

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24年3月31日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770169

研究課題名（和文） 生殖細胞の雄性分化を制御する RNA 分子機構 -Nanos2 蛋白質を中心として-

研究課題名（英文） Molecular mechanism of male-type differentiation in mouse germ cells

研究代表者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)

横浜国立大学・学際プロジェクト研究センター・特任教員（助教）

研究者番号：60467058

研究成果の概要（和文）：本研究においては、NANOS2タンパク質とCCR4-NOT deadenylation complexの結合様式の解析を行った。その結果、CNOT1をNANOS2と直接結合する因子として同定した。また、この結合にはNANOS2のN末10アミノ酸が必須であることを明らかにした。最後に、CCR4-NOT脱アデニル化酵素複合体と結合出来ないNANOS2をトランスジェニックで発現させたところ、Nanos2ノックアウトマウスの表現型を全くレスキュー出来ないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： In our present study, we identify CNOT1, a component of the CCR4-NOT deadenylation complex, as a direct factor mediating the interaction with NANOS2. We find that the first 10 amino acids (AAs) of NANOS2 are required for this binding. We further observe that a NANOS2 mutant lacking these first 10 AAs (NANOS2-ΔN10) fails to rescue defects in the *Nanos2*-null mouse. Our current data thus indicate that the interaction with the CCR4-NOT deadenylation complex is essential for NANOS2 function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA, 生殖細胞, 発生, マウス

1. 研究開始当初の背景

マウスの生殖細胞は、受精後約7日目に胚体外に40個ほどの集団として発生した後に増殖しながら移動し、将来の生殖巣へと到達す

る。移動期の生殖細胞は卵にも精子にも分化する能力を持つが、生殖巣に到達すると体細胞側の性に従って分化する。すなわち、雌の生殖細胞は減数分裂に移行するのに対して、

雄の生殖細胞は細胞周期を停止する。

NANOS2 タンパク質はマウス雄性生殖細胞に特異的に発現し、その雄性化に重要な役割を果たす RNA 結合タンパク質である。その分子機構としては、CCR4-NOT deadenylation complex と結合して特定の mRNA の脱アデニル化を誘導すると考えられている。しかしながら、NANOS2 タンパク質と CCR4-NOT deadenylation complex の結合の生化学的な分子機構や、その生理的意義については未だに不明である。

2. 研究の目的

そこで、本研究においては、NANOS2 と CCR4-NOT 脱アデニル化複合体との結合様式の解析を行うこととした。また、CCR4-NOT 脱アデニル化複合体と結合出来ない NANOS2 をトランスジェニックにより生体内に発現させることにより、両者の結合の生理的意義についても解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) NANOS2 と CCR4 脱アデニル化酵素との結合解析

CCR4-NOT 脱アデニル化複合体の全ての構成因子をクローニングし、GST タグとの融合タンパク質として大腸菌に発現させた。ただし、CNOT1 のみは非常に大きいタンパク質であることから 3 つの断片に分けて発現させた。一方で、MBP タグ融合型 NANOS2 も同時に大腸菌に発現させた上で精製し、両者の結合の有無について *in vitro* で解析を行った。

また、この結合に必須な NANOS2 のアミノ酸配列を同定するために NANOS2 の欠損変異体を精製し、同様の実験系で結合解析を行った。

(2) NANOS2 と CCR4-NOT 脱アデニル化複合体との結合の生理的意義の解析

CCR4-NOT 脱アデニル化複合体との結合に必須な N 末の 10 アミノ酸配列を欠損した NANOS2 (NANOS2- Δ N10) の N 末に 3×FLAG タグを付与した上で Nanos2 エンハンサーの下流につないだトランスジェーンを作製した。これを、マウス受精卵の前核にインジェクションした上で偽妊娠させた雌マウスに移植し、産まれた子供をトランスジェーンに特異的なプライマーで PCR することによってトランスジェニックマウスを得た。このトランスジェーンを交配によって Nanos2 ノックアウトの遺伝的バックグラウンドに導入し、表現型を解析した。

