

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19770051

研究課題名（和文）メダカ性分化における細胞増殖因子の役割

研究課題名（英文）Role of growth factors in the sexual differentiation in medaka

研究代表者

北野 健 (KITANO TAKESHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：40336219

研究成果の概要：メダカ性分化において、増殖因子である MIS(Mullerian inhibiting substance)の生理的機能を明らかにするため、アンチセンスオリゴを用いた MIS 及び MIS 受容体の機能阻害実験を行った。その結果、MIS または MIS 受容体の機能阻害により、雌雄の生殖細胞の増殖が完全に抑制された。このことから、MIS は、メダカ性分化時期において、雌雄の生殖細胞の増殖に不可欠な因子であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：メダカ、性分化、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞は、生殖腺以外の領域で発生し、移動して生殖腺原基に定着した後、生殖腺で発現する性決定遺伝子の方向付けに基づいて精子または卵子へと分化していく。近年、いくつかの生物種において性決定遺伝子が同定されているが、種によって異なる転写因子が性決定遺伝子として機能している事が明らかとなっている。興味深い事に、これら遺伝子は共通して生殖腺体細胞で発現している事から、生殖腺体細胞から何らかのシグナルが生殖細胞へと伝わる事で、生殖細胞が精子または卵子へと分化するものと推測

される。しかしながら、生殖腺体細胞から生殖細胞へと送られるシグナル分子の実体は未だに分かっていない。

メダカ (*Oryzias latipes*) は、XY(雄)/XX(雌)型の性決定機構を持つ小型モデル動物である。メダカの生殖細胞は生殖腺へ移動した後に雌雄で増殖を開始し、受精後9日目の雌では減数分裂を開始するが、雄では有糸分裂を停止する(生殖細胞数は、雌で100個前後、雄で50個前後と非常に少ないために解析しやすい)(Hamaguchi, 1982)。近年、転写因子である雄決定遺伝子 DMY が XY 雄における生殖細胞の増殖と減数分裂の開始を

抑制していることが報告されたが(Matsuda et al., 2002)、雌雄の生殖細胞の増殖及び分化を直接制御する因子は同定されていない。一方メダカは、遺伝子導入技術が確立されており、生殖細胞を緑色蛍光(GFP)で可視化した *olvas-GFP* トランスジェニック(Tg)メダカ系統がすでに作製されている事から、生きたままリアルタイムで生殖細胞の変化を観察する事ができる優れた実験動物である(Tanaka et al., 2001)。

2. 研究の目的

本研究では、メダカ性分化時期の雌雄の生殖腺体細胞で発現している細胞増殖因子MIS(Mullerian inhibiting substance; Shiraishi et al., 2008)に着目し、メダカ性分化においてMISがどのような役割を果たしているのかを解明する事を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

*olvas-GFP*Tgメダカ系統の一細胞期の受精卵に、MISまたはMIS受容体のアンチセンスオリゴを顕微注入して、生殖細胞の増殖動態及び減数分裂マーカー遺伝子の発現パターンを調べた(Shiraishi et al., 2008)。

4. 研究成果

(1) MISの *in vivo*における機能解析

olvas-GFP Tgメダカを用いてMIS及びMIS受容体(MISR11)の機能阻害を行い、GFPで可視化した生殖細胞数をカウントした。その結果性分化前(受精後4日目)では、コントロール胚と機能阻害胚の生殖細胞数はほぼ同数であり、性差も認められなかった(FIG. 1A)。また、性分化時期(受精後9日目)において、コントロール個体では、受精後4日目に比べて雌雄両方での生殖細胞数の増加が観察され、XX個体は、XY個体の約2倍の生殖細胞数を示した。一方、MIS及びMISR11機能阻害個体では、雌雄両方ともに生殖細胞数の増加が有意に抑制されていた(FIG. 1A-E)。次に、実際の生殖細胞数をカウントするために組織学的観察を行った。その結果、GFPで可視化した生殖細胞数のカウントと同様に、機能阻害個体では生殖細胞数の増加が抑制されていた(FIG. 1F-J)。さらに、BrdU染色法により生殖細胞の増殖活性を調べた結果、コントロール個体ではBrdU陽性の生殖細胞が多数観察されたが、機能阻害個体では、全生殖細胞数の2-3%しか検出されなかった(Shiraishi et al., 2008)。これらの事からMISは、性分化時期において雌雄両方の生殖

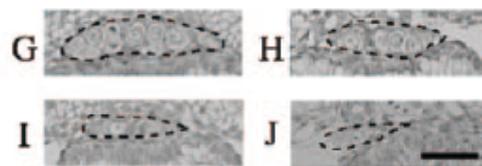
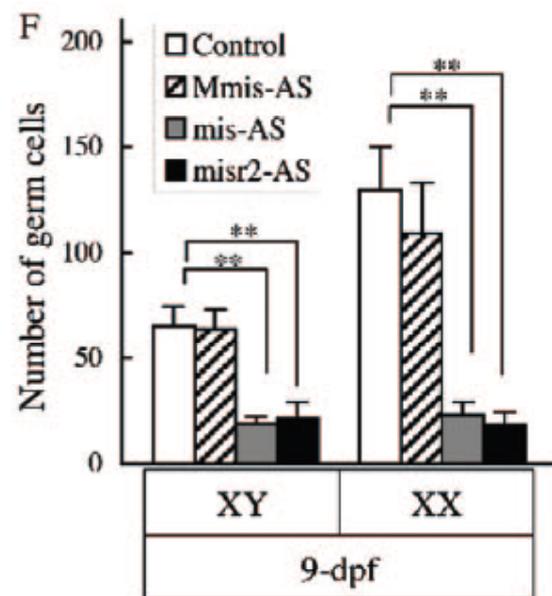
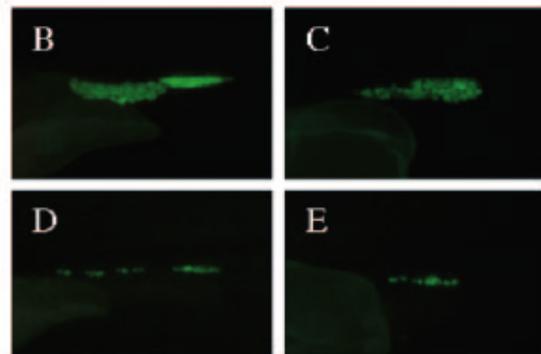
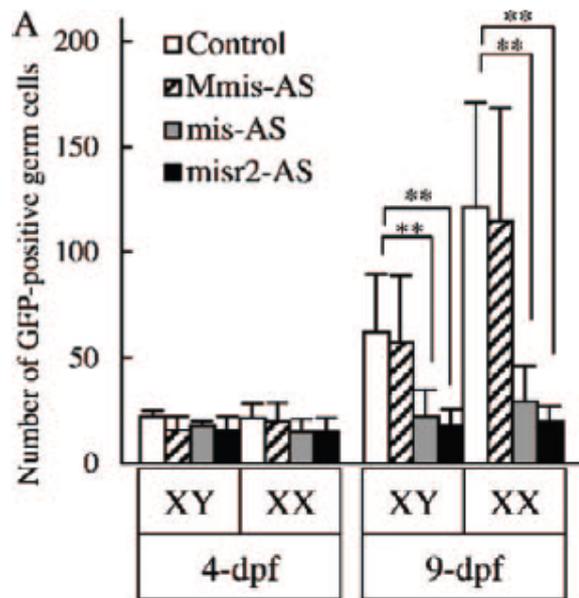


FIG. 1. Number of germ cells in MIS- and MISRII-defective embryos in medaka. A, Number of GFP-positive germ cells in the individuals uninjected (control), or injected with *mis-AS*, *Mmis-AS*, or *misr2-AS*. Results are expressed as mean SEM of GFP-positive germ cell number (n=5; **, $P < 0.01$). Photographs show GFP fluorescent germ cells in 9-dpf embryos (XX individuals) uninjected (B), or injected with *Mmis-AS* (C), *mis-AS* (D), or *misr2-AS* (E). F, Number of germ cells in the individuals uninjected (control), or injected with *mis-AS*, *Mmis-AS*, or *misr2-AS*. Results are expressed as mean + SEM of germ cell number (n=5; **, $P < 0.01$). Photographs show germ cells in 9-dpf embryos (XX individuals) uninjected (G), or injected with *Mmis-AS* (H), *mis-AS* (I), or *misr2-AS* (J). Dotted lines indicate the outline of the gonadal regions. Scale bar represents 20 μ m.

