



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                             |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Studies on the mechanism of transcriptional activation by a mouse testis-specific long noncoding RNA, Tesra, and its physiological role during spermatogenesis [an abstract of entire text] |
| Author(s)           | 佐藤, 丈生                                                                                                                                                                                      |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学部図書室】<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>            |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                                       |
| Degree Name         | 博士(生命科学)                                                                                                                                                                                    |
| Dissertation Number | 甲第16286号                                                                                                                                                                                    |
| Issue Date          | 2025-03-25                                                                                                                                                                                  |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/95520">https://hdl.handle.net/2115/95520</a>                                                                                                           |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                             |
| File Information    | Josei_Sato_summary.pdf                                                                                                                                                                      |



# 学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 佐 藤 丈 生

## 学 位 論 文 題 名

### **Studies on the mechanism of transcriptional activation by a mouse testis-specific long noncoding RNA, *Tesra*, and its physiological role during spermatogenesis**

(マウス精巣特異的長鎖非コード RNA の *Tesra* による転写活性化メカニズムと精子形成過程での生理機能に関する研究)

精子形成は、精原細胞から分化した精母細胞が減数分裂を経て精細胞になり、精細胞が精子変態という大規模な形態変化を遂げることで、雄性配偶子である精子をつくり出すプロセスである。精子形成の過程ではゲノム中の全遺伝子のうち 80-90%が発現しており、大量の遺伝子が時期特異的な発現制御を受けることが適切な精子形成の進行にとって重要である。

精子形成過程における遺伝子発現制御に関しては、ゲノムワイドな転写制御を担う複数の転写因子や、精子形成過程特有の高次クロマチン構造の変化などの「広範な」転写制御機構がこれまで精力的に解明されてきた。一方で、時期・細胞特異的に遺伝子発現の調整を担う「局所的な」発現制御機構、すなわち個別の遺伝子や遺伝子座に焦点を当てた研究は十分に進んでいなかった。

近年、プロモーターやエンハンサーなどの機能性ゲノム配列に加えて、長鎖非コード RNA (long noncoding RNA, lncRNA) と呼ばれる機能性 RNA が、局所的な遺伝子発現制御に関与していることが明らかになってきた。特に、精子形成が進行する器官である精巣は、体内のすべての器官・組織の中で最も多様な lncRNA を発現することが知られており、精巣で発現する lncRNA は精子形成において重要な役割を果たすと考えられている。しかし、作用メカニズムが解明されている精巣 lncRNA はごくわずかであり、さらにこれまで作製された精巣 lncRNA のノックアウト (KO) マウスのほとんどが精子形成において異常を示さないなど、精子形成における lncRNA の分子機能や生理的な重要性は依然として明らかになっていない。

マウス *Prss/Tessp* 遺伝子座は、雄性生殖細胞特異的に発現する 6 つのセリンプロテアーゼ遺伝子から構成される、精巣特異的に活性化される遺伝子座である。このうち *Prss42/Tessp-2*、*Prss43/Tessp-3*、*Prss50/Tsp50* の 3 つのプロテアーゼ遺伝子に関しては、精子形成に必須であることが明らかになっている。これらの知見から、*Prss/Tessp* 遺伝子座は精子形成において重要な遺伝子座であると考えられる。また、*Prss/Tessp* 遺伝子座の遺伝子間領域からは 3 つの精巣特異的 lncRNA が転写されており、そのうち *Tesra* と呼ばれる lncRNA は、*Prss42/Tessp-2* のプロモーター領域に結合して *Prss42/Tessp-2* の転写活性化に寄与することが先行研究により示されていた。そこで本研究では、精子形成過程における lncRNA の機能を解明するために、*Tesra* に着目して研究をおこなった。

第 1 章では、*Tesra* による *Prss42/Tessp-2* 転写活性化の詳細な分子メカニズムの解明に取り組んだ。lncRNA は通常、RNA 結合タンパク質とともに機能を発揮するため、はじめに *Tesra* 結合タンパク質の同定を試みた。Ribotrap 法および質量分析法によって、*Tesra* と結合する RNA 結合タンパク質の候補として、15 種類のタンパク質を同定した。この中でも、PTBP2、HSPA9、PCBP2 が特に高い結合スコアを示した。そのうち、PTBP2 は精子形成の進行に必須なタンパク質であることが知られていたため、本研究では *Tesra* 結合タンパク質として PTBP2 に着目し、解析を進めた。RNA 免疫沈降法によって、PTBP2 は生殖細胞の核で *Tesra* と結合していることがわかり、qRT-PCR 法により、*Ptbp2* は *Tesra* や *Prss42/Tessp-2* と同じく生後 21 日齢の精巣で発現が活性化することを確認した。これらより、PTBP2 は精母細胞で *Tesra* と相互作用すると考えられる。次に、

実際に PTBP2 が *Prss42/Tessp-2* の転写活性化に寄与するかを明らかにするため、Tet-on システムを用いた *Tesra* 過剰発現系による、*in vitro* レポーターアッセイ系を確立した。この実験系では、薬剤添加によって *Tesra* の転写が誘導され、*Tesra* によって *Prss42/Tessp-2* プロモーターが活性化される。この系を導入した培養細胞で *Ptbp2* をノックダウンしたところ、*Prss42/Tessp-2* のプロモーター活性が低下した。最後に、ChIP-qPCR 法により、PTBP2 が *Prss42/Tessp-2* プロモーターに *in vivo* で結合する可能性が示唆された。これらの結果より、PTBP2 は精母細胞において *Tesra* による *Prss42/Tessp-2* の転写活性化に寄与する *Tesra* 結合タンパク質であることがわかった。

第2章では *Tesra* の生理機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法を用いてゲノム中の *Tesra* の領域を欠失した *Tesra*-KO マウスを作製した。qRT-PCR 法によって *Tesra*-KO 個体では *Tesra* の発現が消失していることを確認した。生後 2.5 カ月、4.5 カ月、7.5 カ月齢の雄の個体を解析したところ、生後 7.5 カ月齢において、野生型と比べて *Tesra*-KO 個体で精子数と精子運動能が低下していることが明らかになった。また、精子の形態を観察したところ、*Tesra*-KO 個体では、7.5 カ月齢において精子の頭部・尾部間の結合に異常が生じ、正常な形態の精子の割合が減少していることが明らかになった。すなわち、*Tesra* は加齢した個体において、精子の量（精子数）と質（運動能・形態）の維持に関与していることが示唆された。この原因遺伝子を同定するために野生型と *Tesra*-KO 個体の精巣を用いて RNA-seq 解析をおこなった。RNA-seq 解析の結果、206 遺伝子が野生型と比べて *Tesra*-KO 個体で発現変動しており、これらの発現変動遺伝子は 9 番染色体上と Y 染色体上の遺伝子に集中していた。GO 解析によって、精子形成に関連した遺伝子の発現が *Tesra*-KO で低下しており、これらの遺伝子の塩基配列を調べたところ、*Slx1l* と *Shy* という遺伝子ファミリーであることが明らかになった。*Slx1l* と *Shy* は X 染色体上と Y 染色体上のマルチコピー遺伝子であり、先行研究から、これらの遺伝子の変異マウスでは精子の量や質の低下が見られることが知られていた。公共の RNA-seq データを用いて、精巣の発達段階別の発現を調べたところ、*Slx1l* と *Shy* は生後 22 日以降の精子変態の時期に発現が活性化することがわかった。野生型と *Tesra*-KO 個体の精巣を用いた qRT-PCR 法によって *Slx1l* と *Shy* の発現を調べたところ、生後 2.5 カ月齢や 4.5 カ月齢の精巣では発現変動を示さないものの、生後 7.5 カ月齢の精巣では野生型と比べて *Tesra*-KO で発現が有意に低下していた。最後に、*Tesra* を一過的に過剰発現させた培養細胞で *Slx1l* と *Shy* の発現を調べたところ、*Slx1l* の発現が有意に上昇していることがわかった。これらの結果より、*Tesra* は *Slx1l* や *Shy* といった性染色体上のマルチコピー遺伝子の発現を制御することで、加齢した精巣において精子の量や質の維持に関与している可能性が示された。

本研究によって、*Tesra* は精子形成過程で時期特異的な機能を持つことが示された。すなわち、減数分裂過程の精母細胞において PTBP2 と結合することで *Prss42/Tessp-2* の転写活性化に寄与し、精子変態過程の精細胞においては *Slx1l* と *Shy* という性染色体上のマルチコピー遺伝子を制御することで精子の質と量の維持にはたらくことが明らかになった。精母細胞では、精子形成に重要な遺伝子の発現が活性化されることが知られている。その中で本研究は、精母細胞において、精子形成に重要な遺伝子である *Prss42/Tessp-2* の、lncRNA を介した具体的な転写活性化メカニズムを報告した貴重な一例となる。また、これまでに生理機能が調べられていた精巣 lncRNA は、多くの場合若い個体の結果のみが報告されており、加齢した個体に関する報告は少ない。特に、本研究で表現型が見られた生後 7.5 カ月齢前後は、現代人における男性の生殖年齢である 30 歳から 40 歳に相当し、この年齢のマウスを用いた研究は、ヒトの生殖生物学への応用を考える上で極めて重要である。そのため、本研究は、精巣 lncRNA の生理機能に関する貴重な一例であると同時に、加齢した個体において精巣 lncRNA の表現型を報告した先駆的な事例となった。以上より、本研究によって明らかになった *Tesra* の精子形成過程における分子メカニズム・生理機能は、今後の精巣 lncRNA 研究を進める上での非常に重要かつ優れたモデルとなりうる。