

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18557

研究課題名(和文) 環境に応答した生殖細胞の性転換の仕組み

研究課題名(英文) Sex-reversal of germ cells in response to environments

研究代表者

西村 俊哉 (Nishimura, Toshiya)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：10758056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：foxl3はメスの生殖細胞で発現しており、生殖細胞の性決定に関わる。生殖細胞の卵への運命が決まる仕組みを明らかにするために、foxl3の下流で働く遺伝子の探索を行ったところ、染色体動態に関わる遺伝子群が同定された。また正常な卵形成過程で発現している既知の遺伝子(foxl3/figla)が卵の運命決定に関わるのかを明らかにするために、オスの生殖細胞でこれらの遺伝子を強制発現できるトランスジェニックメダカの作製を行なった。今後これらのメダカを用いて、精巣の中に卵が作られるか検証を行うと共に、卵形成過程における染色体動態について調べていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The applicant identified foxl3 as a sperm-egg switch gene in medaka. FOXL3 is expressed in female germ cells, and foxl3 loss-of-function (foxl3<sup>-/-</sup>) females initiate spermatogenesis in ovaries. However, foxl3<sup>-/-</sup> females also produce eggs by unknown mechanism. In this study, the applicant examined the downstream targets of foxl3 to understand how egg fate decision occurs, and asked whether foxl3 and figla, which is required for follicle formation, could be determinants of eggs. Genes related to chromosomal dynamics were found in targets of foxl3. Among them, a novel ubiquitin ligase likely regulated female-specific mitosis in germ cells. The applicant also generated transgenic medaka in which foxl3/figla genes could be induced in germ cells of testes using Cre/loxP system. In the future, production of eggs in testes will be examined using the transgenic medaka.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物には性がありオスとメスの区別がある。ほ乳類のように性が遺伝的に決まる動物もいれば、爬虫類のように温度で性が決まる動物もいる。さらに魚類の一部では一旦オスに分化し、環境刺激によりメスへ性転換するものもいる。このように動物の性が決まる仕組みは多様であるが、大きく遺伝要因と環境要因の二つに分けることができる。遺伝要因で性が決まる動物は遺伝情報に従って性が決まり、通常性転換することはないが、温度やストレスといった環境要因により性が変わることも知られている。そのため性を決める遺伝的パスウェイの中に、環境要因に応答して「ゆらぐ因子」が存在することが示唆されるが、そのような因子は未だ明らかになっていない。

繁殖に重要な精子と卵は生殖細胞という共通の細胞から作られる。通常、精子は精巣の中で、卵は卵巣の中で作られる。この精巣及び卵巣をまとめて生殖腺と呼ぶ。生殖腺は卵や精子となる生殖細胞と、それを取り囲む体細胞から構成されている。多くの脊椎動物では、体細胞、特に生殖細胞を取り囲む支持細胞でまず性が決定され、その支持細胞からのシグナルに応じて精子形成または卵形成を行うと考えられてきた。しかし、生殖細胞の中でどのような遺伝子が働き、精子あるいは卵になるのか、分かっていなかった。

申請者はメダカを用いた研究で、生殖細胞が「精子になるか、卵になるか」という性の運命を決める遺伝子、*foxl3*、を脊椎動物で初めて同定した。*foxl3* は、精子形成を抑制する機能を持ち、卵を作る過程の生殖細胞で発現しており、精子を作る過程の生殖細胞では発現が抑制されている (図 1)。*foxl3* の機能を欠損させると、体細胞がメスで卵巣構造を作るにも

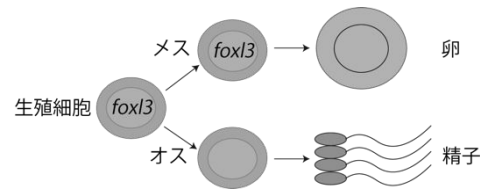


図 1. *foxl3* 遺伝子の発現パターン

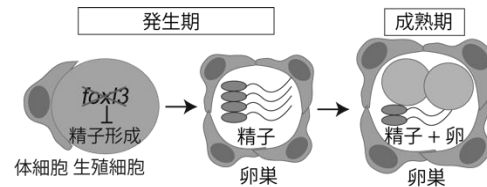


図 2. *foxl3* の機能を欠損した卵巣内での配偶子形成

関わらず、卵の代わりに精子が作られることが明らかとなった。ところが、性成熟した卵巣の中には、精子に加え、卵も作られるようになる。つまり、*foxl3* の機能が欠損した卵巣内では、発生期には精子だけを作っていたのだが、時間が経ち性成熟すると卵も作られるようになる (図 2)。しかし、なぜ卵が作られるのか、そのメカニズムは明らかとなっていない。

野生型オスメダカに対し、高温や絶食、X線照射といったストレスを与えると、精巣の中に卵 (精巣卵) が作られることが知られている。*foxl3* 変異体は精子形成抑制が解除されているので、遺伝的パスウェイはオスに偏り精子を作ろうとする。しかし、その精子が作られる環境はオスとは異なり、卵巣というメスの環境である。このことから精子を作ろうとする生殖細胞にとってメスという環境がストレスとなり、遺伝的パスウェイがゆらぎ、性転換して卵が作られたのではないかと仮説をたてた。つまり、卵の運命が決まる仕組みを明らかにすれば、環境に応答して「ゆらぐ因子」が同定できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、環境に応答した性転換の仕組みを明らかにするためにメダカの卵形成

過程で働く遺伝的パスウェイを調べることで卵の運命が決まる仕組み明らかにし、さらに、その中で環境に応答して「ゆるぐ因子」の同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

卵形成過程で働いている既知の因子 *foxl3* と *figla* が卵決定に関わるのかを明らかにするために、生殖細胞において時期特異的に強制発現できるトランスジェニックメダカを作製し、雄の精巣の生殖細胞で、*foxl3* と *figla* の強制発現を試みた。また *foxl3* の下流で働く因子を探索するために、野生型と *foxl3* 変異体の生殖細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、発現差のある遺伝子のスクリーニングを行なった。

### 4. 研究成果

まずは生殖細胞の卵への運命が決まる仕組みを明らかにするために、正常な卵形成過程で発現している既知の遺伝子 (*foxl3/figla*) が卵形成において積極的に関与するのか検証を行った。*Cre/loxP* システムによるコンディショナルに遺伝子発現誘導が可能なトランスジェニックメダカを用いて、成熟した精巣内の生殖細胞において *foxl3/figla* の発現誘導を試みた。ヒートショックにより *Cre* を発現させ、発現誘導を試みたが、残念ながら精巣において *foxl3/figla* の発現を確認できなかった。今後は、ヒートショックの条件を再検討すると共に、オスの生殖細胞特異的に働くプロモーターを利用することで、*foxl3/figla* の発現誘導を試みる。

次に *foxl3* の下流で働く遺伝子群を調べたところ染色体の構造・動態に関わる因子が含まれていた。そこで、いくつかの遺伝子について CRISPR/Cas9 を用いて機能解析を行った。申請者は、Cas9 の終始コードの直後に *nanos3* の 3'UTR を挿入した *Cas9-nanos3* 3'UTR を作製し、これにより高効

率かつ短期間に生殖細胞における遺伝子機能解析が行える実験系を確立した(論文準備中)。この方法を利用し、*foxl3* の下流で働く候補因子の機能解析を行ったところ、ユビキチンリガーゼをコードする新規遺伝子がメスの生殖細胞特異的な染色体の構造あるいは動態を制御している可能性が示唆された。

今後、オスとメスの生殖細胞における染色体動態を明らかにすると共に、ストレスが染色体動態に何らかの影響を及ぼし、生殖細胞の性転換に関わるのかを明らかにしていく予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Nishimura T, Yamada K, Fujimori C, Kikuchi M, Kawasaki T, Siegfried K R, Sakai N and Tanaka M. Germ cells in the teleost fish medaka have an inherent feminizing effect. **PLOS Genetics** 14(3): e1007259 査読有  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007259>

Shimmura T, Nakayama T, Shinomiya A, Fukamachi S, Yasugi M, Watanage E, Shimo T, Senga T, Nishimura T, Tanaka M, Kamei, Y & Yoshimura T. Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color perception. **Nature Communication** 8: 412, 1-7 (2017) 査読有

Nishimura, T and Tanaka, M. The Mechanism of Germline Sex Determination in Vertebrates. **Biology of Reproduction** 95(1): 30, 1-6 (2016) 査読有  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.138271>

Nishimura, T, Nakamura S, Tanaka, M. A structurally and functionally common unit in

testes and ovaries of medaka (*Oryzias latipes*),  
a teleost fish. **Sexual Development**  
10(3):159-65(2016) 査 読 有  
<https://doi.org/10.1159/000447313>

〔学会発表〕(計 5件)

**Nishimura T** and Tanaka M. Germ cells  
have an inherent property feminizing the gonad  
in medaka. Asian Sex Differentiation Network  
(7th Gonad Biology Joint Meeting, 2017)  
October 16 – 18, 2017 at Nagoya University  
口頭発表

**西村俊哉**、河崎敏広、酒井則良、田中実  
メダカの生殖細胞は身体をメス化する能力  
を元々持っているのか？ 日本動物学会  
第 88 回 富山大会 2017 9月21日-2  
3日 ポスター発表

**西村俊哉**、田中実 生殖質の構成因子  
*nanos3* によるメダカ生殖細胞の性の運命  
決定 第 40 回 日本分子生物学会年会  
2017年12月6日-9日 神戸ポート  
アイランド ポスター発表

**Nishimura T** and Tanaka, M. Follicles are  
not required for feminization of gonads in  
medaka. Cold Spring Harbor Laboratory  
Meeting: GERM CELLS, October 4-8, 2016.  
口頭発表に採択

**西村俊哉**、田中実 メダカにおいて卵胞  
は生殖腺のメス化に必要な 第 39 回  
日本分子生物学会年会 2016年11月  
30日-12月2日 パシフィコ横浜 ポ  
スター発表

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
西村俊哉 (Nishimura Toshiya)  
名古屋大学理学研究科・助教  
研究者番号：10758056

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )