

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16086213

研究課題名（和文）魚類における性決定と生殖腺の性分化の分子メカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish

研究代表者

長濱 嘉孝（ NAGAHAMA YOSHITAKA ）

基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門・特任教授

研究者番号：50113428

研究成果の概要：本研究は、2種の雌雄異体魚（メダカとティラピア）を実験材料として、脊椎動物における性決定と生殖腺の性分化の分子メカニズムを解明することを目的として行った。その結果、*DMY* はメダカの雄への分化に必要なかつ十分であること、魚類では、*DMRT1* は精巢の形成に不可欠であること、さらに *Foxl2* は *cyp19a1*（卵巣型芳香化酵素）遺伝子の発現促進を介して卵巣形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	17,600,000	0	17,600,000
2005年度	17,600,000	0	17,600,000
2006年度	17,600,000	0	17,600,000
2007年度	17,600,000	0	17,600,000
2008年度	4,400,000	0	4,400,000
総計	74,800,000	0	74,800,000

研究分野：生殖生物学、内分泌学、発生生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：性決定/性分化 魚類 性決定遺伝子 エストロゲン *DMRT1*
Foxl2 芳香化酵素 メダカ

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物の性は遺伝的に決定される。そのうち、哺乳類を含むXY型の性決定様式を示す動物では、Y染色体に存在する性決定遺伝子の働きで性が決定される。この場合、性決定遺伝子が有ると雄となり精巢が形成され、無ければ雌となり卵巣が形成される。脊椎動物のY染色体に存在する性決定遺伝子が単離、同定されたのは、1990年にヒトで見つかった*SRY*と呼ばれる遺伝子が最初である。その後、*SRY*のホモログ（*Sry*）はマウスを含むいくつかの哺乳類で見つかり、哺乳類で共通の性決定遺伝子と考えられるように

なった。哺乳類以外の脊椎動物では多くの国内外における精力的な研究にもかかわらず長いこと不明であった。そのような状況下、2002年に我々は、メダカの性決定遺伝子の最有力候補としてDMドメインを有する遺伝子を単離し、*DMY*と命名した。

一方、脊椎動物における生殖腺の性分化メカニズムに関する研究は、特にマウスを用いて*Sry*の働きで誘導される精巢分化のメカニズムが重点的に解析され、*Sox9*が*Sry*の標的遺伝子の最有力候補として同定された。哺乳類以外の脊椎動物では、特に鳥類や魚類を対象とした卵巣形成に果すエストロゲンの役

割に関する研究、爬虫類における温度依存性の性決定/分化の研究、性転換魚に関する研究などが活発に行われた。我々は主にティラピアの性分化期生殖腺における遺伝子発現変動を詳しく解析することにより、精巢形成にDMRT1が、卵巢形成にエストロゲンが重要な役割を果たしていることを示唆した。

2. 研究の目的

本研究では、メダカの性決定遺伝子の有力候補として単離されたDMYが真のメダカの性決定遺伝子であることを示す決定的な証拠(Loss-of-functionとgain-of-function)を得ることを第一の目的とした。さらに、メダカとティラピアを用いて、性決定遺伝子の有無によって誘導される生殖腺の性分化メカニズム、特に精巢形成に果すDMRT1の役割、及び転写制御因子Foxl2のエストロゲン合成促進を介した卵巢形成に果す役割を明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

性決定遺伝子DMYの研究にはメダカ(*Oryzias latipes*)、生殖腺の性分化に関する研究にはティラピア(*Oreochromis niloticus*)を用い、一部はメダカも使用した。メダカもティラピアも雌雄異体魚であり、自然界では生涯を通じて性転換はしない。

性決定/分化の研究には、使用する個体の遺伝的性を知ることが不可欠である。メダカではDMYの有無をPCRにより調べることで使用個体の遺伝的性を知ることが可能であり、またティラピアでは先に我々の研究室で作出したXX全雌群、XY全雄群を使用することで使用個体の遺伝的雌雄の判別が可能である。

4. 研究成果

2種類の硬骨魚類(メダカとティラピア)を主な実験モデル動物として、性決定と生殖腺の性分化の分子メカニズムに関して以下の研究成果が得られた。

(1) 性決定:

