

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06698

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ変異体を用いた精原細胞の成熟、減数分裂開始を制御する新規因子同定

研究課題名（英文）Identification of novel factors to regulate maturation and meiosis initiation of spermatogonia using zebrafish spermatogenesis mutants

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・特命助教

研究者番号：30770630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：精子形成では、精原細胞の増殖に伴う成熟と減数分裂のスタートは密接に関係する。これらの過程を制御する機構の解明のための分子基盤を確立するため、精子幹細胞が分化できないゼブラフィッシュmoto変異体、未分化型精原細胞が減数分裂を開始してしまうPM-035変異体を用いて、未分化型精原細胞特異的にGFPタグを付加したRpl10a発現させ、GFP抗体を用いたRNA-免疫沈降シーケンス解析(TRAP-seq)によってトランスレトーム解析を行い、それぞれの過程に特徴的なタンパク質群およびパスウェイを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖幹細胞の自己複製・分化制御機構や減数分裂の開始機構の解析は、マウスやショウジョウバエで精力的に行われ理解が進んできたが未だ解明に至ったとは言えない状況にある。本研究でトランスレトーム解析に用いたmotoおよびPM-035変異体は先行する動物種においてもユニークな表現型を持つため、本研究からのフィードバックも期待される。またこれら学術的意義以外にも、魚類における生殖原細胞の解析はあまり進んでいないため、本研究におけるゼブラフィッシュ精原細胞における分子基盤の確立は資源枯渇が問題になっている日本の水産研究にも資するものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In spermatogenesis, the maturation of spermatogonia associated with proliferation and the initiation of meiosis are closely related. In order to establish a molecular basis for elucidating the mechanisms that control these processes, I performed transcriptome analysis based on the moto and PM-035 mutant zebrafish having defect in the spermatogonial stem cell differentiation and in the inhibition of meiotic entry in the undifferentiated spermatogonia, respectively. To remove information of somatic cells, translating mRNA were used for RNA-seq analysis by using the RNA immunoprecipitated with GFP tagged Rpl10a expressed in the undifferentiated spermatogonia (TRAP-seq). The characteristic proteins and pathways were identified on self-renewal and differentiation of spermatogonial stem cells and meiosis.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖幹細胞 自己複製 減数分裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子形成では、精原細胞が一定回数の体細胞分裂による増殖をしながら成熟し、減数分裂を開始する。この精原細胞の増殖に伴う成熟と減数分裂の開始は密接に関係する事が明らかである。脊椎動物では最も研究が進んでいるマウスにおいても、精原細胞の成熟を制御する因子はマウスにおいても知見が少なく、*Sohlh2* が精原細胞の成熟を制御する因子として見出されているが¹、この遺伝子はゼブラフィッシュに保存されていない。減数分裂の開始制御因子については、マウス B6 系統におけるレチノイン酸-*Stra8* の経路が減数分裂の開始スイッチとして 20 年近く解析が進んでいるが²、このような機構は哺乳類以外の動物では未だ報告がなされず、その他の動物には保存されていないと推察される。基礎生物学として動物における生殖細胞制御機構を理解する意味では、哺乳類以外での解析が望まれる状況にあった。

ゼブラフィッシュでは、精原幹細胞が分化せず自己複製ばかり繰り返す *moto* 変異体、未分化型精原細胞が減数分裂を開始してしまい、やがて精原幹細胞の枯渇を引き起こしてしまう珍しい表現型を持つ *PM-035* 変異体が単離されている。従って、これらの変異体における未分化型精原細胞と野生型の未分化型精原細胞における網羅的な遺伝子発現情報を比較することにより、精原細胞の成熟と減数分裂開始を制御する新規因子を発見するとともに、哺乳類以外の脊椎動物における理解が深まる事が期待された。

2. 研究の目的

網羅的な遺伝子発現情報を比較するためには RNA-seq 解析が最も手軽で一般的な手法である。しかしながら、オミックス解析が先行しているがん研究においては、RNA とタンパク質の発現レベルの間に相関が見られるタンパク質は少なく、現象の理解には RNA-seq だけでは不十分であることが分かっている³。それに加え、生殖細胞には生殖顆粒と呼ばれる細胞小器官が存在し、その構成因子の働きとして遺伝子の転写後調節に関わるものが多く知られており、RNA の発現レベルからタンパク質の発現レベルを推測することはより困難であると考えられる。そこで本研究では精原細胞の成熟と減数分裂を制御する分子基盤を整えることを目的とし、リボソームと結合して翻訳中の mRNA を免疫沈降してシーケンシングするトランスレイトーム解析を行った。

3. 研究の方法

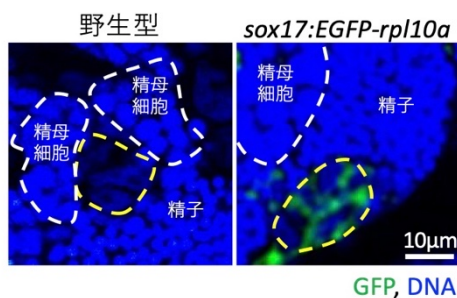
(1) *sox17:EGFP-rpl10a* トランスジェニック系統の樹立

精巣は様々な体細胞および生殖細胞で構成されているため、精巣をそのままトランスレイトーム解析に用いると未分化型精原細胞と関係ない RNA が大量に混入してしまう。そこで野生型ゼブラフィッシュを用いて、未分化型精原細胞特異的に発現する *sox17* プロモーターで GFP を付加した *rpl10a*⁴ を発現するトランスジェニック系統を樹立した。これにより未分化型精原細胞特異的に発現する Rpl10a を取り込んだリボソームを GFP 抗体をコートしたビーズで免疫沈降することにより、翻訳中の mRNA をシーケンスする TRAP-seq 解析(Translating Ribosome Affinity Purification sequence)を行った。

(2) *moto*^{-/-}; *sox17:EGFP-rpl10a*、*PM-035*^{-/-}; *sox17:EGFP-rpl10a* 系統の樹立と TRAP-seq 解析
moto^{+/-}、*PM-035*^{+/-} の個体と野生型 *sox17:EGFP-rpl10a* トランスジェニック個体を掛け合わせた後、さらに次世代を得ることによって、*moto*^{-/-}; *sox17:EGFP-rpl10a*、*PM-035*^{-/-}; *sox17:EGFP-rpl10a* 系統のオスを得た。Jin らの手法⁵に従って、精巣を用いた免疫沈降を行って TRAP-seq 解析を行った。また、TRAP-seq の結果で効率よく翻訳中の mRNA を捉えているか確認するため、各系統の精巣から total RNA を抽出して通常の RNA-seq も行った。

4. 研究成果

(1) *sox17:EGFP-rpl10a* トランスジェニック系統精巣における発現確認



精巣において未分化型精原細胞特異的に機能することが分かっている *sox17* 遺伝子の 5kb⁶ をプロモーターとし、GFP-*rpl10a* を繋げたトランスジェニックを Tol2 転移システムを用いて野生型ゼブラフィッシュに導入して *sox17:EGFP-rpl10a* トランスジェニック系統を作製した。未分化型精原細胞における発現を確認するため、GFP 抗体を用いた精巣の免疫染色を行ったところ、未分化型精原細胞特異的に GFP シグナルが検出された (図 1)。

図 1 *sox17:EGFP-rpl10a* 精巣の免疫染色

黄色点線は未分化型精原細胞の細胞集団を示す。野生型では GFP シグナルは自検出されない。

(2) *moto*^{-/-};*sox17:EGFP-rpl10a*, *PM-035*^{-/-};*sox17:EGFP-rpl10a* 精巢を用いた TRAP-seq の検討
未分化型精原細胞特異的な EGFP-Rpl10a の発現が確認できたため、*sox17:EGFP-rpl10a*、*moto*^{-/-};*sox17:EGFP-rpl10a*, *PM-035*^{-/-};*sox17:EGFP-rpl10a* 精巢を用いて、RNA-seq、および TRAP-seq を行った。まず、得られたリードをゼブラフィッシュゲノム (GRCz11) にマッピングし、各遺伝子のリードカウントを用いて主成分解析を行ったところ、同じジェノタイプであっても TRAP-seq の結果は RNA-seq の結果から大きく離れており、大きく異なる発現プロファイルを持つことが分かった (図 2 A)。この結果から、TRAP-seq においてリボソーム結合 mRNA を効率よく免疫沈降できていることが示唆された。DESeq2 を用いて *moto* 変異体および *PM-035* 変異体の未分化型精原細胞における発現変動遺伝子 (DEG) を抽出したところ、TRAP-seq では RNA-seq より少ない数の変動遺伝子が検出された (図 2 B)。この結果からも TRAP-seq によって未分化型精原細胞で翻訳されている mRNA を抽出できていることが示唆された。

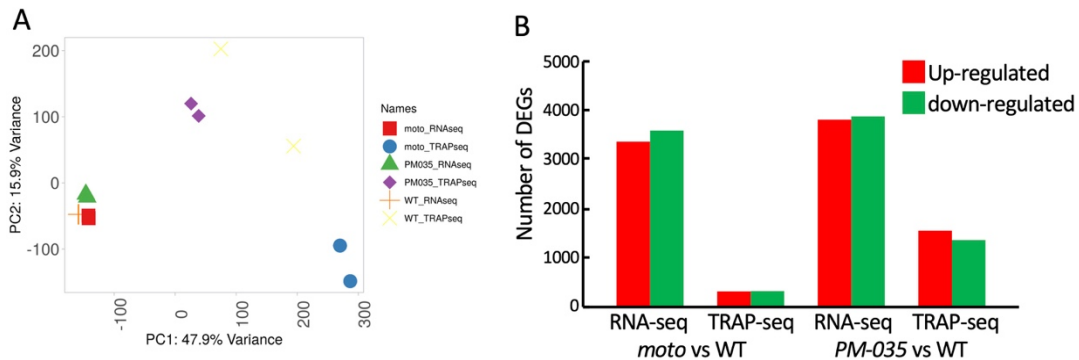
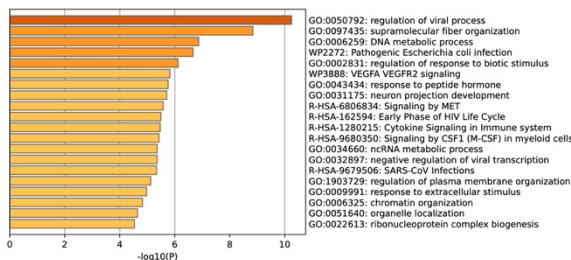


図 2 RNA-seq、TRAP-seq の主成分解析による比較(A)と発現変動遺伝子(DEG)の比較(B)

(3) *moto* 変異体の TRAP-seq 解析による精原幹細胞自己複製・分化制御因子について

A 発現上昇遺伝子(317 genes)



B 発現低下遺伝子(324 genes)

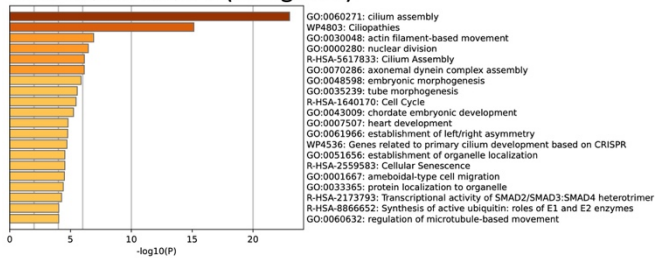


図 3 *moto* 変異体 TRAP-seq における発現上昇遺伝子 (A)および発現低下遺伝子(B)のエンリッチメント解析の Top20

スウェイが検出された (図 3 A)。マウスでは GDNF が自己複製を強力に促進することが分かっているが、魚類ではその様な因子は未だ見つからない状況にある。これらのスウェイのレセプターの変異体作製や精巢器官培養系へのリガンドの添加による解析を進めることにより、魚類精原幹細胞の制御機構が明らかにされることが期待される。

moto 変異体における発現低下遺伝子群は精原細胞の分化に働いている可能性が考えられる。発現低下遺伝子群によるエンリッチメント解析では、cilium 関連のものが多く見られた (図 3 B)。近年 cilium が減数分裂期の組換えに重要であることが報告されており⁷、減数分裂関連の GO も下位に見られるため、*moto* 変異体では減数分裂が全く起きないことが反映されているも

RNA-seq 解析による *moto* 変異体における発現変動遺伝子群を用いて Metascape によるエンリッチメント解析を行ったところ、6000 以上もの GO、パスウェイが検出された。極めて多数であることと共に、発現上昇遺伝子群によるパスウェイと低下遺伝子群によるパスウェイで重複するものも多く見られ、RNA-seq では未分化型精原細胞の制御機構を把握することが難しいことが示唆された。一方、TRAP-seq では発現上昇遺伝子群によって 518、発現低下遺伝子群によって 374 と劇的に少ない数の GO、パスウェイが検出され、重複もほとんど見られなかった。このことから、精原幹細胞の自己複製・分化を制御する分子基盤として、*moto* 変異体 TRAP-seq 解析が有効であると考えられた。

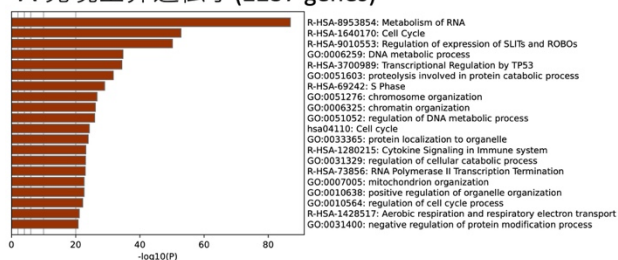
moto 変異体では精原幹細胞が分化せず自己複製を繰り返すため、発現上昇遺伝子群でエンリッチされるパスウェイは精原幹細胞の自己複製に働いている可能性が高いが、増殖因子等のレセプターによるシグナルパ

のと予想される。また Shh 等の増殖因子のシグナルパスウェイも検出され、これらが精原細胞の分化誘導に働く可能性が示唆された。本項目で同定されたパスウェイはそこまで多くはなく、今後時間をかけて各パスウェイの阻害実験などを行なっていくことにより、魚類精原幹細胞の自己複製・分化制御機構の解明に繋がることが期待される。

(4) *PM-035* 変異体の TRAP-seq 解析による減数分裂開始制御因子について

RNA-seq 解析による *PM-035* 変異体における発現変動遺伝子群を用いて Metascape によるエンリッチメント解析を行ったところ、7000 以上もの GO、パスウェイが検出された。TRAP-seq 解析では、発現上昇遺伝子群によって 2808、低下遺伝子群によって 1980、合計 4788 の GO、パスウェイが検出され、残念ながら *moto* 変異体で見られた様な劇的なスリム化は見られなかった。野生型の精母細胞では EGFP-Rpl10a が発現しないのに対して *PM-035* 変異体では減数分裂期に入った後の精母細胞様の細胞が含まれるため、その分多くの発現変動遺伝子が検出されたことによると考えられる。

A 発現上昇遺伝子(2237 genes)



B 発現低下遺伝子(2479 genes)

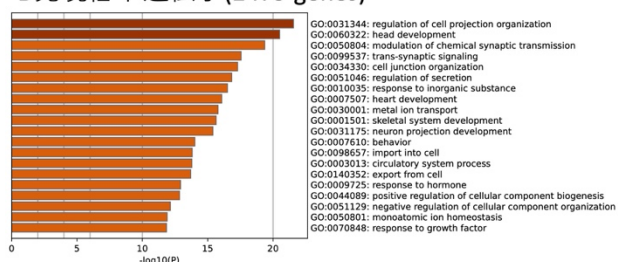


図 4 *PM-035* 変異体 TRAP-seq における発現上昇遺伝子 (A) および発現低下遺伝子 (B) のエンリッチメント解析の Top20

未分化型精原細胞が減数分裂を開始してしまう *PM-035* 変異体の TRAP-seq 解析では、発現上昇遺伝子群に減数分裂の開始を制御する因子が期待されるが、Cell cycle 関連（下に減数分裂の term を含む）や RNA の代謝関連など、減数分裂期の細胞を含む *PM-035* 変異体らしい GO、パスウェイが多く検出された（図 4 A）。Wnt signaling など様々なシグナルパスウェイも検出され（下位のため図 4 には示されない）、これらが減数分裂開始の制御に関与している可能性が予想された。しかし、本項目で同定されたパスウェイが多すぎるため、減数分裂開始因子の同定に至るためにはもっと発現変動遺伝子 (DEG) を絞り込むことが重要である。そのために今後、*syncpl* プロモーターを用いて減数分裂を開始後に EGFP-Rpl10a を発現させ、減数分裂開始後のトランスレイトームを取得して DEG を抽出し、本課題で得られた *PM-035* 変異体の DEG からこれらを省くことによって減数分裂開始時のトランスレイトームの特徴をより正確に把握する必要があることが示唆された。

<引用文献>

1. Hao et al., Stem cells 26, 1587-1597 (2008). doi: 10.1634/stemcells.2007-0502.
2. Ishiguro and Shimada. Genes Genet. Syst. 97, 27-39 (2022). doi: 10.1266/ggs.21-00054.
3. Zhang et al., Nature 513, 382-387 (2014). doi: 10.1038/nature13438.
4. Tryon et al., Genesis 51, 187-192 (2013). doi: 10.1002/dvg.22363.
5. Jin et al., Nat. Chem. Biol. 14, 844-852 (2018). doi:10.1038/s41589-018-0098-0.
6. Mizoguchi et al., Development 135, 2521-2529 (2008). doi: 10.1242/dev.020107.
7. Mytlis et al., Science 376, eabh3104 (2022). doi: 10.1126/science.abh3104.

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 0件）

1. 発表者名 河崎敏広、酒井則良
2. 発表標題 生殖顆粒因子による精原幹細胞の運命決定・分化制御機構
3. 学会等名 動物学会第93回年会 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河崎敏広
2. 発表標題 魚類における新規減数分裂開始制御因子の同定
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河崎敏広、酒井則良
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ生殖顆粒因子 Meioc によるリボソーム・翻訳活性の亢進と精原細胞分化における重要性
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
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
---------	---------