

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370101

研究課題名（和文） AMH系による性的可塑性の分子基盤解析

研究課題名（英文） Analysis of Sexual Plasticity in Gonads by AMH System

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

研究成果の概要(和文):

性の可塑性を制御している分子の実体とその制御機構は明らかでなかった。今回の研究により、AMH系は生殖細胞を取り囲む支持細胞間で働き、分裂中の幹細胞系の生殖細胞の増殖を間接的に制御、この生殖細胞の増殖を通じて生殖腺の性の制御を行いうる分子であることが明らかとなった。またこのAMH系が働く「生殖細胞のゆりかご」と名付けた組織構造も本研究によって発見され、この構造体には卵巣生殖幹細胞が存在し、構造体そのものがニッチでもあることが示された。以上のような性決定分化機構はほ乳類とはメダカでは全く異なる。実際、ほ乳類での生殖腺雄化に必須の因子 *sox9* の機能をメダカで調べると、雄化には必須ではなく生殖細胞維持に関わっていることが明らかとなった。これらの結果を総合すると、それぞれの脊椎動物は独自の性決定システムを発達させていることが分子機能の観点から明らかとなった。

研究成果の概要(英文):

With support of this budget, we firstly clarified the molecular and cellular mechanism of sexual plasticity in the gonads and AMH system is involved in this mechanism. We discovered that this system functions in what we named 'Germinal Cradle' in the ovary, in which germline stem cells are present. This was the first successful demonstration of stem cells and niche structure in vertebrate ovary. The AMH system functions in interfollicular manner in the Germinal Cradles and indirectly regulates proliferation of subpopulation of stem cells. The sexual plasticity is also controlled through the regulation of germ cells. This indicates that Germinal Cradles is not only for regulation of the egg number but also for sexual plasticity.

The function of AMH system differs in medaka and mammals. We also revealed that *sox9*, another important gene for testis formation in mammals, does not functions in masculinization of medaka gonads. Together with functional analysis, our studies collectively indicate that different species in vertebrates develop their own system of sex determination.

交付決定額

(金額単位:円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,700,000  | 1,410,000 | 6,110,000  |
| 2010年度 | 4,900,000  | 1,470,000 | 6,370,000  |
| 2011年度 | 4,900,000  | 1,470,000 | 6,370,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

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:生殖細胞, 性分化

### 1. 研究開始当初の背景

性とは古典的には、発生の過程で一義的に決まるものではなく雌雄のバランスの問題であり、性の可塑性は保たれているのではないと言われてきた。しかしながらそれはあくまでも現象の説明の仕方であって実際にバランスを裏付けるような分子細胞学的機構が存在するか否かは不明である。一方、従来の定説では生殖細胞は体細胞側の性に依存して性分化を行い、卵巣では卵を、精巣では精子形成を行なうとされていた。ところが我々が行ったメダカ突然変異体 *hotei* と生殖細胞欠損メダカを用いた一連の研究では、生殖細胞が性の可塑性制御や生殖腺性分化に重要であることを示していた。

### 2. 研究の目的

突然変異体 *hotei* は進化的に古い TGFbeta family の受容体、AMH2型受容体、の遺伝子に変異があることが我々の研究により明らかとされていた。今まで性の可塑性に関わる分子は不明であったので、AMH 系が性の可塑性に関与する初めての分子である可能性が高い。そこで、正常の性分化での AMH 系の活性を検証し、AMH 系による性的可塑性制御の分子細胞学的基盤を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

特定細胞が可視化されて識別できるトランスジェニックメダカや in situ hybridization、培養細胞、異なるアレルの変異体単離、変異体と正常メダカのキメラメダカなどの手法を組み合わせて解析し、AMH 系が働く細胞を、性転換の細胞学上の機序を明らかにし、AMH 系の性転換における機能を調べる。また AMH が働く細胞を可視化したトランスジェニックメダカを作製し、この細胞を FACS で精製、そこで発現する遺伝子プロファイルを正常型と変異体とで比較し、AMH 系で働く候補因子を得る。

