

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18333

研究課題名(和文)脊椎動物の減数分裂開始機構解明の突破口を開く-減数分裂開始異常変異体を用いて-

研究課題名(英文) Identification of a novel factor involved in meiosis initiation using a zebrafish mutant defective in meiotic entry

研究代表者

河崎 敏広 (Kawasaki, Toshihiro)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30770630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物における体細胞分裂期から減数分裂期へと移行する分子メカニズム解明の糸口を見つけるため、未分化型の精原細胞が減数分裂を開始してしまう異常を持つゼブラフィッシュENU誘導変異体PM-035の原因遺伝子の同定を行った。ゲノムマッピングと次世代シーケンサーを用いた解析により、PM-035変異体特異的に終止変異が存在する遺伝子、すなわち原因遺伝子の候補を3つ見出した。これら候補遺伝子の変異体を作成して精巢の表現型を解析することにより、減数分裂の開始制御に関与する遺伝子を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類ではレチノイン酸によるシグナルが減数分裂期への移行を引き起こすが、その制御因子として知られるstra8遺伝子は脊椎動物全般に広く保存された遺伝子ではなく、魚類ではほとんどの種で見つかっていない。本課題はstra8遺伝子を持たないゼブラフィッシュにおいて減数分裂開始の制御因子を同定することにより、脊椎動物全般における減数分裂開始機構の解明の足がかりを得ることが最も重要な点である。減数分裂開始機構の理解は、生殖に必須な減数分裂のコントロールにつながるため、生殖医療の発達に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to obtain a clue for elucidation of mechanism of transition from mitosis to meiosis in vertebrates, we performed identification of causative gene of PM-035 zebrafish ENU-induced mutant which has an abnormality in the timing of meiotic entry. Through the combination of traditional mapping of responsible gene and next-generation sequencing-based approach, we identified 3 candidate genes as a responsible gene of the PM-035 mutant. By generating mutants of the candidate genes and analysis of them, we succeeded in the identification of a gene involved in the regulation of meiotic entry in spermatogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 減数分裂開始 精子形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、配偶子形成を行う全ての真核生物が共通して持っている細胞分裂様式であり、様々な生物を用いて減数分裂開始機構の解析が行われてきた。最も解析の進んだ酵母では、減数分裂開始を促進する因子と、促進因子の働きや発現を抑える抑制因子が明らかとなり、これら両因子が制御する機構によって、必要な際に減数分裂を開始する¹。しかし、これらの制御因子は高等生物に保存されておらず、減数分裂開始機構は解明されていない。

脊椎動物では、哺乳類においてのみ制御因子が見つかっており、レチノイン酸シグナルに応答して発現する *stra8* 遺伝子が重要な制御因子として 2006 年に見出されているが^{2,3}、*Stra8* が減数分裂へと導く機構は不明のままである。それに加え、雌雄ともに *Stra8* 非依存的な減数分裂開始機構の存在も確認されており^{4,5}、未だ全容の解明には至っていない。また、哺乳類以外の脊椎動物では減数分裂開始制御因子が見つかっておらず、このことが脊椎動物全般における減数分裂開始を制御する機構の理解を妨げている。

魚類では、ゼブラフィッシュを含め殆どの種で *stra8* 遺伝子自体が見つからず、*Stra8* 非依存的な減数分裂開始機構が普遍的であると推測される。研究代表者は近年、精子形成が未分化型精原細胞の段階で停止するゼブラフィッシュ ENU 誘導変異体 *PM-035* において、本来なら体細胞分裂のみ行う未分化型精原細胞が減数分裂期に移行してしまっていることを見出した。このことは *PM-035* 変異体の原因遺伝子が減数分裂の開始を制御していることを示唆しており、この原因遺伝子を同定できれば、新たな *Stra8* 非依存的な制御機構の制御因子の発見、および動物全般を通じた減数分裂の開始機構の理解につながると考えられた。

2. 研究の目的

本課題では、*PM-035* 変異体の原因遺伝子を同定することを目的とし、原因遺伝子のゲノムマッピング、および次世代シーケンサーを用いた全ゲノム SNP 解析を行って原因遺伝子の候補を得たのち、それらの変異体を作成して *PM-035* 変異体との相補性解析を行い、原因遺伝子を同定する。また、得られた原因遺伝子産物に対する抗体を作成し、相互作用する因子の探索を行うことにより、ゼブラフィッシュにおける減数分裂の開始制御機構の一端を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) *PM-035* 変異体の原因遺伝子の候補遺伝子の探索

マイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子のマッピングのために、*PM-035* 変異体 (Tübingen 系統) と近交系ゼブラフィッシュ (IM 系統) を掛け合わせた後、ヘテロ *PM-035* 変異体をスクリーニングした。このヘテロ *PM-035* 変異体同士を掛け合わせ、*PM-035* 変異体の表現型を示す個体、および表現型を示さない個体のゲノムを抽出してプールした。これらプールしたゲノムと各染色体に存在するマイクロサテライトマーカーを用いてゲノミック PCR を行って変異座と連鎖するマーカーの検索を行い、変異座の存在する染色体領域を特定した。その後、プールしたゲノムを用いて次世代シーケンスを行った (HiSeq- X Ten, paired-end150x2)。得られたリードデータを BWA を用いて変異座が存在する染色体のリファレンス配列 (GRCz11) にマッピングした。得られたマッピングデータを用いて、Picard を用いた重複リードの除去、SAMTools を用いた変異のコール、Variant Annotation Integrator を用いた変異のアノテーション付加を行った。得られた変異の中から、変異座の存在する染色体領域中の終止変異を選別し、*PM-035* 変異体の候補遺伝子とした。

(2) 候補遺伝子の変異体の作成

CRISPR/Cas9 を用いて、得られた 3 つの候補遺伝子の変異体の作出を行った。CRISPRscan を用いて、変異座の候補とした終止変異部より上流に gRNA を設計し、T7 プロモーター付加したオリゴ DNA を鋳型にして T7RNA ポリメラーゼで gRNA を作成した。Cas9 タンパクと gRNA を India 系統の受精卵に顕微注入し、それぞれの変異体を作成した。

(3) 抗 *PM-035CG1* 抗体の作成

PM-035CG1 遺伝子の N 末端、中部領域を pCold GST ベクター (Takara) に挿入し、Chaperone Competent cells pG-Tf2/BL21 (Takara) に導入した。0.1mM の IPTG を加え、15°C で一晩融合タンパク質を発現させた。ソニケーションによる大腸菌の破碎後、グルタチオンアガロースを用いて融合タンパク質を精製し、ウサギに免疫して抗体を作成した。得られた抗血清から Protein A アガロースを用いて IgG を精製して実験に使用した。

4. 研究成果

(1) ゲノムマッピングによる *PM-035* 変異座が存在する領域の特定

PM-035 変異体のヘテロ同士を掛け合わせて得た個体群から、*PM-035* 変異体の表現型を示す個体 (ホモ変異体) と示さない個体 (ヘテロ変異体、野生型) に分け、それぞれのゲノムを抽出・プールしゲノミック PCR の鋳型とした。ゼブラフィッシュのすべての染色体の上流、中間部、下流に位置するマイクロサテライトマーカーを用いてゲノミック PCR を行い、変異座が 15 番染色体の上流領域のマーカー (Z21982) と強く連鎖していることを見出した (図 1)。さらに詳細に近傍のサテライトマーカーと個体ごとのゲノムを用いてマッピングを行い、15 番染色体の 12.2 ~ 25.2Mb の領域に変異座が存在することを明らかにした (図 2、Z8991-Z26339 間)。

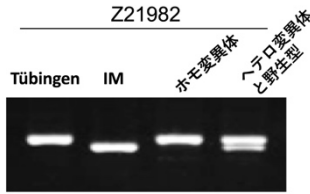


図1 マイクロサテライトマーカーのPCR解析

15番染色体上流域に位置するZ21982(図2、4.2Mb)は、ホモ変異体からは変異体本来のTübingenアリルしか検出せず、変異座と極めて強く連鎖することを示している。

(2) PM-035変異体の全ゲノムSNP解析

PM-035変異体の変異座を特定するため、ゲノムマッピングに用いたプールしたゲノムのリシーケンスを行い、SNP解析を行った。当初は解析ツールが整っているゼブラフィッシュゲノム情報(Zv9)を用いたが、ホモ変異体特異的な終止変異を見出す事が出来なかった。その対策として、さらに変異座の存在する候補領域を縮めるべく、より大規模な変異体ゲノムサンプル数の調整とより緻密なマイクロサテライトマーカーの作出へと方針を変更したため、当初の研究計画に大きく遅れを生じてしまった。

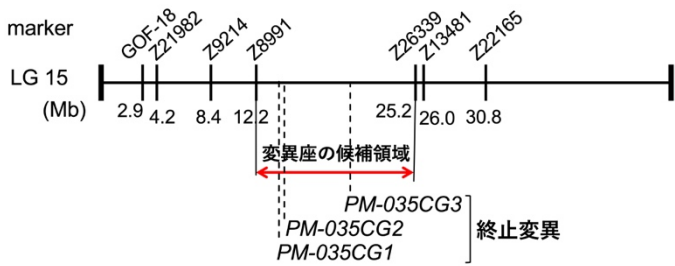


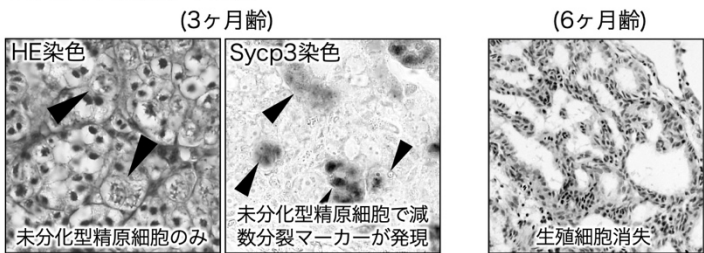
図2 マッピングとSNP解析によって得られた候補領域と候補原因遺伝子の位置

しかし、平成30年3月に公開された最新のゲノム情報(GRCz11)を用いて全ゲノムSNP解析を行ったところ、図2の候補領域中で11遺伝子にPM-035変異体の全当該リードに終止変異が挿入されていることが分かった。ゼブラフィッシュSNPデータベースや我々が過去に全ゲノムSNP解析を行った際のデータを元にPM-035変異体特異的な変異の絞り込みを行い、候補原因遺伝子を3つに絞り込むことができた。これらの遺伝子はすべて機能が不明で、解析がなされれば非常に新規性が高い遺伝子であり、PM-035変異体の変異体の原因遺伝子として過去の知見から除外できないため、これら3つ全てを原因遺伝子の候補としてPM-035CG1、PM-035CG2、PM-035CG3とした(図2)。

(3) 候補遺伝子の変異体の表現型解析

これら候補遺伝子の変異体の表現型をCRISPR/Cas9を用いて作成し、PM-035変異体と同様な表現型を示すか解析を進めた。まず6ヶ月齢の各ホモ変異体のオスと野生型メスを掛け合わせたところ、PM-035CG1変異体が不妊であった。精巣を取り出して観察するとPM-035変異体と同様に生殖細胞が消失していた(図3、AとB 6ヶ月齢)。

A PM-035変異体の精巣



B PM-035CG1変異体の精巣

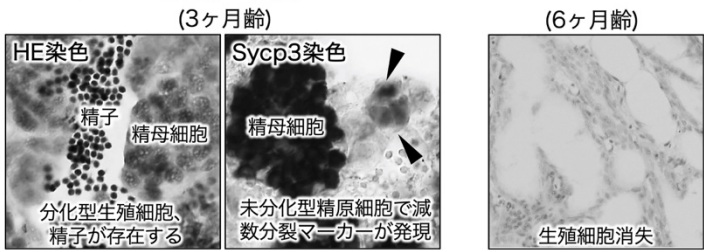


図3 PM-035変異体とPM-035CG1変異体の表現型の比較

A) PM-035変異体では本来なら減数分裂を行わない未分化型精原細胞(矢頭)が減数分裂を開始してしまい、生殖細胞の枯渇を招く。B) PM-035CG1における未分化型精原細胞の減数分裂(矢頭)と生殖細胞の枯渇、この2点が両変異体に共通する。

生殖細胞が枯渇する前の3ヶ月齢の精巣の解析を進め、PM-035変異体と同様に未分化型精原細胞の段階で減数分裂期に移行した異常な細胞が観察された(図3B 矢頭)。この結果から、PM-035CG1遺伝子が減数分裂開始制御に関与することが示唆された。しかしながらPM-035CG1変異体の精巣には、PM-035変異体と異なり、分化型の生殖細胞や精子が存在するという大きな違いが観察された(図3B HE染色)。この原因として、(1)PM-035CG1変異体の遺伝的バックボーンがPM-035変異体と異なることがこの違いをもたらす可能性(PM-035CG1変異体:India系統、PM-035変異体:Tübingen/IM系統)、(2)Nonsense-mediated mRNA decayがどちらかの変異体で起きており、PM-035CG1の機能阻害効果に大きな違いが出ている可能性、(3)PM-035変異体の原因遺伝子が1つでなく、複数の変異とともに表現型をもたらす可能性、が考えられる。現在、PM-035CG1変異体とPM-035変異体の相補性解析を含め、これらの可能性に対する検証を行っている。

(4) 抗体を用いたPM-035CG1の機能解析

PM-035CG1が本当にPM-035変異体の原因遺伝子であるか結論はまだ得られていないが、PM-035CG1遺伝子が減数分裂開始制御に関与すると示唆されたため、PM-035CG1タンパク質の機能

解析に着手した。PM-035CG1はその構造からは機能を予測することが出来ないため、抗体を用いた相互作用する因子の同定などの生化学的なアプローチを試みることにした。PM-035CG1は新規性が高く抗体が市販されていないため、PM-035CG1のN末端、中部領域を大腸菌に発現させて抗原とし、ウサギに免疫して抗体作成を行った。PM-035CG1は可溶性が低く、ウサギへの免疫のために抗原を可溶化させるのに時間を要したが、GST タグを付加することと大腸菌のコールドショック系で発現させることで可溶化に成功した。現在までにN末端側の抗体が得られており、免疫組織化学により未分化型精原細胞でシグナルが得られている。現在このシグナルが正しいか検証を行なっている段階にあり、検証後、抗体を用いて免疫沈降を行ってPM-035CG1と相互作用するRNAとタンパク質を同定することにより、PM-035CG1がどのような経路で減数分裂の開始制御に関与するか解析を進める。

本課題で最も重要な目標は、*stra8*遺伝子を持たないゼブラフィッシュを用いて新たな制御因子を同定することにより、減数分裂への移行を制御する分子メカニズム解明の糸口を見出すことである。この意味において、本課題で新たな制御因子PM-035CG1を見出すことができたことは大きな意義があると考えられる。

<引用文献>

1. Werven and Amon. Regulation of entry into gametogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* **366**. 3521-3531. 2006.
2. Bowles et al. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* **312**. 596-600. 2006.
3. Baltus et al., In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat. Genet.* **38**. 1430-1434. 2006.
4. Dokshin et al. Oocyte differentiation is genetically dissociable from meiosis in mice. *Nat. Genet.* **45**. 877-883. 2013
5. Mark et al. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J. Cell Sci.* **121**. 3233-3242. 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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