細胞の増殖に必須である事が明らかとなった。

(2) MISの *in vitro*における機能解析

MISが生殖細胞の増殖を誘導できるかどうかを明らかにするため、リコンビナントウナギMIS(r-eSRS21)をメダカ生殖腺培養系に投与して、生殖細胞数をカウントした。その結果、コントロール個体においては、r-eSRS21の濃度依存的に生殖細胞数が増加する事が明らかとなった(FIG. 2)。また、MIS機能阻害個体の生殖腺を培養した場合でも、r-eSRS21の濃度依存的に生殖細胞数が増加した(FIG. 2)。さらに、MISRII機能阻害個体の生殖腺を培養したところ、生殖細胞数の増加が全く認められなかった事から、MISはMISRIIを介して機能している可能性が示唆された。

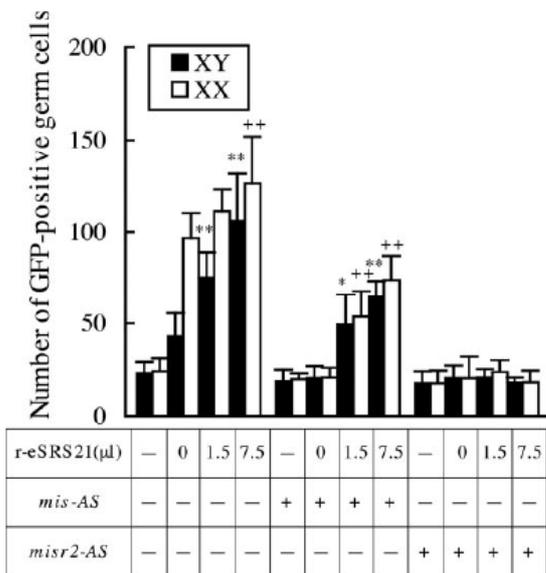


FIG. 2. Effect of recombinant MIS on germ cell proliferation *in vitro*. The germ cells in the tissue fragments treated with r-eSRS21 protein or without (control) for 3 d were counted. Results are expressed as mean + SEM of GFP-positive germ cell number (n=5; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ when compared with the XY control, ++, $P < 0.01$ when compared with the XX control). -, Number of the germ cells before culture.

(3) MIS及びMISRII機能阻害個体における減数分裂マーカー遺伝子の発現解析

メダカの生殖細胞は、孵化時期において、雌では減数分裂を開始するが、雄では有糸分裂を停止する(Hamaguchi, 1982)。そこで、この減数分裂開始におけるMISの役割を明らかにするため、孵化時期(受精後9日目)におけるMIS及びMISRII機能阻害個体の生殖腺領域を使って、RT-PCR解析を行った。その結果コントロールXX個体では、減数分裂マーカーである*syncp1*(*Synaptonemal complex protein 1*) mRNAの発現が確認されたが、MIS及びMISRII機能阻害XX個体では、この発現が抑制されていた(data not shown)。また、調べたすべてのXY個体では、*syncp1* mRNAの発現が検出されなかった。

これらのことから、メダカMISシグナリングは、性分化時期における雌雄両方での生殖細胞の増殖と、雌での減数分裂開始に必須であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

- (1) Shiraishi E., Yoshinaga N., Miura T., Yokoi H., Wakamatsu Y., Abe S. and Kitano T. Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*).

Endocrinology (査読有)149, 1813-1819, 2008

- (2) Yazawa T., Uesaka M., Inaoka Y., Mizutani T., Sekiguchi T., Kajitani T., Kitano T., Umezawa A. and Miyamoto K. Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway.

Endocrinology (査読有)149, 1786-1792, 2008

- (3) Yamaguchi T., Yamaguchi S., Hirai T. and Kitano T. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** (査読有)359, 935-940, 2007
- (4) Kitano T., Yoshinaga N., Shiraishi E., Koyanagi T. and Abe S. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Mullerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). ***Mol. Reprod. Dev.*** (査読有)74, 1171-1177, 2007

[学会発表](計 11 件)

- (1) Kitano T (Invited). Toxicogenomics and sexual differentiation in fish. 4th International Conference on Toxicogenomics (Incheon, Korea). November 7-8, 2008
- (2) Shiraishi E., Miura T., Abe S. and Kitano T. Role of Mullerian inhibiting substance on gonadal sex differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (St Malo, France), 3-8 June, 2007
- (3) Shirozu, T., Shiraishi E., Yoshinaga N., Kanamori A., Kubo Y., Hori H. and Kitano T. The mechanism of transcriptional regulation of Mullerian inhibiting substance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (St Malo, France), 3-8 June, 2007
- (4) Yamaguchi T. and Kitano T. The mechanism of transcriptional regulation of P450 aromatase gene by Foxl2 in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (St Malo, France), 3-8 June, 2007

[図書](計 1 件)

- (1) Kitano T. and Abe S.-I. Involvement of endocrine and environmental factors in gonadal sex differentiation in fish. ***Fish Reproduction*** pp421-434 (2007)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

北野 健 (KITANO TAKESHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：4 0 3 3 6 2 1 9