

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

博 士 論 文 の 要 約

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 L3*) 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.*, 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。このことは、*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。

本研究において、申請者は転写因子 *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* 変異型の有糸分裂期生殖細胞を単離して RNA-seq を行い、*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行い、*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。上記解析と並行して、申請者は iDamIDseq 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制御している可能性を示唆していた。

そこで次に、CRISPR/Cas9 法により *rec8a* と *fbxo47* の機能欠損メダカを作成し、これらの遺伝子の機能を解析した。両変異体はメスの生殖細胞特異的な分化異常を示した。*Rec8a* 変異型生殖細胞の分化は第一減数分裂前期の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* 変異型の生殖細胞では、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* 変異型の生殖細胞は精子形成への分化転換を示した。この結果は、*fbxo47* が *foxl3* の下流で精子形成の抑制に寄与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、マウスにおける卵胞形成関連遺伝子 (*lhx8b*, *figla*, *nobox*) の発現が制御されていることが示された。これら卵胞形成関連遺伝子の機能解析を合わせると、*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することが示唆された。すなわち、*rec8a* の下流における「減数分裂の進行」、*fbxo47* の下流における「精子形成の抑制」と「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が、メダカにおいて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が脊椎動物で初めて明らかになった。