

マウス生殖細胞で機能する転写因子および細胞表面レセプターの系統的解析 (2000年度)
 マウス生殖細胞で機能する転写制御システムの系統的解析 (2001年度)
 マウス精子形成幹細胞で機能する遺伝子群の系統的探索 (2002年度)

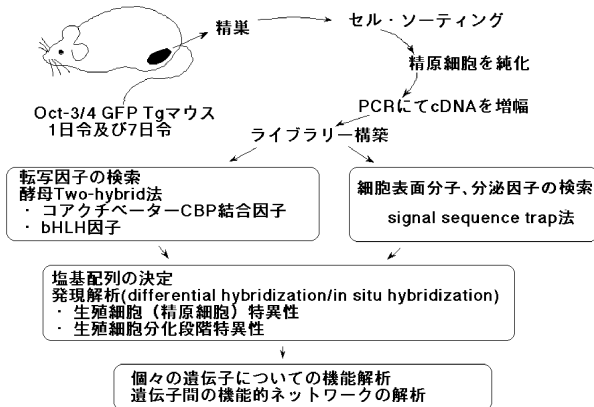
●吉田松生

京都大学大学院医学研究科

〈研究の目的と進め方〉

ほ乳類の精子形成は恒常的に起こり、これは幹細胞によって支えられている。研究開始当時、精子形成幹細胞を含む「未分化型精原細胞」は精巣内で極めて少数である上に、特異的に発現、機能する遺伝子が知られておらず、その実体は謎に包まれていた。そこで、マウスを用いて、未分化型精原細胞の系統的な発現遺伝子解析により、特異的に発現してその性質を規定している遺伝子を同定すること、遺伝子発現のパターンの総体から精子形成幹細胞を俯瞰的に理解することを目的として本研究を開始した。

そのために、生殖細胞特異的にGFPを発現するOct3/4-EGFPマウスの幼弱精巣より、未分化型精原細胞を含む精原細胞をセルソーターにより分画し、mRNAを精製、DNA array法による網羅的発現解析と、転写制御因子および細胞表面シグナル分子という機能的に絞った遺伝子発現解析を計画した (図参照)。それにより、当時形態的観察の他にはほとんど明らかとなっていなかった未分化型精原細胞に、遺伝子発現の観点から光を当てる事が期待された。



〈研究開始時の研究計画〉

1. 精原細胞の精製とmRNA試料の作製。

生殖細胞特異的に発現するOct-3/4の制御領域下にGFPを発現するOCT4/EGFPトランスジェニックマウスの精巣より、セルソーターによりGFP陽性細胞を分画する。この画分は、未分化型精原細胞のみならず、分化型精原細胞をも含む集団だが、当時得られる、もっとも純度の高い分画であった。この細胞の幹細胞機能を検証するとともに、これより調製したpolyA RNAを本研究のstarting materialとする。

2. DNA array法による特異的遺伝子の検索

上記RNAより作製したcDNA probeと、分化型精原細胞 (c-Kit陽性にて精製可能) 由来のprobeを用いてDNA arrayに対してhybridizationを行う。遺伝子発現パターンの特異性を検討するとともに、未分化型精原細胞特異的遺伝子の候補を得る。

3. 酵母two-hybrid法による転写制御因子の検索

上記RNAよりrandom primingによりcDNAライブラリーを構築、酵母two-hybrid法により、転写制御因子を系統的に検索した。baitとしては、①広く転写活性化因子のco-activatorとして機能するCBP,および、②class B bHLH型転写制御因子が共通して2量体を形成するパートナーであるE12、を計画した。①は広く転写制御因子全般を網羅し、②でターゲットとしたbHLH型転写制御因子は、多くの細胞種に細胞種および分化段階特異的に発現し、細胞運命の決定や分化制御に広く重要な役割を果たすものである。

4. signal sequence trap法による細胞表面分子の検索

同じく上述のmRNAより、signal sequence trap用にライブラリーを構築し、細胞表面分子および分泌分子を検索する。

5. in situ hybridization法による得られた遺伝子の発現検討

以上の検索により得られた候補遺伝子の発現を、in situ hybridization法により詳細に検討し、精原細胞、特に未分化型精原細胞特異的な発現を示すものを同定する。

6. 同定された個々の遺伝子を用いた精子形成幹細胞の解析

得られた遺伝子個々に注目した解析を行い、謎に包まれた未分化型精原細胞ないし精子形成幹細胞の性質を明らかにする。

〈研究期間の成果〉

1. 精原細胞の精製とmRNA試料の作製。

Oct4/EGFPマウス 1日令および7日令の精巣から単一細胞浮遊液を作製、セルソーターにより、GFP陽性細胞を純化した。この細胞の機能を、表面抗原c-kitとの関連で検討し、c-Kit陰性分画に、移植によって確認される強い幹細胞活性があることを見出した (論文2)。この画分よりmRNAを調製し、既知遺伝子の発現により純度を検定し、starting materialとした。

2. DNA array法による未分化型精原細胞特異的遺伝子の検索

当初の計画に従ってDNA macroarrayに対するハイブリダイゼーションスクリーニングを行った。しかし、解析に足りるだけの信頼できる結果を得られなかった。startingのRNA量が微少で、増幅が必要となったが、当時十分な増幅技術が確立していなかったためと考えられる。そこで、戦略を変えてsubtraction hybridization法を行った。得られたクローン約200クローンをドットプロット、in situ hybridizationにより、その発現を検討した。精巣において様々な分化段階に特徴あるパターンが発現を示す遺伝子が多く同定されたが、目的とする未分化型精原細胞特異的遺伝子を同定するには至らなかった。

3. 酵母two-hybrid法による転写制御因子の検索

当初の実験計画に乗っ取りライブラリーを作製し、two-hybrid法による検索を行った。これにより、目的とする、未分化型精原細胞特異的に発現する遺伝子を複数得ることが出来た。

①CBPをbaitとしたtwo-hybrid screening.

一次スクリーニングに続いて数十の遺伝子をin situ hybridizationによる解析に供した。いくつかの転写制御因子が同定された。そのなかで、Zinc finger型転写制御因子Plzfが未分化型精原細胞特異的であることを見出した。しかし、残念な事に、欧米の他のグループが我々に先んじて、この遺伝子が未分化型精原細胞で発現し、かつ、その維持に必要であることを報告した。しかし、我々が重点を置いて解析してきたngn3（後述）との機能の連関の面から解析を続けている（未発表）。

また、当初目的とした転写因子ではないが、未分化型精原細胞の更にごく一部で発現する細胞表面分子がこのスクリーニングにより得られた。現在に至るまで、その興味深い発現を利用して、精子形成幹細胞システムの解析を進行している（未発表）。

②E12をbaitとしたtwo-hybrid screening.

細胞種特異的、分化段階特異的に発現し、その分化を制御している例が数多く知られているclassB bHLH型転写制御因子を標的としたスクリーニングである。6種のbHLH因子が得られ、そのうちの2個はin situ hybridizationの結果、精原細胞の一部に発現があることが分かった。その他、他の細胞種において特徴的な発現を示す新規遺伝子が得られ、その解析も行った。

目的通りの未分化型精原細胞に特異的に発現していたために最も注目して解析を進めてきたのがngn3 (neurogenin3)である。in situ hybridizationに加えて、ngn3遺伝子の発現制御領域をクローニングし、その制御下にGFPを発現させることによって未分化型精原細胞を可視化する事に初めて成功した。また、同様にCreリコンビナーゼを発現させ、適切なレポーターとの2重トランスジェニックマウスを作製することによってngn3発現細胞の運命を追跡し、それが成熟精子まで分化し、受精に寄与する事を明らかにした。未分化型精原細胞特異的遺伝子として初めての例であり、当然その可視化に初めて成功したことになる。この成果は論文（1）として報

告した。この成果はその後現在に至るまで研究を進めている、成体マウスの精巣内での未分化型精原細胞のリアルタイムの観察や、生後精巣での幹細胞の成立過程を明らかにする研究の礎となっている。

また、このスクリーニングで得られた別のbHLH因子が、ngn3を発現する未分化型精原細胞のすぐ次の分化段階である分化型精原細胞に発現していることが分かった。現在その機能を、特にngn3との関連に注目して解析している。

その他、我々がSgn1と名付けた新規bHLH型転写因子が同定された。精巣に低レベルの発現が認められたがin situ hybridizationで発現細胞を同定することは出来なかった。しかし、この遺伝子は唾液腺の導管の細胞に強い発現を示した。発現のパターンから、全く知られていなかった唾液腺の発生や分化に寄与する因子であることが強く示唆された。転写制御因子としての基礎的な機能解析と共に論文（3）として報告した。

更に、このtwo-hybrid screeningと並行して、当時爆発的に情報が蓄積してきていたESTデータベースの解析により、全く新規のclass B bHLH型転写因子群を同定した。他のグループが先行してolig familyとして報告するのを許してしましたが、我々のグループも、この中の一つOlig 2がやはりbHLH因子のneurogenin2と共同して運動神経細胞の分化を司る事を共同研究により明らかにした（論文4）。その後もこの因子群の研究は共同研究者により進められている。

4. signal sequence trap法による細胞表面分子の検索

two-hybrid解析を行ったのと同じcDNAより、Signal Sequence Trap法により細胞表面タンパク質や分泌タンパク質の検索を行った。367クローンを単離し、塩基配列の決定により46の既知及び未知の分子を同定した。2000年度の研究協力者大保和之博士（現慶応大学）によって担当され、詳細な発現解析、遺伝子破壊による機能解析が、現在に至るまで続けられて、興味深い機能が明らかとなってきている（未発表）。

5. in situ hybridization法による得られた遺伝子の発現検討

6. 同定された個々の遺伝子を用いた精子形成幹細胞の解析

両項目についての結果は、すでに前項までに、個々の成果と共に記載した。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究で精原細胞に発現する種々のクラスの遺伝子を系統的に検索した結果、それまで知られていなかった未分化型精原細胞特異的遺伝子を複数同定することが出来た。

特にngn3を用いた研究からの知見は、未分化型精原細胞が担う精子形成幹細胞機能を明らかにする上で重要なものであり、国内外の生殖細胞、哺乳類精子形成研究者より高い評価を受けている。現在に至るまで研究は継続、発展している。また、ngn3発現未分化型精原細胞をGFP

あるいはCreリコンビナーゼを発現させたトランスジェニックマウスは、この細胞群を可視化したり、この細胞特異的な遺伝子改変を可能にする上で世界的にほぼ唯一の優れたシステムであり、内外の多くの研究者と共同研究を行っている。

ngn3の他にも、未分化型精原細胞特異的遺伝子はいくつか得られた。また、分化型精原細胞など他の分化段階の精子形成細胞特異的な遺伝子を同定し、現在解析を継続している。

一方副産物的に、精子形成細胞以外の細胞種に特異性を示す遺伝子、特にbHLH型の転写因子を数多く同定するに至った。唾液腺でのSgn1, オリゴデンドロサイトその他の神経系でのOligファミリーについての研究成果は、それぞれの分野で重要な知見となった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

未分化型精原細胞に特異的に発現する遺伝子で、重要な役割を果たしていると考えられるものをいくつか同定する事が出来た一方で、真にゲノム生物学的なゴールである、「遺伝子発現を網羅的に解析し、数多くの遺伝子の発現パターンから俯瞰的に未分化型精原細胞あるいは精子形成幹細胞の特性を理解する」には至らなかったのは残念である。もっとも、このような細胞特性の理解はここ1, 2年でようやくある程度満足の行くかどうかのレベルに達しつつあるもので、本研究が行われた時期の技術到達度あるいは情報蓄積の水準からは止むを得なかった側面もある。中でも、ごく少数の細胞から信頼出来る水準でDNA arrayを行う事が技術的に困難であった。この類の技術はまさに日進月歩で発展してきたが、本研究の後半では、すでに得られた少数の遺伝子に注目した解析にフェーズを移しており、改めて網羅的な解析を行うことが出来なかった。

〈今後の課題〉

現時点では、すでに同定している遺伝子を用いた解析を個々に進め、未分化型精原細胞ないし精子形成幹細胞の増殖と分化についての生物学的な知見を蓄積することが、最もサイエンスに貢献することであると考えられる。

しかし、今日、研究が進んできた結果、未分化型精原細胞が更にいくつかのサブ細胞集団に分けられて、それぞれの性質を明らかにすることが、幹細胞システムの理解に必須であることを強く感じている。そこで、最新の技術と知識を生かして、再び網羅的な遺伝子発現解析を行うことにより、精子形成幹細胞特性の包括的理解を進める必要があると考える。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

1.0602091918

S. Yoshida, A. Takakura, K. Ohbo, K. Abe, J. Wakabayashi, M. Yamamoto, T. Suda, and Y-i. Nabeshima: neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis.

Dev. Biol. 269, 447-458 (2004)

2. 0306041118

K. Ohbo, S. Yoshida, M. Ohmura, O. Ohneda, M. Ogawa, H. Tsuchiya, T. Kuwana, J. Kehler, K. Abe, HR. Schöler and T. Suda: Identification and characterization of stem cells in pre-pubertal spermatogenesis in mice.

Dev. Biol. 258, 209-225 (2003)

3. 0202191034

S. Yoshida, K. Ohbo, A. Takakura, H. Takebayashi, T. Okada, K. Abe and Y-i Nabeshima: Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice

Dev. Biol. 240, 517-530 (2001)

4. 0202191023

R. Mizuguchi, M. Sugimori, H. Takebayashi, H. Kosako, M. Nagao, S. Yoshida, Y-i. Nabeshima, K. Shimamura and M. Nakafuku: Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. Neuron 31, 757-771 (2001)