

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440102

研究課題名(和文)母性mRNAの安定的貯蔵機構

研究課題名(英文)Mechanism of maternal mRNA stored in oocytes

研究代表者

千葉 和義 (Chiba, Kazuyoshi)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：70222130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトデ卵では、サイクリンBのmRNAは短いポリA末端がウリジンで修飾されており、ホルモン刺激によってそのウリジンがトリミングされると同時にポリA伸長が起こること、さらに合成したRNAをマイクロインジェクションすることでウリジル化はRNA安定には関与しないことも明らかにした。体細胞ではウリジル化はmRNA不安定化にはたらくことが報告されているが、卵ではむしろ翻訳抑制にはたらいっていることが示唆された。本研究により、母性mRNAの新たな3' UTR修飾と翻訳制御機構が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Using starfish oocytes, we found that cyclin B mRNAs with short poly(A) tails were uridylated and that hormonal stimulation induced deuridylation and poly(A) elongation. When we injected synthetic RNAs of cyclin B into oocytes prior to hormonal stimulation, uridylated RNAs were as stable as non-uridylated RNAs. Following hormonal stimulation, the 3' termini of short poly(A) tails of synthesized RNAs containing oligo(U) tails were trimmed, and their poly(A) tails were subsequently elongated. These results indicate that uridylation in cyclin B mRNA of starfish oocytes does not mediate mRNA decay; instead, hormonal stimulation induces partial degradation of uridylated short poly(A) tails in the 3' to 5' direction, followed by poly(A) elongation. Oligo(U) tails may be involved in translational inactivation of mRNAs.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：mRNA ウリジル化 サイクリンB 卵母細胞 母性RNA ホルモン ポリA

1. 研究開始当初の背景

初期発生の開始に際して、卵内母性mRNAのポリA鎖は伸長し、翻訳が開始される。本研究分野はすでに良く研究されており、その第一人者Richterらは主にアフリカツメガエル卵を用いて、次のモデルを提唱している。『ホルモン刺激で卵母細胞が減数分裂を再開するときに、mRNAに結合したCPEB (cytoplasmic polyadenylation element (CPE) -binding protein) がリン酸化されると脱アデニル化酵素(ポリA鎖を短くする酵素)が働かなくなる。その結果、ポリAポリメラーゼによりポリA鎖が伸長する』。この説によれば、GV卵でポリAが伸びないのは、脱アデニル化酵素がポリA鎖を削っているからだ。申請者らが、ヒトデ卵母細胞サイクリンBのmRNAについて調べたところ、アフリカツメガエルと同様にCPEBはGVBD時にリン酸化され、ポリAが伸長することが明らかになった(24年度 発生生物学会・動物学会 発表)。すなわちGVBD前のポリA鎖長は10塩基程度であり、GVBD後にCPEBがリン酸化されると数十塩基に伸びていた。一見Richterの説に合っているようだ。しかし、どのような仕組みでGV卵のポリA鎖長が10塩基程度に保たれているのか、なぜ脱アデニル化酵素によって、もっと削られないのかは、明らかでない。この問題は、アフリカツメガエル研究者にも、申請者が知る限り、取り上げられておらず、今まで誰も不思議に思わなかったのだ。どのような機構で母性RNAの3'末端の短いポリA鎖が安定的に維持され得るのか、不明であった。申請者らは、GV卵における母性RNAの安定的な維持機構を解明するためには、母性RNAの3'末端の構造を厳密にシーケンスする必要があると考えた。そのため、ごく普通に用いられているポリTをプライマーとしたcDNA作成によるシーケンス法は不適切だ(なぜならアニーリングが完全に末端からは必ずしも始まらないから)そこ

で母性RNAの3'末端にRNAリガーゼを用いてDNAアダプターを結合させた。そしてアダプター配列からcDNAを合成して、RT-PCR後にクローニング、そして3'末端の完全な構造をシーケンスした。その結果、驚くべき結果を得た。すなわちGV卵の短いポリA鎖にはさらに2~7個のオリゴUが結合していたのだ。

なぜ今まで、このような構造が知られていなかったのだろうか? それはcDNAの作成方法に問題があったと考えられる。一般にcDNAはオリゴ(dT)プライマーを使用して作成されていたので、末端UはcDNAに逆転写されなかったのだろう。

2. 研究の目的

ごく最近、本研究を開始してから、動物培養細胞等においてmRNA末端のオリゴUが、mRNAの不安定化(分解)にはたらいっていることが報告された(Lim et al. 2014)。ところが卵の母性RNAは一般に安定的に維持されると信じられており、その末端がU化されていることで、不安定化してしまうとは考えにくい。

そこで本研究では、ホルモン処理前の卵母細胞のオリゴUの生理的役割を明らかにすることを目的とした。そのために、まずはホルモン処理後に、経時的にオリゴUがどのように削除され、さらにポリA伸長が起こるのかについての詳細を明らかにする。さらにオリゴUの生理的意義として「mRNA3'末端のポリUは、脱アデニル化酵素による過剰なmRNA分解を防止している」の仮説を立て、その真偽を明らかにする。

3. 研究の方法

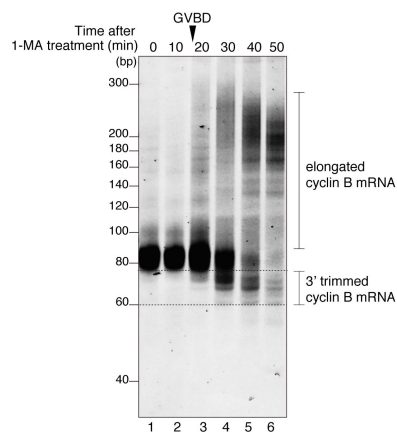
内在性サイクリンBの3'末端の短縮・伸長反応を検出するためには、サイクリンBの3'末端にアダプター配列を結合し、アダプ

ター配列をプライマーとして逆転写酵素を用いて cDNA 合成を行い、さらにサイクリン B 特異的配列とアダプター配列の間を PCR で増幅する。

サイクリン 3' 末端の mRNA 3' 末端のオリゴ U 鎖構造が、安定的な母性 RNA 貯蔵に役立っているか否かを明らかにするためには、「オリゴ U 付」、または「オリゴ U なし」の RNA を合成して、卵母細胞にマイクロインジェクションする。「オリゴ U 付」が安定に存在し続け、「オリゴ U なし」が分解されれば、オリゴ U が安定的な母性 RNA 貯蔵に役立っていると結論付けられる。具体的には、放射性ヌクレオチドを用いた T7RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写法で、サイクリン mRNA の 3' 領域合成を行い、精製後、卵内にマイクロインジェクションを行う。ホルモン処理前後に、卵から放射性 mRNA を回収して、電気泳動により、マイクロインジェクションされた RNA の分解またはポリ A 化による伸長の有無について判定する。

4. 研究成果

卵内サイクリン B の短い 3' 領域だけを増幅することで、3' 領域のわずかな短縮伸長を検出できるように工夫したところ、右図のようにホルモン処理後 20 分で 3' 領域の約 10 塩基の削り込みが起こり、引き続いて 100 塩基の伸長が検出できた。このことは、3' の U がホルモン刺激で削り込まれ、引き続いてポリ A 化されることを示唆している。実際、サイクリンの cDNA をシーケンスすることで、U 削り



込み ポリ A 伸長、は確認できた (発表論文)。次に、U 削り込み ポリ A 伸長に必要な mRNA 領域を明らかにするために、T7RNA polymerase + 酵母 TUTase を用いた正確な末端構造をもつ mRNA を作成する手法を開発した。本手法は、T7RNA polymerase による合成 RNA の 3' 末端構造が、鋳型 DNA 配列を正確には反映しない事実と直面し、それを解決するために開発したものである (詳細は発表論文)。そのうえで本研究では、「3' 末端ウリジンの除去 ポリ A 化」という 2 段階の反応が、3' UTR 配列のみで調節されるのか否かを確かめた。具体的には、内在性サイクリン B の 3' 領域と同様な構造をもつ「5' cap + 3' UTR + 短いポリ A + オリゴ U 修飾」配列の RNA を人工合成し、これを卵母細胞にマイクロインジェクションして、さらに卵成熟を誘起した。マイクロインジェクションした RNA を RTPCR で増幅し、クローニング、シーケンスした結果、ウリジンの除去とポリ A 化が起きたことが確かめられた。すなわち、「ウリジン除去 ポリ A 化」の二段階反応を起こすために、mRNA の 3' UTR 領域が必要であり、5' 側の配列は関与しないことが明らかになった。

さらに近年、ヒト体細胞 mRNA の網羅的シーケンスにより、体細胞の短いポリ A を持つ mRNA にも 3' U 化が起きていること、またそれが mRNA の分解を引き起こすことが報告された (Lim et al. 2014)。これを受け、今回卵細胞におけるウリジン修飾の mRNA 分解への影響を調べた。具体的には、放射性ラベルした「オリゴ U 付」、または「オリゴ U なし」の RNA を合成して、卵母細胞にマイクロインジェクションしたところ、両方の RNA ともに未成熟卵においては安定に存在した。またホルモン刺激でポリ A 化することも確かめられた (発表論文)。したがって、本研究により、体細胞での報告に反し、ホルモン未処理卵母細胞では、ウリジン修飾は分解を引き起

こさず、ウリジン修飾は体細胞での機能とは異なる役割を担っていることが示唆された。 また本研究の仮説「mRNA 3' 末端のオリゴ U は、脱アデニル化酵素による過剰な mRNA 分解を防止している」は、オリゴ U が存在せずとも未成熟卵で安定的に保たれることから、正しくないことが明らかになった。現在、卵細胞で起きる mRNA U 修飾は翻訳の調節において機能を担っている可能性が高いと考えている。一方、図で示したように、U 修飾されたサイクリン B の mRNA はホルモン処理後に部分分解（削り込み）される。削り込みが止まる位置が CPSF 結合領域付近であり、しかしポリ A 化に必要な CPE（発表論文）は削り込みには関与しないことも示唆された。したがって、「どのように母性 RNA の 3' 末端の短いポリ A 鎖が安定的に維持され得るのか」のもともとの疑問は、新たな仮説「卵成熟過程においては CPSF に削り込み防止の機能がある」に結び付けることができた。今後は、この部分分解に U 修飾が必要か否かを明らかにする必要がある。さらに、CPSF がどのように削り込みを抑制しているかについても明らかにする必要がある。また、ポリ A 化前に起きるウリジレーション除去の分子機構の解明、特にウリジレーション除去を担う酵素の同定に取り組み予定である。

参考文献

Lim J, Ha M, Chang H, Kwon SC, Simanshu DK, Patel DJ, Kim VN.

Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation. *Cell* 159: 1365-1376. (2014)

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 2 件)

Ochi, H, and Chiba, K. Hormonal stimulation of starfish oocytes induces partial degradation of the 3' termini of cyclin B mRNAs with oligo(U) tails, followed by poly(A) elongation. *RNA* 22 1-6. (2016).

査読あり doi:10.1261/rna.054882.115.

Ochi H, Aoto S, Tachibana K, Hara M., and Chiba K. Block of Cdk1-dependent poly(A) elongation of *cyclin B* mRNA in MI-arrested starfish oocytes is released by intracellular pH elevation upon spawning.

Mol Reprod Dev 83 79-87. (2016)

査読あり doi: 10.1002/mrd.22599.

〔学会発表〕(計 2 件)

越智洋絵, 千葉和義 ヒトデ卵減数分裂進行時における cyclinB mRNA のオリゴウリジレーションとポリ A 鎖伸長 日本動物学会第 86 回大会、新潟コンベンションセンター 朱鷺メッセ、新潟 (2015)

Ochi, H, and Chiba, K. Removal of 3' terminal oligo(U) tail followed by poly(A) elongation of cyclin B mRNA in starfish oocytes resuming meiosis.

Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, Asamushi Research Center for Marine Biology, Tohoku University, Aomori, Japan (2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 和義 (CHIBA Kazuyoshi)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：70222130