

令和元年6月18日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18590

研究課題名(和文)メダカ属魚類におけるXY型からZW型への性決定機構の進化

研究課題名(英文)Transition mechanism between XY and ZW sex determination system in medaka fishes

研究代表者

竹花 佑介 (Takehana, Yusuke)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：60432093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、互いに近縁でありながら異なる性決定システム(XY型・ZW型)をもつメダカ属3種について性決定遺伝子を同定し、その進化メカニズムを解明することを目的とした。XY型のハウザンメダカについては、常染色体上のDmrt1がY染色体に重複転座しており(Dmrt1Y)、Dmrt1Yに変異をもつXY個体がメスに性転換した。このことから、Dmrt1Yが本種の性決定遺伝子であることが示唆された。また、ZW型のハブスメダカとジャワメダカについては、性染色体上の性決定遺伝子候補についてロックアウト個体の作出を行ったが、いずれの候補遺伝子も性転換を誘導せず、両種が未知の性決定遺伝子をもつと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんどすべての動物にオス・メスがあるのと対照的に、オス・メスを決定する仕組みは動物種によってさまざまである。しかし、この性決定の仕組みがどのように多様化してきたのかはほとんどわかっていない。今回の研究により、メダカ属という近縁なグループ内で、下流遺伝子の重複転座によって異なる性染色体が独立に進化してきたことや、XY型とZW型で性決定遺伝子の作用点が異なることが明らかになってきた。これらの成果は、性決定の仕組みが(従来考えられてきたよりも)さらに多様である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Sex chromosomes harbor a primary sex-determining signal that triggers sexual development of the organism. However, independent evolution of sex chromosomes is widespread in non-mammalian vertebrates, suggesting that sex determination mechanisms are regulated by different genes and have evolved rapidly. To understand the molecular mechanism underlying the XY-ZW transitions, we analyzed sex chromosomes and sex-determining genes of medaka species. We found that duplicated copies of Dmrt1 at the Y chromosomes were required for male determination in the XY species, *Oryzias latipes*. Although no sex-determining gene has been isolated in the ZW species, *O. hubbsi* or *O. javanicus*, Gsdf is not a conserved downstream component of male determination pathway in *O. hubbsi*. These results suggest that sex-determining genes have more diverse downstream targets between XY and ZW systems than previously thought.

研究分野：遺伝学

キーワード：性決定遺伝子 性染色体 遺伝子重複

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物では、性染色体の組み合わせによって遺伝的にオス・メスが決定される。この性染色体による性決定システムには XY 型と ZW 型の 2 パターンが存在し、XY 型の場合は性染色体がヘテロ接合になるとオスに分化し、ZW 型の場合は性染色体がヘテロ接合になるとメスに分化する。XY 型、ZW 型いずれの場合でも、性染色体には生殖巣の分化方向を決定する因子 (性決定遺伝子) が存在するはずであるが、これまでに同定された 8 つの性決定遺伝子のほぼすべてが XY 型に由来するため (Kikuchi and Hamaguchi, 2013)、ZW 型性決定システムの分子基盤はほとんど未解明であった。

また、哺乳類は XY 型、鳥類は ZW 型というように、脊椎動物には XY 型と ZW 型の性決定システムが混在している (Ezaz *et al.*, 2006)。しかも、性染色体や性決定遺伝子の種類はシステム間で異なり、これらは同じシステムであっても種間で異なる。これらのことから、脊椎動物の進化過程では新奇の性決定遺伝子が何度も誕生し、それによって異なる性決定システムや性染色体が頻繁に生じてきたと考えられてきた。実際に異なる Y 染色体から性決定遺伝子が相次いで発見されたことで、XY 型から別の XY 型への進化メカニズムが明らかにされつつある。しかし、XY 型から ZW 型が生じた過程は全く明らかにされていない。

研究代表者らはこれまでに、メダカ属には XY 型と ZW 型の性決定システムが混在し、解析したすべての種が異なる性染色体をもつという、驚くべき多様性を明らかにしてきた。ZW 型は *javanicus* グループの 2 種 (ハブスメダカとジャワメダカ) のみで認められ、この 2 種に近縁なハウザンメダカやインドメダカは XY 型である。このことから、メダカ属では XY 型から ZW 型への転換が少なくとも 1 回生じたことが示唆された。研究代表者らはすでに、4 種のうち最初に分岐したインドメダカについて、その性決定遺伝子が *Sox3^Y* であることを明らかにした (Takehana *et al.*, 2014)。また、ハブスメダカとジャワメダカについても性決定遺伝子座を遺伝学的に同定した (Takehana *et al.*, 2007; 2008)。さらに、ハウザンメダカの XY 性染色体を探索したところ、インドメダカと相同な染色体 (10 番染色体) が性染色体であることを突き止めた (未発表データ)。

2. 研究の目的

本研究では、互いに近縁でありながら異なる性決定システム (XY 型および ZW 型) をもつメダカ属 3 種 [ハウザンメダカ (XY 型)、ハブスメダカ (ZW 型)、ジャワメダカ (ZW 型)] について、各種の性決定遺伝子を同定する。これら 3 種とその外群にあたるインドメダカ (XY 型; 性決定遺伝子: *Sox3^Y*) を含めた 4 種で性決定機構を比較し、その進化メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

候補遺伝子の探索: XY 型のハウザンメダカについては、RAD-seq を用いて性決定遺伝子座の詳細なマッピングを行った。性決定遺伝子座周辺のゲノム領域をメダカと比較し、候補遺伝子を探索した。また、この過程で同定された *Dmrt1* 遺伝子について、BAC および fosmid クローンをを用いた染色体 FISH 解析を行った。また、ZW 型のハブスメダカとジャワメダカについては、先行研究によって同定された数 Mb にわたる性決定領域について、メダカゲノム情報を用いて既知の性決定・性分化関連遺伝子を探索した。

候補遺伝子の発現解析: 定量 PCR や *in situ* ハイブリダイゼーション、CRISPR/Cas9 を用いた GFP ノックインなどにより、各候補遺伝子の発現パターンを解析した。

候補遺伝子のノックアウト解析: CRISPR/Cas9 システムを用いて、各候補遺伝子のノックアウト実験を行った。これにより機能欠損型の変異をもつ個体が性転換するかどうかを解析した。

全ゲノム解析: ジャワメダカについて、ZW 個体から高分子 DNA を抽出し、PacBioRSII および 10xGenomics を用いた全ゲノム解析を行った。

4. 研究成果

XY 型のハウザンメダカの性染色体はメダカ 10 番染色体と相同であることが判明していたが、性決定遺伝子座周辺の一部の DNA マーカーがメダカ 9 番染色体の塩基配列と高い相同性を示した。そこでその周辺領域を詳細に解析したところ、性決定遺伝子座に *Dmrt1* 遺伝子が同定された。*Dmrt1* はショウジョウバエの性決定に関与する *Dsx* と線虫の性決定に関与する *Mab3* が共通して持つ DNA 結合モチーフ (DM ドメイン) を含む転写因子をコードし、多くの脊椎動物においてオスの分化に必須な遺伝子である。メダカでは 9 番染色体の末端に位置しており、メダカの性決定遺伝子 *Dmy* は *Dmrt1* が重複して生じた遺伝子である。そのため、本種の性決定遺伝子候補として *Dmrt1* が考えられた。

そこで *Dmrt1* が 10 番染色体に転座したのか重複したのかを調べるため、FISH 解析を行った。その結果、*Dmrt1* のシグナルは 1 対の染色体末端と 10 番染色体の片方に認められた。このことから、*Dmrt1* は常染色体から Y 染色体に遺伝子重複したことが考えられた。更に、Y 染色体上のシグナルが強かったことから、Y 染色体には複数コピーが存在していることが予想された。そこで qPCR により *Dmrt1* のコピー数を調べたところ、Y 染色体には 6~8 コピー存在していることが判明した。次にハウザンメダカにおける Y 染色体上の *Dmrt1* が性決定に関与しているかを調べるためにノックアウト実験を行った。CRISPR/Cas によって *Dmrt1* 翻訳領域に変異を導

