

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06259

研究課題名(和文) 群体ホヤの有性化において生殖系列幹細胞の分化を調節する分子メカニズム

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of germline stem cells in colonial ascidian

研究代表者

砂長 毅 (Sunanaga, Takeshi)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・准教授

研究者番号：20448393

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)：本研究では、ミダレキクイタボヤの有性化に伴って発現量が上昇する遺伝子群の詳細な発現解析と機能解析を行い、生殖系列幹細胞の分化および生殖細胞の形成を制御する分子メカニズムを解析した。その結果、SSNA1遺伝子が生殖系列幹細胞の維持あるいは分化制御に重要な役割を担っていることが明らかになった。また、SSNA1, SoxB2, SoxF, FoxLが卵母細胞で発現し、卵形成における細胞成長に必要な可能性が示された。その他、生殖系列幹細胞で発現する遺伝子を1つ、生殖系列特異的な発現を示す8つの遺伝子を同定した。これらの遺伝学的解析の基盤となる網羅的トランスクリプトームデータベースを整備した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でトランスクリプトームデータベースを構築したことは、ユニークな生活史をもつミダレキクイタボヤに対する今後の分子遺伝学的研究の発展に大きく貢献する。SSNA1が幹細胞の維持や分化制御に関わる例はこれまでに報告がない。よって、幹細胞生物学の基礎研究における新たな知見となる興味深いデータである。卵形成に関わる4つの遺伝子が明らかになった。特に、SSNA1およびSoxB2が生殖系列で発現している点は動物における初の報告であり、卵母細胞の成長に関わっている点も明らかになった。これらの成果は、生殖細胞形成機構を理解するうえで重要な発見であると同時に、生殖医学に対する基盤的情報となり得るものである。

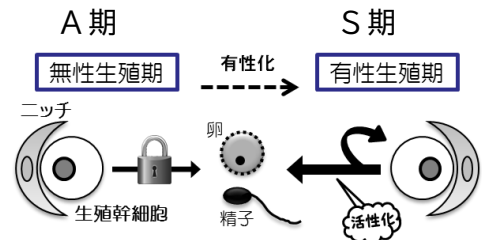
研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular mechanisms that control germline stem cell differentiation and germ cell formation by precise expression analysis and functional analysis of genes whose expression levels increase with the sexualization in the compound ascidian, *Botryllus primigenus*. It was clarified that the SSNA1 gene played an important role in the maintenance and/or differentiation control of germline stem cells. It was also shown that SSNA1, SoxB2, SoxF, and FoxL were expressed in oocytes and might be required for cell growth in oogenesis. Furthermore, *Bre1a* was identified as a gene expressed in germline stem cells, and eight genes showing germline-specific expression were identified. We obtained de novo transcriptomic data from this non-model organism and established informative database that contributes the progress of these genetic analyzes.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：Sox SSNA1 生殖系列幹細胞 配偶子形成 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

自然界では、環境に適応し、無性生殖と有性生殖を巧みに使い分けて子孫を生み出す動物種が多く存在する。無性生殖から有性生殖への転換(= 有性化)を実行する遺伝子レベルの仕組みは不明な点が多い。生殖系列幹細胞から生殖細胞を作り出す動物にとって、有性化は、「生殖系列幹細胞の増殖と分化を調節する遺伝子制御ネットワークが切替わる」ことを意味している。本研究では、生活史に有性化を含む群体ホヤ(ミダレクイタボヤ)を材料とし、有性化関連遺伝子ライブラリ(有性化に伴って発現量が上昇する遺伝子のリスト)を活用し、有性化の仕組みを遺伝子のはたらきとして理解することを目指した。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ミダレクイタボヤの有性化と連動し、生殖系列幹細胞(=GSC)の分化、生殖細胞(卵, 精子)の形成を制御する仕組みを明らかにすることである。具体的には、次の2つの項目に取り組んだ。

### (1) 有性化・S 期関連遺伝子群の発現解析

有性化関連遺伝子ライブラリに記載された遺伝子が、有性化過程およびS期の生体の、どの細胞でいつ発現しているかを明らかにする。また、発現解析をもとにGSCの挙動を解析し、GSCニッチの位置に関する手がかりを得る。

### (2) GSC/ニッチ関連遺伝子の *in vivo* 機能解析

GSCとニッチ細胞の候補で発現する遺伝子に対して、機能阻害法によって機能を解析する。さらに、機能解析の成果をもとに *in vitro* でのGSCの分化制御の再現を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 有性化・S 期関連遺伝子群の発現解析

- ① 解析対象の遺伝子に対してDIG標識プローブを合成し、*in situ* hybridizationでmRNAの発現パターンを決定する。
- ② GSCの候補で特異的に発現する遺伝子が見つかり次第、そのタンパク質に対する抗体を作製し、タンパク質の発現を解析する。

### (2) GSC/ニッチ関連遺伝子の *in vivo* 機能解析

- ① 有性生殖への転換期にあるミダレクイタボヤの間充織にsiRNAを顕微注入することで、解析対象の遺伝子の機能を阻害する(遺伝子ノックダウン)。siRNA注入後、飼育を続け、各種のマーカ分子の発現解析や組織化学的解析で表現型を詳細に観察する。
- ② 遺伝子間の関係性を明らかにするために、ノックダウン後の表現型解析として、GSCおよび生殖細胞形成に関係する遺伝子群の発現量変動をqRT-PCRで解析する。

## 4. 研究成果

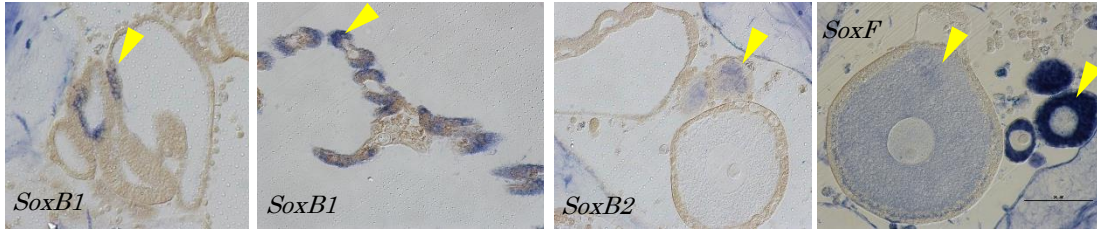
### (1) ミダレクイタボヤトランスクリプトームデータ整備

ミダレクイタボヤの転写産物の配列情報を網羅的に得るために、次世代シーケンサーを用いて、*de novo* トランスクリプトーム解析を実施した。転写産物の候補として310,765配列、タンパク質をコードすると予想される37,175配列を取得し、相同性検索を含む遺伝子アノテーションを付した。これらは、フランスのソルボンヌ大学との共同研究として実施し、データベースとして整備した(右図がデータベース画面の一部)。これにより、ミダレクイタボヤのほぼ全ての遺伝子について塩基配列が得られた。有性化関連遺伝子ライブラリに含まれる遺伝子の情報は、ほとんどが部分配列であるため、このデータベースを用いることで、正確な配列情報の取得が可能となった。さらに、ミダレクイタボヤを用いた今後の遺伝学的研究の基盤が構築できた。



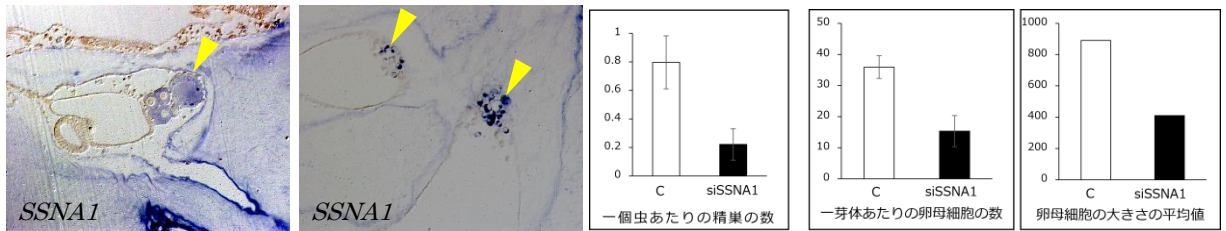
(2) Sox 遺伝子ファミリーの発現および機能解析

有性化関連遺伝子ライブラリから得た *SoxC*, *SoxD* に加えて, *SoxB1*, *SoxB2*, *SoxE*, *SoxF* の発現を調べると, *SoxB1* は芽体の鰓かごの上皮で特異的に発現していた。また, *SoxB2* と *SoxF* は卵母細胞で特異的に発現していることが分かった(写真, 矢尻で示す)。*SoxB2* が生殖腺で特異的に発現しているという報告はこれまでに例がなく, 新規性が高い。*SoxB1*, *SoxB2*, *SoxF* の役割を明らかにするために siRNA を用いた機能阻害実験を行った。その結果, *SoxB2* および *SoxF* の機能を阻害した場合, 卵母細胞の大きさがコントロールに比べて, 小さくなる傾向が見られた。このことは, *SoxB2* および *SoxF* が卵母細胞の成長過程に深く関与することを示唆している。特に, 動物において *SoxB2* が卵形成へ関与することを示すデータの報告は, 本研究が初めてである。

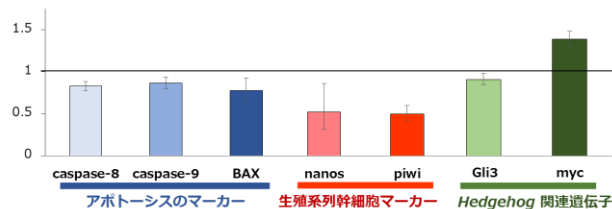


(3) Sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1 (*SSNA1*) の発現および機能解析

有性化関連遺伝子ライブラリから得た *SSNA1* の発現を調べると, 卵母細胞と一部の間充織細胞で特異的に発現していることが分かった(写真, 矢尻で示す)。*SSNA1* の機能を阻害すると, 精巢の形成異常, 卵母細胞の減少, 小型の卵母細胞の比率の上昇がみられた(下図, 黒色の棒グラフで示す)。



これらの表現型があらわれたメカニズムを明らかにするため, *SSNA1* の機能を阻害したサンプルにおけるアポトーシスと GSC のマーカー遺伝子, さらに, マウスにおいて *SSNA1* の関与が報告されているのヘッジホッグ経路に関連する遺伝子の発現を qRT-PCR で調べた(下のグラフで示す)。その結果, 精巢の形成異常, 卵母細胞の減少がアポトーシスによって引き起こされた可能性は低いことが分かった。他方, *SSNA1* の機能阻害により GSC のマーカーである *nanos* と *piwi* の発現が減少したことから, *SSNA1* が GSC の正常な維持, 分化調節に重要な役割を果たしている可能性が示された。これまでに *SSNA1* が GSC の制御や卵形成に関わっている報告はなく, 本研究により興味深いデータが得られた。今後 *nanos* や *piwi* の発現に *SSNA1* が関与するメカニズムの解明が課題となる。



(4) その他の有性化関連遺伝子群の発現解析

*In situ hybridization* による発現解析で, *Brela* が GSC で発現することが分かった。また, *Ribophorin II*, *GF22784*, *NT5C3*, *YB1/2/3*, *FoxL*, *Piwi-like*, 2 種類の *TGFb-like* が生殖前駆細胞および卵母細胞で発現することが明らかになった。これらの遺伝子については, siRNA を用いた遺伝子ノックダウンを行ったが, 明確な影響が観察されなかった。

(5) GSC で発現するタンパク質に対する抗体作製

本研究の発現解析では, GSC のみで特異的に発現する遺伝子の発見に至らなかったため, これまでに GSC での発現が明らかとなっている *piwi* 遺伝子にコードされる *piwi* タンパク質に対する抗血清を作製し, ウェスタンブロットティングによる定量解析に使用可能な抗血清を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北橋翼 砂長 毅
2. 発表標題 イタボヤ類の間充織細胞への遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Sunanaga
2. 発表標題 Role of Pumilio during Germ Cell Formation in Colonial Ascidian, Botryllus primigenus
3. 学会等名 10th International Tunicate Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷内 宥紀 砂長 毅
2. 発表標題 ミダレキクイタボヤにおける Sox遺伝子ファミリーの発現解析
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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	Villefranche-sur-mer Dev. Biol. Lab.			