

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15967

研究課題名(和文) RNA制御を介した精原細胞分化の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of RNA mediated molecular mechanisms of spermatogonial differentiation

研究代表者

井上 弘貴 (Inoue, Hiroki)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：20807812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞を含む精原細胞集団においてNANOS3はより分化した細胞集団で発現することが知られている。本研究では精原細胞のモデルとして対外培養可能なGS細胞を使用してNANOS3の分子機構について解析を行った。NANOS3と相互作用するたんぱく質、および標的RNAを網羅的に探索することで、NANOS3がmRNAの翻訳に係るたんぱく質と相互作用すること、標的RNAの候補を明らかにした。さらに、NANOS3の欠損GS細胞の解析により、標的RNAの候補の中からNANOS3の下流で制御される因子で精原細胞の分化に係りうる遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NANOS3は精原細胞だけではなく始原生殖細胞の生存にも関わることが知られている。しかしながら、これらの細胞は生体内でもごく少数であるため相互作用因子や標的遺伝子の網羅的探索は行われていなかった。本研究ではGS細胞を精原細胞のモデルとして使用することで、網羅的探索を可能にし、NANOS3の分子機構について多くの手がかりを得ることができた。今後これらの解析をもとに、下流の因子を解析することで、NANOS3によるRNA制御を介した精原細胞の分化運命決定機構の解明に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that NANOS3 is expressed in the spermatogonial progenitor. In this study, to analyze the NANOS3 molecular function, we used GS cells as a model of spermatogonia. Our NANOS3 IP Mass spec analysis and NANOS3 RIPseq analysis suggested that NANOS3 interacts with the factors related to the mRNA translation and identified the candidates of NANOS3 target mRNA. We also found a candidate gene, which is indicated to be a transcript factor expressed in differentiated spermatogonia, is differentially expressed in Nanos3 KO GS cells.

研究分野：生殖細胞

キーワード：生殖細胞 RNA結合たんぱく質 NANOS3 GS細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精原細胞は一生涯にわたり精子を産生し続ける機構を備えており、維持機構には未分化型精原細胞の自己増殖および適切な分化制御機構が重要である。未分化型精原細胞はより未分化な GFR α 1 陽性細胞と比較的分化した NGN3 陽性細胞の2種類の細胞で構成されている。GFR α 1 陽性細胞は NGN3 陽性細胞を供給しながら自己増殖を行うことで精原細胞集団の維持を行う。NGN3 陽性細胞は体細胞分裂により増殖しレチノイン酸刺激により分化型精原細胞へと移行する細胞を量的に担保している。分化した細胞は一定回数分裂した後、減数分裂へと移行し精子へ至る。すなわち精子生産量は分化する NGN3 陽性細胞の量に依存する。しかしながら、NGN3 陽性細胞の増殖、分化の分子機構についてはほとんどわかっていない。以上のことから未分化型精原細胞の分化制御機構の解明は生物学的に重要な課題であるとともに、不妊治療などの医療分野への応用も期待されている。

Nanos3 は *Nanos* ファミリーに属する RNA 結合たんぱく質であり、NGN3 陽性細胞で発現することが分かっている。これまでの研究代表者らの解析から、生後における *Nanos3* の欠損は未分化型精原細胞の分化を促進する転写因子 STRA8 の脱抑制および NGN3 陽性細胞の減少を引き起こすことが分かっている。そのため、*Nanos3* は NGN3 陽性細胞の分化の抑制を行うことで未分化型精原細胞の適切な増殖に寄与していると考えられる。しかしながら、*Nanos3* の分子機構についての知見はほとんどない。

本研究では、未分化型精原細胞の自己増殖、分化の運命を決定する機構は何か、という問いに対して RNA 制御を介した精原細胞分化の分子機構という観点から研究を行う。

2. 研究の目的

NANOS3 は RNA 結合たんぱく質として知られているが、その分子機構はほとんどわかっていない。その理由として NANOS3 の発現が初期の始原生殖細胞および NGN3 陽性細胞のみに限定されていることが挙げられる。どちらの細胞も生体内ではごく少数しか存在しないため、相互作用因子の探索や標的 RNA の同定など生化学的な解析を行うことが困難であった。そこで本研究では未分化型精原細胞のモデルとして体外培養が可能な germline-stem cell (GS 細胞) を用いた NANOS3 の相互作用因子および標的 RNA の同定と機能解析を行うことで、未分化精原細胞の増殖、分化過程における NANOS3 の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) *Nanos3* 欠損の表現型解析

