

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840091

研究課題名(和文)生殖細胞の性分化・卵形成におけるRNA結合タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Analyzes of RNA-binding proteins involved in sexual differentiation of male germ cells and oogenesis in mice

研究代表者

加藤 謙 (Kato, Yuzuru)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：60570249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1) マウスを用いて、生殖細胞の雄性分化(性的に未分化な生殖細胞が精子を作る生殖細胞へ分化する発生過程)の分子機構をRNA結合タンパク質、Nanos2に着目し解析した。その結果、Nanos2は同じくRNA結合タンパク質であるDazlと標的RNAに対する拮抗作用を有すること、また、雄性分化にはNanos2によるDazlの抑制が重要であることを明らかにした。

(2) 卵形成における遺伝子Aに着目し、以下の点を明らかにした。(1) 卵形成過程において遺伝子Aは転写後抑制を受ける。(2) この転写後抑制は遺伝子Aの3'UTRを介する。(3) この制御が破綻すると、一回の出産における産子数が減少する。

研究成果の概要(英文)：(1) We analyzed molecular function of Nanos2, and RNA-binding protein essential for sexual differentiation of mouse male germ cells. Particularly, we focused on an antagonistic interaction between Nanos2 and Dazl, a germ cell-specific RNA-binding protein required for meiosis. We found that Nanos2 antagonized Dazl in sexually differentiating male germ cells and that Nanos2-mediated Dazl suppression plays an important role in the promotion of sexual differentiation of male germ cells. (2) We addressed whether gene A plays roles in mouse oogenesis. We found that gene A was post-transcriptionally repressed in developing oocytes after birth. This gene A repression occurs in a 3'UTR-dependent manner. Furthermore, removing the 3'UTR in vivo stabilized gene A protein, resulting in the reduction of litter size. These results suggest that post-transcriptional repression of gene A is required for proper litter size in mice.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 生殖細胞 性分化 卵形成 Nanos2 Dazl

1. 研究開始当初の背景

マウス生殖細胞は性的に未分化な始原生殖細胞として出現し、生殖巣において個体の性に依存して雌雄の性決定を受ける。雌雄の性決定を受けた始原生殖細胞は自身の性に従って雌雄それぞれ異なる発生プロセスに入る。すなわち、雌生殖巣において始原生殖細胞は減数分裂を開始し、雄生殖巣では減数分裂を抑制し、体細胞分裂の休止に入る。

マウス生殖細胞の雄性分化において RNA 結合タンパク質, Nanos2, は必須の役割を果たす。Nanos2 は雄生殖細胞特異的に発現し、Nanos2 変異体では雄生殖細胞が雌生殖細胞のように振る舞い、異常な減数分裂が誘導される。このことから、Nanos2 は生殖細胞の雄性分化に必須の遺伝子である。以前の研究から Nanos2 は CCR4-NOT 脱アデニル化タンパク質と複合体を形成し、標的 RNA の分解に関わることが示唆されていたが、実際に生体内でどのような RNA を標的としているか不明であった。我々は本研究開始当初 Nanos2 の有力な標的 RNA として、RNA 結合タンパク質をコードする, Dazl, を同定し、Nanos2 による Dazl の抑制が生殖細胞の雄性分化に重要であることを明らかにしていた。

では、何故 Nanos2 による Dazl の抑制が雄生殖細胞の性分化に必要なのか？この疑問に答える上で Dazl の分子機能がヒントとなる。Dazl は Nanos2 とは逆に、標的 RNA の翻訳促進に関わること、また Dazl は減数分裂の開始に関わる遺伝子であること、が以前の研究により示されていた。このことから、本研究で我々は「生殖細胞の雄性分化において Nanos2 は Dazl に対し拮抗的に働き、Dazl の機能を抑制する」との作業仮説を立て、その検証を行った。

これとは別に、本研究課題で我々はマウス卵形成における遺伝子 A の機能解析を行った。この遺伝子 A は卵形成において継続的に発現し、重要な役割を果たすとこれまで信じられてきた。実際減数分裂において遺伝子 A は必須であることは示されていたが、生後の卵形成において、その役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではマウス生殖細胞の発生分化において重要な役割を果たす Nanos2, Dazl, 遺伝子 A に着目し、以下の 2 つの課題に取り組んだ。