DMY(遺伝子、タンパク質ともに)は孵化前のXY胚生殖腺の体細胞(セルトリ細胞)で特異的に発現する。しかし、この発現データからだけではDMYがメダカの性決定遺伝子であること確かな証拠にはならない。メダカの性決定遺伝子としての決定的な証拠を得るためには機能欠失実験(loss-of-function)と機能獲得実験(gain-of-function)の実験が必要となる。我々は先に、メダカ野生集団のなかから、DMYをゲノム上にもつにもかかわらず表現型が雌であるXY個体(loss-of-function)を見つけた。これらの個体のDMYの塩基配列

を調べたところ、DMYの第3エクソン部分に1塩基の挿入があり、その結果不完全なDMYタンパク質がつくられていることがわかった。このXY雌と正常なXY雄との交配から得たF1では、母親由来のDMYをもつXY個体はすべて雌になった。

本研究ではまず、DMYに特異的なgrip-NA(遺伝子特異的に翻訳を抑制できる改変RNA)を1細胞期のXY受精卵に顕微注入することによりDMYをノックダウンした時の生殖細胞の形態を詳しく解析した。その結果、遺伝的にはXY個体でありながら孵化日には、すでに生殖細胞の体細胞分裂が活発となり、一部の生殖細胞では減数分裂期の特異的遺伝子マーカーであるSCP3(Synaptonemal Complex Protein 3)や42Sp43(RNA binding protein 42Sp43)の発現が認められた(図1)。従って、これらの生殖細胞は減数分裂期へと移行していると判断された。マウスの性決定遺伝子Sryとは異なり、メダカにおけるDMYの発現は成熟精巢の周辺部の精原細胞を囲むセルトリ細胞でも観察される。これらの結果から、メダカの性決定遺伝子であるDMYの働きの1つは生殖細胞に間接的に働いて、体細胞分裂(mitosis)を抑制しているものと推察された。



図1 XY個体へのDMYノックダウンのSCP3発現に及ぼす影響(孵化5日後)

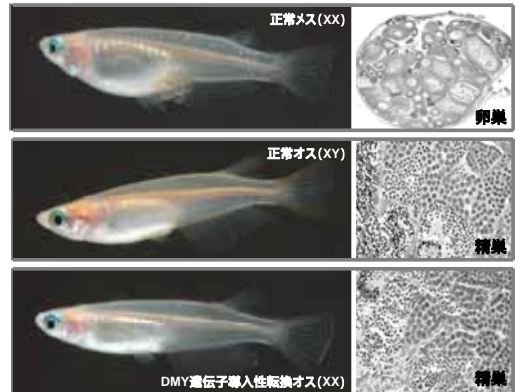


図2 XX受精卵へのDMYの過剰発現の影響

次に、DMYがメダカの性決定遺伝子であるための十分条件を満たしていることを示すべくXX受精卵へのDMY遺伝子導入の実験を行った(図2)。メダカY染色体のY染色体特異的領域(約26万塩基対)のうち、DMY遺伝子領域(タンパクコード領域約5.6万塩基対、遺伝子上流領域約6万塩基対、遺伝子下流領域約0.1万塩基対)をクローニングベクターにつなぎ、これを一細胞期の遺伝的雌

(XX)卵に顕微注入法により導入した。d-rR 系統の卵を用いたので、遺伝的雌はシロメダカ、遺伝的雄はヒメダカとなる。親まで成長した 58 個体の遺伝的雌メダカのうち 13 個体が雄の二次性徴を示した。さらにそのうち 8 個体は受精可能な精子を作った。本来雌になるべき XX 個体のゲノムに *DMY* が導入されたことにより正常な雄になったと結論される。これにより、*DMY* は XX 個体を雄に分化させるのに「十分な」機能をもつと結論された。

本研究の結果を総合することで、「*DMY* 遺伝子は、メダカの雄への分化に必要かつ十分な遺伝子である」と結論された。*DMY* 遺伝子は脊椎動物で見つかった 2 番目の性決定遺伝子である。本研究は、遺伝的な雌を一つの遺伝子導入で雄に分化させることに成功した最初の例である。このことは、メダカの X 染色体と Y 染色体とが機能的には *DMY* 遺伝子を除いて同一であることを示唆している。

