

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07127

研究課題名(和文) 卵母細胞分化を阻害し、卵巣形成過程での細胞間情報伝達を探る

研究課題名(英文) Search for cell-cell interactions during ovarian development through inhibition of oocyte differentiation

研究代表者

金森 章 (KANAMORI, AKIRA)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：40324389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生殖巣が卵巣に分化する過程では、体細胞と生殖細胞間でどのような情報伝達が働き、組織全体の協調した分化が進行するのだろうか。本研究では、1) 転写因子 *fig* の機能欠損メダカをゲノム編集により作出し、卵形成が第一減数分裂前期のディプロテン期以降の成長期に入らず停止することを確認した。2) 正常な成長期の卵母細胞が無いにも関わらず生殖巣は正常に卵巣へ分化した。このことより、成長期の卵母細胞からの情報がない状態でも卵巣の組織構築は正常に進行すること、つまり卵巣の組織構築に関わる体細胞は正常に分化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトを含む多細胞生物の発生では1つの細胞(受精卵)から多様な細胞系列が分化し、異なる細胞同士が集まり組織・器官を作り出す。これらの過程では細胞間の情報伝達により協調した分化過程が進むと考えられているが、その詳細な分子メカニズムには不明な場合が多い。生殖巣は比較的少数の細胞が、オスメスの二者択一を行うことから、器官形成時の細胞間情報伝達を研究する良いモデルと考えられる。本研究では生殖細胞の細胞自律的分化を阻害してやり、他の細胞群の分化への影響を調べることが可能であることを示せた。

研究成果の概要(英文)：What molecular signals are working between somatic cells and germ cells during ovarian differentiation? In the present study, 1) we first knocked out oocyte-specific transcription factor, *fig*, by CRISPR/Cas9 system and verified that oocytes stopped entry into growth phase beyond pachytene. 2) The gonads, however, developed normally into ovaries suggesting that presence of growth phase oocytes are indispensable for normal ovarian development and further that ovarian somatic cells developed normally without growth phase oocytes.

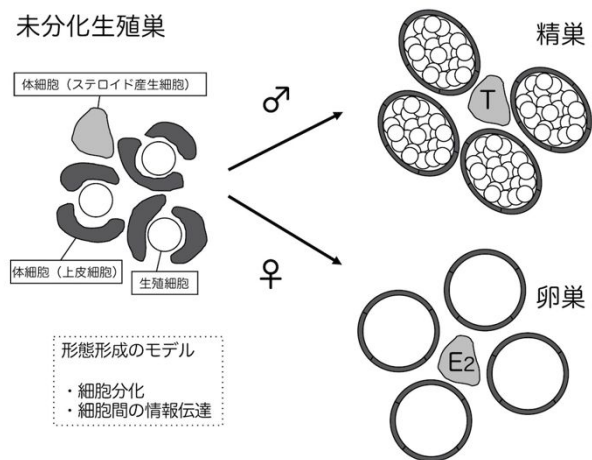
研究分野：発生生物学、生殖生物学

キーワード：卵形成 転写因子 体細胞 生殖細胞 生殖巣 性分化 ゲノム編集 減数分裂

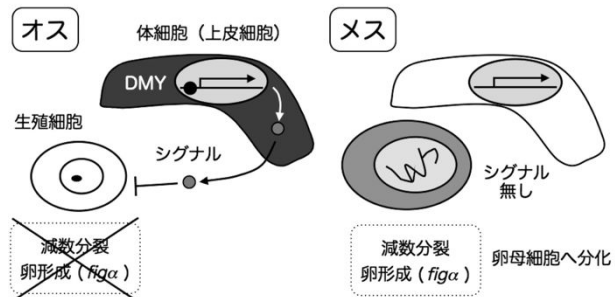
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖巣の性分化ではオスメス(性)の決定に引き続き、組織を構成するすべての細胞がオスもしくはメス特異的な細胞分化を開始する(右図)。たとえば生殖細胞は精子形成もしくは卵形成へ、体細胞(上皮細胞)はセルトリ細胞もしくは顆粒膜細胞へ分化していく。この過程では特定細胞種のみでの性転換はほぼ見られない。つまりこれらの細胞間では互いに性特異的な情報伝達がおこなわれ、それによって組織全体の性分化が協調して進行するのだろう。しかしこのような細胞間の情報伝達をになう分子・細胞機構の詳細はまったく不明のままであった。それまでにモデル魚メダカでは



生殖細胞の増殖に影響を与える体細胞発現遺伝子変異体の解析はおこなわれていたが、生殖細胞分化に影響をあたえるだろう生殖細胞発現遺伝子変異体の作製と表現型解析はほとんどおこなわれていなかった。fig (factor in the germline) は2000年前後にマウス()とメダカ(われわれによる発見:)によりみつかった脊椎動物卵形成の最初期マーカーであり、KO マウスの表現型から卵形成の開始をつかさどる転写因子とかがえられていた()。メダカはXX/XY型の性決定機構をもち、分化前後にY染色体上のオス決定遺伝子、dmy(転写因子)が体細胞(上皮細胞)で発現し、その直下に生殖細胞の性分化を制御する分泌性シグナルがあると考えられる(下図)。このシグナルのありなしにより生殖細胞は精子方向または卵方向への分化を開始する。卵方向への分化のもっとも早いマーカーがfigである。そこで本研究では、figの機能欠損変異メダカの作出とそれらの表現型解析より、卵巣形成過程での細胞間情報伝達を知る手がかりを得ることを目的とする。ゲノム改変技術、CRISPR/Cas9システムにより、(1)figの機能欠損変異体の作出を行ない、(2)卵巣分化過程の表現型を生殖細胞、体細胞それぞれの形態と遺伝子発現の両方から詳細に解析する。



2. 研究の目的

生殖巣の性分化はオスメスの二者択一であり、構成細胞にも中間型はほとんど見つからない。つまりこれらの細胞間では互いに性特異的な情報伝達がおこなわれ、全体の性分化が協調して進行するのだろう。しかしこのような細胞間の情報伝達をになう分子・細胞機構の詳細はまったく不明のままである。そこで本研究では、(1)生殖細胞が卵子になることを規定している可能性のある転写因子figの機能欠損変異メダカを、ゲノム改変技術、CRISPR/Cas9システムにより作出し、(2)卵巣分化過程の表現型を生殖細胞、体細胞それぞれの形態及び遺伝子発現の両方から詳細に解析し、卵巣形成過程での細胞間情報伝達を知る手がかりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)すでにCRISPR/Casシステム用の標的部位を設計し、メダカ受精卵に導入し変異を誘発した。その子孫から変異alleleのスクリーニングと選別を形態観察によりおこなう。同じalleleをもつ親同士との交配により変異体を得る。(2)変異体の表現型をa)組織学的観察を抗体などによる細胞種同定と組み合わせるおこない、詳細を記載する。b)性特異的に発現することが知られている生殖細胞と体細胞それぞれの発現遺伝子の変動を定量PCRにより記述する。

4. 研究成果

(1)fig機能欠損変異体のオスは正常に精巣が形成され、精子形成にも影響はなかった。一方メスでは不稔となった。減数分裂の第一分裂前期のパキテン期より進んだ成長期の卵母細胞は全くみられなかった。またfigのターゲットと予想されている遺伝子の発現はみられなかった。

(2)fig機能欠損変異体でもメス生殖巣は形態的に正常な卵巣へと分化した。生殖細胞が欠損したメス生殖巣は精巣に分化することが知られているが()今回の結果は成長期の卵母細胞からのシグナルは卵巣分化には無くても良いことを示唆している。また形態的に正常な卵巣

への分化には生殖巣体細胞のメス方向への分化が必要なので()、これに対しても成長期の卵母細胞からのシグナルは無くても良いことを示唆している。

(3) 今回の fig 機能欠損変異体の卵母細胞の表現型はいわゆるパキテンチェックポイント()に類似していたので、卵母細胞の表現型をさらに解析した。パキテン期までの卵形成に異常は見られず、またアポトーシスする卵母細胞の数も増えてはいなかった。パキテンチェックポイントが稼働する要因である、相同染色体の対合異常やダブルストランドブレイクの解消の異常もみられなかった。これらから fig 機能欠損変異体の卵母細胞の表現型はパキテンチェックポイントとは関わらない、fig のターゲット遺伝子発現の減少によるものと考えられるが、その原因となる遺伝子の正体についてはわからなかった。

<引用文献>

- Morinaga C et al., (2007) PNAS 104: 9691-6.
Nakamura S et al., (2012) PLoS ONE 7: e29982.
Liang L et al., (1997) Development 124: 4939-47.
Kanamori A (2000) Mol Reprod Dev 55: 31-6.
Soyal SM et al., (2000) Development 127: 4645-4654.
Kurokawa H et al., (2007) PNAS 104: 16958-16963.
Suzuki A et al., (2004) J Exp Zool A Comp Exp Biol 301: 266-73.
Roeder GS and Bailis JM., (2000) Trends Genet. 16: 395-403.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計4件)

Katsuyasu Kamimura, Masato Kinoshita, Hiroshi Hori, *Akira Kanamori. (*は発表者)
A bHLH transcription factor, fig, is indispensable for oogenesis in medaka. 第23回小型魚類研究会 山梨県立図書館 (2017)

*Katsuyasu Kamimura, Masato Kinoshita, Hiroshi Hori, Akira Kanamori
Analyses of gonadal sex differentiation of medaka via knocking out fig, an oocyte-specific transcription factor. The 22nd International Congress of Zoology and The 87th meeting of Zoological Society of Japan. OIST&OCC 沖縄 (2016)

*神村 雄康, 木下 政人, 堀 寛, 金森 章
卵母細胞特異的転写因子 fig ノックアウトによるメダカ生殖巣性分化機構の解析 日本動物学会 第八十六回大会 朱鷺メッセ (2015)

*神村 雄康, 木下 政人, 堀 寛, 金森 章
卵母細胞特異的転写因子 fig ノックアウトによるメダカ生殖巣性分化機構の解析 第10回 DMY 研究会 東大浜名湖水産実験所 (2015)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：木下 政人

ローマ字氏名：(KINOSHITA MASATO)

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院農学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：60263125

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。