

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19317

研究課題名(和文)鳥類の性決定にはたらくnon-coding RNAの解析

研究課題名(英文)Analysis of non-coding RNAs involving sex determinaton in bird

研究代表者

黒岩 麻里(Kuroiwa, Asato)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20372261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類は古くからW染色体上に性決定因子があると考えられているが、未だ同定されていない。その理由として、W染色体上のnon-coding RNAが性決定に関与しているからではないかと着想した。本研究は鳥類の性決定メカニズムを明らかにするために、性決定に働くW染色体上のncRNAを同定し、ゲノム編集による機能解明を目指す。鳥類の性決定は、家禽産業に直結する重要な生命現象であり、その分子メカニズムを解明することは、当該分野の命題である。しかし、ニワトリを用いた実験は長い時間を要し、解析が極めて困難である。そこで、性成熟の早いニホンウズラを用いた研究を計画し、鳥類では困難とされている機能解析を実現する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリは有用な経済動物(家禽)である。卵を産むのはメスであり、肉は体が大きく発達するオスから得るのが効率よい。鳥類の性決定メカニズムを解明することは、家禽産業に直結する重要な基礎研究となる。加えて、産まれてくる雛の性比を人為的にコントロールできる産業価値の高い応用研究に発展する可能性もあり、大きなインパクトを有する。しかし鳥類の性決定研究は大きな遅れをとっており、その理由として、TGニワトリの作出やノックアウト個体作出には長い時間を有し、極めて困難であることが挙げられる。そこで本研究はこの難題を克服すべく、ニワトリよりも小型で、性成熟の早いニホンウズラを用いる。

研究成果の概要(英文)：Birds have long been thought to have sex-determining factors on the W chromosome, but have not yet been identified. I thought that the reason might be that non-coding RNA on the W chromosome is involved in sex determination. In order to clarify the sex-determining mechanism of birds, this study aims to identify ncRNA on the W chromosome that acts on sex-determination and elucidate the function by genome editing. Sex determination in birds is an important biological phenomenon that is directly linked to the poultry industry, and elucidating its molecular mechanism is a proposition in this field. However, experiments using chickens take a long time and are extremely difficult to analyze. Therefore, we plan a study using Japanese quail, which has a fast sexual maturity, and realize a functional analysis that is difficult for birds.

研究分野：発生生殖学

キーワード：ウズラ Z染色体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鳥類では Z 染色体上の *DMRT1* 遺伝子が精巣決定に働く。本遺伝子を過剰発現させると ZW 個体の生殖腺が精巣様になる (Lambeth *et al*, Dev Biol, 389:160-72, 2014, 研究代表者は 4 番目の著者)。一方で、メスの性決定 (卵巣決定) には W 染色体上の遺伝子が必須であると考えられている。その理由として、古くはアリストテレスの記録に始まり、多くの鳥類種において野生下での性転換が報告されているが、全てがメスからオスへの性転換であり、その逆のオスからメスへの転換例は一例もないことが挙げられる。すなわち、鳥類では W 染色体なくしてメスにはなり得ないことを示唆する。よって研究代表者は、卵巣決定に優先的に働く (あるいは精巣決定を阻害する) W 染色体上の因子が必ず存在すると考えている (Kuroiwa, Nature, 462:34, 2009, 代表者コメント記事, 査読無)。研究代表者を含め、国内外の多くの研究グループが W 染色体上の性決定因子の同定を試みているが、未だ実現していない。研究代表者は、未だに発見されない根本の理由は、タンパク質をコードした従来の遺伝子ではなく、W 染色体上の ncRNA が性決定に関与しているからではないかという着想し、従来の概念にとらわれず ncRNA を視野に入れた解析を行う必要があると考え、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究は、未解明である鳥類の性決定メカニズムを明らかにするために、鳥類の性決定に働く W 染色体上の ncRNA を同定し、ゲノム編集によるノックアウトおよび ncRNA 過剰発現のためのノックインを行い、機能解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 性分化関連遺伝子の発現解析