(3) NANOS2- Δ N10 の細胞内局在の解析

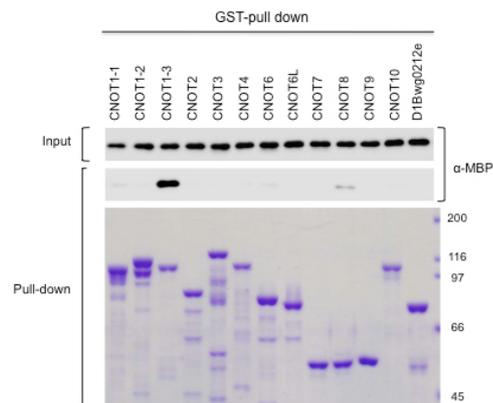
NANOS2- Δ N10 を Nanos2 ノックアウトマウスの遺伝的背景に導入した胎児期雄性生殖巣

の切片を作製し、NANOS2 抗体で免疫染色を行った。その際、NANOS2 が局在する P-body のマーカータンパク質と共染色することにより、NANOS2- Δ N10 タンパク質の細胞内局在を解析した。

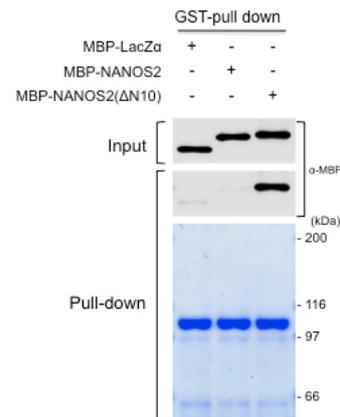
(4) NANOS2- Δ N10 の結合 RNA の解析
NANOS2- Δ N10 を FLAG 抗体で免疫沈降し、共沈殿する RNA を qRT-PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) 上述のように GST pull-down assay によって全ての CNOT タンパク質と NANOS2 との結合を解析したところ、下図のように NANOS2 は CNOT1 の C 末端と直接結合することが明らかになった。

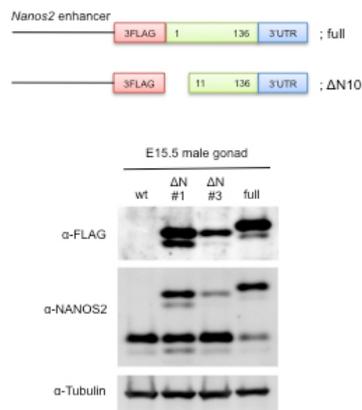


次に、NANOS2 の N 末 10 アミノ酸の欠損体と CNOT1 の C 末端との結合を同様の実験系で解析した。その結果、下図のように NANOS2 の N 末 10 アミノ酸が両者の結合に必須であることが明らかになった。

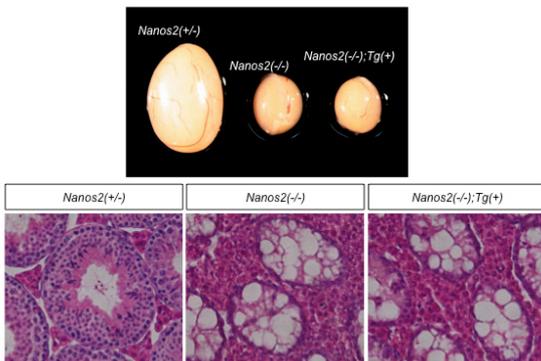


(2) トランスジェーン由来のタンパク質の発現を解析するために、E14.5 の胎児期雄性生殖巣抽出液を SDS-PAGE で分離し、その後、ウエスタンブロッティングにより解析した。この時、コントロールとして Nanos2 エンハンサーの下流に野生型 NANOS2 をつないだ

トランスジェニックマウスの発現解析を同時におこなった。その結果、ライン#1のトランスジェニックマウスが高い発現を示したため、今後の実験はこのラインを用いることとした。