入した G0 オス個体と野生型メス個体の交配をしたところ、G1 の XY 個体では *Dmrt1* に 5 種類の機能欠失を同時に持つ個体が得られた。これらの個体では、Y 染色体の複数の *Dmrt1* に変異が入っていると考えられた。そこで、同じペアから得られた G1 を成魚に育てたところ複数の変異をもつ XY 個体がメスに性転換した。一方、G1 の XX 個体には変異がみられなかった。これらの結果は、Y 染色体上の *Dmrt1* がオス決定に必要であることを示している。したがって、ハウザンメダカでは、もともと 9 番染色体にあった *Dmrt1* が Y 染色体に重複することによって、機能分化を遂げ、新規の性決定遺伝子として進化した可能性が考えられる。

一方、ZW 型のハブスメダカとジャワメダカについては、性染色体上に存在する複数の性決定遺伝子候補について発現解析やノックアウト実験を行った。しかし、いずれの候補遺伝子も未分化生殖腺での発現が認められず、ノックアウト個体も性転換しなかった。このことから、両種が未知の性決定遺伝子をもつと考えられた。そこで、ジャワメダカについて全ゲノム解析を行い、Contig N50 値が 3.8Mb を超える高精度のゲノム配列を決定した。しかし、Z 染色体と W 染色体を区別してアセンブルすることは予想以上に困難で、両者の塩基配列解読には至らなかった。そこで、現在はこのゲノム配列をリファレンスとし、Z 染色体あるいは W 染色体の一方のみをもつ半数体の全ゲノムデータをマッピングすることで、W 特異的な塩基配列の特定を計画している。

また、メダカやルソンメダカにおいて共通してオス分化に関わる *Gsdf* について、ハブスメダカでも機能解析を行ったが、性転換を生じなかった。このことから、ハブスメダカメダカ属のオス分化カスケードには *Gsdf* 依存的なものと非依存的なものがあることが判明した。また、これまでに性決定遺伝子が同定された XY 型のメダカやインドメダカでは下流遺伝子の *Gsdf* がオス分化に重要であることが明らかにされているが (Imai et al., 2015 ほか)、ZW 型のハブスメダカではノックアウト個体に性転換が生じないことから、オス分化に *Gsdf* が必要ないことが示された。これらの成果は、XY 型と ZW 型で性決定遺伝子の作用点が異なることを示唆している。

< 引用文献 >

- Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Graves JAM (2006) Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* 16:R736-743.
- Imai T, Saino K, Matsuda M (2015) Mutation of Gonadal soma-derived factor induces medaka XY gonads to undergo ovarian development. *BBRC* 467:109-114.
- Kikuchi K, Hamaguchi S (2013) Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics* 242:339-353.
- Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K (2014) Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications* 5:4157.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Ishikawa A, Kabeya N, Ikeya K, Kakioka R, Cech JN, Osada N, Leal MC, Inoue J, Kume M, Toyoda A, Tezuka A, Nagano AJ, Yamasaki YY, Suzuki Y, Kokita T, Takahashi H, Lucek K, Marques D, Takehana Y, Naruse K, Mori S, Monroig O, Ladd N, Schubert CJ, Matthews B, Peichel CL, Seehausen O, Yoshizaki G, Kitano J (2019) A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes. *Science* 364:886-889. (査読有り) DOI: 10.1126/science.aau5656
- (2) Nakayama T, Shimmura T, Shinomiya A, Okimura K, Takehana Y, Furukawa Y, Shimo T, Senga T, Nakatsukasa M, Nishimura T, Tanaka M, Okubo K, Kamei Y, Naruse K, Yoshimura T (2019) Seasonal regulation of the lncRNA *LDAIR* modulates self-protective behaviours during the breeding season. *Nature Ecology & Evolution* 3:845-852. (査読有り) DOI: 10.1038/s41559-019-0866-6
- (3) Ohde T, Takehana Y, Shiotsuki T, Niimi T (2018) CRISPR/Cas9-based heritable targeted mutagenesis in *Thermobia domestica*: A genetic tool in an apterygote development model of wing evolution. *Arthropod Structure & Development* 47:362-369. (査読有り) DOI: 10.1016/j.asd.2018.06.003
- (4) Kimura T, Takehana Y, Naruse K (2017) *pnp4a* is the causal gene of the medaka iridophore mutant guanineless. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7:1357-1363. (査読有り) DOI:10.1534/g3.117.040675.
- (5) Sagai T, Amano T, Maeno A, Kimura T, Nakamoto M, Takehana Y, Naruse K, Okada N, Kiyonari H, Shiroishi T (2017) Evolution of *Shh* endoderm enhancers during morphological transition from ventral lungs to dorsal gas bladder. *Nature Communications* 8:14300. (査読有り) DOI:10.1038/ncomms14300.
- (6) Takehana Y, Sakai M, Narita S, Sato T, Naruse K, Sakaizumi M (2016) Origin of the boundary populations in medaka (*Oryzias latipes* species complex). *Zoological Science* 33:125-131. (査読有り) DOI:10.2108/zs150144

