

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05546

研究課題名(和文)哺乳動物精子形成後期に特徴的な翻訳遅延と脱アデニル化の機構

研究課題名(英文)Studies on delayed translation and deadenylation of postmeiotic mRNAs during mammalian late spermiogenesis

研究代表者

柏原 真一 (Kashiwabara, Shin-ichi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00254318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：半数体特異的mRNAの球状精細胞での保存と、伸長精細胞での翻訳活性化に伴う脱アデニル化について解析を行った。翻訳が抑制されているmRNAには、すでにキャップ結合タンパク質eIF4Eおよびポリ(A)鎖結合タンパク質PABPC1が結合していた。また、グローバルな翻訳抑制にかかわると考えていたRNA結合タンパク質YBX2が、半数体特異的mRNAの安定化・保存に関与することが示唆された。一方、ラダー状の段階的脱アデニル化中間体の形成には、ポリ(A)鎖結合タンパク質と一般的な脱アデニル化酵素が関わっていること、また半数体特異的mRNAおよび伸長精細胞に特有な現象ではなく、普遍的であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子の形づくりにかかわるタンパク質をコードするmRNAは、球状精細胞期に転写され、伸長精細胞で翻訳されるまで数日～1週間程度保存される。この現象は、40年ほど前から知られており、魚類から哺乳動物まで共通である。本研究で得られた成果は、生殖生物学における基本原理のみならず、精子形成異常に起因する男性不妊症の原因解明の一助となり得る。

研究成果の概要(英文)：We have studied on the molecular mechanisms of storage of postmeiotic mRNAs and their deadenylation, which accompanies translational activation, during murine spermiogenesis. It was found that translationally repressed mRNAs are associated with cap-binding protein eIF4E and poly(A)-binding protein PABPC1. Y-box RNA-binding protein 2 (YBX2), which has been thought to be involved in global translational repression, may contribute to stabilization and storage of postmeiotic mRNAs. We also revealed that formation of ladder-like deadenylation intermediates with a periodic spacing of ~30 nt is mediated by PABPC and canonical deadenylase complexes and is intrinsic to neither postmeiotic mRNAs nor late haploid cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：精子形成 翻訳制御 ポリ(A)鎖 脱アデニル化 RNA結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

精子形成は、精原細胞が精母細胞へと分化し、減数分裂の結果生じた半数体の球状精細胞が伸長精細胞を経て精子へと分化する過程からなる。ヌクレオソームを構成するヒストンは、球状精細胞から精子へと分化する過程でプロタミン (PRM) に置き換わり、精子核は非常に凝縮した構造をとる。その結果、マウスにおいては step 10 以降の伸長精細胞では転写が完全に不活性化される。したがって、精子核や鞭毛を形作るタンパク質の mRNA は、球状精細胞期に転写され、伸長精細胞で翻訳されるまで約一週間もの間、翻訳不活性な mRNA-タンパク質複合体 (mRNP) として保存されるという特殊な翻訳制御 (翻訳遅延) を受けている。本現象は、40 年以上前から知られており、ニジマスから哺乳動物まで共通してみられる。

半数体特異的 mRNA の保存を介した翻訳遅延には、それらの 3'非翻訳領域 (3'-UTR) が関わっていることがマウスにおいて明らかにされている (Braun *et al.*, *Genes Dev.*, 1989)。そして、その保存配列に結合する因子として YBX2/MSY2、YBX3/MSY4、および TB-RBP などの RNA 結合タンパク質が、1990 年代から 2000 年代初めにかけて Braun らと Hecht らのグループにより同定された。これらの欠損マウスでは、精子形成が異常となることから、本現象は解明されたかのようにみなされてきた。しかし、実際に翻訳遅延が破綻しているかについては示されておらず、その作用機序も不明である。そこで申請者らは、これら RNA 結合タンパク質について検討したところ、たしかに YBX2 と YBX3 は mRNP 形成を介して翻訳を抑制するが、結合する mRNA に特異性はないこと、また TB-RBP は配列依存的な mRNA 分解に関与していることが明らかとなった。したがって、翻訳遅延制御のメカニズムに関しては再検討する必要性が生じてきたと言える。一方、これら mRNA が伸長精細胞で翻訳される際には部分的な脱アデニル化を伴い、ノーザンブロット上でスメアーなバンドとして検出される (Kleene *et al.*, *Dev. Biol.*, 1984)。脱アデニル化とそれに続く mRNA 本体の分解は連続的かつ短時間におこり、このような脱アデニル化中間体が観察される例は調べる限り他にない。しかし、その生成機構や意義についても、まったくと言ってよいほど報告されていない。申請者らは、脱アデニル化中間体はスメアーというよりもむしろ、約 30 塩基毎のラダー状のバンドパターンを示すことを *Prml* など複数の mRNA で見いだしている。このことは、脱アデニル化は段階的に進行することを示唆している。

翻訳遅延に関する解析が行われていた 1980 年代後半から 2000 年代前半はまだ、翻訳開始や mRNA 脱アデニル化に関わる因子や機構についての知見が不十分であった。これらに関する情報が蓄積し、また微量タンパク質の網羅的同定が可能となった現在、この半数体特異的 mRNA に特有の現象に再着目することは意義深いと思われる。本研究課題は、このような背景のもとに立案されている。

## 2. 研究の目的

半数体特異的 mRNA に特徴的な球状精細胞での完全な翻訳抑制と保存、そしてその後の伸長精細胞での翻訳活性化の機構を明らかにする。また、それらの翻訳活性化の際に形成される部分的にポリ (A) 鎖が短くなった脱アデニル化中間体の生成機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) mRNP 形成と翻訳抑制の関連

mRNP 画分の mRNA は、翻訳が完全に抑制されていることから、翻訳開始因子が結合していないことが予想される。そこで、精巣 mRNP 画分における半数体特異的 mRNA への翻訳開始因子の結合の有無について、抗 eIF4E 抗体および抗 PABPC1 抗体を用いた RNA 免疫沈降により検討した。mRNP 画分は、ショ糖密度勾配遠心により分画・調製した。免疫沈降された RNA は、RT-PCR により検出した。

### (2) Y-box RNA 結合タンパク質 YBX2 欠損マウスの作製とその機能解析

YBX2 欠損マウスを、CRISPR-Cas9 法を用いて作製した。24 日齢の精巣における各遺伝子の mRNA 量とタンパク質量を、それぞれ RT-qPCR とウェスタンブロットにより定量し、野生型と比較した。また、組織切片を作製し、HE 染色により精子形成の進行状況を確認した。

### (3) 半数体特異的 mRNA のラダー状脱アデニル化中間体の解析

脱アデニル化中間体の形成は、半数体特異的 mRNA が伸長精細胞で翻訳活性化を受ける際に生じる特徴的な現象であると長らく考えられてきた。ラダー状の脱アデニル化中間体の生成機構に関して、以下の解析を行った。

半数体特異的 mRNA および伸長精細胞に特有な現象であるのかについて検証するために、減数分裂期から発現する mRNA およびハウスキープ mRNA について、高分解能ノーザンブロッ

ット解析を行った。HEK293T 細胞で発現させた半数体特異的 mRNA についても、同様の解析を行った。ラダー状のバンド形成におけるポリ(A)鎖結合タンパク質の関与を検討するために、HEK293T 細胞において *Prm1* mRNA をレポーターとして PABPC1 あるいは PAIP2 を過剰発現させ、ラダーバンド形成への影響を調べた。この段階的な脱アデニル化が、一般的な CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体によるものなのか、あるいは未知のポリ(A)鎖特異的エンドヌクレアーゼが関与しているのかについて、CCR4-NOT 複合体の活性サブユニットのドミナントネガティブ変異体の HEK293T 細胞での過剰発現により検証した。

#### (4) 半数体特異的 mRNA の翻訳遅延にかかわる候補因子の探索と機能解析

半数体特異的 mRNA の翻訳制御には、それらの 3'-UTR が関わっている。そこで、ビオチン UTP 存在下で *in vitro* 転写により合成した *Prm1* の 3'-UTR をアビジンセファロースに結合させ、精巢 mRNA RNP 画分とインキュベートした。結合したタンパク質を SDS-PAGE により分離し、各バンドを PMF 解析により同定した。

同定された候補因子の翻訳への影響を調べるために、 $\lambda$ N-BoxB システムを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。候補因子を  $\lambda$ N ペプチド融合タンパク質として発現させるようなコンストラクトを作製し、R-Luc 6  $\times$  BoxB とコントロールとしての F-Luc を同一ベクター上にコードする psiCHECK2 プラスミド (R-Luc 6  $\times$  BoxB/psiCHECK2) とともに HEK293T 細胞に導入し、R-Luc の F-Luc に対する相対活性を測定した。各レポーターの mRNA 量は、RT-qPCR により決定した。

### 4. 研究成果

#### (1) mRNP 形成と翻訳抑制の関連

mRNP 画分において半数体特異的 mRNA に翻訳開始因子が結合しているかについて、抗 eIF4E 抗体および抗 PABPC1 抗体を用いた RNA 免疫沈降を用いて検証した。予想に反し、翻訳が抑制された mRNA のキャップ構造とポリ(A)鎖には、それぞれ eIF4E と PABPC1 が結合していることが明らかとなった。このことは、翻訳抑制には eIF4E - eIF4G 間、あるいは PABPC1 - eIF4G 間の結合を阻害するような因子が関わっていることを示唆している。

#### (2) YBX2 の mRNA 保存への関与

12 日~24 日齢のマウスにおいて、多くの mRNA 量は精巢の発達に伴い急速に増加するものの、対応するタンパク質量の増加率は極めて低いことが本研究の過程で明らかとなった。YBX2 は、配列非特異的な翻訳抑制能とともに mRNA 安定化能を有することが申請者らにより示されていたので、その関与を精子形成に異常が現れる直前の 24 日齢の YBX2 欠損マウスを用いて検証した。その結果、YBX2 欠損マウス精巢では野生型と比較して、調べる限りほぼすべての mRNA 量が僅かに減少するもののタンパク質量はほぼ同じであるという予想外の結果が得られた。このことは、YBX2 は精巢において翻訳抑制というよりむしろ mRNA 安定化にかかわっていることを示唆している。そこで、YBX2 欠損マウス精巢における *Prm1* などの半数体特異的 mRNA 量を調べたところ、野生型の 10%以下と著しく減少していた。したがって、半数体特異的 mRNA の安定化と保存に YBX2 が関与していることが考えられた (投稿準備中)。

