



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Comprehensive studies of mRNA 3'UTR processing during zebrafish early development
Author(s)	FIERRO, Ludivine
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16602号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16602
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98212
Type	doctoral thesis
File Information	Ludivine_Fierro_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博士 (生命科学) 氏 名 FIERRO Ludivine Martine

審査担当者	主査	准教授 小 谷 友 也
	副査	教 授 木 村 敦
	副査	教 授 千 葉 由 佳 子

学 位 論 文 題 名

Comprehensive studies of mRNA 3'UTR processing during zebrafish early development
(ゼブラフィッシュ初期発生における mRNA の 3' UTR プロセッシングの包括的研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

近年の研究から、多くの動物の受精卵は一万種類を超える mRNA を持つことが示されてきた。さらに、これら mRNA は受精の前後で常に翻訳され続けるものと受精後に翻訳を停止するもの、反対に受精前に翻訳を抑制され受精後に翻訳されるものを含むことが明らかとなってきた。特に受精前に翻訳を抑制された mRNA は、受精後の適切な時期に適切な場所で翻訳を開始し、タンパク質を合成することで発生のさまざまな現象を進行させる。受精卵が持つ mRNA がどのように翻訳を制御され、卵形成と発生を進行させるのかを研究することは、動物の生殖細胞形成と発生を理解するために極めて重要である。しかし、その研究は容易ではなく、本研究分野はほとんど進展してこなかった。一方で、翻訳を抑制された mRNA が時期特異的に翻訳される分子機構は、アフリカツメガエルを用いた卵成熟過程の研究で解明されてきた。卵成熟とは、排卵直前に卵母細胞が減数分裂を再開し、受精可能な卵母細胞となる過程である。その成果は、mRNA 分子に存在するシス配列の発見、および、これらシス配列に結合しトランスに働くタンパク質の発見をもたらした。しかし、受精後に同様の分子機構が機能するかは不明である。本論文は、受精卵が持つ mRNA の 3' 非翻訳領域(UTR)に注目し、mRNA がどのように翻訳制御を受けるのか、その分子機構と全貌の解明を目的とした。本論文の構成は、動物の発生に重要な *pou5f3* 遺伝子の 3' UTR の変化を示した第一章と、受精卵が持つ mRNA 全体における 3' UTR の変化を解析した第二章、この変化の上流で働くと推測される micro RNA (miRNA) の発現を解析した第三章から成る。

ゼブラフィッシュの *pou5f3* mRNA は、転写因子の Pou5f3 をコードする。Pou5f3 は初期発生のさまざまな現象に関わることが示されてきたが、*pou5f3* mRNA がどのように受精卵で維持され、どのような分子機構でタンパク質を合成するかは定かではなかった。本論文の第一章では、*pou5f3* mRNA の 3' 末端の配列を詳細に解析し、約 70 塩基の配列が受精後に削減されることを見出した。トランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いたレポーター mRNA の解析から、全長の 3' UTR を持つ mRNA は翻訳活性が低く、70 塩基が削減された mRNA は翻訳活性が高いことが示された。したがって、*pou5f3* mRNA は長い 3' UTR 配列を持つことで翻訳を抑制し、受精後に 3' 末端の配列を短縮することで翻訳を活性化させると考えられた。これは、3' 末端の長さの変化によって翻訳を制御するという新規分子機構の発見となった。

本論文の第二章では、*pou5f3* mRNA に見られた 3' UTR 配列の短縮が少数の mRNA のみに起こるのか、あるいは広範囲に起こる現象であるのか、その全貌解明を目的とした。この問いに迫るため、受精卵と卵割期の胚 (受精後 2 時間)、初期胞胚 (受精後 4 時間) から RNA を抽出し、全

mRNA を対象に 3' 末端の配列をライブラリー化した。次世代シーケンサーを用いライブラリーを解読した結果、それぞれのステージで 1 万種類前後の mRNA にリードがマップされた。mRNA の量の変化を解析する手法は数多く確立されているが、3' UTR の変化を解析する手法は未だ確立されておらず、著者は個別の研究論文の解析法を順次試すことで解析を実現した。Change Point と呼ばれる手法は長さの異なる 3' 末端のリード数をカウントし、有意差の有無を判断する。この手法と次世代シーケンスの結果を用い、3,000 以上の mRNA の 3' UTR において、受精後に 3' 末端が短縮されることが示された。したがって、*pou5f3* mRNA で見られた 3' UTR の短縮は、多くの mRNA で見られる現象であることが示された。APALyzer と呼ばれる手法は Poly(A) 付加シグナルをもとに 3' UTR の長さの変化を検出するもので、この手法によって 3' 末端を短縮する mRNA とともに、長い 3' 末端の割合が増加する mRNA を見出した。さらに、イントロン配列に存在する 3' UTR の解析が可能となった。Peaks2UTR と呼ばれる手法はライブラリーのリードの全ピークをカウントし既存のデータベースにない 3' UTR を見出す手法で、この解析によって本研究のライブラリーは約 35,000 の 3' 末端を検出していること、さらに 1,000 を超える新規の 3' UTR を見出していることが明らかとなった。これらの成果は、受精卵と初期発生における 3' UTR の全貌と大規模な変化を明らかにしたもので、mRNA の制御機構に新たな局面をもたらすと評価される。

第三章では、3' UTR に結合しその変化を制御する分子として miRNA に注目し、解析した。ゼブラフィッシュの miRNA はその発現を含めて情報が乏しい。本研究で受精後 1 時間の胚が持つ miRNA のライブラリーを作製し、既知の約 100 種類の miRNA に加え、新規の 26 種類の miRNA の発現を明らかにした。特に、新規 miRNA の一つは *pou5f3* mRNA の 3' UTR を標的とする可能性を持つことが示された。また、第二章で発見された長い 3' UTR の割合を増加させる mRNA と翻訳の関係を解析した結果、長い 3' UTR の mRNA は受精後に一定のタンパク質を合成するために重要であることが示唆された。以上の成果は、miRNA が 3' UTR の長さの変化に関わる可能性を示し、さらに 3' UTR の変化と翻訳の新たな関係を示したもので、受精後の mRNA の制御機構を知る上で重要な知見となる。

以上の成果より、著者は mRNA の翻訳制御機構において 3' UTR の長さの変化を介した分子機構の存在と広範囲に及ぶ 3' UTR の変化を包括的に解明したものであり、RNA 制御と動物の発生の分子機構に迫るとともに本研究分野の発展に資すること大である。

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。