

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20870016

研究課題名(和文) マウス生殖細胞におけるナノス2結合タンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of NANOS2-associating proteins in mouse germ cells

研究代表者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)

国立大学法人横浜国立大学・学際プロジェクト研究センター・特任教員(助教)

研究者番号：60467058

研究成果の概要(和文)：本研究においては、マウス生殖細胞の雄性化に必須な機能を持つ RNA 結合タンパク質 NANOS2 の生化学的・細胞生物学的解析を行うことによってその細胞内局在、結合するタンパク質や RNA を明らかにした。以上の知見をもとにして Nanos2 の機能モデルを提唱すると共に、生殖細胞の雄性化を制御する分子機構についてその一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we biochemically and cell biologically analyzed functions of RNA-binding protein NANOS2 which plays a critical role in the differentiation of mouse germ cells. We found cellular localization of NANOS2 protein, and identified Nanos2-associating proteins and RNAs. These data reveal a part of NANOS2 function in the differentiation of mouse embryonic male germ cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞 RNA 発生 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

マウスの生殖細胞は、受精後約7日目に胚体外に40個ほどの集団として発生した後に増殖しながら移動し、将来の生殖巣へと到達する。移動期の生殖細胞は卵にも精子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する。すなわち、雌の生殖細胞は減数分裂に移行するのに対して、

雄の生殖細胞は細胞周期を停止する。

Nanos2 は生殖巣に到達した雄の生殖細胞でのみ発現する遺伝子であり、生殖細胞の雄性分化を制御する。Nanos2 を欠損した雄性生殖細胞は雌の生殖細胞のように減数分裂へと移行すると同時に、雌性生殖細胞の分化に必要な遺伝子が発現上昇する。また、Nanos2 を強制発現させられた雌の生殖細胞

においては減数分裂が抑制されると同時に雄特異的な遺伝子が発現上昇する。以上のように、Nanos2 は生殖細胞の雄性分化に重要な役割を持つが、その分子的基盤については未だに不明であった。

## 2. 研究の目的

上述のように、Nanos2 が生殖細胞の雄性化に重要な機能を持つことは明らかであるが、その生化学的、細胞生物学的な機能については不明であった。そこで、本研究においては、生殖細胞の雄性化を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、Nanos2 タンパク質の細胞内局在、結合するタンパク質や RNA を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Nanos2 細胞内局在の解析

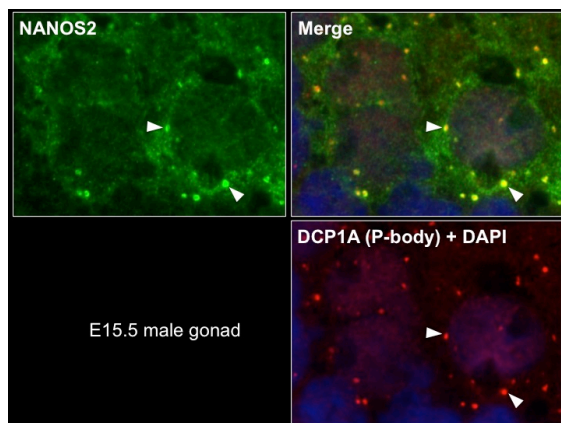
Nanos2 が発現している生殖細胞を含む胎児期雄性生殖巣の切片を作製し、Nanos2 抗体で免疫染色を行った。その際、各種の細胞内オルガネラのマーカーと共染色することで Nanos2 タンパク質の細胞内局在を解析した。

(2) Nanos2 結合タンパク質と RNA の同定  
まず、Nanos2 の N 末に 3×FLAG タグを付与したトランスジーンを持つマウスを作製した。そのマウスの胎児期雄性生殖巣由来の細胞抽出液を作製し、FLAG 抗体を用いて 3×FLAG-Nanos2 タンパク質を免疫沈降によって回収した。その際、共沈殿するタンパク質については質量分析によって、RNA については RT-PCR によって同定した。

## 4. 研究成果

### (1) Nanos2 は P-body に局在する

上述のように雄の胎児期生殖巣切片を Nanos2 抗体で染色したところ、NANOS2 は細胞質に顆粒状に局在した。この



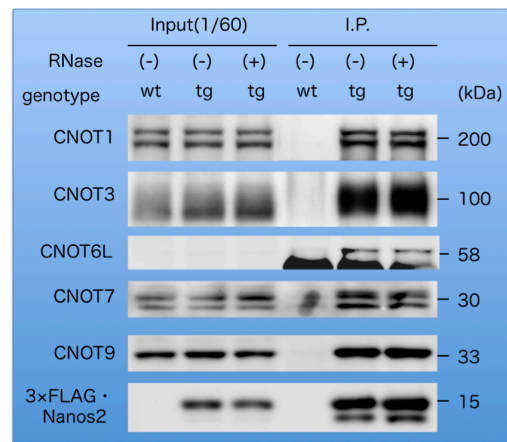
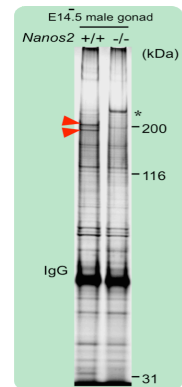
局在様式は P-body と呼ばれる RNA 分解の場

とよく似ていたため、P-body のマーカー (DCP1A 抗体) で共染色したところ、上図の矢頭のように Nanos2 は P-body に局在することが明らかになった。このことは、Nanos2 が RNA 分解の経路に関わっていることを強く示唆している。

### (2) Nanos2 は CCR4-NOT deadenylation complex と結合する

次に、Nanos2 の結合タンパク質を同定するために、胎児期雄性生殖巣の抽出液から Nanos2 抗体によって Nanos2 タンパク質を回収し、SDS-PAGE によって分離した後に銀染色した。

その結果、右図の赤矢頭のように 200kDa 付近に特異的なバンドを検出したため、これを質量分析によって同定したところ CNOT1 であることが明らかになった。CNOT1 は CCR4-NOT deadenylation complex の構成因子であることから、Nanos2 は CCR4-NOT deadenylation complex と結合していることが強く示唆された。そこで、この結果をウエスタンブロッティングによって確認すると、下図のよ

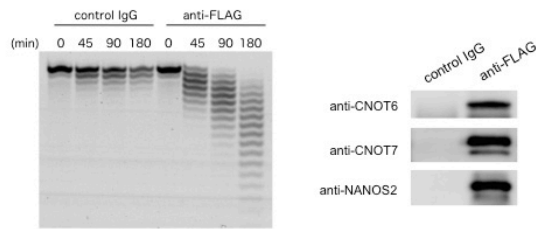


うに、Nanos2 は他の構成因子である CNOT3, 6L, 7, 9 とも結合していることから、Nanos2 と CCR4-NOT deadenylation complex との結合が明らかになった。また、この結合は RNase 存在下においても変わらないため、タンパク質-タンパク質結合であることも明らかになった。

### (3) Nanos2-CCR4-NOT 複合体は deadenylation 活性を示す

CCR4-NOT deadenylation 複合体と結合しているという事実から、Nanos2 を含むタンパク質複合体に deadenylation 活性があることを示唆していた。そこで、3×

FLAG・Nanos2 を過剰発現させた精巣から FLAG 抗体を用いて Nanos2 タンパク質を免疫沈降によって回収し、deadenylation 活性の有無について解析した。



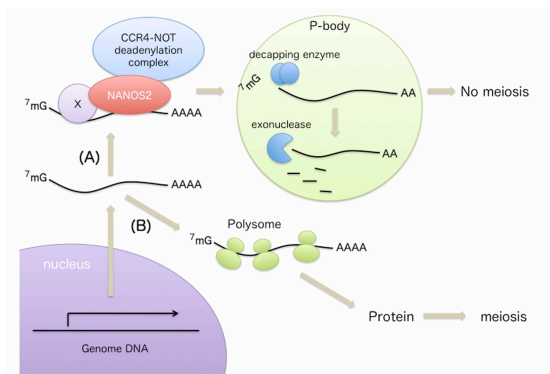
その結果、上図右パネルのように Deadenylation complex の catalytic unit である CNOT6 と CNOT7 が Nanos2 と共沈殿し、かつ、上図左パネルのように Nanos2 免疫沈降物は deadenylation 活性を持つことが示された。以上のことから、Nanos2 は実際の細胞内において、mRNA の deadenylation に関与することが強く示唆される。

(4) Nanos2 は減数分裂関連の mRNA と結合する

Nanos2 と Deadenylation complex との結合が明らかになったため、それらのターゲット RNA を探索するために、Nanos2 結合 RNA の同定を試みた。3×FLAG-Nanos2 を発現する雄性生殖巣の抽出液から FLAG 抗体によって Nanos2 を免疫沈降し、共沈殿する RNA を回収した。この RNA から poly(dT) を用いて一本鎖 cDNA を逆転写によって合成した。Nanos2 は減数分裂を抑制する機能を持つため、そのターゲット RNA は減数分裂を促進する遺伝子の mRNA である可能性が高い。そこで、それらの遺伝子について PCR によって共沈殿の有無を確認したところ、Scp3, Taf7L, DazL などの mRNA が Nanos2 と特異的に結合していることが明らかになった。

(4) Nanos2 の機能モデル

以上のことから、Nanos2 の機能モデルとして下図のようなことが考えられる。



ゲノム DNA から転写された減数分裂関連遺伝子の mRNA は Nanos2 と CCR4-NOT deadenylation complex によって認識されて P-body へと移行すると、そこに局在する酵素群によって分解され、結果として発現は抑制される。それに対して、Nanos2 欠損マウスにおいては減数分裂関連遺伝子の mRNA はポリソームに運ばれてタンパク質として機能することによって生殖細胞を減数分裂へと移行させる。

## 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 3 件)

【査読有り】

1. NANOS2 interacts with CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Saga Y.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 2010 Feb 23;107(8):3594-9.

2. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells.

Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y.

*Science*. 2009 Sep 11;325(5946):1394-8.

【査読無し】

3. Nanos2 蛋白質は生殖細胞の雄性化に必須な分子である -Nanos2 は卵と精子の分かれ目に働く蛋白質-

鈴木 敦, 相賀 裕美子

「生物の科学 遺伝」2008 年 9 月号 vol.62 no.5:12-13.

[学会発表] (計 2 件)

1. GERM CELLS meeting in Cold Spring Harbor Laboratory (New York)

『Functional analysis of mouse Nanos2 in the sexual development of germ cells』

Atsushi Suzuki, Yumiko Saga

ポスター発表 2008.10.3

2. RNA フロンティアミーティング 2008 (京都)

『マウス生殖細胞雌雄分化における Nanos2 の機能解析』

鈴木 敦, 相賀 裕美子

口頭発表 2008.6.6

[その他]

ホームページ等

<http://www.ynu-irc.ynu.ac.jp/suzuki.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)  
国立大学法人横浜国立大学・学際プロジェクト研究センター・特任教員 (助教)  
研究者番号：60467058

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

相賀 裕美子 (SAGA YUMIKO)  
国立遺伝学研究所・系統生物センター・発生工学研究室・教授  
研究者番号：50221271