課題 1 : 生殖細胞の雄性分化における Nanos2 と Dazl の機能的相互作用の解析

課題 2 : 卵形成における遺伝子 A の機能解析

3. 研究の方法

課題 1-1: Dazl 標的 RNA の網羅的同定

課題 1-2: Nanos2 の P-body (processing body) への定量的局在解析

課題 2-1: 卵巣における遺伝子 A の発現解析

課題 2-2: 遺伝子 A 過剰発現マウスにおける

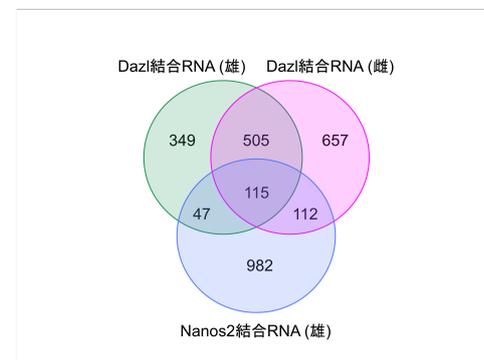
表現型解析

4. 研究成果

課題 1-1: (1) Dazl 標的 RNA の網羅的同定

もし Nanos2 が Dazl に対し拮抗的に働くのであれば、Nanos2 と Dazl は共通の標的 RNA を有するはずである。以前の研究で我々は RNA 免疫沈降、マイクロアレイ解析により Nanos2 の標的 RNA を網羅的に同定していたが、Dazl の標的 RNA は不明であった。そこで、Nanos2 同様、Dazl においても RNA 免疫沈降、マイクロアレイ解析により網羅的に Dazl 標的 RNA の同定を行った。得られた Dazl 結合 RNA のマイクロアレイデータを我々が持つ Nanos2 標的 RNA のデータと比較したところ、Nanos2 標的 RNA の約 21% が Dazl と結合することを見出した。この中には生殖細胞の雄性分化において抑制されるべき減数分裂や卵形成に関わる遺伝子も含まれていた。このことから、Nanos2 と Dazl は共通の標的 RNA を持つことが明らかとなった(下図)。

続いて Nanos2 と Dazl に共通の標的 RNA に着目し、両者の間の拮抗作用の有無について



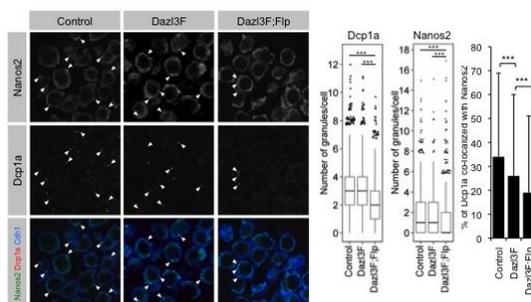
検討を行った。もし Nanos2 がこれらの標的 RNA を Dazl と拮抗して抑制するならば、Nanos2 変異体においてこれらの標的 RNA は発現が上昇し、また Dazl との結合も野生型と比べ強くなると予想される。実際、我々のマイクロアレイ結果から、Nanos2 と Dazl に共通する標的 RNA の発現は Nanos2 変異体において上昇することが示された。加えて、この発現上昇は Dazl の雌生殖細胞における結合の強さと雄生殖細胞における結合の強さの差と相関することも明らかとなった。さらに、抗 Dazl 抗体を用いた RNA 免疫沈降、定量 RT-PCR (RT-qPCR) 実験の結果から、Dazl のこれらの RNA に対する結合は Nanos2 変異体において顕著に増加した。これらの結果から、Nanos2 は Dazl に対し拮抗的に作用することが示唆された。

課題 1-2: Nanos2 の P-body (processing body) への定量的局在解析

Nanos2 は P-body と呼ばれる RNA の分解・保存に関わる細胞質顆粒に局在することが知られている。Nanos2 変異体では生殖細胞当たりの P-body 数が減少することから、Nanos2 の P-body への局在は Nanos2 を介する RNA 代

謝において重要な役割を果たすと考えられている。課題 1-1 から Nanos2 が Dazl に対し拮抗的に作用することが示唆されたが、もしそうならば Dazl も Nanos2 に対し拮抗的に作用するはずである。続いて我々は Dazl の Nanos2 に対する拮抗作用について検討を行った。

先の研究において我々は Dazl C 末端に 3xFlag タグ、Dazl 3' UTR を Frt 配列で挟んだ BAC (bacterial artificial chromosome) トランスジェニックマウスを作成した。この BAC トランスジェニックマウスを Rosa-Flp マウスと交配することで、Dazl 3' UTR を欠失させることが出来る。Dazl 3' UTR を欠失させると、3xFlag Dazl は過剰発現し、Nanos2 変異体と似た表現型を示すことを我々は明らかにしていた。この Dazl 過剰発現マウスを用いて、Nanos2 の P-body への局在の変化を免疫染色、画像解析により解析した。この画像解析は Kavli Institute for Brain and Mind, University of California の勝木健雄との共同研究であり、独自に作成した R スクリプトを用いて Nanos2 と P-body の構成因子である Dcp1a との共局在率を定量的に解析した。その結果、Dazl 過剰発現マウスにおいて雄生殖細胞当たりの Nanos2、Dcp1a の顆粒状のシグナル数は野生型に比べ有意に減少していることが明らかとなった(下図)。また、Nanos2 と共局在する Dcp1a 数も有意に減少していた。このことは、Dazl が Nanos2 に対し拮抗的に作用することを示唆するものである。



