

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

Molecular mechanism underlying sexual development of male germ cells

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



研究の概要

マウスの生殖細胞の発生過程では RNA 制御を介した遺伝子発現が非常に重要機能をもつ。我々はそのなかでも、生殖細胞の性分化及び精子幹細胞の維持に必須な RNA 結合タンパク質 Nanos2 の上流シグナル及び下流遺伝子カスケードを明らかにすることを目的にして研究をおこなっている。これまでに、雄の生殖巣では FGF シグナルの下流で TGF- β シグナルが機能し Nanos2 が誘導され Nanos2 による減数分裂関連遺伝子の分解により雌性分化が抑制されることがわかった。

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、精巣、Nanos、RNA、減数分裂、幹細胞

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 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、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、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。

また生後の精子幹細胞システムを理解するため、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) と生殖細胞特異的因子 Nanos2 の関係を明らかにする。また、セルトリ細胞の遺伝子発現に着目し、その遺伝子発現と生殖細胞分化の関係を明らかにする。また精子幹細胞 (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. これまでの成果

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、TGF β 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 TGF β シグナルが機能していることが明らかになった。TGF β は FGF の下流で機能して生殖細胞の雄性分化を誘導することを明らかにした。

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。

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 と直接に結合し標的 RNA の分解に関与することが分かった。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関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

5. 今後の計画

平成 24 年度からの 2 年間で Nanos2 の上流シグナルカスケードを in vivo で解析したい。そのためにはまず Smad の条件付きノックアウトによる解析を完了させる。また Nanos2 と相互作用する因子 Dnd1 及び Nanos2 の標的候補遺伝子に関して条件付きノックアウトマウスを作成中であり、その解析を中心に行う。さらに Nanos2 の標的遺伝子群の強制発現も計画している。これらの解析を通して、Nanos2 の上流シグナルおよびその下流の遺

伝子カスケードが明らかになり、生殖細胞の性分化機構の解明につながると期待される。また生後の精子幹細胞の維持機構に関しては、セルトリ細胞から分泌される GDNF と内的因子である Nanos2 との関係に関して GS 細胞を用いた解析を行う予定である。また最近、精子幹細胞およびセルトリ細胞両方に FGF シグナルが重要な機能を持っている可能性があり、FGF8 及びその受容体である FGFR1 の条件付きノックアウトマウスを導入してその解析を進める。

6. これまでの主要発表論文

Suzuki A, Saba R, Miyoshi K, Morita Y, Saga Y. Interaction between NANOS2 and the CCR4-NOT deadenylation complex is essential for male germ cell development in mouse. PLoS One, in press

Hasegawa K, Pin PH, Saga Y. NANOS2 acts downstream of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling to suppress differentiation of spermatogonial stem cells. Sada A, Stem Cells. 30(2):280-91. 2012

Hasegawa K, Okamura Y, Saga Y. Notch signaling in Sertoli cells regulates cyclical gene expression of Hes1 but is dispensable for mouse spermatogenesis. Mol Cell Biol. 32(1):206-15. 2012

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

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Saga Y. NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A ;107(8):3594-9, 2010

Suzuki H, Sada A, Yoshida S, Saga Y. 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(2):222-31, 2009

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

ホームページ等

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