

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 アフリカツメガエル初期胚細胞の細胞分裂と生殖系列細胞の分化における
Xtr タンパク質の役割に関する研究
STUDIES ON THE ROLE OF XTR PROTEIN IN KARYOKINESIS PROGRESSION
OF EARLY EMBRYONIC CELLS AND IN GERMLINE CELL DEVELOPMENT IN
XENOPUS LAEVIS

熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学専攻 生命環境科学講座
(主任指導 安部眞一教授)

論文提出者 モハマド ゴーラム モスタファ
(Md. Golam Mostafa)

主論文要旨

In most multicellular organisms, the fertilized egg with totipotency undergoes repeated mitotic divisions to produce all the cells of the body. During this process, differentiating potency of most somatic cells becomes restricted. On the other hand, germ cells are believed to keep the totipotency because they can become a new individual by fusing with another germ cell. Therefore, the characteristic of the germ cell is a crucial problem that should be solved in the fields not only of Developmental Biology but also of Regenerative Medicine.

For obtaining a clue to understanding this characteristic, a novel gene, *Xtr* (*Xenopus* tudor repeat) has been previously found in *Xenopus laevis*. The transcriptional and translational products of this gene occur not only in the germ line cells but also in the early embryonic cells, which are thought to possess pluripotency yet. Previously by taking advantage of microinjection into eggs and embryos with anti-Xtr antibody for specifically inhibiting the Xtr function, it was demonstrated that depletion of the Xtr function caused the inhibition both of microtubule assembly around nucleus and of karyokinesis progression after prophase. This result suggested that mitotic cycle in germ line cells and early embryonic cells as well as meiotic cycle in germ line cells was regulated by a unique mechanism which does not exist in destined somatic cells. Although Xtr is thought to play an important role in this mechanism, how it controls these cell cycles remains largely unknown.

Since Xtr contains plural tudor domains which are known to associate with target proteins directly, Xtr-interacting proteins were investigated in this study by immunoprecipitation with an anti-Xtr monoclonal antibody (mAb) to understand the exact function of Xtr, and several specific protein bands were detected. By MS/MS analysis, at least 10 individual proteins were specifically identified. Among them, there was Y-box binding FRGY2, which is known to be a component of

messenger ribonucleoprotein (mRNP) particle as a repressor for maternal mRNA translation and to occur in the germline cells and in the early embryonic cells like Xtr. To investigate whether Xtr was also a member of the mRNP particle, gel filtration assay was carried out and Xtr (putative molecular mass is approximately 270kDa) as well as FRGY2 were detected in the void fraction (>1,500kDa). Immunoprecipitation of Xtr from this fraction with anti-Xtr mAb clearly showed the interaction of Xtr with FRGY2. These results suggested that Xtr and FRGY2 constituted an mRNP particle.

The search of mRNAs in the immunoprecipitate with anti-Xtr mAb followed by reverse transcription, cDNA amplification, cloning and screening of cDNA libraries suggested that the Xtr associated molecules included several mRNAs, which have already been reported with the putative functions of their translational products. Most of them are related to cell cycle (RCC1, XRHAMM, XL-INCENP, XMAD2, and Mi-2). Along with them, a germ plasm-specific mRNA, XDead end mRNA, was also detected. The association between Xtr and these mRNAs was further confirmed by conventional RT-PCR using gene-specific primers that were designed at their open reading frames. To clarify the state of Xtr-FRGY2 interaction, the homogenates were treated with RNase A, followed by immunoprecipitation of Xtr from them. Although RNase A treatment caused the complete degradation of RNA in the homogenates, Western blot analysis of the anti-Xtr-immunoprecipitates showed the interaction of Xtr with FRGY2 in both homogenates treated with and without RNase A. This result suggested that Xtr-FRGY2 interaction was not mediated by RNA.

Immunohistochemical observation clearly showed the co-localization of Xtr with FRGY2 also in germ plasm, in which XDead end mRNA has been reported to be localized specifically. On the other hand, distribution of Xtr in other cytoplasmic areas could not be clarified because of high background by autofluorescence of the yolk. To examine the presence of Xtr in other areas besides germ plasm, homogenates were prepared separately from animal half (lack of germ plasm) and vegetal half for immunoprecipitation of Xtr. Western blot analysis of the immunoprecipitates with anti-Xtr mAb revealed the presence of Xtr in animal half as well as vegetal half, along with the showing of Xtr-FRGY2 interaction. These results suggested that Xtr was distributed all over the embryo and especially accumulated in germ plasm at high concentration.

To understand the state of Xtr-FRGY2 interaction before and after fertilization and during cell cycle, the amount of FRGY2 that interacted with Xtr was compared in the unfertilized eggs and in the fertilized eggs at different intervals after insemination. Although no striking difference was observed among them, a part of Xtr was degraded upon fertilization of the eggs, suggesting that this degradation may be related to the function of Xtr because previous experiments have shown that Xtr does not act in the unfertilized eggs.