ウズラの性決定時期を特定するために、7 種類の性分化関連遺伝子 (*DMRT1*, *SOX9*, *AMH*, *HEMGN*, *FOXL2*, *CYP19A1*, *NR5A1*) の発現様式を確認した。5 つの発生ステージ (HH27, 29, 31, 34, 38) における雌雄の生殖腺を用いて、RT-PCR および生殖腺切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。さらに、(2)の方法で得た、RNA-seq 解析のデータを用いて、各遺伝子の発現量を定量化した。

#### (2) RNA-seq 解析

(1)で得られた結果をもとに、性決定直後の HH26-28 胚と、性分化が進行した HH30-32 胚の生殖腺を雌雄ごとにサンプリングし、RNA を抽出して Hi-seq3000 により RNA-seq 解析を行った。得られた転写産物のうち、ZW 型のメスのみで発現しており、さらに性決定直後の HH-26-28 胚に転写量が多いものを、情報解析により選定した。

#### (3) 候補配列のキャラクタライゼーション

ウズラおよびニワトリのゲノム情報を用いて、(2)の RNA-seq 解析から選定された候補配列について、W 染色体上に位置すると予想される遺伝子および ncRNA をさらに選定した。さらに、RT-PCR により、各候補遺伝子および候補 ncRNA の発現様式を確認した。

#### (4)ゲノム編集によるノックアウト解析

候補遺伝子を標的とする gRNA を設計し、CRISPR/Cas9 の系を用いてニホンウズラ胚盤葉を用いてノックアウトを行った。受精卵を代替卵殻で培養し、発生途中胚の生殖腺を得て切片を作成し、HE 染色により解剖学的観察を行った。また、免疫染色化学により、性分化関連遺伝子のタンパク質発現を確認した。

### 4. 研究成果

7 種類の性分化関連遺伝子 (*DMRT1*, *SOX9*, *AMH*, *HEMGN*, *FOXL2*, *CYP19A1*, *NR5A1*) について、5 つの発生ステージ (HH27, 29, 31, 34, 38) における雌雄の生殖腺を用いて、RT-PCR および生殖腺切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。ニワトリでは、オスの生殖腺で強く発現し、*SOX9* の制御に関わっていると考えられている *HEMGN* 遺伝子については、ニホンウズラでは顕著な発現が見られなかった。しかし、それ以外の遺伝子については、ニワトリで報告されている発現様式と類似した結果を得たため、6 種類の遺伝子が性分化関連遺伝子マーカーとして、ニホンウズラでも使用できることを確認した。また、各遺伝子の発現様式の比較から、本種の性決定時期は HH26 以前であることを推定した。

性決定直後の HH26-28 胚と、性分化が進行した HH30-32 胚の生殖腺を雌雄ごとにサンプリングし、RNA を抽出して Hi-seq3000 により RNA-seq 解析を行った (表 1)。

表 1 RNA-seq 解析

Samples		%>=Q30 bases	Mean quality score	Yield			
				Raw		Trimmed	
mRNA-seq				#Pair	Total (Gbp)	#Pair	Total (Gbp)
ZZ	HH27	96.33	39.52	90,188,939	18.04	87,488,392	17.20
	HH31	96.65	39.61	97,986,376	19.60	95,713,698	18.81
ZW	HH27	96.61	39.60	80,281,072	16.06	78,265,180	15.40
	HH31	96.33	39.52	98,539,681	19.71	96,240,320	18.92
smRNA-seq							
ZZ	HH27	98.82	39.68	182,176,802	6.56	171,600,762	6.10
	HH31	98.95	39.68	94,958,564	3.42	79,251,611	2.79
ZW	HH27	99.04	39.74	182,176,802	6.56	171,600,762	6.10
	HH31	98.95	39.68	94,958,564	3.42	79,251,611	2.79

