

別紙 4

報告番 -	※ 甲 第 号
----------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 メダカにおける生殖細胞自律的な性決定機構の解明

氏 名 菊 地 真 理 子

論 文 内 容 の 要 旨

生殖細胞の「性」、すなわち卵になるか精子になるかの運命決定は、有性生殖を行う生物にとって重要な問題である。脊椎動物において、生殖細胞の性は生殖腺原基を構成する体細胞の性に依存して決まると考えられてきた。しかしながら、生殖細胞の性を制御している分子の実態とその制御機構については明らかになっていない。

Foxl3 (*Forkhead box protein 3*) は、生殖細胞の性決定因子として硬骨魚類メダカ (*Oryzias latipes*) で同定された転写因子である (Nishimura T, *et al.*, *Science*, 2015)。*Foxl3* はメスの有糸分裂期生殖細胞で発現しており、*foxl3* 機能欠損メダカの卵巣内では機能的な精子が形成されることが報告されている。この結果は、*foxl3* がメスの生殖細胞内で精子形成を抑制しており、体細胞に依らない「生殖細胞自律的な性決定」を制御していることを示している。

本研究では、転写因子 *foxl3* の下流制御因子を網羅的に探索し、生殖細胞自律的な性決定機構の解明を試みた。初めに、野生型と *foxl3* 変異型の卵巣から有糸分裂期の生殖細胞を単離し、これらの細胞を用いた RNA-seq およびトランスクリプトーム比較解析により、*foxl3* の制御下流で発現変動する遺伝子群を同定した。このうち、野生型で発現上昇していた遺伝子群を対象に FOXL3 ターゲット候補遺伝子のスクリーニングをおこなった。その結果、*rec8a* と *fbxo47* がメスの有糸分裂期生殖細胞において *foxl3* 依存的に発現上昇することを見出した。また上記解析と並行して、iDamIDseq 法による FOXL3 結合モチーフの新規同定を行なっ

た。これにより同定された FOXL3 結合モチーフは、*rec8a* および *fbxo47* の遺伝子上流ゲノム領域に保存されており、卵巣内ではこれらのゲノム領域に FOXL3 タンパク質が蓄積していることが示された。以上の結果は、FOXL3 が *rec8a* と *fbxo47* の発現制御を介して生殖細胞のメス化を促進している可能性を示唆していた。REC8A は減数分裂コヒーシンのサブユニットであり、姉妹染色分体の接着や、相同染色体の対合・組換えなどに必須である。FBXO47 は、SCF ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットであり、線虫や植物の減数分裂において染色体の動態に関与することが報告されている。どちらのタンパク質も有性生殖をおこなう生物に広く保存されており、生殖細胞の性決定における普遍的な分子機構に関与している可能性が示唆された。

生殖細胞の性決定における *rec8a* と *fbxo47* の機能に迫るために、CRISPR/Cas9 法を用いてこれらの遺伝子の機能欠損メダカを作成し、表現型を解析した。*Rec8a* および *fbxo47* の変異体は、どちらもメスの生殖細胞特異的な分化異常を示した。*Rec8a*^{-/-} 卵巣内において、生殖細胞の分化は第一減数分裂前期（パキテン期）までに停止しており、相同染色体の対合に必要なシナプトネマ構造の形成・維持に異常が認められた。一方 *fbxo47* 変異体の生殖細胞では、有糸分裂期における染色体の形態異常が認められた。さらに興味深いことに、*fbxo47* 変異体の卵巣内では、生殖細胞の精子形成への分化転換が認められた。この結果は、*fbxo47* が *foxl3* の制御下流において精子形成を抑制している可能性を強く示唆していた。

エピスタティックな解析から、*rec8a* と *fbxo47* は独立な分子経路に乗っていることが示された。さらに *fbxo47* の下流では、生殖細胞メス化関連遺伝子 (*lhx8b*、*figla*、*nobox*) の発現が上昇することが示された。これらメス化関連遺伝子の機能解析、および上記 *rec8a* と *fbxo47* の機能解析を総合すると、*foxl3* の下流で制御される生殖細胞のメス化過程には、少なくとも 3 つの分化イベントが関与していることが示唆された。すなわち、*rec8a* 下流における「減数分裂の進行」、*fbxo47* 下流における「精子形成の抑制」および「卵胞発達」である。これらの分化イベントは、これまで生殖細胞の性と切り離して個別に解析されてきた。本研究では、メス特異的な分化イベントが生殖細胞の性決定機構と密接に連携して制御されている可能性を脊椎動物で初めて明らかにした。

さらに本研究から、メダカにおける生殖細胞の性は、一度決定された後も積極的に維持される必要があることが見えてきた。魚類には、環境に適応して柔軟に細胞の性を変化させる能力を持つ種が多く存在する。今後、本研究で明らかになった分子による性の決定・維持機構をさらに詳細に調べることで、細胞の性的可塑性を保証する分子基盤が明らかになると期待される。