

氏 名 大 浪 修 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第327号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 *C.elegans* 初期胚において時間的・空間的にpoly(A)tailの
長さが変化する母性mRNAについての研究

論文審査委員 主 査 教 授 廣海 健
教 授 中辻 憲夫
教 授 桂 勲
助 教 授 林 茂生
主 席 研 三輪 錠司 (NEC中央研究所)

博士論文の要旨

多くの多細胞生物において、受精直後の初期胚には胚自身の転写活性は存在せず、この間の胚の発生は母性遺伝子に依存する。母性遺伝子は母性mRNAや蛋白として初期胚に供給され、母性mRNAの多くは胚発生の特定の時期に特定の細胞で翻訳され、個々の細胞に独自の性質を与える。母性mRNAが翻訳される時間や場所、母性mRNAが細胞の運命を決定する機構を解明することは、多細胞生物の胚発生の機構の解明のために重要な課題である。

線虫 *C. elegans* の初期胚の各割球はノマルスキー顕微鏡等で容易に識別できる。 *C. elegans* 初期胚において時期特異的、細胞特異的に翻訳され、割球の運命決定に関与する母性mRNAが現在までに数多く報告されている。また、cDNAの系統的な *in situ* 解析より100種類以上の母性mRNAが現在までに同定されている。これ等の理由から、 *C. elegans* 初期胚は、母性mRNAの時間特異的細胞特異的な翻訳の調節機構を解明するための最も適した実験材料の1つであると言える。

母性mRNAの翻訳調節機構としてpoly(A) tailの長さの変化に依存した翻訳調節、キャップのメチル化に依存した翻訳調節、RNA-蛋白複合体形成によるリボゾームからの隔離に依存した翻訳調節が知られている。これらが互いに独立した機構なのか否かは議論が分かれる。poly(A) tailの長さの変化に依存した機構により翻訳が調節される母性mRNAは翻訳不活性時には短いpoly(A) tail (30-60塩基) を持ち、翻訳が活性化される時に長いpoly(A) tail (150-300塩基) を持つようになる。この機構により翻訳の時期が制御される母性mRNAはアフリカツメガエル、ショウジョウバエ、マウス等において数多く報告されたので、この機構は広く多細胞生物に保存された母性mRNAの翻訳調節機構であると考えられる。

C. elegans を用いれば、個々の細胞レベルでの、この機構の解析が期待できる。しかし、 *C. elegans* においてこの機構により翻訳が調節される母性mRNAは報告されていない。それは特定の時期の *C. elegans* の初期胚や割球においてmRNAのpoly(A) tailの長さを測定できる方法が無かったからである。 *C. elegans* では発生時期が厳密に同調した初期胚を大量に調製することができないので、特定の時期の胚におけるmRNAのpoly(A) tailの長さを測定する為には、数個の初期胚を試料として測定できる方法が必要である。このような方法は、特定の割球におけるmRNAのpoly(A) tailの測定のためにも必須である。そこで私は、この条件を満たすpoly(A) tailの長さを測定する新しい方法を開発した。

本法では、目的のmRNAの3'-末端領域 (3'UTRの特定の位置からpoly(A) tailの末端まで) を増幅する。増幅が正確に行われたなら、その増幅産物の長さ、及びシーケンスから目的のmRNAのpoly(A) tailの長さが求められるはずである。このやり方で、数個の初期胚、割球を用いてmRNAのpoly(A) tailの長さを測定することを可能にするために、本法ではmRNAの3'-末端にRNAのタグオリゴヌクレオチドを付加し、遺伝子特異的プライマーとタグ特異的プライマーを用いたRT-PCRを行った。

本法をテストする目的で、卵母細胞と4細胞期胚に含まれる *fem-3* mRNAのpoly(A) tailの長さを測定した。ノーザンブロッティングの結果から *fem-3* mRNAのpoly(A) tailの長さは卵母細胞では30-60塩基、初期胚では30-150塩基であると推算されていたからである。5-15個の卵母細胞と4細胞期胚より核酸を抽出し、これらの3'-末端にRNA

タグオリゴヌクレオチドを付加した。*fem-3*特異的プライマーとタグ特異的プライマーによるRT-PCRにより、卵母細胞からは約330bpの長さのDNA断片が増幅された。4細胞期胚からは2種類のDNA断片（長いもの（約520bp）と短いもの（約330bp））が増幅された。DNA断片の長さは303bpと*fem-3* mRNAのpoly(A) tailの長さを足した長さになることが期待される。これらのDNA断片を直接シーケンスしたところ、卵母細胞より増幅されたDNA断片からは約25塩基のpoly(A)配列が続く*fem-3* 3'UTRの配列（*fem-3*特異的プライマーより下流の部分）が読まれた。4細胞期胚より増幅された2種類のDNA断片からはそれぞれ、約220塩基、約25塩基のpoly(A)配列の続く*fem-3* 3'UTRの配列が読まれた。これらの結果は、卵母細胞には約25塩基のpoly(A) tailを持つ*fem-3* mRNAが含まれ、4細胞期胚には2種類の*fem-3* mRNA（長いpoly(A) tail（約220塩基）を持つものと短いpoly(A) tail（約25塩基）を持つもの）が含まれることを示した。この結果は、ノーザンブロットィングによる推算値と良く一致した。以上のようにして本法によるpoly(A) tailの測定値が正確であることを確認した。

*C. elegans*において、poly(A) tailの長さに依存した機構により翻訳調節される母性mRNAを探索する目的で、*glp-1* mRNAのpoly(A) tailの長さを本法を用いて測定した。母性*glp-1* mRNAは卵母細胞より初期胚に供給され、2細胞期胚、4細胞期胚の各割球には殆ど等量の*glp-1* mRNAが伝えられる。GLP-1蛋白は卵母細胞及び1細胞期胚では検出されず、2細胞期胚では前極側の割球のみで、4細胞期胚では前極側の割球の2つの娘細胞のみで検出される。卵母細胞、2細胞期胚に含まれる*glp-1* mRNAのpoly(A) tailの長さを測定したところ、卵母細胞に含まれる*glp-1* mRNAは短いpoly(A) tail（40-70塩基）を持つこと、2細胞期胚には2種類の*glp-1* mRNA（長いpoly(A) tail（約160塩基）を持つものと短いpoly(A) tail（約40塩基）を持つもの）が含まれことが示された。2細胞期胚より前極側の割球（AB割球）および後極側の割球（P1割球）を分離し、各々に含まれる*glp-1* mRNAのpoly(A) tailの長さを測定した。長いpoly(A) tail（約160塩基）を持つ*glp-1* mRNAはAB割球のみに含まれ、P1割球には短いpoly(A) tail（約70塩基）を持つ*glp-1* mRNAのみが含まれた。これらの結果より母性*glp-1* mRNAの時期特異的、細胞特異的な翻訳調節がpoly(A) tailに依存した機構により調節されていることが強く示唆された。

本研究において私は*C. elegans*の特定の時期の初期胚、及び割球におけるmRNAのpoly(A) tailの測定法を開発した。*fem-3* mRNAを用いた実験によりこの方法の結果の正確性が確認された。本法を*glp-1* mRNAに応用した結果から、母性*glp-1* mRNAの時期特異的、細胞特異的な翻訳調節がpoly(A) tailに依存した機構により調節されていることが強く示唆された。

論文の審査結果の要旨

mRNAの翻訳調節は、遺伝子の転写調節と並んで、遺伝子発現調節の重要な機構のひとつである。特に、多くの動物の初期胚では、胚遺伝子の転写がほとんどないため、母性由来のmRNAの局在、あるいは翻訳調節が、遺伝子発現の空間的・時間的調節を担っていることが多い。mRNAの翻訳調節機構のひとつとして、poly(A)の長さの変化によるものが提唱されている。mRNAの翻訳調節がこの機構に依存しているかを調べるには、特定のmRNAのpoly(A)の長さを測定することが必要である。

poly(A)の長さの定量法としては、Northern blottingを用いるRNaseH-Northern法とPCRを利用するpoly(A)test法が一般に用いられている。前者は、RNaseHによるpoly(A)を除去することによるmRNAの長さの短縮をNorthern blottingで測定するため、長いmRNAのpoly(A)の長さを正確に推定することは不可能であった。後者は、タグを付けたオリゴdTをハイブリダイズさせたあとでタグプライマーと遺伝子特異プライマーを用いてPCR反応を行うが、オリゴdTがpoly(A)のランダムな位置にアニールするため、精度に欠き、実用に適さなかった。大浪君はRNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE) 法に種々の改良を加え、poly(A)の長さ測定の精度及び感度を飛躍的に上昇させることに成功した。大浪君の導入した主な改良点は、(1) mRNA内およびmRNA間の結合を防ぐためにmRNAに脱リン酸化処理を施す、(2) タグオリゴヌクレオチドを結合効率を高めるためにRNAオリゴヌクレオチドを利用する、(3) 複数のタグオリゴヌクレオチドが結合する事防ぐために、3'-末端をアミド化したRNAオリゴヌクレオチドを用いる、の3点である。この結果、線虫の初期胚の割球数個といった非常に少量の試料から、特定のmRNAのpoly(A) tailの長さを数ヌクレオチドの精度で測定することが可能になった。

この方法をテストするため、大浪君はまず、線虫のmRNAのうちそのpoly(A) tailの長さが測定された唯一のmRNAである*fem-3*mRNAのpoly(A)の長さを測定した。その結果、大浪法によって測定したpoly(A)の長さは、彼自身がRNaseH-Northern法によって推定したpoly(A)の長さによく一致することが確認された。次に、大浪君は彼のpoly(A)長さ測定法を、線虫*glp-1*mRNAに適用した。*glp-1*は線虫初期胚において割球特異的に翻訳調節を受けることが知られており、mRNAの翻訳効率とそのpoly(A) tailの長さとの間に相関があるか否かは多くの人の関心を集めていた。大浪君はまず、卵母細胞と2細胞胚を比べることにより、*glp-1*mRNAが翻訳される2細胞胚では長さの長いpoly(A)をもつ*glp-1*mRNAが存在することを示した。次に、2細胞胚の2種の割球を個別に解析することにより、長いpoly(A)をもつ*glp-1*mRNAは、*glp-1*が翻訳されるAB割球にのみ存在することを示した。

大浪君の開発したpoly(A)長さ測定法は、精度・感度ともに既存の方法よりもはるかに優れており、今後の翻訳調節研究に多大な貢献をすることは疑う余地がない。また、*glp-1*mRNAのpoly(A)の長さとその翻訳との間に相関関係がある、という発見は、これらの現象間に因果関係があることを示唆する、という点で発生生物学上も貴重な成果である。以上の理由で、この論文は博士(理学)の学位論文として十分な内容を持つ、と審査員全員の意見が一致した。