Li , Nagata K., XXX (Suzuki 研), Igarashi K., Watanabe-Asaka T., Yasuda T., Suzuki Y., Mitani H., Oda S., 2024

Abstract

Introduction

Materials and methods

Results

**精子形成プロセスのクラスタリング**

　Hd-rR系統のオスメダカ成魚の精巣にてsingle cell RNA-seq 解析を行った。精原細胞（A型、B型）、分化した精原細胞、減数分裂している精母細胞、減数分裂後の精細胞および精子をクラスター化し、それぞれのクラスターにおける特徴的な遺伝子発現を指標としてそれぞれのクラスターの細胞種を判別することに成功した（図1）。大半のクラスターは別のクラスターと連続しており、精子形成の段階が精原細胞、精母細胞、精細胞、精子と連続的に進行することが反映されてい。これら全てのクラスターにおいて生殖細胞のマーカー遺伝子であるddx4 (vasa)およびdazl （ref）が高発現していることから、これらが精子形成している雄性生殖細胞であることが確認された。一方、他のクラスターと連続していないクラスターが３個（cluster 6, 9, 10）見出された。そのうち２個のクラスター（cluster 6, 10）においては、それぞれSertoli細胞のマーカーであるrgs13とLeydig細胞のマーカーである cyp17 （ref）が特異的に高発現していることから、体細胞であるSertoli細胞とLeydig細胞であることが明白である。連続していない最後のクラスター（cluster 9）では、ddx (vasa)およびdazl が高発現していることからこれが生殖細胞であり、またdnd1 がcluster 9に特異的に発現していることを見出した。dnd1は始原生殖細胞や精原幹細胞に発現する（ref）ことから、当該クラスターが最も未分化の精原細胞、すなわちA型精原細胞群である可能性が高いものと判断された。メダカの精巣においてA型精原細胞は nanos2を発現することが報告されている（ref）。nanos2 を発現する細胞はcluster 9に集中しており（図1D）、cluster 9がA型精原細胞のクラスターであることが強く示唆された。哺乳類精巣では未分化精原細胞が幹細胞マーカーであるoct4（pou5f1)、sox2 を発現することとの報告がある（ref）が、メダカ成魚の精巣ではA型精原細胞のクラスターにそれら全能性マーカー遺伝子の発現はほとんど認められず、myc のみ発現が認められた。メダカゲノムにはc-myc に相当する遺伝子が２個（myca、c-myc17）存在し（ref）、myca は精原細胞に、c-myc17は精原細胞と精母細胞に広く発現しており、精子形成において細胞周期を制御するマスター遺伝子の一つと考えられる（図1D）。

分化型精原細胞は体細胞分裂による細胞増殖を終えて減数分裂に移行し精母細胞に分化しつつある精原細胞である（ref）。S期のマーカーであるpcnaの発現よりcluster 4 が減数分裂前のS期にある分化型精原細胞と判定できた。Cluster 4では遺伝的組換えを担うリコンビナーゼであるdmc1（ref）が特異的に強発現し、シナプトネマ複合体を形成するsycp1 （ref）の特異的発現によって減数分裂を開始した精母細胞として cluster 5を特定した（図1B, C）。また、受精の際に卵を活性するplcz1 （ref）を発現する細胞として精細胞、精子を特定した（cluster 8, 2, 図1B, C）。一方、哺乳類において精原細胞の指標遺伝子として知られる ckit、sall4はメダカ精原細胞では発現が限定的であり、stra8 はメダカゲノムにorthologue がなくマーカー遺伝子として用いることができなかった。残るクラスターのうち、cluster 3 はdoublet であるので解析から除外し、cluster 0, 1 ,7をB型精原細胞と特定した。これら3つのクラスターはループを描く様に配置され、B型精原細胞が活発に体細胞分裂していることを反映した（図1）。S期マーカーである pcna、pclaf、skp2 等（ref）の発現を根拠として、cluster 7 が S 期にあるB型精原細胞と推測され、G2/M 期マーカーである ccnb3、g2e3 等（ref）の発現を根拠としてcluster 0 が G2/M 期にあるB型精原細胞と推測される。残るクラスター（cluster 1）はG1期にあるB型精原細胞と判定した。

ガンマ線を照射されていないtp53変異メダカの精巣においてもクラスタリングのパターンとマーカー遺伝子の発現は同様であった（図S1、S2）。さらに、p21 (cdkn1a)は両者ともにおいて発現が認められなかった（図S3）。

**A型精原細胞の一部が精巣卵に分化する**

　tp53変異体系統メダカの精巣においてはガンマ線の照射により精巣卵が誘導される（Yasuda et al., 2021; Nagata et al, 2021）。本研究ではガンマ線による精巣卵誘導の分子機構を解明することを目的として、ガンマ線を照射したtp53変異体系統メダカの精巣においてsingle cell RNA-seq 解析を行った。ガンマ線を照射していないHd-rR系統およびtp53変異体系統のオスメダカ成魚の精巣（図1、図S1）におけると同じようにクラスターが配置・同定され、tp53変異体系統メダカの精巣においてガンマ線照射の精子形成への明瞭な影響は認められなかった（図S4, S5）。

　ガンマ線を照射したtp53変異体系統メダカの精巣においては、nanos2 の発現と他クラスターとのトポロジーを指標としてcluster 6 がA型精原細胞のクラスターと特定された。このクラスターに属する細胞において、卵形成に特異的な遺伝子群（nanog、mos、nobox (ENSORLG00000028896)、nanos3、h1f8 (h1foo, ENSORLG00000024434)）（ref）の発現を確認した（図2A, S6）。これらの細胞がごく初期の精巣卵であることが強く推測された。

一方、我々はガンマ線を照射していないHd-rR系統メダカの精巣においてもA型精原細胞クラスターの一部の細胞が上述の卵形成に特異的な遺伝子群を同様に発現していることを見出した（図2B, S7）。さらに、ガンマ線を照射していないtp53 変異体系統メダカ、ガンマ線を照射したHd-rR 系統メダカの精巣においても、A型精原細胞のクラスターの一部細胞が卵形成特異的遺伝子群を同様に発現していた（図 S1, S8）。本研究において得られたscRNA-seq データにおいてはtp53 遺伝子の欠損による精巣卵誘導の亢進は認められず、ガンマ線照射による精巣卵誘導の亢進も認められなかった。これらの結果は、Hd-rR 系統メダカではA型精原細胞の一部が恒常的に精巣卵へと異常分化していることを強く示唆した。

**ガンマ線照射はp53依存的に減数分裂を促進する**

　ガンマ線を照射したHd-rR系統オスメダカの精巣でも同様にクラスタリングに成功した（図S8）。非照射コントロールと比較して、B型精原細胞クラスター群においてS期マーカーである pcna、pclaf、またG2/M 期マーカーであるccnb1、ccnb3を発現する細胞が減少し、ガンマ線照射によりB型精原細胞が体細胞分裂を停止していることが明瞭に示された（図3A）。また、コントロール精巣にはみられないクラスターがS期にあるB型精原細胞クラスターから形成され、それらは減数分裂中の精母細胞クラスター群との連絡が認められた。それらの細胞は減数分裂期に発現する sycp1、scp3（ref）を強く発現し、また精子形成の後期に発現する plcz1、ccnb2、spatcl1 (ENSORLG00000021836 ) （ref）の発現が亢進していた（図3B）。ガンマ線照射後にメダカの精巣では精原細胞の増殖が停止し、精子形成が促進されることが組織学的に報告されている（Kuwahara et al., 2003）。ガンマ線照射精巣に出現したこれらのクラスターが、ガンマ線照射により正規のプロセスをスキップして精子形成を進めている精母細胞群であるものと考えられる。

　一方、ガンマ線を照射した tp53 欠損メダカの精巣ではHd-rRメダカ精巣にみられた上述の精原細胞の増殖停止と減数分裂の促進は認められなかった（図S4, S5）。

**Ａ型精原細胞における遺伝子発現の特徴**

A型精原細胞はdnd1、nanos2 を特異的に発現していたが、sox2、oct4、klf4 の発現はなかった。また、ckit（kitb） の発現も低調であった。一方、sox19b、fabp11aを特異的に強く発現していた（図1B, 2B）。A型精原細胞とG1 - S期にあるB 型精原細胞においてmycaが強く発現していたのに対し、メダカのもう一つのmyc であるc-myc17 は、A型、B 型精原細胞と減数分裂期にある精母細胞において広く発現していた（図1D）。また、myb2lと ccnf の発現がS 期のB型精原細胞に特異的に見出だされたが、これらは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（ref）。

雄性生殖細胞の中でA型精原細胞のみがOrla-DCA、cd74aを特異的に発現していた。これらは MHC class II の分子であるが、MHC class I である orla-b2m orla-uaaは精子を含む全ての雄性生殖細胞が発現していた（図４）。また、我々はA型精原細胞を含むすべての雄性生殖細胞がmif（macrophage migration inhibitory factor） を発現していることを見出した。A型精原細胞のほかに、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 を発現していた。さらに、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cd44 (ENSORLG00000029763)を発現していた。

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のであるpsmb8がA型精原細胞にのみ発現し、他の精子形成細胞では発現を認めなかった。psmb1-１, 2, 3, 4，7 はA型精原細胞を含むすべての精子形成細胞において発現し、psmb5は減数分裂後期以降に、psmb6, 9, 10 はセルトリ細胞において弱く発現していた（図S9）。

**精原細胞におけるエピジェネティクス関連遺伝子群の発現**

　活発に体細胞分裂しているＢ型精原細胞に比較して、A型精原細胞ではいくつかのヒストン遺伝子（ENSORLG00000028221, ENSORLG00000018301, h3f3d, ENSORLG00000024385, h2afva、ENSORLG00000022841）の発現が低いことが特徴的であって、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（図S10）。A型およびＢ型精原細胞ではDNAアセチラーゼ群が発現しているのに加えて（図S11）、DNAメチルトランフェラーゼである dnmt1 がＢ型精原細胞において強く発現しているのに対して、dnmt3bb.1はA型精原細胞に特異的に発現しており、これらの因子によるエピジェネティクスな制御がA型精原細胞からB型精原細胞への分化に関与している可能性が示唆された（図5）。また、HMGN3 (High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 3)がA型精原細胞に特異的に発現していたほか、kmt5ab (histone-lysine N-methyltransferase 5)がG2/M期にあるB型精原細胞において特異的に発現していた（図5）。

減数分裂前のB型精原細胞はpcgf6をはじめとするPRC1.6の構成要素を発現していた。また減数分裂途中にある精母細胞、精子細胞もpcgf6を強く発現しており、減数分裂の進行にもPRC1.6 が機能している可能性が示された。また、pcgf3 をはじめとしてPRC1.3 の構成要素の遺伝子群が減数分裂期以降の精細胞、精子細胞に強く発現していることを見出した。pcgf2が精原細胞、特に精巣卵に強く発現していた一方、pcgf4, pcgf5 の発現は認められなかった。HDAC1, 2 は精原細胞に強く発現し、rbbp4, rbb4l は精原細胞、特にB型精原細胞に強く発現し、cbx3a がB型精原細胞に特に強く発現し、Polycomb repressive complexes (PRCs) の構成要素が複合体としてではなく単体で発現し機能している可能性があることが示唆された（図6）。

PR-DUBの構成要素（bap1, asxl1, foxk2, ogt,1, kdm1b, mbd5, mbd6）はA型精原細胞とB型精原細胞において発現し、B型精原細胞の一部の細胞において強く発現していた。COMPASS の構成要素のうちwdr5 が全ての雄性生殖細胞に発現していた。SET1A-COMPASS がA型、B型制限細胞、精母細胞に発現し、SET1B-COMPASSは発現がなかった。 MLL1/2-COMPASS-like がA型、B型精原細胞の一部に弱く発現していたのに対して、MLL3/4-COMPASS-like の発現は認められなかった。ash1lが全ての雄性生殖細胞に発現し、cbp がA型精原細胞に強く発現していた。SWI/SNF (BAF) complex 、SWI/SNF (PBAF) complex の構成要素もその多くが雄性生殖細胞全体に発現していた（図S12）。

**B型精原細胞の増殖と減数分裂への移行に関連する遺伝子発現**

前述のように哺乳類の精子形成において研究が進められているレチノイン酸応答遺伝子（Sall4）の発現は極めて弱く、また stra8はオルソログがメダカゲノムに見つからなかった。メダカにおいて、ゼブラフィッシュにおけると同じく哺乳類とは異なって、レチノイン酸による制御が分化のメインスイッチとして機能してはいないことが強く示唆された。そこで、最後に我々は本研究で得られたscRNA-seq データをもって、B型精原細胞から精母細胞への分化、すなわち体細胞分裂から減数分裂へのスイッチングの分子機構の解明を試みた。体細胞分裂中のB型精原細胞のクラスター（cluster 7）と第一減数分裂の前のS期にある分化型精原細胞のクラスター（cluster 4）との間で遺伝子発現を比較したところ、ともにS期のマーカーである pcnaおよび PCLAF を発現していることを確認した一方、cluster 4 では spk2 の発現がなかった（図7A, S13）。さらに、DEG 解析を行ったところ、cluster 7ではskp2 をはじめとして myc シグナルに関連する遺伝子群が強く発現しているのに対して、cluster 4 ではsycp3, scp3, rec8b など減数分裂期において機能する遺伝子群がcluster 7の細胞群より強く発現していることが特徴であった（図7B）。しかし、それらの遺伝子群はcluster 7 の細胞群も強く発現しており（図7A, S13）、さらにG1 期にあるB型精原細胞（cluster 1）に限定して細胞を3D配置して精査したがcluster の細胞に発現量の不均一さを認めらなかった（図S14）。Cluster 7に続くB型精原細胞群（体細胞分裂を続ける）とcluster 4 に続くB型精原細胞群（減数分裂に進む）の最も明瞭な差異は、減数分裂に進むcluster 4に向かうB型精原細胞群において myc をはじめとする増殖シグナルの遺伝子群（myca、pthlha、）の発現が低下していることであった。