Nanos3 の欠損は NGN3 陽性細胞の減少を引き起こす。そのため、まず 4-OHT 添加により *Nanos3* の欠損 (KO) する GS 細胞を樹立し、*Nanos3* 欠損条件下における GS 細胞の増殖速度、細胞の構成比及び分化誘導効率を解析し、培養条件下においても *Nanos3* の発現変動が NGN3 陽性細胞に影響を与えることを定量 PCR により NGN3 陽性細胞マーカーを定量することで確認した。そして各条件下での遺伝子発現を RNA-sequence (RNA-seq) により網羅的に解析した。中でも精細胞マーカーおよび細胞増殖に関与する遺伝子に着目し *Nanos3* が関与する経路を推測し、また方法 (3) におけ

る標的 RNA の同定に利用するため発現量が変動する遺伝子のリストを作成した。

(2) NANOS3 の相互作用因子の網羅的探索と機能解析

RNA 結合たんぱく質は RNA の代謝を行うため他の RNA 結合たんぱく質と複合体を形成することが知られている。現に Nanos ファミリーの NANOS2 も DND1 や CNOT などのたんぱく質と複合体を形成することで、標的 RNA の抑制に関与していることが知られている (Suzuki et al., 2016)。そのため NANOS3 の機能を解明する上で相互作用因子の同定は不可欠である。そこで 3xFLAG-Nanos3 を発現させた GS 細胞に対する免疫沈降産物を質量分析し、NANOS3 の相互作用因子の網羅的な探索を行った。質量分析により作成したリストから RNA 結合ドメインを有する因子から優先的に NANOS3 との共免疫沈降を行い相互作用することを確認した。

(3) NANOS3 の標的 RNA の網羅的探索と機能解析

NANOS3 の標的 RNA を同定するため *Nanos3* OE GS 細胞に対して RNA 免疫沈降の RNA-seq (RNA immunoprecipitation sequence: RIP-seq) 解析を行い、NANOS3 と相互作用する RNA を同定した。中でも方法 (1) で行った RNA-seq のデータから NANOS3 発現量の操作による影響を受ける遺伝子に絞り込みを行った。

4 . 研究成果

本研究では精原細胞の分化運命決定機構の解明に資することを目的として、GS 細胞をモデルとして使用し、RNA 結合たんぱく質 NANOS3 の分子機構に着目して解析を行った。4 - OHT 添加により *Nanos3* を欠損する *Nanos3* cKO GS 細胞を樹立し、GS 細胞における *Nanos3* の機能を解析したところ、*Nanos3* を欠損した GS 細胞では増殖速度の著しい低下がみられた。このことから NANOS3 は GS 細胞においても重要な役割を果たしていることが示唆された。*Nanos3* 欠損は *Nanos2* によって補われることが *in vivo* での解析の結果明らかになっているが、本研究の結果は、NANOS2 が発現する GS 細胞においても *Nanos3* 欠損の表現型が見られることから、NANOS3 には NANOS2 の発現により補完できない NANOS3 固有の機能がある可能性が示唆された。次に NANOS3 の相互作用因子の網羅的解析により、NANOS3 と相互作用する 93 たんぱく質を候補因子として同定した。候補因子の多くは翻訳にかかわるたんぱく質と相互作用していることから NANOS3 は翻訳の制御にかかわることが示唆され、これは既知の NANOS3 の解析結果とも矛盾しない結果であった。NANOS3 の RIP-seq 解析による NANOS3 標的 RNA の網羅的解析では、NANOS3 の標的となりうる候補遺伝子を同定した。さらに *Nanos3* 欠損 GS 細胞の RNA-seq を行い、NANOS3 の標的候補因子の中から *Nanos3* の欠損により変動する遺伝子について絞り込みを行った。今後、これらの因子の中から *Nanos3* の制御を受ける因子とその機能を解析することで *Nanos3* の GS 細胞における分子機能を解明できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Hiroki, Sakurai Takayuki, Hasegawa Kazuteru, Suzuki Atsushi, Saga Yumiko	4. 巻 11
2. 論文標題 NANOS3 suppresses premature spermatogonial differentiation to expand progenitors and fine-tunes spermatogenesis in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.059146	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 井上 弘貴, 桜井 隆順, 相賀 裕美子
2. 発表標題 マウスNANOS3は精祖細胞の適切な分化タイミングの制御に必要である
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Inoue and Yumiko Saga
2. 発表標題 Analysis of NANOS3 function in mouse germline stem cells.
3. 学会等名 53th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上弘貴, 相賀裕美子
2. 発表標題 マウスgermline stem cellsを用いたNANOS3の機能解析
3. 学会等名 第113回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Inoue, Takayuki Sakurai, Danelle Wright and Yuniko Saga
2. 発表標題 NANOS3 is required for proper expansion of spermatogonial progenitors in mice.
3. 学会等名 52th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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