### 4. 研究成果

生殖細胞を取り囲む支持細胞と生殖細胞とを可視化し、卵巣に生殖幹細胞が存在すると予期される「生殖細胞のゆりかご」構造を世界で初めて発見した。さらに熱誘導型 cre/loxP メダカを用いて、生殖細胞のゆりかごに存在する *nanos2* 発現細胞中に生殖幹細胞が存在することを証明し、これは脊椎動物卵巣で初めての生殖幹細胞同定となった。そしてこの「生殖細胞のゆりかご」の体細胞間で AMH 系が働き、この AMH 系の活性がないときに、ごく一部の分裂を開始した生殖幹細胞が増殖することが明らかと

なった。すなわち、AMH 系は生殖細胞に直接作用するのではなく、その活性が間接的に一部の生殖幹細胞の増殖活性に影響することが明らかとなった。さらに、性転換はこの増殖した生殖細胞によってもたらされ、AMH 系シグナル欠如の直接の影響でないことが判明した。以上のことは、性のバランスが AMH 系によって生殖細胞を通じて制御されていることを示し、「生殖細胞のゆりかご」は配偶子(卵や精子)の数を制御するだけでなく、この性の制御でも重要な組織構造であることが明らかとなった。

この AMH 系はほ乳類では、生殖腺の雄化に重要である。しかしながらメダカでは雌雄両方の性分化中の生殖腺に発現し、生殖細胞制御とそれを通じた性の制御に関わっていることになる。このことは性決定システムがほ乳類では全く異なることも示唆している。そのため、同じほ乳類で AMH 系の上流に位置して生殖腺雄化に重要な遺伝子 *SOX9* のメダカの機能についてもメダカ *sox9* orthologue の変異体を用いて調べた。その結果、メダカ *sox9* も直接には生殖腺雄化に関わらず、むしろ細胞外基質の発現制御を通じて生殖細胞の生存に重要な機能を担っていることが明らかとなった。従来、ほ乳類の性決定システムで脊椎動物性決定システムを語るが多かったが、この一連の研究では脊椎動物がまったく異なる性決定システムを発達させてきたことが分子細胞学的機構から初めて示された。

### 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 13 件)

以下の論文はすべて査読あり。

- (1) 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, (in press).
- (2) 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(1), e29982.

doi:10.1371/journal.pone.0029982.

- (3) Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T. and Tanaka, M.  
Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*).  
**Int. J. Biol. Sci.** (2011) 7, 403–409 (Invited Review).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547057>
- (4) Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. and Tanaka, M.  
Identification of germline stem cells in the ovary of teleost medaka.  
**Science** (2010) 328, 1561–1563.  
doi: 10.1126/science.1185473.
- (5) Herpin, A., Braasch, I., Kraeussling, 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.
- (6) Nakamura, S., Kurokawa, H., Asakawa, S., Shimizu, N. and Tanaka, M.  
Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: Germ cell-dependent maintenance of *cyp19a1*-expressing cells.  
**Dev. Dyn.** (2009) 238, 2652–2657.  
doi: 10.1002/dvdy.22068.
- (7) Herpin, A., Nakamura, S., Wagner, T., Tanaka, M. and Schartl, M.  
A highly conserved *cis*-regulatory motif directs differential gonadal synexpression of *Dmrt1* transcripts during gonad development.  
**Nucleic Acids Res.** (2009) 35, 1510–1520.  
doi: 10.1093/nar/gkn1065.
- (8) Aoki, Y., Nakamura, S., Ishikawa, Y. and Tanaka, M.  
Expression and systemic analysis of four *nanos* genes in medaka  
**Zool. Sci.** (2009) 26, 112–118.  
doi:10.2108/zsj.26.112.
- (9) Saito, D. and Tanaka, M.

