

令和元年6月4日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07335

研究課題名(和文) バーコーディング系譜解析による精子幹細胞が選抜される過程の解明

研究課題名(英文) Study of the selection process of spermatogenic stem cells using genetic barcoding

研究代表者

池田 達郎 (Ikeda, Tatsuro)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・NIBBリサーチフェロー

研究者番号：60803963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの発生において、将来の卵や精子となる「生殖細胞」は胎児の中で数万個まで増える。オスではこれらの生殖細胞の一部が成体の「幹細胞」となり、幹細胞は分裂しながら生涯にわたって精子を継続的に産生する。しかし、数万個の生殖細胞の中から幹細胞が選ばれる過程はこれまで解析手法がなく理解が進んでいなかった。本研究では「遺伝子バーコーディング法」という開発されたばかりの手法を胎児の生殖細胞へ適用し、幹細胞の選択過程を1細胞レベルで成体まで追跡することを可能にした。幹細胞が選ばれる時期や規模を定量的に調べることが可能となり、精子さらには次世代の子を作り出す細胞の特性を解明するための基盤を整えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では遺伝子バーコーディング法を適用し、胎児の生殖細胞から成体の幹細胞が選ばれるまでの「系図」を解析する実験系を構築した。今後この実験系を活用することで幹細胞の選択のメカニズムを明らかにできるに違いない。生殖細胞は配偶子(卵や精子)を作り受精によって次世代の子を生み出す唯一の細胞であり、品質の良い配偶子を作ることは生物が繁栄するために不可欠である。本研究を土台に生殖細胞を選択する仕組みが解明されたならば、生物が配偶子を品質管理する仕組みの理解や、培養によって配偶子を人工的に作る技術の発展に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：During mouse embryonic development, about 40 primordial germ cells (PGCs) are first induced, and they proliferate to around 20 thousands before birth. Previous studies have suggested that in male mice only a subset of these PGCs generate spermatogenic stem cells (SSCs) which support lifelong spermatogenesis. However, the property of PGCs that contribute to SSCs remains unknown. We constructed an experimental system to introduce unique DNA sequence into each PGC, enabling lineage tracing of the developing germ cells at single-cell resolution. By using this system, we will be able to see the dynamic change of germ cell lineage, thus quantitatively reveal the selection timing/ratio of PGCs, and uncover the key feature of selected cells which can produce the next generation.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 発生 細胞系譜 始原生殖細胞 精子幹細胞 バーコーディング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の発生における細胞分化では、まず未分化細胞の集団が生じ、そこから時間経過にともなって分化細胞の集団が生じる。この時、(1)一つ一つの未分化細胞が同等に分化細胞を生み出す、もしくは(2)未分化細胞の一部がたくさんの分化細胞を生み出し、残りは少数あるいはまったく生み出さない、という2つの可能性がある。未分化細胞が分裂しながら分化細胞に至るまでの系図は細胞系譜と呼ばれる。これまで線虫やホヤといったシンプルな無脊椎動物では系譜を追跡しながらの細胞分化の研究がおこなわれてきたが、哺乳類のように細胞数が多く系譜が個体ごとに変化する動物では、系譜を総体的に追跡しながらの分化の研究は技術的に難しかった。そのため、上記の2つの系譜動態もあまり区別されてこなかった。どの細胞が分化に至るかは、最終分化した一部の細胞のみが次世代を作り出し世代を超えて系譜をつなぐ生殖細胞の分野ではとりわけ重要な問題である。特にマウスの生殖細胞では後述の現象が報告されていたため、上記の2つの系譜動態を検証することにした。

マウス生殖細胞の発生では、まず受精後 6.5 日ごろに胚のエピプラスト後方に将来の生殖細胞の元となる始原生殖細胞 (PGC) が数十個形成される。続いて PGC は胚内へ移動して左右に形成された生殖巣に至る。オスではその後 13.5 日目頃に生殖巣が精巣へと性分化し、PGC は精細管に包まれて分裂を停止する。この頃からオスの生殖細胞はゴノサイトと呼称される。PGC からゴノサイトに至る過程で生殖細胞の数は 20000 個程度まで増加する。受精後 19.5 日頃に仔は出生し、ゴノサイトは分裂を再開して精細管の基底膜へと着底し、精子幹細胞が作られる。精子幹細胞は自己増殖し、未分化性を保ちながら分化細胞 (精子) を作り出して、オスの生涯にわたる精子産生を支え続ける。

このような生殖細胞の発生において、実は数万個作り出された胎児生殖細胞のうちほんの一部の細胞しか精子幹細胞にならず、大部分の細胞は生涯の精子産生にほとんど寄与しない可能性が、先行研究の巧妙なキメラ実験やパルス標識実験で示唆されていた。その中にはアポトーシスにより消失する細胞、および幹細胞を経ずに直接精子へと分化し排出される生殖細胞がいることが知られており、これらの運命を回避した細胞が精子幹細胞になると予想される。しかし、具体的にいつ、何割程度の生殖細胞が、幹細胞に選ばれて生涯の精子産生に寄与するかは明らかでない。これは、胎児の生殖細胞集団を個別にラベルし出生・性成熟に至るまでの系譜を総体的に追跡することがこれまでの手法では困難だったためである。

この2、3年、脊椎動物のように複雑な動物胚で総体的な系譜追跡を可能にする遺伝子バーコーディング法の報告が進んでいる。遺伝子バーコーディング法は、集団の個々の細胞にそれぞれ異なる DNA 配列 (バーコード) を導入 (バーコーディング) することで個々の細胞系譜を区別する。このバーコードを次世代シーケンシング等で読み取ることで、集団の個々の細胞がたどった系譜を総体的に解析することができる。私は遺伝子バーコーディング法を適用することで、PGC が分化し精子幹細胞に至る過程の系譜ダイナミクスを明らかにし、その選抜の時期と規模を明らかにできると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

目的 (1):

遺伝子バーコーディング法を適用してマウスの PGC にバーコードを導入する系を確立する。本研究では後述のタモキシフェン依存型 Cre レコンビナーゼ (CreER) を用いた系を適用する。そのため、まずは胎児 PGC だけで特異的に組み換えを誘導できるような Cre 系統を選別する。次に、母体にタモキシフェンを投与し胎児 PGC をバーコーディングする条件 (タモキシフェンの投与時期、投与量、投与経路) を検討する。また、バーコーディングした生殖細胞を含む精巣から DNA を精製し、バーコード配列を PCR 増幅して、次世代シーケンシングで配列を決定したのち、情報・統計学的にバーコード配列へと変換し個々のバーコードの生成確率を計算する、という一連のプロセスを条件検討する。

目的 (2):

上記で決定したバーコーディング条件を用いて、オス生殖細胞の分化過程における細胞系譜のダイナミクスを明らかにする。本スタート支援の期間や規模を考慮に入れ、PGC、新生児および成体の各段階の間でのバーコード分布の変化をラフに解析し、次ステップのより大規模・高解像度での解析に向けた概要をつかむことを目指す。

3. 研究の方法

目的 (1) について:

本研究では、CreER の活性依存的にランダムな組み換えを引き起こすことで細胞ごとに異なる DNA 配列を生成するマウス (バーコーディングマウス、Pei et al., Nature 2017) を用いて PGC をバーコーディングする。この系をベスト条件で適用するためには、発生中の生殖細胞特異的に、完全にタモキシフェン投与依存的に、かつ十分な効率で組み換えを誘導できる CreER 系統を用いる必要がある。本研究ではまず PGC で CreER を発現する既存の遺伝子改変マウスを導入し、バーコーディングマウスと交雑させる。タモキシフェンを投与せずに出生した仔の精巣 DNA を解析し、組み換えが生じていないかを確認する。それと並行して、妊娠中の母体にタモキシフェンを投与し、同様に精巣 DNA を解析して、生殖細胞でバーコードの組み換えが誘導されるかどうかを検証する。その後、異なるタモキシフェン投与条件 (投与量、投与時期、投

与経路)を試して同様に精巢 DNA を解析し、PGC をバーコーディングするための最適な条件を決定する。さらに、PCR 増幅産物を用いて次世代シーケンシングの条件検討をおこなう。

目的(2)について:

最適なバーコーディング条件が決定したら、同じ条件で PGC をバーコーディングしたオス個体が胎児、新生児、および成体になった段階で精巢 DNA を取得し、バーコードを次世代シーケンシングする。各時期の複数個体からデータを得たのち、情報・統計学的に解析して個体の成長に伴いどのような系譜の動態(削減や、一部の系譜の拡大)が起こったかを評価する。

4. 研究成果

目的(1)について:

本研究で用いるバーコーディングマウスをドイツの共同研究者から提供していただいたが、このマウスを公表する論文(pei et al., Nature 2017)の公表が当初の想定より遅れたため、マウスの到着も本研究期間が開始した後の 2017 年 11 月にずれ込んだ。

まず入手可能な 4 種類の CreER 系統をマウス飼育施設に導入し、バーコーディングマウスと交配させてバーコーディングの条件検討をおこなった。これらのマウスは生殖細胞におけるレポーター遺伝子のタモキシフェン誘導型組み換えで実績のある CreER 系統である。しかしながら、このうち 3 系統ではタモキシフェンを投与しない場合でも体細胞および生殖細胞でバーコードの非特異的な組み換え(リーク)を引き起こしてしまうことが明らかとなった。in vitro で人工授精し培養した卵割期胚のバーコードの PCR でもリークが検出されたことから、このリークは体細胞と生殖細胞の系譜が別れる前の初期胚の時期に生じていると分かった。この原因として、これらの CreER 系統では初期胚でも非常に強く CreER が発現していること、およびバーコーディングマウスが多数の LoxP サイトをタンデムで持つために(タモキシフェン非投与においても)CreER に対する高い感受性を持つことが想定された。なお、残り 1 系統はリークはなかったが、タモキシフェンを投与しても組み換えが検出できなかった。

上記のリークを回避するために、初期胚において CreER の活性を抑制する手法を検討した。複数回の試行をおこなった結果、一部の胎児で初期胚におけるリークを抑制することが可能になった。しかしながら、試行ごとにリークの抑制効率にばらつきがあること、および後述の新規 CreER 系統を用いた方が安定した結果が得られたことから、今後の解析では抑制による手法は適用しない予定である。

既存 CreER 系統を用いた結果から、(1)卵割期の胚で発現が生じず、(2)生殖細胞での発現は胎児 PGC に一過的に生じ、その後は強い発現が起こらないような遺伝子の調節領域を用いることで、PGC でのみ特異的に組み換えを誘導できるような CreER を実現できると推測された。この条件を満たすような遺伝子を過去の報告から探索し、1 つの候補を見出した。この遺伝子の近傍領域を含む細菌人工染色体(BAC)を入手し、より厳密に応答する CreER 遺伝子(MerCreMer)を組み換えにより ORF へ導入したのち、完成 DNA を初期胚ヘインジェクションすることで BAC トランスジェニック(Tg)マウスを作成した。7 系統の Tg マウスを取得できた。定量 PCR で導入遺伝子のコピー数を測定したところ、10 コピー以上も挿入された系統の存在が示唆された。このような多コピーの MerCreMer 系統のマウスとバーコーディングマウスを交配させた。タモキシフェンを投与せずに産まれた仔マウスから取得した精巢 DNA のバーコードを PCR 増幅した場合、組み換えを示す短いバーコード DNA は検出されなかった。一方で、タモキシフェンを投与した仔マウスの精巢では、組み換えが誘導されたことを強く示唆する短いバーコード DNA の増幅が検出された。したがって、既存の CreER 系統では実現できなかった、タモキシフェン非依存的な組み換えを回避しながら、投与した場合のみ PGC でバーコードを導入することが可能となった。また、様々な発生段階でタモキシフェン投与を試した結果、この系統を用いると PGC の広い発生段階でバーコーディングできることも確認できた。本当に組み換えが PGC 特異的かどうかは今後注意深く検証する必要があるが、この MerCreMer 系統を用いることで安定的に PGC をバーコーディングして成長過程の系譜動態を追跡できると強く期待される。

CreER 系統の検討と並行して、PGC にバーコードを導入した個体の精巢 DNA を用いてバーコード配列決定の条件検討をおこなった。バーコードの PCR 増幅産物を元にライブラリ作成・一分子リアルタイム(SMRT)シーケンシングをおこなった。得られた配列情報を、ドイツの共同研究者から提供を受けたプログラムを用いてバーコード配列へと変換し、さらに統計学的に個々のバーコードの生成確率を計算した。これにより、バーコード解析の一連のプロセスを達成することができた。そして、精巢 DNA に実際にバーコードが導入されていることが確認できた。

目的(2)について:

上述のように、バーコーディングマウスの受け取りが想定より遅れてしまったこと、使用を予定していた CreER 系統で予期しない組み換えのリークが生じてしまったこと、対応策としておこなった新規 Tg マウスの作成に一年弱を要したことにより、バーコーディングを用いた生物学的な現象の解析までには至ることができなかった。しかし、緻密な条件検討をおこなったことで非常に安定なバーコーディング系を確立できたと自負しており、これ以降の生物学的な解析は近い将来に必ずや達成できるに違いない。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Tatsuro Ikeda, Thomas Höfer, Hans-Reimer Rodewald and Shosei Yoshida.

Lineage dynamics of developing germ cells that generate spermatogonial stem cells in mice.

2018 年度 ExCELLS 若手リトリート 2019 年

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/germcell/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 松生

ローマ字氏名：(YOSHIDA, Shosei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。