

マウス初期胚における母性 mRNA の  
選択的分解機構に関する研究

平成 18 年度入学

資源生物制御学分野

66543

平坂聡

# マウス初期胚における母性 mRNA の選択的分解機構に関する研究

2008年3月修了 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野

学生証番号 66543 氏名 平坂聡 指導教員 永田昌男教授、青木不学准教授

Keywords: マウス卵, 母性 mRNA, 選択的分解, MII 期への進行, 3' UTR

## 序論

マウス卵は成長過程において活発に転写を行い、細胞内に mRNA を蓄積する。転写は成長過程が終わる前に停止し、蓄積された mRNA はその後の発生のために使用される。mRNA は成長期においては安定だが、第 1 減数分裂前期の卵核胞期 (GV 期) から第 2 減数分裂中期 (MII 期) にかけてその量が減少している。分解は受精後も続くが、このときの分解速度は mRNA の種類によって異なる。受精後の初期胚において Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は Hprt1 や Cyclin A2 mRNA に比べて急速に分解される。一方、卵に含まれる mRNA は受精後の胚性遺伝子発現 (ZGA) において合成されるか否かで 2 つのクラスに分けられる。第一のクラスの mRNA は ZGA によって合成され、卵と初期胚に共通に含まれるものである。このような mRNA は卵においても胚においても必要とされるものであり、細胞の基本的な機能を担っていると考えられる。第二のクラスの mRNA は ZGA によって合成されず、卵にのみ含まれるものである。このような mRNA は胚においては不必要だけでなく、有害となることもある。受精後の初期胚において比較的安定である Hprt1 や Cyclin A2 mRNA は第一のクラスに属し、急速に分解される Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は第二のクラスに属す。ゆえに、卵には mRNA をその必要性に応じて選択的に安定化あるいは分解する機構が存在すると考えられる。本研究はこの機構について明らかにすることを目的とし、何がこの機構の誘因となっているのか、また、どのようにして mRNA 種に選択性がもたらされるのかについて調べたものである。

## 結果

### 受精前後における mRNA 量の変化

すべての mRNA は GV 期まで安定であるが、その後何れを誘因として安定性に差を持つようになるのかを調べるため、GV 期から 1 細胞期までの卵成熟および発生過程における様々な事象に着目した。すなわち、卵成熟過程における卵核胞崩壊 (GVBD)、MI 期への進行、MII 期への進行、そして受精後における MII 期の終了、前核形成、DNA 複製開始である。これらの事象を正確な時間で同期化して扱える *in vitro* での成熟系 (IVM) と体外受精系 (IVF) で再現し、それぞれの事象が

起こってから 2 時間後の各種 mRNA 量を測定した (図 1)。その結果、Hprt1 と Cyclin A2 mRNA は GV 期から受精後 DNA 複製を開始するまでの間、一定の速度でゆっくりと分解されていった。一方、Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は MII 期に進行した後に顕著に分解の速度が上がり、特に Mos と Gdf9 mRNA につい

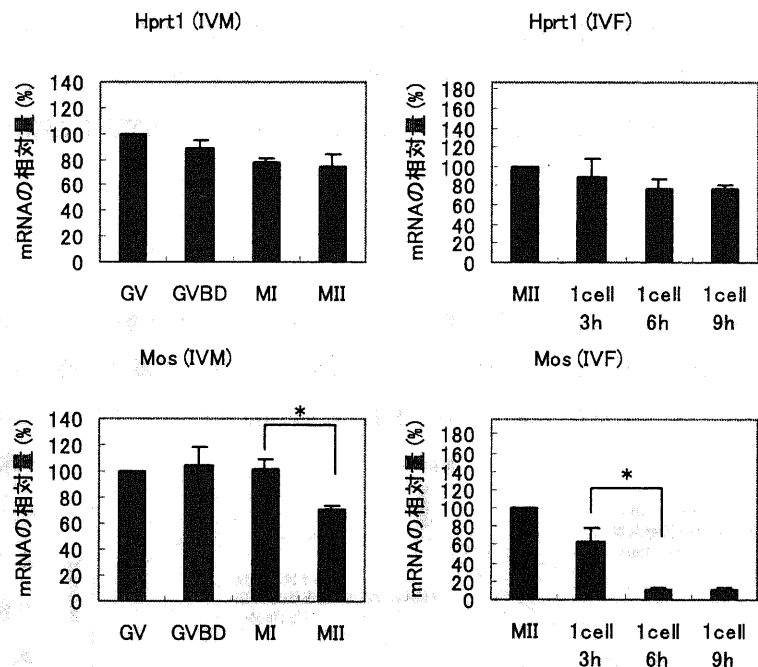


図 1. 受精前後における mRNA 量の変化 IVM と IVF における mRNA 量の変化。Hprt1 と Mos についてのみ示した。\* $p < 0.05$

ては有意にその量が減少した。また、受精後 3 時間から 6 時間にかけても顕著に分解の速度が上がり、特に Mos mRNA については有意にその量が減少した。これらの結果より、mRNA がその種類によって分解速度に差を持つようになるのは、MI 期から MII 期に進行すること、あるいは初期胚において前核を形成することが誘因であることが示唆された。

### mRNA の分解に対する卵成熟・受精の影響

mRNA がその種類によって分解速度に差を持つようになるのは、MII 期に進行することが誘因であるか否かを調べるため、減数分裂進行阻害剤である IBMX の存在下、非存在下でそれぞれ培養を行い、mRNA 量を測定した (図 2)。その結果、Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA について、IBMX 非存在下で培養後 12 時間で見られた顕著な減少が IBMX 存在下では見られなくなった。特に Mos と Gdf9 mRNA については有意に差があった。これらの結果より、mRNA がその種類によって分解速度に差を持つようになることに対して、MII 期に進行することが誘因であることが示唆された。

また、受精の有無による mRNA 量の変化を調べたが、受精による mRNA 量の安定性に対する影響は見られなかった。

### mRNA の安定性に対する 3' UTR 欠失の影響

一般的に mRNA の安定性に大きく影響するといわれている 3' UTR をすべて、または後半のみ、または前半のみ欠失した Hprt1 と Mos mRNA の分解を調べた。その結果、Mos mRNA は 3' UTR のどの領域を取り除いても影響を受けず、3' UTR のすべてを含むものと同様の速い分解が見られた。一方、Hprt1 mRNA は 3' UTR をすべてを含むものは比較的安定であったが、3' UTR のすべてを欠失、あるいは前半のみを欠失させることで安定性が有意に減少した。しかし、3' UTR の後半部分を欠失させても有意な減少は検出されなかった。これらの結果より、Hprt1 mRNA 3' UTR の前半部分に mRNA の安定化に寄与する因子が存在することが示唆された。

### 考察

本研究は、卵成熟の過程における事象ごとの各種 mRNA 量の変化を詳細に調べることにより、ある種の mRNA に対する選択的な分解が MII 期への進行を誘因に引き起こされることを明らかにした。また、mRNA の安定性に対する 3' UTR の影響を調べることにより、Hprt mRNA 3' UTR 前半に分解に拮抗する因子が存在することを示した。これまで、MII 期の mRNA 量が GV 期に比べて少ないことから、GV 期から MII 期にかけて起こる mRNA の大規模な分解は、卵成熟の開始と共に起こると考えられてきた。しかし、本研究で明らかになった、MII 期への進行と共に引き起こされる分解機構が、この大規模な分解を担っているのかもしれない (図 3)。

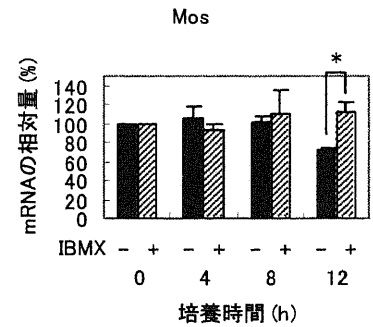


図 2. mRNA の分解に対する卵成熟の影響  
培養時間 4, 8, 12h はそれぞれ GVBD, MI, MII への進行から 2 時間後である。

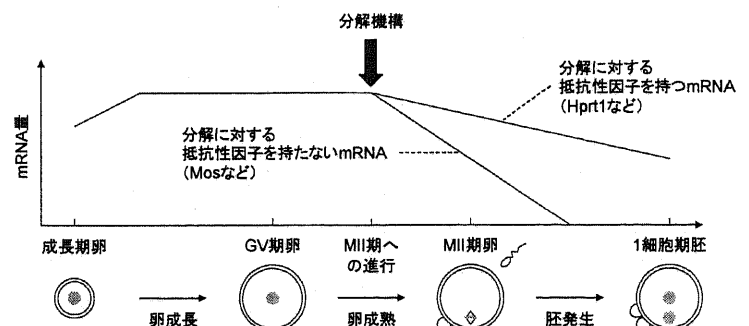


図 3. マウス卵における mRNA の選択的安定化機構

# 目次

要旨	3
緒言	5
材料と方法	8
結果	11
考察	15
謝辞	18
参考文献	19
図表	21

## 要旨

マウス卵において、mRNA の分解速度はその種類によって異なることが知られている。受精後の初期胚において Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は Hprt1 や Cyclin A2 mRNA に比べて急速に分解される。急速に分解される mRNA は、受精後の胚性遺伝子発現において合成されない遺伝子であり、卵には mRNA をその必要性に応じて選択的に安定化あるいは分解する機構が存在すると考えられる。本研究はこの機構について明らかにすることを目的とし、何がこの機構の誘因となっているのか、また、どのようにして mRNA 種に選択性がもたらされるのかについて調べたものである。

