

自己評価報告書

平成23年4月4日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20112003

研究課題名（和文） mRNA 制御システムによる生殖細胞形成機構

研究課題名（英文） mRNA regulation in germ cell formation

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

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学、発生生物学

キーワード：生殖細胞、生殖質、mRNA 制御、miRNA、RNA 結合蛋白質

1. 研究計画の概要

多細胞動物において、次世代を生む生殖細胞の形成・分化過程には、RNA レベルでの遺伝子発現制御（RNA プログラム）が中心的役割を担うことが示唆されている。本研究では、ゼブラフィッシュ始原生殖細胞形成を、RNA プログラムを主要な分子基盤とした「生殖質による生殖細胞の決定」と「生殖細胞決定プログラムの誤作動の防御とその解除による生殖細胞・体細胞の分化確立」と捉え、mRNA-蛋白質複合体（mRNP）の局在化による生殖質・生殖顆粒の形成機構、生殖顆粒を構成する mRNP の生理機能、生殖質 mRNA の分解・翻訳抑制装置、および、その分解・翻訳抑制の解除に働く生殖細胞特異的機構の解明を進める。

2. 研究の進捗状況

(1) 生殖細胞・体細胞の分化確立に働く miRNA 制御システム

ゼブラフィッシュ胚では、生殖質に局在化する nanos1 や tdrd7 の母性 mRNA が体細胞に取り込まれると、miR-430 によって翻訳抑制や mRNA 分解促進制御を受ける。これに対して miR-430 は生殖細胞にも発現しているが、RNA 結合蛋白質 DAZL が tdrd7 mRNA の 3' UTR に結合し、ポリ A 鎖伸長を促進することによって miR-430 による抑制を解除していることを見出した。さらに、dazl mRNA も体細胞における miR-430 による抑制を受け、DAZL 蛋白質によってポリ A 鎖伸長を介して生殖細胞特異的に発現活性化されることがわかった。

また、メダカ miR-430 の同定・機能解析を行った結果、miR-430 が胚発生初期の母性プログラムの消去や、生殖細胞・体細胞の分化

確立に関与している可能性が強く示唆された。

一方、miRNA によって標的 mRNA の翻訳抑制や mRNA 分解促進が行われる分子基盤を明らかにするため、miRISC 構成因子である TNRC6 蛋白質について解析を進め、PABP 非依存的に翻訳抑制に働く新規モチーフを同定した。

(2) 生殖顆粒形成に働く mRNP 局在化機構

ゼブラフィッシュ初期胚の生殖質に局在化する mRNA は、卵形成過程にミトコンドリア凝集体によって植物極へと輸送されるが、askopos mRNA の場合、ミトコンドリア凝集体・植物極経路を経由しないことを見出し、生殖質 mRNA が多様な局在化経路をとることの意義について検討中である。

ゼブラフィッシュの場合、4細胞期胚の卵割面両端4点に生殖質が形成される。これに対してメダカでは生殖細胞関連遺伝子の母性 mRNA 局在化は見つかっておらず、生殖質の存在についてもこれまで明確となっていない。最近、初期卵割期に生殖顆粒様構造が散在していることを見出しており、さらに検討を進めている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

ゼブラフィッシュ胚や卵母細胞を用いた生化学的解析について技術的な問題による遅延があったが、卵抽出液調製の際に障害となる卵黄成分除去法の至適化、蛋白質の Pull down に用いるタグの変更などにより問題を克服しており、今後は順調な進展が見込まれる。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 生殖顆粒の形成機構・生理機能
生殖顆粒の新規構成因子の同定や、各因子間の相互作用、作用機序を中心に解明する。蛋白質因子同定のための質量分析は領域内の中村との共同研究によって実施する。

(2) 体細胞に取り込まれた生殖質 mRNA の分解・翻訳抑制装置およびその解除機構
TNRC6 による新規の翻訳抑制・ポリ A 鎖短縮化機構、DAZL 蛋白質によるポリ A 鎖伸長化の分子基盤を明らかにし、miRNA 機能とその解除による生殖質 mRNA の発現制御機構を解明する。また、vasa mRNA 分解因子を同定するとともに、その働きを抑制する生殖細胞特異的な機構を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

① Tani, S., Kusakabe, R., Naruse, K., Sakamoto, H., and Inoue, K. (2010) Genomic organization and embryonic expression of miR-430 in medaka (*Oryzias latipes*): insights into the post-transcriptional gene regulation in early development. *Gene* 449, 41-49. 査読有

② Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., and Inoue, K. (2009) DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. *PLoS ONE* 4, e7513. 査読有

③ Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C. and Fujiwara, T. (2009) The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a poly(A)- and eIF4A-dependent manner. *Mol. Cell* 36, 1007-1017 査読有

④ 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* 3, 96-104. 査読有

⑤ Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M., and Inoue, K. (2009) UI-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative splicing. *Nucl. Acids Res.* 37, 1907-1914. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Inoue, K. Control of germline/somatic cell distinction by miRNA function in zebrafish. A satellite symposium on Germ Cells in SDB-JSDB Joint Meeting 2010.

Albuquerque Convention Center (New Mexico, USA) 招待講演

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ

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