

論文の内容の要旨

論文題目 精子形成における RNA 結合タンパク質 PTBP1 の機能解析
(PTBP1 contributes to spermatogenesis
through regulation of proliferation in spermatogonia)

氏名 妹尾 真奈美

[背景]

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達することのできる唯一の細胞系譜であり、減数分裂による半数体化、細胞融合による次世代の作出など体細胞には見られないユニークな性質を持つ。したがって、その発生メカニズムを明らかにすることは基礎生物学的に重要であると同時に、不妊治療や避妊法の開発といった医療面への応用という面からも極めて重要であると言える。

生殖細胞の発生・分化を厳密に制御する分子基盤として、これまでに DNA やヒストンのエピジェネティックな修飾および転写因子を介した遺伝子発現ネットワークなどが報告されている。加えて、近年のシーケンス技術の向上に伴い、精巣はスプライシングアイソフォームが多様な組織であることが明らかになってきている。選択的スプライシングによるアイソフォームの制御は、組織の正常な発生に重要な役割を果たすことが神経細胞などを用いた研究から明らかになっている。したがって、多様なスプライシングアイソフォームを発現する生殖細胞の発生・分化においても選択的スプライシングによる制御を受けることが類推されるが、実証的な解析はほとんど報告がない。

PTBP1 はピリミジン塩基に富む配列に結合する RNA 結合タンパク質であり、その主な遺伝子機能は選択的スプライシングである。ショウジョウバエにおいて PTBP1 のホモログ、dmPTB の欠損が起こると精子の分化不全により不妊となることが報告されている。また、我々の先行研究において PTBP1 はマウス精巣において高発現していることが明らかになっている。こうした既往の研究から、本研究では「PTBP1 が選択的スプライシング制御を介して持続的精子形成の維持に寄与する」との仮説を立て、ノックアウトマウスを用いて仮説の検証を行った。

[結果および考察]

(1) 若齢期の精子形成における PTBP1 の機能

精子形成は精細管の基底膜側から管腔側に向かって進行する (図 1)。まず、精巣における PTBP1 の発現の局在について、免疫組織化学染色により調べた。その結果、PTBP1 は精原細胞において発

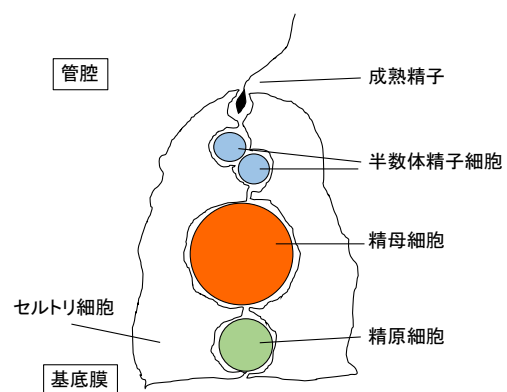


図1 精子形成の模式図

現が高かった一方で、減数分裂期の精母細胞では顕著な発現の低下が見られ、さらに分化が進んだ半数体精子細胞においては発現は殆ど認められなかった。

そこで、PTBP1 が高発現する精原細胞において、その遺伝子機能を明らかにすることを目的とし、出生直後から精原細胞において Cre タンパク質を発現する *Ngn3-Cre* マウスと *Ptbp1 flox* マウスを交配させることにより精原細胞特異的 *Ptbp1* ノックアウトマウス (cKO) を作出し、その表現型の解析を行った。cKO の精巣重量は control と比較して有意に軽くなっており (図 2)、精子形成異常が生じていることが示唆された。また、精巣上体から回収した精子数は 2 ヶ月齢の時点では有意な差が認められなかった一方、6 ヶ月齢の cKO では有意に減少していた (図 3)。

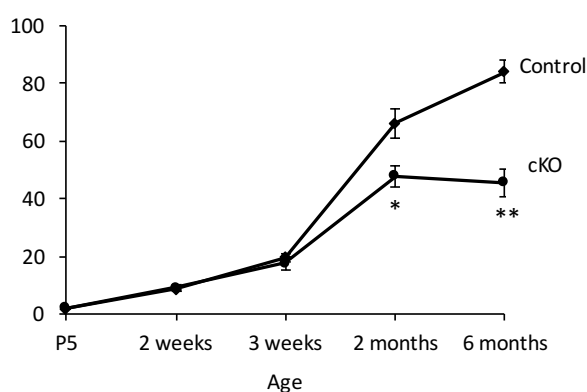


図2 精巣重量 (mg)

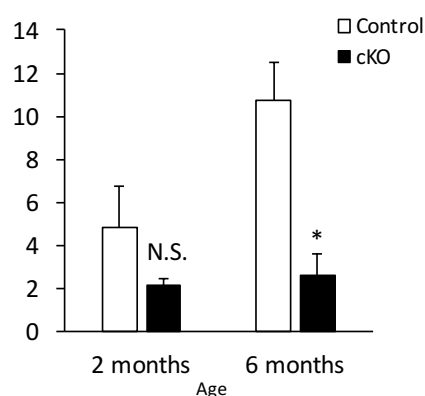


図3 精子数 (× 10⁶)

さらに、HE 染色により組織学的な解析を行ったところ、cKO では control と同様に精子形成が進行している精細管が観察された一方、精細胞を含まない精細管が多数存在した (図 4、アスタリスク)。この結果より、PTBP1 が精子形成において重要な役割を果たすことが示唆された。

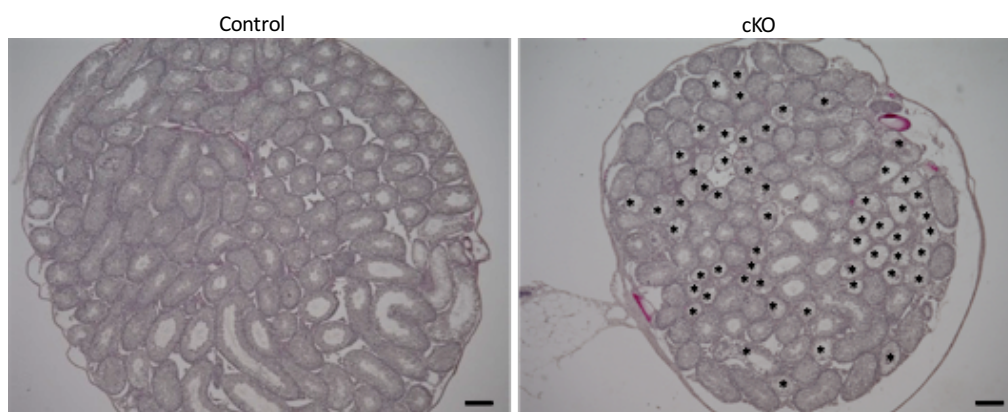


図4 精巣のHE染色

次に、精細胞を含まない精細管が出現する時期と原因を明らかにするため、精原細胞の増殖が開始する出生直後の時期の精巣を回収し、免疫組織化学染色を行った。その結果、出生後 1 日齢では精原細胞を含まない精細管の割合に有意差が見られなかったのに対し、control では出

生後5日齢までにはほぼすべての精細管に精細胞が充填される一方で、cK0では20%程度の精細管が精細胞を含んでおらずその差は有意であった。この結果から、PTBP1を欠損した精原細胞では細胞の増殖性の低下が起こることが示唆された。

次に、精原細胞の増殖性の低下を引き起こす原因として、PTBP1欠損に起因した細胞死の亢進、あるいは細胞周期の休止期の増加という2つの可能性を考え、アポトーシスマーカーであるCleaved Caspase-3 (CC3) および細胞増殖マーカーであるKi67に対する抗体を用いてこの時期の精巣の免疫組織化学染色を行った。その結果、単位面積あたりのCC3陽性細胞数およびKi67陽性となる精原細胞の割合には、controlとcK0で有意な差は認められなかった。この結果から、PTBP1欠損による精原細胞の増殖性の低下はアポトーシスの亢進、または細胞周期の休止期の増加以外の要因で誘発されることが示唆された。Ki67は細胞周期が回っているすべての細胞で発現するマーカーであり細胞周期の速度を示す指標ではないことから、cK0における精原細胞の増殖性の低下は、精原細胞の細胞増殖速度の低下が原因である可能性が考えられる。

(2) 性成熟後の持続的精子形成におけるPTBP1の役割

精巣重量および精子数は2ヶ月齢よりも6ヶ月齢において、よりcontrolとcK0の差が大きくなった。このことは、持続的な精子形成にPTBP1が関与することを示唆している。そこで、持続的精子形成におけるPTBP1の役割を明らかにすることを目的として、2ヶ月齢および6ヶ月齢のマウスを用いて、まず精原細胞を含む精細管の割合がどのように推移するかを免疫組織化学的に解析した。その結果、精原細胞を含まない精細管の割合はcontrolではほとんど変化がないのに対して、cK0では2ヶ月齢から6ヶ月齢になるとその割合が増加する傾向にあった

($P=0.059$)。次に、加齢に伴う精子形成の活性の変化を明らかにするために、精細管の断面積を指標としてcK0における精子形成の活性を検証した。精細管の断面積は精子形成の活性が低下すると縮小することが知られている。controlでは2ヶ月齢から6ヶ月齢になると精細管の断面積が有意に増加する一方、cK0では断面積が有意に減少することが明らかになった(図5)。このことから、PTBP1が持続的な精子形成の活性の維持に関与することが示唆された。一方で、免疫組織化学染色の結果、controlとcK0いずれにおいても加齢に伴うアポトーシス細胞の有意な変化は確認されなかった。これらの結果から、PTBP1の欠損に起因した精子数の減少は、精原細胞の増殖性の低下に伴う精原細胞画分の減少に起因することが示唆された。

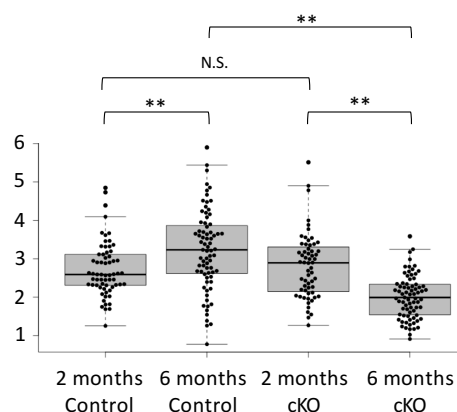


図5 精細管の断面積

(3) PTBP1 を欠損した精原幹細胞の体外培養モデルの構築

(1)、(2) の結果から、PTBP1 が精原細胞の増殖性に寄与する可能性が示唆された。そこで、PTBP1 を欠損した精原細胞の性質についてより詳細に解析することを目的として、精原細胞の体外培養モデルの構築を試みた。出生後 7 日齢前後のマウスの精巣から精原細胞を回収し、GDNF および FGF2 の存在下で培養することで、精原細胞の性質を維持した状態で長期培養が可能であることが報告されている (Germline Stem Cells, GS 細胞)。まず、*CAG-CreMER* マウスと *Ptbp1 flox* マウスの交配により作出した *CAG-CreMER; Ptbp1 flox* マウスの精巣から GS 細胞を樹立し、培地へのタモキシフェン添加により PTBP1 の欠損を誘導できるかを確認した。その結果、培地にタモキシフェンを添加することによりほぼすべての細胞で PTBP1 の欠損が誘導できることが確認された (*Ptbp1*-KO GS 細胞)。次に、この培養モデルを用いて *Ptbp1*-KO GS 細胞の増殖性を確認した。その結果、*Ptbp1*-KO GS 細胞は著しい増殖不全を示した。PTBP1 を欠損した ES 細胞では細胞周期の M 期停止が増加することで細胞の増殖性が低下することが報告されている。そこで、*Ptbp1*-KO GS 細胞に見られる増殖不全の原因として、細胞周期異常が生じている可能性を検証するため、FACS により核型解析を行った。その結果、*Ptbp1*-KO GS 細胞では G0/G1 期の有意な減少および G2/M 期の有意な増加が確認され、PTBP1 の欠損に起因した精原細胞の増殖性の低下に細胞周期の異常が関与することが示唆された。

(4) *Ptbp1*-KO GS 細胞における選択的スプライシングの解析

(3) の結果より、PTBP1 が GS 細胞の増殖および生存性に重要であることが示唆された。そこで *Ptbp1*-KO GS 細胞における選択的スプライシングおよび遺伝子発現の変化を網羅的に調べるため、RNA-seq を行った。*Ptbp1*-KO GS 細胞において、図 6 のグラフに示す 6 種類の選択的スプライシングが対照区と比べて有意に変化した遺伝子の数は 103 個であり、そのうちエクソンスキッピングの変化が 69 個と最多であった。また *Ptbp1*-KO GS 細胞において発現量が上昇した遺伝子は 163 個、低下した遺伝子は 113 個であった。発現低下した遺伝子群には *Nanos2*、*Nanos3*、*Glis3* といった精子形成に極めて重要な役割を果たす遺伝子が含まれており、これらの遺伝子の発現量の低下が *Ptbp1*-KO GS 細胞で観察された著しい増殖不全に寄与している可能性が示唆された。

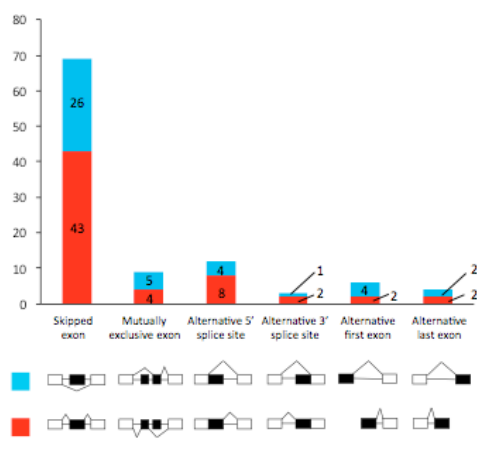


図6 PTBP1欠損により選択的スプライシングが変化した遺伝子の個数

以上の結果から、PTBP1 は他の組織と比較して精巣において高発現し、その中でも特に初期の発生段階にある未分化な精原細胞において何らかの役割を果たす可能性が示唆された。