何を誘因として安定性に差を持つようになるのかを調べるため、GV 期から 1 細胞期までの卵成熟および発生過程における様々な事象における mRNA 量の変化を調べた。その結果、Hprt1 と Cyclin A2 mRNA は GV 期から受精後 DNA 複製を開始するまでの間、一定の速度でゆっくりと分解されていった。一方、Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は MII 期に進行した後に顕著に分解の速度が上がり、特に Mos と Gdf9 mRNA については有意にその量が減少した。また、受精後 3 時間から 6 時間にかけても顕著に分解の速度が上がり、特に Mos mRNA については有意にその量が減少した。

II 期に進行することが誘因であるか否かを調べるため、減数分裂進行阻害剤である IBMX の存在下、非存在下でそれぞれ培養を行い、mRNA 量を測定した。その結果、Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA について、IBMX 非存在下で培養後 12 時間で見られた顕著な減少が IBMX 存在下では見られなくなった。特に Mos と Gdf9 mRNA については有意に差があった。これらの結果より、II 期に進行することが誘因であることが示唆された。また、受精の有無による

mRNA 量の変化を調べたが、受精による mRNA 量の安定性に対する影響は見られなかった。

一般的に mRNA の安定性に大きく影響するといわれている 3' UTR をすべて、または後半のみ、または前半のみ欠失した Hprt1 と Mos mRNA の分解を調べた。その結果、Mos mRNA は 3' UTR のどの領域を取り除いても影響を受けず、3' UTR のすべてを含むものと同様の速い分解が見られた。一方、Hprt1 mRNA は 3' UTR をすべてを含むものは比較的安定であったが、3' UTR のすべてを欠失、あるいは前半のみを欠失させることで安定性が有意に減少した。しかし、3' UTR の後半部分を欠失させても有意な減少は検出されなかった。これらの結果より、Hprt1 mRNA 3' UTR の前半部分に mRNA の安定化に寄与する因子が存在することが示唆された。

## 緒言

マウス卵は成長過程において活発に転写を行い、細胞内に mRNA を蓄積する。転写は成長過程が終わる前に停止し、蓄積された mRNA はその後の発生のために使用される (Schultz, 1993)。mRNA は成長期においては安定だが、第 1 減数分裂前期の卵核胞期 (germinal vesicle stage; GV 期) から第 2 減数分裂中期 (metaphase II; MII 期) にかけてその量が減少している (Pikó et al., 1982; Bachvarova et al., 1985)。GV 期卵には 1 細胞あたり約 1 pg の total mRNA が含まれるが、MII 期卵では約 0.7 pg となり、2 細胞期後期胚では約 0.26pg まで減少する (Pikó et al., 1982)。分解は受精後も続くが、このときの分解速度は mRNA の種類によって異なる。受精後の初期胚において Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は Hprt1 や Cyclin A2 mRNA に比べて急速に分解される (Zohreh et al., 2005) (Fig. 1)。

一方、卵に含まれる mRNA は受精後の胚性遺伝子発現 (ZGA) において合成されるか否かで 2 つのクラスに分けられる。第一のクラスの mRNA は ZGA によって合成され、卵と初期胚に共通に含まれるものである。例えば、actin mRNA は受精前から 2 細胞期後期まで減少し続けるが、胚性の転写により 4 細胞期から 8 細胞期にかけてその量が増加し始め、胚盤胞期まで増え続ける (Paynton et al., 1988)。このような mRNA は卵においても胚においても必要とされるものであり、細胞の基本的な機能を担っていると考えられる。第二のクラスの mRNA は ZGA によって合成されず、卵にのみ含まれるものである。このような mRNA は胚においては不必要なだけでなく、有害となることもある。例えば、Mos は減数分裂の進行に必要であるが、そのタンパク質を 2 細胞期胚にマイクロインジェクションすると分裂が抑制されてしまう (Sagata et al., 1989)。

受精後の初期胚において比較的安定である Hprt1 や Cyclin A2 mRNA は第一のクラスに属し、急速に分解される Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は第二のクラスに属す (Behrendtsen et al., 1995; Rambhatla et al., 1995; Svoboda et al., 2000; Robson et al., 2001; Tanaka et al., 2001; Rajkovic et al., 2002)。ゆえに、卵には mRNA をその必要性に応じて選択的に安定化あるいは分解する機構が存在すると考えられる。本研究はこの機構について明らかにすることを目的とし、何がこの機構の誘因となっているのか、また、どのようにして mRNA 種に選択性がもたらされるのかについて調べたものである。

そのために、GV 期から 1 細胞期までの成熟および発生過程における様々な事象が mRNA の安定性に与える影響を調べた。その結果、第 1 減数分裂中期 (metaphase I; MI 期) から MII 期への進行がある種の mRNA の選択的な安定化あるいは分解の誘因となっていることを見出した。

また、in vitro で合成した mRNA を MII 期卵にマイクロインジェクションし、受精の前後における mRNA 量をリアルタイム RT-PCR を用いて測定することによって、mRNA の安定性に与える特定の配列の影響を調べた。哺乳類の体細胞においては、3' UTR における特定の配列が mRNA の安定性に大きく寄与しているという報告が数多くなされてきた (Jacobson et al., 1996)。例えば、AU-rich element (ARE) と呼ばれる配列はある種の mRNA の 3' UTR に存在し、mRNA の不安定化に寄与している。この配列は 50 から 150 塩基の長さで、1 から 3 回の AUUUA の繰り返しを含むという特徴を有する (reviewed in Chen and Shyu, 1995)。また、両生類や昆虫の初期胚においても、3' UTR における特定の配列が mRNA の安定性に大きく寄与しているという報告が数多くなされてきた。例えば、*Drosophila* の胚では、*bicoid* instability element (BIE) と呼ばれる配列は *bicoid* mRNA の 3' UTR に存在し、胚形成の合胞体胚盤葉期の終わりにおける母性 *bicoid* mRNA の分解を制御するために必要十分であることが



報告されている (Surdej and Jacobs-Lorena, 1998)。これらの知見に基づき、マウス初期胚における mRNA の安定性に与える 3' UTR の影響を調べた。その結果、Hprt1 mRNA 3' UTR の前半部分に、分解に対して抵抗性を有する因子が存在することが示唆された。

## 材料と方法

### GV 期卵、MII 期卵、初期胚の採取および培養

GV 期卵は、5IU の pregnant mare' s serum gonadotropin (PMSG) (Teikokuzouki co. ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与後 46 時間経過した 8 週齢の BDF1 雌マウス (SLC, Shizuoka, Japan) の卵巣より採取した。ピペッティングにより卵丘細胞を取り除き、減数分裂進行阻害剤である 3-isomethylbutyl 1-methylxisantin (IBMX) を含む D-MEM 培地 (Invitrogen CA, USA) に集めた。

MII 期卵は、5IU の PMSG を投与してから 48 時間後に 5IU の human chorionic gonadotropin (hCG) (Teikokuzouki co. ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与することによって過排卵させられた 3 週齢の BDF1 雌マウスより採取した。hCG を投与してから 14 時間後に卵管膨大部より採取し、Hyaluronidase により卵丘細胞を取り除き、HTF 培地 (Quinn P et al., 1984) に集めた。

初期胚は、ICR 雄マウス (SLC) より採取した精子を MII 期卵に媒精させることによって得た。精子は HTF 培地で 2-3 時間培養したものをを用いた。

培養は全て 5% CO<sub>2</sub>、95% air、38°C の条件下で行った。

### Real-Time RT-PCR による mRNA の定量

様々な mRNA の相対的な発現量の変化を Smart Cyclor System (Cepheid, Sunnyvale and TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて測定した。以下にその要約を述べる。GV 期卵、MII 期卵、初期胚の total RNA を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo) を用いて抽出した。抽出の際、抽出効率の差を補正するための外部コントロールとして rabbit globin mRNA (50pg) (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, USA) を加えた。抽出された total RNA に含まれる特定の mRNA の相対量を One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて測定した。この反応系には PrimeScript RT enzyme Mix II と TaKaRa Ex Taq HS が含まれており、逆転写反応と PCR が連続して行われる。用いたプライマーの配列は Table 1 に示した。反応条件は 42°C で 600 秒・95°C で 10 秒の後、95°C で 10 秒・Table 1 に示したアニーリング温度で 25 秒・72°C で 20 秒・Table 1 に示した蛍光測定温度で 6 秒、のセットを 40 サイクルとした。相対量は各サンプルの 10 倍の希釈系列の増幅により得られた検量線を用いて決定した。

