

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440120

研究課題名(和文)生殖細胞の雄性分化におけるRNA制御とその破綻による精巣腫瘍発生の分子機構

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

研究代表者

鈴木 敦 (Suzuki, Atsushi)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：60467058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスNANOS2は始原生殖細胞の性分化において、異所的な減数分裂を抑制すると同時にオス特異的な遺伝子発現を促進することが明らかになっている。しかしながら、NANOS2はin vitroにおいてRNAとランダムに結合することから、その特異性を決める分子機構は不明であった。本研究においては、もう一つのRNA結合タンパク質Dead end1とNANOS2の結合を明らかにし、その生理的・生化学的な意義について解析を行った。その結果、Dead end1がNANOS2のRNA結合特異性を決定することで雄性分化に重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mouse NANOS2 suppresses ectopic meiosis and promotes male-type gene expression, playing a critical role in sexual differentiation of primordial germ cells. However, the mechanisms involved in target specificity remain elusive. We show that another RBP, Dead end1 (DND1), directly interacts with NANOS2 to load unique RNAs into the CNOT complex. Thus, DND1 is an essential partner for NANOS2 that leads to the degradation of specific RNAs.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：生殖細胞 Nanos Dead end

1. 研究開始当初の背景

マウスの生殖細胞は受精後 6.5~7.5 日目に胚体外に少数の細胞集団として発生し、将来の生殖巣へと増殖しながら移動する。移動期の生殖細胞は始原生殖細胞と呼ばれ、卵母細胞にも精母細胞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を開始する。すなわち、メスにおいては直ちに減数分裂に移行するのに対して、オスにおいては細胞周期が停止する。一方で、精巣に到達した始原生殖細胞は、精細管内で初期胚様細胞へと脱分化し、分化多能性の精巢性テラトーマを形成することがある。精巢性テラトーマは内胚葉・中胚葉・外胚葉の三胚葉成分の混在する腫瘍であり、始原生殖細胞が雄性分化に失敗することで発症すると考えられているが、その分子メカニズムは未だに不明である。申請者はこれまでに、マウス始原生殖細胞の性分化機構について解析を行い、RNA 結合タンパク質 NANOS2 が雄性分化の主統御因子であることを明らかにしてきた。さらに、NANOS2 の詳細な分子機能を解析し、その過程で、NANOS2 結合タンパク質として *Dead end1* (DND1) を同定していた。

そこで、申請者は DND1 の条件付き欠損マウスを作製し、始原生殖細胞が生殖巣に到達した後に DND1 を欠損させた。その結果、驚いたことに、始原生殖細胞は NANOS2 欠損の場合と同様に雄性分化に失敗するだけでなく、精巢性テラトーマを発症することが明らかになった (未発表)。以上の結果は、DND1 と NANOS2 の結合が始原生殖細胞の雄性分化に重要であることを示すだけでなく、DND1 が NANOS2 非依存的に分化多能性を抑制し、精巢性テラトーマの発症を抑制することも示していた。

2. 研究の目的

(1) マウス始原生殖細胞の雄性分化において、主統御因子である NANOS2 は DND1 と結合するが、その生理的・生化学的な意義を明らかにする。

(2) マウス始原生殖細胞の雄性分化において DND1 を欠損すると精巢テラトーマが発生するが、その分子機構は不明である。そこで、DND1 の機能を解析することで、精巢テラトーマ発症のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NANOS2 と DND1 の結合様式を明らかにするために、培養細胞 (HeLa 細胞) に DND1 と NANOS2 の各種変異体を強制発現させて結合解析を行い、両者の結合に必要な NANOS2 のドメインを明らかにすることを試みた。次に、大腸菌に発現させたリコンビナント NANOS2 の変異体と DND1 を用いて結合解析を行い、両者の直接の結合に十分な機能ドメインの探索を行った。

