

137. 哺乳類生殖細胞形成を制御する RNA 分子機構

鈴木 敦

Key words : 生殖細胞, 精巢性テラトーマ,
RNA 結合タンパク質

横浜国立大学 大学院工学研究院
機能の創生部門

緒 言

精巢性テラトーマは内胚葉・外胚葉・中胚葉の全ての胚葉成分によって構成される腫瘍である。腫瘍中には生殖細胞を起源とする分化多能性の幹細胞が存在し、その細胞に由来する様々な器官・組織が混在する。このような精巢性テラトーマ発症原因の分子基盤については未だに不明な点が多く残っている。

私達はこれまでに、RNA 結合タンパク質 NANOS2 に着目して、マウス始原生殖細胞の性分化を制御する RNA 分子機構について解析を行ってきた¹⁾。その過程で、NANOS2 結合タンパク質として Dead end1 (DND1) を同定した。Dead end は脊椎動物間で保存された RNA 結合タンパク質であり、ゼブラフィッシュやメダカにおいて生殖細胞の発生に必須であることが知られている²⁾。そこで、私達は Dnd1 の条件付き欠損マウスを作製し、始原生殖細胞が性分化する時期に Dnd1 を欠損させた表現型を NANOS2 欠損マウスと比較した。その結果、意外なことに、Dnd1 を欠損する始原生殖細胞は NANOS2 欠損の場合と同様に雄性分化に失敗するだけでなく、精巢性テラトーマを発症した。NANOS2 欠損の場合では決して精巢性テラトーマは観察されないことを考え合わせると、以上の結果は、DND1 が NANOS2 と協同的に機能して始原生殖細胞の雄性分化を促進していることを示すだけでなく、DND1 が NANOS2 非依存的に雄性始原生殖細胞における分化多能性を抑制し、その結果として精巢性テラトーマの発症を抑制することも示している。本研究においては、DND1 が精巢性テラトーマを抑制する分子メカニズムの解明を目指して解析を行った。

方 法

DND1 に結合するタンパク質と RNA を網羅的に同定するために、抗 DND 抗体を用いた免疫沈降法によってその結合因子を回収することを試みた。しかしながら、ビーズに非特異的に結合する因子によって特異的なシグナルが覆い隠されてしまい、DND 結合因子を特異的に回収することが出来なかった。そこで、私達は遺伝子改変技術によって特殊なタグを融合した DND1 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。具体的には、Dnd1 遺伝子を含む人工染色体を用いて、DND1 の C 末端にフラッグ・タグ (FLAG) とヘマグルチン・タグ (HA) を TEV protease 認識配列を挟んでつなげたタグ (FTH タグと呼ぶ) を融合した DND1-FTH を発現するマウスを作製した (図 1)。次に、このトランスジェーンをもつ胎児期オスの生殖巣を大量に回収し、生殖巣抽出液を作製した。その際、RNA 依存的または非依存的なタンパク質の結合を同定するために、RNase を加えた抽出液も作製した。これら抽出液から抗 HA 抗体で DND1-FTH を免疫沈降した後に TEV protease によって HA タグとビーズを DND1 から切り離した。その上清を抗 FLAG 抗体で免疫沈降したのちに FLAG ペプチドで溶出することによって、効率的に、かつ、非特異的結合タンパク質・RNA の少ない状態で DND1 に相互作用するタンパク質と RNA を回収した。

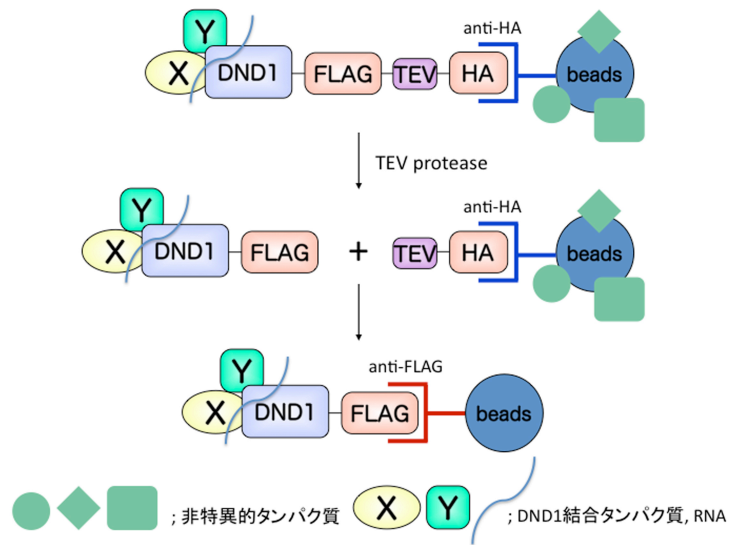


図1. DND1 結合タンパク質と RNA 回収方法の概要.

