HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular biological studies on temporal and spatial regulation of translation during oocyte maturation in mouse [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	武井, 夏海
Description	担当：理学研究院図書室
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14397号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82028
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Natsumi_Takei_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(生命科学)　氏 名　武 井 夏 海

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on temporal and spatial regulation of translation during oocyte maturation in mouse
(マウスの卵成熟過程における翻訳の時空間制御の分子生物学的研究)

卵巣において卵母細胞は減数分裂を第一分裂前期で停止した未成熟卵として存在し、その後の減数分裂や発生に必要なタンパク質の mRNA を、翻訳を抑制した状態で卵細胞質に蓄積する。ホルモン等の刺激を受けると未成熟卵は減数分裂を再開し、第二分裂中期で再び停止する。この過程は卵成熟と呼ばれ、卵母細胞は受精能を獲得した成熟卵となる。卵成熟は卵細胞質に蓄積した mRNA が時期特異的に翻訳されることで進行する。減数分裂第一分裂では、数百種類の mRNA が翻訳を制御されることがマウスやゼブラフィッシュ、カエルの卵を使った研究で知られる。一方第二分裂では、千種類以上の mRNA が翻訳を制御される。卵成熟が正しく進行するためには、これらの mRNA の翻訳時期が厳密に制御されることが極めて重要である。現在までに、卵成熟における翻訳制御メカニズムとして cytoplasmic polyadenylation element-binding protein (CPEB)を介したポリ A 鎖の伸長が mRNA の翻訳を活性化することが明らかとなっている。しかし千以上の mRNA が CPEB の結合配列をもち、それぞれが卵成熟の異なる時期に翻訳されることから、個々の mRNA の翻訳時期を細かく制御するメカニズムが別に存在すると考えられる。しかし数多くの母性 mRNA の翻訳時期を制御するメカニズムは不明な点が多いままである。

先行研究において、第一分裂で翻訳され、卵成熟の進行に重要な因子である *Cyclin B1* mRNA がゼブラフィッシュとマウスの未成熟卵で RNA 顆粒を形成すること、この顆粒構造は翻訳が活性化する時期に消失することが明らかとなった。さらに、*Cyclin B1* RNA 顆粒の形成には Pumilio1 (Pum1)という RNA 結合タンパク質が必要であることが示された。このことから、Pum1 は顆粒の形成と消失を介してターゲット mRNA の翻訳時期を制御することが考えられた。

本研究では、卵成熟における時期特異的な翻訳制御メカニズムを解明することを目指した。まず Chapter I において、チラミドシグナル増幅システムを用いて RNA を高感度かつ高解像度で検出する手法を確立した。Chapter II では、減数分裂第一分裂における翻訳制御メカニズムの解明を目指した。*in situ* hybridization 法によって、*Cyclin B1* mRNA と同じく第一分裂で翻訳される *Mad2* mRNA がマウスの卵細胞質で顆粒構造を形成し、顆粒の形成と消失によって翻訳が制御されることが示唆された。さらに免疫沈降法と RT-PCR によって、*Mad2* mRNA は *Cyclin B1* mRNA と同じく Pum1 の標的 mRNA であることが明らかとなった。次に、蛍光免疫染色法と GFP を結合させた Pum1 のコンストラクトによって、Pum1 が卵細胞質において凝集体を形成することが示された。この凝集体は卵母細胞において *Mad2* と *Cyclin B1* RNA 顆粒を囲うように分布した。また、Pum1 は卵成熟に伴い凝集体の構造が崩壊し、固相様の性質から液相様の性質に変化することが明らかとなった。Pum1 凝集体の構造が維持されるとターゲット mRNA の翻訳並びに卵成熟が抑制されたことから、Pum1 の性質の]変化がターゲット mRNA の翻訳を制御し、卵成熟を進行させることが示された。これらのことから、減数分裂第一分裂において、Pum1 凝集体の形成と崩壊がターゲット mRNA の翻訳を時空間的に制御することが考えられた。

Chapter III では、減数分裂第二分裂における翻訳制御メカニズムの解明を目指した。第二分裂で翻訳が開始する *Emi2* mRNA は、異なる時期に翻訳されると減数分裂の停止や単為発生が引き起こされることから、翻訳時期が厳密に制御されることは卵成熟が正しく進行するために極めて重要である。*in* situ hybridization 法により、*Emi2* mRNA は卵細胞質で *Cyclin B1* RNA 顆粒とは異なる分布を示す顆粒構造をとることが明らかとなった。さらに *Emi2* mRNA の翻訳が活性化する時期に顆粒構造が消失することから、顆粒を介した翻訳制御を受けること示唆された。顆粒構造を形成することから、*Cyclin B1* mRNA と同じく *Emi2* mRNA は Pum1 のターゲット mRNA であると考えられたが、免疫沈降法と RT-PCR の結果、*Emi2* mRNA には Pum1 が結合しないことが明らかとなった。一方、ストレス顆粒や神経顆粒といった他の RNA 顆粒の構成タンパク質として知られる HuR と HuB は *Emi2* と *Cyclin B1* mRNA に共通して結合した。次に *Emi2* mRNA に特異的に結合するタンパク質が存在すると考え、*Emi2* mRNA に結合するタンパク質を網羅的に解析した。その結果、*Emi2* mRNA に特異的に結合し、mRNA の翻訳制御や安定化に関わるタンパク質が 10 種類検出された。このうち、Tudor domain-containing protein 3 (Tdrd3) はストレス顆粒の構成タンパク質として知られ、ウェスタンブロッティングと RT-PCR によってマウスの卵巣と卵母細胞において mRNA とタンパク質が検出された。UV クロスリンクと超解像顕微鏡を用いたタンパク質と mRNA の同時検出により、Tdrd3 は *Cyclin B1* mRNA には結合せず、*Emi2* mRNA に特異的に結合することが明らかとなった。さらに、α-Tdrd3 抗体を卵母細胞に微量注入してから減数分裂を再開させると、第二分裂において *Emi2* mRNA の翻訳開始が遅れたことから、Tdrd3 は *Emi2* mRNA の翻訳時期の制御に関わることが示唆された。

本研究により、卵成熟における mRNA の翻訳は、これまで示されていた CPEB を介したポリ A 鎖の伸長による制御に加え、RNA 顆粒を介して翻訳時期が制御されることが考えられた。この RNA 顆粒は、各 mRNA に共通して結合するタンパク質が構造の基盤となることが考えられる。さらに、mRNA によって顆粒を構成するタンパク質の種類が異なることが明らかとなった。第一分裂で翻訳される *Cyclin B1* と *Mad2* mRNA は Pum1 が結合し、Pum1 凝集体の性質の変化が RNA 顆粒を介した翻訳制御に重要であった。第二分裂では、*Emi2* mRNA に特異的に結合し、翻訳時期の制御に関わるタンパク質として Tdrd3 が新たに示された。このように mRNA に結合するタンパク質の種類の違いと RNA 顆粒によって卵成熟における翻訳が時間的、空間的に制御されると考えられた。