

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580384
 研究課題名（和文） Argonaute タンパク質 MIWI とポリ A 鎖結合タンパク質による翻訳制御
 研究課題名（英文） Translational regulation by Argonaute protein, MIWI, and poly(A)-binding proteins
 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

研究成果の概要（和文）：

真核細胞 mRNA ポリ(A)鎖に結合するポリ(A)鎖結合タンパク質 PABPC は、mRNA の安定性や翻訳効率および分解など、mRNA の一生を制御する中心的タンパク質である。申請者らは、PABPC が精巣特異的 Argonaute タンパク質 MIWI/PIWIL1 と直接相互作用することを見いだした。そこで、MIWI が翻訳にかかわっているのではないかと考え解析を行った。レポーターアッセイの結果、MIWI は翻訳に著しい影響をおよぼさないこと、また mRNP 画分にはほとんど存在しないことなどから、少なくとも翻訳抑制には関与していないことが推測された。また、精巣特異的 PABPC である PABPC2 の欠損マウスを作製し、その機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Poly(A)-binding protein, which binds poly(A) tail of eukaryotic mRNAs, is a central player of mRNA metabolism, including mRNA stability, translation, and decay. We have previously shown that poly(A)-binding proteins, PABPC1 and PABPC2, interact with a testis-specific Argonaute protein, MIWI/PIWIL1, suggesting that MIWI is involved in translational regulation during spermatogenesis. Contrary to our expectation, MIWI had no significant effects on translation, when tethered to reporter mRNAs. Moreover, MIWI was barely detected in translationally inactive mRNP fractions. These results suggest that MIWI is not implicated in, at least, translational repression. We also elucidated the function of PABPC2, a testis-specific PABPC, using knock-out mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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：精子形成、翻訳制御、MIWI、ポリ(A)鎖結合タンパク質

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翻訳レベルでの制御がきわめて重要な役割を担っている。真核細胞 mRNA のポリ(A)鎖に結合するポリ(A)鎖結合タンパク質 PABPC は、mRNA の安定性や翻訳効率および分解など、mRNA の一生を制御する中心的タンパク質である。

近年、マイクロ RNA (miRNA) とよばれる 21-23 塩基の低分子 RNA が、それと相補的な配列を 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に有する mRNA の切断、分解、および翻訳抑制に関与していることが明らかにされた。この miRNA を介した転写後遺伝子発現制御においては、AGO サブファミリーに属する Argonaute タンパク質と PABPC が関与していることが報告されている。さらに、哺乳動物の精巣には piRNA (Piwi-interacting RNA) とよばれる 24-31 塩基の低分子 RNA が、著量かつ数多く存在することが 2006 年に相次ぎ報告された。これら piRNA には、精巣特異的 RNA 結合タンパク質である MILI/PIWIL2、MIWI2/PIWIL4、および MIWI/PIWIL1 と呼ばれる PIWI サブファミリー Argonaute タンパク質が結合する。前者 2 つの欠損マウスの精巣では、*LINE1* や *IAP* といったレトロトランスポゾンの DNA メチル化がおこらないため発現が上昇し、その結果としてパキテン期精母細胞以前に精子形成不全に至る。これに対し、MIWI 欠損マウスでは球状精細胞の段階で精子形成が停止するがそのメカニズムは不明であった。一方、生殖細胞特異的な Y ボックスタンパク質である MSY2 と MSY4 は、翻訳不活性な mRNP 画分に存在し、プロタミンなど半数体特異的 mRNA が伸長精細胞以前の球状精細胞で翻訳されるのを防いでいると考えられている。

申請者らは、①MIWI が普遍的なポリ(A)鎖結合タンパク質 PABPC1 と精巣特異的な PABPC2 に直接結合すること、②PABPC2 が MIWI と同様 RNA 関連因子が濃縮されている精細胞特異的生殖顆粒であるクロマトイドボディにも存在すること、③PABPC2 がプロタミンなどの半数体特異的 mRNA の翻訳抑制が解除される伸長精細胞で MIWI と同調して消失すること、④PABPC1 と MIWI がともにポリソームに分布することなどを明らかにしており、MIWI の翻訳への関与が十分に考えられた。また、クロマトイドボディ構成因子のうち精巣特異的な分子ならびに精巣特異的に発現するイントロンレス遺伝子はともに精子形成に必須であることが数多く報告されている。PABPC2 はどちらにも該当することから、精子形成に必須である可能性がきわめて高い。一方、PABPC1 と PABPC2 は MSY2 や MSY4 と同様、mRNP 画分にも分布する。申請者らは、MSY2 と MSY4 がこれら PABPC と結合することを明らかにしており、両者の生理的関連が示唆されている。

このような背景を鑑み、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、(1) MIWI が翻訳におよぼす影響、(2) 精巣特異的な PABPC2 の機能、(3) MSY2 および MSY4 の翻訳における機能、について明らかにすることを目的とした。

(1) MIWI が翻訳におよぼす影響・・・AGO サブファミリータンパク質は、miRNA を介して標的 mRNA の 3'-UTR に結合し、翻訳抑制ならびに mRNA 分解を引き起こす。これに対し、MIWI は piRNA とよばれる一群の低分子 RNA と結合する。これまで MILI や MIWI2 に

結合する piRNA は、*LINE1* などのレトロトランスポソンの発現抑制に関わっていることが明らかにされている。しかし、MIWI の欠損が精子形成不全にいたる理由や、MIWI が結合する piRNA 群の機能はわかっていない。申請者らは、MIWI が piRNA を介して標的 mRNA に結合し、AGO と miRNA による mRNA 分解や翻訳抑制と同様の機能を有しているのではないかと考えた。そこで、MIWI をレポーター RNA に強制的に結合させるような系を構築し、培養細胞を用いて機能解析を行うことを試みた。

(2) PABPC2 の機能解析・・・PABPC2 は精子形成過程のパキテン期精母細胞から球状精細胞にかけて発現し、伸長精細胞では消失する。PABPC2 は、*Pabpc1* mRNA のレトロポジションの結果生じたイントロンレス遺伝子に由来し、球状精細胞においては翻訳不活性な mRNP 画分のみならず RNA 関連因子が濃縮されているクロマトイドボディにも存在する。このように PABPC2 は、構成的に存在する PABPC1 とは異なる点が多く、また上述のような理由から精子形成に必須である可能性が高い。そこで、その翻訳におよぼす影響をレポーターアッセイを用いて検討するとともに、欠損マウスを作製し精子形成への関与を明らかにすることを試みた。

(3) MSY2 および MSY4 の翻訳における機能・・・プロタミンなどの半数体特異的 mRNA の 3'非翻訳領域に結合し、これら mRNA の保存と翻訳遅延に関わっていると考えられている MSY と MSY4 は、精巣において PABPC とともにおもに mRNP 画分に存在する。そこで、これら因子の翻訳抑制能について培養細胞系を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MIWI が翻訳におよぼす影響・・・MIWI をバクテリオファージの λ N ペプチドとの融合タンパク質 (λ N-MIWI) として、またレポーター遺伝子として λ N ペプチドが結合する部位である BoxB 配列 6 個をタンデムにホタルルシフェラーゼ mRNA (F-Luc) の ORF 下流に挿入した融合遺伝子 (F-Luc-6BoxB) を HEK293T 細胞で共発現させ、 λ N ペプチドの有無によるルシフェラーゼ活性の変化を調べた (λ N-tethering assay)。トランスフェクションコントロールとして、6BoxB 配列を含まないウミシイタケルシフェラーゼ (R-Luc) を用いた。また、R-Luc-6BoxB をレポーターとして、F-Luc をトランスフェクションコントロールに用いた組み合わせについても行った。各タンパク質の分布は、精巣抽出液をグリセロール密度勾配遠心により分画したのち、ウェスタンブロット法により検出した。

(2) PABPC2 の機能解析・・・ λ N-PABPC2 を F-Luc-6BoxB とともに HEK293T 細胞に共発現させた。トランスフェクションコントロールとして、6BoxB 配列を含まない R-Luc を用いた。 λ N ペプチドの有無によるルシフェラーゼ活性の変化を測定し、翻訳におよぼす影響を評価した。また、ノックアウトマウスを作製し、その精子形成や受精能について検討した。

(3) MSY2 および MSY4 の翻訳における機能・・・ λ N-MSY2 あるいは λ N-MSY4 を F-Luc-6BoxB とともに HEK293T 細胞に共発現させた。トランスフェクションコントロールとして、6BoxB 配列を含まない R-Luc を用いた。 λ N ペプチドの有無によるルシフェラーゼ活性の変化を測定し、翻訳におよぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) MIWI が翻訳におよぼす影響・・・MIWI を F-Luc-6BoxB レポーターRNA に強制的にリクルートさせた場合 (λ N-tethering assay)、AGO タンパク質と同様、その翻訳を抑制することが判明した。また、MIWI を構成する3つのドメイン (N 末端ドメイン、PAZ ドメイン、PIWI ドメイン) に分割し解析を行ったところ、PABPC 結合ドメインである N 末端ドメインと PIWI ドメインの2ヵ所が翻訳抑制能を有することが明らかとなった。さらに、これら2つのドメインは翻訳抑制因子である PAIP2 と直接結合することから、MIWI は標的 mRNA に PAIP2 をリクルートすることにより、翻訳を抑制することが推測された。AGO による翻訳抑制においては、GW182/TNRC6 がエフェクター因子として機能する。MIWI は GW182/TNRC6 と結合しないことから、PAIP2 がエフェクターとして機能することが十分に考えられた。事実、PAIP2A が精子形成に必須であることが2010年に報告されている。しかし、F-Luc-6BoxB の代わりに R-Luc-6BoxB を用いたところ、顕著な抑制効果は認められなかった。さらに、精巣抽出液をグリセロール密度勾配遠心により分画しそれらの分布を調べたところ、MIWI は PABPC と PAIP2 が存在する mRNP 画分にはほとんど存在しないことが明らかとなった。これらの結果から、MIWI はポリソームにも分布し、また *in vitro* のアッセイでは PABPC と PAIP2 と結合するが、実際には翻訳には関与していない可能性が高い。

