

博 士 (理 学) 中 村 修 平

学 位 論 文 題 名

# Lineage analysis of *sox9*-expressing cells in medaka (*Oryzias latipes*)

(メダカ *sox9* 発現細胞の細胞系譜解析)

## 学位論文内容の要旨

During the sex differentiation of the gonad, it is known that somatic gonadal cells play important roles. To know when, where and how the many important genes function during the gonadal sex differentiation, it is important to identify the somatic gonadal cell lineages. Nevertheless, the precise somatic cell lineages especially before the gonadal primordium forms remain largely unknown. Using medaka (*Oryzias latipes*) as a model, I revealed that somatic gonadal precursors come from the most posterior part of *sdf-1a*, which is known to be important for the germ cell migration. At the early stage of embryo, most posterior part of *sdf-1a* expression domain constitutes the gonadal field, which can regulate the cells in this field to form somatic gonadal cells. As the development proceeds, the cells in the gonadal field are committed to the somatic gonadal cell lineage and are also established into two populations, *sox9b* expressing cells and *ftz-fl* expressing cells before the gonadal primordium forms. These two populations with PGCs move to form a single primordium on the dorsal to the hindgut and then begin to differentiate.

Next, from the precise expression analysis using *sox9b* transgenic medaka, *sox9b* expressing

cells are revealed to be the common precursors for both granulosa cells in XX gonads and Sertoli cells in XY gonad. In contrast to the mammalian gonads, *sox9b* expression persists in the cells surrounding early stage of germ cells in the female gonad. This expression pattern implies that *sox9b* has additional roles in the female gonad.

Finally, I revealed that *sox9b* expressing cells with early stage germ cells constitute *Drosophila* germarium-like units in the germinal epithelium of medaka adult ovaries. In the units, there are several types of germ cells including GSCs (Germline stem cells)-like slow dividing cells. These results are the first evidence that the unique structural units exist in the vertebrate ovary, as well as the implication for the presence of germline stem cells. Furthermore, it also suggests that *sox9b*, medaka orthologue of *sox9* has the additional unknown roles in the ovary, in addition to the functions in the testis differentiation.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 准教授 清 水 隆

副 査 准教授 田 中 実 (自然科学研究機構・

基礎生物学研究所)

学 位 論 文 題 名

## Lineage analysis of *sox9*-expressing cells in medaka (*Oryzias latipes*)

(メダカ *sox9* 発現細胞の細胞系譜解析)

脊椎動物の発生過程において、性は未分化生殖腺原基で初めて決まり性差(卵巣または精巣)が表出する。この生殖腺には多種の細胞が存在するが、この細胞1つ1つが適切に性分化を行なわなくては全体として性が統一されず、卵巣または精巣が機能しない。実際ヒトでは、生殖腺の一部の性が全体と異なり不妊となる症例も見いだされている。従って性分化機構を解明する上で細胞レベルの性分化過程は重要であるにもかかわらず、その詳細は明らかでなかった。本学位論文では、メダカ(*Oryzias latipes*)を用いて生殖腺を構成する体細胞系譜解析とその体細胞が関与する組織構造の解析を行なった。その結果、生殖腺を構成する細胞の起源を明らかにするだけでなく、脊椎動物では全く不明であった卵巣の生殖幹細胞様細胞とそのニッチ構造を明らかにした。

学位論文は3章からなる。第1章では、メダカ胚を用いて単一細胞の追跡と除去実験を行ない、発生期に生殖腺形成場が存在することを示した。この生殖腺形成場から2種類の異なる生殖腺体細胞の前駆細胞が出現し、そのうちの1種類がこの場へ移動してきた生殖細胞を取り囲み、その後、これらの細胞が後腸背側へ移動して生殖腺原基を構成することを明らかにした。不明であった脊椎動物の生殖腺体細胞の起源と形成過程を明らかにした重要な研究である。

第2章では、上記2種類の生殖腺体細胞前駆細胞うちの1つ、*sox9b* 発現細胞を蛍光蛋白質で可視化できる遺伝子導入を作製し、この細胞の系譜解析を行なった。その結果、生殖細胞を取り囲む雌雄共通の支持細胞の前駆細胞であることが明らかとなった。雄ではセルトリ細胞となり *sox9b* の発現が継続する。雌では、生殖細胞が卵胞を形成するにつれて、それを取り囲む支持細胞(顆粒膜細胞)では発現が消失することを示した。発達中の生殖腺の体細胞系譜を解析しその方法論を切り拓いた重要な研究である。

第3章では、雌卵巣で *sox9b* 発現の残る細胞について解析を行なった。その結果、この細胞系列が、ショウジョウバエにおける生殖幹細胞を含む単位、germarium に対応する構造を構成していることを明らかにした。遺伝子導入メダカと細胞パルスラベルの方法を組み合わせることにより、幹細胞型分裂を行なう生殖細胞からディプロテン期の卵母細胞までが *sox9b* 細胞から構成されるこの構造単位に存在ことを示した。*Sox9b* は哺乳類では精巣特異的に発現し、精巣分化に必要なかつ十分な役割を持つ重要な遺伝子

である。本学位論文の成果は、脊椎動物の卵巢において初めて生殖幹細胞様細胞を含む構造単位を明らかにしただけでなく、*sox9b* 遺伝子機能による雄性分化機構の再解釈を求めるインパクトのある結果となっている。

以上のように、生殖腺を構成する細胞系列の系譜と組織構造を解析することによって得られた結果は、性分化の研究のみならず、幹細胞研究や応用水産学へも大きな影響を与えることが期待される。よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。