(2) 精巣分化：

ティラピアの精巣分化に先立って発現する遺伝子は *DMRT1* である。本研究では、精巣分化に果たす *DMRT1* の役割を直接的に示す目的で、遺伝的全雌 (XX) 群の受精卵に *DMRT1* 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニック XX ティラピアを作製し、表現型を解析した。*DMRT1* 遺伝子を導入された XX 個体のほとんどで雄への機能的性転換が観察された (図 3)。生殖腺には少量の卵巣組織も認められたが精巣に比べると著しく小さかった。形成された精巣には種々の発達過程にある生殖細胞 (精原細胞、精母細胞、精細胞、精子) とともに、著しく活性化された 2 種の体細胞 (ライディッヒ細胞、セルトリ細胞) が認められた。特に、ライディッヒ細胞では 3 β -HSD などのステロイド代謝酵素が強い発現 (遺伝子、タンパク質レベルとも) を示した。さらに、性転換した XX 雄は正常な雄の性行動 (体色も雄型) を示すとともに、それらの個体から得られた精子の運動能 (運動時間) は正常の XY 雄や超雄 (YY) の精子よりも著しく高かった (2~3 倍)。

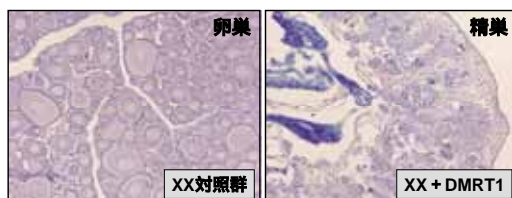


図3 XX受精卵への*DMRT1*の過剰発現の影響

一方、メダカでは *DMRT1* 遺伝子の DM ドメイン配列に変異を起こさせると、遺伝的

には雄 (XY) でも生殖腺の一部に卵巣が形成されることがわかった。

以上の *DMRT1* の loss-of-function と gain-of-function の実験結果、及び、すでに我々が明らかにしているメダカやティラピアの生殖腺の性分化における *DMRT1* 遺伝子発現パターンの結果を総合することにより、*DMRT1* は魚類の精巣の分化、形成に不可欠であると結論された。

(3) 卵巣分化：

ティラピアでは、XX 受精卵を芳香化酵素 (エストロゲンの主要な合成酵素) 阻害剤 (フアドロゾール) やエストロゲン受容体のアンタゴニスト (タモキシフェン) を含む水槽で飼育すると、遺伝的には XX (雌) でも、性転換を起こして精巣を形成し、機能的な雄となる。従って、ティラピアの卵巣分化にエストロゲンが不可欠であると考えられる。

他の脊椎動物とは異なり、魚類には 2 種類の芳香化酵素遺伝子が存在する。生殖腺、特に卵巣に強く発現する卵巣型芳香化酵素 (*cyp19a1*) と主に脳に強く発現する脳型芳香化酵素 (*cyp19a2*) があり、ティラピアやメダカではこれら 2 つの芳香化酵素遺伝子の相同性は約 70% である。そこで本研究では、卵巣型芳香化酵素遺伝子の発現制御にかかわる因子として *Foxl2* に注目した。

性分化期における *Foxl2* の発現は *cyp19a1* の発現と同様に XX 生殖腺で高く、XY 生殖腺では低い。*Foxl2* 発現細胞は形態的性分化が起こる前の XX 生殖腺ですでに観察され、*cyp19a1* と同様に間質細胞である。また、*Foxl2* は単独でも芳香化酵素遺伝子のプロモーター活性を高める (図 4)。従って、*Foxl2* は芳香化酵素遺伝子の雌特異的発現に深くかかわっていると推察される。

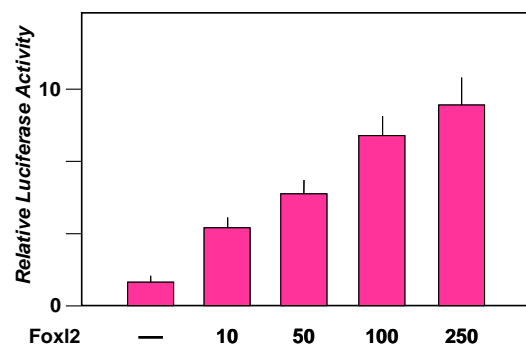


図4 *Foxl2*による卵巣型芳香化酵素遺伝子の発現促進

次に、ティラピアの生殖腺分化に果たす *Foxl2* の役割を調べるために、遺伝的全雌 (XY) 群に *Foxl2* を過剰発現させたトランスジェニックティラピアを作製した。その結果、形成された生殖腺は精巣であるものの、その周辺部が著しく退行した精巣をもつ個体が

