

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22376

研究課題名（和文）動物の誕生の仕組みを知る、新規母性効果変異体スクリーニング

研究課題名（英文）A novel screening for isolating maternal-effect mutants that contributes to understanding mechanisms underlying the birth of animals

研究代表者

小谷 友也（Kotani, Tomoya）

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70419852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：配偶子の卵子には初期発生に必要なほぼ全ての因子が準備されており、その形成は動物の誕生に極めて重要である。本研究は卵子に蓄積される転写産物の働きを知るために、最適化された新規の母性効果変異体スクリーニング方を確立することを目的とした。現在までに、小規模の数の飼育水槽を用い、既存のスクリーニングより遥かに効率良く遺伝子挿入をホモ2倍体に持つメスを作出、卵子形成に異常を示す母性効果変異体の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵子形成は全ての動物にとって根源的な現象で、多くの種において古くから形態学的に解析されてきた。一方で、生理学的な解析は限られている。本研究で実施したスクリーニングは、卵子に準備された母性因子と呼ばれる分子の機能を明らかにする。具体的には、スクリーニングで得られる母性効果変異体を解析することで、動物がどのように発生し個体を生み出すのか、その仕組みの解明につながる。本成果は、卵子形成と生物の誕生の仕組みを理解する研究体系を大きく変換する原動力となると期待する。

研究成果の概要（英文）：The proper production of eggs is crucial for almost all animal to promote development, since eggs accumulate almost all factors that are required for promoting developmental processes. The aim of this study was to develop a novel screening that enable us to identify maternal-effect mutants in order to understand functions of transcripts stored in eggs. In this study, we effectively isolated females homozygous for the insertions and identified a maternal-effect mutant using a small scale fish maintenance systems.

研究分野：卵子形成と発生の分子細胞生物学

キーワード：母性因子 卵母細胞 受精卵 初期発生 母性効果変異体 遺伝子挿入変異 トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上には多くの動物種・数限りない個体が生息し、豊かな生態系を造り上げている。我々ヒトも含めこれら動物の個体は一つの細胞、受精卵から生まれる。すなわち、動物が繁栄し続けるには配偶子の卵子と精子を形成し、受精卵から個体を発生させること、これを連続と繰り返すことが必須である。このように、配偶子の形成と受精、その後の発生は全ての動物にとって根元的な現象で、多くの種において古くから観察されてきた。特に卵子には初期発生に必要なほぼ全ての因子が準備されており、その形成は動物の誕生に極めて重要である。しかし、その研究は形態学的な解析の元に成り立っており、生理学的な解析は極めて限られている。

(2) モデル動物のゼブラフィッシュを用いた研究で、卵子はその形成過程において1万種類を超える転写産物を蓄えることが明らかとなった (Harvey et al., 2013)。さらに、化学変異原による大規模な母性効果変異体のスクリーニングがゼブラフィッシュにおいて実施され、卵子に蓄えられた数十種類の転写産物の役割が明らかとされた (Dosch et al., 2004; Wagner et al., 2004)。その解析から、卵子に蓄えられた転写産物は受精と卵割のみでなく、細胞の分化・形態形成のあらゆる現象に重要な役割を持つことが明らかとなってきた。この研究は、個体の誕生に重要な卵子形成を生理学的に理解する扉を開いたと言える。しかし、化学変異原を用いた母性効果変異体のスクリーニングは膨大な設備と労力を必要とし、変異体の原因遺伝子の同定も困難を極める。これら研究は画期的であったが、同様の研究を一研究室で実施することは現実的ではない。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子挿入による新規の母性効果変異体のスクリーニング法を確立することを目的とした。本研究はまた、母性因子がどのようにその機能を発揮し発生を進行するのか、その仕組みを解明し母性因子による発生の制御機構の理解を目的とした。その成果は、動物の誕生の仕組みを生理学的に理解する原動力となりうる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では母性効果変異体のスクリーニングを格段に最適化し、多くの変異体の同定を目指した。その概要は次の通りである。(A) メダカで同定された *Tol2* トランスポゾンを利用し、高頻度でゼブラフィッシュ・ゲノムに遺伝子挿入を導入する。(B) 挿入遺伝子の持つ配列によって、卵子で発現する遺伝子に入った遺伝子挿入を選別する (第一段階スクリーニング)。(C) 遺伝子挿入をホモ2倍体にもつメスを作出し、卵形成と発生を観察し変異体を同定する (第二段階スクリーニング)。

(2) < 遺伝子挿入による変異体作製 >

化学変異原はゲノム配列にランダムに点変異を生じさせる。この方法はゲノムに変異を高頻度で導入できる利点を持つが、原因遺伝子の同定に膨大な労力と時間を要する。本研究は脊椎動物で高い転移活性を持つ *Tol2* トランスポゾンを用い、遺伝子挿入変異体を作製した。変異体の原因遺伝子は、PCR法によってわずか1日で同定可能である。

(3) < 遺伝子発現の可視化 >

化学変異原で生じる点変異は変異体を同定するまで選別できない。このため、生まれた全ての個体を生育しスクリーニングする必要性が生じる。したがって、母性効果変異体のスクリーニングには、数千~1万個の水槽が必要となる。本研究は、トランスポゾンにスプライス・アクセプター (SA) 配列と GFP をコードする遺伝子を配置することで、卵子で発現する遺伝子に対する挿入を選別した (図1)。次に、同じ遺伝子挿入を持つ第一世代の個体を掛け合わせ、

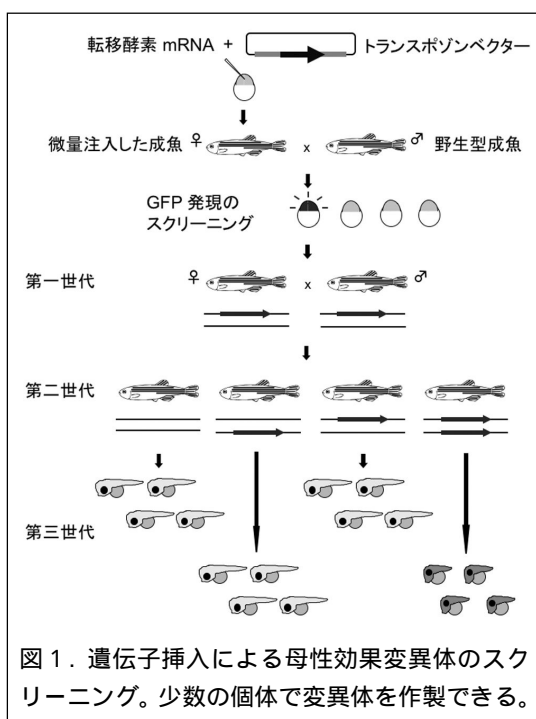


図1. 遺伝子挿入による母性効果変異体のスクリーニング。少数の個体で変異体を作製できる。

第二世代にホモ2倍体の遺伝子挿入を作製した(図1)。その個体はPCRを用い容易に同定できる。これにより、母性効果変異体のスクリーニングを数十~数百個の水槽で実現することが可能となる。

(4) <母性因子の機能とその制御機構の解明>

本研究では主にタンパク質を発現し発生を進行させる母性因子を研究対象とした。これらタンパク質がどのように適切な時期に適切な部位で発現しその機能を発揮するのかを、in situ hybridization 法、免疫染色法、Puro-PLA 法を用い、包括的に解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究で、210ペアの個体について遺伝子トラップの有無をスクリーニングし、45系統の単離に成功した。これらの中で、19系統における遺伝子挿入部位を決定、ゲノム上にマップした。さらに、約20系統においてホモ2倍体個体を同定し、下記の通り表現型解析に至っている。すなわち、本研究の新規母性効果変異体スクリーニングの有効性を示し、その実施によって卵形成と胚発生の新たな仕組みを解き明かせることを示した。

(2) スクリーニングによって得られたh91A系統では、遺伝子トラップベクターは卵母細胞特異的に発現する遺伝子のイントロンに挿入されており、RT-PCRによって上流の転写産物をトラップしていることを確認した。その遺伝子は、タンパク質コード領域を持たない long non-coding RNA の一つであり、ホモ2倍体メスの卵母細胞においてその転写産物量が減少していることを確認した。しかし、ホモ2倍体の卵母細胞でも転写産物は存在しており、これらから生まれた胚は表現型を示さなかった。ゼブラフィッシュ・ゲノムには、ほぼ同じ配列を持つ同様の long non-coding RNA が存在しており、ホモ2倍体個体において転写産物を完全に阻害できない理由はこの重複した遺伝子にあると考えられる。