Comparative aspects of gonadal differentiation in medaka: a conserved role of developing oocytes in sexual canalization.

**Sex. Dev.** (2009) 3, 99–107 (Invited Review).

doi: 10.1159/000223075.

[学会発表] (計15件)

以下すべて発表は Tanaka, M.

- (1) ‘A New Ovarian Structure That Supports Continuous Production of Eggs’  
The 13rd UK–Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals (**Plenary Lecture**)  
2011年12月8日、長崎 全日空ホテル (長崎県)
- (2) ‘Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost, Medaka’  
International Symposium, Endocrine Organ and Stem Cells (**Invited Talk**)  
2011年11月25日、赤坂 都道府県会館 (東京都)
- (3) ‘Characterization Of Heat-Induced Gene Expression In Combination With Cre/LoxP System In Medaka’  
The 3rd International Symposium of *Oryzias* Fish 2011 (Talk)  
2011年11月10日–11日、Universiti Putra Malaysia (マレーシア)
- (4) ‘In Search For The Factors Involved In Balancing of Sex’  
The 1st.NIBB/Princeton Symposium (**Invited Talk**)  
2011年11月1日、岡崎 岡崎コンファレンスセンター (愛知県)
- (5) 「性と生殖細胞との緊密な関係」  
日本動物学会第82回大会「シンポジウム 脊椎動物の性決定及び性分化機構」(**招待講演**)  
2011年9月23日 旭川 旭川クリスタルホール (北海道)
- (6) “Functional differences of *sox9* contribute to species-specific configuration of the gonad”  
The 5<sup>th</sup> Asia–Oceania Zebrafish Meeting

- (Talk)  
2011年8月26日-29日、北京(中国)
- (7) ‘Ovarian Structure that support reproductive cycle – Germline stem cells and their niche structure in ovary’  
9<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (**Plenary Lecture**)  
2011年8月9日-14日、コチン(インド)
- (8) ‘Germline Stem Cells in Medaka Ovary’  
NUS (National University of Singapore) Seminar (**Invited Talk**)  
2011年3月16日、NUS(シンガポール)
- (9) 「メダカ研究から見える性の多様性」  
熱帯生物圏研究センター主催 シンポジウム(**招待講演**)  
2011年2月23日-24日、瀬底臨海実験所(沖縄県)
- (10) 「性をつかさどる生殖細胞」  
第3回性差生物研究会(**招待講演**)  
2011年1月17日(月)九州大学医学研究院(福岡県)
- (11) “Germline Cradles Expressing Sox9b Harbor Germline Stem Cells in the Ovary of Teleost Fish, Medaka”  
Cold Spring Harbour Meeting “Germ Cells” (Talk)  
2010年10月6日-9日、Cold Spring Harbor Laboratory(アメリカ)
- (12) “The Plasticity of Sex”  
JSDB-SDB(日本/米国発生生物学会) Joint-Meeting (**Invited Talk**)  
2010年8月7日、アルバカーキー(アメリカ)
- (13) 「新たなテクノロジーが生み出す新たな生物科学の胎動 – メダカを例として」  
第80回日本動物学会シンポジウム(**シンポジウム主催**)  
2009年9月18日、静岡 グランシップ静岡(静岡県)
- (14) “Analyzing the gonads by visualizing specific cell lineages”  
The 16th International Congress of Comparative Endocrinology (**Symposium Organizer and Invited Talk**)  
2009年6月22日-26日、香港(中国)
- (15) “AMH Signaling in Sex Differentiation in Medaka Fish”  
The 5th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination (**Session Chair and Invited Talk**)  
2009年4月20日-24日、コナ(アメリカ)
- [図書](計7件)
- (1) Naruse, K., Tanaka, M. and Takeda, H. (eds)  
Springer-Verlag,  
“Medaka” a model for organogenesis, human disease, and evolution.  
(2011年) total 387 pages.  
ISBN 978-4-431-92690-7.
- (2) 中村修平 小林佳代 西村俊哉 田中実  
日本生化学学会  
「生化学 7月号(メダカ卵巣の配偶子幹細胞)」  
(2011年) pp. 627-632.
- (3) 田中実、小林佳代、中村修平  
編集 小幡裕一、城石俊彦、芹田忠夫、田中啓二、米川博通  
エル・アール・シー  
「生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール(BAC や fosmid を用いたトランスジェニックメダカ作製法)」  
(2011年2月) pp.573-578.  
ISBN 978-4-9000487-48-2.
- (4) 田中実 (分担執筆)  
編集 石原勝敏、末光隆志  
朝倉書店  
「生物の事典(始原生殖細胞の形成)」  
(2010年) pp.239-241.  
ISBN 978-4-254-17140-2.
- (5) 中村修平 小林佳代 西村俊哉 田中実  
秀潤社  
「細胞工学 7月号(メダカ卵巣の配偶子幹細胞)」  
(2010年) pp.664-669.
- (6) 田中実  
共立出版  
「蛋白質核酸酵素 4月号(メダカを用いた生体内細胞追跡と細胞除去のことはじめ)」  
(2009年) pp. 662-668.

- (7) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K. and Tanaka, M. (eds)  
Wiley-Blackwell,  
“A Laboratory Manual for Medaka Biology”,  
(2009年) total 419 pages.  
ISBN9-780813-808710.

[その他]

(1) その他

2011年8月26日

NHK 科学番組 サイエンスゼロ

「シリーズ細胞の世界 見たぞ！生と死その根源」で、研究内容が映像とインタビューと共に放映。

2011年4月20日

「メダカを用いた新たな生殖細胞研究」が平成23年度文部科学大臣表彰科学技術賞(研究部門)を受賞。

(2) 報道関連情報

新聞、Web ニュース報道

2012年2月3日

科学新聞 6面

脊椎動物の性決定システム  
「種別に相違」独自進化判明

2010年6月4日

科学新聞 1面

成体メダカ卵巣で  
幹細胞の”ゆりかご”発見

2010年5月22日

日本経済新聞(夕) 8面

メダカの卵巣に「卵のもと」  
多産の謎解明 糸口に

2010年5月21日

中部経済新聞 7面

卵の幹細胞を確認  
基礎生物研メダカで脊椎動物では初

朝日新聞(夕) 6面

メダカ卵巣に幹細胞  
大量産卵の仕組み解明

日経産業新聞 9面

メダカ卵巣に幹細胞  
基礎生物学研究所発見多産の謎解明へ道

中日新聞(朝) 3面

メダカに生殖幹細胞 卵巣に確認  
水産分野で応用期待

日刊工業新聞 23面

卵巣に卵つくる幹細胞

生物学研 メダカの研究で解明

毎日新聞(朝) 24面

メダカ卵巣に生殖幹細胞

読売新聞(朝) 28面

メダカ卵巣内で生殖幹細胞確認

Web 河北新報社、西日本新聞、共同通信、

デイリースポーツ、福井新聞

メダカの卵になる幹細胞確認

脊椎動物で初、基礎生物研

Web Yahoo! ニュース

<メダカ>卵巣に生殖幹細胞

基礎生物研が発見

(3) アウトリーチ活動情報

①岡崎市立竜美丘小学校 理科授業3回  
2009年-2011年まで毎年1回

②一般向け講演

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(土)札幌

基礎生物学研究所一般公開 特別講演

「生殖と性をつかさどる細胞たち」

2010年10月3日(火) 岡崎コンファレンスセンター

国研セミナー(ロータリークラブ招待講演)

「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(金)基礎生物学研究所

The 5<sup>th</sup> International Training Course  
Developmental Genetics of Medaka and Zebrafish.

2010年1月26日-2月2日岡崎

(国内外講師5名と選抜された国外受講生  
16名で medaka 技術のコースを開催)

(4) ホームページ情報

研究室ホームページ

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

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