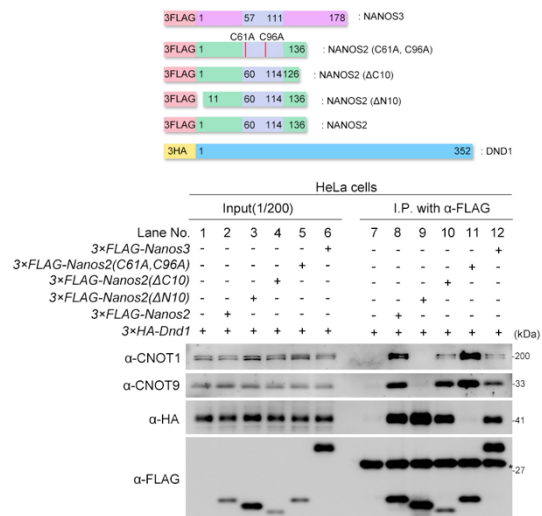
(2) NANOS2 と DND1 が結合することの生

理的な意義を明らかにすることを試みた。まず、*Dnd1* の intron1 と intron3 に loxP 配列を挿入した DND1 条件付き欠損マウス (*Dnd1*-flox マウス) を作製した。一方で、生殖細胞に特異的な発現を示す Oct3/4 の発現制御配列を利用して、CreER^{T2} を発現するトランスジェニック・マウス (Oct4ΔPE-Cre ER^{T2}) も作製した。このマウスでは、タモキシフェンを腹腔投与するタイミングを調節することによって、Cre が機能する時期を選択することが出来る。そこで、上記の両マウスを交配し、始原生殖細胞が生殖巣へと到達した後 (E13.5) にタモキシフェンを腹腔投与して DND1 を欠損させ、その後の雄性生殖細胞の分化過程を解析した。特に、NANOS2 欠損マウスの表現型である 1) 減数分裂への移行、2) 細胞周期の進行、3) 雄特異的マーカー遺伝子の発現低下、について解析を行うことで、NANOS2 依存的な DND1 の機能について解析を行った。

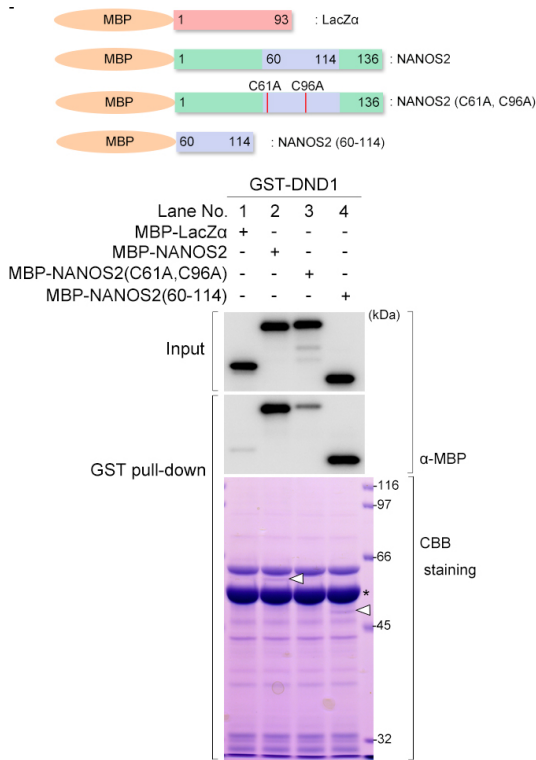
(3) NANOS2 と DND1 が結合することの生化学的な意義を明らかにすることを試みた。まず、上述 (2) の方法でタモキシフェンを投与し、生殖細胞から DND1 を除去する。そのエンブリオの雄性生殖巣を E15.5 で解剖することによって収集し、生殖巣抽出液を作製する。その生殖巣抽出液から抗 NANOS2 抗体を用いて NANOS2 を免疫沈降により回収し、共沈殿した mRNA を逆転写したのちに定量的 PCR により解析を試みた。これにより、NANOS2 と標的 mRNA との結合に DND1 が必要であるかについて解析を行った。