### MII 期卵への mRNA のマイクロインジェクション

MII 期卵への mRNA のマイクロインジェクションを Inverted microscope (ECLIPSE TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) と Micropipettor (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。Borosilicate glass capillaries (GC100 Tf-10, Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) 中に入れた mRNA を Microinjector (IM300, Narishige Co., Ltd.) により N<sub>2</sub> の圧力で押し出し、MII 期卵に約 10pl 注入した。注入は 20mM HEPES を含む KSOM 培地 (Lawitts and Biggers, 1993) 中に行い、注入後は速やかに HTF 培地に戻した。

### マイクロインジェクションに用いる mRNA の作成

マイクロインジェクションに用いた mRNA を以下に述べる方法により合成した。GV 期卵から得られた mRNA を、anchor 配列を含む oligo(dT) antisense プライマーを用いて逆転写することにより cDNA を合成した。これを鋳型に、それぞれの遺伝子に相補的な配列を含む sense プライマーと、anchor 配列を含む antisense プライマーを用いて PCR を行った。増幅された断片を TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter (Invitrogen) を用いてクローニングした。使用した

プライマーの配列を以下に示す。

anchored oligo(dT) antisense: 5'-tggtatcaacgcagagtacgcgt<sub>25</sub>-3'

Hprt1 sense: 5'-ttacctcactgctttccgga-3'

Mos sense: 5'-atgtggctggttttgagaatcaagga-3'

anchor antisense: 5'-tggtatcaacgcagagtacg-3'

クローニングによって得られたプラスミド (pCR II-TOPO) (Invitrogen) を Mlu I 制限酵素 (New England Biolabs, MA, USA) で処理し、さらに一本鎖特異的 endonuclease である Mung Bean Nuclease (TaKaRa) で処理した。前述の anchor 配列には Mlu I 制限酵素サイト (5'-a/cgcgt-3') が含まれており、これら 2 つの酵素処理により、3'末端が a の平滑末端で終わる直鎖状プラスミドが生成される。プラスミドには T7 および SP6 プロモーター配列が含まれており、これを鋳型に mMESSAGE mMACHINE (Ambion, TX, USA) を用いて *in vitro* での転写を行った。さらに、転写された RNA に poly(A) tailing kit (Ambion) を用いて poly(A) tail を付加した。これを MEGAclean (Ambion) を用いて精製したものを Hprt1 all、Mos all mRNA とし、マイクロインジェクションに用いた。

## 結果

### 受精前後における mRNA 量の変化

GV 期まではすべて安定である mRNA が、何を誘因として安定性に差を持つようになるのかを調べるため、GV 期から 1 細胞期までの卵成熟および発生過程における以下の事象に着目した。すなわち、GVBD、MI 期への進行、MII 期への進行、MII 期の終了、前核形成、DNA 複製開始であり、これらの事象が各種 mRNA の安定性に与える影響を調べた。そのために、GV 期卵を採取して *in vitro* で MII 期まで成熟させる過程 (*in vitro* maturation; IVM) において、GVBD、MI 期への進行、MII 期への進行からそれぞれ 2 時間後にサンプリングを行った。また、MII 期卵を採取して *in vitro* で受精させる過程 (*in vitro* fertilization; IVF) において、MII 期の終了、前核形成、DNA 複製開始からそれぞれ 2 時間後にサンプリングを行った。サンプルから total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により Hprt1、Cyclin A2、Mos、Gdf9、H1oo、tPA の mRNA 量を測定した (Fig. 3)。その結果、Hprt1 と Cyclin A2 mRNA は GV 期から受精後 DNA 複製を開始するまでの間、一定の速度でゆっくりと分解されていった。一方、Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA は MI 期から MII 期にかけての段階で顕著に分解の速度が大きくなり、特に Mos と Gdf9 mRNA については有意に差があった。また、受精後 3 時間から 6 時間にかけても顕著に分解の速度が大きくなり、特に Mos mRNA については有意に差があった。これらの結果より、mRNA がその種類によって安定性に差を持つようになるのは、MI 期から MII 期に移行することか、あるいは初期胚において前核を形成することが誘因であることが示唆された。

### mRNA の分解に対する卵成熟の影響

mRNA がその種類によって安定性に差を持つようになるのは、MI 期から MII 期に移行することが誘因であるか否かを調べるため、減数分裂進行阻害剤である IBMX の存在下、非存在下でそれぞれ培養を行い、上記と同様にサンプリングと mRNA 量の測定を行った (Fig. 4)。その結果、Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA について、IBMX 非存在下で培養後 12 時間で見られた顕著な減少が IBMX 存在下では見られなくなった。特に Mos と Gdf9 mRNA については有意に差があった。これらの結果より、mRNA がその種類によって安定性に差を持つようになるのは、MI 期から MII 期に移行することが少なくとも部分的に誘因であることが示唆された。

### mRNA の分解に対する受精の影響

mRNA がその種類によって安定性に差を持つようになるのは、初期胚において前核を形成することが誘因であるか否かを調べるため、受精の有無でそれぞれ培養を行い、上記と同様にサンプリングと mRNA 量の測定を行った (Fig. 5)。その結果、すべての遺伝子の mRNA について受精の有無による違いは見られなかった。Mos、Gdf9、H1oo、tPA mRNA について、受精後 3 時間から 6 時間にかけて見られた顕著な減少は未受精のまま培養を続けることでも同様の時間に見られた。これらの結果より、mRNA をその種類によって選択的に安定化あるいは分解する機構は、MII 期に進行した時点ですでに働き始めていることがわかった。

### マイクロインジェクションによる配列依存性検証系の確立

mRNA をその種類によって選択的に安定化あるいは分解する機構において、mRNA 中のどのような配列が選択性をもたらすのかを調べるため、マイクロイ

ンジェクションによる配列依存性検証系を確立することにした。この系は、*in vitro* で合成された様々な mRNA を MII 期卵にマイクロインジェクションし、受精の前後における mRNA 量をリアルタイム RT-PCR を用いて測定することによって、mRNA の配列がその安定性に与える影響を検証するものである。

まず、マイクロインジェクションされた外来性 mRNA のみを特異的に検出できるようにするため、Fig. 2 に示すように設計されたリアルタイム RT-PCR 用プライマーの特異性を検証した (Table 2)。それぞれのプライマーを用いて、内在性 mRNA のみが含まれるサンプル (MII 期卵) と、そこに外来性の mRNA が加えられたサンプル (マイクロインジェクションされた MII 期卵) のリアルタイム RT-PCR を行った。その結果、すべての外来性 mRNA 特異的検出プライマー (Tag A sense/Hprt1 antisense 2、Tag B sense/Hprt1 antisense 2、Tag C sense/Hprt1 antisense 2、Tag D sense/Hprt1 antisense 2、Tag E sense/Mos antisense 2、Tag F sense/Mos antisense 2、Tag G sense/Mos antisense 2、Tag H sense/Mos antisense 2) において、外来性 mRNA を含まないサンプルでは、外来性 mRNA を含むサンプルより大きな Ct 値が測定された。Ct 値は大きければ大きいほど感度が弱いことを表す数値である。ゆえに、量の差を考慮しても、これらのプライマーが特異性を有することが確認された。

次に、マイクロインジェクションにおける最適な mRNA 濃度を検討するため、Mos all mRNA (Fig. 2) の 10 倍の希釈系列のマイクロインジェクションを行い、受精前後における mRNA 量を測定した。その結果、0.02 $\mu$ M の Mos all mRNA がインジェクションされた場合において、内在性の Mos mRNA と同程度の分解が見られた (Fig. 6)。以降、マイクロインジェクションにおける mRNA 濃度は 0.02 $\mu$ M 以下とすることにした。

次に、マイクロインジェクションされた mRNA が内在性のものと同様の挙動を示すかを確認するため、Hprt1 all と Mos all mRNA (Fig. 2) のマイクロイン

ジェクションを行い、受精前後における mRNA 量を測定した (Fig. 7)。その結果、マイクロインジェクションされた mRNA も内在性のものと同様の挙動を示すことが確認され、系の確立に成功した。

