

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450514

研究課題名(和文) 哺乳類精巣リボソームの構造不均一性がもたらす新規翻訳制御メカニズムの包括的解明

研究課題名(英文) Structural heterogeneity of mammalian testis ribosomes: comprehensive analysis for new mechanisms of translational control

研究代表者

灘野 大太 (NADANO, Daita)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00228074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はプロテオミクス的手法によるげっ歯類リボソームの網羅的解析を行い、組織や細胞内環境によってリボソームの構成因子の一部が変化するリボソームの構造不均一性の存在を示した。さらなるげっ歯類精巣リボソームの解析から、ジンクフィンガータンパク質Lyarを新たな不均一性因子として同定した。またウサギ網状赤血球溶解液を用いたin vitro翻訳実験において、Lyarは翻訳促進効果を示した。本研究からLyarを含む不均一性因子の翻訳調節への関与が推察された。

研究成果の概要(英文)：Our proteomic analysis of rodent cytoplasmic ribosomes revealed their structural heterogeneity. This analysis identified a zinc finger protein, Lyar, in testicular ribosomes. Lyar was suggested to be included in the 60S large subunit, but not in polysomes, by ultracentrifugation of testicular ribosomes. Furthermore, translation was increased by Lyar in vitro, pointing out the involvement of this protein in translation. Overall, our data in this study (including unpublished ones) are expected to make a connection between ribosome heterogeneity and translational control.

研究分野：哺乳類の分子生体制御学

キーワード：リボソーム 翻訳 発現制御

### 1. 研究開始当初の背景

リボソームはすべての細胞において翻訳を担う巨大 RNA-タンパク質複合体である。進化的に保存された開始・伸長・終結からなる基本的な翻訳反応はよく知られている。しかしながら、これらを制御するメカニズムについて不明な点が多い。たとえば、その構成成分の一部を替えたりリボソームが一群の mRNA を選択的に認識し、特異的な翻訳を開始することが提唱された(リボソームフィルター仮説)。また、タンパク質の新規合成途中でのフォールディングによる翻訳の高効率化にリボソームタンパク質を含む未知の因子の関与が予言されるなど、新たな翻訳制御機構が推察された。しかしこうした知見に基づく分子レベルでの解明は不十分と判断せざるを得ない状況にあった。

### 2. 研究の目的

翻訳におけるリボソームの機能制御は、その一部構造の違い、すなわち細胞・組織レベルでみた場合、リボソームの構造上の不均一性によって支えられているはずであるが、その実体や重要性は不明なままである。我々は齧歯類のリボソームの解析から、構成タンパク質の違いに起因する構造の違い、すなわちに哺乳類リボソームにおける構造不均一性を提唱した。上述の学術的問題を踏まえた哺乳類精巣リボソームの構造不均一性の更なる解析を本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

齧歯類(主にマウス)精巣からのリボソームの調製法およびショ糖密度勾配超遠心法を用いたリボソームのプロフィール解析については我々のグループの既報に従った[1,2]。リボソーム不均一性構造解析のためのリボソーム構成タンパク質の電気泳動法については RFHR 二次元電気泳動法を我々が哺乳類リボソーム分析用に改変した方法を用いた。スポットからのタンパク質同定には MALDI-TOF 質量分析法およびタンデム質量分析法を併用して行った[2,3]。

各種培養細胞の培養法は基本的に既報に準拠した。また、細胞へのベクター DNA 導入をリポフェクションにより行った。細胞増殖については MTT アッセイの変法を用いて解析した。

マウス組織およびヒトがん細胞株からの全 RNA の単離および cDNA の調製は常法に従った。新たに同定された Lyar の cDNA のコード領域をマウス精巣 cDNA から PCR 法によって増幅し、各種発現ベクターにクローニングした。またヒト組織・細胞における Lyar の網羅的発現解析のため、市販の cDNA パネルを使用した。

免疫プロットティング、培養細胞の蛍光抗体

法による観察および細胞分画法については既報[1]に従って行った。組織染色においては凍結切片作製法[4]を利用した。これらの方法における Lyar の検出のため、同タンパク質の組換えタンパク質を調製しこれを免疫元としたウサギ抗 Lyar 抗体を作製した。

In vitro (試験管内) 翻訳実験にはウサギ網状赤血球溶解液の系を用い、蛍光標識リジンを翻訳産物に取り込ませ、その蛍光ラベルされた産物をイメージスキャナーを用いて検出・定量した。

### 4. 研究成果

成熟したオスが生涯にわたって精子を作り続ける精巣においては、比較的未分化な細胞の増殖期から減数分裂を経て成熟完全変態した精子の形成まで、複雑な遺伝子制御が行われているとされる。その分子機構の全体像の理解が完全にはほど遠いため、マウスの精巣を用いて、リボソームの精製および不均一性の解析を行った[4]。まず哺乳類のリボソームには、原核生物のような解析の進んでいるリボソームに比べ強塩基性で低分子量の構成タンパク質性因子が多いことが示唆された。よってこれらをもれなく解析し高精度で同定するための解析系を、構成因子の高度な分離を含む電気泳動分析系を含むシステムとした。この系を用いて上述の哺乳類精巣リボソームに含まれるタンパク質を網羅的に分析した。その結果、既知のリボソームタンパク質が高度なレベルで同定されただけでなく、リボソームの不均一性因子と推定される新規タンパク質性候補因子の発見に成功し解析を進めた。

解析例としてを新たな不均一性因子として同定されたジンクフィンガータンパク質 Lyar (図1)について以下記述する[5]。正常組織における Lyar の発現は精巣特異的であり、成体精巣の免疫組織染色において翻訳亢進状態にある精母細胞から円形精子細胞に Lyar の発現が観察された。この分析からは核小体を含む核内での Lyar の発現が認められるのみであったが、生化学的な細胞分画法により、核画分に加えてリボソームを含む細胞質画分に Lyar が検出された。さらに精巣リボソームのプロフィール解析から、Lyar が 60S サブユニットに含まれリボソームには含まれないことが示された(図2)。Lyar が細胞増殖を促進するというこれまでの報告を踏まえ、以下の2種類の実験を行い新たな知見が得られた。(1)ウサギ網状赤血球溶解液を用いた in vitro 翻訳実験において、Lyar の組換えタンパク質は翻訳促進効果を示した(図3)。(2)Lyar は多様な臓器由来のヒトがん細胞株に発現し、これらの細胞においても細胞質リボソームに含まれることが示唆された。したがって、Lyar には翻訳開始における調節因子としての機能が推察さ

れ、翻訳を介した新規発がん機構に結びつくことが期待される [6]。

未発表のものを含め、Lyar 以外にリボソムの不均一性を担うと推定される新規因子が本研究において同定された。これらの包括的な解析を今後とも進めていく予定である。

< 図 > 以下の図は文献 [5] より出版元の許諾を得て掲載。

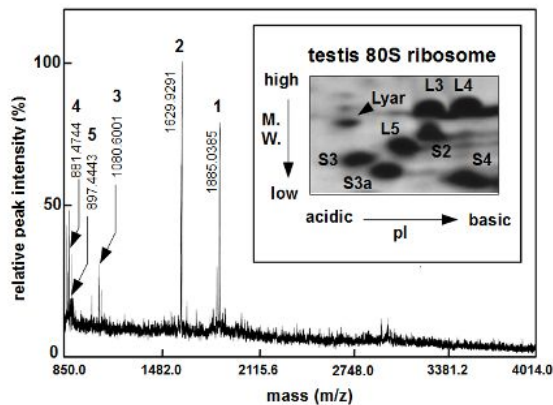


図1 精製リボソームにおける Lyar の質量分析による同定。二次元電気泳動における Lyar のスポットを挿入図に示す。

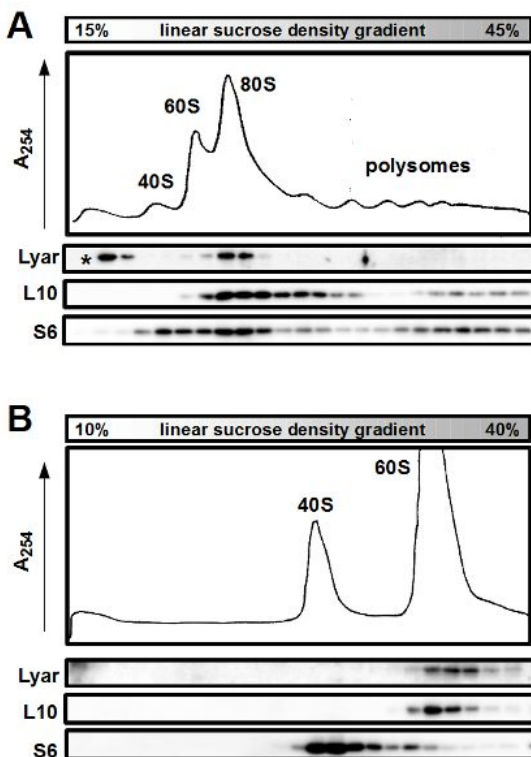


図2 リボソームにおける Lyar の局在解析。(A)精製リボソームをショ糖密度勾配超遠心法および免疫プロット法によって解析した。(B)リボソームサブユニット解離処理後の解析。

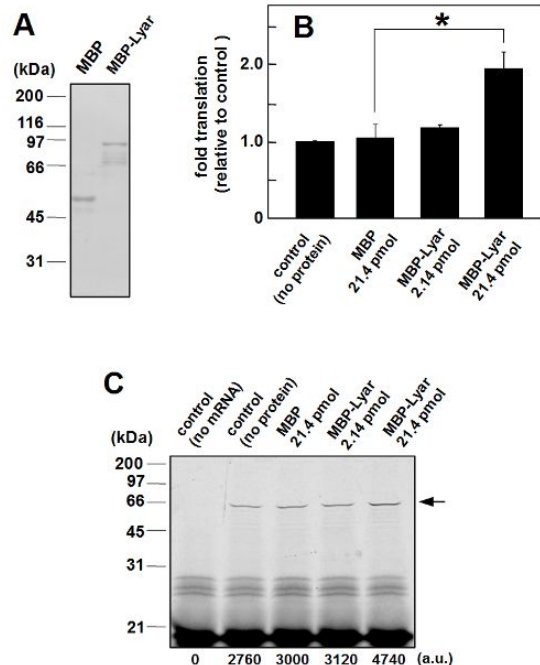


図3 Lyar の翻訳促進機能 (A)組換え Lyar タンパク質の調製。(B)組換えタンパク質を用いた in vitro 翻訳実験。(C) (B)の実験データの一例。

< 引用文献 >

Miyoshi, M., Okajima, T., Matsuda, T., Fukuda, M. N., and Nadano, D. Bystin in human cancer cells: intracellular localization and function in ribosome biogenesis. *Biochem. J.*, **404** (3): 373-381, 2007.

Sugihara, Y., Honda, H., Iida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *J. Proteome Res.*, **9** (3): 1351-1366, 2010..

Taga, Y., Miyoshi, M., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B as a cytoplasmic mRNA-binding protein in early involution of the mouse mammary gland. *Cell Biochem. Function*, **28** (4): 321-328, 2010

Sugihara, Y., Sadohara, E., Yonezawa, K., Kugo, M., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. Identification and expression of an autosomal paralogue of ribosomal protein S4, X-linked, in mice: Potential involvement of testis-specific ribosomal proteins in translation and

spermatogenesis. *Gene*, **521** (1): 91-99, 2013.

Yonezawa, K., Sugihara, Y., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. Lyar, a cell growth-regulating zinc finger protein, was identified to be associated with cytoplasmic ribosomes in male germ and cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **395** (1-2): 221-229, 2014.

灘野大太・杉原圭彦：ふぞろいなリボソームの発見とその役割 新たな翻訳制御・癌化メカニズムとしての構造不均一性．*化学と生物*, **54** (2): 77-79, 2016 .

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

灘野大太・杉原圭彦：ふぞろいなリボソームの発見とその役割 新たな翻訳制御・癌化メカニズムとしての構造不均一性．*化学と生物*, **54** (2): 77-79, 2016. URL: <https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=522>

Yonezawa, K., Sugihara, Y., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. Lyar, a cell growth-regulating zinc finger protein, was identified to be associated with cytoplasmic ribosomes in male germ and cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **395** (1-2): 221-229, 2014. DOI: 10.1007/s11010-014-2128-x

Sugihara, Y., Sadohara, E., Yonezawa, K., Kugo, M., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. Identification and expression of an autosomal paralogue of ribosomal protein S4, X-linked, in mice: Potential involvement of testis-specific ribosomal proteins in translation and spermatogenesis. *Gene*, **521** (1): 91-99, 2013. DOI: 10.1016/j.gene.2013.02.040

[学会発表](計 1件)

米澤佳保里・杉原圭彦・大島健司・松田幹・灘野大太：細胞増殖促進タンパク質 Lyar のリボソーム不均一性因子としての同定 第3回リボソームミーティング 2015年3月(宮崎県・宮崎市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~molreg00/translation.html>

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

灘野 大太 (NADANO, Daita)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：00228074