

生殖細胞の性分化機構

Mechanism of sex differentiation of germ cells

課題番号：17H06166

相賀 裕美子 (SAGA, YUMIKO)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授



研究の概要

生殖細胞は体細胞からのシグナルを受けて性分化する。しかし実際に性分化を誘導する因子やそのメカニズムには不明点が多い。本研究課題では、新たな実験系や解析系を導入することにより、生殖細胞の性分化機構の解析を目指す。特に RNA 結合蛋白質 NANOS2 の標的遺伝子やカスケード解明を足掛かりにして、生殖細胞で機能する RNA 制御機構を明らかにする。

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞、性分化、RNA 制御

1. 研究開始当初の背景

受精を介して次世代の個体を産み出す生殖細胞が、いつ体細胞系列とわかれて、どのようにして生殖細胞独自の性質を獲得・維持するかという問題は、生物学のなかでも非常に重要なテーマである。特に生殖細胞の性分化は胎生期に起こる重要なイベントであるにも関わらず、性分化決定及び分化誘導機構は不明な点が多い。我々は、雄の胎児期の生殖細胞特異的に発現する RNA 結合蛋白質 NANOS2 が雄性化に必須であること、その機能発動にパートナー因子である DND1 が必要であることを示しているが、まだその標的は不明である。また我々は生殖細胞特異的に2つの遺伝子 SMAD4 と STRA8 を同時に欠損させると、卵巣内で生殖細胞の性転換がおこり細胞が雄性化することを示し、これらの因子が雌性決定因子であることを明らかにした。しかし、その下流イベント、特に SMAD4 の下流は不明である。

2. 研究の目的

生殖細胞雄性化の要である NANOS2 の標的認識機構及び制御機構の全容解明を目指す。そのために NANOS2 機能を再現する培養細胞系の確立を目指す。一方、生殖細胞雌化の機構に関しては主に SMAD4 の下流遺伝子カスケード解明を目指す。これらを総合して生殖細胞の性分化開始と分化推進制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 生殖細胞特異的な遺伝子 KO をキメラ解

析 (F0) で行うことを可能にする ES 細胞を確立しその有効性を確認する。

2) キメラで機能が確認できた遺伝子に関しては、マウスラインを確立して、より詳細な解析をおこなう。この標的遺伝子としては P-body 構成因子、NANOS2、SMAD4 の標的候補遺伝子などである。

3) NANOS2 カスケードを簡便に解析できる培養細胞系を確立する。細胞としては P-body を構成的に有する NIH/3T3 を用いる。4) 培養細胞での再現に成功した場合は、生化学的解析、標的 RNA の同定、ライブイメージング等を行う。

4. これまでの成果

(1) XY-ES 細胞を介した雄性キメラ解析の有効性は確認できた。DDX6、DCP2、CNOT1、4ET の cKO をはじめ、NANOS2-NANOS3 キメラ遺伝子などの解析をキメラで行った。その結果、NANOS2 機能における P-body の重要性が示された。一方、蛋白質の安定性が問題になるケースがあった。特に CNOT1、DCP2 遺伝子などは KO しても蛋白質が安定で、マウスラインを確立しても、解析が困難であった。また生殖細胞の雌化解析を目的に、XX-ES 細胞や XO-ES 細胞を用いてキメラ解析を試みたが、ES 細胞の不安定性や、体細胞の雄化による影響が大きく、効率よい解析は不可能と結論した。そこでストラテジーを変更し、発生過程における遺伝子変動を、単細胞レベルで解析する Single-cell RNA-seq 法を用いて、以下の細胞のデータセットを取

得した。

- 1) E11.5-E15.5 の胎仔生殖巣構成細胞
- 2) E13.5-E14.5 の NANOS2-KO 精巣細胞
- 3) E13.5 の SMAD4-cKO, RA 阻害剤処理、SMAD4-cKO+RA 阻害剤処理

これらのデータセットから、NANOS2 の下流遺伝子カスケード、SMAD4 の下流、雄化誘導因子候補を同定した。

(2) 培養細胞 (NIH/3T3) に NANOS2 と DND1 を導入し Dox 依存的に誘導できる細胞を得た。この細胞では、P-body の形成が亢進し、NANOS2 標的遺伝子である *Dazl* の抑制がみられた。さらに生殖細胞でみられる細胞分裂停止現象が再現された。そこでこの細胞系を用いて、以下の解析を行っている。

1) NANOS2 の標的認識機構の解析: *Dazl*, *Sohlh2* の 3'-UTR を用いて mapping を行った。特異的な配列は見出されず、構造的基盤があると想定された。そこで、標的 RNA を網羅的に同定するシステムの構築を行った。NANOS2 あるいは DND1 と RNA-editing 酵素を融合した蛋白質を発現させて、RNA 編集を目印にして、標的 RNA の同定を試みる。培養細胞では、*Dazl* を特異的に編集することが分かった。

2) 標的 RNA の可視化によるイメージング解析: 再現系細胞に dCas13(不活性型 RNA-nuclease)-EGFP 融合蛋白質と *Dazl* RNA 及び gRNA を用いることにより、*Dazl* RNA シグナルを GFP でモニターすることが可能になった。シグナルは DOX 依存的に P-body に効率よくリクルートされた。

3) NANOS2 による細胞分裂停止機構の解析: 興味深いことに、DOX 存在下で、細胞分裂が速やかに停止する。すなわち、生殖細胞が雄化するとき最も初期に起こる細胞分裂停止 (G0 arrest) が再現できていると考えられた。最終的には mTORC 経路の抑制がおこることを見出した。現在この抑制メカニズムの解明を目指した解析を精力的に行っている。

5. 今後の計画

培養細胞系を用いた生化学的解析とライブイメージング解析で、NANOS2 の作動経路を明らかにするとともに、キメラ解析や、cKO マウスを用いた in vivo 解析により、生殖細胞の性分化、特に雄性分化の開始と推進機構を明らかにする。大きな課題として、cKO では解析が困難な遺伝子に関しては、AID-デグロン系、キメラ及びマウスラインの作成と解析により、これまで解析不能であった、蛋白質の機能解析を行う。特に、蛋白質の安定性が問題である P-body 因子の機能解析により、NANOS2 機能発現における P-body による RNA 制御機構の解明を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. *Kato Y, Iwamori T, Ninomiya Y, Kohda T, Miyashita J, Sato M, *Saga Y. ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles. EMBO Rep. 2019 Dec 5;20(12):e48251.

2. Shimada R, Kiso M, *Saga Y. ES-mediated chimera analysis revealed requirement of DDX6 for NANOS2 localization and function in mouse germ cells. Sci Rep. 2019 Jan 24;9(1):515.

3. Niimi Y, Imai A, Nishimura H, Yui K, Kikuchi A, Koike H, Saga Y, Suzuki A. Essential role of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonia. Dev Biol. 2019 Jan 1;445(1):103-112.

4. Fukuda K, Masuda A, Naka T, Suzuki A, Kato Y, *Saga Y. Requirement of the 3'-UTR-dependent suppression of DAZL in oocytes for pre-implantation mouse development. PLoS Genet. 2018 Jun 8;14(6):e1007436.

5. Pui HP, *Saga Y. NANOS2 acts as an intrinsic regulator of gonocytes-to-spermatogonia transition in the murine testes. Mech Dev. 2018 Feb;149:27-40.

国際会議 (招待講演)

1. Germ cell specific conditional knockout without making mouse lines. The 15th Transgenic technology meeting. Japan. April 8, 2019

2. MOLECULAR DISSECTION OF NANOS-MEDIATED RNA-REGULATION. CSH-Germ Cells Meeting. USA. Oct 9, 2018.

3. Requirement of DDX6 mediated P-body formation for the function of NANOS2 in male germ cell differentiation. COMBIO2018 SYMPOSIUM. Australia, Sept 23, 2018

4. Egg or sperm: how germ cell sex is determined. The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo, Japan. July 26, 2017

5. Role of Nanos Proteins in Male Germ Cell Development. Gordon Research Conference, Hongkong, June 18, 2017

7. ホームページ等

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/10/research-highlights_ja/rh20191031.html

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/01/research-highlights_ja/20190129-2.html

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2018/06/research-highlights_ja/20180612.html