

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22132007

研究課題名（和文）生殖腺の性差構築と維持機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of sexual differentiation and maintenance of the gonad

研究代表者

田中 実（Tanaka, Minoru）

基礎生物学研究所・生殖遺伝学研究室・准教授

研究者番号：80202175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,200,000 円

研究成果の概要（和文）：身体が作られる過程において、雌雄の決定（性決定）はまず体細胞で行われる。この影響を受けて生殖細胞は卵になるか精子になる（生殖細胞の性決定）が、生殖細胞内でどのようなメカニズムによって性が決まるかは不明であった。本研究の結果、遺伝的制御の基盤が明らかとなり、身体の性決定前から生殖細胞にはY染色体依存的な性差があることが明らかとなった。さらに最終的に卵か精子になるスイッチ遺伝子の同定に成功し、スイッチを切り替えると、卵巣内で機能的な精子が作られる。また適切な性分化のためには、内分泌制御によってゲノムワイドにエピゲノム状態が影響されることが必要で、その制御が乱れると性転換が生じるとの知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：During development from the fertilized eggs, sex is first determined by the somatic cells. The somatic sex affects the fate of germ cells to develop into sperm or eggs (germ cell sex). However, nobody knows the mechanism in the germ cells which determines the fate (sperm or eggs). We revealed that medaka germ cell exhibits sexually different character before somatic sex is determined. Furthermore on the first time in vertebrates, we successfully identified the gene responsible for the fate decision in medaka germ cells. In the absence of the gene function, medaka develop the ovary ull of functional sperm, indicating that repression of initiation of the spermatogenesis is an essential component of the mechanism that determines the sex in germ cells. We also obtained the evidence that epigenetic regulation is important for proper manifestation of sex and that the sex is affected by an environmental factor(s) like nutrient restriction.

研究分野：生殖生物学

キーワード：性決定 性の維持 生殖細胞 メダカ

1. 研究開始当初の背景

動物個体の性差は、精巣と卵巣に性ホルモン産生細胞が分化するまでの「遺伝的制御」と、性ホルモンを中心とする制御によって個体全域で進む「内分泌制御」からなる。これら二つの制御は、共に時間・空間的かつ階層的な遺伝子発現のもとに進行し、重層して働くことにより、性差が構築されると考えられた。しかしながら、性差構築における具体的な制御の詳細は明らかではなかった。

一方、硬骨魚のメダカは性決定遺伝子によって性が決まり性差が構築される。このとき生殖細胞が制御されなくては、性決定遺伝子の指示した性へと分化しないことが知られる。すなわち、生殖細胞が性差構築では重要な細胞であることが知られていた。その一方で、ステロイドホルモン投与によっても性決定遺伝子の指示する性とは反対の性へと転換することも知られていた。

2. 研究の目的

以上の背景は、メダカの生殖細胞は、性差構築の制御を「遺伝的制御」と「内分泌制御」の観点から性差構築の分子基盤を解析するにはよい系であることを示している。そこで「遺伝的制御」の因子である AMH に焦点を当てつつ、生殖細胞での性差確立における「遺伝的制御」を明らかにする。またステロイドホルモン投与による性転換現象を解析することを通じて、生殖細胞における「内分泌制御」を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

AMH シグナルの変異体を用いて、生殖細胞の性差確立の分子メカニズムを明らかにする。また生殖細胞を蛍光で可視化したトランスジェニックメダカから生殖細胞のみをセルソーターで純化し、雌雄遺伝子発現プロファイルを網羅的に得て比較解析、さらに候補因子の変異体を作製することにより生殖細胞に性差をもたらす「遺伝的制御」を解明する。

また「内分泌制御」の観点からステロイドホルモン投与時の性転換の詳細な現象と、生殖細胞での遺伝子発現等とを解析する。

4. 研究成果

以下の 1-5 に示す具体的成果が得られた。この結果、生殖細胞の性差形成における遺伝的制御の重要な因子の同定され、内分泌制御がエピゲノム状態を介して性差形成に関与するというきわめて重要な知見が得られた。

(1)体細胞による性決定前の生殖細胞にも遺伝的基盤による性差が存在することを脊椎動物で初めて示し、それに関与する遺伝子の同定に成功した。この性差は Y 染色体上の性決定遺伝子には依存しないが、同じく Y 染色

体上に発見された *Sdgc* によって影響され、生殖細胞の分裂能力が雌雄で異なることが見出された (Development 2014)。

(2)AMH シグナルは生殖幹細胞数を制御することで性差をもたらすという分子メカニズムを解明した。まず、卵巣にも生殖幹細胞がいることを脊椎動物で初めて証明した。そして哺乳類ではミューラー管の退縮に関与するとして知られる AMH シグナルが、この生殖幹細胞の増殖を制御することを明らかにした。AMH シグナルは支持細胞間で働き、生殖細胞に直接作用しないが、このシグナルが欠如すると生殖幹細胞が増殖した。その結果、メダカは Y 染色体を持っていても卵巣が発達し雌へと性転換する (Science 2010, Development 2012)。

(3)生殖細胞の性決定遺伝子の同定

体細胞側で性決定遺伝子が発現した後になると、生殖細胞内で遺伝子 *foxl3* の発現が抑制され、生殖細胞は精子形成へと運命決定することが明らかとなった。すなわち、生殖細胞の性決定の分子メカニズム(「遺伝的制御」)が脊椎動物として初めて明らかとなり、ここでは *foxl3* の精子形成抑制機能が重要である。ひとたび生殖細胞内で性が決定すると、精子形成は雄の体細胞非依存的であり、その結果、*foxl3* 変異体の雌 (XX) では、卵巣中に精子が形成される。機能的な精子形成に「内分泌制御」としての女性ホルモンは影響しないことを示している (Science 2015)。

(4)エピゲノム状態を介した性の制御

一方、アンドロゲンを投与して XX 個体を雄に性転換させ、この精子を通じて世代を継いでいくと、性転換体 XX 雄が 5 世代に渡って出現し続けることが明らかになった。この XX 精子の DNA メチル化をゲノムワイドに調べると、メチル化変異も世代を超えて受け継がれていることが見出された。このことは個体の性差出現(この場合オス化)に必要な遺伝子が、「内分泌制御」の攪乱によってエピゲノム状態(「遺伝的制御」)に異常が生じ、雄化がもたらされることを示唆する(論文準備中)。

(5)哺乳類雄化遺伝子 *Sox9* は生殖細胞維持に関与する。*Sox9* は哺乳類の性決定遺伝子 SRY の直接のエフェクター遺伝子である *Sox9* のメダカホモログ *Sox9b* は、生殖細胞の維持に関わることを示した。変異体では生殖細胞が

維持されなくなるため哺乳類とは逆の雄化の表現型を示す。このことは、性決定の主要なカスケードは哺乳類と他の動物とは異なることを示している。またメダカ性決定遺伝子の *Dmrt1* による発現制御を共同研究で明らかにした(PLoS Genet 2010, PLoS One 2012)。

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 17 件)

Nishimura, T., Sato, T., Yamamoto, Y., Watakabe, I., Ohkawa, Y., Suyama, M., Kobayashi, S. and Tanaka, M. *foxl3* is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science* (2015) in press. (査読有)

Nishimura, T., Herpin, A., Kimura, T., Hara, I., Kawasaki, T., Nakamura, S., Yamamoto, Y., Saito, T.L., Yoshimura, J., Morishita, S., Tsukahara, T., Kobayashi, S., Naruse, K., Shigenobu, S., Sakai, N., Schartl, M. and Tanaka, M. Analysis of a novel gene, *Sdgc*, reveals sex chromosome-dependent differences of medaka germ cells prior to gonad formation. *Development* (2014) 141, 3363-3369. doi: 10.1242/dev.106864 (査読有)