出現した。また、精巣周辺部の間質組織中には芳香化酵素遺伝子の発現が認められた。また、このような個体の血中エストロゲン（エストラジオール-17 β ）とアンドロゲン（11-ケトテストステロン）は著しく高かった（図5）。一方、遺伝的全雌（XX）群に *Foxl2* のドミナント・ネガティブ変異体を過剰発現させて *Foxl2* の機能を抑制させたトランスジェニック個体の一部は、遺伝的に XX 個体でありながら完全に性転換を起こし、成熟した精巣を有していた。また、このような個体の血中のエストラジオール-17 β は正常な XX 個体と比べて著しく低かった（図5）。従って、本研究により、*Foxl2* は XX 生殖腺特異的な芳香化酵素遺伝子の発現を誘導することによって卵巣分化の制御に深くかかわっていることが初めて示された。

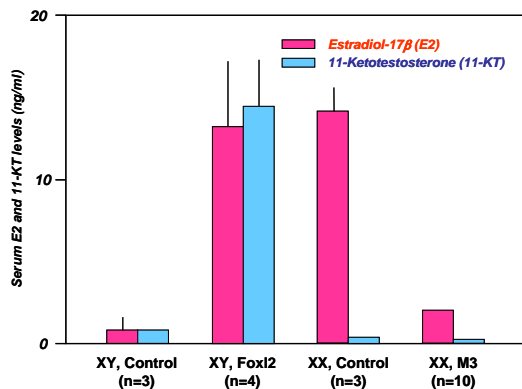


図5 血中性ホルモン量に及ぼす *Foxl2* のドミナント・ネガティブ変異体の過剰発現の影響

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10件)

Sakai, F., Kobayashi, T., Matsuda, M. and Nagahama, Y. Stability in aromatase immunoreactivity of steroid-producing cells during early development of XX gonads of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: An organ culture study. *Zool. Sci.*, 25, 344-348 (2008). (査読有)

Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G. and Nagahama, Y. Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9 during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev. Dyn.*, 237, 297-306 (2008). (査読有)

Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura,

M. and Nagahama, Y. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.*, 78, 333-341 (2008). (査読有)

Zhou, L.Y., Wang, D.S., Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A. and Nagahama, Y. Characterization, expression and transcriptional regulation of *P450c17-1* and *-II* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 362, 619-624 (2007). (査読有)

Zhou, L.Y., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yano, A., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Sakai, F. and Nagahama, Y. A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney. *Endocrinology*, 148, 4288-4291 (2007). (査読有)

Matsuda, M., Shinomiya, S., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. and Nagahama, Y. *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3865-3870 (2007). (査読有)

Wang, D.S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K. and Nagahama, Y. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription female-specifically by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.*, 21, 712-725 (2007). (査読有)

Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Lau, E.L., Suzuki, A., Sakai, F., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. Knock-down of *DMY* initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 351, 815-819 (2006). (査読有)

Nakamura, I., Evans, J.C., Kusakabe, M., Nagahama, Y. and Young, G. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 144, 224-231 (2005). (査読有)

Zhou, L.Y., Wang, D.S., Senthilkumaran, S., Yoshikuni, M., Shibata, Y., Kobayashi, T., Sudhakumari, C.C. and Nagahama, Y. Cloning, expression and characterization of three types of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Mol. Endocrinol.*, 35, 103-116 (2005). (査読有)

[学会発表](計5件)

Nagahama, Y. Sex determination/ differentiation and sexual plasticity in fish. XX Inter- national Congress of Zoology. Paris, France. August 26-29, 2008.

Nagahama, Y. Sex determination, differentiation and sexual plasticity in fish: Current status and future directions. International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.

Nagahama, Y. Hormonal regulation of oocyte maturation and ovulation in fish and starfish – comparative to general. 6th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE). Sliguri, Darjeeling, West Bengal, India. December 10-14, 2007.

Nagahama, Y. Molecular mechanisms of sex determination/differentiation in fish. The International Symposium on *Oryzias* Fish. Bangkok, Thailand. November 12-14, 2007.

Nagahama, Y. *DMY*: The second sex-determining gene in vertebrates. 15th International Congress of Comparative Endocrinology. Boston, USA. May 22-27, 2005.

[図書](計2件)

長濱嘉孝、井口泰泉共編、内分泌と生命現象、シリーズ21世紀の動物科学.日本動物学会監修, pp.256. 培風館(2007).

長濱嘉孝 動物の性はそのように決まるか?蛋白質核酸酵素Vol. 49, 97-134(2004).

6. 研究組織

(1)研究代表者

長濱 嘉孝 (NAGAHAMA YOSHITAKA)
基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門・特任教授
研究者番号: 50113428

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし