

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770196

研究課題名（和文） 遺伝子導入と翻訳部位・時期の可視化による翻訳制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of mechanisms of translational control using transgenes and visualization of the site and timing of translation

研究代表者

小谷 友也 (KOTANI TOMOYA)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：70419852

研究成果の概要（和文）：細胞内における mRNA の局在とその翻訳制御は、遺伝子産物が働く部位と時期の調節に重要な役割を持つ。我々は、卵母細胞に蓄えられたサイクリン B1 mRNA の局在と翻訳を制御する分子機構を、遺伝子導入と翻訳のリアルタイム観察によって解析した。その結果、コード領域に存在する 9 塩基のシス因子が mRNA の局在と時期特異的な翻訳のどちらにも必要であることを明らかにした。これらの結果は、mRNA の局在と翻訳制御機構の機能的な連携を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Localization and translational control of cytoplasmic mRNAs play key roles in the regulation of site and timing of gene expression. We analyzed molecular mechanisms by which localization and translational control of *cyclin B1* mRNA deposited in oocytes are regulated using transgenes and real-time imaging of the site and timing of translation. In this study, we revealed that a *cis*-acting element consisting of 9 nucleotides sequences in the coding region is necessary for the regulation of both localization and translational control of the mRNA. Our results suggest a functional link between mRNA localization and translational control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：翻訳、mRNA 局在、シス因子、コード領域、卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

あらゆる生命現象は、遺伝子産物が正確な部位と時期に働くことで成り立つ。mRNA の局在と翻訳による遺伝子機能制御は、ごく一部の細胞、かつ、少数に限られた遺伝子でのみ働くと考えられてきた。しかし、最近の技術の進歩で細胞内の RNA 発現を高感度に検出することが可能になり、この技術を用いた網羅的な研究から、ショウジョウバエの胚で発現する全 RNA の 70% が細胞内で特異的な

局在を示し、ヒト培養細胞で発現する全 RNA の 10% が微小管に局在し翻訳制御を受けることが見いだされた。これは、生物のあらゆる組織・器官において、mRNA の局在と翻訳による遺伝子機能制御が重要な役割を果たすことを示唆する。しかし、翻訳を解析する方法は未だに限られており、mRNA の局在と翻訳の研究は、その生物学的意義も含め、未知の領域のままである。

我々は、翻訳を抑制されたサイクリン B1 mRNA が卵母細胞の動物極に局在すること

を見いだしてきた。サイクリン B1 mRNA の翻訳抑制は、卵母細胞が受精可能となる過程（卵成熟過程）で解除される。合成されたサイクリン B1 蛋白質は、卵母細胞に存在する Cdc2 キナーゼと複合体を形成し、卵核胞崩壊（GVBD）、紡錘体形成、DNA 複製なしの減数第一・第二分裂移行を進行させ、最終的に卵母細胞を受精可能な成熟卵とする。動物極におけるサイクリン B1 mRNA の局在を人為的に卵全体にばらした場合、卵成熟が進行しない。すなわち、サイクリン B1 mRNA が動物極で時期特異的に翻訳されることが受精可能な卵の形成に重要だと考えられる。しかし、既知の解析法で mRNA の局在と翻訳の分子機構に切り込むには限界があり、本研究分野の発展には新たな技術の確立が望まれていた。

mRNA の局在と翻訳制御の研究が困難な理由は、1) その分子機構が核内における転写から始まること、2) mRNA が翻訳される正確な部位と時期を検出できないことにある。我々は、これらの問題を次の方法で解決した。1) トランスポゾンによる遺伝子転移システムを用い、効率的にレポーター遺伝子をゼブラフィッシュゲノムに挿入、核内から始まる翻訳機構の再現に成功した。2) 新規蛍光色素 ReAsH の特性、すなわち、合成された TC タグペプチド鎖に即座に結合し蛍光を発することを利用し、mRNA が翻訳される正確な部位と時期を世界で初めて可視化した。我々は、この独自に確立した mRNA の局在と翻訳の解析法を用い、サイクリン B1 mRNA の 3'非翻訳領域(3'UTR)のみでなく、コード領域がその局在と時期特異的な翻訳に必須であることを明らかにした。

2. 研究の目的

我々の研究目的は、翻訳による生命現象制御の全貌解明である。その中で本研究は、卵母細胞におけるサイクリン B1 mRNA の局在と時期特異的な翻訳を制御する分子機構を解明することを目的とする。具体的には、mRNA におけるシス因子の同定とその役割の解明、および、mRNA に結合するトランス因子の同定とその役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、サイクリン B1 mRNA のコード領域におけるシス因子を同定するため、次の方法を用いた。

