

学位論文題名

Molecular mechanisms of the spatio-temporally regulated translation of *cyclin B1* mRNA during zebrafish oocyte maturation

(ゼブラフィッシュ卵成熟過程での時期・部位特異的なサイクリンB1 mRNA翻訳制御の分子機構)

学位論文内容の要旨

時期・部位特異的なタンパク質発現は、細胞機能の獲得を含む様々な生命現象の正常な進行に重要である。ゼブラフィッシュの卵母細胞においても、母性 mRNA であるサイクリン B1 mRNA が動物極側細胞質、卵門の直下に局在し、凝集体を形成している。局在したサイクリン B1 mRNA は未成熟卵中で翻訳抑制を受けており、卵成熟誘起ホルモン（MIH）の刺激により開始される“卵成熟”（卵母細胞受精能獲得）の過程において、時期特異的に翻訳活性化を受ける。サイクリン B1 mRNA は、卵成熟の引き金となる分子である M 期促進因子の調節サブユニットをコードしており、サイクリン B1 のタンパク質が無ければ、卵成熟は進行しない。そのため、サイクリン B1 mRNA が適切な時期に翻訳される事は正常な受精能をもった卵を形成するために不可欠である。

先行研究において、ゼブラフィッシュ卵母細胞内ではサイクリン B1 mRNA の凝集体がアクチン繊維に依存して形成されていること、そして、アクチン繊維を脱重合させて凝集体を崩壊させることで MIH 非依存的な卵成熟が引き起こされることが確かめられている。これらのことは、サイクリン B1 mRNA が凝集体を維持する事と翻訳の抑制状態を維持する事を関連づける何らかの機構の存在を示唆するが、凝集体形成と時期特異的翻訳制御を包括的に議論する研究は、主に技術的な困難さから、これまでなされてこなかった。そこで著者は、そのような議論を可能にする実験系の開発とそれを用いた解析を行い、ゼブラフィッシュ卵母細胞でのサイクリン B1 mRNA 凝集体形成メカニズムの解明、および凝集体を形成することが翻訳制御にどのようにしてどのような影響を与えるのかについて研究した。提出する博士論文はその成果をまとめたものである。

第一章ではまず、開発した新規実験系について記した。新規実験系は二つの特徴を持っている。一つは、タンパク質の翻訳を既存のものより高い時間分解能で、かつ生体で検出可能であることで、これを実現するために著者は、ReAsH という蛍光色素を利用したイメージング手法を採用した。ReAsH は TC タグというごく短いペプチドと相互作用し、結合してすぐに赤色波長の蛍光検出が可能となる。TC タグは GFP などの蛍光タンパク質と違いフォールディングにかかる時間がほぼないため、実質的に TC タグが翻訳された直後から検出可能となる。もう一つは、その TC タグを含むレポータータンパク質をコードする配列を、サイクリン B1 mRNA の非コード領域（UTR）およびコード領域（ORF、直前の終止コドンによりタンパク質にはならない）と様々な組み合わせで繋いだレポーター遺伝子を持つトランスジェニック個体を作出し、それらの卵母細胞を解析に用いた事である。これにより、サイク

リン B1 mRNA と同様の挙動を示すために必要な配列が同定でき、かつ mRNA が凝集体形成する場合としない場合において、その翻訳制御がどうなるかを関連づけて議論することが可能となった。第一章ではさらに、この新規実験系を用いて得られた事実についても言及している。ほとんどの mRNA において、その局在を保証するのは 3'UTR である。しかしながら著者は、ゼブラフィッシュサイクリン B1 mRNA は、3'UTR のみでは動物極への RNA 輸送のみしか再現できず、その後卵門直下にアンカーされて凝集体を形成するためには ORF が必要なことを明らかにした。さらに、ORF を持たない（凝集体形成しない）レポーター mRNA は、ORF を持つ（凝集体形成する）レポーター mRNA よりも有為に早く翻訳が開始されることも明らかにした。これらの結果は、試験管合成された mRNA の微量注入では再現されず、ゲノムからの転写に伴う一連の核内プロセスが mRNA の正しい挙動に不可欠である事も示唆された。これらの事実は、凝集体形成メカニズム解明の一端をつかむとともに、凝集体形成と翻訳制御を結びつけて議論できるユニークな実験系の構築に成功した事を示す。

上記の結果をうけて第二章では、ORF 内のどのような配列が凝集体形成、及び翻訳時期の特異性に係するのかについて議論した。まず第一章で用いた凝集体形成を再現できるレポーター mRNA 中の ORF 配列のみを断片化し、凝集体形成及び時期特異的翻訳開始の必要配列を探索した。その結果 ORF 中程 200 塩基の中にその配列が含まれていることが明らかとなった。更なる詳細な配列の探索にあたって、著者は、動物種間で上記の 200 塩基の配列比較を行った。著者の所属研究室では、マウスやアフリカツメガエルの卵母細胞でもサイクリン B1 mRNA が細胞内局在することを見出しており、動物種間で共通の機能配列の存在を期待した。その結果、9 塩基の、RNA 情報レベルでよく保存された配列を同定し、それが凝集体形成及び時期特異的な翻訳制御の両方に必須である事を見出した。さらにこの配列は特定のタンパク質と相互作用して働く事を明らかにした。また、この配列を介した凝集体形成と翻訳抑制に関連がある事を示唆するデータとして、アクチン脱重合阻害剤を用いた実験も行った。アクチンの脱重合を阻害すると、MIH の刺激下でもサイクリン B1 mRNA の凝集体が維持され、翻訳活性化も起こらない。しかしながら、上記 9 塩基に変異を持ち、凝集体形成しないレポーター mRNA は、MHI と阻害剤の両方で処理した場合でも翻訳が活性化されてしまう事を証明した。これらの事実は、ORF を介した凝集体形成が翻訳抑制機構の一部である事を強く示唆する。

第三章では、アフリカツメガエルなどでよく研究されている RNA 結合翻訳制御タンパク質プミリオのゼブラフィッシュサイクリン B1 での機能について議論した。プミリオの結合配列を 3'UTR 中に同定し、そこに変異を導入したレポーター mRNA の挙動を観察した結果、プミリオが、他の翻訳制御タンパク質(CPEB)とは独立して翻訳抑制（翻訳開始時期の制御）に関わる事、さらに、凝集体形成にも必要である事を明らかにした。これらの発見はこれまでに報告のないプミリオの新規機能の存在を示唆する。

上記の結果を総合すると、本研究論文はサイクリン B1 mRNA の卵母細胞内での時期特異的翻訳制御には、従来の制御タンパク質もさることながら、凝集体形成(アクチン繊維との相互作用)を介した制御機構が存在すること、そして ORF やプミリオがその重要な鍵を握る因子である事を解明したと言える。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山下	正兼
副査	教授	高橋	孝行
副査	准教授	勝	義直
副査	准教授	小谷	友也

学位論文題名

Molecular mechanisms of the spatio-temporally regulated translation of *cyclin B1* mRNA during zebrafish oocyte maturation

(ゼブラフィッシュ卵成熟過程での時期・部位特異的なサイクリンB1 mRNA翻訳制御の分子機構)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

生命機能を担う重要分子であるタンパク質は、特定の時期に特定の部位で発現される必要があり、この時期及び部位特異的発現機構の異常は、生命現象の正常な進行を阻害し、種々の疾病の原因となっている。特に、生殖細胞形成、受精、初期発生における翻訳抑制された mRNA からの時期・部位特異的タンパク質発現は、これら過程の正常な進行に極めて重要である。しかし、その分子機構は不明の点が多い。申請者はゼブラフィッシュ卵母細胞で凝集体として存在するサイクリン B1 mRNA の卵成熟過程における時期・部位特異的翻訳開始の分子機構を研究した。

学位論文は三章からなり、第一章では、著者が新規に開発した実験系が示された。この実験系の特徴は、生体におけるタンパク質の翻訳を既存の実験系よりも、より高い時間分解能で検出することが可能な点である。著者はこれを駆使して、サイクリン B1 mRNA の時期・部位特異的翻訳開始に必要な mRNA 内の配列を調べた。その結果、従来必要と考えられていた 3' 非翻訳領域 (3' UTR) のみならず、コード領域 (開かれた読み枠、ORF) も特異的翻訳開始に必要なことを明らかにした。第二章では、特異的翻訳開始に必要な ORF 内の塩基配列を調べ、ORF の中央部に位置する 9 塩基が特定のタンパク質と相互作用をして機能する事を明らかにした。第三章では、サイクリン B1 mRNA の 3' UTR に結合して翻訳を制御するタンパク質の一つであるプミリオの機能を解析した。その結果、プミリオは、既知の 3' UTR 結合タンパク質でサイクリン B1 の翻訳を制御することが知られている CPEB とは独立して、サイクリン B1 の翻訳抑制と凝集体形成に関わる事を明らかにした。

本学位論文は、サイクリン B1 mRNA の卵母細胞内での時期及び部位特異的翻訳制御には、従来想定されていた 3' UTR 中の配列以外に、ORF 中にも重要な配列が存在することを明らかにした。また、3' UTR 中の配列を認識して機能する複数のタンパク質の役割分担も明らかにした。これらは、サイクリン B1 mRNA の翻訳制御機構を解明する上で重要な新知見であり、卵母細胞に蓄積された mRNA の時期及び部位特異的翻訳開始の分子機構の理解に大きく貢献した。

よって著者は北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。