



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular Biological Studies on the Post-Transcriptional Regulation of Pou5f1/Oct4 mRNA during Mouse Oogenesis and Embryogenesis [an abstract of entire text]
Author(s)	高田, 裕貴
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。 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14830号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91164
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Takada_summary.pdf



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 田 裕 貴

学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Studies on the Post-Transcriptional Regulation of *Pou5f1/Oct4* mRNA
during Mouse Oogenesis and Embryogenesis
(マウス卵形成と胚発生における *Pou5f1/Oct4* mRNA の転写後制御の分子生物学的研究)

動物の卵形成過程では1万種類以上のmRNAが卵母細胞に蓄積する。これら母性mRNAの翻訳は卵形成および初期発生の過程で時期特異的に制御される。近年の研究により、約千種類のmRNAの翻訳が卵母細胞の成熟過程(卵成熟過程)で活性化され、さらに二千種類以上のmRNAの翻訳が受精後に活性化することが明らかになった。このような母性mRNAの時期特異的な翻訳制御は動物の卵成熟および初期発生の進行に極めて重要である。現在までに、母性mRNAの時期特異的な翻訳制御機構は卵成熟過程で翻訳される遺伝子を対象に研究が進められてきた。それらの研究により、卵成熟の過程でmRNAの翻訳制御に関与するRNA結合タンパク質がリン酸化等の制御を受け性質を変化させることでmRNAの翻訳を制御することが明らかとなった。しかしながら、これまでに受精後に翻訳されるmRNAの制御機構を明らかにした例は非常に少なく、動物の初期発生過程における遺伝子発現制御メカニズムには不明な点が多く存在する。

Pou5f1/Oct4 は細胞の多能性維持に働く転写因子である。*Pou5f1/Oct4* mRNA はマウスの卵形成から胚発生過程を通して発現することが報告されている。先行研究により、受精卵で*Pou5f1/Oct4* タンパク質を過剰発現すると、発生が初期で停止することが明らかになった。このことから、*Pou5f1/Oct4* の正確な発現制御は受精後の初期発生の進行に極めて重要であると考えられた。しかし、卵形成および初期発生過程における*Pou5f1/Oct4* mRNA および*Pou5f1/Oct4* タンパク質の詳細な発現パターンは未解明であった。

本研究では、受精後における母性mRNAの翻訳制御メカニズムの解明を目指した。Chapter I では、マウス卵形成および胚発生における母性*Pou5f1/Oct4* の発現解析を行った。in situ hybridization 法によってmRNAの発現解析を行った結果、*Pou5f1/Oct4* mRNA は卵形成過程の一次卵胞から発現し、先行研究で報告された翻訳抑制状態のcyclin B1 mRNAと同様に、顆粒状の構造を形成し卵細胞質に蓄積することが明らかになった。このRNA顆粒は受精後の2細胞期までに拡散した。一方、*Pou5f1/Oct4* タンパク質は卵形成および卵成熟過程の卵母細胞では発現せず、受精後の2細胞期胚の核内に検出された。以上の結果から、*Pou5f1/Oct4* mRNA は翻訳を抑制された状態で卵母細胞に蓄積し、受精後の2細胞期に翻訳を活性化すると考えられた。発生初期における*Pou5f1/Oct4* タンパク質の発現の意義を解明するため、モルフォリノオリゴの微量注入による*Pou5f1/Oct4* のノックダウンを行った。受精卵にモルフォリノオリゴを微量注入し*Pou5f1/Oct4* をノックダウンした結果、胚発生が2-4

細胞期で停止した。先行研究により、Pou5f1/Oct4 のノックダウンにより細胞周期関連遺伝子を含む接合体性遺伝子発現が異常になることが示されたことから、2 細胞期における Pou5f1/Oct4 は接合体性遺伝子発現の誘導および初期発生の促進に作用することが考えられた。

2 細胞期におけるPou5f1/Oct4 タンパク質の発現メカニズムを解明するため、Chapter II ではPou5f1/Oct4 mRNA の転写後制御機構の解析を行った。翻訳制御に重要なmRNA の poly(A) 鎖の変化を解析した結果、Pou5f1/Oct4 mRNA のpoly(A) 鎖は卵成熟過程で短縮し、受精後の2 細胞期までに再び伸長することが明らかになった。3' 非翻訳領域(UTR) のシーケンス解析の結果、Pou5f1/Oct4mRNA の3'UTR 末端が卵成熟および初期発生の過程で最大14 塩基短縮することが明らかになった。レポーター解析の結果、3'UTR 末端の短縮は mRNA の翻訳効率を増加させることが明らかになった。3'UTR 末端の短縮により、mRNA の翻訳制御に関与するタンパク質の結合が変化すると予測し、Long タイプおよびShort タイプの3'UTR に結合するタンパク質を質量分析法によりin vitro で網羅的に解析した。その結果、Long タイプの3'UTR に特異的に結合するタンパク質を71 種類、Short タイプの3'UTR に特異的に結合するタンパク質を139 種類、両方の3'UTR に結合するタンパク質を50 種類同定した。これらの結果から、3'UTR 末端の短縮によりPou5f1/Oct4mRNA に結合するタンパク質が大きく変化することが示唆された。Short タイプの3'UTR に特異的に結合した Gemin5 およびDhx9 は、mRNA の翻訳制御に作用するタンパク質として知られる。RT-PCR とウェスタンブロッティングによってGemin5 およびDhx9 のmRNA・タンパク質が卵母細胞で発現することを明らかにした。また免疫染色によって、Gemin5 およびDhx9 タンパク質が卵母細胞および2 細胞期胚の細胞質に発現することを明らかにした。Trim21-mediated protein degradation system によるGemin5 およびDhx9 のノックダウンを行った結果、2 細胞期におけるPou5f1/Oct4 タンパク質の発現が阻害された。以上の結果から、Gemin5 およびDhx9 はPou5f1/Oct4mRNA の翻訳活性化に作用することが示唆された。本研究により、3'UTR 末端の短縮に伴う結合タンパク質の変化が母性Pou5f1/Oct4 mRNA の翻訳を制御するという新規の翻訳制御機構の存在が示唆された。Long タイプの Pou5f1/Oct43'UTR にはRNA 顆粒形成因子を含む翻訳抑制因子が結合することでmRNA の翻訳を抑制する一方、末端を短縮したShort タイプのPou5f1/Oct43'UTR には翻訳促進因子が結合することでmRNA の翻訳を活性化すると考えられる。この翻訳制御により2 細胞期胚における母性Pou5f1/Oct4 タンパク質の発現が誘導され、初期発生の進行に寄与すると考えられた。