

平成 30 年 4 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04396

研究課題名(和文)環境依存型性決定研究のモデル化とメカニズム解析

研究課題名(英文)Analysis of environmental sex determination

研究代表者

井口 泰泉 (Iguchi, Taisen)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・特任教授

研究者番号：90128588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：爬虫類(ワニ)と甲殻類(ミジンコ)の環境依存型性決定機構をモデルとして、性決定時における環境シグナルの受容機構と、環境因子と生体内因子との間の相互作用の解明を目的とした。ワニではTRPV4による環境温度の受容機構を解明した。また、雌雄それぞれの産生温度において、エピゲノム修飾因子が温度依存型性決定に寄与する可能性を示した。ミジンコでは幼若ホルモンと脱皮ホルモンの生合成遺伝子群の単離と発現解析を行い、主要内分泌システムの分子基盤を整備した。さらに、性特異的なスプライシングやクロマチン修飾機構、雌特異的な脱皮ホルモンシグナル経路の活性化により雌雄形質の発現が制御されている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Sex determination is a critical element in animal development and evolution. In contrast to sex determination based on intrinsic genotypic factors, as commonly seen in many animals, some species show environmental sex determination (ESD), where offspring become male or female in response to an environmental factor(s) during development. We investigated ESD mechanism using American alligator and water flea (daphnia) as a models. In alligator, we identified thermosensitive transient receptor potential (TRP) channels as main initiation candidate. In addition, we revealed that epigenomic factors might be involved in temperature-dependent sex determination. In Daphnids, we identified several juvenile hormone and ecdysone biosynthesis-related genes and investigated their expression levels throughout embryogenesis and molting cycle between male and female. These results provide novel insights towards understanding photoperiod-dependent sex determination process in Daphnids.

研究分野：内分泌学

キーワード：性決定 環境 爬虫類 甲殻類

1. 研究開始当初の背景

現在、様々な動物の性決定機構が明らかとなりつつある。遺伝型性決定についてはショウジョウバエの *Sxl* やヒトやマウスの *Sry* の発見を端緒にした研究により、多種多様な性決定システムの詳細が分子レベルで明らかにされつつある。一方で、環境依存型性決定は、その存在こそよく知られているが、いまだ現象の記述のみにとどまっている。

爬虫類ではヘビ類を除き、多くのカメ類、数種のトカゲ、および全てのワニ類が温度依存性の性分化を行い、胚発生時期の温度によって生殖腺の性が決まる。例えばミシシッピーワニの卵を 30 度で孵卵すると全て卵巣をもつ雌に、33.5 度で孵卵すると全て精巣をもつ雄として発生する。我々は、ミシシッピーワニの温度感受性時期に、30 度で孵卵した個体の生殖腺ではアロマトーゼ遺伝子(女性ホルモン合成酵素)の発現が増加し、33.5 度で孵卵した個体の生殖腺ではミュー管抑制ホルモン (*Amh*) 遺伝子の発現が増加することを見出している。また女性ホルモン曝露によって、雄になる温度でも雌になることも見出しており、温度シグナル受容後にその下流で、女性ホルモンシグナルが作用して性分化が制御されているものと考えられる。

一方、節足動物であるミジンコ類は世界中の淡水に生息し、これまで生態学の研究に多く用いられてきた。ミジンコは通常単為生殖により繁殖するため、すべての卵は雌として発生する。しかし、環境条件の変化、例えば温度、光条件や個体密度の変化により、母親の卵巣中で雄へと運命づけられるものが現れる。すなわち環境の変化に伴って、性決定・生殖戦略を変えることにより、群としての生存環境への適応度を増やしているものと考えられるが、その分子メカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

性決定や生殖戦略の多様性は、多様な種の確立に至る生物進化の分子基盤となっている。動物の性決定・性分化については、多くの場合染色体の構成で決まるが(遺伝型性決定)、光や温度、個体密度など、周囲の環境によって性が決まる動物がいる(環境依存型性決定)。本研究は、ミシシッピーワニ(ミシシッピーアリゲーター)と節足動物のミジンコの環境依存型性決定機構をモデルとして、環境性決定における環境シグナルの受容機構と、そのような外部環境シグナルとホルモンを含む生体内環境調節因子との間の遺伝子・シグナルネットワークを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では生物の生育環境を精密に制御し、モデル化する必要がある。したがってワニの卵の採取はフロリダ及びサウスカロライナで行い、サウスカロライナ医科大学