(2) PABPC2 の機能解析・・・精巣特異的な PABPC2 は、PABPC1 と異なり翻訳不活性な mRNP 画分とクロマトイドボディにおもに存在することから、翻訳抑制的に働くことが

考えられた。 λ N-PABPC2 を F-Luc-6BoxB とともに HEK293T 細胞に共発現させた場合、予想に反しレポーターRNA の翻訳を活性化した。実際、PABPC2 は λ N ペプチドの有無にかかわらず、HEK293T 細胞においてポリソーム画分にも存在した。PABPC2 の機能を明確にするために、欠損マウスを作製したところ、その精子形成は野生型と同じように進行し、結果として正常に産仔を得ることができた。したがって、PABPC2 は精子形成において特別な機能は有していないことが考えられた。精巣特異的なイントロンレス遺伝子で精子形成に必須でない分子は異例であり、これまでに報告がない。

(3) MSY2およびMSY4の翻訳における機能・・・精巣においてMSY2とMSY4はmRNP画分に存在することから、mRNA保存と翻訳遅延にかかわっていると考えられている。 λ N-MSY2あるいは λ N-MSY4をF-Luc-6BoxBとともにHEK293T細胞で共発現させた場合、予想に反しレポーターRNAの翻訳を活性化した。これらのY-boxタンパク質は、PABPCと直接結合することから、この翻訳活性化効果はPABPCをリクルートするためであると考えられる。このことはまた、精巣においてY-boxタンパク質が翻訳抑制的に機能するためには、ほかに協働因子が必要であることを示唆している。特異的抗体の作製が完了したので、免疫沈降法等により相互作用因子の探索を行っている。

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 2件)

① Kanemori, Y., Ryu, J.-H., Sudo, M., Niida-Araida, Y., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Sugiura, S., Kashiwabara, S., and Baba, T.

Two functional forms of ACRBP/sp32 are

produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse

Biology of Reproduction, 88, 1-8 (2013) (査読有)

DOI: 10.1095/biolreprod.112.107425

② Akama, K., Horikoshi, T., Sugiyama, A., Nakahata, S., Akitsu, A., Niwa, N., Intoh, A., Kakui, Y., Sugaya, M., Takei, K., Imaizumi, N., Sato, T., Matsumoto, R., Iwahashi, H., Kashiwabara, S., Baba, T., Nakamura, M., and Toda, T.

Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme

Biochimica et Biophysica Acta, 1804, 1272-1284 (2010) (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.02.004

[学会発表] (計 17 件)

- ① ○山岡悠太郎、柏原真一、馬場 忠
Analysis of mice lacking testis-specific poly(A) polymerase, TPAP/PAPOLB
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日、マリンメッセ福岡(博多)
- ② ○柏原真一
ポリ(A)鎖関連因子の精子形成における役割
特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 5 回公開シンポジウム
2012 年 11 月 22 日、京都大学 (京都)
- ③ ○柏原真一
RNA 結合タンパク質による精子形成制御
特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 4 回公開シンポジウム
2011 年 11 月 18 日、千里ライフサイエンスセンター (豊中)
- ④ ○山岡悠太郎、石田和之、柏原真一、木村正紀、岩崎千恵子、田中文、馬場 忠
Testis-specific Argonaute protein MIWI mediates translational silencing in a GW182-independent manner
The 2nd World Congress on Reproductive Biology
2011 年 10 月 11 日、CAIRNS CONVENTION CENTRE (オーストラリア)
- ⑤ 石田和之、○柏原真一、木村正紀、田中文、岩崎千恵子、馬場 忠
Translational repression by testis-specific Argonaute protein PIWIL1

Cold Spring Harbor Meeting (Germ cells)

2010 年 10 月 6 日、Cold Spring Harbor Laboratory (ニューヨーク)

- ⑥ ○岩崎千恵子、柏原真一、石田和之、田中文、馬場 忠
miRISC におけるポリ A 鎖結合タンパク質の機能解析
第 12 回日本 RNA 学会年会
2010 年 7 月 28 日、一橋記念講堂 (東京)

[その他]
ホームページ等
<http://www.acroman.org/>

6. 研究組織
(1) 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