

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05778

研究課題名(和文)ステロイド代謝経路の「見える化」ープリ属性決定機構の全容解明を目指すー

研究課題名(英文)Elucidation of the role of steroids in *Seriola* sex-determination

研究代表者

小山 喬 (KOYAMA, Takashi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：40749701

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)：本研究では、実質的な性決定因子がエストロゲンであることが分かったカンパチを用いて、エストロゲンが駆動する初期性分化メカニズムを解明することを目的とした。組織観察および多検体mRNA-seq解析の結果、初期性分化が始まる時期を1週間程度の期間まで狭めることに成功した。また、多検体mRNA-seqデータを用いた発現変動遺伝子解析により、初期性分化に重要だと思われる複数の遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでに、エストロゲンが性を直接決定できることが明らかにした。一方、なぜエストロゲンが性を決める(すなわち生殖腺の運命を決定する)ことができるのかは、依然として明らかになっていない。本研究ではその原因が、性決定期が分子レベルで特定されていないことにあると考え、性的に未分化な時期から性が確実に決まっている時期まで、生殖腺の遺伝子発現変化を経時的に観察することを試みた。その結果、分子的な性分化が始まる時期を1週間程度まで狭めること、その時期の発現変動遺伝子を複数同定すること、に成功した。これらの遺伝子を詳細に解析すれば、エストロゲンによる性分化メカニズムの一端が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to elucidate early sex-differentiation mechanism mediated by estrogen using amberjack, in which sex is determined by estrogen.

By means of histological observations and massively parallel mRNA-seq, we succeeded to narrow down sex-determining period within a week. Differential expressed gene (DEG) analysis identified several DEGs in this period.

These information will be valuable to further reveal estrogen-driven sex determination mechanism in amberjack and other teleosts.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：カンパチ 初期性分化 エストロゲン 多検体mRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、ブリ属の性がステロイド代謝酵素の一つである *Hsd17b1* 遺伝子第3エキソン上の1塩基多型 (SNP) (以降、ブリ属性決定 SNP) によって決定されていることを、カンパチを用いて明らかにした (Koyama *et al.*, 2019)。ブリ属性決定 SNP により、HSD17B1 タンパク質活性中心近傍の 144 番目のアミノ酸が、W 染色体アリルのグリシン (祖先型) から、Z 染色体アリルのグルタミン酸 (派生型) へと置換される。このアミノ酸置換により、性決定期のブリ属生殖腺では、W アリルをもつ遺伝的メスではエストラジオール (E2) が十分産生され、卵巣形成へと進むのに対し、Z アリルしか持たない遺伝的オスでは E2 がほとんど (あるいは全く) 作られず、精巣形成へと誘導されると考えられた。従ってブリ属では、性決定期における内因性 E2 量の性差が実質的に性を決定していることが強く示唆された。本結果は、古くから提唱されてきた「性ステロイドによる性決定」の仮説を強く支持する、世界で初めての例となった。

2. 研究の目的

E2 が性を決定できることが明らかとなった一方で、「E2 がどのように卵巣あるいは精巣形成を誘導するのか？」は、あらゆる生物種で未だによくわかっていない。その理由は、

- (1) これまで性決定遺伝子が同定された種では、そもそも性ステロイド自体が性を決定しているのかよく分からない (研究材料の問題)
- (2) 組織観察や性分化に関連する遺伝子の発現解析では、性決定の時期を特定することは不可能である (研究手法の問題)

ためである。これらの問題は、ブリ属で性決定期の生殖腺の遺伝子発現変化を丹念に追跡することで解決できる。すなわち、

- (1) ブリ属は生殖腺内の E2 量の雌雄差が現れるまで、いかなる性差も存在しない
- (2) 網羅的遺伝子発現解析を経時的に行うことで、原理的にはあらゆる遺伝子発現の性差の、詳細な時間変化を観察できる

ことを利用すれば、性決定期直後に内因性 E2 量の雌雄差によってもたらされる卵巣・精巣への誘導 (性分化) メカニズムを明らかにできると考えた。そこで本研究では、低コスト・安価・簡便に多検体で網羅的遺伝子発現解析する方法を、性決定が行われる時期のカンパチへ適用し、

- (1) 性分化が始まる時期を特定すること
- (2) 性分化が始まった直後に遺伝子発現の雌雄差が現れる遺伝子を特定すること

を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 多検体網羅的遺伝子発現解析 (mRNA-seq) 法の立ち上げ

生殖腺における遺伝子発現変化を網羅的に解析するには、次世代シーケンサー (NGS) を用いた解析が必須になる。近年発展してきた一細胞 mRNA 解析は、細胞特異的バーコードを付加することで、一度の NGS ライブラリ調整で数千~数万の細胞由来の遺伝子発現情報を得ることができる。このライブラリ調整法を細胞ではなく検体に適用することで、数百~千程度の検体から安価にライブラリ調整する手法も考案されている。本研究ではその中の手法のうち、Bulk RNA Barcoding and sequencing (BRB-seq) 法と、RNA Fragmentation and Sequencing (RF-seq) を試みた (Alpern *et al.*, 2019; Veeranagouda *et al.*, 2019)。

- (2) 性決定期の経時サンプリングと多検体 mRNA-seq

これまでの研究で、カンパチでは孵化後 46 日から 88 日の間にステロイド代謝に関連する遺伝子の転写が活発化し、性決定が行われることが分かっている (Koyama *et al.*, 2019)。そこで、上記期間の発達段階のカンパチを飼育し、3 日毎に生殖腺と尾ビレをサンプリングした。得られた生殖腺より total RNA を抽出し、§1 で立ち上げた BRB-seq に供した。遺伝的な性は、尾ビレより抽出したゲノム DNA を材料に、我々が開発した PCR-RFLP 法により判定した (Koyama *et al.*, 2019)。

NGS より得られた BRB-seq データは、一細胞 mRNA 解析パッケージの Monocle3 を用いて次元圧縮して二次元平面上へプロットするとともに、DESeq2 パッケージを用いて発現変動遺伝子解析に供した。

4. 研究成果

- (1) 多検体網羅的遺伝子発現解析 (mRNA-seq) 法の立ち上げ

ライブラリ調整とシーケンス解析の結果、BRB-seq 法と RF-seq 法の双方でデータ取得が可能だった。NEB 社 RNA-seq ライブラリ作製キットを用いて、同一サンプルをライブラリ作製・シーケンシングに供したデータと比較した結果、相関係数は双方とも 0.8 程度であり、多検体 mRNA-seq は実用に耐えうると判断した。難点として、BRB-seq は Tn5 トランスポゼースの自作が必要であること、未分化生殖腺のような少量の total RNA し

か得られないサンプルではライブラリ作製が煩雑であることが挙げられた。一方、**RF-seq** は **Tn5** トランスポゼースが必要なく、少量の **total RNA** でも **BRB-seq** に比べると容易にライブラリ作製が可能だった。

(2) 性決定期の経時サンプリングと多検体 **mRNA-seq**

BRB-seq データを解析に供した結果、サンプリング期間のある時点で遺伝子発現が大きく変化しているのが観察された。変化前は、遺伝的な性に関わらずひとつのクラスターを形成していたが、変化後は遺伝的な性に従ってそれぞれがクラスターを形成していた。従って、この時点でカンパチの性が分子レベルで決定されたと考えられた。

分子レベルで性が決定された後の、最も初期のサンプルを発現変動遺伝子解析に供したところ、遺伝的オスとメスの間で複数の遺伝子発現が有意に変動していた。詳細な解析が必要だが、これらの遺伝子は **E2** によって駆動される初期性分化遺伝子である可能性が高い。

<参考文献>

1. Koyama T, Nakamoto M, Morishima K, Yamashita R, Yamashita T, Sasaki K, Kuruma Y, Mizuno N, Suzuki M, Okada Y, Ieda R, Uchino T, Tasumi S, Hosoya S, Uno S, Koyama J, Toyoda A, Kikuchi K, Sakamoto T. (2019) A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in *Seriola* Fishes. *Curr. Biol.* 29:1901-1909.e8
2. Alpern D, Gardeux V, Russeil J, Mangeat B, Meireles-Filho ACA, Breyse R, Hacker D, Deplancke B. (2019) BRB-seq: ultra-affordable high-throughput transcriptomics enabled by bulk RNA barcoding and sequencing. *Genome Biol.* 20:71
3. Veeranagouda Y, Remaury A, Guillemot JC, Didier M. (2019) RNA Fragmentation and Sequencing (RF-Seq): Cost-Effective, Time-Efficient, and High-Throughput 3' mRNA Sequencing Library Construction in a Single Tube. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 129:e109

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koyama Takashi, Nakamoto Masatoshi, Morishima Kagayaki, Yamashita Ryohei, Yamashita Takefumi, Sasaki Kohei, Kuruma Yosuke, Mizuno Naoki, Suzuki Moe, Okada Yoshiharu, Ieda Risa, Uchino Tsubasa, Tasumi Satoshi, Hosoya Sho, Uno Seiichi, Koyama Jiro, Toyoda Atsushi, Kikuchi Kiyoshi, Sakamoto Takashi	4. 巻 29
2. 論文標題 A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in <i>Seriola</i> Fishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1901 ~ 1909.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.04.069	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 -
1. 著者名 KOYAMA TAKASHI, NAKAMOTO MASATOSHI, MORISHIMA KAGAYAKI, YAMASHITA TAKEFUMI, MIZUNO NAOKI, KIKUCHI KIYOSHI, SAKAMOTO TAKASHI	4. 巻 85
2. 論文標題 -3. Sex Determination Mechanism in <i>Seriola</i> Fishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NIPPON SUISAN GAKKAISHI	6. 最初と最後の頁 188 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2331/suisan.WA2603-4	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 KIKUCHI KIYOSHI, IEDA RISA, FUJIKAWA DAIGAKU, AHAMMAD KABIR, KOYAMA TAKASHI, HOSOYA SHO	4. 巻 85
2. 論文標題 -2. Sex-determining genes in <i>Takifugu</i> pufferfishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NIPPON SUISAN GAKKAISHI	6. 最初と最後の頁 187 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2331/suisan.WA2603-3	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Nakamura Masahiro, Jiang Tao, Xu Gangchun, Yang Jian, Xu Pao, Watanabe Soichi, Kaneko Toyoji, Koyama Takashi, Kikuchi Kiyoshi, Tsukamoto Katsumi, Otake Tsuguo	4. 巻 767
2. 論文標題 Capacity for freshwater acclimation and differences in the transcription of ion transporter genes underlying different migratory life histories of <i>Takifugu</i> fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145285 ~ 145285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.145285	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 該当する

1. 著者名 Koiwai Keiichiro, Koyama Takashi, Tsuda Soichiro, Toyoda Atsushi, Kikuchi Kiyoshi, Suzuki Hiroaki, Kawano Ryuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.01.10.426076	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小山喬・菊池潔・豊田敦
2. 発表標題 超多検体トランスクリプトーム解析を指向したライブラリ作製法の立ち上げ
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 車遥介・小山喬・菊池潔・森島輝・小林久人・志波優
2. 発表標題 ブリ属3種の比較ゲノム解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 車 遥介, 小山 喬, 菊池 潔, 森島 輝, 小林 久人
2. 発表標題 半数体ブリゲノムを用いた性拮抗遺伝子の探索
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山 喬, 車 遥介, 菊池 潔, 森島 輝, 豊田 敦
2. 発表標題 ブリ属の性決定領域ゲノム配列比較
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 車 遥介, 小山 喬, 菊池 潔, 中本 正俊, 坂本 崇
2. 発表標題 ブリ属ステロイド代謝関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山 喬, 菊池 潔
2. 発表標題 カンパチ性分化関連遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山 喬, 中本 正俊, 森島 輝, 山下 量平, 山下 雄史, 佐々木 皓平, 水野 直樹, 車 遥介, 鈴木 萌, 家田 梨櫻, 内野 翼, 田角 聡志, 細谷 将, 宇野 誠一, 小山 次朗, 豊田 敦, 菊池 潔, 坂本 崇
2. 発表標題 ステロイド代謝酵素多型によるブリ属の遺伝的性決定機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Koyama, Masatoshi Nakamoto, Kagayaki Morishima, Ryohei Yamashita, Takefumi Yamashita, Sasaki Kohei, Naoki Mizuno, Moe Suzuki, Risa Ieda, Tsubasa Uchino, Satoshi Tasumi, Sho Hosoya, Seiichi Uno, Jiro Koyama, Atsushi Toyoda, Takashi Sakamoto, Kiyoshi Kikuchi
2. 発表標題 Revisiting the steroid theory of sex inducer; Trans-species SNP in a steroidogenic enzyme, <i>Hsd17b1</i> , is associated with sex in <i>Seriola</i> species.
3. 学会等名 Eighth International Symposium On Vertebrate Sex Determination (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小祝敬一郎・小山喬・津田宗一郎・豊田敦・菊池潔・鈴木宏明・川野竜司
2. 発表標題 単細胞レベルでのクルマエビ血球細胞の機能および分化経路推定
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kabir Ahammad・Risa Ieda・Daigaku Fujikawa・Shotaro Hirase・Takashi Koyama・Atsushi Toyota・Shigehiro Kuraku・Sho Hosoya・Kiyoshi Kikuchi
2. 発表標題 Genomic identification and characterization of sex-determining locus of Takifugu niphobles by a chromosome-scale genome assembly
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小山喬, 中本正俊, 森島輝, 山下雄史, 坂本崇, 菊池潔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 258
3. 書名 魚類の性決定・性分化・性転換(菊池 潔、井尻成保、北野 健 編)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ブリ類の性識別方法	発明者 坂本 崇, 中本 正俊, 菊池 潔, 小山 喬	権利者 国立大学法人東 京海洋大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/005821	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所
<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/japanese.html>

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
研究 分 担 者	中本 正俊 (NAKAMOTO Masatoshi) (80447721)	東京海洋大学・学術研究院・博士研究員 (12614)	

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
---------	---------