

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

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

研究成果の概要（和文）：

ゼブラフィッシュ始原生殖細胞形成をモデル系とした解析を行い、数種の生殖質 mRNA が体細胞で miRNA による抑制制御を受けるのに対し、始原生殖細胞では RNA 結合タンパク質 DAZL がその抑制解除に働くことを示した。また、miRNA によるサイレンシング機構として、PABP に依存しない翻訳抑制機構の役割を示した。一方、生殖顆粒構成因子 Gra タンパク質が翻訳開始因子 eIF4E との結合を介して翻訳抑制を行う可能性を見出した。さらに、TALEN 法によって、いくつかの mRNA 制御因子の変異体系統を樹立した。

研究成果の概要（英文）：

In zebrafish, primordial germ cells (PGCs) are determined by a specialized maternal cytoplasm, germ plasm, which forms at the distal ends of the cleavage furrows in 4-cell embryos. During embryogenesis, miR-430 represses some germ plasm mRNAs incorporated into somatic cells. Here we showed that a germline-specific RNA-binding protein DAZL counteracts the miRNA-mediated repression of tdrd7 and dazl mRNAs. Also we showed that, in zebrafish embryos, miRNA inhibits translation of the target mRNA in a deadenylation- and PABP-independent manner at early time points.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
2009 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2011 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2012 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
総計	83,700,000	25,110,000	108,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：生殖細胞、生殖顆粒、mRNA 制御、miRNA、RNA 結合蛋白質、TALEN 法

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。小型淡水魚ゼブラフィッシュでは、初期発生過程に母性の「生殖質」を取り込んだ細胞が始原生殖細胞となる。生殖質には mRNA やタンパク

質を含む「生殖顆粒」が存在し、生殖質による生殖細胞形成には、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。しかし、生殖顆粒の形成機構や生殖質による生殖細胞決定機構は未解明な点が多い。

研究代表者は、生殖質に局在化すべき nanos1 や tdrd7 mRNA が体細胞に取り込まれると、microRNA (miRNA) の miR-430 によってポリ A 鎖短縮化を介した抑制制御を受けること、一方、miR-430 は生殖細胞にも存在するが、nanos1 や tdrd7 の発現抑制は生殖細胞では何らかの機構で解除されることを見出していた (Mishima et al., Curr Biol, 2006)。

また、ゼブラフィッシュ胚における解析から、miRNA が標的 mRNA の翻訳抑制に加え、ポリ A 鎖の短縮化や分解促進を担うことを示していた。 (Giraldez et al., Science, 2006)

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュ初期胚における始原生殖細胞形成が、RNA プログラム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」から成立していると捉え、mRNA-タンパク質複合体 (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ことを目的とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ初期胚や卵母細胞を用い、mRNA 制御を受ける遺伝子や制御因子について、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法や免疫染色により、発現様式や細胞内局在性の検討を行った。

初期胚への mRNA インジェクションによる RNA 結合タンパク質の強制発現や、アンチセンスモルフォリノオリゴによる発現阻害実験を行い、GFP に 3' UTR を連結したレポーター mRNA の安定性や翻訳効率への効果を検討するとともに、 λ N ペプチドを融合したタンパク質を用いることによってレポーター mRNA に制御因子を繫留させる tethering 系を用いて解析を進めた。さらに、mRNA 制御や miRNA 機能を検出するレポーター遺伝子を発現する各種のトランスジェニックシステムを作成し、より内在に近い状況での解析を行った。

また、ゼブラフィッシュ胚や卵母細胞の抽

出液を作成し、mRNA 制御因子複合体の生化学的解析を行った。

さらに、人工ヌクレアーゼを用いた TALEN 法を導入し、制御関連因子の機能を欠損する変異体系統を樹立した。

4. 研究成果

(1) 生殖細胞・体細胞の分化確立に働く miRNA 制御システム

① 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 (Mishima et al, Curr Biol, 2006)。これに対して miR-430 は生殖細胞にも発現しているが、生殖細胞特異的な RNA 結合タンパク質である DAZL が tdrd7 mRNA の 3' UTR に結合し、ポリ A 鎖伸長化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 (図 1)。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 鎖伸長化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 (論文 9)。