(3) h116A系統は、受精卵と胚全体の細胞でGFPを発現する。遺伝子トラップベクターは*cit*と呼ばれる遺伝子のイントロンに挿入され、RT-PCRによって上流の転写産物をトラップしていることを確認した。ヒトにおいてこの遺伝子に変異が入った場合、遺伝病の原因となることが知られている。ホモ2倍体のメスは生存可能であるものの、不妊であった。その原因として卵母細胞の形成不全が起こっていると見られ、その詳細な解析を現在進めている。

(4) h58A系統は、h116A系統と同じく受精卵と胚全体の細胞でGFPを発現する。遺伝子トラップベクターは、*lin37*遺伝子の第1イントロンに挿入され、RT-PCRによって上流の転写産物をトラップしていることを確認した。Genomic PCRによって遺伝子挿入をホモ2倍体に持つ稚魚を同定し、その表現型を詳細に解析した。初めに、ホモ2倍体胚で*lin37*遺伝子の転写産物が欠損していることをRT-PCRによって確認した(図2)。*lin37*転写産物を持たない胚は野生型胚と同様に受精後1週間程度で泳ぎ始めたが、約1ヶ月目あたりから生存率が著しく悪化し、90日までに全ての個体が死亡した。受精後1ヶ月の稚魚を固定し、内部構造の変化を組織学的に詳細に解析した結果、脳と目の組織に異常が見られるものの野生型稚魚と同様に生殖腺が形成され、分化直後と思われる卵母細胞が観察された。これら研究成果は、遺伝子トラップベクターが胚発生のみでなくその後の成長においても挿入遺伝子の転写を阻害できること、トラップした遺伝子産物の卵母細胞形成における機能を形態学的に検証できることを示した。

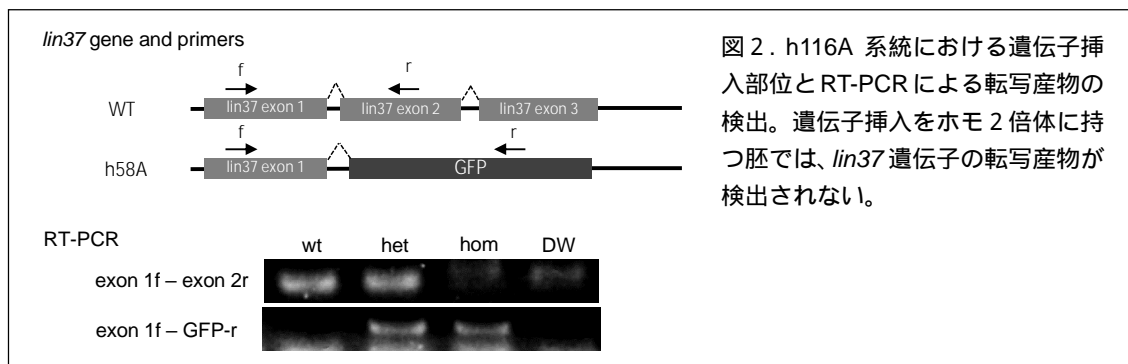


図2. h116A 系統における遺伝子挿入部位とRT-PCRによる転写産物の検出。遺伝子挿入をホモ2倍体に持つ胚では、*lin37* 遺伝子の転写産物が検出されない。

(5) 多くの母性因子は、受精後の適切な時期に適切な部位でタンパク質となり発生を進行させる。本研究で、ほぼ全ての動物の発生に必須のPou5f3タンパク質が受精後に適切な時期と部位で合成される仕組みを解析した。初めに、免疫染色とPoly(A)鎖の解析から、このタンパク質をコードする*pou5f3* mRNAが翻訳を抑制された母性mRNAとして卵母細胞に蓄積されることを示した。高感度の蛍光in situ hybridizationの結果から、これらmRNAは顆粒状の構造をとり細胞質に存在することを見出した。翻訳を抑制されない*alpha-tubulin* mRNAと*beta-actin* mRNAは細胞質全体に拡散して存在したことから、この構造は翻訳抑制を受けるmRNAに特有の構造であるこ

とが示唆された。興味深いことに、卵母細胞で見られた顆粒状構造は受精後の卵割期においても維持され (図3)、さらにその性質は固相様の状態から液相様の状態に変化した。一方で、免疫染色の結果から卵割期にタンパク質量が増加することが示された。Puro-PLA法を用い、新規に合成されたPou5f3のペプチド鎖を検出した結果、卵割期の液相様の *pou5f3* mRNA顆粒においてタンパク質合成が活発に起こることを示した。さらに、同様の顆粒構造をとる母性mRNAを数種類同定しており、本研究で見出したタンパク質合成の仕組みは発生現象を進行させる普遍的な仕組みであることが予想される。

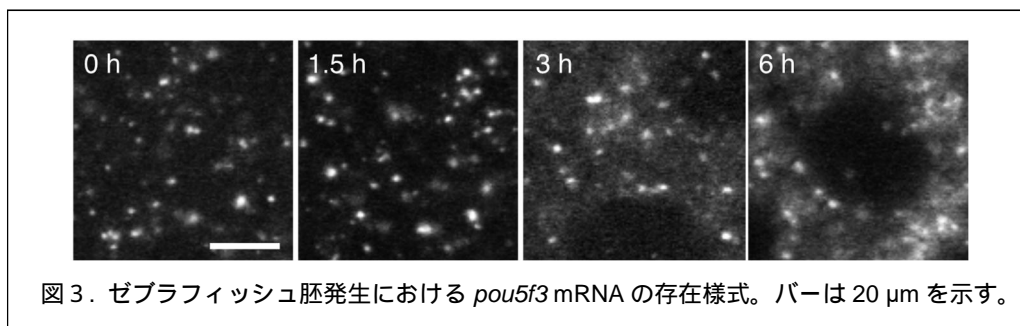


図3. ゼブラフィッシュ胚発生における *pou5f3* mRNA の存在様式。バーは 20 μm を示す。

(6) 以上の結果より、本研究において新規の母性効果変異体のスクリーニング法を確立したと判断する。このスクリーニング方はすべての過程を最適化でき、その実施は簡便で大規模な設備を必要としない。したがって、スクリーニングそのものを小規模な設備で実施できる。なおかつ、原因遺伝子の同定はPCR法を基盤としており、極めて簡便である。すなわち、世界中の研究室で同様の研究が可能となり、生物の誕生の仕組みを生理学的に理解する強力な促進力となる。さらに、本研究で得た新規の mRNA 翻訳機構は、生物がどのように発生を進行させ個体を生み出すかを紐解く新たな知見をもたらした。本研究の成果は、卵子形成と生物の誕生の仕組みを理解する研究体系を大きく変換する原動力となりうる。

<引用文献>

Harvey, S.A., Sealy, I., Kettleborough, R., Fenyves, F., White, R., temple, D., Smith, J.C. Identification of the zebrafish maternal and paternal transcriptomes. *Development*, vol. 140, p2703-2710, 2013.

Dosch, Wagner, D.S., Mintzer, K.A., Runke, G., Wiemelt, A.P., Mullins, M.C. Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. *Developmental Cell*, vol. 6, p771-780, 2004.

Wagner, D.S., Dosch, R., Mintzer, K.A., Wiemelt, A.P., Mullins, M.C. Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II. *Developmental Cell*, vol. 6, p781-790, 2004.

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 1件）

1. 著者名 Sato Keisuke, Sakai Moeko, Ishii Anna, Maehata Kaori, Takada Yuki, Yasuda Kyota, Kotani Tomoya	4. 巻 25
2. 論文標題 Identification of embryonic RNA granules that act as sites of mRNA translation after changing their physical properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104344 ~ 104344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104344	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤圭祐、小谷友也
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ初期発生におけるpou5f3翻訳の時空間制御機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第65回北海道支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷友也
2. 発表標題 Temporal and spatial control of translation by aggregation of an RNA-binding protein Pumilio1 and its dissolution in oocytes.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤圭祐、小谷友也
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ初期発生に重要なpou5f3 mRNA翻訳の時空間的制御機構
3. 学会等名 日本動物学会第92回米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤圭祐、前畑香織、酒井萌子、高田裕貴、安田恭大、小谷友也
2. 発表標題 脊椎動物の初期発生におけるmRNAの時空間翻訳制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------