

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 1 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15799

研究課題名（和文）線虫の精子特異的なタンパク質のアルギニンメチル化による制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanism of arginine methylation for sperm-specific protein in *C. elegans*

研究代表者

田島 達也（Tajima, Tatsuya）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：80845058

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000 円

研究成果の概要（和文）：タンパク質アルギニン残基（Arg）のメチル化は、PRMTファミリーと呼ばれるメチル基転移酵素により触媒され、モノメチルアルギニン化（MMA化）を経て、非対称性ジメチルアルギニン化（ADMA化）または対称性ジメチルアルギニン化（SDMA化）される。これまでの実験から、ADMA化酵素であるPRMT-1は精子特異的かつ哺乳類プロタミン代替タンパク質されているSPCH-2およびSPCH-3の43位Argをメチル化することを明らかにした。また、遺伝学的解析より、SPCH-2は線虫の生殖機能に大きく寄与しており、精細胞形成と精子形成の偽足（哺乳類精子のべん毛に相当）の伸長に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルギニンメチル化は転写調節やシグナル伝達など様々な細胞内イベントに関与することが知られてきたが、生殖機能を制御することはほとんど報告されてこなかった。本研究より、戦中の精子特異的タンパク質SPCH-2とSPCH-3のアルギニン43位はPRMT-1によるアルギニンメチル化を受けていた。また、遺伝学的解析より、spch-2変異体における精細胞形成と精子形成に異常がみられた。これらの知見は、ヒトの男性不妊の原因究明、さらには治療法の開発につながる潜在性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Protein arginine methylation is catalyzed by a family of methyltransferases called PRMTs. This process involves the formation of monomethylarginine (MMA), followed by either asymmetric dimethylarginine (ADMA) or symmetric dimethylarginine (SDMA). Previous experiments have revealed that PRMT-1, an enzyme responsible for ADMA formation, methylates the Arg43 residue of the sperm-specific and mammalian protamine substitute proteins SPCH-2 and SPCH-3. Furthermore, genetic analysis has shown that SPCH-2 significantly contributes to the reproductive function of nematodes and may be involved in the elongation of pseudopodia (analogous to the flagella of mammalian sperm) during spermatogenesis and spermiogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：線虫 精子 アルギニンメチル化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線虫を用いる利点は2つあり、1つはマウスなどの他の生物種と比べて実験系が確立していること、もう1つは分子遺伝学的手法による表現型の原因遺伝子の特定が容易である。しかし、精子などの生殖細胞は、体細胞に比べて存在が微量であるため、生化学的解析が求められる翻訳後修飾の研究はほとんど進展していない。また、線虫の *prmt-1* 変異体および *prmt-5* 変異体は、それぞれ生体内の非対称ジメチル化、対称ジメチル化が完全に消失することを発見している (*J Biochem.* 161, 255-258, 2017)。さらに、両変異体はマウスやショウジョウバエのように胎生致死に至らず、ほぼ正常に発生するが、*prmt-1,5* 各変異体および二重変異体では有意な産子数の減少が認められる。この結果は、アルギニンメチル化が生殖プロセスのいずれかに関与することを示唆していることから、申請者はこれまでの研究経歴を活かせる極めて興味深いテーマであると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、線虫の配偶子形成および受精過程におけるアルギニンメチル化修飾の生物学的意義を解明することである。この目的を達成するために、アルギニンメチル化が SPCH の機能に与える影響、SPCH と PRMT の配偶子形成および生殖機能における役割、について研究を進める。

3. 研究の方法

アルギニンメチル化が SPCH の機能に与える影響の解明

- (a) アルギニンメチル化: *in vitro*メチル化実験により、線虫PRMT-1がSPCH-2および-3を非対称ジメチル化することを発見した。同様の実験で、PRMT-5がSPCHを対称ジメチル化するか検討する。またMALDI-TOF/MS分析によるメチル化アルギニン残基の特定も試みる。

SPCH と PRMT の配偶子形成および生殖機能における役割の解明

以下の実験には、野生型線虫 N2 に加えて、*spch-1*, *spch-2*, *spch-3*, *prmt-1*, *prmt-5* の各欠失変異体を用いる。

- (a) 産子数: SPCH とそのメチル化が、配偶子形成から受

精の過程に寄与するか検証するため、各欠失変異体を用いて、一匹の雌雄同体から産卵される受精卵、未受精卵および孵化した幼虫の総数を測定する。なお *prmt-1* 変異体及び *prmt-1;prmt-5* 二重変異体では産子数が減少することを確認済みである。

- (b) 精子形成: 線虫の精子形成は *in vitro* 再現系が確立されている。まずスライドガラス上の培地中でオスを解剖して精細胞を放出させ、プロテナーゼ K を添加することで、細胞膜から偽足が伸長しているかどうかを観察する。また、蛍光試薬 FM1-43 を加えることにより、膜オルガネラと細胞膜の融合 (受精能獲得の指標) を可視化する。

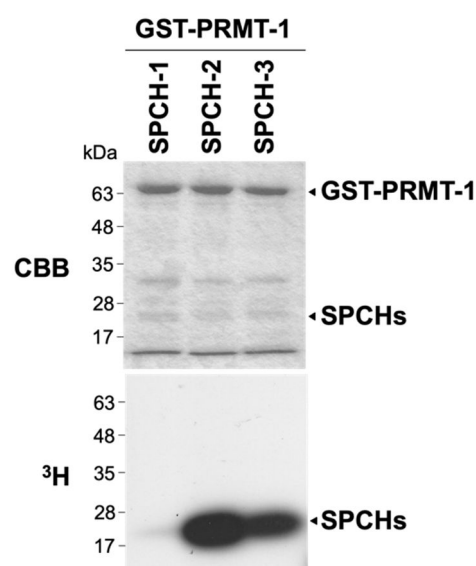


図1. *in vitro*メチル化実験

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

4. 研究成果

SPCH タンパク質は PRMT-1 によってメチル化される

in vitro メチル化実験より線虫の精子特異的かつ Arg rich なタンパク質である 3 種類の SPCH は PRMT-1 または PRMT-5 によってメチル化されるかどうかを組換えタンパク質を用いて検証したところ、興味深いことに、SPCH-2 と SPCH-3 は PRMT-1 によって顕著にメチル化されることを発見した(図2)。

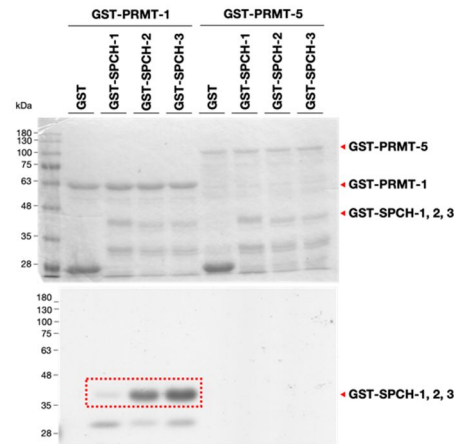


図2. PRMT-1とPRMT-5を用いた*in vitro*メチル化実験

PRMT-1 は SPCH Arg43 位をメチル化する次にこの 2 種類の SPCH タンパク質のどのアルギニンをメチル化するのか調べた。PRMT はアルギニン-グリシンリッチモチーフのアルギニンをメチル化することが知られており、SPCH-1 には存在せず、SPCH-2 と-3 に存在するアルギニンがメチル化されていると予想した。この条件に合うアルギニンは黄色で示したアルギニン 43 位の一か所のみである。そこで、アルギニンと構造が似たりジンに置換した SPCH-2 と-3R43K を作製して、PRMT-1 との *in vitro* methylation を行ったところ、興味深いことに、SPCH-2 と-3R43K は PRMT-1 によって全くメチル化されなかった。このことから、2 種類の SPCH のメチル化部位は Arg43 位であることを明らかにした。

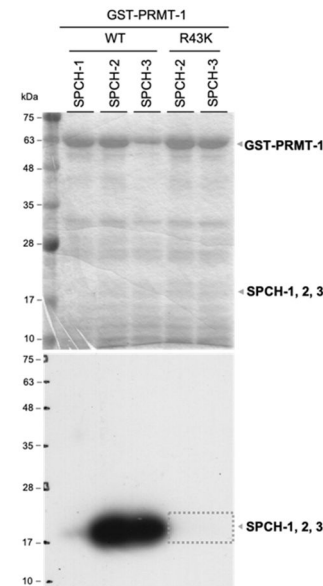


図3. 変異型SPCHタンパク質の*in vitro*メチル化実験

SPCH-2 変異体は線虫の生殖機能に関与している

以上から、精子形成時のクロマチンモデリングが PRMT-1 による SPCH の Arg メチル化が関与する可能性を考えた。これまでに、変異体を使った遺伝学的解析の報告はないので、まず、線虫の生殖に関与しているかどうかを調べるために、*spch* 遺伝子変異体を使って線虫の産子数を測定した。

線虫の生殖は基本的に 1 匹の雌雄同体で起こる。体内で産生された自己精子と卵子が貯精嚢で受精し、1 匹の雌雄同体から 300 匹の幼虫が生まれる。ところが *spch* 変異体の産子数は野生

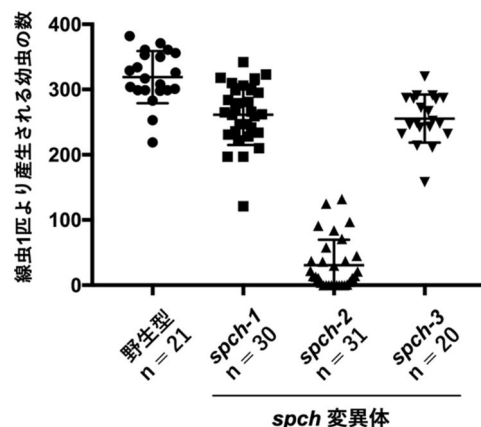


図4. *spch*変異体の産子数

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

型と比べて減少しており、特に *spch-2* については半分以下になっていたことから、SPCH-2 は線虫の生殖に大きく寄与していることが考えられた(図4)。

SPCH-2 は線虫の精細胞形成と精子形成に関与している

次に SPCH-2 が雄性生殖細胞系列のどのステップで機能しているのかを調べた。

線虫の精細胞はオスを解剖することで容易に観察することが可能である。そこで、*spch-2* 変異体のオス線虫は精細胞形成が正常に起きているかどうかを簡易的に調べた。その結果、*spch-2* 変異体は、野生型より精細胞の産生量が低下しており、精細胞形成に関

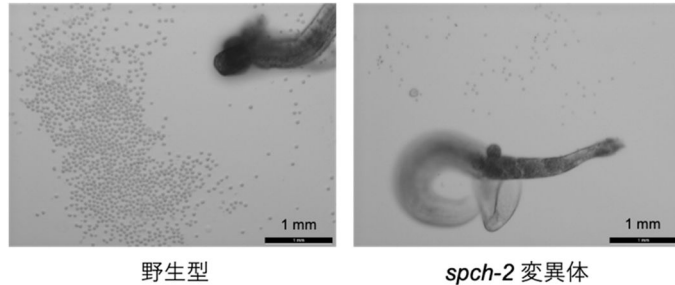


図5. *spch*変異体の精細胞

与していることが分かった(図5)。次に、*spch-2* 変異体の精細胞は精子形成が起こるかどうかを調べた。

線虫の精子形成は *in vitro* で簡単かつ短時間で再現できるため、精子の研究をする上で優れたモデルである。オス線虫を精子培地中で解剖して、精細胞をリリースさせた後に *in vitro* の活性化剤として知られているプロナーゼを加えて顕微鏡で観察した。

その結果、*spch-2* 変異体の精細胞も精子へと変態していたが、ImageJ を用いて哺乳類精子のべん毛に相当する偽足の長さを測定すると、野生型の約半分程度の長さとなっており、SPCH は偽足の伸長に関与していると考えられた。

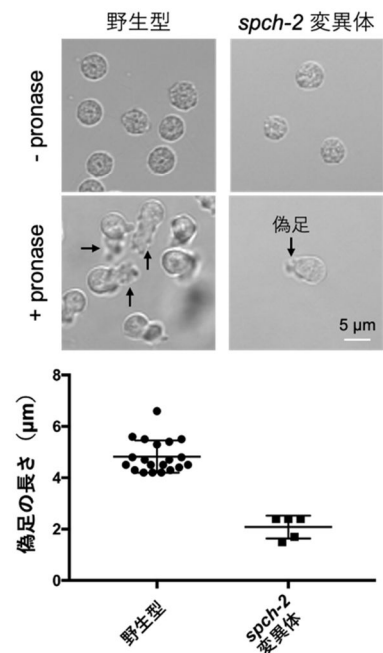


図6. *spch*変異体の精子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 田島達也、大徳浩照、加香孝一郎、張 文瑜、平野寛太、池田音緒、 深水昭吉
2. 発表標題 線虫の雄性生殖細胞における アルギニンモノメチル化酵素PRMT-9の機能的役割の解明
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田島達也、大徳浩照、加香孝一郎、張 文瑜、平野寛太、池田音緒、 深水昭吉
2. 発表標題 線虫の生殖におけるアルギニンモノメチル化制御機構の解明
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島達也、大徳浩照、加香孝一郎、張 文瑜、秋元祐斗、深水昭吉
2. 発表標題 線虫の精子特異的タンパク質におけるアルギニンメチル化制御機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会 本大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田島達也、張 文瑜、大徳 浩照、深水 昭吉
2. 発表標題 線虫の精子形成におけるアルギニンメチル化酵素PRMT-9の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第94回日本生化学会大会 若手優秀賞受賞
https://www2.aeplan.co.jp/jbs2021/img/top/top_list_211109_jp.pdf

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
---------	---------