

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440001

研究課題名(和文) 卵母細胞形成と発生において翻訳機構が果たす役割と分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular and functional analysis of translational machinery during oogenesis and development

研究代表者

小谷 友也 (Kotani, Tomoya)

北海道大学・理学(系)研究科(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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生物種を超えて保存されるcyclin B1翻訳制御機構についてその分子機構を解明し、部位・時期特異的な翻訳の本質に迫ることを目的とした。はじめに、脊椎動物卵母細胞で見いだされたcyclin B1 RNA顆粒の形成にPumilio1蛋白質の結合が必須であること、さらにPumilio1による顆粒形成が部位・時期特異的な翻訳の制御に重要なことを明らかにした。次に、cyclin B1に結合する新規因子としてIMP3を同定、その翻訳制御機構に新たな知見を得た。さらに、アクチン繊維の動態を可視化する遺伝子導入個体を作製し、翻訳制御におけるアクチン繊維の関与を支持する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate molecular mechanisms of evolutionarily conserved control of cyclin B1 mRNA translation to understand the nature of translational machineries by which special and temporal translation is regulated. First, we demonstrated that binding of Pumilio1 to cyclin B1 mRNA is essential for the RNA granule formation, which was found in vertebrate oocytes, and that this Pumilio1-mediated RNA granule formation is important for specially and temporally regulated translational activation of the mRNA. Then, we identified IMP3 protein as a novel factor binding to cycle B1 mRNA, providing novel insight into the translational regulation of the mRNA. Furthermore, we generated transgenic animals visualizing dynamics of actin filaments and obtained results supporting the notion that assembly and depolymerization of actin filaments are involved in the translational regulation.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：翻訳 mRNA局在 シス因子 トランス因子 脊椎動物 卵母細胞 RNA顆粒

1. 研究開始当初の背景

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。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、最近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 RNA 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 RNA 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、及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、多くのことが未解明のままである。

我々は、翻訳を抑制された *cyclin B1* mRNA が卵母細胞において局在することを見いだしてきた。*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 を微量注入された卵母細胞は、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。我々はさらに、RNA 結合蛋白質の Pumilio1 が *cyclin B1* mRNA の 3' 非翻訳領域 (3'UTR) に結合し、翻訳時期を調節することを生化学的解析で明らかにした。しかし、既存の解析法で翻訳の分子機構に切り込むには限界があり、本研究分野の発展には新たな技術の確立が望まれていた。

翻訳制御の研究が困難な理由の一つは、その分子機構が核内における転写から始まることにある。我々はこの問題を解決するため、新規遺伝学的方法論を用い、*cyclin B1* のレポーター遺伝子をゼブラフィッシュ・ゲノムに挿入し、卵母細胞で発現させた。その詳細な解析から、核内で転写されたレポーター mRNA が、内在の mRNA と同様の制御を受けることを証明した。翻訳制御の研究が困難なもう一つの理由は、mRNA が翻訳される正確な部位と時期を検出できないことにある。我々はこの問題を解決するため、新規蛍光色素 ReAsH の特性、すなわち、合成された TC タグのペプチド鎖に即座に結合し蛍光を発することを利用した。その結果、我々は

mRNA が翻訳される正確な部位と時期を世界で初めて可視化・検出することに成功した。

mRNA の制御機構に迫るため、我々は高感度の *in situ* hybridization システムを導入し、卵母細胞に蓄積された mRNA を検出した。その結果、*cyclin B1* mRNA が多数の顆粒を形成し、局在することが明らかとなった。これら RNA 顆粒は卵母細胞が成熟する過程において消失したことから、顆粒形成と翻訳制御機構との関係が示唆された。アクチン繊維を脱重合した卵母細胞では、*cyclin B1* の RNA 顆粒が細胞質に拡散し、反対にアクチン繊維を安定化させた卵母細胞では、RNA 顆粒が維持された。これらの結果は、*cyclin B1* の RNA 顆粒形成がアクチン繊維に依存することを示唆するが、その形成機構、さらに翻訳制御との関係は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、翻訳による生命現象制御の全貌解明である。その中で本研究は、生物種を越えて保存される *cyclin B1* 翻訳制御機構について、その分子機構と実態を解明し、翻訳の本質に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

< *cyclin B1* RNA 顆粒の形成機構 >

cyclin B1 RNA 顆粒の形成機構に迫るため、シス因子とトランス因子の解析を行った。具体的には、*cyclin B1* mRNA の 3'UTR に結合する Pumilio1 の結合部位の同定とその機能解析を次の手順で実施した。

(1) *cyclin B1* mRNA の全長 RNA プローブを作製し、試験管で合成した Pumilio1 蛋白質と反応させた後、SDS-PAGE 法によって結合の有無を解析した。Pumilio1 が結合する配列の候補を探索し、その配列に変異を入れることで結合の変化を解析した。

(2) TC タグ配列を有する *cyclin B1* レポーター遺伝子をゼブラフィッシュ・ゲノムに挿入し、レポーター mRNA の翻訳を ReAsH 蛍光色素で検出した。同様に、Pumilio1 結合配列に変異を導入したレポーター遺伝子をゼブラフィッシュ・ゲノムに挿入し、レポーター mRNA の翻訳を ReAsH 蛍光色素で検出した。

< 新規トランス因子の同定 >

cyclin B1 mRNA に結合し、顆粒形成あるいは翻訳制御に関わる新規因子を次の方法で同定し、その機能を解析した。

(1) ゼブラフィッシュ卵巣の抽出液をショ糖密度勾配遠心法で分離し、200 μ l 毎に分画した。*cyclin B1* RNA 顆粒が存在する画分に特

異的に存在する蛋白質を質量分析によって同定した。

(2) 同定した蛋白質を認識する特異的抗体を作製し、*cyclin B1* mRNA との結合を生化学的に解析した。

(3) 卵母細胞において IMP3 蛋白質を過剰発現し、卵成熟に与える影響を解析した。同様に特異的抗体を卵母細胞に微量注入し、卵成熟に及ぼす影響を解析した。

< アクチン繊維の可視化 >

卵母細胞における翻訳制御とアクチン繊維との関係を明らかにするため、次の方法でアクチン繊維のリアルタイム・イメージングを実現した。

(1) アクチン繊維に特異的に結合する Moesin 蛋白質のアクチン結合部位と GFP を融合したコンストラクトを作製した。

(2) *cyclin B1* 遺伝子のプロモーターの下流に GFP 融合 Moesin をコードする配列を挿入し、*Tol2* トランスポゾンを用いてゼブラフィッシュ・ゲノムに挿入した。

(3) トランスジェニック・ゼブラフィッシュをスクリーニングし、メス個体から卵母細胞を取り出し GFP-Moesin の動態を解析した。

< BAC トランスジェニック・フィッシュの作製 >

TC タグ配列と ReAsH 蛍光色素による翻訳の可視化法を改良するため、下記の方法で BAC を用いたレポーター mRNA の発現を試みた。

(1) *cyclin B1* 遺伝子を含む BAC クローンを用い、相同組替えによる配列の編集を行った。具体的には、*cyclin B1* 遺伝子の 5'UTR 直後に TC タグ配列と赤色蛍光蛋白質の mCherry、stop コドンを挿入した。

(2) *Tol2* トランスポゾンを用い、TC-mCherry を持つ BAC クローンをゼブラフィッシュ・ゲノムに挿入した。mCherry を発現するトランスジェニック・フィッシュを実体蛍光顕微鏡下でスクリーニングした。

4. 研究成果

< *cyclin B1* RNA 顆粒の形成機構 >

ゼブラフィッシュ *cyclin B1* mRNA は、3'UTR に Pumilio1 結合配列の UGUA を 2 個所持つ。これら結合配列に変異を入れ、試験管で合成した Pumilio1 と反応させた結果、Pumilio1 は 5'側の UGUA 配列に結合することが明らかとなった。

次に、Pumilio1 の結合配列を持つレポーター遺伝子と、5'側の UGUA に変異を入れたレポーター遺伝子をゼブラフィッシュ・ゲノムに挿入し、それぞれのレポーター mRNA を卵母細胞で発現させた。卵巣抽出液から Pumilio1 を免疫沈降し、レポーター mRNA の結合を解析した結果、*in vitro* での実験と同様に、Pumilio1 は 5'側の UGUA に結合することが明らかとなった。

