翻

訳が阻害されることが明らかとなった。この効果は、デアデニレース活性を阻害すると抑制された。これらのことから、ゼブラフィッシュ胚において DND が翻訳抑制因子として働くことが強く示唆された。

(3) ゼブラフィッシュ生殖顆粒形成に関与する Buc 遺伝子の発現制御機構

ゼブラフィッシュ初期胚の生殖顆粒や卵形成期のミトコンドリア凝集体の形成に関与すると考えられる Bucky Ball (Buc) の発現制御機構について解析を行った。Buc はタンパク質が生殖質への局在化活性を有するが、これに加えて、胚発生過程において *miR-430* が *buc* mRNA の 3' UTR を認識し、胚全体で翻訳抑制制御を行っていることを見出した。生殖質 mRNA である *nanos* や *tdrd7* の場合には、生殖細胞特異的な RNA 結合タンパク質である DND や *DAZL* が 3' UTR に結合して *miR-430* による抑制を解除することが示されているが、*buc* mRNA の場合には、これらの RNA 結合タンパク質が存在しても抑制の解除が起こらないことがわかった。生殖細胞における Buc タンパク質の発現（mRNA 翻訳制御）に他の制御因子が関与するか、さらに検討を進めている。

(4) ゼブラフィッシュ生殖顆粒構成因子の機能解析系の構築

タグを付加した生殖顆粒構成タンパク質 Buc などを発現するトランスジェニック系統を樹立し、内在性タンパク質と同様にタグ付き Buc タンパク質について生殖顆粒への局在を再現することが出来た。しかしながら、その後の系統維持の過程でトランスジーンサイレンシングが起こり、生化学的解析に使用することが出来ない状況となったため、mRNA インジェクションによって強制発現させたタンパク質を用いて免疫沈降実験などを行い、生殖顆粒構成因子と相互作用する新規タンパク質候補を同定した。

また、*brul* の mRNA およびタンパク質は生殖質に局在化することを明らかにしているが、その役割は明らかとなっていない。そこで、ゲノム編集法である TALEN 法によって *brul* 遺伝子の機能欠失変異体を作成し、母性ホモ変異胚の表現型解析を進めている。

一方、共同研究によって他生物種における始原生殖細胞形成機構についても研究を進め、種を越えた共通性などの考察を行った。

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 4 件）

1. Miwa, T., Takasaki, T., Inoue, K., and Sakamoto, H. (2015)

Restricted distribution of mrg-1 mRNA in *C. elegans* primordial germ cells through germ granule-independent regulation. *Genes to Cells* 20, 932-942
査読有り

doi: 10.1111/gtc.12285.

2. Furukawa, M.T., Sakamoto, H., and Inoue, K. (2015)

Interaction and colocalization of HERMES/RBPMS with NonO, PSF, and G3BP1 in neuronal cytoplasmic RNP granules in mouse retinal line cells. *Genes to Cells* 20, 257-266. 査読有り

doi: 10.1111/gtc.12224.

3. Makino, S., Mishima, Y., Inoue, K., and Inada, T. (2015)

Roles of mRNA-fate modulators Dhh1 and Pat1 in TNRC6-dependent gene silencing recapitulated in yeast. *J. Biol. Chem.* 290, 8331-47. 査読有り

doi: 10.1074/jbc.M114.615088.

4. Saito, T., Pšenička, M., Goto-Kazeto, R., Inoue, K., Adachi, S., Arai, K., and Yamaha, E. (2014)

The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. *PLoS ONE* 9, e86861. 査読有り

doi: 10.1371/journal.pone.0086861.

[学会発表](計6件)

1. 高松 陽紀、坂本 博、井上 邦夫. ゼブラフィッシュ卵母細胞のmRNA輸送機構の解析、第38回日本分子生物学会、神戸国際展示場(兵庫県) 2015.12.1-4

2. 小林 真奈美、井上 邦夫. ゼブラフィッシュ生殖顆粒構成因子Dead-endにより発現制御を受ける mRNA 群の同定、第17回日本RNA学会、ホテルライフオーソ札幌(北海道) 2015.7.15-17

3. Manami KOBAYASHI, Kunio INOUE. Identification Of MRNAs Regulated By The Germ Granule Protein Dead-end In Zebrafish By RNA-seq、*Zebrafish* 2015、Oslo (Norway)、2015.6.28-7.2

4. 小林 真奈美、井上 邦夫. Identification of mRNAs regulated by the germ granule protein Dead-end in zebrafish by RNA-seq、第48回日本発生生物学会、つくば国際会議場(茨城県)、

2015.6.2-5

5. 小林 真奈美、井上 邦夫. ゼブラフィッシュ生殖顆粒構成因子Dead-endにより発現制御を受ける mRNA 群の同定と機能解析、第37回日本分子生物学会、パシフィコ横浜(神奈川県) 2014.11.25-27

6. 小林 真奈美、金村 節子、井上 邦夫. ゼブラフィッシュ生殖質構成因子の同定と機能解析、RNAフロンティアミーティング2014、ラフォーレ南紀白浜(和歌山県) 2014.9.16-18

[図書](計0件)

[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

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

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

動画ページ

http://douhiro.com/video/?cd_video=111

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・教授
研究者番号: 40252415

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

星島 一幸 (HOSHIJIMA, Kazuyuki)
米国ユタ大学・助教