### mRNA の安定性に対する 3' UTR 欠失の影響

一般的に mRNA の安定性に大きく影響するといわれている 3' UTR をすべて、または後半のみ、または前半のみ欠失した Hprt1 と Mos mRNA (Fig. 2) の分解を調べた (Fig. 8)。その結果、Mos mRNA は 3' UTR のどの領域を取り除いても影響を受けず、3' UTR のすべてを含むもの (Mos all) と同様の速い分解が見られた。一方、Hprt1 mRNA は 3' UTR をすべてを含むもの (Hprt1 all) は比較的安定であったが、3' UTR のすべてを欠失 (Hprt1 del)、あるいは前半のみを欠失 (Hprt1 B) させることで安定性が有意に減少した。しかし、3' UTR の後半部分を欠失 (Hprt1 F) させても有意な減少は検出されなかった。これらの結果より、Hprt1 mRNA 3' UTR の前半部分に mRNA の安定化に寄与する因子が存在することが示唆された。



## 考察

本研究は、マウス卵における mRNA の選択的な安定化あるいは分解機構について明らかにすることを目的として行われた。そのために、何がこの機構の誘因となっているのか、また、どのようにして mRNA 種に選択性がもたらされるのかについて調べた。

mRNA の配列が分解に与える影響について調べる実験として、マイクロインジェクションによって導入された外来性 mRNA の分解を測定するという方法が理想的であると考えた。この実験系において、リアルタイム RT-PCR での検出を考慮するならば、なるべく濃い濃度の mRNA をマイクロインジェクションすることが望ましい。しかし、マイクロインジェクションされた mRNA 量が卵が一定時間内に分解できる mRNA 量を超えてしまった場合、卵本来が行う分解を測定することができない。ゆえに、10 倍の希釈系列を用いて mRNA 濃度の条件検討を行った。その結果、0.02  $\mu\text{M}$  の場合において適切な分解が見られた。これは 0.01 pg/pl に相当し、マイクロインジェクションされた mRNA 量は約 0.1 pg であると概算できる。MII 期における total mRNA 量は約 0.7 pg であるので (Pikó et al., 1982)、マイクロインジェクションされた mRNA 量は total mRNA 量の約 14%となる。この 10 倍の濃度条件では約 140%の mRNA をマイクロインジェクションしたことになり、おそらく卵の分解能を超えてしまい、分解速度が低下したと考えられる。また、この 10 分の 1 の濃度条件ではリアルタイム RT-PCR における検出下限を下回ってしまう。今回設定した 0.02  $\mu\text{M}$  という濃度条件は、これ以上もこれ以下も検出不可能になってしまう、ごく狭い適正範囲内のものであろう。

これまで、MII 期の mRNA 量が GV 期に比べて少ないことから、GV 期から

MII 期にかけて起こる mRNA の大規模な分解は、卵成熟の開始と共に起こると考えられてきた。しかし本研究では、GV 期から MII 期に至るまでに起こる事象ごとの mRNA 量の変化を詳細に調べた結果、MII 期への進行と共に Mos などのある種の mRNA が急速に分解され始めることが明らかになった (Fig. 3)。また、これまで漠然と考えられてきた、卵成熟の開始と共に起こる大規模な mRNA の分解は検出されなかった。MII 期への進行と共に開始する分解を調節する機構として以下のような仮説が考えられる。GV 期以前から以降にかけて長らく安定だった mRNA は、MII 期の進行と共に活性化した mRNA 分解機構によって分解される。しかし、この分解に対する抵抗性は mRNA 種によって異なる。ある種の mRNA はこの分解に対して抵抗性を有する配列的因子をもち、ある種の mRNA は持たない。ゆえに、MII 期以降における mRNA 種による分解速度の違いが観測されるというものである (Fig. 9)。mRNA の安定性に与える 3' UTR の影響を調べた実験の結果、Hprt1 mRNA 3' UTR の前半部分に、分解に対して抵抗性を持つ因子が存在することが示された。この結果は上記仮説を支持するものである。

MII への進行から分解機構の活性までは、一体どのようなシグナル伝達系が用いられているのだろうか？MI 期から MII 期への移行には様々な分子が働いていることが知られている (Ohsumi et al., 2006)。 *Xenopus laevis* の卵では、MI 期から MII 期への移行に際して Erp1 のリン酸化レベルが上昇する。リン酸化された Erp1 は Cyclin B の分解を行う APC/C の活性を抑制し、MII 期への進行を促進する (Inoue et al., 2007)。また、Cdc2-Cyclin B 複合体は Aurora-A を活性化し、MII 期における紡錘体の形成を促進する (Maton et al., 2003)。一方、卵成熟における mRNA の調節機構についても様々な機構が知られている。*Drosophila* の卵成熟において、Aurora kinase は cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB) をリン酸化し、Maskin の eIF4E からの解離

と cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) の AAUAAA 配列への結合を促進させる。これら 2 つの反応は共に mRNA の翻訳を促進する (Kuersten et al., 2003)。このように、MII 期への移行と mRNA の調節における分子機構については様々な知見が得られており、中には共通の分子を用いた機構も存在することが知られている。マウス MII 期卵における mRNA の分解機構についても、MII 期への移行に関連した分子が作用しているかもしれない。

卵が減数分裂中に、減数分裂特異的遺伝子の mRNA の分解を始めることは興味深い。MII 期へ進行した後、MII 期の維持に必要な遺伝子である Mos の mRNA の分解が始まる。これはすなわち、MII 期はある程度の時間以上経過すると、その状態を維持する必要がないということかもしれない。老朽化した MII 期卵はヒストンアセチル化が異常になっており、このような卵は低い発生能を有する (Huang JC et al., 2007)。不要な着床は母体への負担ともなり、ゆえに卵にはある程度の寿命があらかじめ設定されているのかもしれない。

現在、研究によって得られた結果は限定的なものであるが、更なる選択的安定化因子の追求により、MII 期に起こる mRNA の分解機構について詳細な分子レベルでの知見が得られることが期待される。

## 謝辞

本論文を完成するにあたり、二年間の研究活動及び修士論文の作成を懇切丁寧にご指導頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科の青木不学准教授に心より感謝致します。また、研究全般において貴重なご助言を下さり、研究を支えて下さった東京大学大学院新領域創成科学研究科の永田昌男教授に深謝致します。

また、実験に際して技術のご指導をはじめ多くのご意見、ご助言を頂いた研究室の素晴らしい先輩方、共に協力し合い研究に打ち込んだ良きパートナーであり良きライバルであった井上梓君、菊田真吾君、曾根原弘樹君、湯川将之君、そして後輩諸君に感謝します。

最後に、研究生活に理解を示し支援して頂いた両親と、先端生命科学専攻の仲間たちに感謝いたします。皆様、本当にありがとうございました。

## 参考文献

Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z. 1995. Cooperative interactions between extracellular matrix, integrins and parathyroid hormone-related peptide regulate parietal endoderm differentiation in mouse embryos. *Development* 121: 4137-4148.

Chen CY, Shyu AB. 1995. AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20:465-470.

Huang JC, Yan LY, Lei ZL, Miao YL, Shi LH, Yang JW, Wang Q, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY. 2007. Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. *Biol Reprod.* 77(4):666-70.

Inoue D, Ohe M, Kanemori Y, Nobui T, Sagata N. 2007. A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446 (7139): 1100-1104.

Kuersten S, Goodwin EB. 2003. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet.* 4(8):626-37.

Maton G, Thibier C, Castro A, Lorca T, Prigent C, Jesus C. 2003. Cdc2-cyclin B triggers H3 kinase activation of Aurora-A in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 278(24): 21439-49.

Ohsumi K, Yamamoto TM, Iwabuchi M. 2006. Oocyte extracts for the study of meiotic M-M transition. *Methods Mol Biol.* 2006;322:445-58.

Pikó L, Clegg KB. 1982. Quantitative Changes in Total RNA, Total Poly(A), and Ribosomes in Early Mouse Embryos. *Developmental Biology* 89: 362-378.

Quinn P, Begley AJ. 1984. Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci* 37: 147-152.

Rajkovic A, Matzuk MM. 2002. Functional analysis of oocyte-expressed genes using transgenic models. *Mol Cell Endocrinol* 187: 5-9.

Rambhatla L, Patel B, Dhanasekaran N, Latham KE. 1995. Analysis of G protein alpha subunit mRNA abundance in preimplantation mouse embryos using a rapid, quantitative RT-PCR approach. *Mol Reprod Dev* 41: 314-324.

Robson P, Stein P, Zhou B, Schultz RM, Baldwin HS. 2001. Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 234: 317-329.

Schultz RM. 1993. Regulation of zygote gene activation in the mouse. *Bioessays* 15: 531-538.

Surdej P, Jacobs-Lorena M. 1998. Developmental regulation of bicoid mRNA stability is mediated by the first 43 nucleotides of the 30 untranslated region. *Mol Cell Biol* 18:2892-2900.

Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127: 4147-4156.

Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: Homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128: 655-664.

Zohreh A, Kageyama S, Aoki F. 2005. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos : selective degradation of specific mRNA after fertilization. *Mol Reprod Dev* 72: 281-290.

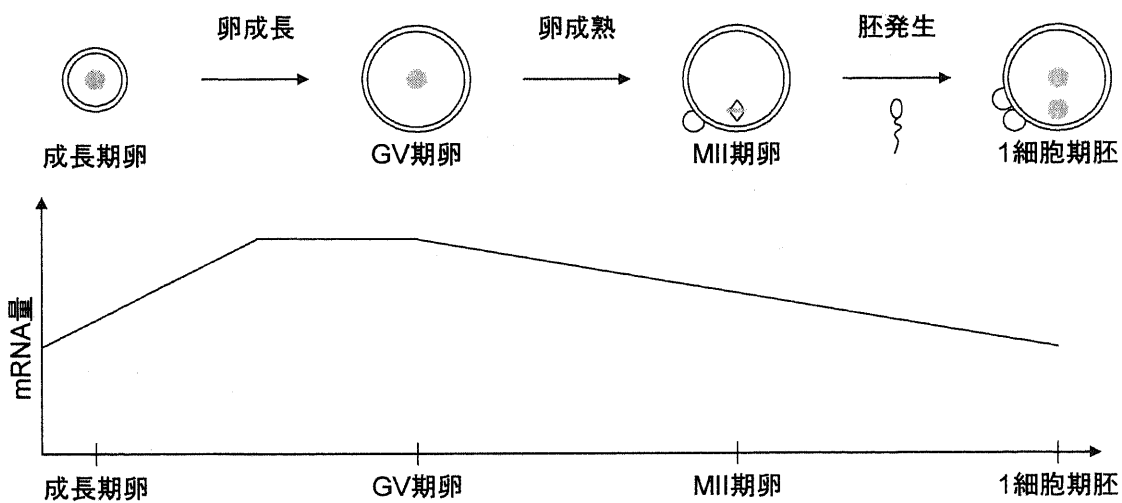


Fig. 1. 卵成長から初期胚発生の過程と mRNA 量の変遷

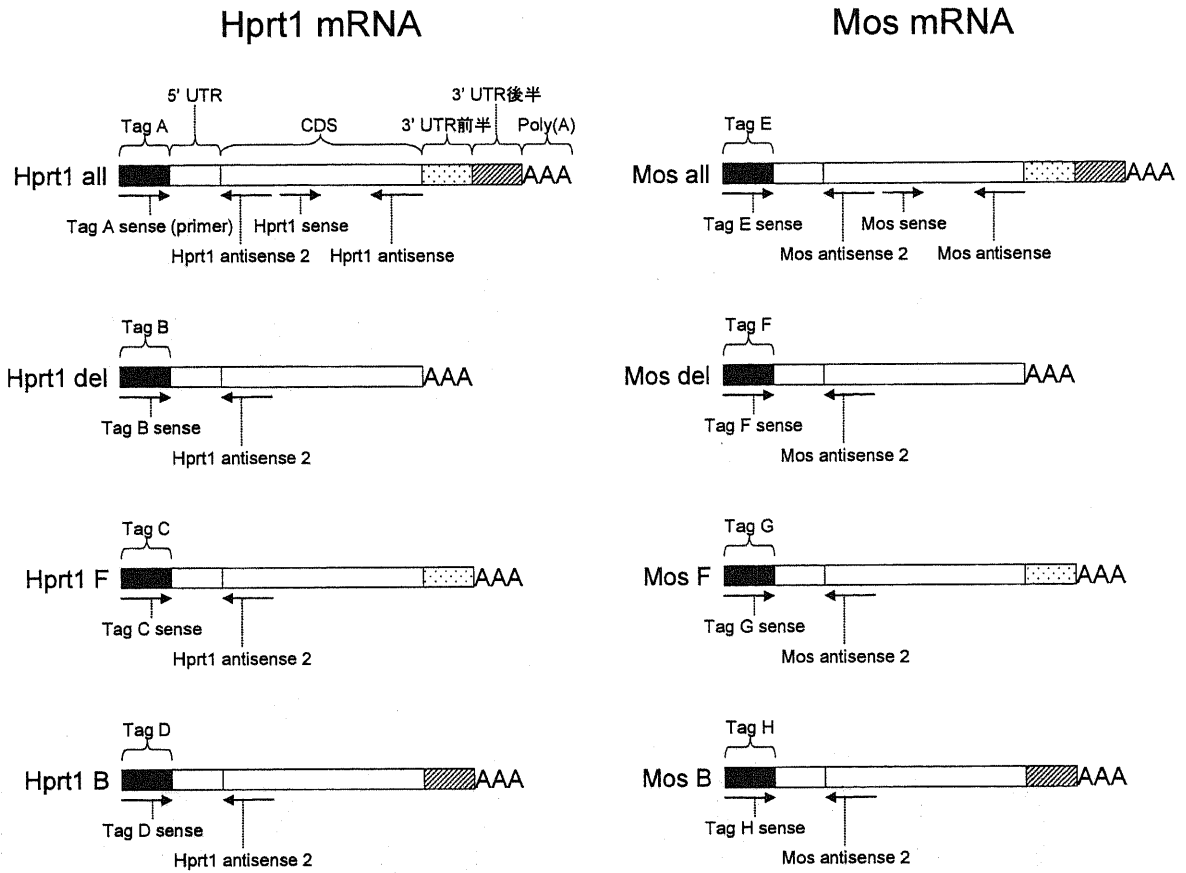


Fig. 2. マイクロインジェクションに用いた mRNA



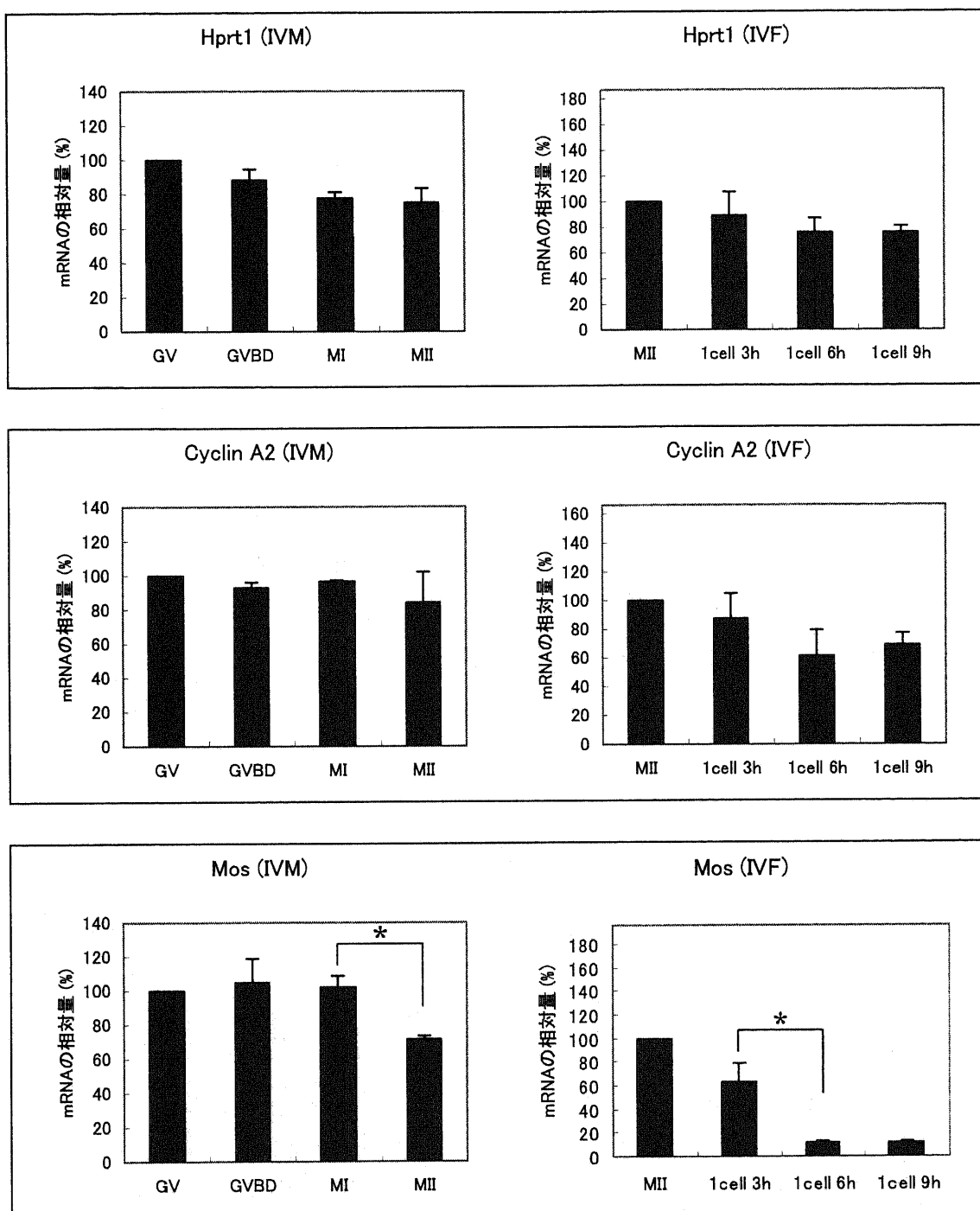


Fig. 3. 受精前後における mRNA 量の変化 (1)

In vitro での成熟系 (IVM) において、培養開始直後 (GV)、GVBD を起こした約 2 時間後 (GVBD)、MI 期に進行した約 2 時間後 (MI)、MII 期に進行した約 2 時間後 (MII) にサンプリングを行った。In vitro での受精系 (IVF) において、培養開始直後 (MII)、MII 期を終了した約 2 時間後 (1cell 3h)、前核形成から約 2 時間後 (1cell 6h)、DNA 複製開始から約 2 時間後 (1cell 9h) にサンプリングを行った。各遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR により測定し、それぞれ培養開始直後の値を 100% とした。実験はそれぞれ 3 回ずつ行い、各実験においては 2 連のサンプルを採取した。エラーバーは標準誤差を示す。

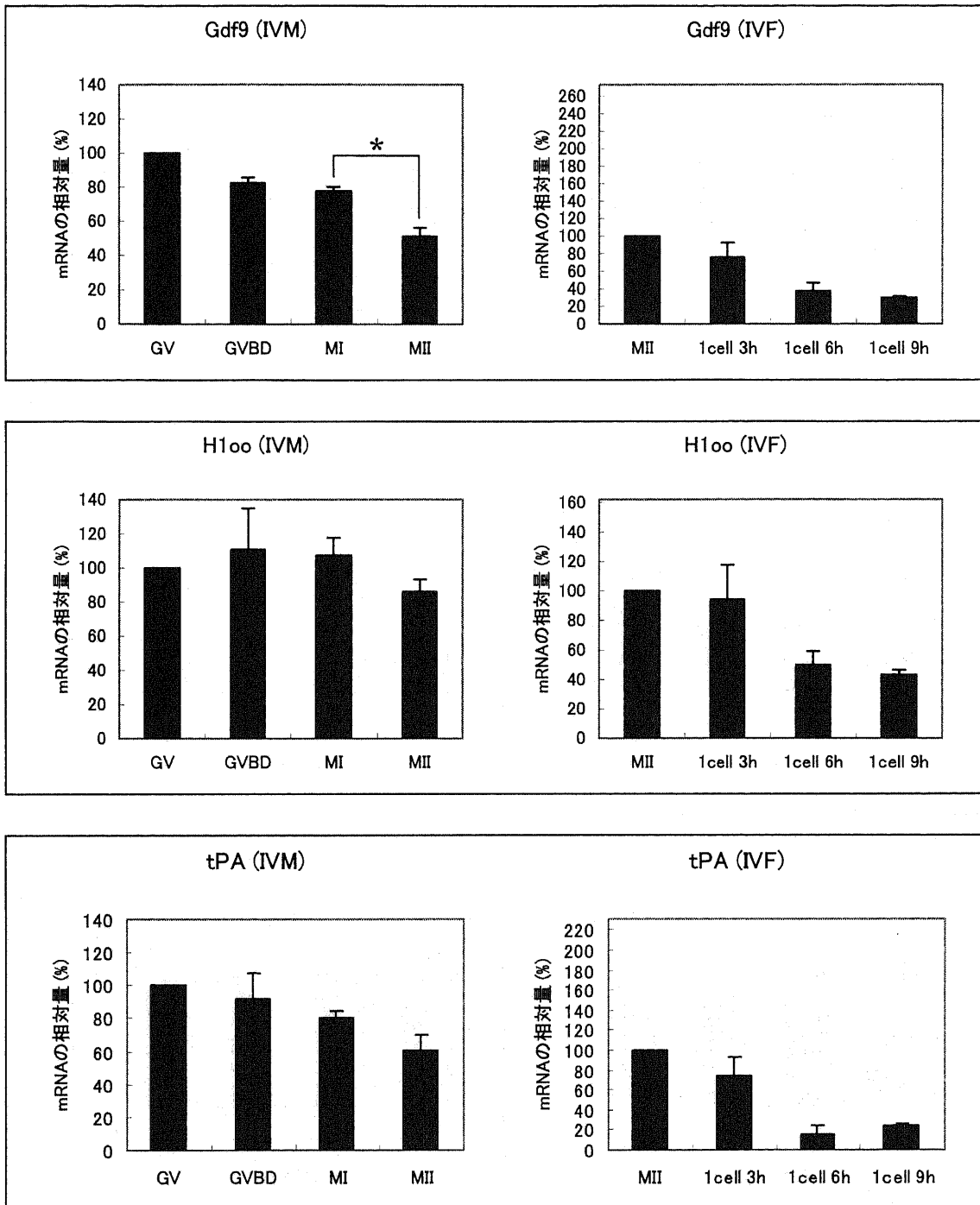


Fig. 3. 受精前後における mRNA 量の変化 (2)

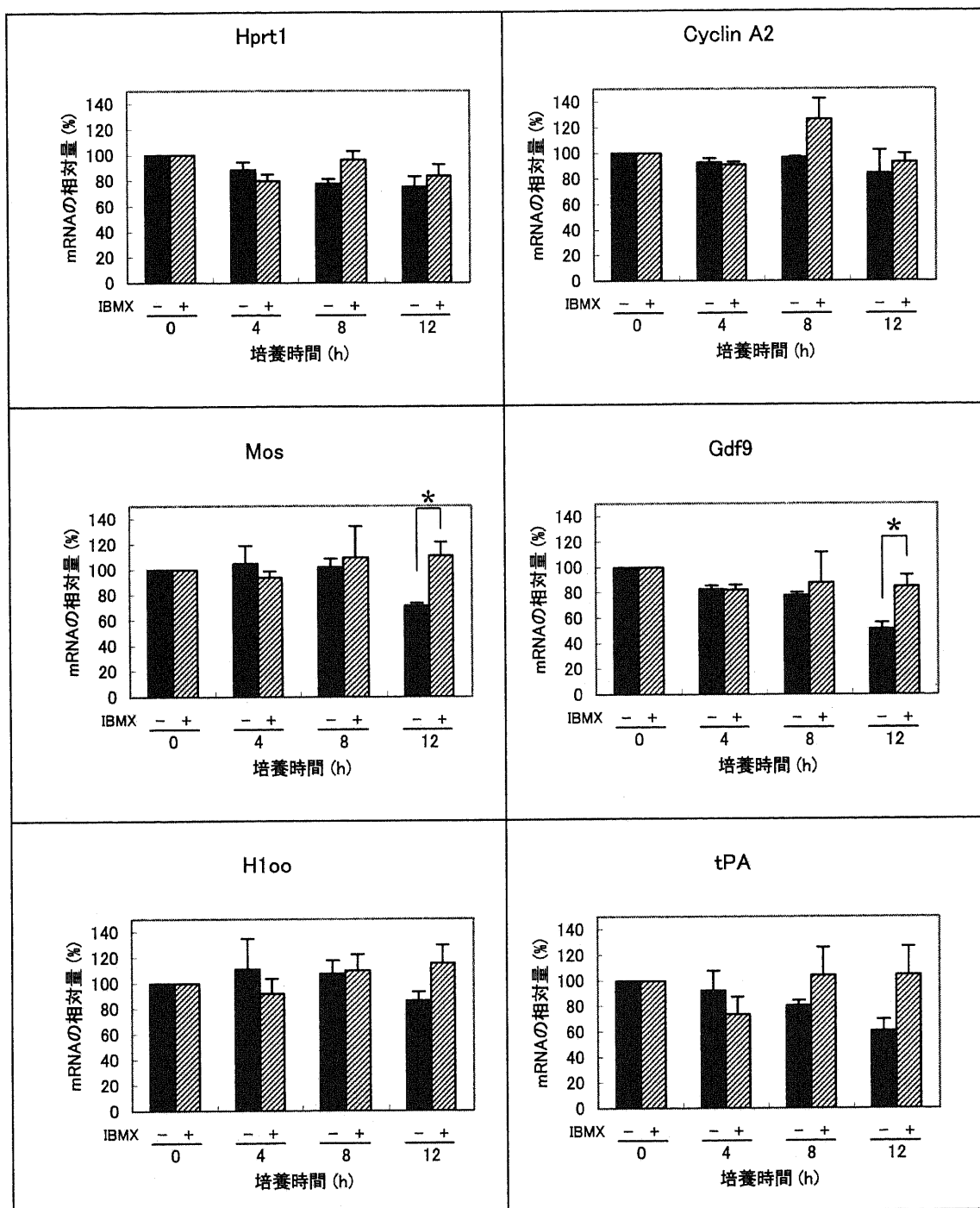


Fig. 4. mRNA の分解に対する卵成熟の影響

採取した GV 期卵を IBMX の存在下、非存在下でそれぞれ培養し、培養開始後 0、4、8、12 時間後にサンプリングを行った。IBMX 非存在下での培養開始後 4 時間では GVBD の、8 時間では MI 期への進行の、12 時間では MII 期への進行の影響を見ている。各遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR により測定し、それぞれ培養開始直後の値を 100% とした。実験はそれぞれ 3 回ずつ行い、各実験においては 2 連のサンプルを採取した。エラーバーは標準誤差を示す。

