

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251025

研究課題名(和文)生殖細胞の発生分化を司るRNA制御機構

研究課題名(英文)RNA-mediated regulatory mechanisms involved in germ cell development

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) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞の遺伝子発現制御には、RNA結合タンパク質の機能を介した制御が重要である。我々はその中でも、生殖細胞特異的に発現するNanos2及びNanos3の機能に焦点を絞って研究を行ってきた。Nanos3は始原生殖細胞の形成には必須だがそれに加えて精子形成過程で、未分化精原細胞の増幅に関与することを明らかにした。一方、Nanos2は胎生期においてはDazlを標的としてその3'-UTRを介して発現抑制する。また生後の精子幹細胞ではSohlh2等の標的RNAの抑制による分化抑制と、mTORC1経路の機能阻害により、精子幹細胞の増殖及び分化を抑制することが主な機能であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：In the germ cell development, regulatory mechanisms mediated via the function of RNA binding proteins are especially important. We have focused on functions of Nanos2 and Nanos3, which are expressed specifically in germ cells. We found that Nanos3 functions in the amplification process of undifferentiated spermatogonia during spermatogenesis, in addition to the important function in PGC development. On the other hand, Nanos2 suppresses expression of the target gene Dazl through binding to its 3'-UTR in the embryonic male germ cells. In addition, we found that Nanos2 maintains spermatogonial stem cell state via 1) direct recruitment and translational repression of genes that promote spermatogonial differentiation, and 2) repression of the target of rapamycin complex 1 (mTORC1), by sequestration of the core factor mTOR in mRNPs. This mechanism establishes a post-transcriptional buffering system to facilitate SSC homeostasis in the fluctuating environment within the seminiferous tubule.

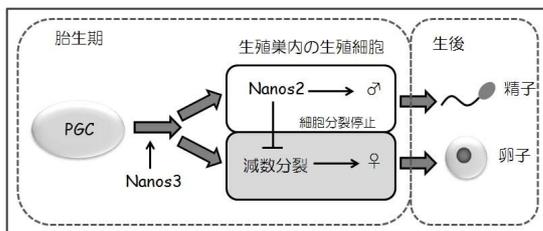
研究分野：発生遺伝学

キーワード：Nanos2 Nanos3 Dnd1 germ cell testis spermatogenesis P-body

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞であり、その異常は世代を超えて受け継がれる。生殖細胞は個体発生初期過程で始原生殖細胞として体細胞系列と分離し、ゲノムワイドなリプログラミングによってエピジェネティック修飾は一旦リセットされる。このことは、転写レベルによる制御よりも RNA を介した発現制御機構の必要性を示唆している。

我々は過去 10 年以上にわたって RNA 結合タンパク質 Nanos2, Nanos3 の機能解析を行ってきた。Nanos3 は始原生殖細胞の維持に必須であり雌雄ともに不妊になる (Tsuda et al. Science 2003)。一方、Nanos2 は生殖細胞の



雄性分化に必須で、Nanos2 を欠損させると生殖細胞は雌化し、雌性生殖細胞に強制発現させると雄化する (Suzuki et al. Genes & Dev. 2008)。我々は Nanos2 は脱アデニル化酵素構成因子である CNOT1 と Nanos3 は CNOT8 と直接結合し、RNA の分解に関与すること (Suzuki et al. PNAS, 2010, PLoS One, 2012)、また標的 RNA の認識にはパートナータンパク質である RNA 結合タンパク質 Dnd1 との結合が必須であることを明らかにした (Suzuki et al. 2016)。また、Nanos2 の最も有力な標的 RNA として Dazl-mRNA を同定した (Kato et al. 2016)。興味深いことに Dazl-mRNA の翻訳産物である Dazl も RNA 結合タンパク質であり、翻訳促進に機能すると考えられている。すなわち、Nanos2 による Dazl 抑制が阻害されると、分解と翻訳のバランスが崩れ、Dazl タンパク質が本来分解されるべき mRNA の運命を翻訳へと変更させ、その結果、細胞の運命も変更される可能性が考えられる。Nanos2 は精子幹細胞の維持にも必須であることから (Sada et al. Science 2009)、精子幹細胞とその分化過程においても類似の RNA 制御機構が存在する可能性がある。このことから我々は、RNA 結合タンパク質が介する標的 RNA の量的制御が、雄性分化を含めた生殖細胞の発生・分化における主要な駆動力ではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

生殖細胞の発生・分化に関わる RNA 制御機

構の解明をめざす。

(1) 始原生殖細胞 (PGC) の形成・維持における Nanos3 の機能解析

Nanos3 は Dnd1 及び CNOT8 と直接結合することから Nanos2 と同様に RNA の分解に寄与していると考えているが、その証拠はなく、また標的も不明である。近年開発された PGC 誘導系を用いて、Nanos3 の機能及びその作用機構を明らかにする。

(2) 生殖細胞の性分化能獲得過程における Dazl の機能解析

Dazl は Nanos2 の発現以前に生殖細胞特異的に発現する。Dazl を欠損すると生殖細胞は性分化能を失う。Dazl 及び Dnd1 と相互作用するタンパク質及び標的 RNA を同定し、性分化能獲得機構を明らかにする。

(3) 雄性生殖細胞、精子幹細胞における RNA 制御機構の解析

Nanos2, Dnd1, Dazl が構成する RNA タンパク質複合体の構造実態とその形成機構を解明する。それぞれの RNA 結合タンパク質の存在形態及び標的 RNA を同定し、それらのタンパク質複合体が標的 RNA を認識・結合する機構を明らかにする。

標的 RNA が分解と翻訳という最も根源的に重要な RNA 経路に振り分けられ制御される仕組みを明らかにし、細胞分化を制御する分子機構を解明する。各種 RNA 結合タンパク質と標的 RNA 複合体の細胞内局在の可視化・定量化を介して、RNA 制御のモデル化を試みる。

3. 研究の方法

1) 始原生殖細胞 (PGC) の形成・維持における Nanos3 の機能解析

共同研究者から Blimp1-venus 遺伝子を持つ ES 細胞の分与を受け、PGC-like cell (PGCLC) を誘導する系を確立した。この遺伝子背景をもち Nanos3 を欠損した ES 細胞を樹立し、PGCLC を誘導して、野生型との遺伝子発現変動を解析する。その結果、下流で機能している可能性のある遺伝子に関しては、遺伝子破壊実験を行う。一方、一方、Nanos3 は生後の精子形成過程においても発現しているが、その機能は不明である。通常の Nanos3-KO マウスは胎児期で生殖細胞が全て死滅するため、Nanos3 の cKO マウスを作製しその機能解析を行う。

2) 生殖細胞の性分化能獲得過程における Dazl の機能解析

タグ付きの Dazl-TG マウス (作成済み) の胎児精巣を回収し、免疫沈降により、Dazl と相互作用する因子、及び標的 RNA を同定する。ま

た Dazl-cK0 マウスを用いて Nanos2-K0 のレスキューを試みる。

3) 雄性生殖細胞、精子幹細胞における RNA 制御機構の解析

Nanos2-cK0 及び Nanos2-cOE, Dnd1-cK0, Dazl-cK0 を薬剤で誘導可能な GS 細胞を確立した。これらの細胞系を用いて Nanos2 の下流制御機構を解析する。

4 . 研究成果

(1) 始原生殖細胞(PGC)の形成・維持における Nanos3 の機能解析

Nanos3 を欠損した ES 細胞から PGCL 細胞を誘導し PGC の形成を解析した。その結果 Blimp1 陽性の PGC は野生型細胞と同様のタイミングで出現した。しかし、PGCL 細胞の数は次第に減少し失われていった。これは生体における Nanos3 欠損細胞の表現型と非常によく似ていた。そこで Nanos3 欠損 PGCLC の遺伝子発現変動を解析するために細胞を回収し RNA-seq 解析を行った。興味深い変動を示す遺伝子に関して、遺伝子 KO 解析を開始した。一方、Nanos3 は精子形成過程にも発現しているが、その機能解析には cK0 が必要である。ようやくマウスが作製できたので生後に Nanos3 を KO してその表現型を解析した。Nanos3 は未分化精原細胞の増幅段階で機能しているという結果が得られた。

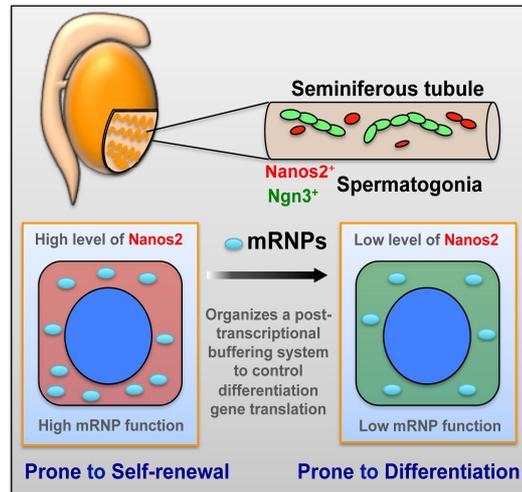
(2) 生殖細胞の性分化能獲得過程における Dazl の機能解析

生殖細胞における Dazl の機能としてよく理解されているのは、減数分裂の進行であるが、Dazl は RNA 結合タンパク質であり、その標的や、作用機構は不明である。我々は、まずオスの生殖細胞の分化過程で Dazl は Nanos2 の標的遺伝子となっており、3' -UTR を介して抑制されること、その抑制が起こらないと、細胞分裂が誘導されることを明らかにした。また Dazl の IP によりその標的を解析したところ、Nanos2 の標的も含まれており、Nanos2 とは標的の競合によっても機能していることが示唆された。一方、Nanos2-K0 マウスにおける異常が Dazl の抑制不全による可能性を検討するため、Nanos2/Dazl の dK0 マウスを作製し、Nanos2 の異常がレスキューされる可能性を検討した。しかし、細胞分裂の異常な進行を阻止することはできなかった。RA シグナルを遮断すると分裂は停止するので、Dazl 以外に Nanos2 の下流で機能する RA 経路が重要な機能をもつと考えられる。

(3) 3) 雄性生殖細胞、精子幹細胞における RNA 制御機構の解析

精子幹細胞における Nanos2 の機能を明らかにするために、条件付きで Nanos2 をノックアウト(KO)あるいは強制発現(OE)できる GS 細胞を確立し、実験を行った。その結果、Nanos2 は少なくとも 2 つの方法で幹細胞の維持に寄与することが判明した。ひとつは、

標的 RNA の抑制で、主に細胞分化に關与する遺伝子の 3' -UTR に結合し、P-body にリクルートして、分解あるいは翻訳抑制することを示した。一方、Nanos2 は mTORC シグナル系で重要な役割を果たす mTOR タンパク質と直接結合し、P-body にリクルートする。通常 mTOR タンパク質はライソソームの膜上にリクルートされて細胞の増殖や分化に機能することが報告されている。Nanos2 によるトラップは精子幹細胞の増殖・分化を抑制し、未分化性を維持することに機能することが判明した。また、Nanos2 が機能を発揮するためには P-body へのリクルートが重要であることが P-body の構成タンパク質 DDX6 のノックダウンによっても証明された。またこの Nanos2 タンパク質は幹細胞では非常に安定だが、RA シグナルにより不安定化される。この時 E3 ライゲースである Nedd4 が Nanos2 をユビキチン化して P-body ではなくライソソームに運んでいくことにより、Nanos2 の分解を誘導し、結果として細胞の分化が促進されることが明らかになった。



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 11 件) 全て査読有り。

1. Kabayama Y, Toh H, Katanaya A, Sakurai T, Chuma S, Kuramochi-Miyagawa S, Saga Y, Nakano T, Sasaki H. Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 23. pii: gkx027. doi: 10.1093/nar/gkx027.
2. Wu Q, Fukuda K, Kato Y, Zhou Z, Deng CX, Saga Y. Sexual Fate Change of XX Germ Cells Caused by the Deletion of SMAD4 and STRA8 Independent of Somatic Sex Reprogramming. *PLoS Biol.* 2016 Sep 8;14(9):e1002553. doi: 10.1371/journal.pbio.1002553.

3. Kato Y, Katsuki T, Kokubo H, Masuda A, Saga Y. *Dazl* is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat Com*. 2016 Apr 13;7:11272. doi: 10.1038/ncomms11272.

4. Suzuki A, Niimi Y, Shinmyozu 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 Rep*. 2016 Jan;17(1):37-46. doi: 10.15252/embr.201540828. Epub 2015 Nov 20

5. Zhou Z, Shirakawa T, Ohbo K, Sada A, Wu Q, Hasegawa K, Saba R. Saga Y. RNA Binding Protein Nanos2 Organizes Post-transcriptional Buffering System to Retain Primitive State of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Dev Cell*. 2015Jul6;34(1):96-107.doi:10.1016/j.devcel.2015.05.014.

6. Wu Q, Fukuda K, Weinstein M, Graff JM, Saga Y. (2015). SMAD2 and p38 signaling pathways act in concert to determine XY primordial germ cell fate in mice. *Development* 142, 575-86. doi: 10.1242/dev.119446.

7. Matsubara Y, Kato T, Kashimada K, Tanaka H, Zhi Z, Ichinose S, Mizutani S, Morio T, Chiba T, Ito Y, Saga Y, Takada S, Asahara H. (2015). TALEN-Mediated Gene Disruption on Y Chromosome Reveals critical role of EIF2S3Y in mouse spermatogenesis. *Stem Cells Dev*. 24, 1164-70. doi: 10.1089/scd.2014.0466. Epub 2015 Feb 25

8. Suzuki A, Niimi Y, Saga Y. (2014). Interaction of NANOS2 and NANOS3 with different components of the CNOT complex may contribute to the functional differences in mouse male germ cells. *Biol Open*. 3, 1207-16. doi: 10.1242/bio.20149308.

9. Hasegawa K, Saga Y. (2014). FGF8-FGFR1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Biol Reprod*. 9, 145 doi: 10.1095/biolreprod.114.121012. Epub 2014 Oct 30.

10. 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. Epub 2014 Feb 24.

11. 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. Epub 2013 Oct 29.

[学会発表](計23件)
(国際)

1. Han Pin Pui and Yumiko Saga. Intrinsic regulation of the timing of gonocytes-to spermatogonia transition in the murine testes by an RNA-binding Protein NANOS2. *Mouse Molecular Genetics*, Hinxtton, 2015. 9. 17
2. Yumiko Saga. Sex determination of mouse germ cells. Seminar in Francis Crick Institute. Sept 15, 2015, LONDON
3. Yumiko Saga. Mechanism of Sex determination of mouse germ cells. Vertebrate Sex determination meeting, Kona, Hawaii, 2015.4.17
4. Yumiko Saga. Sex determination of mouse germ cells. Finnish-Japanese joint symposium, (Helsinki) 2015. 3.3
5. Yuzuru Kato, Yumiko Saga, Nanos2 antagonizes *dazl* to achieve sexual differentiation of male germ cells in mouse embryos. CSH-GERM CELLS meeting, 10/7-11, 2014, USA
6. Atsushi Suzuki, Yuki Nimi, Kaori Shinmyozu, Makoto Kiso, Yumiko Saga. Mouse dead end1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell development. CSH-GERM CELLS meeting, 10/7-11, 2014, USA
7. Quan Wu, Yumiko Saga. Female to male sex reversal of mouse PGCs independent of somatic environment. CSH-GERM CELLS meeting, 10/7-11, 2014, USA