Louis J. Guillette Jr. 教授(故人)の研究室で厳密な温度制御下で孵卵、薬剤曝露などを行い、胚組織及び mRNA、cDNA は許可を得て国内に持ち帰り解析した。TRP チャネルの電気生理学実験はゼノパス卵母細胞を使用し、その活性化温度の同定は生理学研究所の富永真琴教授の協力によって行った。ミジンコに関しては、温度を含む外部環境を完全にコントロールできるマルチチャンバー式人工気象器内で飼育した。えさは一日一回クロレラを与えた。動物実験及び遺伝子組換え実験に関しては、所属大学及び研究機関の動物実験委員会と組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと行った。

4. 研究成果

ワニの温度依存型性決定に関して、我々は電気生理学実験から温度センサーである TRPV4 が雄産生温度域(高温度域)で活性化され、さらに卵への薬剤塗布実験からこのタンパク質が精巣分化に強く関連することを明らかにした。一方低温度域で活性化される TRP については、温度感受域の測定や、薬剤による性決定への寄与に関する知見はないことから、今後他の TRP 遺伝子の活性化温度域の測定及びワニの生殖腺分化状態変化に関する実験が必要である。

雌雄それぞれの温度で飼育したワニ胚から性腺を摘出し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ヒストン修飾酵素など、それぞれの温度で特異的に発現変化する遺伝子を複数同定した。例えば、マウスで *Sry* 遺伝子のエピゲノム修飾を介して生殖腺分化を制御する *Jumonji* ファミリーのひとつである *Kdm6b* やヒストン修飾酵素/ポリコーム複合体の構成因子の一つである *JARID2* が、雌産生温度特異的に発現が低下することを見出した。このことは、環境性決定においても、エピゲノム修飾が生殖腺分化に関与することを示唆している。興味深いことに、海外の研究グループが、カメの性決定時にも(カメもワニ同様に温度依存型性決定動物である) *Kdm6b* の発現変化を報告していることから(Czerwinski et al., *Dev Biol.* 2016:420:166-177)、温度依存型性決定と遺伝型性決定の共通するメカニズムとなることが示唆された。

ミジンコ *Daphnia pulex* WTN6 系統による光周期依存的な雌雄の誘導系を用いた RNAseq 解析やメタボローム解析によって、雄誘導(短日)条件において幼若ホルモン経路の活性化に関与する複数のシグナル経路や因子(イオンチャネル型グルタミン酸経路、protein kinase C 経路、ビタミン B5)を同定した。今後は、これらの因子が他のミジンコ類においても保存されているのか調べる必要がある。

性決定期以前の卵母細胞から性分化過程の後胚発生期に及び計 10 時点を用いた発生時系列 RNAseq を行なった。その結果、性特

異的スプライシングやクロマチン修飾によって単一のゲノム情報から雌雄それぞれへの発生運命が決められ、さらに脱皮ホルモンシグナルによって雌形質の発現が制御されている可能性が示唆された。

上述の爬虫類の温度依存型性決定と同様に、ミジンコの性決定においてもエピゲノム修飾による制御機構の存在が示唆されたが、依然として環境刺激の受容からエピゲノム修飾に至る分子機序は不明である。今後、爬虫類ではTRPを介した下流シグナル経路の解析、そしてミジンコではJHの制御機構の解析から性決定を制御するエピゲノム修飾機構の多様性及び共通原理を明らかにする実験が必要になる。

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60件)

Hiruta, C., Kakui, K., Tollefsen, K.E. and Iguchi, T. (2018). Targeted gene disruption by use of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex*. *Genes to Cells*, (in press).

Toyota, K., McNabb, N.A., Spyropoulos, D.D., Iguchi, T. and Kohno, S. (2017). Toxic effects of chemical dispersant Corexit 9500 on water flea *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 37, 201-206.

Toyota, K., Williams, T.D., Sato, T., Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2017). Comparative ovarian microarray analysis of juvenile hormone-responsive genes in water flea *Daphnia magna*: potential targets for toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 37, 374-381.

Toyota, K., Sato, T., Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2017). Protein kinase C involved with upstream signaling of methyl farnesoate for the photoperiod-dependent sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. *Biology Open*, 6, 161-164.

Miyakawa, H. and Iguchi, T. (2017). Comparative luciferase assay for establishing reliable *in vitro* screening system of juvenile hormone agonists. *Journal of Applied Toxicology*, 37, 1082-1090.

Toyota, K., Sato, T., Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2017). Photoperiodism of male

offspring production in the water flea *Daphnia pulex*. *Zoological Science*, 34, 312-317.

Miyakawa, H., Watanabe, M., Araki, M., Ogino, Y., Miyagawa, S. and Iguchi, T. (2017). Juvenile hormone-independent function of *Krüppel homolog 1* in early development of water flea *Daphnia pulex*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93, 12-18.

Yatsu, R., Katsu, Y., Kohno, S., Mizutani, T., Ogino, Y., Guillette, L.J.Jr., Miyagawa, S. and Iguchi, T. (2016). Characterization of evolutionary trend in squamate estrogen receptor sensitivity. *General and Comparative Endocrinology*, 238, 88-95.

Toyota, K., Gavin, A., Miyagawa, S., Viant, M.R. and Iguchi, T. (2016). Metabolomics reveals an involvement of pantothenate for male production responding to the short-day stimulus in the water flea, *Daphnia pulex*. *Scientific reports*, 6, 25125.

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Parrott, B.B., Yamaguchi, K., Ogino, Y., Miyakawa, H., Lowers, R.H., Shigenobu, S., Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T. (2016). RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during *Alligator mississippiensis* temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics*, 17, 77.

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R.H., Ogino, Y., Fukuta, N., Katsu, Y., Ohta, Y., Tominaga, M., Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T. (2015). TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Scientific Reports*, 5, 18581.

Miyagawa, S., Yatsu, R., Kohno, S., Doheny, B.M., Ogino, Y., Ishibashi, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T. (2015). Identification and characterization of the American alligator androgen receptor and the intriguing role of its splice variant. *Endocrinology*, 156, 2795-2806.

[学会発表](計30件)

Iguchi, T. EDC's and steroid receptors across species. 25 Years of Endocrine Disruption Research: Past Lessons and

Future Directions. (ベセダ、メリーランド州、アメリカ) 2016年

Iguchi, T. Outcomes of the Japanese program on endocrine disruption (EXTEND2010) and new program of endocrine disrupting chemicals in the Japanese Ministry of the Environment (EXTEND2016). 7th International Fresenius Conference Endocrine Disruptors (ボン、ドイツ) 2016年

Miyagawa, S., Yatsu, R., Kohno, S., Guillette, L.J.Jr. and Iguchi T. Research on the mechanisms of temperature-dependent sex determination in American alligator, *Alligator mississippiensis*. The Biology and Ecotoxicology of the American Alligator, The 3rd Biennial Symposium (タイトスビル、フロリダ州、アメリカ) 2016年

〔図書〕(計10件)

Toyota, K., Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2018). Environmental control on sex differentiation in *Daphnia*. In Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life. Part 2: Diversity in Sex Differentiation. Springer. (in press).

Miyagawa, S., Yatsu, R. and Iguchi, T. (2018). Environmental control on sex differentiation in reptiles. In Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life. Part 2: Diversity in Sex Differentiation. Springer. (in press).

Toyota, K., Miyagawa, S., Ogino, Y. and Iguchi, T. Microinjection-based RNA interference method in the water flea, *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*. In: RNA Interference, pp119-135, Abdurakhmonov IY (Ed.), InTech, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井口 泰泉 (IGUCHI, Taisen)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任教授
研究者番号：90128588

(2) 研究分担者

荻野 由紀子 (OGINO, Yukiko)
九州大学・農学研究院・准教授
研究者番号：00404343

(2) 研究分担者

宮川 信一 (MIYAGAWA, Shinichi)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師
研究者番号：30404354

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()