(1)サイクリン B1 の 5' 非翻訳領域(5'UTR)、コード領域、および 3'UTR を持つレポータ

ー遺伝子を核内に微量注入し、転写された mRNA の局在を *in situ hybridization* 法を用い解析した。さらに、コード領域を断片化し、動物極細胞質の局在に必須の領域を同定した。

(2)微量注入に用いたレポーター遺伝子をゼブラフィッシュゲノムに挿入し、卵形成過程で発現させた。転写された mRNA の局在を *in situ hybridization* 法で、卵成熟における翻訳の活性化を ReAsH 蛍光色素による翻訳部位の可視化法によって解析した。

(3)同定した最短領域においてシス因子を推定し、その配列に変異を入れたレポーター遺伝子を作製した。そのレポーター遺伝子から転写された mRNA の局在を *in situ hybridization* 方で、翻訳の活性化時期を ReAsH 蛍光色素による可視化法で解析した。

サイクリン B1 mRNA に結合し、トランス因子として働く蛋白質を次の方法で解析した。

(4)コード領域におけるシス因子周辺の 50 塩基をプローブに用い、ゼブラフィッシュ卵母細胞抽出液と反応させ、プローブの分子量の変化を解析した。プローブの分子量の変化が蛋白質との結合によることを確かめるため、蛋白質分解酵素を用いた。

4. 研究成果

(1)サイクリン B1 mRNA の局在に必要な領域の同定。

我々は、サイクリン B1 mRNA の全長を含むレポーター遺伝子をゼブラフィッシュ卵母細胞の核内に微量注入し、その転写産物を *in situ hybridization* 法によって検出した。その結果、レポーター mRNA は内在のサイクリン B1 mRNA と同様に、動物極細胞質に局在した。次に、1197 塩基のコード領域を前半の 1~523 塩基と 524~1197 塩基に断片化し、同様の実験を行った。その結果、524~1197 の塩基を持つレポーター mRNA のみが動物極細胞質に局在した。さらに、この領域を 3 つに断片化し、レポーター mRNA の局在を解析した結果、524~736 塩基をもつレポーター mRNA のみが動物極細胞質に局在した。以上の結果から、コード領域における局在に必須のシス因子は 524~736 塩基に存在することが示唆された。

核内への微量注入で得られた結果を確認するため、用いたレポーター遺伝子をゼブラフィッシュゲノムに挿入した。卵母細胞にお

ける発現を *in situ hybridization* 法によって解析した結果、微量注入実験と同様に 524~736 塩基を持つレポーター mRNA のみが動物極細胞質に局在した。これらの結果から、サイクリン B1 コード領域の 524~736 塩基において、局在に必須のシス因子が存在すると結論付けた。

(2) サイクリン B1 mRNA の翻訳制御に必要な領域の同定。

サイクリン B1 mRNA の全長を持つレポーター mRNA は、卵成熟開始後に GVBD を起こす時間を 100 としたときの約半分のタイミング (51.4 ± 4.0) に翻訳される。一方、コード領域を持たないレポーター mRNA は卵成熟開始後の非常に早いタイミング (19.0 ± 8.4) で翻訳される (Yasuda et al., 2010)。コード領域における、サイクリン B1 mRNA の時期特異的な翻訳に必須の配列を同定するため、断片化したコード領域を持つレポーター mRNA の翻訳時期を解析した。その結果、興味深いことに局在に必須の配列 (524~736 塩基) をもつレポーター mRNA は、コード領域全長を持つレポーター mRNA と同様のタイミングで翻訳されたが、この領域を持たないレポーター mRNA はコード領域を持たない mRNA と同じく非常に早いタイミングで翻訳された。すなわち、局在に必須の領域 (524~736 塩基) に翻訳時期の制御に必須のシス因子が存在することが示唆された。

(3) コード領域におけるシス因子の同定。

卵母細胞におけるサイクリン B1 mRNA の局在は、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、マウスにおいて保存されている。従って、コード領域におけるシス因子は脊椎動物において高度に保存されていることが考えられた。我々は、ゼブラフィッシュで同定した、局在に必須の領域 (524~736 塩基) の配列をゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、マウス、ヒトにおいて比較した。その結果、559~567 塩基においてすべての脊椎動物で 100% 保存された配列 (CAGGAGACC) を見いだした。この配列は、アミノ酸残基のグルタミン、グルタミン酸、トレオニンをコードするがそれぞれの三つ組コドンの最後の塩基は置換が可能である。にもかかわらず、すべての塩基が保存されていることから、この 9 塩基が進化的に保存されたアミノ酸をコードするのみでなく、RNA そのものの機能に関わるのではないかと推測された。

サイクリン B1 遺伝子のコード領域における CAGGAGACC 配列に、コードするアミノ酸を変えずに 3 つの塩基置換を入れたレポーター遺伝子を作製した。この塩基置換レポ

