

氏 名 Wright, Danelle

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2246 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Studies on the function and target-RNA recognition of
RNA-binding proteins essential for mouse germ cell
differentiation

論文審査委員 主 査 野々村 賢一
遺伝学専攻 准教授
鐘巻 将人
遺伝学専攻 教授
齋藤 都暁
遺伝学専攻 教授
日比野 佳代
遺伝学専攻 助教
鈴木 敦
横浜国立大学 大学院工学研究院 准教授

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full: Wright, Danelle

Title: Studies on the function and target-RNA recognition of RNA-binding proteins essential for mouse germ cell differentiation

Post-transcriptional regulation by RNA-binding proteins is highly important to establish gene regulatory networks during all stages of germ cell development. RNA-binding proteins generally make functional complexes to control their target mRNA, but what kind of protein structures are needed to form these complexes and bind specific mRNA are largely unknown. One family of RNA-binding proteins that is essential for germ cell development is NANOS. I focused on murine NANOS2 and NANOS3, which have different yet critical functions. NANOS3 is required for protection from apoptosis during migration and gonadal colonization of primordial germ cells in both sexes, whereas NANOS2 is male-specific and required for male-type differentiation of germ cells. What is interesting about these proteins is their reported one-way functional redundancy, i.e., NANOS2 can rescue NANOS3 function but NANOS3 cannot promote the male pathway. These two proteins are structurally similar, both having a conserved zinc finger domain and similar N-terminal. In the case of NANOS2, this zinc finger domain is required to interact with its partner, DND1. The other key protein domain, the N-terminal, is required for interaction with CNOT1 of the CCR4-NOT deadenylation complex. Previous studies demonstrated that NANOS2 and DND1 colocalize with processing body (P-body) components, such as CNOT1, in germ cells. NANOS2 carries out some of its post-transcriptional regulatory activity by targeting specific mRNA to these P-bodies. If the binding between DND1 and NANOS is inhibited, these specific P-bodies are not formed and the male pathway does not proceed. However, although

there are many reports of the phenotypes of such mutant mice, no study has looked at the dynamic process of events leading to P-body formation by germ cell-specific RNA-binding proteins. Furthermore, in *Nanos2*-knockout germ cells, up-regulated NANOS3 instead localizes with DND1 to these P-bodies, but cannot rescue NANOS2 function, and it is unknown what its role is during this male differentiation stage. The purpose of my thesis study was to therefore clarify the role of NANOS2 in P-body-mediated RNA regulation and reveal why NANOS3 is unable to substitute.

In the first chapter, I report my results obtained using conditional *Nanos3/Nanos2* knockout mice and chimeric mice expressing chimeric NANOS protein constructs to assess why NANOS3 cannot rescue NANOS2 function. These *in vivo* analyses demonstrated NANOS3 to be a “weaker” version of NANOS2 with inhibitory action against apoptosis. My study also suggested that mouse NANOS3 is different from human NANOS3 in that it cannot bind CNOT1. It is unknown whether human NANOS3 can promote the male pathway, but human NANOS3 may have stronger regulatory ability than mouse NANOS3. I additionally found that DND1 and NANOS2 binding is highly dependent on the specific NANOS2 structure itself, which is why NANOS3 is unable to regulate target mRNA to promote the male pathway.

Although I determined that the specific NANOS2 structure is key in its interactions with other proteins, the dynamic events leading to the formation of an individual P-body remained unclear. This question led to my second aim: to reveal how NANOS2 and DND1 interact with target mRNA and P-body components in real time. I decided to use live imaging techniques to analyze their interactions. In the second chapter, I report my achievement of establishing a system to view mRNA in real time using dCas13, an endonuclease-dead RNA-specific RNase. I also used two different mouse cultured cell lines to investigate P-body formation and mRNA targeting in the presence or absence of the germ cell-specific NANOS2 and DND1. The target mRNA visualized was *Dazl*, one of two known NANOS2 targets. In my cultured cell system, I

was able to visualize the targeting of *Dazl* to P-bodies after inducing the expression of NANOS2 and DND1. I next compared *Dazl* localization under multiple conditions with wild-type and mutant NANOS2 and DND1. Based on the time-lapse imaging under all conditions, I proposed the following model of the events leading to mRNA regulation by NANOS2 and DND1: In the presence of NANOS2, DND1 binds a specific target, in this case *Dazl*. NANOS2 then binds *Dazl*-bound DND1, bringing with it CNOT1 of the CCR4-NOT complex, leading to the formation of P-bodies.

In conclusion, my thesis study revealed the specific structural basis for NANOS2 function in P-body-mediated RNA regulation, as well as the effects of its expression on the localization of other involved proteins and target mRNA. Determining how RNA-binding proteins regulate their targets is highly important in understanding the downstream pathways in development. By combining new *in vivo* analyses, I was able to shed light on this highly intricate mechanism.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 Wright, Danelle

論文題目 Studies on the function and target-RNA recognition of RNA-binding proteins essential for mouse germ cell differentiation

マウスの生殖細胞は、胎児の発生中期に始原生殖細胞が生殖巣に到達した後、精原細胞あるいは卵原細胞に分化する。その過程では、様々な転写後遺伝子発現制御機構が働くことが知られる。Wrightさんは、マウスの雄性生殖細胞分化に重要な働きをもつ2つのRNA結合タンパク質 NANOS2 と NANOS3 の機能解析を行った。両者は一次構造が酷似するにも関わらず、NANOS3 は雌雄の生殖巣に移動中の始原生殖細胞で発現し、その維持に必要であるのに対し、NANOS2 は精巣に移動後の生殖細胞で特異的に発現し、減数分裂の一過的抑制および雄性生殖細胞の分化を誘導する。NANOS2 は NANOS3 の機能を補填し得るが、NANOS3 は NANOS2 の機能を補填できないなど、明らかな機能分化が認められる。

Wrightさんは本論文の前半で、NANOS3 のコンディショナルノックアウト (cKO) マウス、および NANOS2/NANOS3-cKO マウスを作成し、雄性生殖細胞分化過程での NANOS2 と NANOS3 の機能を比較解析した。さらに、両者のアミノ末端領域と zinc finger ドメイン (ZF) を相互に入れ替えたキメラタンパク質の機能解析を行うとともに、NANOS2 との相互作用が知られる RNA タンパク質 DND1 との結合解析などを行った。後半では、NANOS2-DND1 が結合する *Dazl* mRNA の細胞内局在を解析するため、培養細胞において dCas13-EGFP を用いた *Dazl* mRNA の細胞内イメージング系構築に成功した。そして、この培養細胞において *Dazl* mRNA と共に蛍光標識した NANOS2、DND1、及び RNA 分解や貯蔵の場として働くプロセシングボディ (P-body) を構成する DDX6、DCP1、CNOT1 のライブイメージング解析を行った。一連の研究結果から、以下のことを明らかにした。

- (1) NANOS2 が欠損した雄性生殖細胞で発現する NANOS3 には、雄性生殖細胞のアポトーシスを抑制する機能がある。
- (2) NANOS2 と結合して雄性生殖細胞分化に関わる DND1 のタンパク質発現は、NANOS2 発現に依存するが、NANOS3 には依存しない。
- (3) 雄性生殖細胞の分化誘導には、NANOS2 のアミノ末端領域と ZF の両方が重要な役割を担う。NANOS2 の DND1 結合性は NANOS3 より強く、その強さは ZF の機能中心 CCHC-CCHC 配列周辺の 6 カ所のアミノ酸の違いに起因し、それらを NANOS3 型に置換すると NANOS2 ZF と DND1 との結合は弱まる。また、NANOS2 アミノ末端領域の P-body 因子 CNOT1 への結合も分化誘導に重要である。
- (4) 雄性生殖細胞で発現する DND1 は、*Dazl* mRNA と結合した後、NANOS2 と結合し、NANOS2 が CNOT1 と結合することで P-body 形成が促進される可能性をみいだした。加えて、DND1 の *Dazl* mRNA 結合性、およびアミノ末端領域を介した NANOS2 の CNOT1 結合性は、共に P-body の安定な形成に寄与する。

上記の結果から、雄性生殖細胞における NANOS2 および NANOS3 の未知の機能が明らかとなった。また、DND1 および CNOT1 との結合、安定的な P-body の形成を通じて、NANOS2 が *DAZL* mRNA の P-body 局在と分解を促進し、雄性減数分裂を一過的に抑制する可能性が示唆された。得られた結果はいずれも新規性が高く、当該分野に重要な知見となることが十分期待できる。また、KO マウスの作成や mRNA イメージングでは、共同研究者の助力を得ながらも自らの創意工夫により問題を克服し、数多くの有益な結果を得たことは称賛に値する。

上記の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に十分に値すると判断した。