

令和 2 年 9 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15161

研究課題名(和文)Gsdfから性決定遺伝子へ独立に進化した3種のメダカの性決定遺伝子誕生機構の解明

研究課題名(英文)The study of the universal evolutionary mechanism of the sex-determining gene by analyzing three medaka species whose sex-determining gene is Gsdf.

研究代表者

明正 大純(Myosho, Taijun)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00781808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：性決定遺伝子が頻繁に交代するメダカ属において、性決定遺伝子がGsdfである3種を用いて、性決定遺伝子誕生の共通の分子機構を明らかにすることを目的とした。

その中の1種である長崎県産ミナミメダカのGsdfneoYでは、上流配列へのLTR retrotransposonの挿入が原因であり、それが旧性決定遺伝子Dmyに依らない自律的な高発現を獲得することによって、既存の性決定カスケードを利用するという分子機構を明らかにした。その他の2種についても性決定遺伝子誕生の原因配列は異なるが、既存の性決定カスケードを利用することから、性決定遺伝子誕生の共通の分子機構を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物において10以上の性決定遺伝子が同定され、その多様性が明らかになっている。しかし、それぞれの性決定遺伝子は誕生後長い年月が経過しており、新規性決定遺伝子誕生の詳細な分子機構の特定が困難なため、なぜそのような多様性が生み出されるのかが不明だった。

本研究では、進化的に新しいメダカ属3種の性決定遺伝子Gsdfのそれぞれ誕生の分子機構を明らかにすることで、脊椎動物には多様な性決定遺伝子があるが、普遍的な性決定カスケードの存在という共通性のもとにその多様性が生み出された可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In the genus *Oryzias*, the sex-determining gene (SD gene) were frequently changed. The purpose of this study was to clarify the universal evolutionary mechanism of the SD gene by analyzing three medaka species whose SD gene is Gsdf.

In *Oryzias latipes* from Nagasaki population, the SD gene GsdfneoY was appeared by the insertion of the LTR retrotransposon in the upstream region of Gsdf. Furthermore, the SD gene took over the existing SD cascade by acquiring autonomous high expression independent of the old SD gene Dmy. Although the other two species have different responsible sequences of SD gene, these SD genes utilize existing SD cascades. These results suggested a common molecular mechanism for the appearance of the SD gene.

研究分野：遺伝学、進化生物学

キーワード：Gsdf sex-determining gene LTR retrotransposon *Oryzias latipes* *Oryzias luzonensis* *Oryzias pectoralis*

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝的多様性を生み出し、それらを維持するために用いられているのが有性生殖である。性は遺伝または環境要因によって決まるが、脊椎動物の多くは遺伝的な性決定を用いている。遺伝性決定を担うのは性染色体上の性決定遺伝子であり、これまでに 11 個の性決定遺伝子が同定されたことにより、その多様性が明らかになってきた (図 1)。これらの結果は、1 つの性

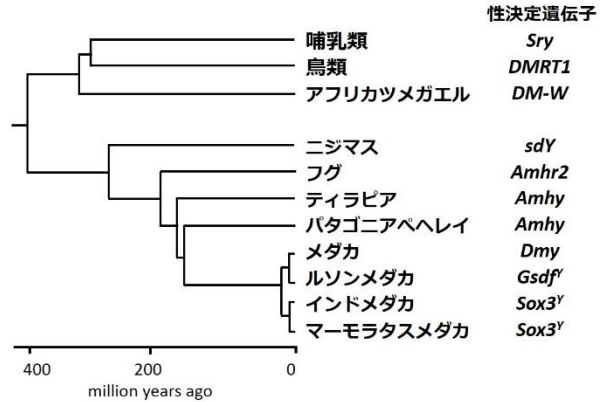


図 1 脊椎動物の性決定遺伝子

決定遺伝子が支配する期間の違いはあるが「性決定遺伝子が交代する」ことが普遍的なシステムであることを示唆する。つまり、性決定遺伝子が多様化した仕組みを理解するには、その交代機構の解明が

必須である。

性決定遺伝子の交代には、個体内の遺伝子レベルで起こる「遺伝子の性決定機能獲得」と個体群内で起こる「新旧性決定遺伝子の交代」の 2 段階が必要である。前者は、祖先遺伝子から性決定遺伝子に進化するという性決定機能を獲得する機構であり、獲得した機能とその機能をもたらす DNA の塩基配列を特定することで明らかになる。しかし、多くの既知の性決定遺伝子は起源が古く、祖先遺伝子からの変化が大きいため、その原因を特定することが困難である。後者は、2 つの性決定遺伝子が共存するような、性決定遺伝子の交代過程にある稀有な個体群を解析する必要がある。上記の理由により、両者の機構は不明な部分が多い。