4. 研究成果

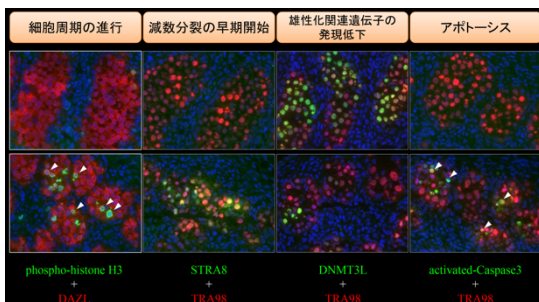
(1) HeLa 細胞を用いて NANOS2 の各種変異体との結合解析を行った結果、下図のように NANOS2 の zinc finger motif が結合に必須であることが明らかになった。



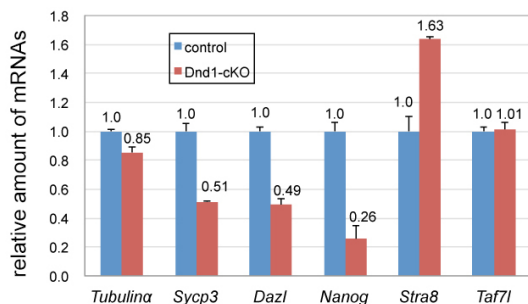
また、リコンビナント・タンパク質を用いた結合解析の結果、下図のように NANOS2 の zinc finger motif のみで DND1 との結合に十分であることが明らかになった。



(2) タモキシフェンの投与により、DND1 を欠損させた雄性生殖細胞の表現型を NANOS2 欠損の表現系と比較すると、以下の図のように非常によく似ていた。

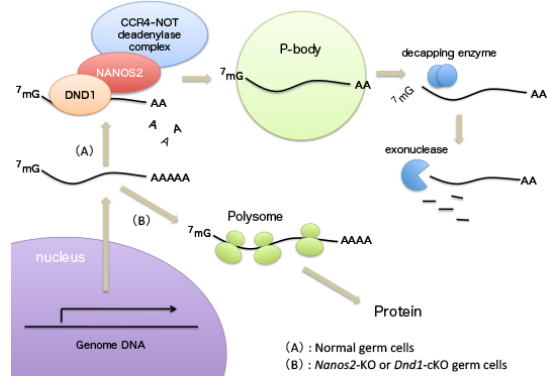


(3) タモキシフェン投与により DND1 を欠損させた雄性生殖細胞の細胞抽出液から NANOS2 を免疫沈降し、共沈殿する mRNA を逆転写したのちに定量的 PCR により解析した。その結果、下図のように一部の mRNA と NANOS2 との相互作用は劇的に減少した。



以上 (1) から (3) までの結果から、DND1 は NANOS2 と標的 RNA との相互作用に結合特異性を与えると考えることができ、以下の

ような機能モデルが考えられる。



すなわち、DND1 が NANOS2 に特異的な RNA との結合を促進し、NANOS2 が CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体をリクルートすることにより標的 RNA の分解を促進する。一方で、NANOS2 または DND1 非存在化においては、標的 RNA はタンパク質へと翻訳され、表現型を引き起こすと考えられる。

一方で、DND1 の欠損が生殖細胞のテラトーマ化を促進する機構については現段階において解析不足である。今後、DND1 の機能を解析する上で明らかになると考えられる。

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 1 件)

Suzuki A, Niimi Y, Shinmyouzu K, Zhou Z, Kiso M, Saga Y; Dead end1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell development.

EMBO Reports 2016 Jan;17(1):37-46. 査読有
DOI: 10.15252/embr.201540828.

[学会発表] (計 1 件)

Niimi Y, Kikuchi A, Tazu Y, Suzuki A; Functional analysis of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonial cells.

The 2016 meetings on GERM CELLS
Cold Spring Harbor Laboratory, New York

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

鈴木 敦 (SUZUKI, Atsushi)
横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：60467058

(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

新見 夕姫 (NIIMI, Yuki)