

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21397

研究課題名（和文）同一遺伝子座から翻訳される2種の新規ポリペプチドによる精子形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of spermatogenesis by two novel polypeptides translated from the same locus

研究代表者

松本 有樹修（Matsumoto, Akinobu）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60741519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは、long non-coding RNAと思われていたRNAから翻訳される新規ポリペプチドである、KastorとPolluksを同定した。これらはどちらもVDAC3と非常に強く結合しており、KastorとPolluks欠損するマウスは雄性不妊を示した。われわれはin vitro current trace assayなどを用いて、KastorとPolluksがVDAC3のチャネル活性に影響するかどうか検討したが、VDAC3のチャネル活性には影響しなかった。これらの結果より、Kastor/PolluksはVDAC3のチャネル活性以外の機能を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでlong non-coding RNAと思われていたRNAが、実はKastorとPolluksという2種類の新規ポリペプチドを産生し、それらが精子ミトコンドリアの形態制御を担っていることを明らかにした。KastorとPolluksは共にヒトを含む哺乳類に広く保存されており、これらの生物では、共通した機能を持つと考えられる。精巣特異的な遺伝子の機能解析は、男性不妊の原因解明だけでなく、これらを標的とした避妊薬の開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：We identified two novel polypeptides, Kastor and Polluks, which are translated from RNAs that were thought to be long non-coding RNAs. Both of them bind strongly to VDAC3, and mice lacking Kastor and Polluks show male infertility. We examined whether Kastor and Polluks affect the channel activity of VDAC3 using in vitro current trace assays and other methods, but found no effect on VDAC3 channel activity. These results suggest that Kastor/Polluks regulate functions other than channel activity of VDAC3.

研究分野：分子生物学

キーワード：Long non-coding RNA ポリペプチド 精子

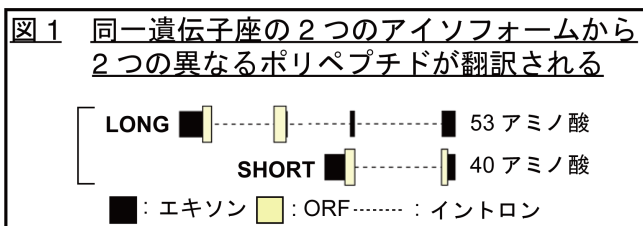
1. 研究開始当初の背景

【われわれは一部の lncRNA が翻訳されていることを明らかにした】

Long non-coding RNA (lncRNA) と呼ばれるタンパク質をコードしない長鎖 RNA が大量に存在することが明らかとなったが、多くの lncRNA からは 100 アミノ酸以下の小さな ORF の存在が推測されている。そこでわれわれは質量分析計を用いて解析を行ったところ、lncRNA と思われていた RNA から翻訳される新規ポリペプチドを多数同定した [Matsumoto et al., Nature 541: 228-232 (2017)]。われわれの解析の結果、lncRNA として登録されている RNA の一部は、non-coding RNA ではなく coding RNA であるということが分かった。

【新規精子特異的ポリペプチドの同定：同一遺伝子座から 2 つの異なるポリペプチドが翻訳され、どちらも VDAC と非常に強く結合する】

lncRNA の多くが精子特異的に発現していることが知られているため、in silico 解析を用いた精子特異的な新規ポリペプチドのスクリーニングを行い、多数の新規ポリペプチドを同定することに成功した。その中から、同一遺伝子座の第 1 エキソンが異なる 2 つのアイソフォームから翻訳される 2 つの新規ポリペプチドに着目して解析を進めていくことにした (図 1)。これらポリペプチドはアミノ酸配列が全く異なるにも関わらず、どちらもミトコンドリアの外膜に局在する Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) と非常に強く結合していた。



【ノックアウトマウスのオスは精子のミトコンドリア形態異常により不妊となる】

VDAC は哺乳類では 3 種類のアイソフォーム (VDAC1~3) が存在し、VDAC3 欠損マウスは精子ミトコンドリアの形態異常により雄性不妊になることが知られている [Sampson M. J. et al., J. Biol. Chem. (2001)]。そこで、2 つの新規ポリペプチドを両方欠損するマウスを作製したところ顕著な雄性不妊が見られ、この変異マウス由来の精子は VDAC3 欠損精子と類似したミトコンドリアの形態異常を示した。次に、新規ポリペプチドをそれぞれ単独で欠損したマウスを作製したところ、2 重欠損より弱い表現型ではあるが、どちらのポリペプチドを欠損しても受精能が低下したことから、これらポリペプチドは協調的に VDAC を制御していることが考えられる。

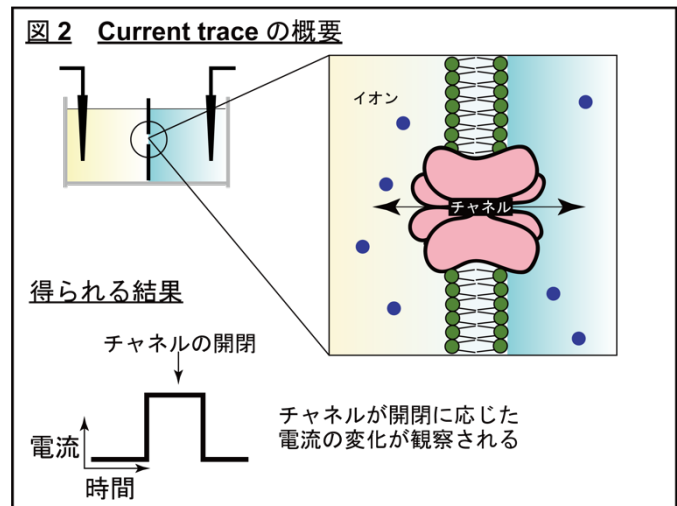
2. 研究の目的

以上の結果より、精子形成に必須な 2 つの VDAC 結合新規ポリペプチドを同定した。本課題では、この新規ポリペプチドが VDAC をどのように制御しているのかという詳細な分子機構を (1) In vitro current trace assay と、(2) 結晶構造解析を行うことにより明らかにしていく。

3. 研究の方法

【In vitro current trace assay によりチャンネルの開閉に与える影響を検討する】

チャンネルとして機能する VDAC は膜電位依存的に開閉することが知られており、この現象は in vitro で再構成することができる(図2)。穴の空いた遮蔽板で左右の部屋を区切り、それぞれに電極を繋いでおく。遮蔽板の穴に脂質の膜を張ってから VDAC を埋め込むと、VDAC の開閉による電流の変化を計測することが可能となる(図2)。この方法を用いて、新規ポリペプチドが VDAC の開閉にどのような影響を与えるかを検討する。



【結晶構造解析を行いポリペプチドの結合で VDAC の構造がどのように変化するかを検討する】

理化学研究所の白水研などのグループにより、VDAC の立体構造が明らかとなっている [Hosaka et al., Protein Sci. (2017)]。そこで、白水研との共同研究により、新規ポリペプチドが結合した VDAC の結晶構造解析を行う。ポリペプチドがそれぞれ VDAC のどの領域に結合し、結合により VDAC の構造がどのように変化するかなどを明らかにしていく。

4. 研究成果

まずわれわれは、同定された新規ポリペプチドを、双子座の星の名前に由来する、Kastor と Polluks という名をつけた。われわれは in vitro current trace assay、さらに in vitro liposome assay も行い、Kastor と Polluks が VDAC3 のチャンネル活性に影響するかどうか検討したが、Kastor と Polluks の有無は VDAC3 のチャンネル活性には影響しなかった。さらに Kastor/Polluks ノックアウトマウスを用いて精子のミトコンドリアの代謝活性やカルシウム濃度、mPTP の形成など多様な解析を行ったが、いずれにおいても優位な差は検出されなかった。これらの結果より、Kastor/Polluks は VDAC3 のチャンネル活性以外の機能を制御することにより、精子の形成に寄与することが示唆された。

また、Kastor/Polluks と VDAC の共結晶の構造解析により、VDAC3 の内腔にポリペプチドらしき電子密度が観察されたが、あまり精細な構造は得られなかった。今後、より詳細な結果を得るために、さらに精密な条件検討を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mise Shintaro, Matsumoto Akinobu, Shimada Keisuke, Hosaka Toshiaki, Takahashi Masatomo, Ichihara Kazuya, Shimizu Hideyuki, Shiraishi Chisa, Saito Daisuke, Suyama Mikita, Yasuda Tomoharu, Ide Toru, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Kimura-Someya Tomomi, Shirouzu Mikako, Miyata Haruhiko, Ikawa Masahito, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28677-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 Long non-coding RNAの翻訳
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------