

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22437

研究課題名(和文)生殖細胞の増殖・発達を負に制御する因子の解明

研究課題名(英文) Investigation of negative regulators for proliferation and development of germ cells

研究代表者

酒井 則良 (Sakai, Noriyoshi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授

研究者番号：50202081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う生体組織微小環境の質的変化の一端を解明する目的で、ゼブラフィッシュの成体皮下に胚をまるごと移植する全胚移植法を用いて、加齢の異なる精巣組織の相互作用を解析した。生殖幹細胞のみが存在するmeioc変異体の成体を宿主とする野生型初期胚の移植実験から、分化型精原細胞が未分化な生殖細胞の増殖に影響をおよぼす可能性が示された。併せて、分化した卵母細胞が未分化な生殖細胞に及ぼす影響の解析できる実験系を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体組織は胚性期に未分化細胞により器官原器が形成され、成長過程を経て最終的な成体の組織へと成熟する。成体組織は少数の成体幹細胞と多数の分化型細胞により構成され、胚性期の未分化細胞により構成される器官原器とは、その微小環境も質的に異なるものと予想されるが、その実体はほとんどわかっていない。本課題の成体幹細胞の増殖を負に制御する因子もまだ見つけられていない要素で、その発見は成体組織の幹細胞維持システムに新たな概念をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To explore intrinsic changes in micro environments of living organs with aging, we analyzed interaction of the heterochronic parabiotic testes after transplantation of whole living larvae as grafts in an immunodeficient adult zebrafish. When we used meioc mutants whose testes have only germ-line stem cells (GSCs) as a host, development of testes in grafted larvae was not affected, but GSCs of the host decreased. This result showed a possibility that factors that depend on differentiating germ cells suppress proliferation of GSCs. In addition, we developed transplantation experiments using ovarian germ cell aggregates to explore interaction between oocytes and GSCs.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖幹細胞 組織微小環境 全胚移植法 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

生体組織は胚性期に未分化細胞により器官原器が形成され、加齢過程を経て最終的な成体の組織へと成熟する。多くの成体組織は少数の成体幹細胞と多数の分化型細胞により構成され、胚性期の未分化細胞により構成された器官原器とは、細胞数や細胞種、さらに形態的にも大きく異なる。したがって、組織の微小環境も加齢に伴い質的に変化するものと予想されるが、その実体はほとんどわかっていない。マウスでは、若年と老化個体の並体融合 (parabiosis) を用いた研究が行われ、循環系を共有することで神経系、肝臓、筋肉の幹細胞が個体の加齢状態の影響を受けることが報告されている (Conboy et al., 2013)。さらに、この研究から、組織の修復能力が若年個体では低下、老化個体では上昇が見られ、全身の加齢状態に影響を受けること、その因子の一つとして Oxytocin が見つけられている (Elabd et al., 2014)。

我々は、ゼブラフィッシュにおいて胚をまるごと成体皮下に移植する方法 (全胚移植法) を開発し、移植胚が宿主と血管系を共有し、成長することを見つけた (Kawasaki et al., 2017)。この方法ではマウスの並体融合よりも若い初期胚と成体の組合せで循環系を共有することが可能となる。興味深いことに、多くの移植胚で、成長後、心臓、肝臓、精巣の形成が阻害されていた。宿主の精巣から生殖細胞を除去すると、移植胚の精巣形成が回復した一方で、心臓や肝臓形成への阻害効果は維持されることがわかった。このことは、成体の生殖巣には生殖細胞の発達に特異的な微小環境が存在すること、そこで生殖細胞に依存して産生される因子が血管系を介して胚の未分化生殖細胞の発達に特異的に重篤な影響を及ぼすことを示している。すなわち、成体の生殖巣には未分化生殖細胞の増殖を抑制する負の制御因子が存在し、それが血液を介して胚の生殖細胞発達に阻害効果を及ぼす可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュの全胚移植法を用いて、成体の生殖組織で産生され、血液を介して胚の未分化生殖細胞の発達を阻害する負の制御因子の解明を目的とした。我々は、ゼブラフィッシュにおいて生殖幹細胞の分化が異常となる *meioc* 変異体を単離している。生殖幹細胞のみが存在し、分化した生殖細胞がない宿主では、生殖幹細胞が移植胚に及ぼす影響や移植胚から受ける影響を解析しやすい。そこで、*meioc* 変異体を用いて生殖幹細胞のみを持つ宿主を作製し、野生型胚を皮下移植して、その相互作用の影響を解析した。

一方、皮下移植による解析はオスの宿主に対して有効で、メスの生殖細胞の解析は困難である。上記の *meioc* 変異体を宿主とする全胚移植法の解析から、本課題の負の制御因子は分化型生殖細胞が未分化な生殖幹細胞に影響を及ぼす因子である可能性が高くなったため、卵巣組織の再構築法を用いて、メスの生殖細胞における未分化型細胞と分化型細胞の相互作用を解析できる実験系も合わせて検討した。

3. 研究の方法

(1) 生殖幹細胞のみをもつ宿主個体の作製

はじめに、*meioc* 変異体で生殖幹細胞が異常となる段階を正確に把握するために、リボソーム RNA (5.8S, 18S, 28S rRNA) とリボソームタンパク質 Rpl15 の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学により調べた。また、細胞全体のタンパク質合成活性を 0-propargyl-puromycin (OP-Puro) assay (Liu et al., 2012) により解析した。さらに、ゼブラフィッシュの精原幹細胞培養系と精子分化培養系 (Kawasaki et al., 2016) を用いて、タンパク合成阻害剤のシクロヘキシミドが生殖幹細胞の分化におよぼす影響を解析した。

これと併行して、全胚移植には免疫不全系統 *rag1*^{-/-} が必要なため、*rag1*^{-/-} と *meioc* 変異体を交配して *rag1:meioc* 二重変異体を作出した。二重変異体はゲノムの塩基配列と精巣の組織観察により確認した。この成体皮下へ野生型初期胚を移植し、2~3 ヶ月後、それぞれの生殖巣を組織観察して、その相互作用を解析した。

(2) 生殖組織再構築法による卵母細胞と分化異常生殖幹細胞をもつ生殖組織の作製

別の研究プロジェクトで、小さな卵母細胞を用いることで解離した卵巣組織を再集合でき、それを免疫不全系統の卵巣内へ移植することで卵巣組織を再構築できることがわかった。後述のように、分化型生殖細胞が未分化な生殖幹細胞の増殖に影響する可能性が見えてきたことから、卵母細胞が生殖幹細胞の増殖に及ぼす影響を解析できる実験系を検討した。卵巣再構築には未熟な小さな卵母細胞が必要であるため、発達段階の揃った卵母細胞の準備が容易な、同じコイ科のホンモロコから未熟卵巣 (卵母細胞の直径が 50 μm 以下) を単離し、コラゲナーゼを用いて解離した。これと *meioc* 変異体の解離した生殖組織を混ぜて、未熟卵母細胞と分化異常生殖幹細胞を持つ再集合塊を作製した。それを免疫不全系統成体の腹腔内へ移植し、2~3 ヶ月後、移植生殖組織を単離して組織観察し、その相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) 生殖幹細胞のみをもつ宿主個体における初期胚精巣の解析

最近の研究から、多くの幹細胞では翻訳活性が抑えられ、分化が始まると上昇することが報告されている (Tahmasebi et al., 2019)。そこで、ゼブラフィッシュの生殖幹細胞から精原細胞への分化の過程における、5.8S, 18S, 28S rRNA と Rpl15 の発現パターンを解析した。ゼブラフィッシュでは精原細胞の発達はセルトリ細胞に包まれた状態で進み、分化が進むにつれ2細胞、4細胞、8細胞と、その数を増加する。野生型では、4細胞までの精原細胞が低発現状態にあり、それ以降発現が上昇することが認められた。一方、*meioc* 変異体の生殖細胞は全て低発現状態であることがわかった。OP-Puro assay によるタンパク質発現解析でも同様の結果が得られ、*meioc* 変異体の生殖細胞は、翻訳活性という点においても、幹細胞特性を持つことが明らかとなった。そこで、精原幹細胞培養系で1ヶ月間維持した生殖幹細胞を精子分化培養系に移し、0.2 μ M のシクロヘキシミド処理により翻訳活性を抑えて培養したところ、分化が抑制されることがわかった。0.2 μ M シクロヘキシミド処理では、翻訳活性が約30%低下することを確認できている。この結果から、生殖幹細胞の分化には翻訳活性の上昇が不可欠であり、*meioc* 変異体の生殖幹細胞分化異常はリボソームが活性化しないことに起因することが示唆された。

rag1;meioc 二重変異体の成体の皮下に野生型初期胚を移植し、2ヶ月後に、移植胚と宿主の精巣を調べたところ、宿主精巣のサイズが減少し、著しく退縮していることが認められた。一方、移植胚の精巣は正常に発達し、シスト構造を持つ精原細胞、精母細胞、精細胞、精子が認められた (図1)。この結果は、一見、移植胚の精巣形成が宿主の生殖細胞により阻害されるという従来の結果と異なるように見えるが、移植胚精巣の発達は生殖幹細胞のみの宿主からは影響を受けず、逆に移植胚で発達した精巣が宿主の生殖幹細胞に影響を及ぼしたと捉えることができる。すなわち、加齢した精巣が幼若期の未熟な精巣に影響を及ぼすのではなく、分化型生殖細胞が未分化な生殖幹細胞の増殖に影響するという可能性が示された。これは、本課題が想定している分化型細胞が分泌する未分化幹細胞増殖阻害因子の存在を支持するものである。現在、*meioc* 変異体の精巣と野生型精巣からそれぞれ RNA を抽出し、RNA-seq により野生型精巣のみで発現する分泌型因子を絞り込んでいる段階である。

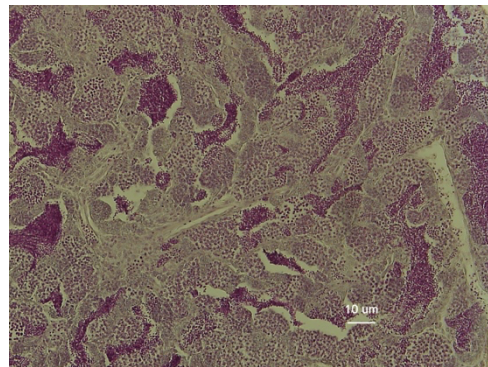


図1. *meioc* 変異体宿主における移植胚の発達した精巣の組織像。正常な成熟精巣の構造をとり、精子までの各発達段階の生殖細胞が見て取れる。

また、分化型生殖細胞の種類を絞り込む目的で、ゼブラフィッシュ減数分裂変異体の同定と解析を進めた。この変異体は生殖細胞の発達が減数第一分裂前期ザイゴテン期からパキテン期の移行期で停止するもので、原因は *syce1* 遺伝子のナンセンス変異によるものであった (Imai et al., 2021)。この解析過程で減数分裂期を把握するための新たなマーカーとして Hormad1 と Iho1 の抗体を得ることができた。現在、この変異体と免疫不全系統 *rag1*^{-/-} の交配を進めており、二重変異体が出来しだい、減数第一分裂前期までの生殖細胞を持つ個体を宿主として移植実験を進め、分泌因子の絞り込みを進める予定である。

(2) 生殖組織再構築法による卵母細胞と分化異常生殖幹細胞をもつ生殖組織の解析

上記の、分化型生殖細胞が未分化な生殖幹細胞の増殖に影響するという可能性は、全胚移植法によるオスの生殖細胞の結果で、メスの生殖細胞に適応できるのか不明である。メスの成体へ初期胚を皮下移植した場合、初期胚の発達は認められず、これまで解析できていない。別の研究プロジェクトで、卵巣細胞を用いた生殖組織再構築法を確立できたため、卵母細胞が未分化な生殖細胞に及ぼす影響を解析できる実験系を検討した。

同じコイ科のホンモロコは年周期の産卵をするため、特定の発達段階の卵母細胞を容易に集めることができる。また、ゼブラフィッシュとホンモロコの卵母細胞は形態的に区別可能である。さらに、ホンモロコ精巣由来の生殖幹細胞と *meioc* 変異体の生殖組織の再集合塊をゼブラフィッシュ免疫不全系統に皮下移植した場合、精子形成が進み精子まで分化すること、卵母細胞への分化も起こることを確認している。そこで、ホンモロコから未熟な卵巣を単離し解離した後、*meioc* 変異体の解離生殖組織と混ぜて再集合塊を作製し、これを *rag1;meioc* 二重変異体の成体の腹腔内へ移植した。2ヶ月後、移植片を解析したところ、*meioc* 変異体の生殖幹細胞の過増殖が認められ、ホンモロコの卵母細胞はほとんど消失していた。現在、卵母細胞の発達段階や再集合塊における生殖幹細胞と卵母細胞の比、さらに移植場所を変えて再検討を行なっているところである。また、異種間で相互作用に違いがある可能性も考慮して、ゼブラフィッシュから未熟な卵母細胞を必要量得る方法を確立中である。

<引用文献>

- ① Conboy M. J., Conboy I. M., Rando, T. A. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell* 12, 2013, 525-530.
- ② Elabd C., Cousin W., Upadhyayula P., Chen R. Y., Chooljian M. S., Li J., Kung S., Jiang K. P., Conboy I. M. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat Commun.* 5, 2014, 4082.
- ③ Imai Y., Saito K., Takemoto K., Velilla F., Kawasaki T., Ishiguro K., Sakai N. Sycp1 is not required for subtelomeric DNA double-strand breaks but is required for homologous alignment in zebrafish spermatocytes. *Front Cell Dev Biol* 9, 2021, 664377.
- ④ Kawasaki T., Siegfried K.R., Sakai N. Differentiation of zebrafish spermatogonial stem cells to functional sperm in culture. *Development* 143, 2016, 566-574.
- ⑤ Kawasaki T., Maeno A., Shiroishi T., Sakai N. Development and growth of organs in living whole embryo and larval grafts in zebrafish. *Scientific Reports* 7, 2017, 16508.
- ⑥ Liu J., Xu Y., Stoleru D., Salic A. Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 2012, 413-418.
- ⑦ Tahmasebi S., Amiri M., Sonenberg N. Translational control in stem cells. *Front Genet.* 9, 2019, 709.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imai Yukiko, Saito Kenji, Takemoto Kazumasa, Velilla Fabien, Kawasaki Toshihiro, Ishiguro Kei-ichiro, Sakai Noriyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Sycp1 Is Not Required for Subtelomeric DNA Double-Strand Breaks but Is Required for Homologous Alignment in Zebrafish Spermatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 664377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.664377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yukiko Imai, Noriyoshi Sakai
2. 発表標題 Sycp1 is not required for subtelomeric DNA double-strand breaks but is required for homologous alignment in zebrafish spermatocytes
3. 学会等名 The Students and Postdocs Meiosis Workshop, v3.0 - PDSM 2021, online conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Imai
2. 発表標題 The synaptonemal complex and recombination in zebrafish meiosis
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, online conference, Symposium 「Dynamic and structural regulation of chromosome inheritance in meiosis」
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 酒井則良	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 7
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド、平田普三編、第2章 系統	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------