

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19332

研究課題名（和文）網羅的スクリーニングによる生殖細胞の性決定に関わる遺伝子群の同定

研究課題名（英文）Identification of genes involved in germline sex determination by global screening

研究代表者

西村 俊哉（Nishimura, Toshiya）

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：10758056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：精子と卵は唯一次世代を作り出すことができる細胞であり、生殖細胞という共通の細胞に由来する。本研究では生殖細胞の性が決まる仕組み（精子になるか、卵になるか）を明らかにするために網羅的に遺伝子スクリーニングが可能な実験系の構築を行った。まず次世代シーケンサーを用いてオスとメスの生殖細胞の遺伝子発現を網羅的に比較解析し、生殖細胞の性に重要な遺伝子群の絞り込みを行った。次にそれらの遺伝子の機能を破壊するためにCRISPR/Cas9システムのgRNAの効率的な作製方法を確立した。最後に遺伝子破壊を行った際、生きたまま表現型が解析できるように精子形成あるいは卵形成すると蛍光タンパクで光るメダカを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞がどのような仕組みで精子あるいは卵になるか（生殖細胞の性決定）は、医学や水畜産学分野において基本的な問題であるにも関わらずほとんど分かっていないのが現状である。メダカを用いた研究で脊椎動物で初めてfoxl3という生殖細胞の性決定遺伝子が同定された。本研究では、foxl3を中心とした生殖細胞の性の仕組みを具体的に明らかにするために、効率的に生殖細胞の性に関わる遺伝子群のスクリーニング可能な実験系を構築した。本手法は生きた個体を用いて簡便に遺伝子の働きを探ることが出来るため、生殖生物学分野の研究だけでなく、生物学分野全般の研究において役立つツールだと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Germ cells are the only cells that can generate the next generation and produce either sperm and eggs. In this study, a genetic screening system was constructed to elucidate the mechanism of sperm-egg fate decision in germ cells using medaka. First, comparative gene expression analyses were performed between male and female germ cells to narrow down the number of candidate genes. Second, an efficient generation of DNA templates for gRNAs in CRISPR/Cas9 system was established. Third, transgenic lines in which spermatogenesis and oogenesis could be visualized by fluorescence were established. Upon gene knock-out, the phenotype could be easily distinguished by observing alive medaka under a fluorescent microscopy.

研究分野：生殖生物学

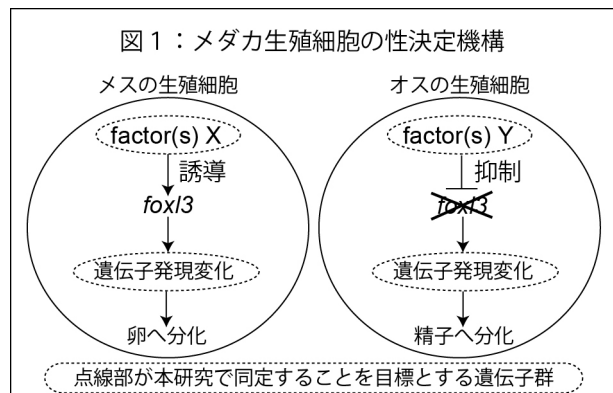
キーワード：生殖細胞 ゲノム編集 メダカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は精子と卵の元となる細胞であり、唯一次世代にゲノム情報を伝えることができる細胞である。もともと生殖細胞は精子と卵のどちらの配偶子にも分化できる能力を持っており、生殖細胞の周りを取り囲む体細胞の性に従って、生殖細胞は精子あるいは卵へと分化すると考えられている。では、生殖細胞自身はどのように生殖細胞の性、すなわち「精子になるか、卵になるか」を決めるのだろうか。これは生物学・医学分野において重要な問題であるにも関わらず、実はほとんど分かっていない。そもそも生殖細胞が自身の性を決める機構があるのかについては脊椎動物では分かっていなかった。

申請者はメダカを用いた研究で、脊椎動物で初めて生殖細胞の性を決める遺伝子 *foxl3* を同定した (Nishimura et al., 2015)。*foxl3* はメスの生殖細胞で発現しており、オスでは発現が抑制される。*foxl3* は精子形成を抑制する機能を持ち、*foxl3* の機能を欠損したメスは、卵巣の中で精子を形成することが明らかとなった。この成果の重要な点は、生殖細胞には体細胞の性とは独立に性を決める機構があるという点である。つまり、*foxl3* を中心とする生殖細胞独自の性決定機構が存在し、通常メスでは、*foxl3* の発現が誘導され、*foxl3* の下流でなんらかの遺伝子群が働くことで生殖細胞は卵となる(図1)。一方、オスでは、*foxl3* を抑制する機構が働き、*foxl3* が働かないことにより下流でなんらかの遺伝子群が働き生殖細胞は精子となる(図1)。生殖細胞の性決定機構の仕組みを理解するためには、*foxl3* の上流・下流で働く遺伝子群を同定する必要がある。

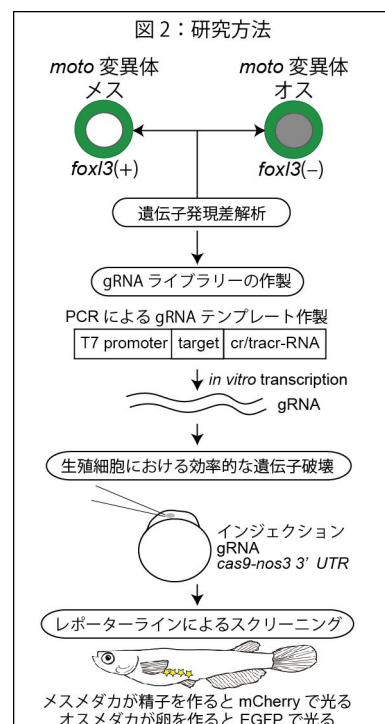


2. 研究の目的

本研究では生殖細胞の性を決める重要な遺伝子群を網羅的に同定することを目的とし、独自のCRISPR/Cas9によるスクリーニング系の確立にチャレンジする。

3. 研究の方法

本研究では、生殖細胞の性に重要な遺伝子群をより効率的に同定するために、CRISPR/Cas9による網羅的スクリーニング系の確立を目指す。メダカの遺伝子は2万以上あり、それら全てを含むgRNA(ターゲット遺伝子にDNA切断酵素Cas9をリクルートするためのRNA)ライブラリーを一つの研究室で作製することは現実的でない。そこで研究室レベルでCRISPR/Cas9によるスクリーニング系を確立するために、(1)候補遺伝子の絞り込み、(2)効率的なgRNAの合成法、(3)



候補遺伝子の効率的な機能解析法 の3点について効果的な方法を計画した(図2)。(1)では、生殖細胞の性決定機構が働いている生殖細胞のみを単離し、RNAseqによる網羅的遺伝子発現解析を行い、オスとメスの生殖細胞で発現差のある遺伝子群を候補とした。(2)では、PCR反応のみでgRNAのテンプレートを作製し、候補遺伝子全てのgRNAの合成を効率的に行なった。(3)ではCas9の終止コドン直後に*nanos3* 3'UTRを挿入した*Cas9-nos3* 3'UTRを作製し、Cas9を発生の初期から生殖細胞のみで局在させることで、生殖細胞での遺伝子破壊の効率を上げた。また、生きたまま精子形成を可視化できるレポーターライン *shippo1b*-EGFP と XY メダカのみ目がEGFPで光るトランスジェニックメダカを作製した。

4. 研究成果

(1) 候補遺伝子の絞り込み

申請者は、生殖細胞がシスト形成できない、*moto* 変異体を作製した(Nishimura et al.,2018)。*moto* 変異体では生殖幹細胞のみ存在するようになるが、メスの生殖細胞においてのみFOXL3タンパク質の発現がある。つまり、*moto* 変異体の生殖細胞では性決定機構が働いており、オスとメスで異なる制御を受けていることを意味する。従って、*moto* 変異体のオスとメスの生殖細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することで、シスト形成や減数分裂に関わる遺伝子をできる限り排除した上で、さらに*foxl3*の上流及び下流で働く遺伝子群を絞り込むことができる。そこで、生殖細胞をEGFPで可視化できるトランスジェニックメダカと*moto* 変異体を交配し、精巣と卵巣から生殖細胞のみをセルソーター(SH800S, SONY)で5000-10000細胞程度単離し、quartz seq法に従ってRNA-seq用のライブラリーを作製した。シーケンス反応後に発現差解析を行ったが、ライブラリーの質が悪く、発現差のある遺伝子が1000以上検出され、候補の絞り込みが困難であった。細胞数を20000細胞まで増やして、再度実験を行ない、ライブラリー作製まで行なった。残念ながら本研究期間中には発現差解析による候補遺伝子の絞り込みまで達することができなかった。

(2) 効率的なgRNAの合成法

一般的にgRNAを合成する際、ターゲット配列を含んだDNA断片を専用ベクターにクローニングする必要がある。この方法では日数も手間もかかり大量のgRNA合成を行う系として現実的ではない。そこで申請者はPCR反応のみで、gRNA合成のためのT7プロモーターを含んだDNAテンプレートを作製する方法を開発した(図2)。テンプレートとなるPCR産物も精製することなく、T7RNAポリメラーゼの転写反応によりgRNAを合成できるため、短時間(1日以内)でgRNAの合成が可能となった。

(3) 候補遺伝子の効率的な機能解析法

1) 生殖細胞における効率的な遺伝子破壊

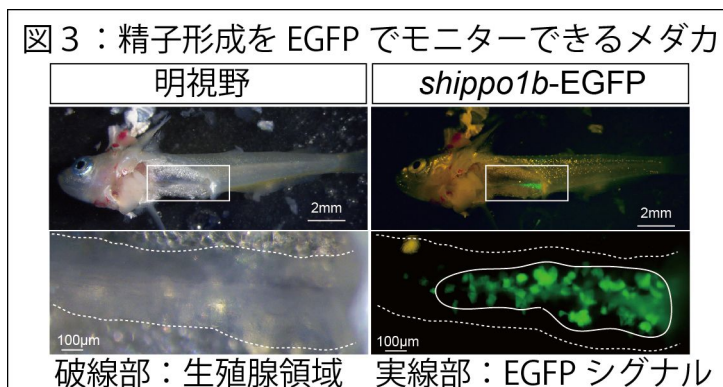
メダカにおいて生殖細胞形成に重要な遺伝子として*nanos3*が知られている。*nanos3* 遺伝子の3'UTRとEGFPを繋いだRNAを受精卵にインジェクションすると、発生の初期からEGFPの発現を生殖細胞のみに限局させることが可能となる。この仕組みを応用し、Cas9の終止コドン直後に*nanos3* 3'UTRを挿入した*Cas9-nos3* 3'UTRを作製し、*foxl3*をターゲットとしたgRNAと共に受精卵にインジェクションしたところ、受精後

2週間後において80%の個体でFOXL3タンパク質の発現がなくなり、精子形成が確認できた。つまり *Cas9-nos3* 3'UTR を用いることで、生殖細胞における機能解析が効率的に行えることが明らかとなった。

2) 精子形成及び卵形成をモニターできるレポーターメダカの作製

精子形成及び卵形成をモニターできるレポーターメダカを組み合わせることで、さらなる効率化を図る(図4)。先行研究で *shippo1* が精巣において減数分裂を開始した全ての細胞で強く発現していたため (Nishimura et al., 2015)、*shippo1b* プロモ

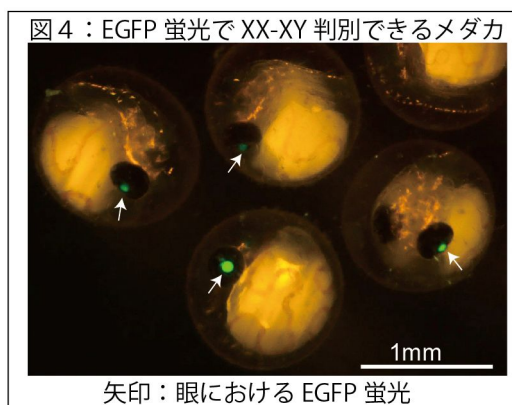
ーターにEGFPをつないだレポーターメダカを作製した(図3)。EGFPシグナルは卵母細胞では見られず、精母細胞で強く発現が見られた。EGFPで光る *figla*-EGFP メダカはすでに作製済みである (Nishimura et al., 2018)。今後は、遺伝子破壊を行った際に、メスで精子形成を行いEGFPが光ることを、また、オスでは卵形成が進行するとEGFPが光ること指標に、生きたままレポーターラインを観察し、候補遺伝子のスクリーニングを行う予定である。この方法を用いることで免疫染色を行う手間が省け、スクリーニングの効率を上げることができる。



3) Y染色体の有無を蛍光で判別できるトランスジェニックメダカ

上記のトランスジェニックメダカだけでは、観察したメダカがXXかXYかが分からなかった。さらなる効率的なスクリーニングシステムを構築するために、XXとXYメダカをEGFPの蛍光の有無で識別可能なトランスジェニックメダカが作出できないか検討した。そのためにY染色体上の性決定遺伝子 *DMY* 下流に *hsp-EGFP-BGHpA* をノックインしたトランスジェニックメダカを作出した。そ

の結果、XYメダカのみをEGFPで光らすことに成功した。このトランスジェニックメダカと上記の精子形成・卵形成が進行すると光るメダカを交配させれば、XXとXYメダカを区別した上で、精子形成あるいは卵形成が進行したかを評価することができるようになった。



5. 参考文献

Nishimura T, Sato T, Yamamoto Y, Watakabe I, Kobayashi S, Ohkawa Y, Suyama M, Tanaka M. *foxl3* is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science* 349, 328-331 (2015)

Nishimura T, Yamada K, Fujimori C, Kikuchi M, Kawasaki T, Siegfried K R, Sakai N and Tanaka M. Germ cells in the teleost fish medaka have an inherent feminizing effect. **PLOS Genetics** 14(3): e1007259 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikuchi M, Nishimura T, Saito D, Shigenobu S, Takada R, Gutierrez-Trianag JA, Cerdang JLM, Takadad S, Wittbrodt J, Suyama M, Tanaka M	4. 巻 445
2. 論文標題 Novel components of germline sex determination acting downstream of foxl3 in medaka	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 80-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.10.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakayama T, Shimmura T, Shinomiya A, Okimura K, Takehana Y, Furukawa Y, Shimo T, Senga T, Nakatsukasa M, Nishimura T, Tanaka M, Okubo K, Kamei Y, Naruse K, Yoshimura T	4. 巻 3
2. 論文標題 Seasonal regulation of the lncRNA LDAIR modulates self-protective behaviours during the breeding season	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 845-852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi M, Nishimura T, Ishishita S, Matsuda Y, Tanaka M	4. 巻 117
2. 論文標題 foxl3, a sexual switch in germ cells, initiates two independent molecular pathways for commitment to oogenesis in medaka	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 12174-12181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1073/pnas.1918556117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakae Y, Oikawa A, Sugiura Y, Mita M, Nakamura S, Nishimura T, Suematsu M, Tanaka M	4. 巻 9
2. 論文標題 Starvation causes female-to-male sex reversal through lipid metabolism in the teleost fish, medaka (<i>Olyzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1242/bio.050054	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishimura T and Tanaka M
2. 発表標題 Germline sex determination by nanos3, a component of germ plasm, in medaka
3. 学会等名 4th Strategic Meeting for Medaka Research 3rd Regional Fish Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----