Li, Nagata et al., 2024

Discussion

メダカ精巣において scRNA-seq 解析を実施し、A型、B型精原細胞、分化型精原細胞、減数分裂中の精母細胞、精細胞・精子、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞のクラスターを特定した。精子形成が連続的であることを反映して、生殖細胞のクラスターは精子形成の段階に応じて連続して配置された。Hd-rRの精巣では、唯一A型精原細胞のクラスターが不連続であった（図1）が、ガンマ線を照射したHd-rR オスの精巣、tp53欠損オスの精巣ではA型精原細胞のクラスターもB型精原細胞のクラスターと連続していた。実験室環境ではメダカは通年産卵する（Furutani-Seike 2004; Kinoshita et al., 2009）。本研究で得られた scRNA-seq データには十分な数のB型精原細胞が含まれていたので、B型精原細胞は３つのクラスターにクラスタリングされ、細胞周期マーカーの発現をもとにそれらが S期、G2/M 期、G1 期にあるB型精原細胞と特定できた。脊椎動物のB型精原細胞は減数分裂に進む前にさかんに体細胞分裂を行って増殖しその数を大きく増大させるが、本研究ではその様子を可視化することができた（図1）。

tp53遺伝子を欠損したメダカでは、ガンマ線を照射すると精巣に卵様細胞（精巣卵）が誘導される（Yasuda et al., 2012; Nagata 2019; Nagata et al., 2022）。放射線による精巣卵誘導の分子機構を解明することを目標として、本研究が実施された。まず、ガンマ線を照射していないtp53欠損メダカにおいてscRNA-seq 解析を実施し、tp53遺伝子欠損によって精子形成が明瞭な影響を受けないことを確認した（図S1, S2）。次に、ガンマ線を照射したtp53遺伝子欠損メダカの精巣においてscRNA-seq を実施したところ、やはり精子形成へのガンマ線照射による明瞭な影響がないことが示された（図S4, S5）。これらの結果は、すでに示されている組織学的な解析結果と合致する（Yasuda et al., 2012; Nagata 2019）。なお、p53 関連の遺伝子群の発現について、tp53遺伝子の欠損、およびガンマ線照射による明瞭な影響は見られなかった（data not shown）。tp53のもっとも有力な下流分子である p21 (cdkna1)の発現はHd-rR、tp53欠損メダカともに精巣細胞においてほとんど認められなかった（data not shown）。

一方、tp53遺伝子が機能するHd-rR 系統メダカの精巣では、ガンマ線照射により精子形成が大きく変化した。すなわち、B型精原細胞の体細胞分裂が停止した。さらに、S期にあるB型精原細胞から減数分裂期のクラスターと連絡する新規なクラスターが誘導された。それらのクラスターの細胞では減数分裂期のマーカー遺伝子（Sycp1、Scp3、dmc1、hsp90aa1.2、rec8b）（ref）および精細胞・精子期のマーカー遺伝子（plcz1、spatcl1）（ref）が発現していた（図３，S8）。B型精原細胞が細胞増殖を止めてイレギュラーに減数分裂に進み、精子完成が促進されてた（図3）一方、減数分裂の進行と精子完成（spermiogenesis）にはガンマ線照射による明瞭な影響は認められなかった。メダカの精子形成では、 B型精原細胞の体細胞分裂のみがp53 による制御下にあるものと考えられる。放射線によるメダカ精子形成の促進は組織学的にも報告されており（Kuwahara et al., 2003）、本研究のscRNA-seq によりその結果が確認された。

tp53欠損メダカ精巣における放射線による精巣卵誘導の分子機構を解明することが本研究の目標である。そこで、精巣卵のクラスターを探索したところ、卵において特異的に発現する遺伝子群（nanos3、nanog、mos、nobox、h1f8 (H1foo) （ref）を発現する細胞がA型精原細胞クラスター内に見出された（図2, S6）。ガンマ線を照射したtp53欠損メダカ精巣だけでなく、ガンマ線を照射していない Hd-rR 系統メダカ精巣のA型精原細胞のクラスターにも、それら卵特異的遺伝子を発現する細胞を多数認めた（図2, S7）。さらに、sox19bを発現する細胞がA型精原細胞クラスターに見出された（図2）。sox19b は魚類に特異的に存在する sox familyであり、特に卵形成に寄与することが報告されている（ref）。これらの結果は、メダカの精巣ではガンマ線の照射の有無に関係なく生殖幹細胞から卵原細胞様に分化を始めている細胞が恒常的に存在しており、それらとA型精原細胞とは同じクラスターにクラスタリングされるくらいに類似していることを強く示唆している。これらの卵原細胞様細胞は、分化のごく初期にtp53依存的アポトーシスによって排除されているが、tp53 欠損メダカ精巣ではアポトーシスが起きないために卵原細胞として分化成長を続けて、卵様細胞（精巣卵）として組織学的に認められたものと考えることが、極めて自然である。哺乳類に比較して魚類は非常に高い性的可塑性を有している（ref）。特にメダカの性的可塑性は高く、性ホルモン処理によって容易に性転換させることから、古くより性分化機構の研究や環境ホルモン影響の研究に供されてきた（ref）。このメダカの高い性的可塑性を可能にしている要因の一つが、今回見出した精原細胞の両性性であると考えられる。

では、A型精原細胞がB型精原細胞に「分化」する＝雄性化を強める機構はどうなっているのであろうか？それぞれマウスとニワトリにおいて精原細胞の分化を促進すると報告されている mybl2bと ccnf の発現はS 期のB型精原細胞に特異的であった（ref）。さらに、A型精原細胞クラスターとB型精原細胞クラスターの間でDEG 解析を行った結果、A型精原細胞クラスターはMHC class II 分子（Orla-DCA、cd74a）（ref）を特異的に発現していた。一方、MHC class I （orla-b2m orla-uaa）は精子を含む全ての雄性生殖細胞が発現した（図４）。cd74のリガンドであるMIF（macrophage migration inhibitory factor）（ref）がA型精原細胞を含むすべての雄性生殖細胞において発現していた上、セルトリ細胞（クラスター 6）とライディッヒ細胞（クラスター 10）がMIF の受容体である cd74a を発現し、セルトリ細胞（クラスター 6）のみがcd74 のシグナル伝達経路の下流に位置することが報告されているcd44 (ENSORLG00000029763)を発現していた（ref）。公開されているマウス精巣のscRNA-seq データを解析したところ、やはり全精子形成細胞が MIF を発現していることを確認した。

免疫反応においてMHC class I 分子が提示する抗原ペプチドを生成する免疫プロテオソーム（ref）であるpsmb8はA型精原細胞にのみ発現していた。A型精原細胞のみにおいて免疫プロテオソームが発現していることの生理的意義は不明であるが、逆に免疫プロテオソームの発現を失うことがB型精原細胞への分化において重要である可能性も考えられる。精子形成のごく初期にセルトリ細胞が精原細胞を取り込み、精子形成はセルトリ細胞の中でその保護を受けながら全てのプロセスが進行し、最終的に輸精管に排精される。その間、精子形成細胞がリンパ液などのセルトリ細胞以外の細胞と相互作用することはない（ref）。その意味では、セルトリ細胞に取り込まれた後の精子形成細胞が免疫プロテオソームを発現する意義はないと考えることができる。一方、減数分裂期以降のpsmb5の特異的発現は、psmb5を構成要素とするプロテオソームが減数分裂後の精子完成において精細胞の形態変化に関与していることを示唆する（ref）。セルトリ細胞が精原細胞をとりこむプロセスにMIF が関与している可能性を示唆する報告がある（ref）ことと、雄性生殖細胞における免疫関連遺伝子群の特徴的な発現制御は、MIFをはじめとする免疫関連遺伝子群が雄性生殖細胞と精子形成をサポートする体細胞との相互作用に重要な機能を果たしている可能性を示唆しており、scRNA-seq データのさらなる精査によってこの問題についても詳細に解明ができるものと期待される。

また、A型精原細胞クラスターとB型精原細胞クラスターの間でのDEG 解析により、両クラスター間で発現が大きく変化するヒストン遺伝子が複数見つかり、A型精原細胞からＢ型精原細胞への分化においてエピジェネティックな制御があることが強く示唆された（ref）。そこで関連する遺伝子群を網羅的に解析し、dnmt1とkmt5aがＢ型精原細胞において特異的に発現している一方、dnmt3とhgmn3がA型精原細胞のみで発現していることを見出した（図５）。また、ncPRC1.3が減数分裂後に強く発現し、ncPRC1.6 がA型精原細胞、B型精原細胞、精母細胞において発現していることを見出した（図６）（ref）。一方、PR-DUB（bap1, asxl1, foxk2, ogt,1, kdm1b, mbd5, mbd6）、COMPASS の構成要素であるwdr5 、SET1A-COMPASS、MLL1/2-COMPASS-like、ash1、cbp 、SWI/SNF (BAF) complex 、SWI/SNF (PBAF) complex（図S12）（ref）も精子形成細胞に様々に発現していた。今回の解析で得られた結果は、ncPRC1.6がB型精原細胞への分化において主として機能し（ref）、減数分裂以降の精子形成においてはncPRC1.3が主として機能している（ref）が、それらによる制御は必ずしも一律的な、あるいはある一つの因子による決定的な制御ではなく、他のPRC の構成要素も含むロマチン修飾関連の遺伝子群による様々な制御機構が、複雑に、相互作用しながらｍ並行的にクロマチンの状態を徐々に変化させ、おそらくは変化のプロセスを行きつ戻りつしながらA型精原細胞からB型精原細胞への分化、減数分裂の進行、精子完成における精子核の凝縮等のプロセスが進んでいる、との印象を強く与える。scRNA-seq データはこのような複雑なプロセスを解明する上で極めて有効である。

最後に、B型精原細胞が減数分裂を開始する分子機構の解明を試みた。哺乳類ではレチノイン酸がsall4、stra8 などの遺伝子の発現を誘導し、減数分裂の開始の引き金を引くモデルのエビデンスが蓄積し、広く受け入れられている（ref）。一方、ゼブラフィッシュでは RA がB型精原細胞の分化を誘起できるものの（ref）、精巣においてRA がB型精原細胞の分化を誘起しているとの明瞭なevidence は得られていない（ref）。また、ゼブラフィッシュは stra8 を欠いており、魚類では必ずしもRA のみが減数分裂の誘導因子ではない可能性が考えられている（ref）。メダカもstra8 を欠いており、本研究においてもsall4等のRAに誘導される遺伝子の発現が精原細胞において確認できなかった。そこで、改めてB型精原細胞の分化に伴う遺伝子発現を精査した。まず、pcna の発現から体細胞分裂しているB型精原細胞で S 期にあるクラスターと減数分裂前の分化したB型精原細胞のクラスターをそれぞれ同定した。一方、同じくS期のマーカーである skp2 （ref）は体細胞分裂のS期にあるB型精原細胞が発現していたものの、減数分裂前の分化したB型精原細胞は発現していないことを見出した。そこで、両B型精原細胞クラスターの間で DEGs 解析を行ったところ、体細胞分裂のS期にあるB型精原細胞はskp2をはじめとして myc に関連する増殖関連遺伝子（myca、pthlha、dnph1、cdca7a）（ref）が発現していてmyc 経路の細胞増殖シグナルが入っているのに対して、同じくS期にある減数分裂前の分化したB型精原細胞ではこれらのmyc に関連する増殖関連遺伝子群を発現していなかった。一方、減数分裂前の分化したB型精原細胞は減数分裂期に特徴的なマーカー遺伝子（scp3, sycp3, rec8b）（ref）を強く発現していたので、これらの遺伝子の発現を誘導する因子がB型精原細胞を体細胞分裂から減数分裂に切り替えていると考えた。そこで、体細胞分裂と減数分裂への分かれ目にあるB型精原細胞が含まれる G1期のB型精原細胞クラスターにおいて、減数分裂期マーカーを強く発現するB型精原細胞群があることを期待してscRNA-seq データを精査したが、G1期のB型精原細胞クラスターに限定しても減数分裂マーカーの発現はクラスター内で一様であり、発現が特に高いB型精原細胞群を認めることはできなかった。対して、mycとpthlha の発現は体細胞分裂のS期へ向かうB型精原細胞において強く、減数分裂に向かう分化型B型精原細胞において弱かった。つまり、予想に反して、減数分裂マーカーを強く発現するB型精原細胞は見つからず、減数分裂に向かう分化型B型精原細胞の明らかな特徴はmyc経路の増殖関連遺伝子群を発現していないことであった。

ここで、減数分裂の起源を考察してみようと思う。原初の細胞が半数体の状態を常としたであろうことは異論がないはずである。半数体である細胞が自然放射線によるDNA二重鎖の切断を修復するためには、二つの手段しかない。一つ目はただつなぎ合わせるのであり、SOS修復やNHEJなど現生の細胞においてもいくつかの修復機構が稼働している（ref）。ただし、オリジナルの塩基配列が回復することはないので、突然変異率が増大し、細胞の致死率（修復の失敗の率）が高くなる（ref）。二つ目の方法は、同じゲノムを有する別の細胞と融合（接合）し、染色体間で組換えを実行することである（接合→遺伝的組換え→分離）。運良く「壊れていない」遺伝子のセットを引き継いだ細胞は増殖し、娘細胞（子孫）を残すことができる（図S15A）。続いて、そのような遺伝的組換えを実行する細胞の中に、染色体を複製した後で組換えを行う細胞が現れたはずである。なぜなら、オリジナルかコピーを編集する戦略により、少なくとも現状を確保して接合後に共倒れになるリスクが回避される可能性が高くなるはずだから。これを実行する細胞は、遺伝的組換えに続けて細胞分離した後に、半数体に復帰するためにさらに体細胞分裂を実行する必要がある（接合→染色体の複製→遺伝的組換え→分離→半数体への復帰）。そして、図S15A のフロー図にDNA複製（S期）と（半数体としての）体細胞分裂（M期）をオーバーラップすることによってこれを実現できる。こうしてできるフロー（図S15B）は、まさしく現行の減数分裂そのものである。すなわち、接合した半数体細胞が遺伝的組換えの後に細胞分離するのが第一減数分裂であり、半数体に復帰するためにさらに体細胞分裂するのが第２減数分裂と解釈できる。そして、接合し２倍体となった細胞は、半数体よりもはるかにDNA損傷に抵抗性が増大したはずであり、２倍体の状態を続ける戦略をとる細胞も現れたであろう。接合し染色体を複製した後に、遺伝的組換えと細胞分離（第一減数分裂）をスキップして体細胞分裂（第２減数分裂）を実行すれば、2倍体細胞が実現される（図S15C）。以上の仮説では、２倍体細胞より構成される動物においての配偶子の受精が半数体細胞の接合に相当する。また、遺伝的組換えと細胞分離（第１減数分裂）が抑制される限り、２倍体細胞は体細胞分裂して２倍体の娘細胞を与えて細胞増殖する。さらに、２倍体細胞のうち一部の細胞群では細胞増殖＝体細胞分裂を停止すると、デフォルトのパスウェイである遺伝的組換えと細胞分離（第一減数分裂）が実行されることが予想され、これらが、精原細胞（おそらくは卵原細胞も）と呼ばれる細胞群であると解釈することができる。ガンマ線を照射したHd-rR メダカの精巣において細胞増殖を止めた精原細胞がいっせいに減数分裂・精子完成に進んだのは、ガンマ線によって細胞増殖が停止したのが原因であり、細胞の増殖因子である myc の発現の消失が原因であると説明することができる。一方、p53を欠損するHd-rR メダカの精巣においてそのような反応が誘導されなかったのは、ガンマ線照射によるmyc の発現抑制が p53 依存的であるためと考えられる（ref）。本研究ではp53の下流にあるp21等の遺伝子群（ref）の発現も精査したが、それらの関与を示すような遺伝子変動を見出すことはできなかった。今回、メダカの精原細胞におけるmyc の発現の有無が減数分裂と体細胞分裂のいずれに進むかを決定する可能性が示唆されたが、より原始的な形質を残す魚類であるから、この仮説の可能性を示唆するデータが得られたのではないだろうか。

これまでに様々な動物種において精子形成細胞群のscRNA-seq の解析結果が報告され、公的データベースにおいて公開されている（ref）。マウス（ref）におけるscRNA-seq データおよびゼブラフィッシュにおけるscRNA-seq データ（ref）と比較して、今回のメダカのデータには多数の精原細胞が含まれており、A型精原細胞からB型精原細胞への分化のプロセスとB型精原細胞が体細胞分裂し増殖している様子を詳細に解析できるなど、かつてない高品質のデータセットを得ることができた。哺乳類の精巣は内壁面に精子形成細胞が位置する輸精管が密に折りたたまれているのに対して、魚類の精巣はクローナルに精子形成を進める細胞群をセルトリ細胞が取り込んだシスト構造が集合するよりシンプルな構造である（ref）ので、scRNA-seq 用の細胞サンプルを調整する際により多くの精原細胞を精巣から回収できたものと想像する。また、実験室環境ではメダカが毎日産卵する（ref）。性的に成熟した成魚では継続的に精子形成が進んでいることと、ゼブラフィッシュと比較しても精巣の構造がシンプル（ref）であって精原細胞の回収により適していたことがその理由として考えられる。scRNA-seq データには精子形成における全ステージの細胞の遺伝子発現が含まれており、それらが連続するクラスター群として配置できることは、精子形成の経時的プロセスの詳細がそこに含まれていることを示す。したがって、scRNA-seq データのさらなる精査により、精子形成がどのように進捗するのかを細胞レベルで経時的に追跡し、また、プロセスの進行がどのように制御されているかを細胞集団内の多様性として評価できる。本論文に報告する解析のレベルでは、、A型精原細胞からB型精原細胞への分化と減数分裂以降のプロセスにおいて、エピジェネティックな制御があるものの、一律的に厳格に制御されているとの結果は得られず、むしろ多様な分子機構が並行的に機能して分化の制御が進行しているように見受けられた。遺伝子発現が振動しながら細胞の分化が進行することは最近になって報告が増加している（ref）。一つ一つの細胞レベルで遺伝子発現を解析し、クラスター内の細胞集団の多様性を正しく評価することによって、そのような遺伝子発現パターンの変動による細胞分化の制御を詳細に解析することが可能となっている。