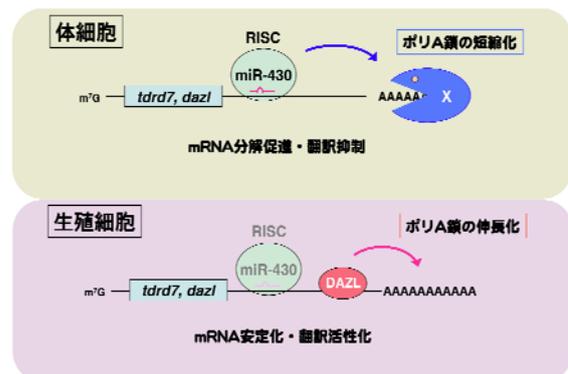


図1. ゼブラフィッシュ生殖細胞・体細胞分化に働くmiRNA制御システム

② 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 (論文 8)。ゼブラフィッシュと比較して、miR-430 は同様な生理的役割を担っているものの、標的となる生殖細胞関連 mRNA は異なっているようである。

③ 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 のコア因子 TNRC6 について、レポーター mRNA への tethering 系や miRNA 機能を検出するレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックシステムなどを用いた解析を行った。miRISC によるサイレンシ

グ機構として、ポリ A 鎖短縮化及びポリ A 鎖結合タンパク質 PABP に依存しない翻訳抑制機構が大きく貢献することを明らかにした (図 2) (論文 5)。さらに、TALEN 法により機能欠損型の TNRC6A 変異体系統を樹立した。今後この変異体系統を用いることで、個体レベルでの TNRC6 の生理機能や活性調節機構を明らかにしていくことが可能と考えている。

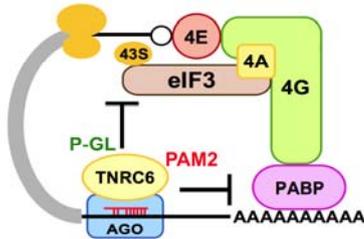


図2. miRNA サイレンシング複合体による翻訳抑制機構モデル

(図 3)。ヒト gra 遺伝子について解析したところ、精巣に強く発現することがわかった。また、Gra タンパク質をヒト HeLa 細胞で発現させると細胞質に顆粒状に存在することを見出している。さらに Gra タンパク質の生理機能解析を押し進めるために、TALEN 法によって変異体系統を樹立した。4 細胞期に生殖質に局在する RNA 結合タンパク質 Bruno-like (Brul) についても変異体系統を樹立した。

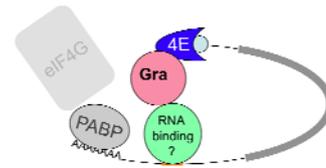


図3. 生殖顆粒因子Graタンパク質による翻訳抑制機構モデル

(2) 生殖顆粒形成に働く mRNP 局在化機構

①ゼブラフィッシュ初期胚の生殖質に局在化する vasa, nanos1, dazl などの 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。

(Kosaka et al, Mech Dev, 2007)

これに対し、askopos mRNA の場合、初期胚の生殖質に局在化が観察されるが、卵形成過程にはミトコンドリア凝集体・植物極経路をとらず、動物極に局在化することを見出し、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。また、卵成熟過程に c-mos mRNA が動物極局在化することを示した (論文 14)。

②メダカでは生殖細胞関連遺伝子の母性 mRNA 局在化は報告されておらず、生殖質の存在についてもこれまで明確となっていない。ゼブラフィッシュ卵母細胞におけるミトコンドリア凝集体の形成には Bucky Ball (Buc) タンパク質が中心的役割を果たす可能性が示唆されており、4 細胞期胚では、卵割面両端の生殖質に局在化する (Marlow & Mullins, Dev Biol, 2008)。メダカにおいて解析した結果、Buc タンパク質は初期卵割期に卵割溝には存在しないが、生殖顆粒様の凝集塊の状態で見出していることを見出した。

③生殖顆粒構成因子である Gra タンパク質が翻訳制御因子として働く可能性を見出した。すなわち、Gra タンパク質は 4E-BP と類似のモチーフを有し、mRNA キャップ構造に結合している eIF4E への結合を介して翻訳を抑制する活性を持っていることが明らかになった

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 15 件)

① Tani, S., Kuraku, S., Sakamoto, H., Inoue, K., and Kusakabe, R. Developmental expression and evolution of muscle-specific microRNAs conserved in vertebrates. *Evolution & Development* (in press)

査読有り

② Kusakabe, R., Tani, S., Nishitsuji, K., Shindo, M., Okamura, K., Miyamoto, Y., Nakai, K., Suzuki, Y., Kusakabe, T. G., and Inoue, K. (2013) Characterization of the compact bicistronic microRNA precursor, miR-1/miR-133, expressed specifically in Ciona muscle tissues. *Gene Exp. Patterns* 13, 43-50.

査読有り

③ Shiimori, M., Inoue, K., and Sakamoto, H. (2013) A specific set of exon junction complex subunits is required for the nuclear retention of unspliced RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 33, 444-456.

査読有り

④ Nishibu, T., Hayashida, Y., Tani, S., Kurono, S., Ukekawa, R., Kojima-Kita, K., Kurokawa, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Inoue, K., and Honda, S.

(2012) Identification of MIWI-associated poly(A) RNAs by immunoprecipitation with an anti-MIWI monoclonal antibody. *BioScience Trends* 6, 248-261
査読有り

⑤ Mishima, Y., Fukao, A., Kishimoto, T., Sakamoto, H., Fujiwara, T., and Inoue, K. (2012) Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 1104-1109
査読有り

⑥ Fujiwara, T., Fukao, A., Sasano, Y., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Imataka, A., Inoue, K., Endo, S., Sonenberg, N. Thoma, C., and Sakamoto, H. (2012) Functional and direct interaction between the RNA binding protein HuD and active Akt1. *Nucleic Acids Res.* 40, 1944-1953
査読有り

⑦ Fujiwara, Y., Kasashima, K., Saito, K., Fukuda, M., Fukao, A., Sasano, Y., Inoue, K., Fujiwara, T., and Sakamoto, H. (2011) Microtubule association of a neuronal RNA-binding protein HuD through its binding to the light chain of MAP1B. *Biochimie* 93, 817-822.
査読有り

⑧ 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.
査読有り

⑨ 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.
査読有り

⑩ 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
査読有り

⑪ Hayashida, Y., Nishibu, T., Inoue, K., and Kurokawa, T. (2009) A useful approach to total analysis of RISC-associated RNA. *BMC Research Notes* 2, 169.
査読有り

⑫ Fukumura, K. and Inoue, K. (2009). Role and mechanism of U1-independent pre-mRNA splicing in the regulation of alternative splicing. *RNA Biol.* 6, 395-398.
査読有り

⑬ Hayashi, S., Akiyama, S., Tamaru, Y., Takeda, Y., Fujiwara, T., Inoue, K., Kobayashi, A., Maegawa, S., and Fukusaki, E. (2009). A novel application of metabolomics in vertebrate development. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 268-272.
査読有り

⑭ 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.
査読有り

⑮ Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M., and Inoue, K. (2009). U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Research* 37, 1907-1914.
査読有り

[学会発表] (計 6 件) 招待講演のみ記載

① Inoue, K. RNA regulation in zebrafish germ cell formation. 2012 Taiwan-Japan Joint Symposium on cell signaling and gene regulation.
(2012.11 台南・台湾)

② Mishima, Y., and Inoue, K. Molecular mechanisms and regulations of microRNA-mediated gene silencing in zebrafish. 第 34 回日本分子生物学会・ワークショップ
(2011.12 横浜)

③ 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.
(2010.8 New Mexico.America)

- ④ Inoue, K. Control of germline/somatic cell distinctions by miRNA function. The NIBB International Practical course “Developmental Genetics of zebrafish and medaka” (2009.1.29 基生研)
- ⑤ Inoue, K. U1-independent splicing and the splicing regulation. 第32回日本分子生物学会 ワークショップ「多様性を生むRNAプログラム」
(2009.12.9 横浜)
- ⑥ Inoue, K. U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative splicing. 国際シンポジウム “The expanding world of post-transcriptional regulation of gene expression”
(2008.12.13 東京医科歯科大学)

[その他]

ホームページ

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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 邦夫 (KUNIO INOUE)
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

なし

(3) 連携研究者

なし