RNA-seq 解析により得られたデータを用いて、ZW 型のメスのみで発現しており、さらに性決定直後の HH-26-28 胚に転写量が多いものを、情報解析により選定した。その結果、74 種類の転写産物を得た。さらに、タンパク質をコードした遺伝子を 24 種類、ncRNA を 8 種類に絞り込み、ニホンズラおよびニワトリのゲノム情報比較から、少なくとも 4 種類のタンパク質コード遺伝子および 4 種類の ncRNA が W 染色体上に存在することを確認した。また、RNA-seq 解析のデータを用いて、性分化関連遺伝子の発現様式を確認した (図 1)。

選定された W 染色体上の遺伝子の中に、*HINTW* (別名 *Wpkci*) 遺伝子が含まれていた。*HINTW* 遺伝子は、ニワトリにおいて卵巣決定遺伝子の候補として 2000 年に報告されたが (Hori et al. 2000; O'Neill et al. 2000) 本遺伝子を ZZ 型ニワトリ胚で過剰発現させても表現型に変化が見られないことから、卵巣決定の機能はないと考えられている (Smith et al. 2009)。本遺伝子について、CRISPR/Cas9 の系を用いたゲノム編集実験により、ZW 型ノックアウト個体を作成した。生殖腺の切片観察を行った結果、生殖腺の形態的な変化は見られなかった。しかし、免疫染色により性分化関連遺伝子の発現を確認したところ、一部の卵巣分化関連遺伝子の発現が減少していることが明らかになった。

また、選定された 4 種類の ncRNA について、全長配列を決定し、発現様式を確認した。しかし大変残念ながら、ncRNA についてはノックアウト個体の作出には至らなかったため、今後、展開させていく予定である。

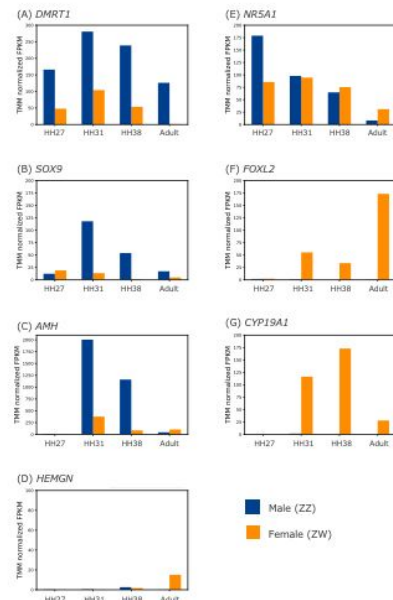


図 1 7 種類の遺伝子の発現量

<参考文献>

Hori T, Asakawa S, Itoh Y, Shimizu N, Mizuno S (2000) *Wpkci*, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Mol Biol Cell* 11:3645-3660

O'Neill M, Binder M, Smith C, Andrews J, Reed K, Smith M, Millar C, Lambert D, Sinclair A (2000) ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev Genes Evol* 210:243-249

Smith CA, Roeszler KN, Sinclair AH (2009a) Genetic evidence against a role for W-linked histidine triad nucleotide binding protein (*HINTW*) in avian sex determination. *Int J Dev Biol* 53:59-67

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 Okuno Miki, Miyamoto Shuntaro, Itoh Takehiko, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Mizushima Shusei, Kuroiwa Asato	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression profiling of sexually dimorphic genes in the Japanese quail, Coturnix japonica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77094-y	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本淳太郎、奥野未来、伊藤武彦、水島秀成3、黒岩麻里
2. 発表標題 ニホンウズラにおける性分化関連遺伝子および新規性決定候補遺伝子の解析
3. 学会等名 第42日回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水島秀成、佐藤望、塚田光、笹浪知宏、小野珠乙、黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラの生殖腺における生殖細胞特異的遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第42日回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本淳太郎、奥野未来、伊藤武彦、水島秀成、黒岩麻里
2. 発表標題 ニホンウズラにおける新規性決定遺伝子の探索とゲノム編集技術の確立
3. 学会等名 「先進ゲノム支援」拡大班会議
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	水島 秀成  (Mizushima Shusei)  (20515382)	北海道大学・理学研究院・助教    (10101)	

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