

令和元年5月29日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19413

研究課題名(和文) 遺伝子バーコーディング法を用いたマウス生殖細胞系譜の全体像の解明

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of mouse germ line using genetic barcoding

研究代表者

吉田 松生 (YOSHIDA, Shosei)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授

研究者番号：60294138

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)：我々ヒトを含むほ乳類が発生する過程では、配偶子(精子や卵子)を作る「生殖細胞」が数多く作られるが、実際に次世代を作る精子や卵子となるのはその一部に過ぎないと考えられている。しかし、生殖細胞の中でどの程度の割合の細胞が、いつ、どのように選ばれるのかは明らかになっていない。本研究では、「遺伝子バーコーディング法」と呼ばれる数多くの細胞の運命を区別して追跡できる開発されたばかりの手法を生殖細胞に応用し、この問題を解明する基盤を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

配偶子(精子や卵子)は次世代を作ることができる唯一の細胞であり、その品質を高く維持することは極めて重要である。しかし、配偶子の品質管理のメカニズムはほとんど解明されておらず、今後の重要な課題である。本研究を基盤として、一部の生殖細胞から配偶子が作られる発生プロセスの全容が解明されると期待される。これは、個体における配偶子の品質管理を解明したり、培養下で形成される配偶子の品質を維持する上で極めて重要な情報を与える。

研究成果の概要(英文)：During mammalian development, numerous “germ cells”, which give rise to gametes (sperm or eggs), are generated. It is believed to be true that only a portion of them eventually become gametes and generate the next generation. However, it is largely unknown when, and to what extent, such germ cell selections occur. This study has developed an experimental basis to address this problem, making use of a newly established technology called “DNA barcoding”, which enables to trace numerous cell lineages independently.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生・分化 細胞・組織 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、次世代の個体を残すことで命をつなぎ、長い進化の歴史を生き抜いてきた。次世代に命をつなぐためには、親の世代から受け継いだゲノムを正しく伝えることが極めて重要である。われわれヒトを含む有性生殖を行う多細胞生物では、配偶子—すなわち卵と精子—が受精することで次世代の個体が生まれる。多くの多細胞動物の場合、個体発生の初期に生まれた「生殖細胞」と呼ばれる特定の系列の細胞から配偶子は作られる。したがって、生殖細胞の最大のミッションは、配偶子を作りゲノムを次世代へと伝達することであると言える。

本挑戦的研究が対象としたマウスでは、胚発生初期に胚体外で生まれた少数(10個以下)の生殖細胞(当初は始原生殖細胞=PGCと呼ばれる)の集団が数を増しながら、胚体内の生殖腺(卵巣および精巣)への遊走、雌雄の性分化、(オスでは)配偶子幹細胞(精子幹細胞)の形成、体細胞分裂による前駆細胞の増幅、減数分裂とその後の配偶子成熟、といった多段階の分化を経た後に精子となる。しかし、興味深いことに、胚発生期に存在した全てのPGCが等しく配偶子となるのではなく、発生分化の過程で大規模な生殖細胞の除去が何度か起こり、生き残った細胞だけが配偶子となって次世代にゲノムを伝達することが、生殖細胞の細胞死の観察とともに、巧妙なキメラ動物実験や細胞系譜追跡実験の結果から示唆されていた。

これは、次世代にゲノムを伝える配偶子が(意味を持った選抜の結果か、バイ・チャンスの選択なのかは分からないが)選ばれた少数の生殖細胞から作られる可能性を示す。細胞分裂の過程である確率でゲノムに変異が必ず蓄積すること、すべての生殖細胞のエピゲノム状態が均一の状態で維持されることはあり得ないことを鑑みても、この現象が生殖細胞のミッションと密接に関わることは明白である。しかしマウスの場合、何万個にもおよぶ多数の胚生期PGCの子孫がどのような経過を経て、どの程度の割合が選択された結果、最終的な配偶子形成に至るのかその全体像は謎に包まれている。この現象を解析するためには、極めて多数の細胞の運命をそれぞれ区別して追跡することが必要であるが、それを可能とする技術は永く実現しなかったからである。

最近、このように多数の細胞の系譜を一つ一つ区別して解析することを実現できる「遺伝子バーコーディング法」が開発された。とりわけ、Creリコンビナーゼを用いることで、マウス個体発生期の細胞系譜解析に直接応用することが可能なシステムが開発された(pei et al., Nature 2017: 本研究課題の開始時には未発表であった)。そこで、この開発されたばかりの手法を用いることで上記の永年の謎に取り組むべく、本挑戦的研究課題を開始した。

## 2. 研究の目的

上記のように本研究は、「多細胞生物(動物)において、配偶子となって次世代にゲノムを伝える細胞は、生殖細胞集団の中でどのような過程を経て選ばれるどのような性質を持つ細胞なのか?」という大きな生物学的な問いを動機としている。その上で、本研究課題での具体的な到達目標として、以下の2つを掲げた。

### 目的(1):

開発されたばかりの「遺伝子バーコーディング法」を、マウスの発生期生殖細胞に応用し、その系譜を解析できる実験系を確立すること。本実験システムは薬剤(タモキシフェン)依存性Creリコンビナーゼを用いることで、マウス組織全般で利用できるよう設計されているが、生殖細胞系列での実績はなかった。本研究を実現するためには、薬剤(タモキシフェン)を投与して、十分な多様性を持ったバーコードを生殖細胞特異的に導入することが不可欠となる。そのためには、適切なCreリコンビナーゼ発現系統とともに、薬剤投与条件(投与時期、投与量、投与経路など)を最適化する必要がある。

### 目的(2):

上記で確立した実験系を用いて、マウス生殖細胞発生から配偶子形成に至る過程での細胞系譜の削減の全体像を明らかにすること。本課題の期間や規模に鑑み、詳細な解析は無理であるが、全体像(削減の程度)をラフに理解することを目的とした。理論的には雌雄いずれにも適用できるが、まず配偶子数が多いオスの精子形成の解析を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### 目的(1)のために:

本研究では、発生期の生殖細胞特異的かつ、薬剤(タモキシフェン)依存性、十分に多様なバーコードを導入することが必須である。Creリコンビナーゼ発現系統としては、他の実験系で実績のある遺伝子改変マウスを4系統導入し、バーコードレポーター系統と交配して、「相性」をテストした。加えて、タモキシフェンの投与条件(投与時期、投与量、投与経路など)の最適化を図った。発生期の生殖細胞にバーコードを導入するためには、妊娠している母マウ

スに投与した薬剤が胚（胎児）に移行して生殖細胞に作用する必要があるため、慎重な条件検討が求められた。

バーコードが導入された後には、以下のように評価する。すなわち、純化した生殖細胞、あるいは生殖細胞と体細胞を含む生殖腺組織からゲノム DNA を抽出、バーコード領域を PCR で増幅して deep sequencing によって決定した塩基配列よりバーコードを解読する。バーコードは全てが同じ確率で生成するのではなく、比較的高い生成確率を持つものと稀にしか生成しないものがあるため、回収されたバーコードから生殖細胞の系譜情報を得るためにはこの生成確率を考慮に入れて計算する。

#### 目的(2)のために：

目的(1)が達成された後の最初の実験として、以下のようなスケジュールを計画した。すなわち、数百から数千個の PGC が存在する発生ステージでバーコーディングを導入、その後個体発生を継続させる。出生・成熟後にオス個体の精巣に含まれるバーコードを解析し、パルス標識直後の結果と比較する。その結果から、生殖細胞の系譜削減の規模を推定する。

### 4. 研究成果

#### 目的(1)に対して：

まず、発生期の生殖細胞特異的にタモキシフェン依存的 Cre リコンビナーゼを発現するマウス 4 系統を、それぞれバーコードレポーター系統と交配した。メス個体が妊娠する胎児の中に、目的とする 2 重遺伝子改変マウスが含まれる。妊娠している母マウスに様々な条件でタモキシフェンを投与し、胚（胎児）の生殖細胞にバーコードが導入されるかを検討した。具体的には、タモキシフェンを投与した母親が出産した次世代が成長したのち、成熟した精巣のゲノム DNA からバーコード領域を PCR により増幅した。バーコードが生成された電気泳動パターンを示した増幅産物を、次世代シーケンサーを用いて解析したのち、塩基配列からバーコードを解読した。その結果、我々の用いた実験系でバーコード配列が生成され、生殖細胞の系譜解析が可能であることが確認された。

しかし、上記の初期実験の結果、以下のような「リーク」が生じるために、信頼できるバーコード情報が得られないことが明らかとなった。まず、薬剤（タモキシフェン）を投与しない場合にもバーコードの導入が観察された。これは生殖細胞で顕著に観察されたが、生殖細胞以外の細胞でも軽度ながらバーコードが導入されていた。特に、タモキシフェンを投与しなくても複数の臓器にバーコードが導入されることが頻発したことから、初期胚で薬剤非依存的にバーコードが導入されたと結論した。以上の実験に用いたマウス系統はいずれも他のレポーターを用いた系譜追跡実験や条件的遺伝子欠損実験において十分な特異性と薬剤依存性を発揮していたことから、新規技術であるバーコーディングの持つ当初想定できなかった特性を反映した問題だと考えられた。また、バックグラウンドとして観察されたバーコードは軽度であったものの、統計的解析を著しく複雑にするばかりでなくその精度も著しく低下させるため、バックグラウンドを検出感度以下まで抑制することが不可欠となった。

そこで、初期胚で Cre リコンビナーゼの活性を抑制することでバックグラウンドのバーコード導入を防ぐ手法を検討した。一定の効果を得ることができたが、信頼できるデータが安定して得られる条件は確立できなかった。そこで根本的な解決策として、生殖細胞特異性がより高く、薬剤非依存的なバーコードの導入がより少ないと期待されるデザインの特異的トランスジェニックマウス系統を新規に作出した。この系統をバーコードレポーター系統と交配して解析した結果、上記のリークが大幅に改善されたことが分かった。現時点で最終的な評価を下すには至っていないが、本研究に必要な条件、すなわち、生殖細胞に十分なバーコードを導入すると同時に、高い特異性と低いバックグラウンド活性を実現できた可能性が高いと考えている。したがって、想定外の問題に直面したものの、目的(1)は概ね達成することができたと評価している。

#### 目的(2)に対して：

一方、目的(1)が達成された後の目的として掲げた目的(2)は、本研究の期間内に完了できなかった。しかし、目的(1)を概ね達成できたため、目的(2)を達成することは、高い蓋然性で期待出来る状況に至った。本研究で作り上げた研究基盤を最大限活用することで、今後、目的(2)で掲げた当初の目的を超えて、多くのスケジュールでバーコードを導入・解析する実験を大規模に行うことができる。それによって、ブラックボックスである生殖細胞系譜の動態が定量的かつ詳細に解明されると期待される。

### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Tatsuro Ikeda, Thomas Hofer, Hans-Reimer Rodewald, 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

②吉田松生:精子を作る細胞たち:個のランダム性が集団を支える 大隅基礎科学創成財団 第  
二回創発セミナー 2018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：池田 達郎

ローマ字氏名：(IKEDA, Tatsuro)