これまでにメダカ属では性染色体が頻繁に交代していることが明らかになっており、誕生して間もない祖先遺伝子からの変化が少ない性決定遺伝子が多数存在すると考えられる。メダカ属は各種の性決定遺伝子を同定することで、前者の共通機構の解明が期待できる最適なモデルである。メダカ属で最初に同定された性決定遺伝子は *Dmy* である。その後、性決定遺伝子とその有力候補を 3 種 (ルソンメダカ: *Gsdf<sup>Y</sup>*、インドメダカ: *Sox3<sup>Y</sup>*、マーモラタスメダカ: *Sox3<sup>Y</sup>*) (Myosho et al. Genetics 2012、Takehana, Myosho et al. Nat commun 2014、Myosho et al. G3 2015) で明らかにした。未発表ではあるが、2 種の性決定遺伝 (ペクトラリスメダカ: *Gsdfb<sup>Y</sup>*、長崎県産ミナミメダカ: *Gsdf<sup>neoY</sup>*) が *Gsdf* であることも特定した。これらの遺伝子の発見により、独立に何度も同じ祖先遺伝子から性決定遺伝子に進化するような、性決定遺伝子に進化しやすい遺伝子 (*Sox3*, *Dmrt1*, *Amh*, *Gsdf*) の存在が示唆された。

一方で、ルソンメダカの性決定遺伝子の同定から、後者に関する知見として、野生集団内で性決定遺伝子が交代するには新旧の性決定遺伝子が共存する可能性が高いという仮説を提唱した (Myosho et al. Genetics 2012)。最近、*Dmy* と第 2 の性決定遺伝子である *Gsdf<sup>neoY</sup>* が共存する長崎県平戸市の野生メダカ個体群を発見した。これは数十万年から数百万年に一回起こる非常に稀な現象が起こっている個体群であり、個体群内で起こる「新旧性決定遺伝子の交代」を解明する

うえで最適な個体群である。

## 2. 研究の目的

*Gsdf*から進化した性決定遺伝子をもつ3種（ルソンメダカ、ペクトラリスメダカ、長崎県産ミナミメダカ）を対象に、それぞれの性決定遺伝子の誕生の分子機構を解明することでその共通性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝的性の判定

DNAを尾鰭、または尾部から抽出した。PCRによるDNA増幅はKAPATaq EXtra PCR Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)を用い、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動によって、遺伝子型の判定を行った。

### (2) 生殖腺の観察

稚魚をブアン氏固定液で固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン標本は、回転式マイクロームで厚さ5 μmの連続横断組織切片を作成し、組織標本とし、生殖腺の観察を行った。

### (3) 遺伝子発現解析

稚魚をRNAlater (Thermo, Kanagawa, Japan)で固定し、RNA抽出をNucleoSpin® RNA (Takara, Shiga, Japan)を用いて行った。得られたTotal RNAは5×Prime Script RT Master Mix (Takara, Shiga, Japan)を用いてcDNA溶液とした。RT-qPCRはSYBR® Green I Master (Roche, Indianapolis, USA)とLightCycler® 480 System (Roche, Indianapolis, USA)を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) ペクトラリスメダカの性決定遺伝子*GsdfbY*

孵化後の生殖腺の観察により、孵化直後に生殖細胞数の二型（XX.>XY）が見られた。この結果から、既に生殖巣の発生パターンが明らかになっているミナミメダカと同様の孵化前後に性決定遺伝子が機能することを明らかにした。そして、重複によって生じた*GsdfbY*の発現パターンを解析するために、常染色体上の*Gsdf*と区別できる定量PCRの測定系を確立した。この方法によって、常染色体の*Gsdf*が生殖巣特異的な発現パターンを持つのに対し、*GsdfbY*の発現量が一定のコピキタスな発現パターンを持っていた。

### (2) 長崎県産ミナミメダカの*Gsdf<sup>neoY</sup>*

#### 性分化関連遺伝子の定量PCRによる測定系の確立

性決定遺伝子機能後に性差が見られる、性分化に関連する遺伝子の順序である性決定カスケードの変化と共通性を明らかにするため、ミナミメダカにおいて生殖巣の発生過程で発現量に性差が報告されている10以上の性分化関連遺伝子の定量PCRによる測定系を確立した。その結果、*Dmy*を性決定遺伝子を持つミナミメダカの近交系のHd-rR系統において6つの性分化関連遺伝子（*Gsdf*, *Dmrt1*, *Scp3*, *Figa*, *Foxl3*, *Amhr2*）に発現量の性差が存在することを明らかにした。

