

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640128

研究課題名(和文)母性プログラムにおけるmRNA前駆体スプライシング制御の役割

研究課題名(英文)Splicing regulation of maternal mRNA precursors during early embryogenesis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):ゼブラフィッシュにおいて、受精卵中に母性のsquint mRNA前駆体が存在し、16細胞期に著しく減少することが確認されたが、顕微注入により導入したsquint mRNA前駆体についてはスプライシング産物を検出できなかった。一方、ヒト細胞内、および、細胞核抽出液を用いた試験管内実験系においてsquint mRNA前駆体が効率よくスプライシングされることがわかった。また、初期胚のRNAについてRNA-seq解析を行ったところ、イントロンを含む転写産物の存在が確認されたことから、スプライシング抑制制御機構が働いているか検証を進めている。

研究成果の概要(英文):We confirmed previous reports showing that unspliced squint transcript (pre-mRNA) is maternally supplied in the zebrafish fertilized egg, and that it disappears in the 16-cell stage embryo. We found that squint pre-mRNA injected into the fertilized egg can not be spliced. By contrast, it was spliced efficiently in HeLa cells. Using RNA-seq analyses, we have identified some candidate maternal transcripts that contain retained introns during early embryogenesis.

研究分野：分子生物学・発生生物学

キーワード：発生分化 母性プログラム スプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物において、受精後の胚発生初期には、接合体ゲノムからの転写が開始しておらず、卵形成過程に供給された母性 mRNA や母性タンパク質などの母性因子が卵割、胚葉形成、体軸形成、始原生殖細胞形成などに中心的役割を担うことが知られている。また、母性 mRNA の多くは、受精卵・初期胚の細胞質内で、その安定性、空間的配置(局在性)、翻訳のタイミング・効率などが厳密に制御を受けている。

脊椎動物のモデル実験材料として汎用される小型淡水魚ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) では、受精後、胞胚期の中頃までは接合体ゲノムからの遺伝子発現(転写)が起きていないことが知られている。しかしながら、近年の研究によって、受精卵において Nodal タンパク質をコードする *squint* 遺伝子の mRNA 前駆体がイントロンを保持した状態で蓄積していること、卵割が進行して 16 細胞期胚頃になるとスプライシングによってイントロンが除去されて成熟した *squint* mRNA が生成し、タンパク質への翻訳が行われることが示唆された (Gore et al., Nature, 2005; Kumari et al., Elife, 2013)。ゼブラフィッシュ胚発生過程において、Nodal タンパク質は背腹軸のパターン形成に中心的役割を担うと考えられることから、母性 mRNA 前駆体のスプライシング制御という未知の制御機構の存在が注目されることとなった。

これらの報告を踏まえて、私達は、ゼブラフィッシュの初期の胚発生過程において、*squint* 遺伝子だけでなく、受精卵の核内にスプライシング未完了な mRNA 前駆体として保持され、適切なタイミングでスプライシングが行われて mRNA となるさまざまな母性転写産物が存在しているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエ、ツメガエル、ゼブラフィッシュなどのモデル動物を用いた研究から、これらの動物の胚発生初期には、卵形成時に卵母細胞内に蓄積された mRNA などの母性因子による「母性プログラム」が主役を務めることがよく知られている。しかしながら、これまで、イントロンを含む mRNA 前駆体の状態で卵内に蓄積された母性転写産物が存在しているかどうか、そして、そのスプライシングの制御が初期発生過程に生理的な役割を担うかといった問題について、積

極的な検討は行われてこなかった。また、受精後、胞胚中期までは転写が行われていない発生段階であるため、核内においてスプライシング装置が稼働しているかどうかについても特段の注意が払われてこなかった。

一方、ゼブラフィッシュの受精卵において、母性に供給されたスプライシング未完了な *squint* mRNA 前駆体が存在し、16 細胞期頃にスプライシングされるとの報告については、これに強く反駁する主張もあり、依然として混沌とした状況である (Bennett et al., Nature, 2007)。

そこで、本研究では、ゼブラフィッシュをモデル実験動物として用い、受精卵にスプライシング未完了の *squint* mRNA 前駆体が蓄積されているとの報告について検証を行う。そして、受精卵においてイントロンを含む mRNA 前駆体の状態で保持されている母性転写産物についてゲノムワイドに探索・同定を行うとともに、*squint* などの mRNA 前駆体がスプライシングを受けない状態で受精卵に保持されている機構、および、その状態が解除され、スプライシングが行われて成熟した mRNA が生成するようになる機構に働くシス制御配列を明らかにすることを目的とした。

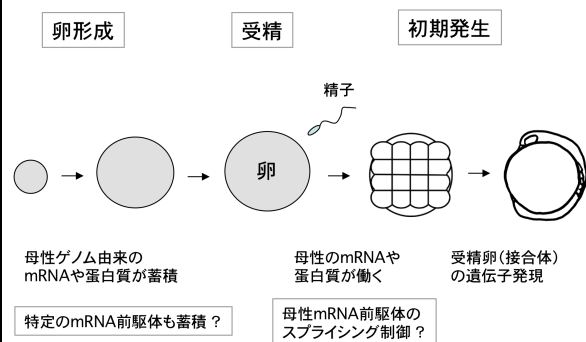


図1. 初期発生調節における母性プログラムと本研究の目的

## 3. 研究の方法

ゼブラフィッシュの受精後から卵割期の各ステージについて全 RNA を抽出し、RT-PCR による解析を行って、イントロンを含んだ *squint* mRNA 前駆体の存在について検証を行うとともに、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、イントロンを含んだ mRNA 前駆体をゲノムワイドに探索・同定する。

次に、同定した mRNA 前駆体について、割球内での局在性(核内に存在するか)について解析を行うとともに、それらの mRNA

前駆体のスプライシングが行われる発生段階を明らかにしていくことにより、母性時期におけるスプライシング制御の役割を検討する。

一方、ゼブラフィッシュ *squint* 遺伝子について、エキソン・イントロンを含むゲノム領域をクローニングする。作製したプラスミド DNA を鋳型として、試験管内でレポーター mRNA 前駆体を作成し、受精卵へのインジェクションによって、mRNA 前駆体の保持、および、卵割期におけるスプライシング開始を再現する実験系を構築し、それぞれの過程に働く RNA 上の制御配列を同定することを目指す。

また、*squint* mRNA 前駆体についてヒト細胞におけるスプライシング活性を検討し、*squint* 遺伝子のスプライシング制御がゼブラフィッシュ胚発生過程に特異的な機構によるものか検討する。

ゼブラフィッシュ卵母細胞において mRNA 輸送に関するタンパク質の同定や、その相互作用因子の同定を進め、スプライシング未完了な *squint* mRNA 前駆体が保持される分子基盤について検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゼブラフィッシュ受精卵における *squint* mRNA 前駆体の蓄積についての検証

ゼブラフィッシュの初期胚から抽出した RNA について、イントロンを含む領域に設計したプライマーとエキソン領域に対するプライマーを使用して RT-PCR による解析を行ったところ、受精卵中に母性の *squint* mRNA 前駆体が存在し、16 細胞期に著しく減少することが確認された (図 2)。

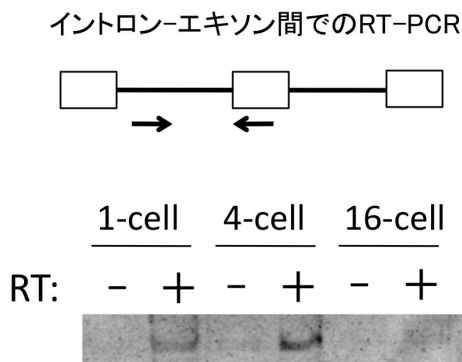


図2. *squint* mRNA 前駆体の検出

しかしながら、スプライシングを受けて生

成する成熟 mRNA を検出するプライマーを用いた場合には、初期卵割期の各ステージ間で mRNA 存在量に大きな変動が見られなかった。これらのことから、16 細胞期頃のスプライシング効率には、必ずしも過去に報告されているほどには大きな上昇ではないものと推察される。

##### (2) ゼブラフィッシュ卵割期におけるスプライシング未完了な mRNA 前駆体のゲノムワイドな探索

ゼブラフィッシュ初期胚の各ステージから抽出した全 RNA を用いて RNA-seq によるゲノムワイドな解析を行ったところ、*squint* をはじめとした遺伝子群において、イントロンを含む転写産物の存在が確認されているので、スプライシング抑制制御機構が働いているか検証を進めている。

また、ゼブラフィッシュの卵割期初期胚においてイントロン領域をプローブとしたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを実施したところ、十分に有意なシグナル強度が得られておらず、現時点では mRNA 前駆体が核内において蓄積しているかどうか (あるいは、mRNA 前駆体が細胞質に存在しており、細胞質におけるスプライシング機構が働いている可能性があるのか) について明確にすることが難しい状況であり、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションの条件検討が必要である。

##### (3) ゼブラフィッシュ卵母細胞における mRNA 輸送機構の解析

ゼブラフィッシュの受精卵内において、スプライシング未完了な *squint* mRNA 前駆体は、おそらく核内において保持されているものと推測される。このような mRNA 前駆体の保持には、転写産物特異的にスプライシング反応を抑制しスプライシング未完了状態にとどめておく機構や、mRNA 前駆体の核外輸送を抑制する機構が関与しているものと考えられる。

このような機構を解明する糸口として、卵母細胞において、スプライシング反応に共役して mRNA のエキソン連結部に形成される EJC 複合体の構成因子 Magoh タンパク質など、mRNA の核から細胞質への輸送に関連するタンパク質を同定した。また、免疫沈降実験と質量分析によって、これらタンパク質の相互作用因子について同定を行い、その細胞内局在性などを検討した。

また、GFP を融合した Magoh タンパク質をコードする mRNA を卵形成の比較的初期の卵

母細胞にインジェクションすることにより、GFP-Magoh タンパク質の核局在を検出する実験系を構築できた。そこで、このような系を用いることで、squint mRNA 前駆体と相互作用しているタンパク質等について解析を進めている。

#### (4) squint mRNA 前駆体のスプライシング抑制・活性化制御を再現する実験系の構築

スプライシング未完了な mRNA 前駆体の保持、および、スプライシング抑制の解除機構を検討する実験系を構築するため、イントロンを含む squint mRNA 前駆体を試験管内で合成し、ゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションによって導入した。そして、卵割期の各ステージから抽出した RNA を用いて RT-PCR によって解析を行った。その結果、16 細胞期頃になっても、導入した mRNA 前駆体の存在量には大きな減少は見られず、スプライシングをうけた成熟 mRNA の生成も検出されなかった。

そこで、イントロン領域を含む squint 遺伝子全長のゲノム断片を CMV プロモーターに連結した発現ベクターを作製して受精卵へのインジェクション実験を行ったところ、非常に早いステージから成熟 mRNA が検出されることがわかった。

また、イントロンを含む squint mRNA 前駆体をヒト培養細胞である HeLa 細胞の核抽出液と混合し、試験管内においてスプライシング反応を行ったところ、通常の場合と同様なレベルで、squint mRNA 前駆体を用いた場合と同様なレベルで、squint mRNA 前駆体が効率よくスプライシングされることが明らかとなった。また、CMV プロモーターに squint 遺伝子ゲノム断片を連結した発現ベクターをトランスフェクションによって HeLa 細胞に導入した場合にも、スプライシングされた成熟 mRNA 産物の効率よい生成が観察された。

これらのことから、squint mRNA 前駆体のスプライシング抑制はゼブラフィッシュ卵においてのみ起こる機構であること、および、受精から卵割期にかけて squint mRNA 前駆体のスプライシング制御（イントロン除去の抑制とその解除）が起こるためには、あらかじめ卵形成過程にスプライシング未完了の mRNA 前駆体の状態で卵の核内に蓄積され、RNA スプライシングや mRNA 核外輸送を制御する因子との複合体を形成していることが重要である可能性が示唆された。

今後、ゼブラフィッシュにおいて、改変した squint 遺伝子を卵形成期に発現するトランスジェニック個体を作成することにより、

内在遺伝子に近い状況でイントロンを含む母性 mRNA 前駆体の保持機構やスプライシング制御機構を検討していくことが必要と考えている。

## 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0件)

[学会発表](計1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

[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

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

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

## 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