Taken together, the findings of the present study suggested the possible role of Xtr in translational activation of the maternal mRNAs repressed by FRGY2 in mRNP particle for the regulation of karyokinesis progression as well as the germ cell development.

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) で見出された新規遺伝子 *Xtr* (*Xenopus tudor repeat*) は生殖系列の細胞だけで発現しており、生殖細胞の分化や特性に関与しているのではないかと予想されている。その転写産物および翻訳産物は、生殖系列細胞のみならず、卵形成期に合成されたものが母性因子として初期胚細胞にも存在しているが、分化した体細胞には存在しない。中和抗体を用いた *Xtr* の機能阻害により、少なくとも減数分裂や初期胚細胞の細胞分裂の制御に関与していることが示されてきた。しかし、その具体的な作用機序や生殖細胞の分化・特性との関わりについては明らかにされていなかった。

Xtr は、複数の tudor ドメインを含んでいるのが特徴である。tudor ドメインは、標的タンパク質と結合することでタンパク質間の相互作用において重要な働きをすることがわかっている。このことから、*Xtr* も他のタンパク質との相互作用を通して機能している可能性がある。そこで本研究は、*Xtr* と相互作用する分子の探索を通して *Xtr* の作用機序について明らかにすることを目標とした。まず、抗 *Xtr* モノクローナル抗体を用いて受精卵ホモジェネートから *Xtr* を免疫沈降し、この *Xtr* と共に沈殿してくるタンパク質の探索を行った。免疫沈降産物の LC-MS/MS 解析により、FRGY2 や Vg1 RNA binding protein variant D 等の 10 種類のタンパク質を見出すことに成功した。FRGY2 は、卵母細胞において母性 mRNA に結合して messenger ribonucleoprotein (mRNP) を形成し、母性 mRNA の翻訳を抑制しているタンパク質である。また、*Xtr* と同じく生殖細胞や初期胚細胞に存在することが示されていた。そこで、*Xtr* と FRGY2 の相互作用について焦点をあて解析することにした。上述したように FRGY2 は mRNA 構成因子であることから、免疫沈降産物に mRNA が存在すると予想し、その探索を行った。mRNA の逆転写産物をクローニングした後に 140 クローンについて解析したところ、27 種類の mRNA を見出した。興味深いことに、これらの中に、RCC1、XRHAMM、XL-INCENP、XMAD2、Mi-2 といった細胞分裂制御に関わるタンパク質をコードするものが含まれていた。また、生殖質に局在し生殖細胞分化に重要な働きをしている XDead end の mRNA も含まれていた。免疫沈降産物に mRNA が存在していたことから、*Xtr* も mRNP の構成因子の 1 つである可能性が示唆されたので、そのことを検証するために Sephacryl S-300 HR を用いたゲルろ過を行った。その結果、分画限界である 1,500 kDa 以上の画分に *Xtr* と共に FRGY2 や mRNA が相互作用した状態で溶出されてきた。この結果から、*Xtr* も mRNP の構成因子の 1 つであることが強く示唆された。RNase A で前処理したホモジェネートから *Xtr* を免疫沈降したところ、*Xtr* と共に FRGY2 も検出できたことから、これら 2 つのタンパク質の相互作用は mRNA を介していないことも明らかにした。免疫沈降産物に含まれていた XDead end mRNA は、卵割期胚において生殖質に局在していることが既に報告されていた。そこで、*Xtr* と FRGY2 の生殖質への局在を免疫組織化学的に調べたところ、周りの細胞質領域に比べて高い密度で局在していることが明らかになった。生殖質には生殖細胞分化に関わるタンパク質をコードする mRNA が多く局在しており、その翻訳制御は生殖細胞分化にとって重要である。*Xtr* が細胞分裂制御や生殖細胞分化に重要なタンパク質をコードする mRNA と相互作用していること、および *Xtr* の機能を阻害すると細胞分裂が停止することを合わせて考えることにより、*Xtr* はこれら mRNA の翻訳制御を通して、細胞分裂や生殖細胞分化に重要な働きをしていることが示唆された。

細胞分裂周期における Xtr と FRGY2 の相互作用について、受精前後、および第一分裂が終了するまでの各ポイントで調べたところ、Xtr と相互作用している FRGY2 の量的変動は観察されなかった。興味深いことに、受精後 30 分たった胚から調整したホモジェネートの中に未受精卵では見られなかった Xtr の部分分解産物が検出され、この部分分解産物はその後も存在し続けた。未受精卵は休止した状態の細胞であることから、受精後にみられる Xtr の部分分解は、Xtr の活性化と深く関わっていると予想された。