抗 HA 抗体で DND1-FTH を免疫沈降した後に TEV protease によって HA タグとビーズを DND1 から切り離す. その上清を抗 FLAG 抗体で免疫沈降したのちに FLAG ペプチドで溶出する.

結果

上記のように回収したタンパク質を SDS-PAGE によって分離した後に銀染色した (図2). コントロールに比べて特異的なバンドを切り出し, 質量分析によって同定したところ, NANOS2 を含む 25 個の DND1 結合タンパク質の候補を同定した. 一方で, 上記のように回収した RNA を増幅した後にマイクロアレイで解析し, 約 600 種類の DND1 結合 RNA を同定した.

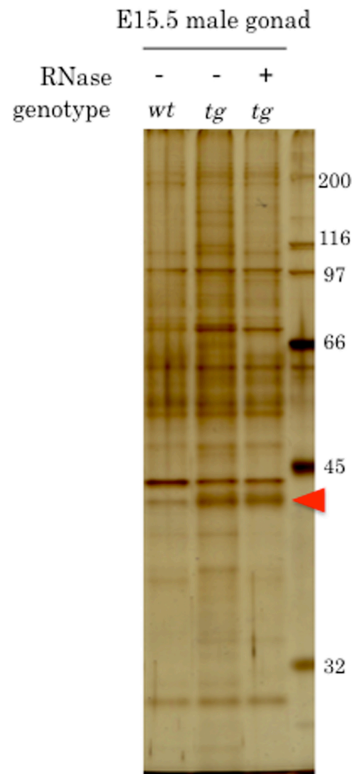


図2. DND1 結合タンパク質の銀染色像.

FTH タグを用いて免疫沈降したサンプルを銀染色した画像. 赤い矢頭はトランスジーン由来の DND1 を示す.

考 察

幹細胞は高い分化能を保持しながらも分裂の回数や分化のタイミングを厳密に制御されることによって正常な発生や生体組織の恒常性維持を行っている. このような制御の分子基盤を明らかにすることは, 発生生物学や癌生物学の中心的なテーマの一つである. 生殖細胞は精子と卵が融合して受精卵になると全能性の細胞となることから, 潜在的に高い分化能を保持していると考えられる. 精巢性テラトーマの発症は, そのような分化多能性を適切に制御する分子機構が破綻した結果として起こる生殖細胞の腫瘍化である. このことを考慮すると, 精巢性テラトーマ発症の分子メカニズムを解明することは, 幹細胞が未分化性を保持する機構や, 適切なタイミングで分化する機構を解析する上でのモデルケースとなる. 特に, 本研究で注目する DND1 は精原幹細胞や ES 細胞, iPS 細胞などの未分化細胞に高発現することが知られている. このことは, 雄性始原生殖細胞において DND1 がテラトーマ発症を抑制する分子機能は, 上記の未分化細胞においても同様に存在する可能性を示唆している. 本研究において DND1 に結合する因子を同定したことは, DND1 が精巢性テラトーマを抑制するメカニズムを解明する上で重要な情報を得たことになる.

一方で, 生殖細胞形成戦略の進化的側面からも興味深い. これまでに我々はマウス DND1 と NANOS2 の結合を明らかにしたが, 同時に, ゼブラフィッシュ Dead end (Dnd) と Nanos の明らかな相互作用は検出できないことも発見している (未発表). また, 最近, ゼブラフィッシュ Dnd は mRNA に結合して microRNA のアクセスを阻害することによって遺伝子発現を促進する機能があると報告されたが³⁾, これは NANOS2 と共に RNA 分解を促進するマウス DND1 の機能と一致しない. さらに, ハエの Nanos のパートナーは Pumilio であるが, 哺乳類 PUMILIO は存在するにもかかわらず NANOS2 の結合タンパク質は DND1 である. 以上のことは, Nanos や Dead end などの遺伝子は種を超えて広く保存されており, かつ, 生殖細胞の発生に重要な機能を持つ点は共通するが, その機能は種間で大きく違うことを示している. 今後, それぞれの種における各遺伝子の機能を解析することによって, 生殖細胞形成戦略の種を超えた同一性と多様性がより明らかになると期待できる.

共同研究者

本研究において、質量分析は理研 CDB 質量分析ユニットの新名主かおり氏、中村 輝先生、林 茂生先生に協力いただいた。

文 献

- 1) Suzuki, A. & Saga, Y. : Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev.*, **4** : 430-435, 2008.
- 2) Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B. & Raz, E. : Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol.*, **316** : 1429-1434, 2003.
- 3) Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J. A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P. M., van Duijse, J., Ørom, U. A., Lund, A. H., Perrakis, A., Raz, E. & Agami, R. : RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, **7** : 1273-1286, 2007.