

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08630

研究課題名(和文) 選択的mRNA核外輸送による雄性生殖細胞分化制御機構

研究課題名(英文) Regulation of male germ cell differentiation by selective mRNA export

研究代表者

片平 じゅん (Katahira, Jun)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30263312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：選択的mRNA核外輸送による雄性生殖細胞分化・維持の制御機構を明らかにするため、精原細胞におけるmRNA核外輸送受容体TapおよびNxf2により輸送されるmRNA種の同定を試みた。Nxf2およびTapとRNA塩基修飾酵素の融合タンパク質の機能を培養細胞を用いた実験系で検証した。また、融合タンパク質を発現するマウス作成のため、それぞれのTGを保有するES細胞を樹立した。さらにTGマウスを複数ライン作成したが、精巣組織において解析に十分な発現量が得られない、という問題が生じ、計画実現のためには発現系のさらなる改良が必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

改良の余地が依然として多く残されているものの、本研究で採用したRNA標識法が、動物個体を用いたRNA輸送の研究を行なう上で、有望なツールであることを検証することができた。また、研究過程で作成したノックアウトマウスを精子形成過程や幹細胞維持機構の研究等に利用可能な研究材料として公的機関に寄託し、広く利用できるようにすることで、研究コミュニティに貢献することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of present study was elucidation of the role of “selective mRNA export” for differentiation and development of male germ cells. To this end, the usefulness of a newly developed method for identification of target mRNA was evaluated. ES cell lines harboring mRNA exporter-base modifying enzyme fusion TGs were established. By using these ES cell lines several TG mouse lines were also established, however, it turned out that the TGs were only poorly expressed in testicular tissues, indicating further optimization of the expression system is required to fully exploit the system for future analysis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核 細胞質間輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞における核 - 細胞質間物質輸送は、核膜孔複合体を介して行なわれる。その際、輸送受容体と総称される一群のタンパク質が、積み荷の特異的な認識、核膜孔の通過といった過程において、きわめて重要な役割を果たす (Katahira, 2015)。核 - 細胞質間輸送受容体群の中でも最も多様性に富んだインポーチンβファミリー輸送受容体は、転移 RNA、マイクロ RNA 前駆体といった低分子量 RNA や NES (Nuclear Export Signal) 配列を有するタンパク質など、それぞれの積み荷に特有の構造を識別し、核外へと輸送する (Shibata et al., 2005, Okada et al., 2009, Katahira et al., 2012, Kressler et al., 2012)。

一方、mRNA の核外輸送には、インポーチンβファミリー輸送受容体群に属さないユニークな輸送受容体である Tap が関与する (Katahira et al., 1999, Katahira, 2015)。転移 RNA やマイクロ RNA 前駆体に比べ構造的な多様性の遙かに高い分子である mRNA を輸送するため、Tap は、mRNA の一次配列や構造ではなく、mRNA に結合するアダプタータンパク質群との相互作用により、mRNA を特異的な積み荷として識別し、輸送する (Zhou et al., 2000, Katahira et al., 2009, Katahira et al., 2015)。

近年報告されている研究データは、特定の遺伝子の mRNA の核外輸送レベルにおける厳密な制御が、ストレス応答や細胞分化といった高次の生命機能発現の基盤となっていることを示唆している。言い換えれば、核外輸送過程は、これまで考えられてきたように、単に mRNA を細胞質に局在する翻訳装置へと供給するためだけの単純なプロセスではなく、その選択性を介して、さまざまな生命活動の基盤となる遺伝子発現を調節するメカニズムの一つとしても重要な役割を担っていることが明らかにされつつある (Wickramasinghe and Laskey, 2015)。

多細胞生物では、mRNA 核外輸送に関与するアダプターの多様性だけでなく、輸送受容体にも多様性が認められ、Tap に相同性を示す複数のパラログ遺伝子は、NXF (Nuclear RNA Export Factor) ファミリー遺伝子と総称される mRNA 輸送受容体ファミリーを形成している。マウスでは、ユビキタスに発現の認められる Tap の他に、組織特異的に発現する 3 種類の NXF ファミリー遺伝子が同定されている (Sasaki et al, 2005, Takano et al, 2007, Katahira et al, 2008)。インポーチンβファミリー輸送受容体の積み荷の多様性から、NXF ファミリーメンバーも mRNA の選択的輸送を通じて細胞機能制御に関与すると予想されてきたが、その役割はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本申請研究では、技術的制約から未解明のままであった mRNA 核外輸送受容体 Tap およびそのパラログである Nxf2 により輸送される mRNA 種を新規の RNA 標識法を用いて同定し、選択的 mRNA 核外輸送による精原細胞分化・維持の制御機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、RNA 修飾酵素と Nxf2 および Tap の融合タンパク質を発現するトランスジェニック (TG) マウスを作成し、精原細胞において Tap および Nxf2 に結合する mRNA を同定し、輸送受容体の多様性に基づく選択的 mRNA 核外輸送を介した遺伝子発現制御機構を明らかにするとともに、精原細胞に特有な mRNA 核外輸送受容体の多様性の生物学的な意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

1) Tap および Nxf2 - RNA 修飾酵素融合タンパク質の機能解析

融合タンパク質の発現ベクターを作製した。作成した発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、それぞれの融合タンパク質の発現を融合タンパク質に付加したタグに対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングにより、また、mRNA 核外輸送能をルシフェラーゼレポーターアッセイ (Katahira et al. 2015) により解析した。

2) Tap および Nxf2-RNA 修飾酵素融合タンパク質発現マウスの作成

Tap および Nxf2 と塩基修飾酵素融合タンパク質発現カセットを作成し、CRISPR/Cas9 を用いて、ES 細胞の *Nxf1* および *Nxf2* 遺伝子座へノックインした。ノックインの確認は、ゲノム DNA を用いた PCR により行った。また、融合タンパク質の発現を確認するため、Nxf2 および Tap の大腸菌リコンビナントタンパク質を免疫源として、ウサギ抗 Nxf2 および Tap 抗体を作製した。ES 細胞における Tap 融合タンパク質の発現は、特異抗体を用いたウエスタンブロットティングにより確認した。

得られた ES 細胞株をマウスの桑実期胚にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製した。さらに、キメラマウスを野生型マウスと交配し、TG ラインを樹立した。TG ラインの遺伝子型確認は、耳介組織の DNA を用いた PCR 法により行った。また、TG マウスの精巣を採取し、その重量を測定するとともに、ライセートを作成して、ウエスタンブロットティングにより TG の発現を確認した。

3) *Nxf2* ノックアウトマウスの作成

C57Bl6/J マウスの受精卵前核へ CRISPR/Cas9 とともにガイド RNA を導入し、マウス *Nxf2* 遺伝子の第 4 エクソンに変異を導入した。変異導入の確認は、PCR によって得られたゲノム DNA 断片のダイレクトシーケンシングにより行なった。さらに、野生型マウスとの交配を繰り返し、*Nxf2* KO マウスラインを樹立した。*Nxf2* の発現は、特異抗体を用いた精巣ライセートのウエスタンブロッティング、および、精巣組織凍結切片の免疫染色により確認した。さらに、野生型雌マウスと交配を行い、妊孕性についての解析を行うとともに、精巣重量の解析、精巣上体および精巣の組織切片の観察、KO マウスから採取した精子を用いた体外受精を行ない、精子形成過程、および、成熟精子の異常を解析した。

