

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07411

研究課題名(和文)生殖細胞の分化・増殖に必須なmRNA安定性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanism of mRNA stability, which is essential for germ cell differentiation and growth

研究代表者

坂本 博 (Sakamoto, Hiroshi)

神戸大学・理学研究科・教授

研究者番号：00187048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：mrg-1 mRNAの始原生殖細胞への限局は体細胞における能動的なRNA分解によってではなく、始原生殖細胞におけるmRNAの特異的な安定化によって生じる可能性が示された。また、mrg-1 3' UTRが受けるRNA安定性制御はRNA二次構造を介さない配列依存的な制御であると考えられる。さらに、トロポミオシン蛋白質LEV-11が始原生殖細胞におけるmrg-1 3' UTRとの相互作用を介してmRNAの安定化制御に寄与することが示唆された。加えて、体細胞でMRG-1を発現しない変異体の表現型から、MRG-1が一部の体細胞におけるクロマチン制御に寄与することも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、mrg-1 mRNAの始原生殖細胞への限局機構にトロポミオシン蛋白質LEV-11が関与することを示唆する結果を得た。トロポミオシンが直接mrg-1 3' UTRと特異的に結合しているかどうかについては今後の課題であるが、このことはRNAの局在に細胞骨格系が極めて重要な役割を果たしていることを再認識させた点で学術的に意義がある。また、従来生殖細胞系列においてのみ機能すると考えられていたMRG-1が体細胞におけるクロマチン制御にも関与することを示したことは学術的に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：It was shown that localization of mrg-1 mRNA to primordial germ cells may not be caused by active RNA degradation in somatic cells, but by specific stabilization of mRNA in primordial germ cells. This RNA stability control that mrg-1 3'UTR undergoes seems to be a sequence-dependent control that does not involve RNA secondary structure. It is also suggested that the tropomyosin protein LEV-11 contributes to the regulation of mRNA stabilization through its interaction with the mrg-1 3'UTR in primordial germ cells. Moreover, the phenotype of mutants that do not express MRG-1 in somatic cells suggests that MRG-1 may also contribute to chromatin regulation in some somatic cells.

研究分野：生殖細胞形成機構に関する発生生物学、分子遺伝学

キーワード：始原生殖細胞 クロモドメイン蛋白質 3'非翻訳領域 mRNA安定性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は精子や卵へと分化し、遺伝情報を次世代に伝えることのできる特別な能力を持った細胞である。多くの動物種において、生殖細胞の形成には、胚発生初期に形成される始原生殖細胞が未分化状態を維持することで体細胞系譜から隔離されるとともに、適切な時期に生殖細胞へと分化することが必要である。申請者は線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成に必須の母性因子としてクロモドメイン蛋白質 MRG-1 を同定した(Fujita et al., Mech Dev., 2002)。MRG-1 は胚発生初期には全ての細胞核内に局在するが、胚発生後期になると始原生殖細胞核内に限局するという特徴的な局在パターンを示す(図1)。また、始原生殖細胞においてはクロマチン制御を介した転写抑制制御に重要であり、その変異体は始原生殖細胞が細胞死を起こし不稔となる(Takasaki et al., Development, 2007)。これまで線虫の始原生殖細胞に局在し機能する因子についての研究は、細胞質に存在し多種類の RNA 結合蛋白質と RNA で構成される生殖顆粒 P granule が中心であり、MRG-1 などの核内蛋白質についての知見は乏しかった。申請者はこれら背景から、MRG-1 を始めとした始原生殖細胞に限局する核内蛋白質がどのようにして始原生殖細胞へと限局するのか、また、その機能

について研究を進めた。その結果、MRG-1 の始原生殖細胞への限局が *mrg-1* mRNA の 3' 非翻訳領域(3' UTR) を介した mRNA の安定性制御によって生じること(図1) さらにこの制御が P granule 非依存的に行われる新規の局在制御機構であることを明らかにしている(Miwa et al., Genes Cells, 2015)。

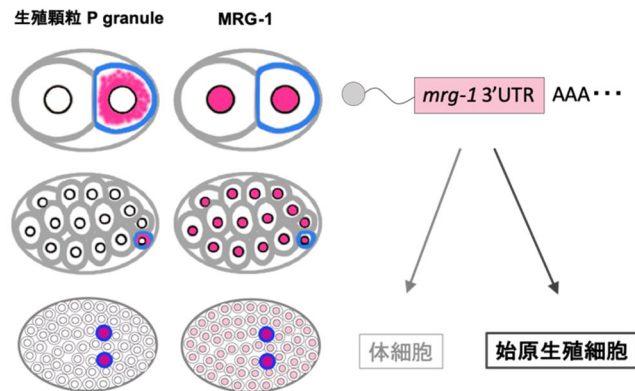


図1: MRG-1は3'UTRを介したmRNAの安定性制御により始原生殖細胞に限局する

## 2. 研究の目的

MRG-1 は初期胚では全ての細胞に mRNA が分配されるが、胚発生に伴って体細胞における mRNA の分解が行われることによって、始原生殖細胞へと限局する。このようにして生殖細胞形成に必要な蛋白質を始原生殖細胞に限局させるとともに、体細胞分化には悪影響を与えないように体細胞系譜から除去する時空間的な mRNA の安定性制御機構が存在することは全く新規な発見であり、その詳細を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) RNA 分解関連因子の RNAi スクリーニング

これまでの研究において、*mrg-1* mRNA の 3' UTR を結合したレポーター遺伝子が *mrg-1* mRNA とほぼ同じ安定性制御を受けることを明らかにしている。そこで、これを発現するトランスジェニック線虫に対して、mRNA の分解に関わる因子群を RNAi により網羅的に阻害することで、体細胞において *mrg-1* mRNA の分解に関与する因子を同定する。

### (2) RNA 安定制御に関わるシス配列の同定

*mrg-1* mRNA の 3' UTR(250nt)の部分欠失変異を持つレポーターRNA の解析から、3' UTR の 155-231 塩基の領域に *mrg-1* mRNA の分解制御に関与することが示唆されている。この領域内に RNA 分解に関わるシス配列が存在するとの予測の下、任意の領域を部分欠損させたレポーター遺伝

子を作製し、その発現解析を行う。

### (3) *mrg-1* 3' UTR に相互作用する因子の同定

MS2 タギング法を利用し、*mrg-1* 3' UTR と相互作用する因子を同定する。GFP ヒストンの下流に、MS2 結合配列 (MS2 コート蛋白質の認識配列) と、*mrg-1* 3' UTR を付加したレポーター mRNA を発現するトランスジェニック系統を作製し、このトランスジェニック胚から得られた抽出液と MS2 コート蛋白質とを混合しプルダウンアッセイを行うことでレポーター mRNA と相互作用する蛋白質を回収し、質量分析により同定する。

### (4) *mrg-1* 変異体のレスキュー実験による MRG-1 型の局在制御機構の生理学的意義の解明

生殖顆粒 P granule が生殖細胞系列への非対称分配を繰り返すことで始原生殖細胞に局限するのに対して、MRG-1 は体細胞においても発現が見られる。その生理学的意義を理解するために、MRG-1 コード領域の下流に始原生殖細胞特異的な翻訳活性を有する *nos-2* 3' UTR を付加したコンストラクトを用いて *mrg-1* 変異体のレスキュー実験を行うことにより、生殖細胞系列においてのみ MRG-1 を発現する線虫を作製し、その表現型解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) mRNA の分解に関与する因子群に対して網羅的な RNAi 実験による阻害実験を行ったものの、RNAi による阻害効果が認められた多くの因子について *mrg-1* 3' UTR レポーターのシグナルに顕著な変化は観察されなかった。これより、*mrg-1* mRNA の始原生殖細胞への局限が体細胞における能動的な RNA 分解によるものではなく、始原生殖細胞特異的に mRNA が安定化されることによって生じる可能性が示された。

(2) *mrg-1* 3' UTR の 155-231 塩基の領域における RNA の二次構造を M fold 及び Centroid Fold により解析したところ、二次構造を取りづらい配列であるが、211-227 塩基の領域においては強固なステムループ構造を形成する可能性が示された。そこで、この構造を欠損させたレポーター mRNA を発現するトランスジェニック線虫を作製し、発現解析を行ったところ、予測に反しステムループ欠損型のレポーターは全長レポーターと同様のシグナルを示した。これより、*mrg-1* 3' UTR が受ける RNA 安定性制御は RNA 二次構造を介さない配列依存的な制御であると考えられる。

(3) MS2 結合部位を付加した *mrg-1* 3' UTR を発現するレポーター系統を作製したところ、通常の *mrg-1* 3' UTR レポーター系統との間で発現量に大きな差がないことが確認された。そこで、この線虫株の後期胚における細胞抽出液を用いた MS2 タギング法により、*mrg-1* 3' UTR と相互作用する蛋白質群の単離を行った後、質量分析を行うことにより、トロポミオシン蛋白質 LEV-11 をはじめとした細胞骨格を構成する因子群を *mrg-1* 3' UTR との相互作用因子の候補として同定した。これら因子群に注目し、3' UTR レポーター系統に対して、消化管を構成する E 細胞系列における過剰発現実験を行ったところ、LEV-11 の過剰発現胚においてレポーター蛋白質のシグナル上昇が観察された (図 2)。このことから、LEV-11 が始原生殖細胞に

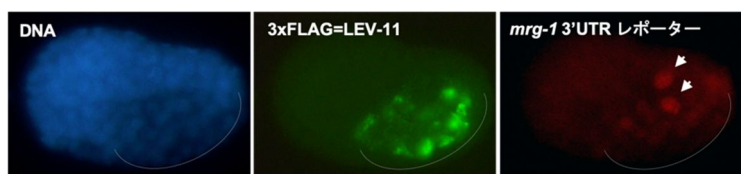


図2: LEV-11を過剰発現させた細胞において、*mrg-1* 3'UTRレポーターのシグナルが上昇する (点線-LEV-11過剰発現領域、矢印-始原生殖細胞核)

おける *mrg-1* 3' UTR との相互作用を介して mRNA の安定化制御に寄与することが示唆された。

(4) *mrg-1* 変異体のレスキュー実験により、胚発生過程においては始原生殖細胞でのみ MRG-1 を発現する系統を樹立した。この線虫は稔性を有するものの、成長遅延や陰門の形成異常などの体細胞性の異常が観察された(Miwa et al., Genes Cells, 2019)ことから、MRG-1 は胚発生初期の体細胞においても何らかの機能を担うものと考えられる。このことから、MRG-1 固有の局在制御機構の生理学的意義について、胚発生初期に mRNA を全ての細胞に分配することで体細胞におけるクロマチン制御に寄与するとともに、始原生殖細胞が形成されるまでの過程において mRNA が維持されるために重要であると考えられる。

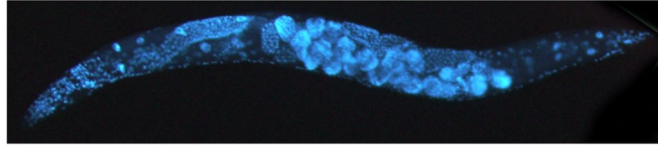


図3：体細胞においてMRG-1を発現しない線虫は、陰門の異常により、受精卵を体外に排出できない

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miwa, T., Inoue, K., Sakamoto, H.	4. 巻 24
2. 論文標題 MRG-1 is required for both chromatin-based transcriptional silencing and genomic integrity of primordial germ cells in <i>C. elegans</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 377-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 The chromodomain protein MRG-1 is required for global repression of Pol II-dependent transcription in the primordial germ cells in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会、第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 巳波孝至、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 The chromodomain protein MRG-1 is required for global repression of Pol II-dependent transcription in the primordial germ cells in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> においてクロモドメイン蛋白質MRG-1は始原生殖細胞における転写抑制制御に必要である
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miwa, T., Takasaki, T., Inoue, K., Sakamoto, H.
2. 発表標題 Chromodomain protein MRG-1 is required for global repression of Pol II-dependent transcription in the primordial germ cells in <i>C. elegans</i> .
3. 学会等名 第50回発生生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 線虫始原生殖細胞におけるクロモドメイン蛋白質MRG-1の機能解析
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 線虫クロモドメイン蛋白質MRG-1は始原生殖細胞における転写抑制制御に必要である
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----