Okuyama, T., Yokoi, S., Abe, H., Isoe, Y., Suehiro, Y., Imada, H., Tanaka, M., Kawasaki, T., Yuba, S., Taniguchi, Y., Kamei, Y., Okubo, K., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H. A Neural Mechanism Underlying Mating Preferences for Familiar Individuals in Medaka Fish. *Science* (2014) 343, 91-94. doi: 10.1126/science.1244724. (査読有)

Nishimura, T. and Tanaka, M. Gonadal Development in Fish. *Sex. Dev.* (2014) 8, 252-261. doi:10.1159/000364924. (invited review) (査読有)

Tanaka, M. Vertebrate female germline – the acquisition of femaleness. *WIREs Dev. Biol.* (2013) vtotal 8 pages (online 出版 : ページ数等なし) doi: 10.1002/wdev.131 (invited review) (査読有)

Herpin, A., Adolphi, M.C., Nicol, B., Hinzmann, M., Schmidt, C., Klughammer, J., Engel, M., Tanaka, M., Guiguen, Y. and Schartl, M*. Divergent expression regulation of gonad development genes in medaka shows incomplete conservation of the downstream regulatory network of vertebrate

sex determination. *Mol. Biol. Evol.* (2013) 30, 2328-2346 doi:10.1093/molbev/mst130 (査読有)

Capel, B. and Tanaka, M. Forward to the Special Issue on Sex Determination. *Dev. Dyn.* (2013) 242. 303-306. Forward on the special issue of ‘sex determination’, edited by Capel and Tanaka. doi: 10.1002/dvdy.23937 (査読有)

Kobayashi, K., Kamei, K., Kinoshita, M., Czerny, T. and Tanaka, M. A heat-inducible cre/loxP gene induction system in medaka. *Genesis* (2013) 51, 59-67. doi: 10.1002/dvg.22348 (査読有)

Ichimura, K., Bubenshchikova, E., Powell, R., Fukuyo, Y., Nakamura, T., Tran, U., Oda, S., Tanaka, M., Wessely, O., Kurihara, H., Sakai, T. and Obara, T*. A Comparative Analysis of Glomerulus Development in the Pronephros of Medaka and Zebrafish. *PLoS ONE* (2012) 7, e45286. total 12 pages. doi:10.1371/journal.pone.0045286 (査読有)

Nakamura, S., Watanabe, I., Nishimura, T., Picard, J-Y., Toyoda, A., Taniguchi, Y., di Clemente, N. and Tanaka, M. Hyperproliferation of mitotically active germ cells dues to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development* (2012) 139, 2283-2287. doi:10.1242/dev.076307 (査読有)

Nakamura, S., Watanabe, I., Nishimura, T., Toyoda, A., Taniguchi, Y. and Tanaka, M. Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS ONE* (2012) 7, e29982. total 12 pages. doi:10.1371/journal.pone.0029982. Faculty of 1000 “RECOMMENDED” (査読有)

Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. and Tanaka, M. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* (2010) 328, 1561-1563. doi:10.1126/science.1185473 Faculty of 1000 “MUST READ” (査読有)

Herpin, A., Braasch, I., Kraussling, M., Schmidt, C., Thoma, E.C., Nakamura, S., Tanaka, M. and Schartl, M. Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene duplicate by transposable elements. *PLoS*

Genetics (2010) 6, e1000844. doi:10.1371/journal.pgen.1000844 (査読有)

〔学会発表〕(計 19 件) 以下主たるもの。

Tanaka, M. (Invited Talk and Session Chair) “Germline Sex Determination in Medaka” The 7th International Symposium of Vertebrate Sex Determination. April 17. (2015) Kona, HI (USA).

Tanaka, M. (Invited Talk) “Mechanism of Sex Differentiation in Fish” INRA symposium February 9. (2015) Rennes (France).

田中実、北野潤 (主催) 第 85 回日本動物学会大会シンポジウム 性と生殖「繁殖システム多様化の遺伝・生理機構」2014 年 9 月 12 日 東北大学、仙台市、宮城県

Tanaka, M. (Invited Talk) “Germ Cells and Sex Determination” The 46th SSR Meeting (全米生殖学会) July 25. (2013) Montreal, Quebec (Canada).

田中実、北野潤 (主催) 第 84 回日本動物学会大会シンポジウム 性と生殖「魚類における性的二型の進化機構」2013 年 9 月 28 日 岡山大学、岡山市、岡山県

Tanaka, M. ‘Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost, Medaka’ International Symposium, Endocrine Organ and Stem Cells (日本比較内分泌学会、神経内分泌学会合同大会 (Plenary Lecture) November 25. (2011) 都道府県会館、千代田区、東京 (Japan).

Tanaka, M. “Ovarian Structure that support reproductive cycle – Germline stem cells and their niche structure in ovary” 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Plenary Lecture) August 11, (2011) Cochin (India).

Tanaka, M. “The Plasticity of Sex” JSDB-SDB Joint-Meeting (全米発生生物学会、日本発生生物学会合同大会 Invited Talk) August 7, (2010) Albuquerque, NM (USA).

〔図書〕(計 5 件)

田中実 S.Gilbert 著「発生生物学 (Developmental Biology) 第 10 版」性決定の章の翻訳 (2015) メディカル・サイエンス・インターナショナル pp. 525-554 (total 835 pages), ISBN978-4-89592-805-2.

田中実 特集「愛と性の科学」-「性が変わる能力」岩波書店 雑誌「科学」2014 年 7 月号, pp.764-768 (total 86 pages). 雑誌コード 02317-07.

Tanaka, M. Molecular and Cellular Bases of Sexual Flexibility in Vertebrates. In ‘New Principles in Developmental Processes (eds: Kondoh, H. and Kuroiwa, A.)’ Springer Japan. (2014) pp.265-278. (total 321 pages) ISBN 978-4-431-54633-7. DOI 10.1007/978-4-431-54634-4.

Nishimura, T. and Tanaka, M. Function of Germ Cells in Sex Differentiation. In ‘Sexual Plasticity and Gametogenesis in Fishes (ed: Subramanian, S)’ Nova Biomedical. NY. (2013) pp.291-304. ISBN 978-1-62618-848-8.

Naruse, K., Tanaka, M. and Takeda, H. (eds) “Medaka” a model for organogenesis, human disease, and evolution. total 387 pages. Springer-Verlag, Tokyo (2011) ISBN 978-4-431-92690-7.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 魚類の生殖細胞の性決定方法、性判別方法、被検物質の性分化の攪乱作用の評価方法、生殖細胞、魚類個体、配偶子、及び培養細胞

発明者: 西村俊哉、田中実

権利者: 自然科学研究機構

番号: 特願 JP2014-241331

出願年月日: 2014/11/28

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

基礎生物学研究所 生殖遺伝学研究室 HP

<http://www.nibb.ac.jp/reprogenetics/>

アウトリーチ活動

- ・ 小学校メダカ授業 岡崎市立竜美丘小学校 7 年間 (2009-2015) にわたって毎年実施 岡崎市、愛知県
- ・ 市民公開シンポジウム「性の不思議—女と男」(企画・司会) 2013 年 12 月 21 日 九州大学、福岡市、福岡県
- ・ 三河地区高校理科教育研究会「性と生殖細胞」2013 年 2 月 5 日 基礎生物学研究所、岡崎市、愛知県
- ・ 市民公開シンポジウム「性の不思議—女と男」(企画・司会) 2011 年 9 月 24 日 札

幌市、北海道

- ・ 国研セミナー（ロータリークラブ講演）
「雄・雌はどのようにして決まるのだろうか？- 光らせたメダカを用いた性分化の研究から」2010年6月25日基礎生物学研究所、岡崎市、愛知県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 実 (Tanaka, Minoru)
基礎生物学研究所・生殖遺伝学研究室・
准教授
研究者番号：80202175

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小林 悟 (Kobayashi, Satoru)
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・教授
研究者番号：90225508