In situ hybridization 法の解析から、Pumilio1 が結合した *cyclin B1* のレポーター mRNA は顆粒を形成し、Pumilio1 に結合しないレポーター mRNA は顆粒を形成しないことが明らかとなった。ReAsH 蛍光色素による翻訳の可視化によって、Pumilio1 と結合し顆粒を形成するレポーター mRNA は、卵成熟の開始後に卵核崩壊 (GVBD) が起こるまでの約半分のタイミング (30~60 分) で翻訳されること、Pumilio1 と結合せず顆粒を形成しないレポーター mRNA は、卵成熟の開始後の非常に早いタイミング (10~20 分) で翻訳されることが明らかとなった。

以上の結果は、*cyclin B1* の RNA 顆粒形成に Pumilio1 の結合が必須であることを示し、さらに顆粒形成が mRNA の翻訳時期の制御に重要なことを示唆する。

< 新規トランス因子の同定 >

卵巣抽出液をシヨ糖密度勾配遠心法にかけ、*cyclin B1* RNA 顆粒が含まれる分画を解析した。5~65% のシヨ糖密度の遠心物を 1~10 の 10 画分に分離した結果、*cyclin B1* RNA 顆粒は主に 6 から 9 画分に存在した。分画したすべての画分に存在する蛋白質を SDS-PAGE で分離した後に銀染色によって解析した。*cyclin B1* RNA と同様の画分に特異的に存在する蛋白質を質量分析で解析し、5 種類の蛋白質を同定した。これらのうち、IMP3 は *cyclin B1* mRNA に直接結合することが示された。

IMP3 を特異的に認識する抗体を作製し、卵巣抽出液から IMP3 を免疫沈降したところ、*cyclin B1* mRNA が沈降物に検出された。さらに、Pumilio1 が IMP と複合体を形成すること、ただし、IMP3 と Pumilio1 の結合は RNA を介することが明らかとなった。

IMP3 の役割を明らかにするため、未成熟卵において IMP3 を過剰発現させた。対照の GST 蛋白質の過剰発現は卵成熟の進行に影響を与えなかったが、IMP3 の過剰発現は GVBD が起こるタイミングを遅らせた。さらに IMP3 の役割に迫るため、抗 IMP3 抗体を卵母細胞に微量注入した。対照の抗 GST 抗体の微量注入は卵成熟の進行に影響を与えなかったが、抗 IMP3 抗体の微量注入は GVBD が起こるタイミングを遅らせた。これらの結果は、*cyclin B1* mRNA の翻訳のタイミングが遅れたためと考えられる。

以上の結果から、*cyclin B1* mRNA の翻訳を制御する新規因子として IMP3 を同定する

ことに成功した。IMP3が *cyclin B1* mRNA を制御する分子機構の解明が今後の課題である。

<アクチン繊維の可視化>

アクチン繊維の脱重合、あるいは重合を促進する薬剤の解析から、*cyclin B1* の RNA 顆粒形成と翻訳制御にアクチン繊維が関わることが示唆される。しかし、卵母細胞におけるアクチン繊維の動態は全く分かっていなかった。

本研究において、アクチン繊維の動態を明らかにするため、Moesin 蛋白質のアクチン結合部位を GFP と融合し、卵母細胞で発現させた。卵母細胞特異的に遺伝子を発現誘導するため、*cyclin B1* 遺伝子の上流配列をプロモーターとして用い、GFP-Moesin 遺伝子を下流に挿入したレポーター遺伝子を作製した。これらの配列を *Tol2* トランスポゾン配列に挿入し、転移酵素の mRNA とともにゼブラフィッシュの受精卵に微量注入した。次世代の稚魚を GFP の発現でスクリーニングし、4 系統のトランスジェニック・フィッシュの作製に成功した。卵母細胞における GFP-Moesin の発現は、系統による差はなかった。

cyclin B1 遺伝子のプロモーターは、GFP-Moesin を卵母細胞特異的に発現誘導した。すなわち、卵母細胞を取り囲む濾胞細胞では全く GFP-Moesin は発現せず、従って、卵母細胞におけるアクチン繊維の状態を濾胞細胞から完全に切り離して解析することが可能となった。

トランスジェニック・フィッシュの卵巣を用いることで、卵形成過程においてアクチン繊維の形状が変化することを初めて捉えることができた。さらに、十分に成長した卵母細胞の細胞質表層にカラム状のアクチン繊維が密に形成されることが明らかとなった。このアクチンカラムは一部、微絨毛を含むと考えられる。

細胞質表層に密に形成されたアクチンカラムは、卵成熟を誘導すると非常に早いタイミング(20 分以降)で緩やかな脱重合を開始した。この脱重合は GVBD と同じタイミングで激しくなり、その後にアクチン繊維の再重合が観察された。卵成熟開始後に見られた緩やかな脱重合は、*cyclin B1* の RNA 顆粒が消失するタイミングより早く起こることから、アクチン繊維が脱重合することで *cyclin B1* RNA 顆粒が消失し、mRNA の翻訳が開始される、という我々のモデルが指示される結果となった。

<BAC トランスジェニック・フィッシュの作製>

我々が確立したトランスジェニック・フィッシュ作製による翻訳の可視化は、翻訳が開始される部位と時期を初めて可視化した。そのシグナルは弱く高解像度による解析は

困難であった。その理由は、レポーター mRNA が内在の *cyclin B1* mRNA と比較し、1/100 程度しか発現しないことにあると考えられる。この点を改善するため、BAC を用い、レポーター mRNA の発現量を内在の mRNA に近づけることを試みた。

本研究において、相同組替えによって TC タグと mCherry の配列を *cyclin B1* 遺伝子の 5'UTR 直後に挿入した。BAC 配列すべて(150 kbp)を *Tol2* トランスポゾン配列に挿入し、転移酵素の mRNA とともにゼブラフィッシュ受精卵に微量注入した。次世代の稚魚を mCherry の蛍光でスクリーニングした結果、2 系統のトランスジェニック・フィッシュの分離に成功した。これらトランスジェニック・フィッシュの卵母細胞を用いることで、部位・時期特異的な翻訳を高解像度で捉えることが可能になると考える。今後、アクチン繊維の動態と同時に翻訳を可視化し、*cyclin B1* mRNA の翻訳制御機構の実体に迫ることを目指す。

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3件)

- (1) Nukada, Y., Horie, M., Fukui, A., *Kotani, T., Yamashita, M. "Real-time imaging of actin filaments in the zebrafish oocyte and embryo." *Cytoskeleton*, 査読有, vol.72, p491-501, 2015. (*Corresponding author) DOI: 10.1002/cm.21253
- (2) Takahashi, K., Kotani, T., Katsu, Y., Yamashita, M. "Possible involvement of insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 in zebrafish oocyte maturation as a novel *cyclin B1* mRNA-binding protein that represses the translation in immature oocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, vol.448, p22-27, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.020
- (3) *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*, 査読有, vol.202, p1041-1055, 2013. (*Corresponding author) DOI: 10.1083/jcb.201302139

Research Highlight in *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol.14, p688-689, 2013.

〔学会発表〕(計8件)

- (1) 中村拓磨, 小谷友也: 遺伝子トラップ法による新規母性因子の同定と機能解析. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月3日, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市)
- (2) 齋藤篤, 小谷友也: ゼブラフィッシュ卵母細胞において Pumilio1 のリン酸化は *cyclin B1* mRNA の翻訳に先立って起こる. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市)
- (3) 川村翔平, 小谷友也: マウス卵母細胞の染色体分配到重要な *Mad2* mRNA の翻訳制御機構解析. 日本動物学会第86回新潟大会, 2015年9月19日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
- (4) 齋藤篤, 小谷友也: マウス卵成熟における翻訳制御因子 Pumilio1 の局在とリン酸化. 日本動物学会第86回新潟大会, 2015年9月19日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
- (5) 堀江真友, 小谷友也: ゼブラフィッシュ卵成熟過程における顆粒形成を介した *mos* mRNA 翻訳制御機構. 日本動物学会第86回新潟大会, 2015年9月17日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
- (6) 川村翔平, 齋藤篤, John Carroll, 小谷友也: 卵母細胞における Pumilio1 標的 mRNA の局在と翻訳機構. 第17回日本 RNA 学会年会, 2015年7月16日, ホテルライフオーソ札幌(北海道, 札幌市)
- (7) 額田侑実子, 堀江真友, 山下正兼, 小谷友也: Visualization of actin filaments in oogenesis and oocyte maturation. 日本分子生物学会第37回年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)
- (8) 小谷友也, 安田恭太, 太田龍馬, 山下正兼: Temporal control of *cyclin B1* mRNA translation through formation and disassembly of RNA granules. 日本分子生物学会第36回年会, 2013年12月5日, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 友也 (KOTANI TOMOYA)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・
准教授