

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580392

研究課題名 (和文) 生殖細胞の分化過程における mRNA ポリ A 鎖の機能とその運命

研究課題名 (英文) Function of mRNA polyA tails in germ cell differentiation

研究代表者

柏原 真一 (KASHIWABARA SHIN-ICHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00254318

研究成果の概要：

精子形成はきわめて複雑な細胞分化過程であり、この過程における遺伝子発現は転写のみならず細胞質での転写後および翻訳レベルでの制御がとりわけ重要な役割を担っている。申請者はこれまでに、精子形成細胞の細胞質特異的に存在する新規ポリ A 鎖付加酵素 TPAP を同定し、精子形成に必須であることを明らかにしている。本研究では、その伸長機構と欠損による精子形成不全の分子機構および精巣特異的細胞質ポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC2 について解析を行い、精子形成過程におけるポリ A 鎖の動態について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発生・分化制御

## 1. 研究開始当初の背景

精子形成はきわめて複雑な細胞分化過程であり、この過程における遺伝子発現は転写のみならず、細胞質での転写後および翻訳レ

ベルでの制御がとりわけ重要な役割を担っている。真核生物 mRNA の 3' 末端に存在するポリ A 鎖は、mRNA の核外輸送や安定性・分解および翻訳制御にかかわっている。したがって、ポリ A 鎖長の調節は転写後遺伝子発

現制御機構のひとつであるといえる。

申請者らはこれまでに、哺乳動物精巣特異的に存在する細胞質ポリ A ポリメラーゼ TPAP (PAPOLB) を同定した。通常、ポリ A 鎖は核内で付加されるのに対し、TPAP は細胞質に局在するという点で特徴的である。その欠損マウスでは、精子特有の構造である凝縮した核や鞭毛などの形態形成に関与する半数体特異的遺伝子の転写が著しく減少しており、結果として精子形成が球状精細胞の段階で停止していた。

さらなる解析の結果、TPAP は転写関連因子である *Tbp11* や *Gtf2a2* といった特定の mRNA 群の半数体精細胞特異的なポリ A 鎖伸長に関与していることが明らかとなった。これらの結果は、TPAP による細胞質での mRNA ポリ A 鎖伸長といった転写後修飾が一群の半数体特異的遺伝子の転写に関与し、最終的に精子形態形成をつかさどるといってこれまで知られていなかった遺伝情報発現制御機構の存在を示唆している。しかし、TPAP によるポリ A 鎖伸長機構やその欠損による精子形成不全の分子機構は未解明であった。

一方、細胞質に存在するポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC は、ポリ A 鎖に結合して mRNA の分解を防ぐとともに、mRNA キャップ構造に結合している翻訳開始因子複合体 eIF4F 中の足場タンパク質 eIF4G との相互作用を介して mRNA を環状化し、リボソームの再利用を促進させることにより効率的な翻訳に関与していると言われている。精巣には、普遍的に発現している PABPC1 と精巣特異的な PABPC2 が存在するが、両者の機能的な違いは不明であった。

以上のような背景のもと、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

mRNA ポリ A 鎖を介した精子形成の制御機構を明らかにすることを目的とし、下記の項目について解析を行った。

(1) TPAP による球状精細胞細胞質特異的な mRNA ポリ A 鎖伸長機構の解析

RNA 結合タンパク質による mRNA 制御は、多くの場合 3' 非翻訳領域 (3' -UTR) 中の特定のシス配列とそこに結合する RNA 結合タンパク質によって行われることが多い。そこで、TPAP の標的 mRNA である転写因子 *Tbp11* や *Gtf2a2* の 3' -UTR を用いて、制御因子の同定を試みた。

(2) TPAP 欠損による精子形成不全の分子機構の解析

野生型マウスの球状精細胞では、*Tbp11* や *Gtf2a2* の mRNA ポリ A 鎖が、その前段階であるパキテン期精母細胞と比較して伸長していたが、TPAP 欠損マウスではこの伸長が見られなかった。しかし、これら mRNA に対するポリ A 鎖の伸長は、その安定性や翻訳効率にも寄与していないことをすでに明らかにしている。そこで、TPAP 欠損によりポリ A 鎖伸長がおこらず、その結果として正常に翻訳されないようなタンパク質の同定を試みた。

(3) TPAP 以外の酵素による細胞質ポリ A 鎖伸長反応の解析

精巣細胞質画分のポリ A 鎖付加活性は、TPAP 欠損マウス精巣でも他の組織と比べてきわめて高いことから、TPAP 以外の酵素による mRNA ポリ A 鎖伸長反応の存在が推測された。事実、アクロシンやアクロシン結合タンパク質 *Acrbp* などの mRNA ポリ A 鎖は、TPAP 欠損マウスの球状精細胞でも伸長していた。また、ポリ A 鎖伸長によって翻訳が活性化される減数分裂期シナプトネマ構成タンパク質をコードする *Sycp1* と *Sycp3* の mRNA ポリ

A鎖も、野生型と同じように伸長されていた。

そこで、近年同定された新規のポリ A ポリメラーゼである GLD-2 の欠損マウスについて、その関与を検証した。

(4) 精巣特異的細胞質ポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC2 の解析

細胞質に存在するポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC は、ポリ A 鎖特異的に結合する RNA 結合タンパク質である。精巣には、普遍的に発現している PABPC1 と、精巣特異的な PABPC2 が存在する。PABPC1 は精子形成過程においてほぼ同じレベルで存在するのに対し、PABPC2 はパキテン期精母細胞と球状精細胞には存在するが、伸長精細胞では消失することを見いだしている。そこで、両者の機能的相違を明らかにすることを試みた。

これらの解析を通して、哺乳動物精子形成過程における mRNA ポリ A 鎖の動態と機能について考察した。

### 3. 研究の方法

(1) TPAP による球状精細胞細胞質特異的な mRNA ポリ A 鎖伸長機構の解析

TPAP の標的 mRNA である転写因 *Tbp11* や *Gtf2a2* の 3' -UTR を用いて、制御因子の同定を試みた。*In vitro* 転写により合成したこれらの RNA をセファロースビーズに結合させた担体を作製し、精巣抽出液のプルダウンを行った。結合したタンパク質を MALDI TOF-MS に供し、PMF 解析により同定した。

(2) TPAP 欠損による精子形成不全の分子機構の解析

TPAP 欠損マウスの精子形成は、球状精細胞の段階で停止する。そこで、精子形成が球状精細胞までしか進行していない 26 日令の野生型と欠損マウスの

精巣より細胞質画分と核画分のタンパク質抽出液を調製し、プロテオーム解析を行うこ

とにより、TPAP 欠損マウス球状精細胞で消失あるいは減少しているタンパク質を検出した。

(3) TPAP 以外の酵素による細胞質ポリ A 鎖伸長反応の解析

GLD-2 欠損マウスの精巣について、TPAP 以外のポリ A ポリメラーゼにより減数分裂期にポリ A 鎖の伸長を受ける *Sycp1* と *Sycp3* mRNA および球状精細胞期にポリ A 鎖伸長を受けるアクロシンや *Acrbp* mRNA のポリ A 鎖伸長の有無をノーザンブロット法と reverse ligation-mediated PCR (RLM-PCR) により調べ、GLD-2 の関与について検証した。

(4) 精巣特異的細胞質ポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC2 の解析

PABPC1 と PABPC2 について、結合する翻訳関連因子を免疫沈降法および GST プルダウン法により検証した。また、それらのポリソーム分布および細胞内局在をショ糖密度勾配遠心と免疫染色により調べた。

### 4. 研究成果

(1) TPAP による球状精細胞細胞質特異的な mRNA ポリ A 鎖伸長機構の解析

RNA アフィニティーゲルを用いた精巣抽出液のプルダウンにより、TPAP の mRNA 特異性にかかわると考えられる因子の一つとして、RNA 結合タンパク質 HuR を同定した。HuR は、初期発生における母性 mRNA の翻訳活性化を惹起する細胞質ポリ A 鎖伸長にかかわるウリジンに富む配列 (embryonic cytoplasmic polyadenylation element; eCPE) に結合することが報告されている。

*Tbp11* や *Gtf2a2* の 3' -UTR には、これと類似した配列が存在することから、TPAP によるポリ A 鎖伸長の mRNA 特異性に、この配列が関与している可能性が十分にある。HuR 以外にも結合するタンパク質が存在したの

で、その解析を引き続き行っている。また、3' -UTR を断片化し、同定された RNA 結合タンパク質の結合配列を明確にしていく予定である。

#### (2) TPAP 欠損による精子形成不全の分子機構の解析

26 日令の野生型と欠損マウスの精巣より細胞質画分と核画分のタンパク質抽出液を調製し、プロテオーム解析を行った。その結果、TPAP 欠損マウスの核画分において野生型と比較して著しく減少しているタンパク質をいくつか検出した。PMF 解析により、そのひとつとして adenylylate kinase が同定された。今後、このタンパク質をコードする mRNA の球状精細胞におけるポリ A 鎖伸長の有無とポリソーム解析によるポリ A 鎖伸長と翻訳効率の関連を明らかにしていく予定である。また、そのほかのタンパク質についても同様の解析を行うことを予定している。

#### (3) TPAP 以外の酵素による細胞質ポリ A 鎖伸長反応の解析

アフリカツメガエルの卵成熟過程において、母性 mRNA の細胞質でのポリ A 鎖伸長と翻訳活性化にかかわる配列として CPE 配列 ( $U_4U/AAU$ ) が知られている。この配列には CPE 結合タンパク質 CPEB が結合し、CPEB 依存的なポリ A 鎖伸長には既知のポリ A ポリメラーゼとはアミノ酸配列上ではほとんど相同性を示さない新規ポリ A ポリメラーゼ GLD-2 が行っていると考えられている。また、CPEB のマウスホモログである CPEB1 の欠損マウスでは、シナプトネマ構成タンパク質 *Sycp1* と *Sycp3* の mRNA の翻訳効率がポリ A 鎖伸長不全により低下することが報告されている。しかし、GLD-2 欠損マウスにおけるこれら mRNA のポリ A 鎖伸長は野生型と同じであったことから、GLD-2 以外の未知のポリ A ポリメラーゼが CPE 配列を介したポリ A 鎖伸長を行

っていることが推測された。また、アクロシンや *Acrbp* mRNA の球状精細胞でのポリ A 鎖伸長は GLD-2 欠損マウスでも行われていたことから、このポリ A 鎖伸長機構も現在のところ不明であり、今後の課題である。

#### (4) 精巣特異的細胞質ポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC2 の解析

PABPC2 は、*Pabpc1* mRNA のレトロポジションにより生じたイントロンレス遺伝子に由来する。PABPC2 は PABPC1 と同じように、さまざまな mRNA のポリ A 鎖に非特異的に結合し、また eIF4G や翻訳活性化因子 PAIP1 (Poly(A)-binding protein interacting protein 1)、翻訳抑制因子 PAIP2、および PIWI サブファミリー Argonaute タンパク質 MIWI (mouse piwi-like homolog 1; PIWIL1) などと結合した。ショ糖密度勾配遠心により PABPC2 は翻訳が活発に行われているポリリボソーム画分にほとんど存在せず、翻訳が抑制されている mRNP 画分に存在することが明らかとなった (図 1)。

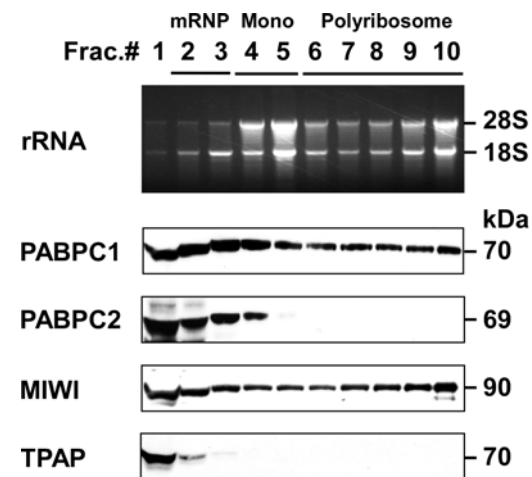


図1 PABPC2はmRNP画分に分布する

さらに、PABPC2 は体細胞における mRNA 分解や貯蔵の場と考えられている P-ボディ (Processing body) に相当するクロマトイドボディとよばれる精細胞特有の構造体に MIWI とともに局在していた (図 2)。クロマトイドボディは哺乳動物精子形成細胞に特

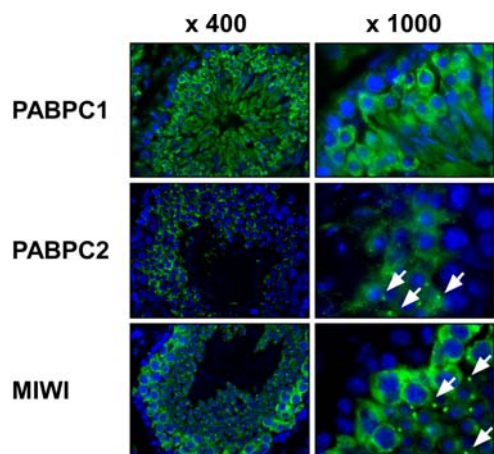


図2 PABPC2はクロマチンボディ(白矢印)に濃縮されている

異的な RNA 顆粒 (生殖顆粒) であり、P-ボデ  
イにも存在する脱キャッピング酵素 DCP1 や  
miRNA およびそれに関連する DICER や AGO タ  
ンパク質などのほか、RNA ヘリカーゼ MVH  
(mouse vasa homolog) などが濃縮されている。  
これらの結果から、PABPC2 は PABPC1 と異な  
り、生体内では翻訳抑制的に機能することが  
推測された。

#### 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 8 件)

1. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T., and Suzuki, T.  
Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3'-adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* **23**: 433-438 (2009)
2. Kimura, M., Ishida, Y., Kashiwabara, S., and Baba, T.  
Characterization of two cytoplasmic poly(A)-binding proteins, Pabpc1 and Pabpc2, in mouse spermatogenic cell. *Biol. Reprod.* **80**: 545-554 (2009)
3. Yamashita, M., Honda, A., Ogura, A., Kashiwabara, S., and Baba, T.  
Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes to Cells* **13**:1001-1013 (2008)

4. Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S., and Baba, T.  
Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 677-82 (2008)
5. Nakanishi, T., Ishibashi, N., Kubota, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kashiwabara, S., and Baba, T.  
Birth of normal offspring from mouse eggs activated by a phospholipase C $\zeta$  protein lacking three EF-hand domains. *J. Reprod. Dev.* **54**: 244-249 (2008)
6. Kashiwabara, S., Nakanishi, T., Kimura, M., and Baba, T.  
Non-canonical poly(A) polymerase in mammalian gametogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**: 230-238 (2008)
7. Nakanishi, T., Kumagai, S., Kimura, M., Watanabe, H., Sakurai, T., Kimura, M., Kashiwabara, S., & Baba, T.  
Disruption of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 does not alter polyadenylation status in oocytes and somatic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**: 14-19 (2007)
8. Tsujimoto, Y., Tanaka, H., Takemura, R., Yokogawa, T., Shimonaka, A., Matsui, H., Kashiwabara, S., Watanabe, K., & Suzuki, Y.  
Molecular determinants of substrate recognition in thermostable  $\alpha$ -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 13. *J. Biochem.* **142**: 87-93 (2007)

[学会発表] (計 7 件)

1. 木村正紀、石田和之、田中文、柏原真一、馬場 忠  
精子形成における Pabpc1-Paip2 複合体の解析  
日本分子生物学会  
2008 年 12 月 11 日、神戸
2. 康 宇鎮、山下美鈴、河野 菜摘子、柏原真一、馬場 忠  
Acrosin-deficient epididymal sperm exhibit a delayed penetration through the cumulus matrix  
日本分子生物学会  
2008 年 12 月 11 日、神戸

3. 山下美鈴、河野菜摘子、康 宇鎮、柏原真一、馬場 忠  
子宮内因子による受精能回復機構の解析  
日本分子生物学会  
2008年12月11日、神戸

4. 柏原真一  
精子形成と受精の機構  
日本実験動物技術者協会講演会  
2008年11月12日、東京

5. 木村正紀、石田和之、柏原真一、馬場 忠  
精子形成におけるポリ A 鎖結合タンパク質  
PABP を介した翻訳調節機構  
日本分子生物学会  
2007年12月12日、横浜

6. 石田 和之、木村 正紀、柏原 真一、馬場 忠  
マウス精巣特異的 RNA 結合タンパク質 Miwi  
の機能解析  
日本繁殖生物学会  
2007年9月18日、博多

7. 柏原真一、馬場 忠  
哺乳動物の精子形成と mRNA ポリ A 鎖  
2007年度国立遺伝学研究所研究会  
「生殖細胞と生殖腺形成の普遍性と多様性」  
2007年7月23日、三島

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柏原 真一 (KASHIWABARA SHIN-ICHI)  
筑波大学・大学院生命環境科学研究科  
・准教授  
研究者番号：00254318

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし