

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0200

研究課題名（和文）オスとメスの生殖細胞における染色体・核小体動態の解析

研究課題名（英文）Studies on sexual dimorphism of chromosome and nucleolus dynamics in germ cells

研究代表者

西村 俊哉（Nishimura, Toshiya）

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：10758056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：生殖細胞の性（精子になるか、卵になるか）の仕組みを明らかにするために、オスとメスの生殖細胞の核内動態を高解像度にライブイメージングで解析できる実験系の構築を行った（フランスとの国際共同研究）。マイクロ流路デバイスを用いて精巣組織を培養しながら、光毒性の小さいスピニングディスク型共焦点レーザー顕微鏡で撮影したところ、24時間に渡り核内動態を追跡できる解像度で生殖細胞をモニターできた。また、減数分裂期のシナプトネマ構造（相同染色体が対合する際に形成する高次構造）をEGFPで可視化したトランスジェニックメダカの作出に成功し、減数分裂中の染色体動態をモニターできるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゲノム編集技術の登場により、標的クロマチン領域を可視化し、染色体の動態をライブイメージングできる技術が培養細胞で開発されてきた。その結果、染色体は静的なものではなく、核内をダイナミックに動き回っていることが新たに分かってきた。今後は、その動きにどのような生物学的意義があるのかを明らかにすることが課題であるが、そのためにin vivo（生体内）で解析できる実験系は重要となる。本研究においてメダカ生殖腺（精巣・卵巣）で確立したライブイメージング手法は、その解明に向けた重要な技術基盤となり、今後、精子と卵を作るための染色体の動態の違いを見出すことで、その意義の一端の解明に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The goal of the project was to reveal how chromosome and nucleolus dynamics differ between male and female germ cells and the mechanism behind the sexual dimorphism. To achieve the goal, live imaging of medaka germ cells was established in collaboration with Dr. Huynh in the College de France, who has pioneered live imaging technique using Drosophila germ cells. By culturing testes in a microfluidic device during live imaging with a spinning disc confocal laser microscopy, we successfully monitored medaka germ cells for more than 24 hours at a high resolution. We also generated transgenic medaka in which synaptonemal complex, a protein structure forms between homologous chromosomes during meiotic prophase, was able to be visualized by EGFP, which allows monitoring the dynamics of chromosome by live imaging.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖細胞 メダカ ライブイメージング 染色体

## 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、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かった。精子と卵は細胞サイズと数が大きく異なっており、その特徴はどの動物でも共通している。この違いを生み出す共通原理は何であろうか。

生殖細胞が配偶子形成を行うとき、性の決まっていない幹細胞型の生殖細胞（生殖幹細胞）から分化型のシスト、減数分裂を経て、卵あるいは精子になる(図1)。申請者は、生殖細胞の性決定に関与する遺伝子、*foxl3*、を脊椎動物で初めて同定した。*foxl3* は、卵になる過程の一部の生殖幹細胞と全てのシスト型生殖細胞で発現しており、精子になる過程の生殖細胞では発現が抑制されている(図1)。*foxl3* をメスメダカにおいて欠損させると、驚くべきことに、身体はメスで生殖腺は卵巣になるにも関わらず、生殖細胞は精子になることが明らかとなった。この結果が示す重要な知見は、生殖細胞の中には体細胞の性とは独立した性決定のスイッチの機構があるという点である。では、*foxl3* は一体何を制御することで、生殖細胞の性のスイッチを行っているのだろうか。その仕組みを探るべく、*foxl3* の下流で働く遺伝子群の探索を行ったところ、その中には染色体動態に関わる遺伝子群が含まれていた。さらに、*foxl3* の発現後に見られるオスとメスの生殖細胞の形態的な違い調べたところ、シストあたりの細胞数がメスよりもオスの生殖細胞で多くなり、さらに減数分裂前期に細胞のサイズがメスで大きくなり、その時に核小体のサイズ及び構造がオスとメスで異なっていることを見出した(図1)。核小体はリボソームの合成の場と知られているが、近年、ゲノムの安定性、ストレス応答、細胞分化など多様な機能が報告されている。以上のことを考え、*foxl3* は染色体や核小体の構造・動態に関わる因子を制御しており、それらをダイナミックに変化させることで、「精子になるか、卵になるか」のスイッチを行っているという仮説を立てた。

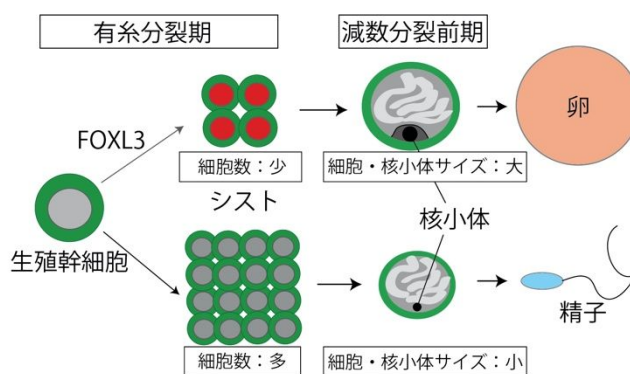


図1: FOXL3 の発現とオスとメスの生殖細胞の違い

## 2. 研究の目的

「細胞のサイズは小さいが数の多い配偶子」が精子であり、「数は少ないが細胞のサイズが大きい配偶子」が卵である。この二つの異なる特徴を作り出す仕組みを明らかにすることが「精子になるか、卵になるか」の動物種を超えた共通原理を理解するために重要と考えられる。そこで本研究では、細胞の数に性差が見られるシスト分裂から、細胞のサイズに性差が見られる減数分裂前期までの過程を高解像度にライブイメージングにより撮影する技術の開発を行う。そして、オスとメスの生殖細胞で染色体や核小体の構造、動態にどのような違いがあるのかを明らかに

し、その違いを生み出す仕組みを探ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ・顕微鏡ステージ上における器官培養系の確立

メダカ生殖細胞はシスト分裂を開始し、減数分裂前期に達するまで約5日間要するため、少なくともその期間ライブイメージングが可能な器官培養系の構築を目指した。ライブイメージングで重要となる点は、サンプルがフォーカス面からずれないように固定され、新しい培養液の供給ができ、さらに湿度・温度を一定に保つことである。これらの条件を満たすイメージング方法として、横浜市立大学の小川毅彦教授らが開発されたマイクロ流路デバイス<sup>(1)</sup>を用いた方法を採用した。本流路デバイスにおいては、観察する組織を固定するためのサンプルチャンバーの両隣に培養液が流れる培養流路が存在する。培養流路とサンプルチャンバーの間は、薄膜で隔てられているため、毛細血管から組織に栄養を供給するように、培養液がサンプルチャンバーに沿って流れることで、チャンバー内の組織に栄養を供給できる(図2)。更に、マイクロ流路は空気透過性のPDMS(ポリジメチルシロキサン、シリコンの一種)を材料に作製されているため、サンプルチャンバーの上部からは酸素が供給される。サンプルチャンバー内の精巣組織を倒立顕微鏡の油浸レンズ(100倍)を用いて観察できるように、マイクロ流路の下部は、カバーガラス(厚さ0.17mm)で接着した。

生殖細胞をEGFP、生殖腺の体細胞をDsRed蛍光で標識された*olvas-EGFP/sox9b-DsRed*トランスジェニックメダカの精巣を眼科パサミで切断し、0.5~1mm四方に断片化した。SiR-DNA(CY-SC007, Spirochrome)によって核染色を施した後に、精巣断片をピペットを用いて、サンプルチャンバーに挿入した(図2)。カバーガラスに接着させたマイクロ流路を倒立顕微鏡(オリンパス)のステージに載せ、シリンジポンプを用いて培養液を流速0.05 $\mu$ l/minで吸引しつつ、スピニディスク共焦点レーザーシステム(CSU-W1, Yokogawa)を用いてライブイメージングを行った。

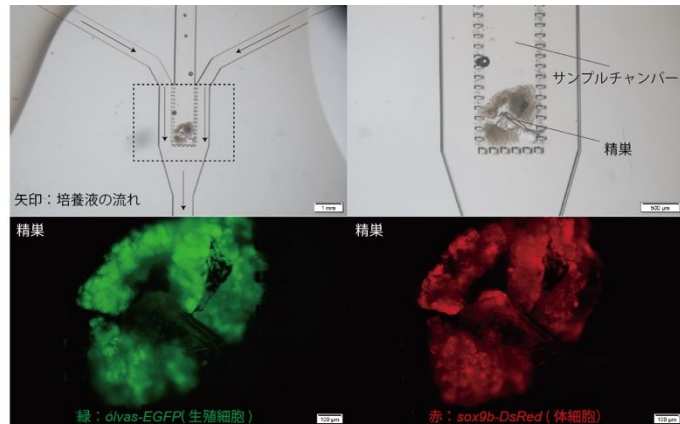


図2: ライブイメージング用マイクロ流路とサンプルチャンバーにマウントした精巣  
上段の左写真の破線部は右に拡大。下段は精巣の蛍光画像

#### ・シナプトネマ構造が可視化できる SYCP3:EGFP トランスジェニックメダカの作出

シナプトネマ構造の構成因子である *sycp3* 遺伝子の翻訳開始点より上流約2キロとエキソン・イントロンを含めた遺伝子領域を増幅し、終始コドン直前にEGFPを挿入し、pDest\_AMAベクター(共同研究者のJean-ReneHyunh博士から分与)にクローニングした。10ng/ $\mu$ lのベクターを制限酵素I-SceIとともに1細胞期のメダカ胚へインジェクションし、EGFP陽性のメダカ胚を選別・飼育した。野生型個体と交配後、F1メダカの生殖腺においてEGFPシグナルが検出可能なトランスジェニックメダカを選別・維持した。EGFPシグナルの細胞内局在を調べるために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて成体卵巣をライブイメージングにより観察した。また、孵化後10日目のメダカ幼魚の生殖腺に対し、EGFP抗体とVASA抗体を用いた免疫染色、及び、DAPIによる核染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。



#### 4. 研究成果

メダカ生殖細胞の高解像度ライブイメージング法の構築のためにいくつかの顕微鏡システムや器官培養装置を用いて、撮影条件を検討した。また Jean-Rene Huynh 博士の研究室(College de France)に3週間滞在し、ショウジョウバエで確立されたライブイメージング法について学んだ。その結果、マイクロ流路デバイスを用いて培養液を循環させ、光毒性の小さいスピニングディスク型共焦点システムを用いたところ、精巣組織を24時間に渡り核内の動態が追跡できる解像度で撮影に成功した。

ライブイメージングにあたり、生殖腺の体細胞はDsRedで、生殖細胞はEGFPで可視化できる *sox9b*-DsRed/*olvas*-EGFP トランスジェニックメダカを用いた。スピニングディスク型共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて、100倍油浸レンズで観察したところ、生殖細胞における核内の核小体、細胞質中のミトコンドリアやゴルジ体などの細胞小器官が *olvas*-EGFP のシグナルが弱い領域として、検出が可能であった(図3)。24時間に渡るライブイメージングによって、核小体が核内を動き回

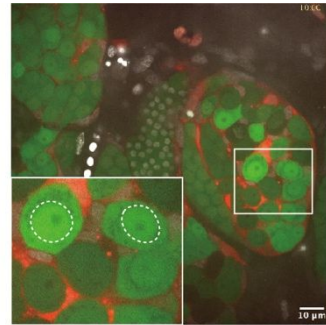


図3：精巣のライブイメージング画像（撮影開始から10時間後）  
赤：生殖腺体細胞（支持細胞） 緑：生殖細胞 グレー：核  
左下：白四角の拡大図。細胞内の白い破線部は核を示す。核内の暗い領域は核小体。細胞質（破線外部）の暗い領域はミトコンドリア・ゴルジ体などの細胞小器官。

る様子を捉えることができた。SiR-DNA（シリコンローダミン）によって核を染色したが、生殖細胞は、体細胞に比べ、プローブの取り込みが悪く、明確に核を染色できなかった。

本トランスジェニックメダカの *sox9b*-DsRed は生殖腺体細胞の中でも生殖幹細胞のニッチとなる細胞で発現していることが知られている<sup>(2)</sup>。24時間に渡りライブイメージングで観察したところ、動き回っていた生殖幹細胞が *sox9b*-DsRed 発現細胞に捕えられ、それら体細胞と生殖幹細胞が一緒になって、精巣組織内を移動している様子を見られた。ショウジョウバエや線虫では生殖幹細胞ニッチは特定の場所に局在しており、動かないものと考えられていた。本観察は生殖幹細胞ニッチ動態の新たな現象が見えているのかもしれない。

核染色用プローブ SiR-DNA では、生殖細胞の核を明確には染色できなかったため、核内構造を可視化できるトランスジェニックメダカの作出を計画した。特にシスト分裂から減数分裂期に入ると、染色体の配置がダイナミックに変化するため、その変化が可視化できるトランスジェニックメダカを作る必要があった。そこで、減数分裂時のシナプトネマ構造が可視化できるトランスジェニックメダカの作出を試みた。SYCP3 タンパク質（シナプトネマ構造の構成因子）のC末端にEGFPが融合したタンパク質（SYCP3:EGFP）を発現するコンストラクトを1細胞期のメダカ胚へインジェクションし、EGFP 蛍光を指標に胚を選別・継代したところ、生殖腺で特異的にEGFPシグナルが検出可能なトランスジェニックメダカの作出に成功した。ライブイメージングと免疫染色の結果、減数分裂期生殖細胞の染色体上にSYCP3:EGFP タンパク質が局在していることを確認した。第一減数分裂前期の相同染色体が対合する直前の leptotene 期では



図4：SYCP3:EGFP トランスジェニックメダカを用いたライブイメージング画像。 緑：SYCP3:EGFP, スケールバー：10μm

EGFP のシグナルが核内で均一に検出されたのに対し、相同染色体の対合が開始する zygotene 期、完了する pachytene 期への移行に伴い、シナプトネマ構造でEGFPのシグナルが顕著に検出され

た(図4)。これらの結果は、SYCP3 タンパク質の局在を調査した先行研究<sup>(3)</sup>の結果と一致しており、SYCP3:EGFP が内在性の SYCP3 タンパク質と同様の局在パターンであることを示している。

以上、本研究で開発したマイクロ流路デバイスを用いたイメージング手法は、生殖細胞のみならず、幅広い組織における細胞内の核や細胞小器官を観察するための技術基盤となりうる。今後、SYCP:EGFP メダカを用いた高解像度・長期間ライブイメージングにより減数分裂期におけるオスとメスの生殖細胞の核内動態の解明が期待される。

参考文献：(1)Yamanaka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 885-891 (2018). (2) Nakamura et al., *Science* 328, 1561-1563 (2010). (3) Iwai et al., *Exp. Cell Res.* 312, 2528-2537(2006).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8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 Nishimura T, Tanaka M	4. 巻 2218
2. 論文標題 Observation of Medaka Larval Gonads by Immunohistochemistry and Confocal Laser Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 209-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0970-5_17	査読の有無 無
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 Nakayama T, Okimura K, Shen J, Guh Y-J, Tamai K, Shimada A, Minou S, Okushi Y, Shimmura T, Furukawa Y, Kadofusa N, Sato A, Nishimura T, Tanaka M, Nakayama K, Shiina N, Yamamoto N, Loudon A.S, Nishiwaki-Ohkawa T, Shinomiya A, Nabeshima T, Nakane Y, and Yoshimura T	4. 巻 -
2. 論文標題 Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000278117	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: bio050054
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) 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 -
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) 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 Sumita Ruka, Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru	4. 巻 38
2. 論文標題 Dynamics of Spermatogenesis and Change in Testicular Morphology under 'Mating' and 'Non-Mating' Conditions in Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 436-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210025	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 Sone Ryota, Taimatsu Kiyohito, Ohga Rie, Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru, Kawahara Atsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Critical roles of the ddx5 gene in zebrafish sex differentiation and oocyte maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71143-2	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 Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru	4. 巻 39
2. 論文標題 Zygotic nanos3 Mutant Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) Displays Gradual Loss of Germ Cells and Precocious Spermatogenesis During Gonadal Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210123	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 Mariko, Nishimura Toshiya, Ishishita Satoshi, Matsuda Yoichi, Tanaka Minoru	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 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 Fujimoto Takafumi, Nishimura Toshiya	4. 巻 68
2. 論文標題 Chromosome Set Manipulation and Genome Manipulation in Aquaculture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 277 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/nskkk.68.277	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内萌、川村祥史、荒井那允、山羽悦郎、藤本貴史、西村俊哉
2. 発表標題 雄も重要なメダカの雌性発生
3. 学会等名 日本動物学会 北海道支部
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	田中 実  (Tanaka Minoru)  (80202175)	名古屋大学・理学研究科・教授    (13901)	

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		
フランス	College de France	Dr. Jean-Rene Hyunh	