HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Mechanisms regulating the translation and localization of cyclin B1 mRNA in zebrafish oocytes [an abstract of entire text]
Author(s)	高橋, 一樹
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12731号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65608
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Takahashi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏 名　高 橋　一 樹

学 位 論 文 題 名

Mechanisms regulating the translation and localization of *cyclin B1* mRNA in zebrafish oocytes
（ゼブラフィッシュ卵母細胞におけるサイクリン B1 mRNA の翻訳と局在を制御する機構）

卵母細胞は卵成長過程において卵黄や母性因子を十分に蓄積した後，減数分裂の進行を第一分裂前期で停止する。ゼブラフィッシュでは，これら未成熟卵は卵成熟誘起ホルモンの刺激に応答して減数分裂を再開し，受精可能な成熟卵となる。卵成熟と呼ばれるこの過程はサイクリン B1 タンパク質とサイクリン依存性キナーゼである Cdc2 タンパク質の複合体, 卵成熟促進因子の働きによって進行する。ゼブラフィッシュの未成熟卵では，サイクリン B1 は mRNA の状態で翻訳を抑制されおり，卵成熟促進因子が形成されていない。卵成熟誘起ホルモンの刺激はサイクリン B1 mRNA の翻訳の抑制を解除し，これが卵成熟の最終的な引き金となる。

先行研究により, 翻訳抑制状態のサイクリン B1 mRNA は卵成長初期の卵母細胞では卵母細胞の細胞質全体に存在するが，卵成長過程で動物極直下の細胞質にのみ局在化することが明らかとなっている。また，最近の研究により，サイクリン B1 mRNA が動物極へ局在化した後，その局在を維持しておくことがホルモン刺激後の適切なタイミングで翻訳の抑制を解除するために必要であることが分かり，これにはタンパク質コード領域中に結合する未同定のタンパク質と，3’ 非翻訳領域中に結合する Pumilio1 がそれぞれ独立して必要であることが示された。しかしながら, いずれのタンパク質もサイクリン B1 mRNA の動物極への局在化やホルモン刺激以前の翻訳抑制には寄与せず，これらを制御する分子メカニズムは依然未解明のままである。

第一章

以上のように，卵成熟の進行を制御するサイクリン B1 タンパク質の新規合成は，サイクリン B1 mRNA の局在化と共役した翻訳によって制御されているが, その分子メカニズムの全容は明らかとなっていない。そこで，本研究では始めに，ショ糖密度勾配超遠心法と質量分析法を用い，サイクリン B1 mRNA の翻訳および局在化に関与する新規のタンパク質の探索を行なった。その結果，５つの RNA 結合タンパク質が同定され，それらの内２つが *in vitro* においてサイクリン B1 mRNA の 3’ 非翻訳領域と特異的に結合することが分かった。第一章ではその内，Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3（IMP3）について抗体を作製し，以下の解析を行なった。

免疫沈降法と逆転写 PCR 法を用い，内在の IMP3 とサイクリン B1 mRNA の結合を解析した結果，未成熟卵では両者の結合が見られるのに対し，成熟卵では見られないことが分かった。共免疫沈降法を用い，既知のサイクリン B1 mRNA 結合タンパク質である Pumilio1 あるいは CPEB と IMP3 との相互作用を解析した結果，どちらも未成熟卵でのみ mRNA を介した結合が見られた。これらの結果から，IMP3 は翻訳抑制状態のサイクリン B1 mRNA にのみ結合していることが示された。卵巣の組織切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーション法と蛍光免疫組織化学染色法により，サイクリン B1 mRNA と IMP3 の二重染色を行なった。その結果，IMP3 は

卵成長過程を通してサイクリン B1 mRNA と分布を共にすることが分かった。続いて，IMP3 がサイクリン B1 mRNA の翻訳に及ぼす影響を解析するため，卵母細胞における強制発現実験を行なったところ，強制発現された IMP3 は動物極直下の細胞質に蓄積し，IMP3 強制発現卵ではサイクリン B1 タンパク質の合成と卵成熟の進行に有意な遅れが観察された。以上の結果から，IMP3 は未成熟卵においてサイクリン B1 mRNA の翻訳の抑制に寄与していることが示唆された。

第二章

IMP3 はアフリカツメガエル卵母細胞では Vg1 RNA 結合タンパク質として知られ，その標的である *vg1* mRNA とともに Late pathway と呼ばれる mRNA 輸送機構によって微小管依存的に卵母細胞の植物極側の細胞質に局在することが示されている。しかし，第一章での解析から，ゼブラフィッシュ IMP3 はアフリカツメガエルとは逆に，卵母細胞の動物極側へ局在することが明らかとなった。さらに，ゼブラフィッシュ *vg1* mRNA もまた，動物極側に局在することが報告されている。これらの事実は両種において IMP3 とその標的 mRNA の局在化機構が保存されていることを示唆する。アフリカツメガエルの Late pathway では RNA 結合タンパク質である Staufen1 が mRNA の輸送に関与していることが報告されている。これを受け，第二章ではゼブラフィッシュ Staufen1 のサイクリン B1 mRNA の局在化への関与について検証するため，以下の解析を行なった。

ゼブラフィッシュ Staufen1 に対する抗体を作製し，卵成長および卵成熟過程におけるタンパク質発現を解析した。その結果，Staufen1 はサイクリン B1 mRNA の局在化が起こる卵成長過程で高い発現を示した。また，免疫沈降法と逆転写リアルタイム PCR 法を用い，内在の Staufen1 とサイクリン B1 mRNA の結合を解析した結果，卵成長初期から卵成熟後まで一貫して結合が維持されていることが分かった。卵巣の組織切片に対する Staufen1 の蛍光免疫組織化学染色では，Staufen1 が卵成長過程で動物極を含む卵母細胞全体の表層直下の細胞質に局在することを除いては，サイクリン B1 mRNA と共局在することが分かった。サイクリン B1 レポーターmRNA をコードするベクターを卵母細胞に注入し，転写されたレポーターmRNA の局在化率を様々な条件下で観察したところ，微小管重合阻害剤である Nocodazole，抗 Kinesin1 および抗 Staufen1 抗体の存在下において，局在化率の有意な減少が認められた。先行研究から Staufen1 はショウジョウバエからヒトに至るまでの様々な細胞においてモータータンパク質である Kinesin1 と微小管に依存して標的 mRNA を輸送することが知られている。ゼブラフィッシュ卵母細胞におけるサイクリン B1 mRNA の輸送もまた，この保存された機構により動物極へと能動的に輸送されている可能性がある。事実，Kinesin1 が向かう微小管の＋端はゼブラフィッシュの最も成長した未成熟卵では動物極に多く，アフリカツメガエルとは正反対であることも明らかとなった。また，アフリカツメガエル *vg1* mRNA の Vegetal localization element（VLE）は植物極側へ mRNA を輸送させるシグナル配列で，Staufen1 や IMP3 はこの領域に結合するとされるが，ゼブラフィッシュにおいて VLE は動物極側への mRNA 輸送シグナルとして機能しうることが示された。

以上のように，本研究はサイクリン B1 mRNA の転写後調節の重要な段階である翻訳と局在を制御する機構の一端を明らかにした。また，それらがアフリカツメガエルの Late pathway と呼ばれる既知の RNA 輸送機構と進化的に保存された機構である可能性を示した。以上の成果は卵母細胞におけるサイクリン B1 mRNA の翻訳と局在を制御する機構のより深い理解に貢献するだけでなく，母性因子による複雑な発生分化の制御機構の包括的な理解にも大きく寄与するものである。