

氏 名 櫻井 隆順

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1935 号

学位授与の日付 平成29年3月24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 Nanos3 is required for proper expansion of spermatogonial
progenitors in mice

論文審査委員 主 査 教授 澤 齊
教授 北川 大樹
准教授 酒井 則良
助教 天野 孝紀
准教授 鈴木 敦 横浜国立大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

In adult mouse testes, all spermatogenic cells originate from the spermatogonial stem cells (SSCs) established within 7 days after birth. SSCs give rise to undifferentiated and differentiating spermatogonia, which are the amplifying progenitor population for spermatogenesis. Both undifferentiated and differentiating spermatogonia expand their pool size with incomplete cytokinesis. Thus, the mitotic divisions produce spermatogonial clusters with each cell interconnected. Undifferentiated spermatogonial clusters are called A_{single} (A_s, single cell), A_{paired} (A_{pr}, two interconnected cells) or A_{aligned} (A_{al}, more than three connected spermatogonia) according to the number of connected cells in a cluster. The expanded A_{al} undifferentiated spermatogonia initiate differentiation to become A₁ differentiating spermatogonia. Following 6 further mitotic divisions, differentiating spermatogonia enter meiosis to produce haploid spermatozoa. The number of SSCs is small due to the lower proliferation rate, representing only 0.03% of all germ cells in the testis. Thus, the expansion of the progenitor population is an extremely important process to constantly produce millions of sperm. However, the mechanisms which regulate this process are poorly understood.

NANOS family proteins are evolutionarily conserved RNA-binding proteins that play crucial roles during germ cell development in many organisms. Three Nanos genes (Nanos1, Nanos2 and Nanos3) were identified in the mouse, among which Nanos2 and Nanos3 are expressed specifically in germ cells. Previous studies demonstrated that NANOS2 is predominantly expressed in A_s and A_{pr} undifferentiated spermatogonia, which are the most primitive spermatogonia, and plays a crucial role in maintaining the stem cell population through suppressing genes involved in spermatogonial differentiation. On the other hand, NANOS3 is mainly detected in A_{al} undifferentiated spermatogonia and its expression is down-regulated during spermatogonial differentiation. This expression profile raises the possibility of NANOS3 involvement in the maintenance of the spermatogonial progenitor population. However, functional analysis of NANOS3 in spermatogenesis has not been performed because Nanos3 is also expressed in embryonic germ cells and mice deficient for Nanos3 completely lose germ cells before birth.

In this study, I show the requirement of Nanos3 in the expansion of undifferentiated spermatogonia. I examined the importance of Nanos3 in spermatogenesis by analyzing Nanos3 conditional knockout (cKO) mice. The postnatal Nanos3-deletion resulted in formation of small testes and reduction of sperm counts compared with the wild type. Immunofluorescence staining for marker genes of spermatogonia and differentiated germ cells revealed that the numbers of both

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

undifferentiated spermatogonia and differentiated spermatogenic cells were significantly reduced. In particular, longer Aal undifferentiated spermatogonia were markedly decreased in Nanos3-cKO testes, suggesting that NANOS3 is required for proper expansion of Aal undifferentiated spermatogonia. This reduction of the Aal population is likely to influence the number of terminally differentiated spermatozoa. To further confirm that Nanos3 functions in the amplification step of undifferentiated spermatogonia, I conducted gain of function experiments by the artificial induction of NANOS3. As expected, I observed an increase of undifferentiated and differentiating spermatogonia in Nanos3 overexpression (OE) mice, opposite of the Nanos3-cKO phenotype. Importantly, even though Nanos3 is expressed in part of the As and Apr clusters, which are the putative SSC population, I did not observe significant changes in the population either by loss or gain of NANOS3, indicating that NANOS3 is dispensable for the maintenance of stem cells. Taken together, these results indicate that NANOS3 is a positive regulator of spermatogonial progenitor expansion.

The reduction of undifferentiated spermatogonia in Nanos3-cKO testis may be caused by precocious differentiation and/or cell proliferation defects of spermatogonia. Indeed, I observed premature expression of the differentiation marker in the undifferentiated spermatogonial population in Nanos3-cKO mice, suggesting that precocious differentiation occurred in the absence of NANOS3. On the other hand, proliferation abnormalities were not detected in the Nanos3-cKO testes. These results suggest that precocious differentiation may be the main cause of the phenotype. Further analyses are required for understanding the mechanisms by which NANOS3 regulates the expansion of spermatogonial progenitors.

In summary, I conclude that NANOS3 is required for proper expansion of the spermatogonial progenitor population. This is the first report for a germ cell specific gene proven to be involved in this process. Therefore, this study should contribute to the understanding of mechanisms that underlie the production of the large number of sperm in spermatogenesis.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

動物の雄は莫大な数の精子を産生する。ヒトの場合、一日に 5000 万 - 1 億もの精子を作る。このような膨大な精子数は、主に精原細胞の増殖によってもたらされる。これまで精子幹細胞の維持や分化の機構についてはよく研究されているが、精原細胞がその数を拡張する過程についてはほとんど研究されていない。櫻井さんは保存された RNA 結合蛋白 NANOS3 に着目し、精原細胞増殖におけるその機能を解析した。

未分化精原細胞は、単一の細胞 (As) が不完全な細胞質分裂を伴う分裂によって、二細胞状態 (Apr)、三細胞以上がつながった状態 (Aal) を介して増殖した後、分化を開始する。NANOS3 は As、Apr で弱く、Aal で強く発現する。加えて、NANOS3 は胚発生時の始原生殖細胞で発現しており、Nanos3 欠損マウスは、始原生殖細胞が細胞死を起こしてしまうので、その後起こる精子幹細胞から精子が形成される過程での NANOS3 の機能は不明であった。そこで櫻井さんは、胚発生後期に生殖細胞系列で Nanos3 を欠損する、条件的欠損マウス (cKO) を作成した。このマウスでは、精原細胞で NANOS3 の発現がほとんど観察されず、効率よく欠損が起こっていることが確認された。Nanos3 cKO マウスでは、精巣が小さく、精子数が減少していた。また、未分化精原細胞、分化を始めた精原細胞、特に Aal 未分化精原細胞が減少していた。これに対し、自己複製を行う GFRA1 陽性の精子幹細胞の数は有意に減少しておらず、NANOS3 が幹細胞からの精原細胞数の拡張に関与していることが示された。また、Nanos3 cKO マウスでは、分裂している精原細胞の割合は野生型と変わらなかった。これに対し、減数分裂開始マーカー STRA8 を発現する細胞数が上昇していた。この結果は、NANOS3 が精原細胞の分化を抑制することで、精原細胞数の拡大を促進していることを示唆している。

また、雄の Nanos3 cKO マウスは、精子数は減少するが、不妊ではない。子孫の遺伝子型を調べることで、Nanos3 が完全に欠失した精子由来の子孫が存在していることが確認された。NANOS3 は精子形成に必須ではないことが示された。

また、櫻井さんは、NANOS3 を胚発生後の精原細胞で過剰発現するマウスを作成し、その影響を調べた。Nanos3 過剰発現マウスでは、精子幹細胞の数は変化しなかったが、未分化精原細胞が増加し、NANOS3 が精原細胞数の拡張を促進していることが確認された。

本研究はこれまでほとんど研究されていなかった、精原細胞数の拡張に特異的に関与する遺伝子を同定しており、精子形成機構の研究に大きく貢献するものである。精子数の減少は男性不妊の主要な原因でもあり、櫻井さんの研究成果は、今後男性不妊の診断や治療の研究につながる可能性もある。以上の理由から、櫻井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。