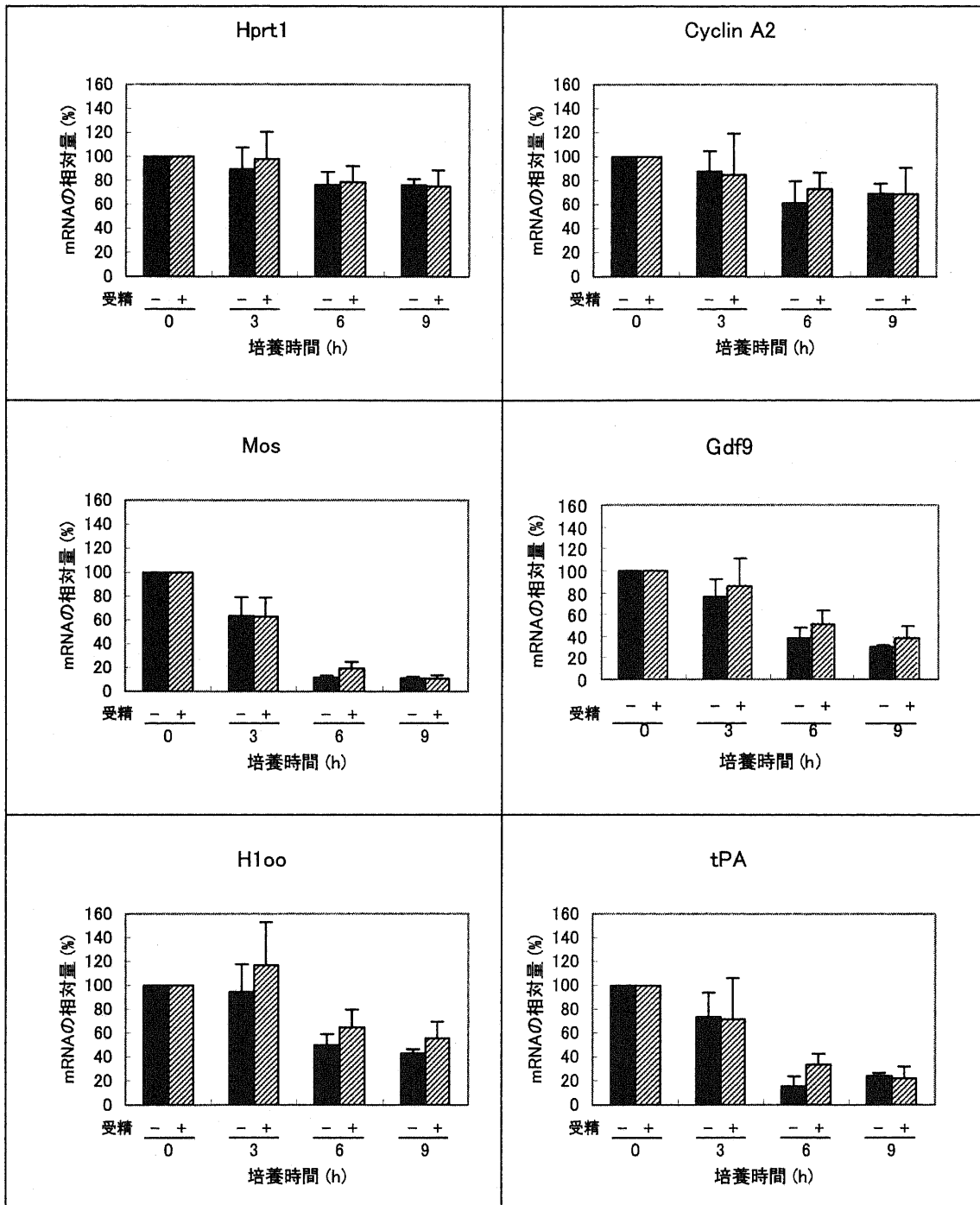


Fig. 5. mRNA の分解に対する受精の影響

採取した MII 期卵に媒精を行ったものを行っていないものをそれぞれ培養し、培養開始後 0、3、6、9 時間後にサンプリングを行った。受精卵の培養開始後 3 時間では MII 期終了の、6 時間では前核形成の、9 時間では DNA 複製開始の影響を見ている。各遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR により測定し、それぞれ培養開始直後の値を 100%とした。実験はそれぞれ 3 回ずつ行い、各実験においては 2 連のサンプルを採取した。エラーバーは標準誤差を示す。

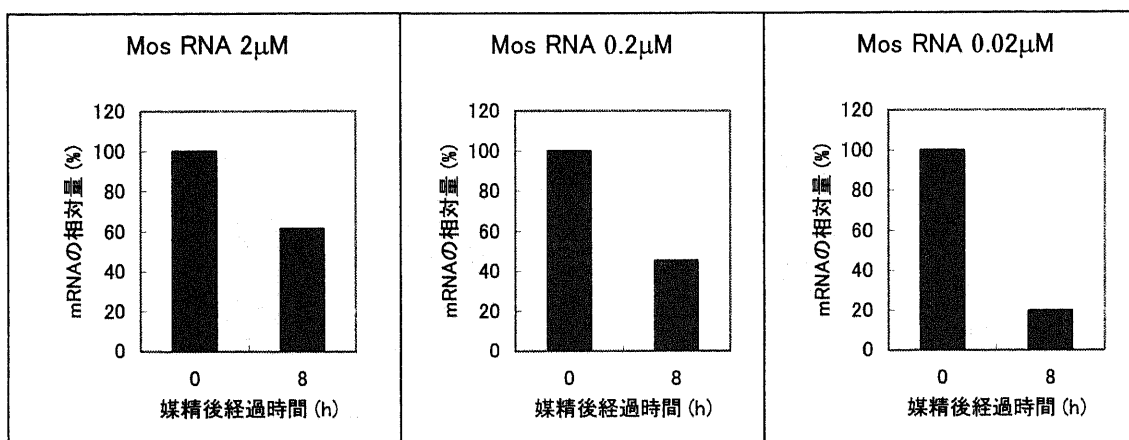


Fig. 6. マイクロインジェクションにおける mRNA 濃度の条件検討

MII 期卵への Mos mRNA の 10 倍の希釈系列のマイクロインジェクションを行い、受精前後における量の変化をリアルタイム RT-PCR により測定した。それぞれ培養開始直後の値を 100%とした。

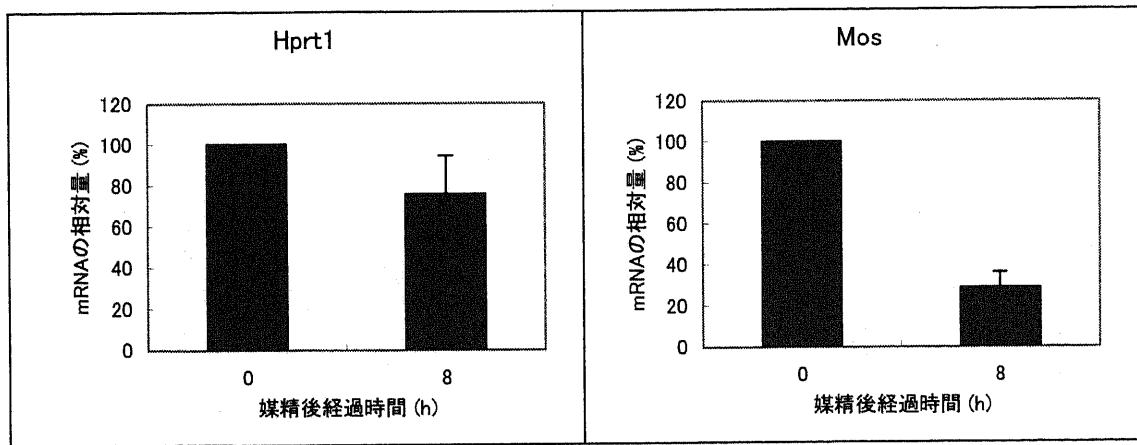
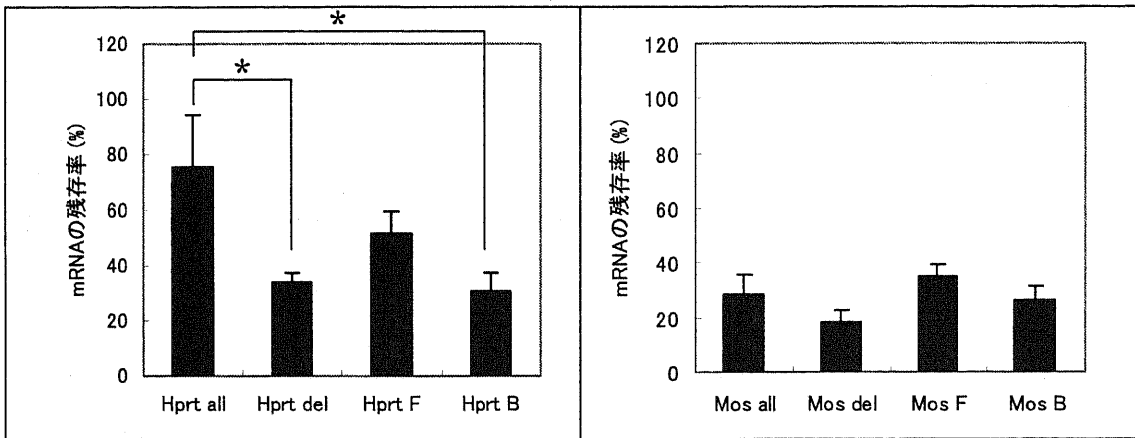


Fig. 7. マイクロインジェクションにおける外来性 mRNA 量の変化

MII 期卵への Hprt1 と Mos mRNA のマイクロインジェクションを行い、それぞれの受精前後における量の変化をリアルタイム RT-PCR により測定した。それぞれ培養開始直後の値を 100% とした。実験は Hprt1 については 4 回行い、Mos については 5 回行った。各実験においては 2 連のサンプルを採取した。エラーバーは標準誤差を示す。



**Fig. 8. mRNA の安定性に対する 3' UTR 欠失の影響**

Hprt と Mos mRNA (Fig. 1, Hprt all, Mos all) の 3' UTR のすべてを (Hprt del, Mos del)、または後半のみを (Hprt F, Mos F)、または前半のみを (Hprt B, Mos B) 欠失した mRNA の分解を調べた。MII 期卵へそれぞれの mRNA をマイクロインジェクションし、受精後 8 時間での量の変化をリアルタイム RT-PCR で測定した。それぞれ培養開始直後の値を 100%とした。実験は Hprt all については 4 回、Hprt del については 5 回、Hprt F については 8 回、Hprt B については 8 回、Mos all については 5 回、Mos del については 4 回、Mos F については 9 回、Mos B については 9 回行った。各実験においては 2 連のサンプルを採取した。エラーバーは標準誤差を示す。

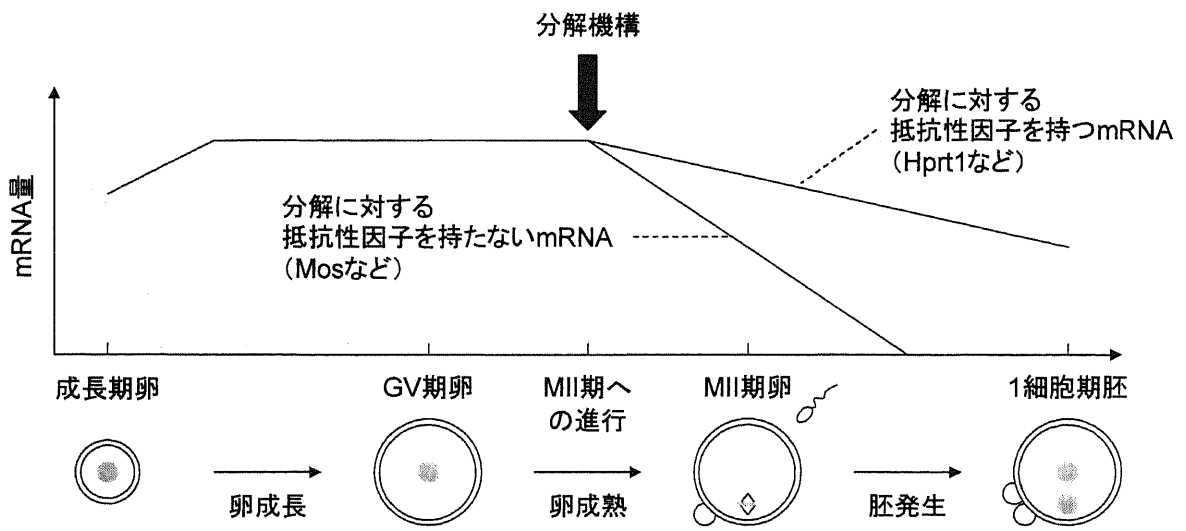


Fig. 9. mRNA の選択的安定化機構



Table 1. リアルタイム RT-PCR におけるプライマーの配列と反応条件

プライマー	配列	アニーリング 温度 (°C)	蛍光測定 温度 (°C)
Hprt1 sense	5'-AAACTTTGCTTTCOCTGGTTA-3'	50.6	78.1
Hprt1 antisense	5'-AGGCTTTGTATTTGGCTTTTC-3'		
Cyclin A2 sense	5'-GAGGTGGGAGAAGAATATAA-3'	50.2	78.4
Cyclin A2 antisense	5'-ACTAGGTGCTCCATTCTCAG-3'		
Mos sense	5'-CTCCGGAGATCCTGAAAGGA-3'	55.4	82.4
Mos antisense	5'-CAGTGTCTTCCAGTCAGGG-3'		
Gdf9 sense	5'-TGAGATTGATGTGACCTCCC-3'	53.3	82.8
Gdf9 antisense	5'-AGTAGCTTCCTCTTTCACGG-3'		
H1oo sense	5'-GATGGAGAAAGGGCAGAAGA-3'	53.3	82.2
H1oo antisense	5'-ATTTGCTTCTTGCCTGCTCC-3'		
tPA sense	5'-TACCACGGAGTTCTGTAGCA-3'	53.3	82.8
tPA antisense	5'-GTGAGGTGATGTCTGTGTAG-3'		
Tag A sense	5'-TGGAATTCGCCCTTTACCT-3'	51.3	85.0
Hprt1 antisense 2	5'-AACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'		
Tag B sense	5'-CAGAATTCGCCCTTTACCT-3'	51.3	85.0
Hprt1 antisense 2	5'-AACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'		
Tag C sense	5'-CTGGCACAGTTGATTACTAG-3'	51.3	85.2
Hprt1 antisense 2	5'-AACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'		
Tag D sense	5'-GACTGAATGATCGATGTTGC-3'	51.3	85.2
Hprt1 antisense 2	5'-AACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'		
Tag E sense	5'-CAGAATTCGCCCTTATGTGGC-3'	55.4	78.9
Mos antisense 2	5'-GCGAAGGCATTACACCCTCA-3'		
Tag F sense	5'-CAGAATTCGCCCTTATGTGGC-3'	55.4	78.9
Mos antisense 2	5'-GCGAAGGCATTACACCCTCA-3'		
Tag G sense	5'-GCTATATGAGCAACAAGTCG-3'	51.3	79.0
Mos antisense 2	5'-GCGAAGGCATTACACCCTCA-3'		
Tag H sense	5'-CAGATTAGATCGTACGCATC-3'	51.3	79.0
Mos antisense 2	5'-GCGAAGGCATTACACCCTCA-3'		
Rabbit globin sense	5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'	53.3	85.9
Rabbit globin antisense	5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'		

Table 2. 外来性 mRNA 特異的検出プライマーの検証

プライマー	Ct 値 (Cycle)	
	内在性 mRNA	内在性 mRNA + 外来性 mRNA
Hprt1 sense		
Hprt1 antisense	24.94	21.32
Tag A sense		
Hprt1 antisense 2	34.41	25.42
Tag B sense		
Hprt1 antisense 2	35.99	24.44
Tag C sense		
Hprt1 antisense 2	36.99	26.31
Tag D sense		
Hprt1 antisense 2	36.52	25.81
Mos sense		
Mos antisense	23.95	22.32
Tag E sense		
Mos antisense 2	35.11	23.78
Tag F sense		
Mos antisense 2	32.31	24.74
Tag G sense		
Mos antisense 2	34.74	25.6
Tag G sense		
Mos antisense 2	32.65	23.11