

氏 名 小池 紘子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1727 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Reciprocal regulation between *Nanos2* and *Sox2* for sexual
differentiation of male germ cells in mice

論文審査委員 主 査 准教授 酒井 則良
教授 城石 俊彦
教授 荒木 弘之
准教授 野々村 賢一
教授 松居 靖久 東北大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Germ cells, which generate spermatozoa in the testes and oocytes in the ovaries, are specialized cells that transmit genetic information to the next generation. In mice, spermatozoa and oocytes are differentiated from primordial germ cells (PGCs) through sexual differentiation. In female gonads, PGCs proceed to meiosis, whereas in male gonads they enter mitotic arrest at G₀/G₁ stage and maintain the quiescence after birth.

One of the key factors required for promoting male pathway is *Nanos2* in male germ cells. *Nanos2* plays a crucial role in sexual differentiation of male germ cells because meiosis is abnormally induced and male-type genes are down-regulated in the *Nanos2-null* male germ cells. In addition, the expression of pluripotency genes (such as *Sox2*), which is a hallmark of undifferentiated PGCs, is maintained in *Nanos2-null* male germ cells. However, it is unclear how *Nanos2* promotes the male differentiation pathway. In my thesis research, I focused on these events which are compromised in *Nanos2-null* germ cells to understand the mechanism by which male genetic program is promoted in mouse germ cells.

Firstly, I examined *Nanos2-null* phenotype and found that mitotic resumption rather than meiotic entry was frequently occurred. I expected that male pathway would be recovered if I could inhibit the abnormal mitotic resumption of *Nanos2-null* germ cells. Since retinoic acid (RA) is implicated in the mitotic regulation and the meiotic initiation of embryonic germ cells, I investigated the involvement of RA signaling in the defect in *Nanos2-null* germ cells. Interestingly, cell cycle abnormalities were completely prevented by treating with RA receptor (RAR) antagonist, suggesting a

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

role for *Nanos2* in the suppression of RA signaling. Next, I examined expression of *Dnmt3L*, a representative downstream factor of *Nanos2* required for male specific genomic imprinting. However, I could not observe any recovery of the *Dnmt3L* expression. These results indicate that *Nanos2* is required for the expression of *Dnmt3L* independently of maintaining mitotic quiescence.

Secondly, I asked whether the prolonged expression of the pluripotency genes in *Nanos2-null* male germ cells influences the male-type gene expression. To address this question, I employed conditional *Sox2* knocked-out mice (*Sox2^{f/f}*). I found that the mitotic quiescence was retained in the *Sox2/Nanos2* double mutant male germ cells, indicating that *Nanos2*-mediated repression of pluripotency genes is required for the maintenance of mitotic quiescence. Furthermore, these gene expressions were repressed in the RAR antagonist treated *Nanos2-null* male gonads. These data suggest that *Nanos2* maintains the mitotic quiescence through the suppression of RA signaling which otherwise promotes pluripotency gene expression. However, *Dnmt3L* expression was not recovered regardless of knocking out of *Sox2* either with or without RAR antagonist. This result indicates that *Nanos2* is required for *Dnmt3L* expression in addition to repressing RA signaling. Surprisingly, I found that male type-genes were highly expressed in *Sox2^{f/f}* male germ cells. This observation led me hypothesize that *Sox2* is involved in the suppression of the *Nanos2* expression in PGCs.

Based on my hypothesis, I conditionally knocked-out the *Sox2* gene from PGCs before *Nanos2* expression begins. As expected, I observed *Nanos2* up-regulation in the *Sox2-null* germ cells compared to those in the control embryos. However, the

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

precocious *Nanos2* up-regulation had a marginal effect on the expression of male-type genes. Next I focused on the cell cycle state, since mitotic arrest is another sign of the male differentiation pathway. While 70% of PGCs were still proliferative in control, more than 90% *Sox2-null* PGCs entered mitotic arrest, indicating that *Sox2* is involved in the entry of mitotic quiescence. Since *Nanos2* is precociously expressed in the *Sox2-null* PGCs, it is possible to speculate that the *Nanos2* might have induced the mitotic arrest. However, the ectopic *Nanos2* expression had moderate effect on the induction of mitotic arrest. To further explore the reason why mitotic arrest is prematurely induced in the absence of *Sox2*, I focused on cell cycle regulators and found that *Sox2* regulates $p15^{\text{INK4b}}$ via suppressing *Brd4*. Based on these results, I finally tested the possibility that male pathway is prematurely promoted if higher dose of *Nanos2* (*Tg-Nanos2*) is expressed together with knocking out of *Sox2*. As expected, I found *Dnmt3L* expression in *Tg-Nanos2/Sox2^{Δ/Δ}* male germ cells earlier than the wild-type, which supported my hypothesis.

My study proposed that reciprocal regulation between *Nanos2* and *Sox2* plays a key role in the male germ cell differentiation pathway. I elucidated that the down-regulation of *Sox2* triggers initiation of mitotic arrest and then *Nanos2* is highly expressed in the mitotic quiescent cells. *Nanos2* regulates both maintenance of mitotic arrest and down-regulation of *Sox2* expression via repressing retinoic acid signaling. These results provide important information to understand the gene regulatory network for male sexual differentiation in mouse germ cells.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

マウスの始原生殖細胞 (PGC) は、受精後 12.5 日に生殖巣の体細胞の性に依存して卵形成あるいは精子形成への運命が決定される。メスとして性決定を受けた PGC はすぐに減数分裂に入るのに対して、オスの PGC は有糸分裂を停止し休止期に入る。小池さんの所属研究室では RNA 結合タンパク NANOS2 がオスに分化した PGC で発現すること、その遺伝子を欠損するとオスの PGC でも減数分裂が起こることを報告している。小池さんは NANOS2 が誘導する生殖細胞のオス化の分子機構に興味をもち、以下の解析を行った。

はじめに、*Nanos2* を欠損したオス PGC の減数分裂過程を詳細に検証し、これまで起こっているとされた減数分裂が正常ではなく、むしろ多くの PGC は有糸分裂を起こしていることを認めた。このことは *Nanos2* の発現抑制が生殖細胞のメス化を引き起こすものではないことを示唆している。そこで、小池さんは *Nanos2* が誘導する生殖細胞のオス化の実体を細胞分裂休止状態とオス化マーカーの *Dnmt3L* の発現に切り分けて解析を進めた。*CyclinE2* などの細胞周期関連遺伝子の発現解析を進めるとともに、器官培養下でレチノイン酸 (RA) 阻害剤により *Nanos2* 欠損細胞で細胞周期を休止状態にできる条件を確立し、*Dnmt3L* の発現解析を行った。その結果、細胞周期休止状態と *Dnmt3L* の発現誘導は独立した現象であることを認めた。一方、先行研究で *Nanos2* 欠損 PGC では多能性遺伝子 *Sox2*, *Oct3/4*, *Nanog* の発現上昇が示されていたため、これらの遺伝子の発現がオス化を阻害するか調べた。*Sox2* の欠損体で 3 つの多能性遺伝子が抑制されることがわかったため、*Nanos2* と *Sox2* の 2 重欠損細胞を用い、RA 阻害剤で細胞周期を休止させて *Dnmt3L* の発現を解析した。その結果、細胞周期が休止状態で多能性遺伝子の発現がない条件でも *Dnmt3L* の発現は認められなかった。以上の解析から、*Nanos2* は細胞周期を制御する機構と多能性遺伝子の発現抑制する機構とは独立して、オス化を誘導することが示唆された。

上記解析の過程で、*Sox2* を欠損させると *Nanos2* が正常よりも早い段階の PGC から発現上昇することが見つかったため、PGC のオス化における *Sox2* の役割についてさらに解析を進めた。*Sox2* を欠損し、*Nanos2* を強制発現させた PGC の解析から、細胞周期休止状態は *Nanos2* よりもむしろ *Sox2* の欠損で起こること、その過程は *p15^{INK4b}* とその活性化因子の *Brd4* を介することを見つけている。さらに、*Nanos2* 強制発現・*Sox2* 欠損細胞では *Dnmt3L* の発現が早まることを見つけた。これらの成果は PGC のオス化に *Sox2* と *Nanos2* の発現が相反して働くことを示唆するもので、新規の知見である。得られたデータを更に精査することで、当該分野に高いインパクトをもたらす結果となり得る点で高く評価できる。

様々な視点から NANOS2 が引き起こすことが想定される分子実体を解析しており、NANOS2 の機能を解明する上で貴重な実験データであり、評価に値する。また、その過程で *Sox2* と *Nanos2* が相反して発現するという新規の成果を得ている。これは、PGC から雄生殖細胞への分化過程の分子カスケードを解明する上での、重要な知見となる

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

であろう。以上の理由から、小池さんの博士論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。