(国内)

8. Yumiko Saga. Sex determination of mouse germ cells. International Symposium on Epigenetic Dynamics and Regulation in Germ Cells. Kyoto, 2016.2.17-19.
9. Takayuki Sakurai, Yumiko Saga. Functional analyses of Nanos3 in mouse spermatogenesis. International Symposium on Epigenetic Dynamics and Regulation in Germ Cells. Kyoto, 2016.2.17-19
10. Han Pin Pui and Yumiko Saga. Intrinsic regulation of the timing of gonocytes-to spermatogonia transition in the murine testes by an RNA-binding Protein NANOS2. International Symposium on Epigenetic Dynamics and Regulation in Germ Cells. Kyoto, 2016.2.17-19

11. Yumiko Saga, Zhi Zhou. An intrinsic buffering mechanism in spermatogonial stem cells controls the timing of mouse spermatogenesis. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会(BMB2015) 神戸 2015.12.3
12. Takayuki Sakurai, Yumiko Saga. Functional analyses of Nanos3 in mouse spermatogenesis. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会(BMB2015). 神戸 2015.12.3
13. Kurumi Fukuda, Yuzuru Kato, Atsushi Suzuki, Yumiko Saga. Role of a 3'UTR-dependent suppression of *Dazl* in female reproduction. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会(BMB2015).神戸 2015.12.3
14. 相賀裕美子、生殖細胞の性分化決定機構「精子と卵子のわかれめ」、第 9 回家畜 DNA 西郷シンポジウム、福島 2015.9.16.
15. Takayuki Sakurai, Yumiko Saga. Functional analyses of Nanos3 in mouse spermatogenesis. 第 48 回日本発生生物学会年会.筑波 2015.6.2-5.
16. Zhou Zhi, Yumiko Saga. Nanos2 organizes a post-transcriptional buffering system in mouse Spermatogonia Stem Cells. 第 47 回発生生物学会, 5 月 29 日名古屋, 2014
17. Han Pin Pui, Yumiko Saga. A revised model of gonocytes-to-spermatogonia transition in the mouse testis. 第 47 回発生生物学会, 5 月 29 日、名古屋, 2014
18. Yuzuru Kato, Yumiko Saga. Germ cell sexual differentiation requires Nanos2-mediated dosage control of *Dazl* in mice. 第 47 回発生生物学会, 5 月 29 日、名古屋、2014
19. Quan Wu, Yumiko Saga. Smad2 and p38 signaling orchestrate the male fate decision of mouse PGC. 第 47 回発生生物学会, 5 月 29 日、名古屋, 2014
20. Hiroko Koike, Yumiko Saga. Suppression of pluripotency gene together with NANOS2 is essential for male sexual differentiation in mouse germ cells. 第 47 回発生生物学会, 5 月 29 日、名古屋, 2014
21. 相賀裕美子、マウス生殖細胞の性分化制御機構 Mechanism of sexual differentiation of mouse germ cells. エピジェネティクス研究会(東京大学) 2014. 5.26
22. Han Pin Pui, Yumiko Saga. The role of FGF signaling in the initiation and maintenance of murine spermatogenesis. 第 37 回日本分子生

物学会, 11 月 25 日、横浜, 2014

23. Takayuki Sakurai, Yumiko Saga. Functional analyses of Nanos3 in mouse spermatogenesis. 第 37 回日本分子生物学会, 11 月 25 日、横浜, 2014

〔その他〕

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2016/09/research-highlights_ja/20160909-2.html

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2015/06/research-highlights_ja/20150626.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

(3)連携研究者

加藤 譲 (KATO Yuzuru)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：60570249

安島理恵子 (AJIMA Rieko)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：10615066

二宮 洋一郎 (NINOMIYA Yoichirou)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：90237777

鈴木 敦(SUZUKI Atsushi)

横浜国立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60467058