

機関番号：82648

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870054

研究課題名（和文） ショウジョウバエ生殖細胞系列における性決定機構

研究課題名（英文） Mechanism regulating sex determination of the germline progenitors in *Drosophila*

研究代表者

橋山 一哉 (HASHIYAMA KAZUYA)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：20546949

研究成果の概要（和文）：

生殖系列の性は生殖巣に取り込まれた後、周囲の体細胞からのシグナルで決まると考えられている。本研究において、申請者は *Sex lethal (Sxl)* 遺伝子が生殖巣に取り込まれる以前の始原生殖細胞において、雌胚特異的に発現することを見出した。*Sxl* を異所的に雄胚の始原生殖細胞で発現させ、雌胚に移植すると、卵巣中で正常に卵形成を起こし、次世代が生まれた。この結果は、*Sxl* がショウジョウバエの生殖細胞の雌分化に必要なかつ十分な因子であることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Germline sex is imposed by surrounding soma after gonad formation. Here, we found that *Sex lethal (Sxl)* gene is expressed in the migrating PGCs in a female (XX) specific manner. To examine whether *Sxl* is able to induce female fate in the male (XY) PGCs, we expressed *Sxl* in XY PGCs. Then we transplanted the XY PGCs into normal female embryos and examined their fate. The feminized germline contributed progeny production. This suggests that *Sxl* is both required and sufficient for the female fate in the germline.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ・生殖細胞・性決定

1. 研究開始当初の背景

生殖系列の細胞は卵または精子に分化するために、性を決定する。最近のモデルでは、ショウジョウバエにおいても、マウスと同様に、生殖系列の性は生殖巣に取り込まれた後、周囲の体細胞からのシグナルにより決定されると考えられている。

雄では、生殖巣を形成後、周囲の体細胞からの JAK/STAT シグナルにより、生殖系列で雄特的な遺伝子の発現が開始する。一方、雌においては、周囲の体細胞からのシグナルは知られておらず、JAK/STAT シグナルを受けないことが、雌の性分化のスイッチになっていると考えられていた。また、生殖巣に取り囲まれるまでの期間、始原生殖細胞で性差が存在するか否かは明らかにされていない。

申請者は、生殖巣に取り囲まれる以前の始原生殖細胞において、雌胚特異的に *Sex lethal* (*Sxl*) 遺伝子が発現することを明らかにした。これは、雌の生殖系列の性分化が予想よりも早期に、生殖系列自律的に開始する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、雌胚特異的に始原生殖細胞で発現する *Sxl* 遺伝子が生殖系列の雌分化に関与するか否かを明らかにする。

Sxl 遺伝子の強制発現、及び機能阻害実験を行い、生殖細胞の性分化を調べ、*Sxl* 遺伝子の影響を検証した。また、生殖系列において *Sxl* 遺伝子がどの様に発現が制御されているのか、また、*Sxl* 遺伝子がどのような遺伝子を制御するのかを調べた。得られた結果は、今まで明らかにされていなかった、生殖系列の性決定機構を解き明かす基盤となると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの始原生殖細胞において、雌胚特異的に *Sxl* 遺伝子が発現する。*Sxl* 遺伝子の発現時期をより詳細に調べるため、各発生ステージの胚より、始原生殖細胞を取り出し、RT-PCR を行った。

(2) ショウジョウバエの生殖系列において、SUMO 化修飾に関わる *lesswright* (*lwr*) 遺伝子の機能を阻害すると、雌胚特異的に始原生殖細胞がアポトーシスを起こす。この現象は始原生殖細胞で最初に観察される雌の特徴である。そこで、*Sxl* 遺伝子が始原生殖細胞の雌化を引き起こすか否かを明らかにするため、雄胚の始原生殖細胞で *Sxl* 遺伝子を強

制発現させ、*lwr* 遺伝子の機能を阻害した。

(3) *Sxl* 遺伝子が、始原生殖細胞の雌化に必要なか否かを明らかにするため、*Sxl* 機能欠損変異体において、*lwr* 遺伝子の機能を阻害した。

(4) 始原生殖細胞の性分化を解析するため、始原生殖細胞の移植実験を行った。ドナー側には GFP 陰性の系統を用い、ホスト側には GFP 陽性の系統を用いた。移植時期は、胚発生ステージ 5/6 の胚を用いた。移植後、ホストの胚を成虫まで発生させて、成虫卵巣において、GFP 陰性の細胞(ドナー細胞)の性分化を調べた。Gal4/UAS システムを用い、① 胚発生ステージ 16 より成虫まで、② 胚発生ステージ 9 より成虫まで、③ 胚発生ステージ 9 より 16 までと、発現時期を変えて *Sxl* 遺伝子を強制発現させた。*Sxl* 遺伝子を強制発現させた、雄胚の始原生殖細胞を雌個体に移植し、生殖系列の性分化を調べた。

(5) 雌個体の始原生殖細胞特異的に *Sxl* 遺伝子の RNAi を行い、生殖系列の性分化を調べた。ショウジョウバエの Gal4/UAS システムを用い、生殖系列特異的に *Sxl* 遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現させた。この雌個体の成虫卵巣を取り出し、卵形成への影響を観察した。

(6) 体細胞においても *Sxl* 遺伝子は雌胚特異的に発現する。体細胞では転写因子 *Da*, *Sc*, *SisA* 遺伝子とその発現に関与することが知られている。これら変異体の胚を用いた、*in situ* hybridization 法を行い、始原生殖細胞における *Sxl* 遺伝子の発現に、これら転写因子が関与するか否かを調べた。

(7) *Sxl* 遺伝子による生殖系列の雌化の効果と、周囲の体細胞による雄化シグナルのどちらが優位に働くのかを調べる為に、生殖系列で *Sxl* 遺伝子を発現させた雄個体の生殖系列の性分化を観察した。

(8) SXL 蛋白質は、RNA に結合し、下流遺伝子のスプライシングや翻訳を制御することが知られている。抗 SXL 抗体を用いて、免疫沈降実験を行い、SXL 蛋白質が始原生殖細胞中で、どのような RNA に結合し、雌分化を引き起こしているのかを調べた。

4. 研究成果

(1) 胚発生ステージ 4~17 までの胚から、FACS 法を用いて、始原生殖細胞を単離した。この始原生殖細胞から mRNA を抽出し、cDNA 合成を行った。この cDNA を鋳型として、*Sxl* 遺伝子の RT-PCR を行った。その結果、胚発生ステージ 8/9~13/14 までの期間において、*Sxl*

遺伝子の発現が観察された。以上の結果より、雌胚において、生殖巣への移動中の始原生殖細胞で、*Sxl* 遺伝子が発現することが明らかとなった。ショウジョウバエの始原生殖細胞においては、胚発生ステージ 4~7 までの期間、RNA ポリメラーゼが不活性化されていることが知られている。よって、*Sxl* 遺伝子は RNA ポリメラーゼの活性化に伴い、速やかに転写が開始すると考えられる。

(2) ショウジョウバエの Gal4/UAS システムを用いて、始原生殖細胞特異的に、*Sxl* 遺伝子を強制発現させた。雄胚で *Sxl* 遺伝子を発現させた場合では、始原生殖細胞数の減少は観察されなかった。しかし、雄胚で、*Sxl* 遺伝子を発現させ、*lwr* 遺伝子の機能を阻害すると、雌胚と同様に、始原生殖細胞がアポトーシスを起こし、細胞数が減少した。以上の結果は、*Sxl* 遺伝子を発現させると、雄胚の始原生殖細胞が雌化することを示している。

(3) *Sxl* 機能欠損変異体を用いて、*lwr* 遺伝子の機能を阻害した。その結果、雌胚の始原生殖細胞において、アポトーシス及び、細胞数の減少は観察されなかった。以上の結果は、*Sxl* 遺伝子発現は、始原生殖細胞の雌化に必要であることを示している。

(4) 移植実験の結果、② 胚発生ステージ 9 より成虫まで、及び③ 胚発生ステージ 9 より 16 までの期間、*Sxl* 遺伝子を強制発現させた雄の生殖系列は、卵巣中で卵形成が観察された。一方、*Sxl* 遺伝子を強制発現しない場合、及び ① 胚発生ステージ 16 より成虫まで強制発現させた場合では卵形成は観察されなかった。以上の結果は、胚発生ステージ 9~16 までの期間、*Sxl* 遺伝子が発現することで、雄の生殖系列が雌への性転換を起こすことが明らかとなった。また、雌化した生殖系列から、次世代がうまれることも確認した。*Sxl* 遺伝子は、一遺伝子の発現を誘導するだけで、完全に生殖系列が性転換する、初めての例である。今後、生殖系列の性転換によってうまれた次世代に、異常が無いか詳細に解析し、不妊治療への応用を目指したい。

(5) 胚発生ステージ 9~16 までの始原生殖細胞において、RNAi 法を用い、*Sxl* 遺伝子の機能を抑制した。その結果、卵巣中で卵形成が観察されなかった。異常の見られた、生殖系列は、卵巣中で腫瘍を形成し、細胞死を起こした。以上の結果は、*Sxl* 遺伝子の機能が雌の生殖細胞の性分化に必要であることを示している。

(6) 体細胞において、*Sxl* 遺伝子の転写活性化に関与する、*Da*, *Sc*, *SisA* 遺伝子の生殖系列における *Sxl* 遺伝子の発現への関与を調べた。

その結果、*Da* 機能欠損変異体では、雌胚の始原生殖細胞において、*Sxl* 遺伝子の発現は減少した。一方、*Sc* 機能欠損変異体及び、*SisA* 機能欠損変異体では、雌胚の始原生殖細胞における *Sxl* 遺伝子の発現は正常に観察された。以上の結果より、始原生殖細胞における *Sxl* 遺伝子の発現は、体細胞とは異なるメカニズムで制御されていることを示している。現在、*Sxl* 遺伝子の上流でどの様な遺伝子が働いているのか解析を進めている。

(7) 生殖系列で *Sxl* 遺伝子を強制発現させた雄個体では、正常に精子形成が観察された。この結果は、周囲の体細胞からの雄化シグナルは *Sxl* 遺伝子による雌化よりも優位に働くことが明らかとなった。

(8) SXL 蛋白質に対する抗体を用いて、免疫沈降実験を行った。その結果、複数の RNA に優位に結合することが明らかとなった。現在、これら遺伝子が実際に SXL 蛋白質によって制御を受けるのか否かを解析している。

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)

[学会発表] (計 5 件)

① Kazuya Hashiyama, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi. *Sex lethal* acts autonomously in the primordial germ cells to initiate female fate in *Drosophila*. March 28, 2011 Heinrich-Heine Universität, Dusseldorf, Germany. (Invited seminar)

② Kazuya Hashiyama, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi. *Sex lethal* acts autonomously in the primordial germ cells to initiate female fate in *Drosophila*. March 24, 2011 JSDB/Gfe Joint meeting, Dresden, Germany. (Oral presentation)

③ Kazuya Hashiyama, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi. *Sex lethal* acts autonomously in the primordial germ cells to initiate female fate in *Drosophila*. March 21, 2011 IRB-Barcelona, Barcelona, Spain. (Invited seminar)

④ Kazuya Hashiyama, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi. *Sex lethal* acts autonomously in the germline progenitors to initiate female development in *Drosophila*. October 14, 2010 Carnegie

institution, Baltimore, U. S. A. (Oral presentation)

⑤ Kazuya Hashiyama, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi. *Sex lethal* acts autonomously in the germline progenitors to initiate female development in *Drosophila*. October 6, 2010 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, New York, U. S. A. (Poster presentation)

⑥ Kazuya Hashiyama, Yoshiki Hayashi, Satoru Kobayashi. Mechanism regulating sex determination of the germline progenitors in *Drosophila*. August 5, 2010 Sattellite Symposium to SDB and JSDB joint meeting, Albuquerque, U. S. A. (Oral presentation)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋山 一哉 (HASHIYAMA KAZUYA)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：20546949