

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07242

研究課題名(和文)YY超雄両生類を用いたゲノム解析および雄決定遺伝子の探索

研究課題名(英文)Genomic analysis of the YY supermale frog and identification of the male-determining gene

研究代表者

高瀬 稔 (TAKASE, Minoru)

広島大学・両生類研究センター・准教授

研究者番号：80226779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：両生類において精巣分化をスタートさせるスイッチとして働く遺伝子(雄決定遺伝子)について、世界中で実験に使われているネッタイツメガエルを用いて探索した。ヒトでも見られるXX/XY型の性決定様式を示す動物種では、雄はXY型であり、雌はXX型である。まず、X染色体を持たない雄(Y型)を人工的に作製し、普通の雌(XX型)と共にそれぞれの遺伝情報(ゲノム)を調べて雌雄間で比較した。さらに、全て雄からなる幼生集団と全て雌からなる幼生集団それぞれにおいて生殖腺が分化する時期に発現している遺伝子を調べて雌雄間で比較した。それらの結果から、精巣分化のスイッチに関係しているかも知れない9個の遺伝子が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両生類の性決定遺伝子に関して、これまでZZ/ZW型性決定様式を示すアフリカツメガエルの雌決定遺伝子としてDM-W遺伝子が報告されているのみである。両生類ではXX/XY型性決定様式を示す種も多く見られるが、その雄決定遺伝子については不明である。今回、アフリカツメガエルの近縁種であるがXX/XY型性決定様式を示すことを明らかにしてきたネッタイツメガエルの雄決定遺伝子候補を明らかにできたことは、両生類性決定機構の分子メカニズムおよびその進化の解明にとって学術的に大変有意義であると考えられる。また、今回解析に用いられた同じ性集団の作製方法を哺乳類に応用することは、食糧不足問題解決の一助になるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to identify the male-determining gene that initiates testis differentiation in amphibians. In the animal species having the XX / XY sex-determination system like humans, males are XY type and females are XX type. First, the genetic information of an artificially produced male without an X chromosome (YY type) and a normal genetic female (XX type) was analyzed respectively and compared between both sexes. Furthermore, the genes expressed at the gonad differentiation in each of all-male tadpole and all-female tadpole were analyzed by RNA-seq and compared between the two tadpole populations. These results revealed that nine genes may be involved in the initiation of testis differentiation.

研究分野：発生生殖内分泌学

キーワード：性決定 両生類 ネッタイツメガエル

## 1. 研究開始当初の背景

両生類の性決定遺伝子としては、ZZ/ZW 型性決定様式を示すアフリカツメガエルから W 染色体上にマッピングされる *DM-W* 遺伝子が単離されているのみである( )。精巢分化に関わる転写因子として *Dmrt1* が知られているが、*DM-W* は *Dmrt1* と DNA 結合領域を共有しているものの機能ドメインを含む C 末側を欠失しているため、*Dmrt1* の内在性競合阻害因子、つまり雄化抑制因子としての機能を持つと考えられている。一方、アフリカツメガエルの近縁種であるネツタイツメガエルでは *DM-W* オルソログは単離されておらず、ネツタイツメガエルの染色体にアフリカツメガエル *DM-W* はハイブリダイズしないことから( )、ネツタイツメガエルではアフリカツメガエルとは異なる性決定機構の存在が考えられる。ネツタイツメガエルの性決定様式は ZZ/ZW 型であると考えられていたが、性転換個体を用いた戻し交配によって得られた個体の性比、および卵のゲノムだけで 2 倍体を発生させる卵核二倍体発生法によって得られた個体の性比を調べたところ、当研究室で維持されているネツタイツメガエルの性決定様式は XX/XY 型性決定様式であることが考えられた。Roco らの報告( )においても、ZZ/ZW 型のネツタイツメガエル集団の一部には Y 染色体も混在する可能性が示唆されている。さらに、3 年間にわたる人工交配の繰り返しにより、両生類では初めてとなる YY 超雄個体が当研究室で作製され、両生類の XX/XY 型性決定様式を解析する材料として非常に有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

YY 超雄ネツタイツメガエルを用いて次のことを明らかにすることにより、ネツタイツメガエル雄決定遺伝子の探索を行う。

まず、ゲノム解析により Y 染色体特異的領域を明らかにする。Y 染色体には、X 染色体との共通領域である偽常染色体領域と Y 染色体特異的領域があることが知られている。そこで、作製した YY 超雄と XX 雌のゲノム DNA を次世代シーケンサーにより解析し、雌雄間でゲノム DNA の塩基配列を比較することにより雄特異的領域のゲノム情報を明らかにする。

さらに、精巢分化過程に特異的に発現している遺伝子の RNA-seq 解析により雄決定遺伝子を探索する。全雄 (XY) 幼生集団および全雌 (XX) 幼生集団において生殖腺性分化時期に発現している遺伝子を網羅的に解析し、雌雄間で比較することにより雄決定遺伝子を探索する。

## 3. 研究の方法

ゲノム解析については、まず YY 超雄および XX 雌それぞれの肝臓からゲノム DNA を抽出し、イルミナ社の HiSeq2500 次世代シーケンサーを用いてゲノム DNA の塩基配列を解析した。次に、CLC workbench システムを用いて雌雄間におけるゲノム DNA 塩基配列の違いを解析した。

RNA-seq 解析については、まず作製した YY 超雄と XX 雌を人工交配させることにより全雄 (XY) 幼生集団を作製し、さらに作製した XX 雄と XX 雌を人工交配させることにより全雌 (XX) 幼生集団を作製した。次に、生殖腺性分化時期を調べるために、各幼生集団の生殖腺・腎臓・副腎の複合組織を取り出し、ブアン液で固定したのちにパラフィン薄切片を作製し、染色後に顕微鏡観察を行った。技術的に性分化中の生殖腺のみからトータル RNA を抽出することは難しいことから、性分化時期の腎臓・副腎と共に生殖腺からトータル RNA を抽出して RNA-seq 解析を行った。ここで、分化過程の精巢においてのみ発現している遺伝子を知るために、性ホルモン処理により発達した卵巢から精巢に分化転換するツチガエル全雌幼生集団を用いて、性ホルモン処理群の分化転換中生殖腺および対照群の卵巢それぞれから抽出したトータル RNA についても RNA-seq 解析を行った。

## 4. 研究成果

最初に、YY 超雄および XX 雌のゲノム解析を行った。得られたデータから、第 1~10 染色体それぞれの塩基配列を雌雄間で比較し、各染色体の全塩基数に対する欠失および多塩基バリエーション、一塩基バリエーション、挿入、置換それぞれが観察された塩基数の出現率を調べた。その結果、第 1~10 染色体それぞれにおける雌雄間の各変異の出現率は、欠失で 0.035~0.0276%、多塩基バリエーションで 0.0132~0.0282%、一塩基バリエーションで 0.142~0.346%、挿入で 0.0166~0.0342%、置換で 0.00172~0.00373%であった。また、各染色体の間では第 9 染色体において全ての変異出現率が高い傾向にあった(図 1)。さらに、各染色体内における変異位置については、各染色体の両端部分に比較的多くの変異が観察される傾向があった。従って、Y 性染色体の偽常染色体領域や Y 染色体特異的領域を同定することは困難であった。そこで、RNA-seq 解析により精巢分化特異的に発現している遺伝子を解析することを考えた。

次に、RNA-seq 解析を行うための生殖腺性分化時期を知るために、全雄幼生集団および全雌幼生集団における生殖腺分化過程について組織切片を作製して組織学的に調べた。NF ステージ 47 の生殖腺は雌雄共に同じ組織像を示し、共に未分化生殖腺であることが分かった。NF ステージ 54 では、雄の生殖腺では一つの生殖細胞がいくつかの体細胞に囲まれた精巢の組織像を示し、

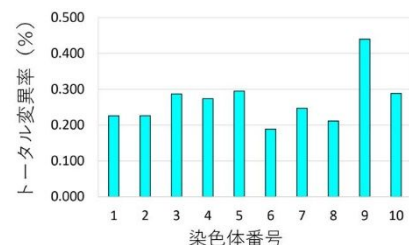


図1. ネツタイツメガエルゲノム解析による雌雄間変異率

一方雌の生殖腺では卵巣腔や生殖細胞シストが観察され、卵巣の組織像を示した。従って、NF ステージ 47 から 54 の間に生殖腺性分化が起こっていることが考えられた。

最後に、全雄幼生集団および全雌幼生集団の性分化時期の生殖腺・腎臓・副腎の複合組織から抽出された RNA について RNA-seq 解析を行った。性決定遺伝子としてまずは転写因子が考えられるために転写因子遺伝子に着目したところ、全雄幼生集団において発現していた 962 個の遺伝子の中に明記された転写因子遺伝子 9 個が含まれていた。同じく全雌幼生集団では 857 個の遺伝子の中に 5 個の転写因子遺伝子が含まれていた。それら転写因子遺伝子はお互いに重複していなかった。雌雄で発現が見られた遺伝子についての Volcano プロットは図 2 に示してある。また、ツチガエル幼生の卵巣から精巣への分化転換生殖腺およびその対照群の卵巣から抽出した RNA について RNA-seq 解析を行い、分化転換生殖腺において特異的に発現している転写因子遺伝子を調べたところ、ネッタイツメガエル全雄幼生集団の生殖腺に発現していた 9 個の遺伝子とは異なっていた。従って、その 9 個の転写因子遺伝子はネッタイツメガエル精巣分化時に特異的に発現してことが考えられた。今回同定された 9 個の遺伝子情報は、今後のゲノム編集による機能解析を行うために大変有用であることが考えられる。さらに、962 個の遺伝子の中には転写因子遺伝子として明らかにされていない遺伝子も含まれていることから、全雄幼生集団にランダムな変異を導入し、精巣分化に異常が見られた個体を解析していくことも今後必要であると考えられる。

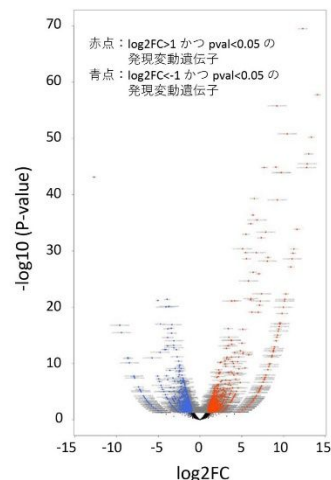


図2. ネッタイツメガエル生殖腺分化発現遺伝子によるMA/Volcano プロット

#### < 引用文献 >

Shin Yoshimoto, Ema Okada, Hirohito Umemoto, Kei Tamura, Yoshinobu Uno, Chizuko Nishida-Umehara, Yoichi Matsuda, Nobuhiko Takamatsu, Tadayoshi Shiba, Michihiko Ito. (2008) A W-linked DM-domain gene, *DM-W*, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. PNAS 105(7): 2469-2474.

Yoshinobu Uno, Chizuko Nishida, Shin Yoshimoto, Michihiko Ito, Yuki Oshima, Satoshi Yokoyama, Masahisa Nakamura, Yoichi Matsuda. (2008) Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. Chromosome Res. 16:999-1011. DOI: 10.1007/s10577-008-1257-z.

Adam J Bewick Dave W Anderson, Ben J Evans. (2011) Evolution of the closely related, sex-related genes *DM-W* and *DMRT1* in African clawed frogs (*Xenopus*). Evolution 65(3):698-712. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.01163.x.

Álvaro S. Roca, Allen W. Olmsteadb, Sigmund J. Degitzb, Tosikazu Amanoc, Lyle B. Zimmermanc, Mónica Bullejosa. (2015) Coexistence of Y, W, and Z sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. PNAS 112(34): E4752-4761. Doi: 10.1073/pnas.1505291112.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高瀬 稔	4. 巻 43
2. 論文標題 広島大学両生類研究センター 発生研究部門 高瀬研究室	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 101-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5983/nl2008jsce.43.101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高瀬 稔
2. 発表標題 両生類ネットイツメガエル性転換個体を用いた持続可能な雄集団および雌集団の作製法
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高瀬 稔
2. 発表標題 ネットイツメガエル幼生へのアンドロゲン投与による性転換の誘導および性転換個体を用いた全雌幼生集団の作製
3. 学会等名 環境ホルモン学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高瀬 稔
2. 発表標題 YY超雄ネットイツメガエルを用いて作成された全雄集団の精巣分化過程および受精能の解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高瀬 稔、大西悠太、櫻井真紀、後藤康之、井口泰泉
2. 発表標題 受精後から孵化までエストロゲン様化学物質を暴露したネツタイツメガエル幼生における生殖腺分化
3. 学会等名 環境ホルモン学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minoru Takase
2. 発表標題 The XX/XY sex determination system in <i>Xenopus tropicalis</i> and generation of the YY supermale frog
3. 学会等名 両生類研究センター国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>両生類研究センター 発生研究部門 研究成果 「性決定」 に関して報告します。  <a href="http://amphibian.hiroshima-u.ac.jp/2017/08/31/%e3%80%8c%e6%80%a7%e6%b1%ba%e5%ae%9a%e3%80%8d%e3%81%ab%e9%96%a2%e3%81%97%e3%81%a6%e5%a0%b1%e5%91%8a%e3%81%97%e3%81%be%e3%81%99%e3%80%82/">http://amphibian.hiroshima-u.ac.jp/2017/08/31/%e3%80%8c%e6%80%a7%e6%b1%ba%e5%ae%9a%e3%80%8d%e3%81%ab%e9%96%a2%e3%81%97%e3%81%a6%e5%a0%b1%e5%91%8a%e3%81%97%e3%81%be%e3%81%99%e3%80%82/</a></p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------