#### (3) 半数体特異的 mRNA のラダー状脱アデニル化中間体の形成機構

*Prm1* mRNA を HEK293T 細胞に発現させ、高分解能ノーザンプロット分析を行ったところ、伸長精細胞と同様約 30 塩基間隔のラダー状の脱アデニル化中間体が観察された。そこで、精巢において減数分裂期から発現する mRNA やハウスキーピング mRNA についても解析を行った結果、普遍的な現象であることが判明した。

ラダー状の脱アデニル化中間体の形成について、*Prm1* mRNA をレポーターとして PABPC1 と PABPC1 のポリ(A)鎖への結合を阻害する PAIP2 の過剰発現実験を HEK293T 細胞において行った。その結果、前者ではラダーバンドが明確になり、逆に後者では形成が阻害された。したがって、その形成には PABPC が関与していることが明らかとなった。また、CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体の活性サブユニット (CNOT6, CNOT7, CNOT8) のドミナントネガティブ変異体の導入により、脱アデニル化が阻害された。したがって、ラダー状の脱アデニル化中間体の形成は通常の脱アデニル化プロセスによるものであり、未知のポリ(A)鎖特異的エンドヌクレアーゼによる可能性は低いことが考えられた (投稿準備中)。

#### (4) 半数体特異的 mRNA の翻訳遅延にかかわる候補因子の探索と機能解析

*Prm1* 3'-UTR に結合する因子として、hnRNPU, hnRNPR, および IGF2BP1 などの RNA 結合タンパク質が PMF 解析により同定された。これら因子について、 $\lambda$ N-BoxB システムを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、hnRNPU が R-Luc の相対活性を強力かつ効果的に低下させることが判明した。R-Luc 6  $\times$  BoxB mRNA 量を RT-qPCR により調べたところ、mRNA 量の減少はみられなかった。したがって、hnRNPU は配列特異的な翻訳抑制能を有することが考えられた。また、翻訳の抑制に際して R-Luc 6  $\times$  BoxB mRNA の mRNP シフトを伴わないことがポリソーム解析により明らかとなった。このことは、hnRNPU による翻訳抑制が翻訳開始

以降の過程でおこることを示唆している。hnRNPU が、半数体特異的 mRNA の特定の配列に結合するののかについては、今後検証すべき課題である。

以上の結果より、

精巣における翻訳抑制には、eIF4E - eIF4G 間、あるいは PABPC1 - eIF4G 間の結合を阻害するような因子が関与している可能性が高いこと、 YBX2 は、少なくとも半数体特異的 mRNA の安定化と保存にかかわっていること、 ラダー状の脱アデニル化中間体の形成は、半数体特異的 mRNA および伸長精細胞に特有のものではなく普遍的な現象であり、ポリ(A)鎖結合タンパク質と CCR4-NOT 脱アデニル化複合体が関与する通常の脱アデニル化プロセスであること、が判明した。

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 Oyama, K., Baba, T., and Kashiwabara, S.	4. 巻 67
2. 論文標題 Functional characterization of testis-brain RNA-binding protein, TB-RBP/Translin, in translational regulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 35-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-120	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 Kim, J., Nakamura, J., Hamada, C., Taketomi, T., Yano, S., Okajima, T., Kashiwabara, S., Baba, T., Sato, B., Chiba, T., and Tsuruta, S.	4. 巻 40
2. 論文標題 USP15 deubiquitinates TUT1 associated with RNA metabolism and maintains cerebellar homeostasis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00098-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00098-20	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 Kokubu, D., Ooba, R., Abe, Y., Ishizaki, H., Yoshida, S., Asano, A., Kashiwabara, S., and Miyazaki, H.	4. 巻 65
2. 論文標題 <i>Angelica keiskei</i> (Ashitaba) powder and its functional compound xanthoangelol prevent heat stress-induced impairment in sperm density and quality in mouse testes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 139 ~ 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-141	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中豪人、馬場 忠、柏原真一
2. 発表標題 精子形成におけるグローバルな翻訳抑制へのRNA結合タンパク質YBX2の関与
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中豪人、柏原真一、兼森芳紀、馬場 忠
2. 発表標題 Functional analysis of Y-box RNA-binding protein YBX2 during mouse spermatogenesis
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大山可奈子、柏原真一、馬場 忠
2. 発表標題 RNA結合タンパク質TB-RBPはmRNA分解に関与する
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須郷卓也、相田千尋、兼森義紀、柏原真一、馬場 忠
2. 発表標題 Acrbp pre-mRNAの選択的スプライシング機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
---------	---------