

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21227008

研究課題名(和文)生殖細胞の性分化と精子幹細胞の維持を支える分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism underlying sexual development of male germ cells

研究代表者

相賀 裕美子(SAGA, Yumiko)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：50221271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,000,000円、(間接経費) 49,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの生殖細胞の発生過程において、雄性生殖細胞の性分化の誘導にはNanos2の発現が必須であり、その誘導にはTGF- β (Nodal)シグナルを介したSmad2シグナル系が必要であることを明らかにした。Nanos2は生殖細胞の雌化を抑制し雄化を促進する。その際、Nanos2はRNA結合タンパク質Dnd1と直接結合して標的RNAを認識し、脱アデニル化活性をもつCNOT複合体と直接結合してRNAの分解に関与することが明らかになった。またNanos2は生後の精子幹細胞に発現し、GDNFを介した幹細胞の維持に必須である。Nanos2は主に分化抑制を介して幹細胞の維持に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In mouse germ cell development, the activation of an RNA binding protein Nanos2 is a critical step for male germ cell differentiation. We found that TGF- β signal (nodal/activin) mediated by Smad2 signaling is required for the Nanos2 induction. Once Nanos2 is induced, it localizes to P-bodies and interacts with CNOT complex, by which target RNAs are degraded. Nanos2 suppresses female pathway and promotes male pathway by repressing RNAs involved in the maintenance of PGCs, meiosis and mitosis in embryonic gonads. Nanos2 is also expressed in spermatogonial stem cells and plays an important role for the maintenance of stem cells. In the absence of Nanos2, stem cells can not maintain the stem cell property and quickly differentiate. We found that coordination of stem cells between self-renewal and differentiation is regulated by both extrinsic niche signals such as GDNF, FGF, RA and stem cell intrinsic factors such as Nanos2.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：生殖細胞 RNA結合タンパク質 性分化 精子幹細胞 CNOT複合体

1. 研究開始当初の背景

マウス、ヒトなどの哺乳類の生殖細胞は発生の初期から体細胞系列から分離され、独自の維持システムを確立する。胎生期では、性分化過程をへて、精子・卵子への決定をうける。生殖細胞の性分化決定機構とその維持機構の理解は個体の維持のみならず、種の維持に必須な基本概念をもたらす。我々は、これまでに種をこえて生殖細胞のみに発現し機能する RNA 結合蛋白質 Nanos2 及び Nanos3 に関する解析を行ってきた。近年この中でも特に Nanos2 蛋白質が生殖細胞の雄性分化及び精子幹細胞システムの構築と維持に重要な鍵分子であることを突きとめた。生殖細胞はその独自性の維持機構や、減数分裂の制御機構のみならず、哺乳類に特徴的なインプリンティング確立などエピジェネティックな側面からも注目されている。このような、生殖細胞特異的なシステムを維持する機構の解明は、種を越えて維持されてきた生殖細胞の形成機構に加えて細胞生物学、幹細胞システムなどの理解につながる重要な情報を寄与する。

2. 研究の目的

Nanos2 の上流シグナルを同定し、Nanos2 の標的あるいは下流で機能する遺伝子群の生殖細胞の性分化における機能、意義を明らかにする。すなわち Nanos2 を中心とした RNA 制御機構を明らかにしようとするものである。また Nanos2 の生後の精子幹細胞システムの維持における機能を明らかにし、生後の Nanos2 の作動原理を明らかにすることにより精子幹細胞システムの制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

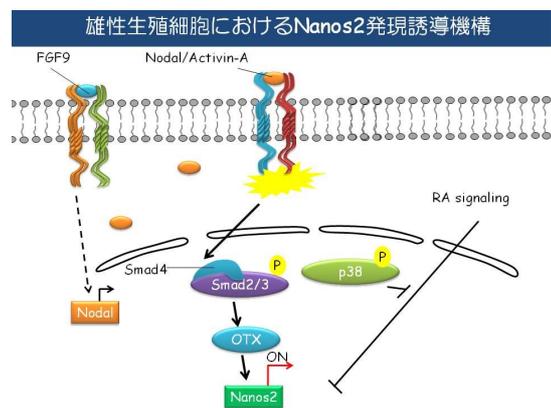
胎生期における (1) Nanos2 の上流シグナルを明らかにするため、遺伝子発現解析によって示唆されたシグナル系の機能を、器官培養系を用いて解析すると共に、(2) 生殖細胞特異的ノックアウトマウスの解析により、そのカスケードを明らかにする。また性分化における Nanos2 の機能を解析するために、(3) 免疫沈降により Nanos2 の標的 RNA を同定する。それら標的遺伝子の機能に関しては遺伝子ノックアウトあるいは強制発現系を用いた個体レベルの解析を行う。また Nanos2 を解した RNA 制御分子機構を解明するために、Nanos2 と相互作用するタンパク質を同定しその機能解析により、推進する。

また (4) 生後の精子幹細胞システムにおける Nanos2 の機能解析には条件付きノックアウトマウスによる解析、また Nanos2 の細胞系譜解析には Nanos2 のエンハンサーの下流に誘導型 Cre リコンビナーゼを挿入したトランスジェニックマウスを作製し使用する。(5) また精子幹細胞の維持機構を理解するため、生殖細胞と体細胞であるセルトリ細胞の両者の相互作用に着目し、セルトリ細胞からの因子(GDNF)や、その他のシグナル因子、Notch, RA, FGF 等と生殖細胞特異的因子 Nanos2 の関係を明らかにする。また (6) 精子幹細胞(GS 細胞)を樹立し、Nanos2 の欠損及び過剰発現の効果を調べる。

細胞からの因子(GDNF)や、その他のシグナル因子、Notch, RA, FGF 等と生殖細胞特異的因子 Nanos2 の関係を明らかにする。また (6) 精子幹細胞(GS 細胞)を樹立し、Nanos2 の欠損及び過剰発現の効果を調べる。

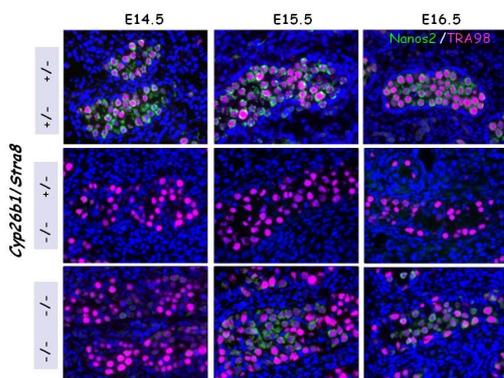
4. 研究成果

(1) Nanos2 の上流で機能している因子を明らかにするため、Nanos2 に先だって発現する遺伝子群の検索を試み、TGFb ファミリーに属する Nodal シグナル系を見いだした。Nodal シグナルは生殖細胞から分泌され、体細胞・生殖細胞両方に機能する可能性が示唆された。器官培養系を用いた阻害剤実験から、Nanos2 の上流に TGFb シグナルが機能していること、また TGFb は FGF の下流で機能し生殖細胞の雄性分化を誘導することを明らかにした。この Nodal シグナルは Smad を介して伝達されるため、TGFb シグナルに参与する Smad3, Smad3, Smad4 の条件付きノックアウトマウスを導入して、解析した。まず、Smad の共通共役因子である Smad4 を KO したが、Nanos2 の発現はほとんど影響されず、Smad を介さずにシグナルが伝達される可能性が考えられた。ところが、非常に興味深いことに、Smad2 の KO によって Nanos2 の発現は顕著に低下することが明らかになった。一方、Smad3 は関与しないことが明らかになり、雄性生殖細胞において Nodal シグナルは Smad2 を介して伝達されることが明らかになった。さらにその下流で転写因子 Otx2 が Nanos2 の発現に寄与している可能性が示唆された。一方、雄性生殖細胞においてレチノイン酸(RA)シグナルは抑制する必要がある。RA の抑制にはいくつかの経路が関与するが、阻害剤を用いた解析で P38 経路が主にレチノイン酸経路を抑制することにより、雄性分化を制御することも明らかになった。



(2) Nanos2 欠損マウスの遺伝子発現解析により、Nanos2 は 始原生殖細胞に発現している遺伝子、雌性生殖細胞の分化に関与する遺伝子 (特に減数分裂関連遺伝子) 及び生後の精子形成に関与する遺伝子を抑制し、雄性生殖細胞の分化に関与する遺伝子の活性化に寄与することが分かった。そこで減数分裂の進行が雄性分化を阻害するのではと考え、減

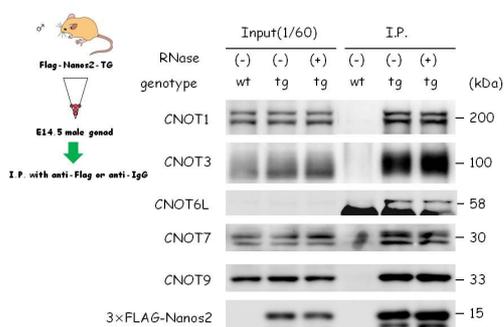
数分裂に必須な遺伝子 Stra8 とのダブルノックアウトマウスを作成した。結果、減数分裂の抑制は観察されたが、雄の遺伝子発現の進行は観察されず、Nanos2 は Stra8 の発現抑制以外の機構で雄性分化を制御していることがわかった。その際、細胞分裂が維持されていたため、さらに RA シグナルを抑制して完全に細胞分裂を抑制した。しかしながら雄性分化を誘導することはできなかった。一方、Cyp26B1 欠損マウスにおいて RA シグナルが上昇しその結果、生殖細胞は減数分裂を開始し雄性分化は完全に抑制される。この時 Stra8 と同時に欠損させることにより、減数分裂を抑制すると、興味深いことに Nanos2 の発現が誘導できること、そしていったん Nanos2 が発現すると、RA の存在に関わらず、雄性化が進行することが明らかになった。



(図の説明) Cyp26/Stra8 ダブルノックアウトマウスの胚性精巣の切片における Nanos2 の発現を解析したものである。通常 Cyp26 ノックアウトマウスでは Nanos2 の発現は抑制されているが、Stra8 を同時にノックアウトすると、Nanos2 が発現する。

(3) Nanos2 と結合する蛋白質を MAS 解析で同定した。その結果 Nanos2 は、CNOT タンパク質、CNOT1 と直接に結合しその複合体は RNA の分解の最初の段階である脱アデニル化活性を有することを明らかにし、Nanos2-CNOT 複合体が標的 RNA の分解に関与することが分かった。この複合体は P-body と呼ばれる細胞質構造に局在し、雄性生殖細胞における遺伝子発現制御に寄与することが明らかになった。さらに Nanos2 のドメイン解析を行っ

Nanos2 は deadenylation complex と複合体を形成する



たところ、Nanos2 の N 末 10 アミノ酸が CNOT1 の結合に必須であり、このドメインを欠損した Nanos2 は Nanos2 としての機能を完全に失うことがトランスジェニックマウスを用いたレスキュー実験で明らかになった。一方、この変異体は Nanos2 標的 RNA との結合能力を保持しており、Nanos2-RNA 複合体を単離し、標的 RNA を同定したところ、減数分裂関連遺伝子、始原生殖細胞に発現する Sox2 や Nanog 等の遺伝子の結合が確認できた。

(4) 生後の Nanos2 発現細胞が精子幹細胞であることを、細胞系譜追跡実験によって明らかにした。また生後に Nanos2 をノックアウトすると、精子幹細胞が速やかに分化し精子形成が停止すること、また生後に Nanos2 を強制発現すると、精子幹細胞の分化が抑制され幹細胞が蓄積することから Nanos2 は精子幹細胞に発現し、分化を抑制することにより精子幹細胞の維持に与する重要な因子であることを明らかにした。Nanos2 は GDNF の下流で機能するが、GDNF 不在化でも分化抑制能を持ち、幹細胞の維持に寄与することも明らかにした。

生後の精子形成における Nanos2 の機能

- 細胞系譜実験・Nanos2 発現細胞をハルスラベルする。

ラベルされた細胞が長期間にわたって維持され精子形成を行う
- 生後に発現する Nanos2 をノックアウトする (Conditional-KO)

速やかに精子幹細胞が消失し、生殖細胞が2か月以内にすべて失われる
- Nanos2 を生後の生殖細胞で強制発現する

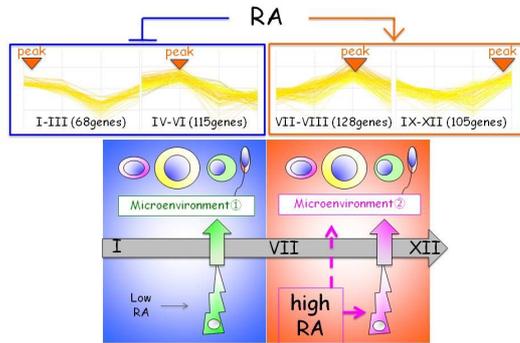
Nanos2 発現細胞は精子幹細胞として維持され、分化が完全にブロックされる

Nanos2 は精子幹細胞に発現し、幹細胞の維持と分化抑制に働く

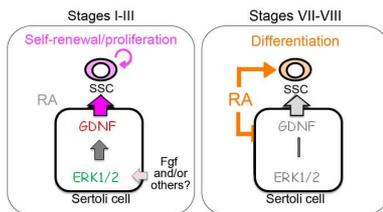
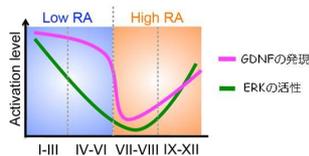
(5) セルトリ細胞で観察されるステージ依存的な遺伝子発現変化は、複数のシグナルがステージ依存的に活性化されることによって形成されると考えられる。我々は、その中でも、主にレチノイン酸シグナルと FGF シグナル系が GDNF の発現パターンや未分化精原細胞の増殖パターンと相関あるいは逆相関して活性化することを見出した。そこでドミナントネガティブ型のレチノイン酸レセプター (DN-RAR) をセルトリ細胞に強制発現しその遺伝子発現における変動解析及び機能解析を行った。その結果、DN-RAR により、通常 RA によって発現誘導される遺伝子は抑制され、RA によって抑制される遺伝子が活性化することが分かった。

また DN-RAR をセルトリ細胞に発現させた精巣では精子血管閉門 (BTB) が破壊され、精子形成が異常になることを見出した。また、その時タイトジャンクションの構成タンパク質であるオクルディン遺伝子の発現が異常になることを見出し、精子サイクルにおける RA が BTB を制御することにより、精子形成を制御していることを明らかにした。

Sertoli cells によって作られる細胞環境が重要



また、精子幹細胞に発現する Nanos2 を過剰発現させると未分化型精原細胞の異常な増殖がおこるが、これが GDNF 依存性であることを検討するため、Nanos2 過剰発現マウスで GDNF のレセプターである GFRa1 をノックアウトした。その結果、Nanos2 の発現のみで GDNF 非依存的に未分化型精原細胞の分化を抑制することが分かったが、結局は、それらの細胞は消失した。Nanos2 は未分化型精原細胞の増殖には負の効果があり、GDNF と Nanos2 による増殖と分化のバランスが重要であることが分かった。またその際、セルトリ細胞において ERK シグナルが GDNF の分泌を促進することが明らかになった。一方 ERK シグナルは精子幹細胞でも活性化しており、分化抑制に寄与することも明らかになった。



(6) Nanos2 の条件付きノックアウトマウス及び、強制発現マウスの精子幹細胞から GS 細胞を調整し、培養細胞を用いて Nanos2 のノックアウト及び、強制発現による遺伝子発現変動を解析した。その結果、精子形成における幹細胞維持に、Nanos2 が主に RA シグナルの下流遺伝子を抑制することによる分化抑制により幹細胞状態を維持することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件) 全て査読有り

1. Saba R, Wu Q, Saga Y (2014). CYP26B1 promotes male germ cell differentiation by suppressing STRA8-dependent meiotic and STRA8-independent mitotic pathways. *Dev Biol.*389:173-81.

doi:10.1016/j.ydbio.2014.02.013.

2. Saba R, Kato Y, Saga Y. (2014) NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. *Dev Biol.*385:32-40.

doi:10.1016/j.ydbio.2013.10.018.

3. Hasegawa K, Namekawa SH, Saga Y. (2013) MEK/ERK Signaling Directly and Indirectly Contributes to the Cyclical Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells. *Stem Cells.*31:2517-27.

doi:10.1002/stem.1486.

4. Wu Q, Kanata K, Saba R, Deng CX, Hamada H, Saga Y. (2013) Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. *Development.* 140(2):291-300.

doi: 10.1242/dev.087882

5. Hasegawa K, Saga Y. (2012) Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development.*139:4347-55

doi: 10.1242/dev.080119

6. Suzuki A, Saba R, Miyoshi K, Morita, Saga Y. (2012) Interaction between NANOS2 and the CCR4-NOT

deadenylation complex is essential for male germ cell development in mouse. *PLoS One*, 7(3):e33558

doi: 10.1371/journal.pone.0033558

7. Sada A, Hasegawa K, Pin PH, Saga Y. (2012) NANOS2 acts downstream of glial cell line-derived neurotrophic factor

signaling to suppress differentiation of spermatogonial stem cells. *Stem Cells.* 30:280-91.

doi: 10.1002/stem.790

8. Hasegawa K, Okamura Y, Saga Y. (2012) Notch signaling in Sertoli cells regulates cyclical gene expression of Hes1 but is dispensable for mouse spermatogenesis. *Mol Cell Biol.* 32:206-15.

doi: 10.1128/MCB.06063-11

9. Suzuki H, Saba R, Sada A, Saga Y. (2010) The Nanos3-3'UTR is required for germ cell specific NANOS3 expression in mouse embryos. *PLoS One.* 18:5(2):e9300

doi: 10.1371/journal.pone.0009300

10. Suzuki A, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Saga Y. (2010) NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:3594-9
doi: 10.1073/pnas.0908664107

11. Suzuki H, Sada A, Yoshida S, Saga Y. (2009) The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. Dev Biol. 336:222-31
doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.002

12. Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. (2009) The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. Science 325(5946):1394-8.
doi: 10.1126/science.1172645

[学会発表](計 40 件)招待講演のみ記載。すべて研究代表者の発表を抜粋。

1. Germ cell specific factors, NANOS2 and NANOS3 interact with distinct components of the CNOT complex. Meeting of Japanese Society of Molecular Biology, Kobe, 12/4 (2013).
2. Maintenance of spermatogonial stem cell(SSCs) via Nanos2-mediated mechanism. Meeting of Japanese Society of Biochemistry, Yokohama, 9/11 (2013).
3. The molecular mechanism of NANOS2-mediated RNA regulation in germ cell differentiation. Meeting of Japanese Society of Molecular Biology, Fukuoka, 12/15 (2012).
4. NANOS2 and NANOS3 contribute to germ cell differentiation via interacting with different components. Meeting of Japanese Society of Biochemistry, Fukuoka, 12/12 (2012).
5. NANOS2-mediated RNA regulation in germ cell differentiation. CSH-meeting, germ cells, NY, 10/2-10/6 (2012).
6. Genetic pathways leading to sexual fate decision in mouse germ cells. The 58th/60th NIBB conference, Okazaki, 7/17-21 (2012).
7. NANOS2-mediated RNA regulation in germ cell differentiation. ISSCR,

Yokohama, 6/13-16 (2012).

8. The mechanism leading to sexual differentiation of male germ cells. The Cold Spring Harbor Asia conference, Suzhou, China, 10/11-15 (2011).
9. Male germ cell development in mice, Gordon Research Conference, Andover, NH, 6/19-23 (2011).
10. Functions of NANOS2 in the maintenance and differentiation of male germ lineage in mice, CSH-meeting : Mouse development, Genetics and Genomics, Cold Spring Harbor, New York 10/26-30 (2010).
11. Function of NANOS2 in the embryonic germ cells and spermatogonial stem cells in mice, OzBio2010, Melbourne, Australia 9/26-10/1 (2010).
12. Molecular functions of Nanos2 as a switcher of sexual differentiation of germ cells, SDB-JSDB Joint Meeting, Albuquerque, New Mexico, United States 8/5-9 (2010).
13. Functions of NANOS2 in the Maintenance of Embryonic Germ Cells and Spermatogonial Stem Cells in Mice. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Perimplantation Biology, Beijing 5/8-12 (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MamDev/home-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

相賀 裕美子 (SAGA, Yumiko)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号 : 50221271

(2)研究分担者

小久保 博樹 (KOKUBO, Hiroki)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

(平成 22 年度より連携研究者)

研究者番号 : 10270480

(3)連携研究者

鈴木 敦 (SUZUKI, Atsushi)

横浜国立大学・工学研究院・准教授

研究者番号 : 60467058