

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07422

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質の機能解明から迫る原始卵胞形成の分子機構

研究課題名(英文) Primordial follicle formation: insights from the study of RNA-binding proteins

研究代表者

加藤 譲 (Kato, Yuzuru)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：60570249

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)：RNA結合タンパク質ELAVL2は原始卵胞形成に必須のRNA制御因子である。しかし、その分子機構は未解明であった。本研究は ELAVL2の機能解析から、原始卵胞形成におけるRNA制御機構を明らかにすることを目的とした。その結果、1)ELAVL2はRNAヘリカーゼDDX6を含む細胞質顆粒P-bodyの構成因子のメッセンジャーRNAと結合し、その翻訳を促進すること、2)原始卵胞形成過程の卵母細胞において巨大なP-body様の細胞質顆粒が形成されること、を見出した。また、P-body様顆粒の形成に必須のDDX6変異体の解析から、同顆粒が原始卵胞形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は女性の生殖可能期間を支える最も未成熟な卵胞である原始卵胞の形成機構の理解深化を目指すものである。本研究により原始卵胞の形成に必須のRNA結合タンパク質ELAVL2の機能の一端が明らかにされたことは、原始卵胞形成機構の理解に大きく貢献するものである。また本研究から得られる成果は、早発閉経などの女性不妊症の原因究明に貢献することが期待できる他、将来的に女性不妊治療に役立つ技術の開発などに有用な知的基盤となる可能性を秘めており、学術のみならず医学分野への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Primordial follicles are a finite reservoir of mammalian eggs, which arise from oocytes in cyst within few days after birth in mice. However, molecular mechanisms underlying the formation of primordial follicles are largely unknown. In this study, we aimed to reveal the role of an RNA-binding protein, ELAVL2, involved in the formation of primordial follicles in mice. we found that ELAVL2 acts as a promoter of translation of genes related to processing bodies (P-bodies). Furthermore, we revealed that P-body-like huge RNP granules were assembled in oocytes prior to the formation of primordial follicles. Targeted deletion of Ddx6, a crucial genes required for the assembly of P-bodies, exhibited defective formation of primordial follicles, suggesting that ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of primordial follicles in mice.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 卵巣 原始卵胞 ELAVL2 DDX6 RNP顆粒

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖幹細胞に依存しない哺乳動物の卵子形成において、卵子はどのようにして継続的に産生されるのか？これは、生殖生物学における大きな問いの一つである。例えばヒトの場合、性成熟後およそ 30 年に渡り卵子を産生し続ける。この間卵巣内では、最も未成熟な卵胞である原始卵胞を維持しつつ、逐次的にその一部の卵胞成長を活性化することにより卵子を産生する。継続的に卵子を産生し続けるためには卵子のリザーバーである原始卵胞が適切数形成されなければならないが、その分子機構に関する知見は乏しい。

哺乳動物のモデル生物であるマウスにおいて、卵母細胞は細胞間架橋により互いに連結したシストとして発生し、出生後、シストが崩壊することにより原始卵胞が形成される。これまでの研究から、原始卵胞形成に関わる転写因子やシグナル因子は幾つか報告されてきた。一方、遺伝子発現制御の中心的役割を担う分子機構の一つである RNA 結合タンパク質が介する転写後遺伝子発現制御 (RNA 制御) は、性分化、減数分裂、精子形成、卵子成熟など生殖細胞の様々な発生プロセスに関与するが、原始卵胞形成における知見はこれまで得られてこなかった。

我々はこれまでに、原始卵胞形成に関わる RNA 結合タンパク質 (RBP) のスクリーニングから、メッセンジャー RNA (mRNA) の安定化・翻訳促進に関わるとされる RBP、ELAVL2 を同定した。Elavl2 ノックアウトマウスを作成し、原始卵胞形成への関与を解析したところ、変異体卵巣ではシスト崩壊が正常に起こらず、卵母細胞は出生後短期間の間に死滅することを見出した。このことから、ELAVL2 は原始卵胞形成に必須の RNA 結合タンパク質であることが明らかとなった。そこで本研究では、ELAVL2 が介する RNA 制御機構に着目し、原始卵胞形成に関わる分子機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、原始卵胞形成に必須の RBP, ELAVL2 の機能解析から、原始卵胞形成における RNA 制御機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では以下に記す 4 つの研究を行った。その結果と成果を 4. に記す。