以前の研究から我々は Nanos2 による Dazl mRNA の抑制の重要性を指摘していたが、本研究から Nanos2 は Dazl と拮抗的に働くことで、Dazl の機能を阻害していることが強く示唆された。このことから、Nanos2 は、mRNA レベルによる発現抑制とタンパクレベルによる拮抗作用という2重の抑制作用により Dazl の機能を阻害すると考えられる。

課題 2-1: 卵巣における遺伝子 A の発現解析

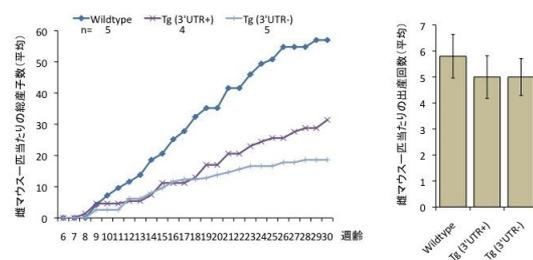
以前に報告された遺伝子 A 変異体の論文において遺伝子 A は卵細胞において発現していることが報告されていることから、遺伝子 A は卵形成の各段階において機能を有していると信じられて来た。実際、胎児期の卵巣において遺伝子 A は減数分裂の進行に必要であることが示されている。しかし、生後の卵巣におけるこの遺伝子の機能は不明であった。

我々は卵形成における遺伝子 A の機能解析を行うにあたり、まず遺伝子 A の発現パターンを解析した。RT-qPCR, ウェスタンブロットによる解析を行ったところ、驚いたことに、RNA レベルで遺伝子 A は胎児期から性成熟にかけて継続的に発現していたが、タンパクレベルにおいて遺伝子 A は出生後急激に減少していた。このことは以前の免疫染色の結果と異なると思われたが、我々は「遺伝子 A は生後の卵巣において転写後抑制を受ける」との作業仮説を立て、その検証を行うことにした。

課題 2-2: 遺伝子 A 過剰発現マウスにおける表現型解析

我々は、卵細胞における遺伝子 A の転写後抑制が 3' UTR に依存的か検証するため、条件的に 3' UTR を欠失可能なトランスジェニックマウスを作成し、3xFlag-A の発現解析を行った。その結果、3xFlag-A タンパク質は 3' UTR を欠失させると顕著に卵細胞において発現上昇することを見出した。このことから、卵細胞において遺伝子 A は 3' UTR を介して転写後抑制されることが示唆された。

続いて、このトランスジェニック雌マウスの配偶子産生能・妊性を調べるため、トランスジェニック雌マウスを野生型雄マウスと 6~30 週齢の間交配させた。その結果、トランスジェニックマウス (3' UTR+) において野生型の 55%, トランスジェニックマウス (3' UTR-) において 32.6%にまで総産子数が減少した。総出産回数においてはそれぞれの間で有意な差は見られず、各回の出産において明らかな産子数の減少が見られたことから、総産子数の減少は週齢に依存しない(下図)。この結果から、卵形成において遺伝子 A の抑制は正常な産子数を得るために必須であることが明らかとなった。



マウスのような多産哺乳動物にとって適切な数の産子を得ることは、種を維持するために極めて重要であると考えられる。本研究から得られた成果はマウス等の多産哺乳動物の産子数制御の理解に大きく貢献するものと思われる。今後遺伝子 A 抑制メカニズムを明らかにする予定である。尚、本研究は未発表のため、遺伝子名を A とした。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Yuzuru Kato, Yumiko Saga Nanos2 antagonizes Dazl to achieve sexual differentiation of male germ cell. Germ Cell Meeting, Cold Spring Harbor, 2014.10 U.S.

加藤譲 相賀裕美子 マウス始原生殖細胞の性分化における Nanos2 による Dazl の量的制御 日本発生生物学会 2014.5 名古屋 (WINC AICHI)

Yuzuru Kato, Yumiko Saga Uncovering a role of Nanos2 in sexual differentiation of murin male germ cells. Mouse Molecular Genetics Meeting, Hinxton 2013.9 U.K.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 譲 (KATO Yuzuru)

国立遺伝学研究所系統生物研究センター・助教

研究者番号：60570249

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

勝木 健雄 (KATSUKI takeo)

Kavli Institute for Brain and Mind, University of California, San Diego,