

令和元年6月13日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18556

研究課題名(和文)精子幹細胞におけるmiRNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of miRNAs in spermatogonial stem cells

研究代表者

平野 孝昌(Hirano, Takamasa)

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：30594999

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)：精子幹細胞では、P-bodyと呼ばれるmRNA抑制に関わる構造体が発達している。P-bodyによるmRNA発現抑制系であるmiRNAの精子幹細胞における機能を検証したが、明確な役割を見いだすことが出来なかった。次に、他の精子幹細胞におけるP-body構成因子であるNANOS2およびDND1の機能解析に焦点を移した。NANOS2とDND1は生殖細胞特異的なRNA結合タンパク質であるが、これらの機能を体細胞で再構成した。NANOS2-DND1は、生殖細胞や体細胞でmTORC1活性を抑制し、細胞増殖を制御することがわかった。さらに、NANOS2-DND1の標的mRNAとして新たに6遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NANOS2およびDND1は、精子幹細胞の維持だけでなく、始原生殖細胞の雄性分化にも関わることが知られている。しかし、これらの細胞は生体内で僅少であるため、標的となるmRNAの同定が遅れている。本研究では、生殖細胞特異的なNANOS2-DND1機能を体細胞で再構成することで、6種の標的候補遺伝子mRNAを同定した。今後、これら遺伝子の機能を明らかにすることで、生殖幹細胞維持や雄性分化の分子機構を明らかにすることが期待できる。さらに、微僅少な細胞でのみ発現するRNA結合タンパク質を体細胞で再構成することで、その分子機能に迫ることが可能であることを提唱した。

研究成果の概要(英文)：In germ line cells, RNA-protein (RNP) granules are well developed. Spermatogonial stem cells (SSCs) have well-grown P-bodies, one of RNP granules. MicroRNA (miRNAs) pathway involves in P-body mediated mRNA regulation. I tried conditional disruption of miRNA biogenesis component (Dgcr8) in SSCs, but no obvious phenotypes. Next, I asked other P-body components, NANOS2 and DND1 proteins. NANOS2 and DND1 are germ cell specific RNA binding proteins and these proteins interact each other. Here, I reconstituted NANOS2-DND1 functions in somatic cell lines (N2D1 reconstituted cells). In germ cells, NANOS2-DND1 complex suppress mTORC1 activity and regulate cell growth. This mTORC1 suppression and cell growth suppression was reproduced in N2D1 reconstituted cells. Furthermore, using N2D1 reconstituted cells I found 6 gene mRNAs as novel NANOS2-DND1 targets, suggesting that these six genes involved in SSC regulation.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 P-body 精子幹細胞 雄性生殖細胞 NANOS2 DND1 転写後制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雄では、半永久的に精子が作成される。これは、精巣に存在する精子幹細胞が、維持と分化を継続的に行うことで達成される。精子幹細胞は、周辺の体細胞から供給される外因性分泌因子 GDNF 及び FGF によって維持されることが知られている。しかし、精子幹細胞の内因性の維持機構に関しては、GDNF 受容体 (GFRa1-RET 複合体) や FGF 受容体下流のシグナル経路を除いて不明な点が多い。精子幹細胞では、P-body と呼ばれる RNA-タンパク質の細胞質非膜顆粒体が発達している。P-body には、RNA 分解酵素や RNA 結合タンパク質、またこれらによって制御を受ける mRNA が凝集している。従って、P-body は特定の遺伝子 mRNA を負に抑制することで、遺伝子発現を制御することに関与する。これまでに、P-body 形成の必須因子を欠損させると、精子幹細胞は幹細胞性を失うことが知られている。従って、P-body を介した mRNA 制御が、精子幹細胞の維持に重要な役割を果たすことが示唆される。

P-body とその主要な構成因子は、mRNA の分解やタンパク質発現抑制に直接関わる。しかし、その制御する標的 mRNA の選択には関与しないと考えられている。従って、各細胞種に発現する標的 RNA 選択因子が、その標的となる mRNA を決定する。P-body を介した mRNA 制御の主要な標的 mRNA 選択因子として microRNA (miRNA) 経路が知られている。miRNA はおよそ 22 塩基長の小分子 RNA で、相補的な mRNA と結合して遺伝子発現を抑制する。現在、ヒトでは 1917 種の miRNA が知られており、細胞種に応じてその発現が異なる。よって、精子幹細胞で発現する miRNA が、その幹細胞性維持に関与することが考えられる。しかし、精子幹細胞における miRNA 経路の役割に関して、あまり解析がなされていなかった。

そのほか、精子幹細胞における標的 RNA 選択因子として、RNA 結合タンパク質 NANOS2 及び Dead end1 (DND1) 複合体が挙げられる。これまで、NANOS2-DND1 複合体は胎生生殖細胞の雄性分化への関与や、精子幹細胞維持にも必須であることが知られている。しかし、NANOS2-DND1 複合体が認識する標的 RNA に関しては知見が乏しい。これは、NANOS2-DND1 が発現する精子幹細胞や、雄性生殖細胞の数が僅少であることが考えられる。

### 2. 研究の目的

精子幹細胞の維持に必須な役割を果たす、P-body を介した mRNA 制御機構の理解を目標として、標的 RNA 選択因子の機能を切り分け、それぞれの役割を明らかにする。具体的には、標的 RNA 選択の主要な機構である miRNA 経路の、精子幹細胞における役割を明らかにする。また、精子幹細胞制御に関わる標的 RNA 選択因子として NANOS2-DND1 タンパク質複合体があるが、これらがどのように標的 RNA を選択・抑制するかは不明な点が多い。そのため、NANOS2-DND1 複合体の標的 RNA の全貌に関しても未解明である。本研究では、NANOS2-DND1 複合体の分子機能の解明や、標的となる mRNA の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) miRNA の生合成は、複数段階の RNA のプロセッシングを経て、最終的に成熟型 miRNA となる。miRNA 生合成の必須因子である、核内 RNA 結合タンパク質 DGCR8 をコードする遺伝子を、精子幹細胞特異的に欠損するマウスを作成し、全ての miRNA 生合成を阻害した精子幹細胞を用いて、そのマウスにおける精子幹細胞の表現型を解析する。

(2) NANOS2-DND1 は生殖細胞特異的 RNA 結合タンパク質である。NANOS2-DND1 機能の発揮に必要な因子を明らかにするために、体細胞に必要な因子を導入することで NANOS2-DND1 機能を再構成する。次に、NANOS2-DND1 機能再構成細胞を用いて、既知の標的遺伝子 mRNA の認識部位を同定する。また、NANOS2-DND1 標的候補となる遺伝子 mRNA を、NANOS2-DND1 再構成細胞に導入することで検証して、新規 NANOS2-DND1 標的遺伝子を同定する。

### 4. 研究成果

(1) 精子幹細胞における miRNA 機能を検証するため、miRNA 生合成の必須因子である *Dgcr8* を精子幹細胞特異的に欠損するマウス (*Dgcr8*<sup>flox/-</sup>; *Gfra1-Cre*) を作成した。しかし、精子幹細胞に関して、明確な違いを見いだすことができなかった。したがって、精子幹細胞の維持において、他の P-body 構成因子が有意な機能をもつと示唆された。

(2-1) NANOS2-DND1 機能を体細胞で再構成するために、まずこれらタンパク質の細胞内局在を検証した。生殖細胞では、NANOS2 および DND1 は P-body に局在し、標的 mRNA の発現を負に抑制することが知られる。マウス線維芽細胞由来培養細胞である NIH3T3 に、NANOS2 や DND1 を単独で発現させたところ、細胞質全体に拡散する局在パターンを示した。しかし、NANOS2 と DND1 を同時に発現させたところ、両者ともに P-body への局在がみられた (図 1)。次に、NANOS2-DND1 の既知の標的遺伝子 mRNA である *Sohlh2* および *Dazl* の 3' UTR を含む mRNA を発現させ、mRNA 局在を観察したところ、これら標的 mRNA も、NANOS2-DND1 発現依存的に P-body への蓄積がみられた。最後に、*Sohlh2* や *Dazl* 3' UTR を含む mRNA を NANOS2-DND1 と共に体細胞に導入する

と、mRNA の不安定化、及びタンパク質発現の抑制がみられた。これは、NANOS2-DND1 の標的ではない *ActB* 3' UTR では引き起こされないことから、NANOS2-DND1 機能が体細胞で再構成されたことを示す。また、NANOS2-DND1 による標的遺伝子 mRNA の抑制は、ヒト培養細胞である HeLa や HEK293T でも引き起こされた。このことから、NANOS2-DND1 機能は、生殖細胞特異的な NANOS2 及び DND1 と、恒常的に働くシステムによって標的遺伝子の抑制に寄与することが示唆された。さらに、NANOS2 および DND1 は、両者が協調することで標的 mRNA を抑制することが示された。

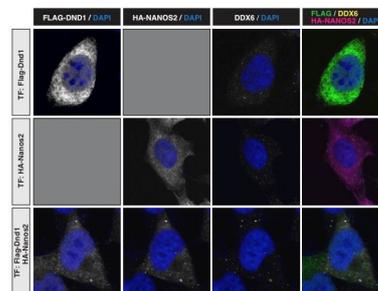


図1. NANOS2及びDND1共発現におけるP-body局在 (DDX6: P-bodyマーカー)

(2-2) 先行研究では、NANOS2 や DND1 が単独で、CNOT1 タンパク質と結合することが知られている。CNOT1 は、mRNA の poly(A) 鎖分解酵素複合体 (CCR4-NOT) の構成因子である。このことは、本来 NANOS2 や DND1 タンパク質は、単独であっても標的となる mRNA の抑制が可能であることを意味する。本研究との齟齬に関して明らかにする為、MS2-MCP システムを用いたタンパク質の mRNA 繫留を行い、各タンパク質の mRNA 分解能を検証した。NANOS2 を mRNA に繫留した場合、mRNA の分解が促進された。また、NANOS2 の CNOT1 結合領域を欠損した NANOS2 では、mRNA 分解が抑制された。このことから、NANOS2 が CNOT1 をリクルートすることで、mRNA の分解を促進することが示唆された。一方、DND1 を mRNA に繫留した場合、NANOS2 による mRNA 分解に比べ、たいへん弱い分解能しか示さなかった。しかし、タンパク質を mRNA に繫留せず、NANOS2 や DND1 を単独で発現させた場合、mRNA 分解は誘導せず、両者を同時に発現した時はじめて mRNA 分解を示す。以上より考察すると、NANOS2 は CNOT1 を誘導するが、NANOS2 単独では mRNA に結合できない。一方、DND1 単独では mRNA 分解を強力に促進することができない。従って、NANOS2-DND1 経路による mRNA 認識・分解機構は、以下の2つの仮説が考えられた。

- (i) DND1 が標的 mRNA と結合し、NANOS2 が DND1-mRNA 複合体を認識して相互作用し、CNOT1 をリクルートして mRNA 分解を促進する。
- (ii) DND1 および NANOS2 が複合体を形成し、協調して標的 mRNA と結合する。そこに CNOT1 がリクルートされ、mRNA 分解を促進する。

(2-3) NANOS2-DND1 機能を再構成した体細胞(以下、N2D1 再構成細胞)を用いて、*Sohlh2* 3' UTR 上に存在する NANOS2-DND1 認識領域の検証を行った。*Sohlh2* 3' UTR の各領域欠損コンストラクトをもつ蛍光タンパク質発現ベクターを作成し、mRNA 不安定化の脱抑制を指標として検証した。これらの結果より、*Sohlh2* 3' UTR の 3' 末端側約 100nt 上に、NANOS2-DND1 認識領域が存在することがわかった。

(2-4) 体細胞で簡便に *Nanos2* 及び *Dnd1* を発現誘導するため、Dox 誘導型 *Nanos2-Dnd1* 発現 NIH3T3 細胞(以下、conditionally inducible NANOS2-DND1 NIH3T3: ciN2D1-3T3)を樹立した。興味深いことに、*Nanos2-Dnd1* の発現を誘導すると、ciN2D1-3T3 細胞の増殖が停止することがわかった。また、NANOS2-DND1 誘導時に、細胞増殖を促進する mTORC1 シグナル活性が低下することを見出した。雄性生殖細胞および精子幹細胞においても、mTORC1 シグナル活性が抑制されている。従って、NANOS2-DND1 は mTORC1 シグナルを抑制することで細胞増殖を抑制し、精子幹細胞の幹細胞性維持や、雄性生殖細胞分化に貢献していることが示唆された。

(2-5) 新たな NANOS2-DND1 標的 mRNA を同定するため、*Nanos2* 欠損マウスにおける生殖細胞の遺伝子発現から候補となる遺伝子を挙げ、検証を行った。標的候補遺伝子の mRNA 3' UTR を連結した蛍光遺伝子を ciN2D1-3T3 細胞に導入し、mRNA の P-body 局在及び蛍光タンパク質発現を指標として検証した。その結果、新たに6遺伝子を標的として見出した(図2)。そこで、これら新規 NANOS2-DND1 標的遺伝子は、雄性生殖細胞分化や精子幹細胞の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

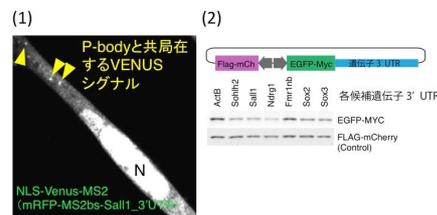


図2. ciN2D1-3T3細胞を用いた新規NANOS2-DND1標的 mRNA の検証  
(1) 新規NANOS2-DND1標的 mRNA の P-body 局在  
(2) 新規NANOS2-DND1標的 mRNA 3'UTR のタンパク質発現抑制

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Naoki Matsumoto, Hiroshi Nishimasu, Kazuhiro Sakakibara, Kazumichi M Nishida, Takamasa Hirano, Ryuichi Ishitani, Haruhiko Siomi, Mikiko C Siomi, Osamu Nureki, 2016 Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA. *Cell* 167 (2). 484-497. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.002 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

平野孝昌, 村岡正文, 相賀裕美子, “生殖細胞特異的 NANOS2-DND1 経路の体細胞における再構成”, 日本分子生物学会, 2017

平野孝昌, “体細胞における DND1-NANOS2 カスケード再構成”, 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」「ステムセルエイジングから解明する疾患原理」「動的クロマチン構造と機能」3 領域合同若手勉強会, 2017

平野孝昌, “shRNA を用いた新規精子幹細胞維持因子の同定”, 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」「ステムセルエイジングから解明する疾患原理」合同若手勉強会, 2016

〔図書〕(計 1 件)

Takama Hirano, Hidetoshi Hasuwa, Haruhiko Siomi, 2017 Identification of mouse piRNA pathway components using anti-MIW12 antibodies. *Methods in Molecular Biology* 1463, 295-216. DOI: 10.1007/978-1-4939-4017-2\_15

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/hiranotak/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。