



Title	Molecular Biological Studies on the Spatial and Temporal Regulation of mRNA Translation during Early Zebrafish Development [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 圭祐
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16285号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95490
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 佐 藤 圭 祐

学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Studies on the Spatial and Temporal Regulation
of mRNA Translation during Early Zebrafish Development
(ゼブラフィッシュ初期発生における mRNA 翻訳の時空間制御機構の分子生物学的研究)

動物の卵母細胞は翻訳を抑制された数千種類の mRNA を成長過程で蓄積する。mRNA はそれぞれに特有の時期に翻訳され、合成されたタンパク質は卵成熟や初期発生を進行させる。したがって、mRNA の時空間翻訳制御は個体の発生にとって非常に重要である。この時期特異的な翻訳制御の仕組みは卵成熟過程でよく解析されてきた一方で初期発生過程においてはほとんど研究されていなかった。

Pou5f3 は接合体性の遺伝子の転写活性化、内胚葉の分化、背腹軸の形成等に関与するゼブラフィッシュ初期発生において重要な転写因子である。これまでの研究から *pou5f3* mRNA が卵母細胞と初期胚において顆粒構造を形成し、その構造を維持することが示された。また初期発生の過程で *pou5f3* mRNA の 3' UTR の末端が短縮されることで翻訳が活性すること、短縮前と短縮後で mRNA 3' UTR に結合するタンパク質の種類が変化する可能性が示された。これらのことから *pou5f3* mRNA の翻訳制御には RNA 顆粒構造、またそれを構成する RNA 結合タンパク質の機能が重要な役割を果たすことが考えられた。

本研究では初期発生過程における mRNA 翻訳のより詳細な時空間制御機構を明らかにすることを目指した。Chapter I では *pou5f3* mRNA の RNA 顆粒構造の形成とその維持に着目し、翻訳の時空間制御機構の解析を行った。初期発生過程における Pou5f3 タンパク質の発現解析を行ったところ Pou5f3 タンパク質は受精後初期発生の過程で発現量が増加した。*In situ* hybridization 法で mRNA の発現解析を行った結果、先行研究と同様に *pou5f3* mRNA は初期胚で顆粒構造を形成しその構造が維持されていた。以上の結果より、*pou5f3* mRNA の翻訳は RNA 顆粒構造の形成とその維持による新規の翻訳制御機構により制御されていることが示唆された。RNA 顆粒構造の維持による翻訳活性化について解析するため、*pou5f3* mRNA と同時に Ribopuromycylation 法によって新規に合成されたペプチドを検出し超解像顕微鏡を用いた観察を行った。受精後 0 時間と比べて受精後 3 時間ではより多くの mRNA 顆粒構造とペプチドサイトが共局在した。この共局在した場所で Pou5f3 タンパク質が合成されているかどうかを検証するため Puromycin と Pou5f3 タンパク質の相互作用を Proximity ligation assay 法 (Puro-PLA 法) により可視化した。その結果 Puro-PLA のシグナルは受精後 0 時間から 3 時間で大きく増加した。この結果から受精後 3 時間では *pou5f3* mRNA の翻訳が活性化し細胞質内で活発に Pou5f3 タンパク質が合成されていることが示された。これらのことから RNA 顆粒の翻訳活性は受精後 0 時間から 3 時間で増加していることが考えられた。この翻訳活性の増加の分子機構を探るため RNA 顆粒の分子の状態に着目し 1,6-Hexanediol を用いた解析を行った。1,6-Hexanediol は固相様の分子に対しては影響を与えないが、液相様の分子に対してはその分子を溶解させるという性質を持つ。受精後 0 時間の胚に対して 1,6-Hexanediol 処理をしても RNA 顆粒構造の数に大きな差はなかった一方、受精後 3 時間の胚に対して処理をすると顆粒の数が半分程度減少した。この結果から受精後 0 時間の顆粒構造は固相様であるのに対し、受精後 3 時間では半分程度が液相様へと変化することが示唆された。RNA 顆粒構造の維持とその状態の変化が翻訳の活性化に重要であることが示唆された。

このような RNA 顆粒構造の状態の変化に関与する因子として RNA 結合タンパク質である Syncrin と Ewsr1b に着目し Chapter IIにおいてこれらのタンパク質の機能解析を行った。先行研究から RNA 結合タンパク質の天然変性領域 (IDR) が RNA 顆粒の相転移・相分離に

関与することが示されてきた。Syncrip と Ewsr1b はともに IDR を有している。Syncrip タンパク質の発現を解析したところ、初期発生の過程で発現量が減少した。また、受精後 0 時間に比べて受精後 3 時間では Syncrip と *pou5f3* mRNA の顆粒構造との共局在サイトが減少した。Syncrip の過剰発現を行ったところ、Pou5f3 タンパク質の発現量の減少並びに *pou5f3* mRNA のポリ A 鎖の伸長阻害が示された。これらの結果から、Syncrip は *pou5f3* mRNA の翻訳抑制に関与することが考えられた。Syncrip と相互作用するタンパク質を免疫沈降と質量分析により網羅的に解析したところ Cnot1 を含む 87 のタンパク質が検出された。Cnot1 は mRNA のポリ A 鎖分解酵素複合体として翻訳制御に重要な Ccr4-Not 複合体の構成因子であり、Syncrip が Ccr4-Not 複合体と共役して標的 mRNA の翻訳を制御している可能性が示された。Ewsr1b を特異的に認識する抗体を作製しタンパク質の発現を解析したところ、受精後に Pou5f3 よりも早い段階からタンパク質の発現量が増加した。また Ewsr1b は細胞において核と細胞質の両方に局在し、細胞質においては *pou5f3* mRNA の RNA 顆粒構造と一部共局在した。Ewsr1b の発現をモルフォリノオリゴでノックダウンした結果、Pou5f3 のタンパク質発現量も減少した。これらの結果から、Ewsr1b が *pou5f3* mRNA の翻訳活性化に重要であることが示された。Ewsr1b は合成された Pou5f3 タンパク質とも細胞質と核内で共局在しており、Pou5f3 の機能制御にも関与することが示唆された。初期胚における mRNA の 3' UTR を網羅的に解析した解析から、*ewsrlb* mRNA は 3' UTR の長さが異なる 2 つの転写産物として発現していることが分かった。Ewsr1b に GFP タグを融合したタンパク質の発現解析から、短い長さの 3' UTR を持つ mRNA から合成されたタンパク質は細胞質に局在して液滴を形成し、*pou5f3* mRNA と結合することが分かった。一方長い 3' UTR を持つ mRNA から合成されたタンパク質は細胞の核内に局在した。これらの結果から、初期胚において発現する 2 つの *ewsrlb* mRNA の転写産物は、それぞれ合成されるタンパク質の局在と機能が異なることが示唆された。Ewsr1b は細胞内で様々な役割を担っており、これらの機能は 3' UTR の長さに応じた *ewsrlb* mRNA の翻訳制御によって規定されることが示唆された。

本研究により、初期発生過程における RNA 顆粒構造の維持とその状態の変化による新規の翻訳制御機構、また翻訳制御における Syncrip と Ewsr1b の機能、そして Ewsr1b の機能解析を通じて 3' UTR の長さによる翻訳制御が初期胚で働いていることを見出した。このように初期発生過程において RNA 顆粒を構成するタンパク質の機能、それによって変化する RNA 顆粒の状態、そして 3' UTR の長さが初期発生過程の mRNA 翻訳の時空間制御に貢献することが示された。