4. 研究成果

選択的 mRNA 核外輸送による雄性生殖細胞分化・維持の制御機構を明らかにするため、mRNA 核外輸送受容体 Tap および *Nxf2* により輸送される mRNA 種の同定を試みた。TG マウス作成に先立ち、融合タンパク質の発現及び機能を培養細胞を用いた実験系で検証した。それぞれの融合タンパク質をコードする cDNA を CMV プロモーターの下流にクローニングし、哺乳動物細胞用発現ベクターを構築した。それぞれの発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクトし、ウエスタンブロッティングにより発現を解析した。その結果、予想通りの分子量の融合タンパク質の発現を確認することができた(図 1, asterisk)。また、ルシフェラーゼレポーターを用いた mRNA 核外輸送アッセイを行なったところ、Tap および *Nxf2* 融合タンパク質は、GFP 融合タンパク質 (Katahira et al., 2015) と同等の mRNA 核外輸送能を有していることが明らかとなった(図 2)。さらに、Tap 融合タンパク質を一過性に過剰発現した HEK293 細胞より総 RNA を採取し、RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なったところ、Tap の内在性ターゲットとして知られる *NXF1* 遺伝子の第 10 イントロン (Li et al. 2006) に塩基修飾が起こることを確認できた(図 3)。これらのことから、融合タンパク質は Tap および *Nxf2* のターゲットの同定に有用であると判断した。

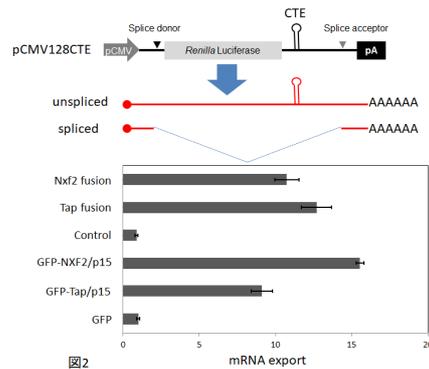


図2

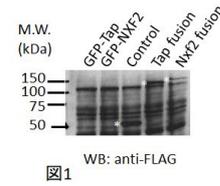


図1

et al., 2015) と同等の mRNA 核外輸送能を有していることが明らかとなった(図 2)。さらに、Tap 融合タンパク質を一過性に過剰発現した HEK293 細胞より総 RNA を採取し、RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なったところ、Tap の内在性ターゲットとして知られる *NXF1* 遺伝子の第 10 イントロン (Li et al. 2006) に塩基修飾が起こることを確認できた(図 3)。これらのことから、融合タンパク質は Tap および *Nxf2* のターゲットの同定に有用であると判断した。

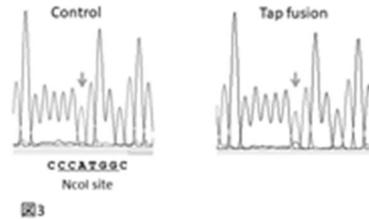


図3

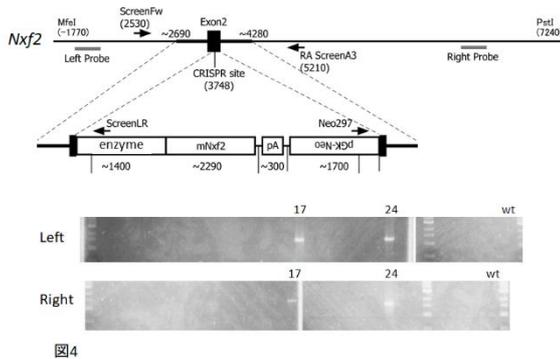


図4

融合タンパク質を発現する TG マウス作成のため、それぞれの TG を保有する ES 細胞を樹立した。組織特異的、かつ、内在性レベルの発現量をえられるよう、それぞれの融合遺伝子を *Nxf1* および *Nxf2* 遺伝子座に CRISPR/Cas9 システムを用いてターゲティングした(図 4 上)。各 ES 細胞株のゲノム DNA を用いた PCR によりスクリーニングを行ない、ポジティブクローンを選択するとともに、各遺伝子座への TG の挿入を確認した(図 4 下)。ES 細胞で発現の見られる Tap に関して

は、TGES 細胞株のライセートを用いてウエスタンブロッティングを行い、融合タンパク質の発現を確認した。その結果、TGES 細胞では、野生型 ES 細胞に比べて、内在性の Tap の発現量がおよそ半減すると同時に、予想された分子量の位置に融合タンパク質の発現を確認することができた(図 5)。さらに、これらの TG ES 細胞株を桑実期マウス胚にマイクロインジェクションした後、仮親に戻し、キメラマウスの作成を行なった。キメラマウスはコントロール TG、および、*Nxf2* TG について、それぞれ 3 ラインずつが得られた。一方、Tap TG に関しては、計 4 回試行したものの、キメラマウスの樹立には至らなかった。ES 細胞ですでに融合タンパク質の発現が認められることから、胎児の発生に伴う細胞分化などの過程において融合タンパク質が影響を与え、そのことがキメラマウスの発育に何らかの影響を及ぼしたものと推察された。

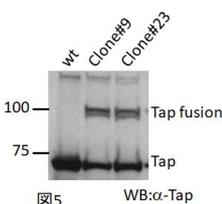


図5

得られたキメラマウスは野生型マウスと戻し交配し、TG ラインを作製した。*Nxf2* 融合タンパク質の発現に関して、精巣組織のラ

イセートを用いたウエスタンブロッティングにより確認を行なったが、有意な発現を認められなかった。また、同腹の野生型オスと比較したところ、*Nxf2* KO マウスと同様に TG マウスでも精巣重量の減少が観察された。このことから、TG の発現抑制、あるいは、融合タンパク質の不安定化のために、KO と同様のフェノタイプを示していると考えた。精巣組織において解析に十分な融合タンパク質の発現が得られなかったことから、研究計画実現のためには、TG の挿入部位の検討、融合タンパク質の安定化など、TG 発現系の改良が必要であると結論付けた。発現系の改良は、現在も継続中である。

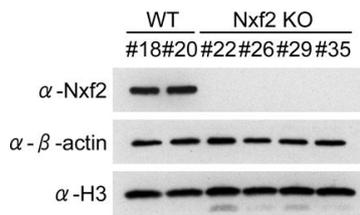


図6

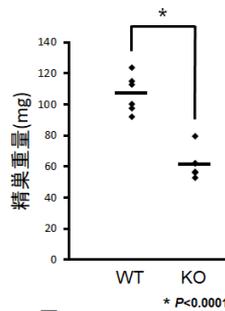


図8

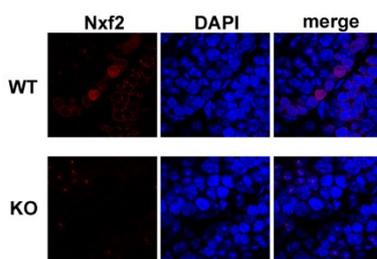


図7

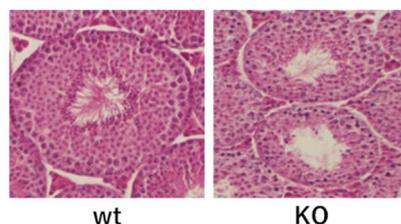


図9

研究の過程で CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Nxf2* 遺伝子の KO マウスを作成した。KO マウスでは、精巣における *Nxf2* タンパク質の発現の消失 (図 6、7) が、組織ライセートを用いたウエスタンブロッティング、および、精巣組織の免疫染色により観察された。また、9 週齢のマウスにおいて精巣重量の有意な低下 (図 8) を認めた。野生型雌マウスとの交配を行なったところ、7~8 週齢頃までの若齢期の雄マウスの妊孕性に関しては、野生型マウスと KO マウスとの間で差異が認められなかった。一方、9 週齢以降、比較的晩発性の妊孕性の低下が認められた。さらに、9 週齢 (図 9)、12 週齢において KO および同腹の野生型マウス

の精巣の組織切片を比較観察したところ、KO マウスにおいて精細管の萎縮や精子の低形成が認められた。また、このとき、精原細胞マーカーである PLZF 陽性細胞の数は、野生型マウスと KO マウス間で有意な差を認めなかった。9 週齢 KO マウスから採取した精子を体外受精に用いたところ、媒精の前培養中に精子の運動性の顕著な低下が認められ、受精卵を得ることができなかった。このことから、*Nxf2* 遺伝子 KO により、精子形成の低下以外にも、成熟精子自体に何らかの異常が起こっていることが推察された。*Nxf2* の標的 mRNA の同定という観点から、これらの異常について考察できるだけだけのデータを得るまでに至っていないが、本研究で作成した *Nxf2* KO マウスは、選択的 mRNA 核外輸送の研究のみならず、精原細胞の分化・維持機構の研究に資する研究材料であることが明らかとなった。そこで、研究コミュニティーで広く利用できるよう、医薬基盤・栄養・健康研究所に凍結胚を生物資源として寄託・公開した。

引用文献

- *Katahira, J., Dimitrova, L., Imai, Y., Hurt, E. NTF2-like domain of Tap plays a critical role in cargo mRNA recognition and export. *Nucleic Acids Res.* 43, 1894-1904. (2015)
- Shibata, S., Sasaki, M., Miki, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y., *Katahira, J., *Yoneda, Y. Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Res.* 34, 4711-4721. (2006)
- Okada, C., Yamashita, E., *Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., *Yoneda, Y., *Tsukihara, T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 326, 1275-1279. (2009)
- *Katahira, J. mRNA export and the TREX complex. *Biochim. Biophys. Acta.- Gene regulatory mechanisms* 1819, 507-513. (2012)
- *Kressler, D., Bange, G., Ogawa, Y., Stjepanovic, G., Bradatsch, B., Pratte, D., Amlacher, S., Strauß, D., Yoneda, Y., Katahira, J., *Sinning, I., *Hurt, E. Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science* 338, 666-671. (2012)

5. Katahira, J., Sträßer, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J. U., *Hurt, E.
The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human.
EMBO J. 18, 2593-2609. (1999)
6. Zhou, Z., Luo, M-j., Sträßer, K., Katahira, J., Hurt, E., *Reed, R.
The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans.
Nature 407, 401-405. (2000)
7. *Katahira, J., Inoue, H., Hurt, E., *Yoneda, Y.
Adaptor Aly and co-Adaptor Thoc5 function in the Tap-p15-mediated nuclear export of *HSP70* mRNA.
EMBO J. 28, 556-567. (2009)
8. Wickramasinghe, V. O. Laskey R. A.
Control of mammalian gene expression by selective mRNA export.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 16, 431-442. (2015)
9. Sasaki, M., Takeda, E., Takano, K., Yomogida, K., Katahira, J., *Yoneda, Y.
Molecular cloning and functional characterization of mouse *Nxf* family gene products.
Genomics 85, 641-653. (2005)
10. Takano, K., Miki, T., *Katahira, J., *Yoneda, Y.
NXF2 is involved in cytoplasmic mRNA dynamics through interactions with motor proteins.
Nucleic Acids Res. 35, 2513-2521. (2007)
11. *Katahira, J., Miki, T., Takano, K., Maruhashi, M., Uchikawa, M., Tachibana, T., *Yoneda, Y.
Nuclear RNA Export Factor 7 is localized in processing bodies and neuronal RNA granules through interactions with shuttling hnRNPs.
Nucleic Acids Res. 36, 616-628. (2008)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagamori, I., Kobayashi, H., Nishimura, T., Yamagishi, R., Katahira, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Kono, T., Nakano, T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Relationship between PIWIL4-mediated H3K4me2 demethylation and piRNA-dependent DNA methylation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 350-356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.017	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 -

1. 著者名 Katahira, J., Ishikawa, H., Tsujimura, K., Kurono, S., Hieda, M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Human THO Coordinates Transcription Termination and Subsequent Transcript Release From the HSP70 Locus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 272-283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/gtc.12672.	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 -

1. 著者名 Katahira, J., Senokuchi, K., Hieda, M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Human THO maintains the stability of repetitive DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 334-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/gtc.12760	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katahira, J., Ishikawa, H., Tsujimura, K.
2. 発表標題 Human THO coordinates transcription termination and subsequent transcript release from the HSP70 locus
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西岡優、今泉大将、今田順子、片平じゅん、松浦成昭、檜枝美紀
2. 発表標題 SUN1バリエーションがLINC 複合体の機能的多様性に担う役割の解析
3. 学会等名 染色体ワークショップ
4. 発表年 2017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
研究協力者	永森 一平 (Nagamori Ippei) (20624729)	大阪大学・医学(系)研究科・助教 (14401)	