同様の遺伝子を、長崎県産ミナミメダカで解析したところ、発現量に性差とその性差が明確になる時期もHd-rR系統と同じだった。

#### *Gsd<sup>neoY</sup>*の原因となった塩基配列の同定

新規性染色体であるneoY上の*Gsdf* (*Gsd<sup>neoY</sup>*) のコーディング領域のノックアウト個体が雌に分化することから、新規性決定遺伝子であることを示唆している。また、neoX上の*Gsdf* (*Gsd<sup>neoX</sup>*) と*Gsd<sup>neoY</sup>*のアミノ酸配列は同じであることから、本性決定遺伝子の原因配列はシス領域にあると推定されている。そこで、*Gsd<sup>neoY</sup>*と*Gsd<sup>neoX</sup>*とミナミメダカのHd-rR系統の*Gsdf*の上流と下流の塩基配列を隣接する遺伝子まで決定し、*Gsd<sup>neoY</sup>*特異的な塩基配列の変化を調べたところ、60カ所程度のSNPと上流に5.5kbの挿入を発見した。さらに、5'RACEによって*Gsd<sup>neoY</sup>*のmRNAの完全長を決定したところ、通常*Gsdf*のmRNAの他に、上流の5.5kbの挿入配列の一部を用いた新規の*Gsdf*のmRNAが転写されていることを発見した。これらの結果から、この挿入を性決定遺伝子になった原因配列の候補とした。そして、それらを確認するために、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術を用いて、この挿入配列の欠失個体を作成した。その結果、*Gsd<sup>neoY</sup>*の5.5kbの挿入配列の欠失個体が雌へと分化したことから、この配列が原因であることを強く示唆した。

#### 5.5kbの挿入配列はLTR Retrotransposonである

BLASTや分子系統解析を行ったところ、*Gsd<sup>neoY</sup>*の5.5kbの挿入配列は両端にLong terminal repeat (LTR)を持つLTR Retrotransposonの*Sushi-ichi*であることが明らかになった。そして、*Gsd<sup>neoY</sup>*の新規転写開始地点がLTR内にあること、転写開始の向きが*Sushi-ichi*が機能するプラス鎖ではなく、逆向きのマイナス鎖であった。これらは*Sushi-ichi*の活性を抑制するマイナス鎖の転写機構を利用して、性決定機能を獲得したことを示唆する。

#### *Sushi-ichi*は高い転移活性を持つ

全ゲノム配列が利用可能なミナミメダカのHd-rR系統とキタノメダカのHNI系統において*Sushi-ichi*を探索したところ、それぞれ10コピー以上発見することができ、それらの挿入ヶ所は1コピーも一致しなかった。さらに、Hd-rR系統はd-rR系統から作成されたが、そのd-rR系統でも挿入ヶ所を調べたところ、Hd-rR系統と一致しない挿入ヶ所が複数発見された。これらの結果により、*Sushi-ichi*は日本のメダカ種間・種内・系統内でも転移するような高い活性を持つことが明らかになった。

### (3) 3種の性決定遺伝子誕生の共通性

これまでの性決定遺伝子に対する知見と、*Gsdf*という同一の祖先遺伝子からの誕生機構を解析した本研究の成果によって、性決定遺伝子誕生の分子機構がより詳細に明らかになってきた。染色体レベルでは、重複または対立遺伝子のどちらからでも性決定遺伝子へと進化可能である。遺伝子レベルでは、ルソンメダカの*Gsd<sup>neoY</sup>*はSNP、ペクトラリスメダカの*GsdfbY*は新規のエキソンとそれに伴うプロモータ領域の獲得、長崎産ミナミメダカの*Gsd<sup>neoY</sup>*は*Sushi-ichi*の挿入によるプロモータ領域を獲得したというようにさまざまであるが、既存の性決定カスケードを利用するという共通性が明らかになった。

< 引用文献 >

- Turnover of sex chromosomes in *celebensis* group medaka fishes. Myosho T., Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. *Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)*. 5, 2685-91 (2015).
- Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. Takehana Y, Matsuda M, Myosho T., Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi, Sakaizumi M, Naruse K. *Nature Communication* 20;5:4157 (2014).
- Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. Myosho T., Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. *Genetics*. 191(1), 163-70 (2012).

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 0件）

1. 著者名 Taijun Myosho, Tadashi Sato, Hiroka Nishiyama, Akiho Watanabe, Jun Yamamoto, et. al.	4. 巻 36(5)
2. 論文標題 Inter- and Intraspecific Variation in Sex Hormone-Induced Sex-Reversal in Medaka, <i>Oryzias latipes</i> and <i>Oryzias sakaizumii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 425-431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.2108/zs180194">https://doi.org/10.2108/zs180194</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 明正大純、小林亨
2. 発表標題 新旧性決定遺伝子DmyとGsdffneoYが共存する長崎県平戸産野生ミナミメダカ個体群
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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