

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23749

研究課題名(和文) FOXL3共因子の網羅的同定による生殖細胞の性決定機構の解明

研究課題名(英文) Underlying mechanism of germline sex determination by FOXL3 and its co-factors

研究代表者

菊地 真理子 (Kikuchi, Mariko)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：20845135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：FOXL3が直接発現を誘導する因子(FBX047、REC8A)の変異体を作成し、その表現型を調べた。fbxo47変異体はメスのみが不稔となり、卵巣内には卵胞が欠失していた。fbxo47変異体の染色体は末端部がつながったリング状の異常形態を呈していた他、生殖細胞の精子形成への運命転換が認められた。rec8a変異体も雌性不稔となり減数分裂の進行に異常が認められた。これらの結果から、FOXL3の下で生殖細胞のメス化イベント(卵胞形成、精子形成抑制、減数分裂)を開始させる分子経路が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

REC8AとFBX047はそれぞれ染色体の高次構造とタンパク質分解に関わる因子であり、これらの事象と生殖細胞の性決定との関連が本研究で初めて示された。今後REC8AとFBX047の機能を詳細に調べることで、生殖細胞の性を決める仕組みと卵を作り出す仕組みが分子レベルでより詳細に明らかになると考えられる。そして卵や精子への経路を決める仕組みが明らかになれば、畜産・水産業において家畜や養殖魚の繁殖効率上昇や、生殖医療技術の改善につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Using CRISPR/Cas9 system, I generated medaka mutant lines of fbxo47 and rec8a, direct targets of FOXL3. fbxo47-mutant females were sterile, while males were fertile. The mutant ovaries lacked follicles, and chromosome in germ cells exhibited ring-like morphology possibly caused by telomere fusion. Furthermore, the fbxo47-mutant germ cells committed into spermatogenesis, suggesting that FBX047 has a role in suppression of spermatogenesis. rec8a-mutant females were also sterile, and progression of meiosis was severely defected in germ cells. These results firstly revealed the molecular pathways that initiates several events in female germ cells (e.g. folliculogenesis, suppression of spermatogenesis, and meiosis progression).

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖細胞 性決定 卵形成 メダカ

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖細胞は卵と精子の元となる細胞であり、体の性に合わせて自身の性を決める仕組みを備えていると考えられる。硬骨魚類メダカを用いた研究から、生殖細胞の性決定因子として転写因子 FOXL3 が同定された (Nishimura T, 2015, Science)。しかしながら、FOXL3 がどのような分子機構を発動して生殖細胞の性を決めるのかは解明されていなかった。

(2) 申請者らの研究から、FOXL3 が制御する因子の一部はクロマチン制御因子であること、また FOXL3 結合配列が特定の遺伝子発現を制御するには複雑性が低いことが明らかになった (Kikuchi T, 2019, DevBiol)。これらの結果から、FOXL3 が何らかの共因子と相互作用してクロマチンの性的二型を制御し、性特異的な遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 免疫沈降および質量分析法 (IP-MS) を用いて FOXL3 の共因子を網羅的に探索する。これにより明らかになった共因子の機能解析を通じて、生殖細胞の性決定を司る FOXL3 の作用機序を解明し、FOXL3 がクロマチンの性的二型構築に関わる可能性を検証する。

(2) RNA-seq により明らかになった FOXL3 下流因子 (FBXO47、REC8A) の機能解析を通じて、生殖細胞のメス化を開始させる分子経路を明らかにする。また、クロマチン制御因子である REC8A と REC8B が性特異的に減数分裂を制御する可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降に用いる抗 FOXL3 抗体は既に作製済みであったため (Kikuchi T, 2019, DevBiol)、FOXL3 発現細胞を多く含む *meioC* 変異体メダカ (Nishimura T, 2018, PLoS Genet) の卵巣からタンパク質を抽出し、IP サンプルの調製条件を検討した。IP サンプルが MS に利用可能であることの判定基準として、IP サンプルのウェスタンブロッティングにより FOXL3 タンパク質が検出できることを指標とした。

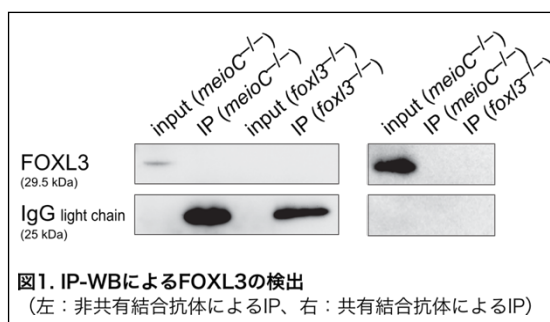
(2) RNA-seq により同定された FOXL3 下流因子 (FBXO47、REC8A) の変異体を CRISPR/Cas9 法を用いて作製し、その表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) 抗 FOXL3 抗体を用いた免疫沈降の条件検討

meioC 変異体メダカおよび *foxl3* 変異体メダカ (ネガティブコントロール) の卵巣からタンパク質を抽出し、抗 FOXL3 抗体を用いてウェスタンブロッティング (WB) を行なった。その結果、IP input では FOXL3 が *meioC* 卵巣サンプルでのみ検出されたのに対し、IP サンプルでは *meioC* 変異体、*foxl3* 変異体ともに FOXL3 が検出されなかった (図 1 左上)。一方、これらの IP サンプルでは約 25 kDa の位置に IgG light chain と思われるタンパク質が過剰に検出された (図 1 左下)。これは、IP に用いた抗 FOXL3 抗体が IP サンプル中に残り WB で非特異的に検出されたものと考えられた。質量分析で IP サンプル中の微量な FOXL3 相互作用タンパク質を検出するためにも、IP に用いた過剰量の IgG を IP サンプル中から除外する必要があると考えた。

そこで、抗 FOXL3 抗体を IP で用いる ProteinG Dynabeads に BS³ を用いて共有結合させた。この共有結合はしばしば抗体の失活を招くことが知られている。実際、IP-MS に使用された抗体の条件 (Menon DU, 2019, Development) を参考に共有結合を施したところ、IP サンプル IgG は検出されなくなったものの FOXL3 も検出されないことが示された。そこで、抗体の共有結合に最低限必要な BS³ 濃度と反応時間をそれぞれ検討し、0.25mM BS³ で 20 分反応させることで、抗体を完全に ProteinG に結合させようを見出した。しかしながら、このようにして共有結合させた抗 FOXL3 抗体を用いた IP サンプルにおいても、WB で FOXL3 を検出することはできなかった (図 1 右)。以上の結果を踏まえ、IP サンプルには WB で検出可能な FOXL3 が含まれていない、または FOXL3 抗体と ProteinG との共有結合により抗体の活性が失われた可能性が考えられた。ここにおいて、IP により MS サンプルを調製することは現状困難であると判断し、当初の計画を変更することとした。すなわち、セルソーターで単離した FOXL3 発現細胞のプロテオームを、野生型と *foxl3* 変異体で比較することにより、FOXL3 依存的に変動するタンパク質群を同定することにした。この実験には *foxl3* プロモ-



ターで EGFP 発現を誘導するトランスジェニックメダカ（作出済み）を用いる予定であり、また EGFP 陽性細胞の単離方法等は既に確立していることから（Kikuchi M, 2019, DevBiol）、サンプルが調製でき次第すぐに研究を始めることができると考えている。

(2) FOXL3 により制御される因子 (FBXO47, REC8A) の機能解析

① FBXO47 の機能解析

FBXO47 が属する F-box ファミリータンパク質は、SCF E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子としての機能がよく知られている。この複合体において F-box タンパク質はユビキチン化基質との相互作用を担う。マウスや線虫では、FBXO47 が減数分裂染色体の末端部テロメアに局在し、ユビキチン化を介して染色体の動態に関与することが示唆されているが、生殖細胞の性決定における役割は明らかになっていなかった。

CRISPR/Cas9 により *fbxo47* 機能欠損型変異体を作成したところ、オスには異常が認められなかったのに対し（図 2 B）、メスは卵形成異常を生じて不稔となった（図 2 A）。*fbxo47* 変異体卵巣内の生殖細胞は、第一減数分裂前期ザイゴテン期様のステージで分化が停止していた。さらに、有糸分裂期の進行に異常が認められ、多くの細胞が前中期の染色体を持つことが示された（図 2 A 矢尻）。これらの染色体は末端同士が融合したリング様の異常形態を呈していた。以上の結果は、FBXO47 が卵形成初期に必須であること、染色体の形態形成に関与している可能性を示唆している。さらに驚くべきことに、FBXO47 変異体の卵巣内では精子形成が進行していることが、精子形成マーカーの発現と生殖細胞の核形態から示された（図 2 C-G）。この結果は、FBXO47 が精子形成の抑制に寄与していることを示しており、ユビキチン化ターゲットの分解によりこれを制御している可能性が示唆された。

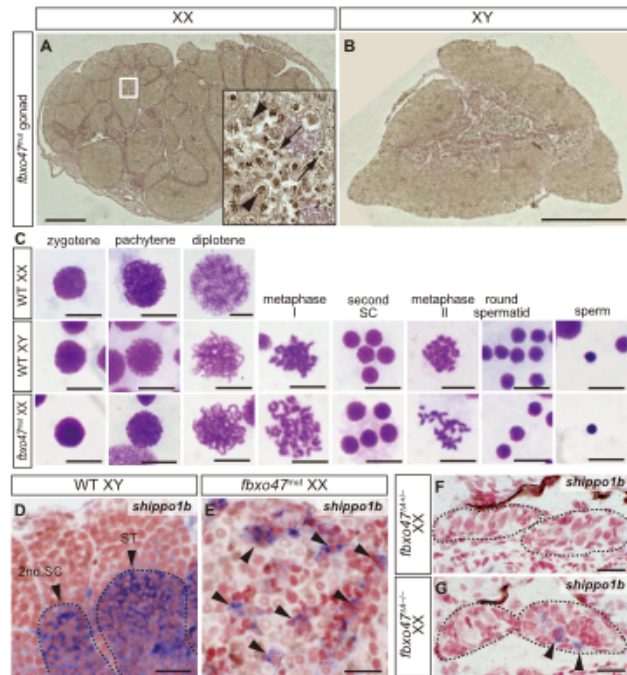


図2. *fbxo47* 変異体の表現型解析

② REC8A の機能解析

REC8 はコヒーシンの減数分裂特異的な構成因子（クレイシン）であり、一般的には姉妹染色单体をつなぎ留める働きを担っている。また REC8 は真核生物に広く保存されており、減数分裂における普遍的な機能を持つと考えられる。

メダカゲノムには、真骨魚類の祖先における全ゲノム重複により生じた2つの *rec8* パラログ (*rec8a*, *rec8b*) が存在する。これらの遺伝子発現を調べると、*rec8a* は主に卵原細胞で、*rec8b* は主に精原細胞で発現していることが明らかになった（図 3 A-D）。さらに *rec8a* は FOXL3 の下流で発現誘導されることが示されており（Kikuchi M, 2019, DevBiol）、REC8 パラログがそれぞれ卵形成と精子形成を制御するように機能分化した可能性が示唆された。

CRISPR/Cas9 により *rec8a* 機能欠損型変異体を作成したところ、上記の仮説と一致してメスでのみ表現型が現れた（図 3 E, F）。*rec8a* 変異体の卵巣では卵形成が損なわれ、第一減数分裂前期のパキテン期までに分化が停止していることが示された（図 3 G-L）。一方 *rec8a* 変異体の精巣では減数分裂が正常に進行し、稔性のある精子が形成された。以上の結果から、REC8A が卵形成の進行に必須であること、減数分裂を制御する分子機構に実質的な性差があることが明らかになった。今後は REC8B の機能解析や REC8A と REC8B の置き換え実験などを通してコヒーシンの機能分化を詳細に調べるとともに、減数分裂の性差（染色体形態や組換え頻度など）をもたらず分子機構に迫っていく。

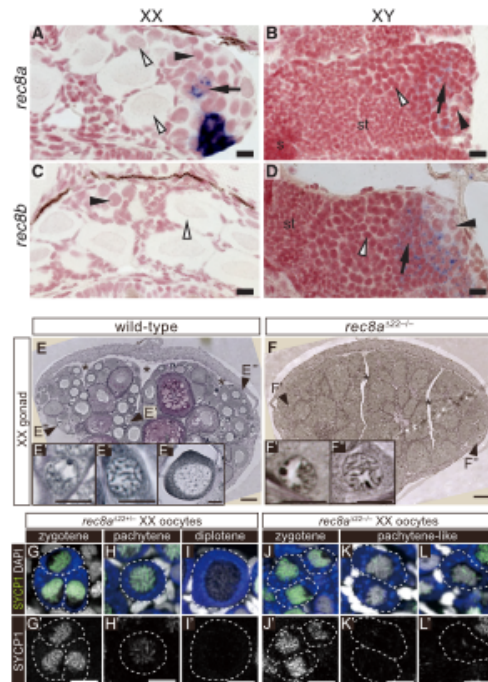


図3. *rec8a* 変異体の表現型解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikuchi Mariko, Nishimura Toshiya, Ishishita Satoshi, Matsuda Yoichi, Tanaka Minoru	4. 巻 117
2. 論文標題 foxl3, a sexual switch in germ cells, initiates two independent molecular pathways for commitment to oogenesis in medaka	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 12174 ~ 12181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1918556117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊地真理子、西村俊哉、丹羽大樹、田中実
2. 発表標題 卵形成コミットメントの分子機構
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------