1. RNA 免疫沈降・RNA シーケンスによる ELAVL2 結合 RNA の同定
2. ELAVL2 の下流で起こる細胞内イベントの解析
3. ELAVL2 により制御を受ける因子 (DDX6) の同定
4. 原始卵胞形成における DDX6 の機能解析

4. 研究成果

1. RNA 免疫沈降・RNA シーケンスによる ELAVL2 結合 RNA の同定

ELAVL2 に結合する RNA を網羅的に同定するため、出生直後の卵巣を用いて、抗 ELAVL2 抗体により RNA 免疫沈降を行った。ELAVL2 と共沈殿した RNA を次世代シーケンスにより同定し、2519 の遺伝子を同定した。続いて、どのような遺伝子群が ELAVL2 と結合するか調べるためジーンオンロジー解析を行ったところ、P-body (processing body) やストレス顆粒などの細胞質顆粒を構成する遺伝子が有意に ELAVL2 と結合することを見出した。

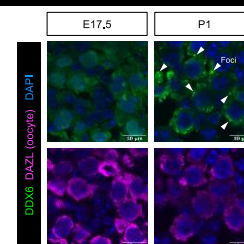
2. ELAVL2 の下流で起こる細胞内イベントの解析

P-body に代表される細胞質 RNP 顆粒は RNA とタンパク質から成る“膜なしオルガネラ”として、液-液相分離により形成される細胞内構造体である。我々はこの“膜なしオルガネラ”に着目し、原始卵胞形成過程の卵母細胞における発現を解析した。RNA ヘリカーゼ DDX6 は P-body の形成に必須のタンパク質として知られ、また、ストレス顆粒の構成因子でもある。そこで、抗 DDX6 抗体を用いて出生前後の卵巣切片に対し免疫染色を行ったところ、原始卵胞形成直前の卵母細胞において、細胞質に DDX6 の顆粒状のシグナルが検出された (図 1)。さらに解析を進めた結果、この DDX6 顆粒は原始卵胞形成後の卵母細胞ではその大きさが縮小することが明らかとなった。

続いて、この DDX6 顆粒が P-body 様であるかストレス顆粒様であるか検討するため、それぞれのマーカーである DCP1A (P-body), TIAR (ストレス顆粒) に対する抗体を用いて共局在の有無を解析した。その結果、DDX6 顆粒は DCP1A と共局在するが、TIAR との共局在は見られなかった。このことから、原始卵胞形成直前に形成される細胞質顆粒は P-body 様の顆粒であることが示唆された。

P-body 様顆粒の形成における ELAVL2 の関わりを明らかにするため、Elavl2 変異体における P-body 様顆粒の形成の有無を解析した。その結果、同変異体では P-body 様顆粒の形成に著しい阻害が観察された (図 2)。ELAVL2 の P-body 様顆粒への明白な局在は見られないことから、ELAVL2 は P-body 様顆粒の構成因子としてではなく、同顆粒を構成するタンパク質の発現制御を介して、P-body 様顆粒の形成に関わることが示唆された。

図 1 : 原始卵胞形成直前に出現する P-body 様顆粒

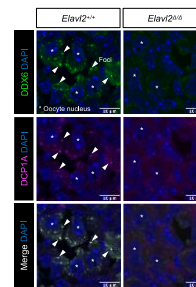


3. ELAVL2 により制御を受ける因子 (DDX6) の同定

そこで ELAVL2 が結合する P-body 様顆粒の構成因子をコードする RNA に着目し、*Elavl2* 変異体における発現変化を解析した。我々は以前、出生直後の卵巣における *Elavl2* 変異体のマイクロアレイ解析を行い、同変異体において発現変動する遺伝子を同定していた。このデータを用いて、ELAVL2 と結合する P-body 様顆粒構成因子をコードする RNA を調べたところ、*Elavl2* 変異体でこれらの遺伝子は発現が変化していないことが判明した。一方、DDX6 や DCP1A タンパク質は同変異体において顕著に発現の低下が見られたことから、ELAVL2 はこれらの標的遺伝子の翻訳に関わることが示唆された。

我々は *Ddx6* に着目し、ELAVL2 との結合を確認するため、培養細胞におけるレポーターアッセイを行った。GFP レポーターの下流に *Ddx6* 遺伝子の 3'-UTR 配列をつなげると、ELAVL2 の GFP に対する結合は有意に強くなる。一方、ELAVL2 の RNA 結合ドメインに変異を入れると、その結合は著しく低下する。これらの結果から、ELAVL2 は *Ddx6* の 3'-UTR に直接結合することが示唆された。

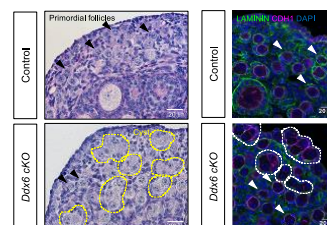
図 2 : *Elavl2* 変異体では P-body 様顆粒の形成不全が起こる



4. 原始卵胞形成における DDX6 の機能解析

上述の解析から、ELAVL2 は原始卵胞形成において DDX6 などの P-body 様顆粒の構成因子の翻訳に関わることが示唆された。では、ELAVL2 依存的な同顆粒の形成は、原始卵胞形成に関与するのだろうか？この疑問に答えるため、卵母細胞特異的 *Ddx6* 変異体を作成し、原始卵胞形成への影響を解析した。*Ddx6* をノックアウトすると卵母細胞に P-body 様の顆粒は形成されない。組織学的解析の結果、同変異体ではおよそ半数の卵母細胞でシスト崩壊が起こらず、原始卵胞形成不全が見られた。また、原始卵胞で発現する卵母細胞特異的遺伝子群の発現上昇も見られなかった。これらの結果から、ELAVL2 依存的な P-body 様顆粒の形成は原始卵胞形成において必要な RNA 制御機構であることが示唆された。

図 3 : *Ddx6* 変異体卵巣の組織象



生後7日目の卵巣
左：PAS染色。右：免疫染色。
矢頭は原始卵胞。点線で囲われた卵母細胞はシスト。

本研究により、原始卵胞形成に関わる RNA 結合タンパク質 ELAVL2 が介する RNA 制御機構の一端が明らかとなった。これにより、原始卵胞形成機構の理解が更に深化することが期待される。一方、ELAVL2 標的 RNA の解析はまだ始まったばかりである。ELAVL2 は *Ddx6* 以外にも多くの RNA と結合すること、また、*Ddx6* 変異体の表現型は *Elavl2* 変異体の表現型に比べマイルドであること、を考慮すると、原始卵胞形成に関わる ELAVL2 標的 RNA がまだ未解析のまま残されていると考えられる。これは今後の課題として、引き続き検討を行う必要がある。

本研究により、マウス原始卵胞形成は P-body 様顆粒の大規模な変遷を伴う発生プロセスであることが示された。今後、この顆粒がどのように原始卵胞形成に関わるのか、解析を進めることで、原始卵胞形成の理解が一段と深まることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuzuru Kato, Tokuko Iwamori, Youichirou Ninomiya, Takashi Kohda, Jyunko Miyashita, Mikiko Sato & Yumiko Saga	4. 巻 20
2. 論文標題 ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948251	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 -

1. 著者名 Kurumi Fukuda, Aki Masuda, Takuma Naka, Atsushi Suzuki, Yuzuru Kato, Yumiko Saga	4. 巻 14 (6): e1007436
2. 論文標題 Requirement of the 3'-UTR-dependent suppression of DAZL in oocytes for pre-implantation mouse development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1007436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 謙
2. 発表標題 マウス生殖細胞の発生・分化におけるRNA制御機構
3. 学会等名 熊本大学発生医学研究所 発生研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 謙
2. 発表標題 原始卵胞の形成と維持に関わるRNA制御機構
3. 学会等名 遺伝学研究所研究集会「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 謙
2. 発表標題 原始卵胞の形成と維持に関わるRNA制御機構
3. 学会等名 基礎生物学研究所 部門公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 謙
2. 発表標題 原始卵胞の形成と維持に関わるRNA制御機構
3. 学会等名 熊本大学発生医学研究所 発生研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato Y.
2. 発表標題 Primordial follicles: insights from a study of RNA-binding proteins for its development and activation
3. 学会等名 The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 謙
2. 発表標題 マウス原始卵胞形成におけるRNA制御機構
3. 学会等名 第7回 植物RNA研究ネットワークシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

卵の品質はDazl 遺伝子の適切なONとOFFで制御される
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2018/06/research-highlights_ja/20180612.html
卵子の前駆体形成に必須な RNA 制御因子の発見」
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/10/research-highlights_ja/rh20191031.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----