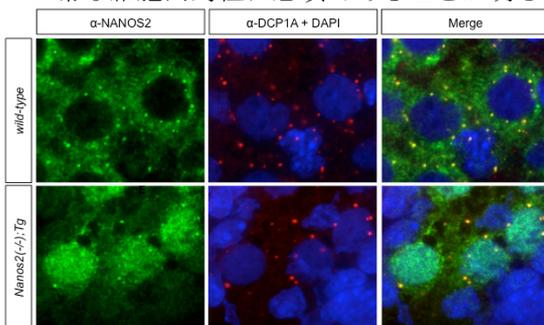


次に、上述のように樹立したトランスジェニックマウスを Nanos2 ノックアウトマウスと交配して Nanos2 ノックアウトの遺伝的背景に導入し、このトランスジェンが Nanos2 ノックアウトの表現型をレスキューするかどうかについて解析を行った。その結果、下図のように、Nanos2 ノックアウトマウスの表現型を全くレスキューしなかった。



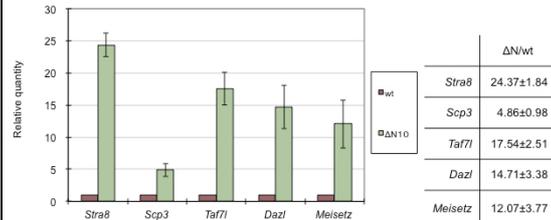
このことから、NANOS2 と CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体の結合は、NANOS2 の機能に必須であることが明らかになった。

(3) 野生型 NANOS2 は細胞質全体に拡散して存在し、その一部は P-body と呼ばれる RNA 分解の場に局在することが知られている。それに対して、NANOS2-ΔN10 は主に細胞質に局在した。これにより、CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体との結合が NANOS2 の正常な細胞内局在に必須であることが明らかになった。



かとなった。

(4) 上述の実験の結果、野生型 NANOS2 と結合することが明らかになっている、Stra8, Scp3, Taf7l, Dazl, Meisetz などの mRNA との結合が認められた。NANOS2 は RNA 結合の特異性を持たないことから、その結合タンパク質が RNA 特異性を決定していると考えられている。以上のことを踏まえると、CCR4-NOT 脱アデニル化複合体以外の結合タンパク質が RNA 結合特異性を決定するこ



とが強く示唆される。

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)

【査読有り】

1. Interaction between NANOS2 and the CCR4-NOT deadenylation complex is essential for male germ cell development in mouse.

Suzuki A., Saba R., Miyoshi K., Morita Y., Saga Y.

PLoS One. 2012;7(3):e33558.

DOI:10.1371/journal.pone.0033558

【査読無し】

2. 哺乳類生殖細胞形成機構の解析 –生殖医療への応用に向けて

鈴木 敦、栗原 靖之、相賀 裕美子

「医学のあゆみ」2011 年 9 月 24 日号
vol.238 No.13:1221-1222

[学会発表] (計 5 件)

1. 生殖細胞雄性分化におけるRNP複合体の解析

平成24年1月7日多様性と非対称性を獲得するRNAプログラム領域班会議 (神戸)

鈴木敦

2. Functional difference between NANOS2 and NANOS3 in the interaction with the CCR4-NOT deadenylation complex

平成23年12月15日 日本分子生物学会年

会 (横浜)

Morita Y., Saga Y., Suzuki A

3. The essential role of NANOS2 zinc finger motif in the assembly of P-bodies
平成23年12月13日 日本分子生物学会年会 (横浜)

Nakajima Y., Saga Y., Suzuki A.

4. 生殖細胞雄性分化におけるRNA分子機構
平成23年11月18日 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 (大阪)

鈴木敦

5. Functional analysis of NANOS2 in mouse germ cell development
平成23年9月22日 第84回日本生化学会大会

Suzuki A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)

横浜国立大学・学際プロジェクト研究センター・特任教員 (助教)

研究者番号：60467058

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

相賀 裕美子 (SAGA YUMIKO)

国立遺伝学研究所・系統生物センター・発生工学研究室・教授

研究者番号：50221271