- (7) [Takehana Y](#), Matsuda Y, Ikuta J, Kryukov AP, Sakaizumi M (2016) Genetic population structure of the Japanese grass lizard, *Takydromus tachydromoides* (Reptilia: Squamata), inferred from mitochondrial cytochrome *b* variations. *Current Herpetology* 35:22-32. (査読有り) DOI: 10.5358/hsj.35.22
- (8) Kagawa N, Honda A, Zenno A, Omoto R, Imanaka S, [Takehana Y](#), Naruse K (2016) Arginine vasotocin neuronal development and its projection in the adult brain of the medaka. *Neuroscience Letters* 613:47–53. (査読有り) DOI:10.1016/j.neulet.2015.12.049

〔学会発表〕(計8件)

- (1) 山本永花, 三田村学歩, 市川椋太, 嶺井隆平, [竹花佑介](#), 小倉淳, 西郷甲矢人「メタゲノム解析を用いた食性調査の試み～野生メダカを例に～」第66回日本生態学会大会, 神戸国際会議場(神戸), 2019年3月15日～19日
- (2) [竹花佑介](#)「魚類性決定遺伝子の多様化機構」第41回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜), 2018年11月28日～30日
- (3) [竹花佑介](#), 成瀬清「ハブスメダカにおける *Gsdf* に依存しないオス分化経路」日本動物学会第89回大会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2018年9月13日～15日
- (4) [Takehana Y](#), Heilig AK, Gücüm S, Naruse K “*Gsdf*-dependent and -independent male sex determination pathways in medaka fishes.” 9th International Conference on Stickleback Behavior and Evolution. Kyoto, Japan, 2018年7月3日～7日
- (5) [Takehana Y](#), Heilig AK, Gücüm S, Naruse K “*Gsdf*-independent male determination pathway in a medaka fish, *Oryzias hubbsi*.” 8th International Symposium on Vertebrate Sex Determination. Hawaii, USA, 2018年4月16日～20日
- (6) [Takehana Y](#), Yasugi M, Nagano A, Naruse K “Sex-determining locus of the medaka-related fish, *Oryzias haugiensis*.” 8th Aquatic Animal Models of Human Disease Conference. The University of Alabama, Birmingham, USA, 2017年1月7日～12日
- (7) [Takehana Y](#), Yasugi M, Nagano A, Naruse K “Identification of sex-determining locus in the medaka-related fish, *Oryzias haugiensis* collected at southern Vietnam.” 22th International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan. OIST (Onna-son)/Okinawa Convention Center (Naha), Okinawa, 2016年11月14日～19日
- (8) [Takehana Y](#), Myosho T, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K “Repeated co-option of *Sox3* as the sex-determining gene in *Oryzias*.” 8th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology. The University of Hong Kong, Hong Kong, China, 2016年6月20日～24日

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。