

领域前沿·中国



刘默芳，中国科学院生物化学与细胞生物学研究所研究组长(PI)、研究员、国家杰出青年科学基金获得者(2013年)、上海市优秀学术带头人(2016年)、科技部国家重点研发计划项目首席科学家(2017年)、入选“国家百千万人才工程”(2017年)和国家“万人计划”科技创新领军人才(2018年)等。刘默芳研究员主要从事非编码RNA功能机制研究，围绕piRNA与精子发生、miRNA与癌症等开展系统性探索，获得了前沿性进展，已发表论文50多篇，包括以通讯/共通讯作者在国际顶级学术期刊*Cell*及子刊等发表论文20多篇。这些原创性研究成果揭示了小分子非编码RNA的生理和病理功能机制，可为男性不育症及肿瘤等疾病的诊治研究提供理论依据和相关基础。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=135>

MIWI/piRNA激活小鼠精子细胞mRNA翻译的新功能机制研究

戴鹏 刘默芳*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 哺乳动物减数分裂后期的精子发生(spermatogenesis)，即精子形成(spermiogenesis)，是一个剧烈的细胞形态变化过程。伴随精子细胞中细胞核压缩和染色质重构，基因转录活性将逐渐降低直至完全停止，那些为精子细胞后期阶段发育所需的基因都需要提前转录为信使核糖核酸(mRNA)，然后以翻译抑制状态储存在精子细胞中，直到特定发育阶段再被激活翻译，以合成蛋白质发挥作用。这个现象被称为“转录-翻译解偶联”，是精子发生中基因表达调控的一个典型特征。然而，目前对于精子细胞中被抑制的mRNA是如何被翻译激活的还知之甚少。我们当前的这项研究发现，MIWI/piRNA通过与翻译起始因子eIF3f、RNA结合蛋白HuR等因子形成功能性翻译激活复合物，特异地激活小鼠精子细胞中包含AU序列富含元件(AU-rich element, ARE) mRNA的翻译。此项研究揭示了PIWI/piRNA在精子细胞翻译激活中的新功能，并证明此功能为精子细胞发育和功能性精子生成所必需。

关键词 PIWI; MIWI; piRNA; eIF3f; HuR; 翻译激活; 精子形成

The Study of MIWI/piRNA-Mediated mRNA Translational Activation during Mouse Spermiogenesis

DAI Peng LIU Mofang*

科技部重大研发项目(批准号: 2017YFA0504400)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921146, E-mail: mfliu@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFA0504400)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921146, E-mail: mfliu@sibcb.ac.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5168>

(Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology,
Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Development of post-meiotic male germ cell cells in animals is known as a complex biochemical and morphological process, which is termed as spermiogenesis. Chromatin condensation results in a drastic inhibition of transcriptional activity in late stages of haploid spermatids, and genes that are required for spermiogenesis need to be transcribed in advance and stored as mRNAs in earlier stages of germ cells. However, it remains largely unclear how such repressed mRNAs become activated during spermiogenesis. Here, we unexpectedly discovered that MIWI/piRNA/eIF3f/HuR super-complex is responsible for activating translation of a subset of sperniogenic mRNAs containing cis-acting AU-rich elements. These findings reveal a critical role of the PIWI/piRNA in translation activation, which is functionally required for spermatid development.

Keywords PIWI; MIWI; piRNA; eIF3f; HuR; translational activation; spermiogenesis

1 相关研究背景介绍

哺乳动物的精子发生在减数分裂以后即进入剧烈的细胞形态变化期,此过程被称为精子形成(spermiogenesis),将伴随顶体和鞭毛形成、细胞核压缩和细胞质丢弃等事件。在小鼠中,精子形成被划分为16个连续转化步骤,包括球形精子细胞(round spermatid, 第1~8步)、延长型精子细胞(elongating spermatid, 第9~10步)、长形精子细胞(elongated spermatid, 第12~14步)和精子(spermatozoa, 第15~16步)^[1-2]。这些连续转化的发育步骤受到精子细胞中一系列高度特化表达基因的协同调控。在单倍体精子细胞演变为精子的过程中,伴随精子细胞形态变化和染色质压缩,细胞核内的基因转录活动将逐渐减少直至完全停止,那些为精子细胞后期阶段发育所需的基因都需要提前转录为信使核糖核酸(mRNA),然后以翻译抑制状态储存在精子细胞中,直到特定发育阶段再被激活翻译,以合成蛋白质发挥作用^[3-4]。这就是精子形成过程中经典的“转录-翻译解偶联”现象,但如何激活这些被抑制的mRNA从而完成蛋白翻译?这一直是生殖生物学中的一个不解之谜。

piRNA是动物生殖细胞中特异性表达的一类小分子非编码RNA,通过与生殖细胞特异性表达的PIWI蛋白结合,可在表观遗传和转录后水平沉默基因组中的转座子等移动性遗传元件,从而维持生殖细胞基因组的稳定性和完整性;此外,PIWI/piRNA还可以在转录后水平负调控生殖细胞中蛋白编码基因的表达^[5-6]。在研究组前期研究中,我们发现,小鼠PIWI(MIWI)/piRNA通过招募脱腺苷酸酶CAF1等

因子,以类似miRNA的机制,介导小鼠后期精子细胞中大量mRNA的降解和清除^[7]。在利用报告基因筛选鉴定piRNA靶基因过程中,我们意外地发现,一些靶基因的表达受到对应piRNA的激活,并证明了piRNA具有激活mRNA翻译的新功能。这种激活功能具有什么生物学意义?MIWI/piRNA是否参与了精子细胞中“转录-翻译解偶联”和翻译激活调控?为回答这些问题,我们开展了以下研究。

2 piRNA通过不完全互补配对的方式并协同MIWI蛋白激活靶mRNA翻译

我们发现,piRNA可以正调控靶mRNA表达,却不影响其稳定性,这表明,piRNA可能是在翻译水平上激活靶mRNA表达。我们首先探究piRNA是否通过碱基配对方式激活靶mRNA翻译。为此,我们将靶mRNA 3'UTR报告基因中预测的7~8 nt长度piRNA结合位点进行缺失突变。双荧光素酶报告基因分析发现,突变报告基因不再受到piRNA的激活,证明piRNA:mRNA碱基配对对此激活作用是必需的。与piRNA具有激活翻译作用一致的是,蔗糖密度梯度离心实验发现,piRNA可以促进靶mRNA从核糖核蛋白组分向多聚核糖体组分迁移。接着,我们探索了作为piRNA结合蛋白的MIWI是否参与piRNA介导的翻译激活?MIWI CLIP数据表明,MIWI在靶mRNA的piRNA预测识别位点处存在结合;当Miwi表达被敲低后,piRNA对靶mRNA表达的促进作用被明显削弱;而当高表达Miwi时,piRNA对靶mRNA表达的促进作用被显著增强。这些实验结果表明,piRNA可通过不完美配对识别靶mRNA

3'UTR序列，并协同MIWI蛋白在翻译水平激活靶基因的表达。

3 eIF3f蛋白参与MIWI/piRNA对靶mRNA的翻译激活

为进一步探究MIWI/piRNA激活靶mRNA翻译的分子机制，我们利用酵母双杂交技术及免疫共沉淀实验，筛选并确认了真核翻译起始因子3f(eukaryotic initiation factor 3f, eIF3f)与MIWI直接相互作用。双荧光素酶报告基因分析发现，*eIF3f*敲低明显削弱了piRNA对靶mRNA表达的促进作用，而高表达*eIF3f*则显著增强了piRNA激活作用。上述实验结果表明，eIF3f蛋白为MIWI/piRNA在翻译水平促进靶基因表达所必需。

4 AU-rich元件(AU-rich element, ARE)和ARE结合蛋白HuR为MIWI/piRNA激活靶mRNA翻译所必需

我们之前的研究发现，MIWI/piRNA通过招募脱腺苷酸酶CAF1等因子诱导靶mRNA的降解^[7]，而当前的研究又发现，MIWI/piRNA通过与翻译起始因子eIF3f结合而激活靶mRNA的翻译。是何种因素决定了MIWI/piRNA对靶mRNA发挥截然相反的两种调控作用？通过对靶mRNA 3'UTR序列分析，我们发现，在被piRNA激活翻译的5个靶mRNA的3'UTR序列中都含有AU-rich元件(AU-rich element, ARE)。当去除ARE序列后，piRNA就不再对相应的靶mRNA发挥翻译激活作用了。*Grk4*是我们早期发现被piRNA负调控的靶基因^[7]。非常有趣的是，我们发现，将ARE插入*Grk4*靶基因3'UTR的适当位置，就能成功地把piRNA的抑制作用转换为激活作用，再次证明ARE是piRNA激活所需的顺式元件。

接下来，我们分析了ARE元件结合蛋白——HuR在piRNA激活翻译过程中的作用。作为ELAV/HuR蛋白家族的成员，HuR在各组织中普遍表达。已有研究发现，HuR通过特异性结合mRNA 3'UTR序列中的ARE序列，在小鼠的精子形成过程中调控靶mRNA从拟染色体向多聚核糖体的迁移，暗示HuR在精子细胞翻译激活中发挥作用^[8-9]。为鉴定HuR在MIWI/piRNA激活靶mRNA翻译中的贡献，我们首先通过RNA免疫沉淀分析，发现HuR可以特异地结合被piRNA激活翻译的5个靶mRNA。进一步，我们

发现，HuR以一种RNA依赖的方式与MIWI和eIF3f相互作用。更为重要的是，我们发现敲低*HuR*可导致piRNA激活作用丧失。这些实验结果共同表明，ARE结合蛋白HuR参与了MIWI/piRNA介导的靶基因翻译激活。

5 MIWI和HuR在睾丸组织中与多种翻译相关蛋白相互作用

为了解MIWI/piRNA是否在体内调控翻译激活及如何激活翻译，我们通过免疫沉淀结合质谱技术，分析了睾丸组织裂解液及多聚核糖体组分中的MIWI、HuR复合物。我们发现，MIWI和HuR均可以结合大量翻译起始相关因子。特别是，HuR不仅结合翻译起始因子eIF4G3，还促进MIWI与poly(A)结合蛋白-PABPC1相互作用。基于这些发现，我们推测，MIWI/piRNA和eIF3f、HuR等形成功能复合物，可能通过促进翻译起始阶段mRNA“环(loop)”结构的形成，激活了靶mRNA翻译。

6 piRNA激活功能为精子细胞中的靶mRNA翻译所必需

我们接下来鉴定这种新发现的piRNA激活功能是否调控内源靶基因的翻译？我们通过qPCR及Western blot实验，发现以上验证的piRNA激活靶基因均已再小鼠精母细胞中被转录了，但仅在单倍体精子细胞才被有效翻译，提示这些靶基因受控于“转录-翻译解偶联”调控。随后，我们分别鉴定了MIWI和HuR在这些靶基因表达中的作用。通过shRNA慢病毒睾丸转导技术，我们敲低了精子细胞的*Miwi*或*HuR*表达，发现受piRNA靶基因调控的mRNA水平没有明显变化，但蛋白水平明显降低，表明MIWI和HuR为这些靶基因在精子细胞中的翻译激活所必需。

我们进一步探索了MIWI-eIF3f相互作用在piRNA靶基因翻译中的作用。我们发现，位于MIWI蛋白N-端的10个氨基酸(111~120 aa)是其与eIF3f相互作用的关键区域，含有这10个氨基酸的MIWI蛋白N-端短肽MIWI-N2可以有效竞争全长MIWI与eIF3f的相互作用。基于此，我们通过慢病毒转导技术在小鼠球形精子细胞中外源表达了MIWI-N2短肽，发现该短肽可显著抑制piRNA靶基因的翻译，表明MIWI-eIF3f相互作用为piRNA靶基因翻译所必需。这些研

究结果共同证明, 我们新发现的piRNA激活功能对piRNA靶基因在精子细胞中的翻译至关重要。

7 MIWI/piRNA激活基因为顶体发育所必需

为探索该MIWI/piRNA新调控作用在精子形成中的生物学功能, 围绕对顶体组装至关重要的两个靶基因*Agfg1*和*Tbpl1*^[10-11], 我们鉴定了该调控作用对小鼠精子顶体发育的贡献。我们发现, 从*Miwi*敲低精子细胞衍生而来的精子, 其顶体发生了严重缺陷; 而在*Miwi*敲低精子细胞中恢复*Agfg1*和*Tbpl1*的表达, 可有效拯救精子的顶体缺陷, 证明MIWI/piRNA介导的翻译激活作用为精子细胞发育过程中的顶体组装所必需。

我们还进一步分析了精子细胞中有多少基因的翻译受到MIWI/piRNA的调控? 通过对野生型和*Miwi*敲除小鼠睾丸组织的核糖体印迹测序和定量蛋白组分析, 我们发现, *Miwi*敲除后有大量mRNA的翻译效率出现下调。结合MIWI CLIP及含有HuR结合位点的mRNA数据的分析, 发现MIWI/piRNA复合体可能至少直接参与了601靶基因的表达调控。此外, 通过半定量微量细胞质谱技术, 我们发现, 精子细胞中有大量蛋白的表达依赖于MIWI或/和HuR。

8 总结及科学意义

在本研究中, 我们首先从之前工作意外发现的piRNA激活靶基因表达这一现象入手, 研究并发现piRNA以不完全互补配对的方式识别靶mRNA 3'UTR序列, 并协同MIWI、eIF3f、HuR等蛋白, 在翻译水平激活靶基因的表达。随后, 通过一系列体内体外实验, 我们发现, MIWI/piRNA/eIF3f/HuR可调控精子细胞中大量mRNA的翻译, 并证明该机制为小鼠精子形成中的顶体组装所必需。该研究工作

发现, MIWI/piRNA介导精子细胞中翻译激活, 不仅为解析精子形成过程中“转录-翻译解偶联”这个重要生物学问题提供了新线索, 还将有助于揭示精子形成障碍的致病机理, 并可为相关男性不育症的临床诊断治疗提供理论依据和方法技术。

参考文献 (References)

- [1] YAN W. Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 306(1/2): 24-32.
- [2] MEISTRICH M L, HESS R A. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules [J]. Methods Mol Biol, 2013, 927: 299-307.
- [3] STEGER K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids [J]. Anat Embryol (Berl), 1999, 199(6): 471-87.
- [4] SASSONE-CORSI P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis [J]. Science, 2002, 296(5576): 2176-8.
- [5] KLATTENHOFF C, THEURKAUF W. Biogenesis and germline functions of piRNAs [J]. Development, 2008, 135(1): 3-9.
- [6] OZATA D M, GAINETDINOV I, ZOCH A, et al. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(2): 89-108.
- [7] GOU LT, DAI P, YANG J H, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis [J]. Cell Res, 2014, 24(6): 680-700.
- [8] NGUYEN-CHI M, AURIOL J, JE'GOU B, et al. The RNA-binding protein ELAVL1/HuR is essential for mouse spermatogenesis, acting both at meiotic and postmeiotic stages [J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(16): 2875-85.
- [9] NGUYEN-CHI M, CHALNE F, AGIUS E, et al. Temporally regulated traffic of HuR and its associated AREcontaining mRNAs from the chromatoid body to polysomes during mouse spermatogenesis. PLoS One, 2009, 4(3): e4900.
- [10] KANG-DECKER N, MANTCHEV G T, JUNEJA S C, et al. Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice [J]. Science, 2001, 294(5546): 1531-3.
- [11] ZHANG D, PENTTILA T L, MORRIS P L, et al. Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene [J]. Science, 2001, 292(5519): 1153-5.