ーター遺伝子をゼブラフィッシュ卵母細胞の核内に微量注入し、レポーター mRNA の局在を解析した結果、動物極細胞質への局在が見られなくなった。さらに、塩基置換したレポーター遺伝子をゼブラフィッシュゲノムに挿入し、その転写産物の局在を解析した結果、微量注入実験と同様に動物極細胞質への局在が見られなくなった。興味深いことに、このレポーター mRNA は、コード領域を持たない mRNA と同様に、卵成熟開始後の非常に早いタイミングで翻訳された。以上の結果は、サイクリン B1 mRNA の動物極への局在と時期特異的な翻訳の制御が 9 塩基のシス因子に依存することを示している。

(4) コード領域のシス因子に結合するトランス因子の探索。

我々はレポーター遺伝子を用いた解析から、次の仮説を立てた。サイクリン B1 mRNA はコード領域の 9 塩基のシス因子によって動物極細胞質に局在し、この場に局在することで時期特異的な翻訳制御を受ける。それでは、コード領域の 9 塩基はどのような分子機構で mRNA を局在化するのであろうか。

我々は、新規に同定したシス因子に特異的に結合するトランス因子が存在し、mRNA を局在化すると推測し、次の解析を行った。はじめに、新規シス因子を含む蛍光 RNA プロブとシス因子に塩基置換を入れた蛍光 RNA プロブを作製し、ゼブラフィッシュ卵母細胞の抽出液と反応させた。それら反応液を SDS-PAGE によって分離し、蛍光 RNA プロブの分子量の変化を解析した。その結果、シス因子を含むプロブは、卵母細胞抽出液との反応によって見かけ上の分子量が大きくなり、反対に、塩基置換を入れたプロブの分子量は変化しなかった。RNA プロブの分子量の上昇が蛋白質の結合によることを確かめるため、プロブと抽出液の反応液を蛋白質分解酵素で処理した。その結果、RNA プロブの分子量は抽出液と反応する前の分子量に戻った。これらの結果は、新規シス因子に特異的に結合するトランス因子の存在を示唆する。

以上の解析結果より我々は、コード領域のシス因子に蛋白質が結合し、その蛋白質を介して mRNA が動物極細胞質に局在、この局在が時期特異的な翻訳の開始に重要であるというモデルを提唱した (Yasuda et al., *in press*)。これは、mRNA の局在と翻訳制御機構がリンクすることを示した初めての成果であり、翻訳の研究分野に重要な知見をもたらした。また、コード領域における高度に保存された塩基配列が RNA 機能の制御に関わることを初めて示し、今後、コード領域の再考につながると考えられる。現在我々は、サ

イクリン B1 コード領域のシス因子に結合する蛋白質の同定を試みており、トランス因子の決定により mRNA の局在と翻訳制御がどのようにリンクしているかの解明を目指す。

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 3 件)

①Kyota Yasuda, Tomoya Kotani, Masakane Yamashita, A *cis*-acting element in the coding region of *cyclin B1* mRNA couples subcellular localization to translational timing, *Developmental Biology*, 査読有, in press

②Ryoma Ota, Tomoya Kotani, Masakane Yamashita, Possible involvement of Nemo-like kinase 1 in *Xenopus* oocyte maturation as a kinase responsible for Pumilio1, Pumilio2, and CPEB phosphorylation, *Biochemistry*, 査読有, vol.50, 2011, p5648-5659
DOI: 10.1021/bi2002696

③Ryoma Ota, Tomoya Kotani, Masakane Yamashita, Biochemical characterization of Pumilio1 and Pumilio2 in *Xenopus* oocytes, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, vol.286, 2011, p2853-2863
DOI: 10.1074/jbc.M110.155523

[学会発表] (計 4 件)

①安田恭太、小谷友也、山下正兼、卵成熟過程でのゼブラフィッシュ *cyclin B1* mRNA 翻訳に関する新規シス配列の同定、日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学

②Tomoya Kotani, Kyota Yasuda, Ryoma Ota, Masakane Yamashita, Translational control of *cyclin B1* mRNA by RNA granule formation in vertebrate oocytes, Joint meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, 2012 年 5 月 29 日、神戸コンベンションセンター

③Kyota Yasuda, Tomoya Kotani, Masakane Yamashita, Transgenic zebrafish reveals a novel *cis*-acting element responsible for the spatio-temporally regulated translational activation of *cyclin B1* mRNA in oocytes, Joint meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, 2012 年 5 月 28

日、神戸コンベンションセンター

④Ryoma Ota, Tomoya Kotani, Masakane Yamashita, Possible involvement of Nemo-like Kinase 1 in *Xenopus* oocyte maturation as a kinase that catalyzes Pum1, Pum2 and CPEB phosphorylation required for the translation of dormant mRNAs in oocytes, 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011 年 5 月 20 日、沖縄コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 友也 (KOTANI TOMOYA)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：70419852

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし