

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570214

研究課題名（和文） トランスジェニックメダカを用いた性決定遺伝子 DMY の機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of the medaka sex-determining gene using transgenic technique.

研究代表者

松田 勝 (MATSUDA MASARU)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：20414013

研究成果の概要：多くの脊椎動物では、授精の瞬間に決定された遺伝的な性別に従って、未分化生殖腺がメスでは卵巣に、オスでは精巣に分化することで、個体の性別は決定される。脊椎動物の性決定遺伝子は、哺乳類の *SRY/Sry* とメダカの *DMY* のみが報告されているが、ほ乳類においてもその具体的な機能はよくわかつっていない。そこで本研究では申請者自ら同定したメダカ性決定遺伝子 *DMY* が発生過程のどの時期に働くことで、未分化生殖腺をオスの方向（精巣）へ向かわせるのかを明らかとすることを目的とし、*DMY* を好きな時期に *DMY* の発現を停止できる実験系構築を試みた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝学、発生・分化、動物、性分化

1. 研究開始当初の背景

(1) ほとんどの脊椎動物の性別は遺伝的に決められているが、性決定遺伝子は哺乳類の *SRY/Sry* とメダカの *DMY* のみしか分かっていない。

(2) ほ乳類の *SRY/Sry* の発現パターンは一過性であるのに比較して、メダカ性決定遺伝子 *DMY* の発現は、親の精巣でも検出できる。

(3) メダカの性決定遺伝子 *DMY* が性分化のどの時期に働くているのかは、明らかとなっていない。

(4) マウスでは、利用されている *Cre-loxP* システ

ムによるゲノム改変技術と、発現誘導システムを組み合わせることで時間的、空間的に遺伝子の発現を制御することが可能となつて来ている。

2. 研究の目的

(1) メダカの性決定遺伝子 *DMY* が性分化のどの時期に効いているのか、つまり *DMY* がいつ働くことで未分化生殖腺を精巣方向に分化させるのかを明らかにする。

(2) このためには、*Cre-loxP* システムによる遺伝子改変がメダカで可能であることを確認する必要がある。また、*Cre* 組換酵素遺

伝子の発現を誘導できる実験系の構築が必要。

3. 研究の方法

(1) *Cre-loxP*システムがメダカ生体内で問題なく働くかを確認するために、 β アクチンプロモーター制御下に *loxP*配列に挟まれた *RFP*、さらにその下流に *GFP*を配したコンストラクトを遺伝子導入したメダカを京都大学木下政人博士より分与してもらった。この遺伝子導入メダカは、*Cre* 組換酵素遺伝子が生体内で発現し、働いた場合に、*loxP*配列に挟まれた *RFP*部分が切り出されることで、赤色蛍光タンパク質を発現していた細胞は緑色蛍光タンパク質を発現するようになる。よって、メダカを生かした状態で外から蛍光観察によって、*Cre* 組換酵素の働きをモニターできる。

(2) 合成ノルステロイドの mifepristone を使用した遺伝子発現誘導系として、GeneSwitch システム(インビトロジェン社)を試した。このシステムは以下の3段階で働く。①目的遺伝子を *GAL4* UAS 下流に連結する。②添加された mifepristone が GeneSwitch™ 調節タンパク質の hPR-DBD に結合し、立体構造が変化して二量体を形成する。③二両体を形成した GeneSwitch™ 調節タンパク質が *GAL4* UASと結合し、目的遺伝子の転写が誘導される。そこで、*GAL4* UAS 下流に *GFP*を連結することで *GFP*を誘導できるコンストラクトと *GAL4* UAS 下流に *Cre* 組換酵素を連結することで *Cre* 組換酵素を誘導できるコンストラクトとの2つを作成した。これらを使って、培養細胞およびメダカ生体内で、これらのコンストラクトが予測通り働くかどうかを確認しようとした。

(3) *DMY* の発現停止誘導コンストラクトの作成。XX 個体に遺伝子導入することにより雄に分化誘導できる *DMY*ゲノム全長とその上流、下流を含む BAC(細菌人工染色体)クローナーを改変して、*DMY* の第3エクソンを *loxP* で挟んだ改変 *DMY* コンストラクトを作成した。BAC クローンの改変には、Red/ET Recombination による相同組換を使った BAC クローン改変キット(Quick and Easy BAC modification kit, GENE BRIDGES 社)を用いた。

4. 研究成果

(1) メダカ生体内での *Cre-loxP*システムの動作確認

京都大学木下博士より分与された遺伝子導入メダカは全身で赤色蛍光タンパク質を発現している。この系統の受精卵の一細胞期に CMV プロモータ一下流に *Cre*組換酵素遺伝子を連結したプラスミドを顕微注入することで、*GFP*を発現

するメダカが得られれば、*Cre* 組換酵素がメダカ生体内で働くことを確認できる。実際、一細胞期の受精卵に CMV プロモーターで制御された *Cre* 組換酵素遺伝子を顕微注入したところ、F₀ 世代ではパッチ乗に *GFP*を発現する個体を得ることができた。また、次世代の中には、図1のように、全身で *GFP* を発現する個体を得ることができた。*Cre* 組換酵素の発現による遺伝子改変が生殖細胞で生じた結果であると推察された。

図1：遺伝子コンストラクトの概略と赤色蛍光タンパク質および緑色蛍光タンパク質を発現するメダカ。

QuickTime® C2
TIFF (LZW) 311EVEEGEOEAEK
C™CzAEEENE EEC%aBCECZC%...C0IKovC-CAB

本研究により *Cre* 組換酵素がメダカ生体内で働くことが確認できた。

(2) 発現誘導系の構築

合成ノルステロイドの mifepristone を使用した遺伝子発現誘導システムである GeneSwitch システムを用いて、*GFP*を発現誘導できるコンストラクトを作成し、HeLa 細胞に導入し、培地に mifepristone を添加することにより、*GFP* が発現するかどうかを確認した。mifepristone 添加により予想通り *GFP* の発現を誘導できることで、作成したコンストラクトが正常に働くことを確認することができた。一方、同じコンストラクトをメダカ受精卵の一細胞期に顕微注入し、遺伝子導入メダカを作出し、孵化後飼育水中に mifepristone を添加することで *GFP* の発現が誘導できるかどうかを確認した。この結果、いくつかの個体では mifepristone 添加により、*GFP* の発現がパッチ状に観察できた。

さらに、*Cre* 組換酵素の誘導できるコンストラクトを作成し、(1)で用いた、*loxP* 配列に挟まれた *RFP* 部分が切り出されることで、赤色蛍光タンパク質を発現していた細胞が緑色蛍光タンパク質を発現するようになる遺伝子導入メダカ受精卵の一細胞期に顕微注入したところ、*Cre* 組換酵素が、mifepristone の誘導なしに発現しているようであった。

この結果は GeneSwitch システムをつかつたゲノム改変がメダカでは難しいことを示唆

している。今後は、別の発現誘導系として利用されているクロンテック社のテトラサイクリン誘導発現系を試す必要がある。マウスを研究材料とした研究と比較すると、これまで小型魚類の研究は記載が主であった。しかしながら、今後メダカを研究材料とした研究もマウスと同様にゲノム改変により遺伝子発現制御を行い、その結果を観察していく研究が必要とされると予測できこのような場合に、本研究の知見が役に立つと考えられる。

(3) 誘導により *DMY* の発現を停止する遺伝子導入メダカの作出

DMY 発現停止誘導コンストラクトを作成し(図2)、メダカ受精卵の一細胞期に顕微注入した。*F₀*で性転換した XX 雄を得ることができた。また *F₁*世代に外来遺伝子を導入している個体が得られている。

図2 : *DMY* ゲノム構造(a)と *DMY* 改変 *DMY* 発現停止誘導コンストラクトの構造(b)

この *F₁* 世代が 改変 *DMY* 導入により性転換していれば、次世代を作出し、その外来遺伝子の遺伝的安定性を確認すると共に、受精卵の一細胞期に *Cre* 組換酵素 RNA の顕微注入によりゲノムを改変し、*loxP* 配列に挟まれた *DMY* 遺伝子が抜けることで、雄になれないメダカが作出できることを確認する。(図3)この遺伝子導入メダカと *Cre* 組換酵素発現誘導メダカを交配し、両方の外来遺伝子を持つ個体が作出できれば、*Cre* 組換酵素の発現を誘導することで、*DMY* の発現を停止するメダカを得ることができる。このメダカを用い、任意の発生段階に *Cre* を誘導し、*DMY* の機能を停止することで、*DMY* の発現により未分化生殖腺が精巣方向に分化する上での *DMY* の働きに重要な時期を特定できることが期待できる。

図3 : *DMY* 発現停止誘導遺伝子導入メダカを用いた *DMY* 機能解析の概略図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① M. Nakamoto, S. Muramatsu, S. Yoshida,

M. Matsuda, Y. Nagahama and N. Shibata, Gonadal Sex Differentiation and Expression of Sox9a2, Dmrt1, and Foxl2 in *Oryzias luzonensis*. *genesis* **47**: 289-299, 2009.

- ② F. Sakai, T. Kobayashi, M. Matsuda and Y. Nagahama, Stability in aromatase immunoreactivity of steroid-producing cells during early development of XX gonads of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: an organ culture study. *Zoolog Sci* **25**: 344-348, 2008.
 ③ 松田勝, メダカの性別はどのように決定されているか?. 蛋白質核酸酵素 **53**: 1158-1165, 2008.
 ④ M. Nakamoto, D. S. Wang, A. Suzuki, M. Matsuda, Y. Nagahama and N. Shibata, Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development* **74**: 1239-1246, 2007.
 ⑤ 松田勝, メダカの性決定. アニテックス **19**: 19-26, 2007.
 ⑥ Y. Ohmuro-Matsuyama, K. Okubo, M. Matsuda, S. Ijiri, D. Wang, G. Guan, T. Suzuki, M. Matsuyama, K. I. Morohashi and Y. Nagahama, Liver receptor homologue-1 (LRH-1) activates the promoter of brain aromatase (*cyp19a2*) in a teleost fish, the medaka, *Oryzias latipes*. *Molecular Reproduction and Development* **74**: 1065-1071, 2007.

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① M. Matsuda, 2009 A mutation in DMRT1 causes male to female sex reversal in medaka – the making of a sex-determining gene –, pp. in 3rd Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Monterey, CA, USA.
 ② 大竹博之, 真島佑佳, 松田勝, 濱口哲, 酒泉満, 人工性染色体を持つメダカ系統の作出. 日本動物学会第 79 回大会 福岡大学七隈キャンパス: 2008 年 2009 月 2005 日-2007 日, 2008.
 ③ 山田雅斗, 増山治男, 長濱嘉孝, 石川智子, 亀井保博, 藤堂剛, 松田勝, 2008 メダカの DMRT1 の突然変異は雄から雌への性転換を引き起こす, pp. 2008 年 2009 月 2005 日-200

- 7日 in 日本動物学会第 79 回大会, 福岡大学七隈キャンパス.
- ④ M. Matsuda, 2008 A MUTATION OF DMRT1 CAUSES MALE TO FEMALE SEX REVERSAL IN THE MEDAKA, ORYZIAS LATIPES, pp. in *Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions*, Honolulu, Hawaii.
- ⑤ 増山治男, 山田雅斗, 長濱嘉孝, 松田勝, 外来 DMY 遺伝子をゲノムにもつ XX メダカは雄になる. 特定領域「性分化機構の解明」第3回冬のワークショップ 2008年3月3日—5日: 静岡県御殿場高原ホテル, 2007.
- ⑥ 山田雅斗, 増山治男, 長濱嘉孝, 石川智子, 亀井保博, 藤堂剛, 松田勝, メダカの DMRT1 の突然変異は雄から雌への性転換を引き起こす. 特定領域「性分化機構の解明」第3回冬のワークショップ 2008年3月3日—5日: 静岡県御殿場高原ホテル, 2007.
- ⑦ 増山治男, 山田雅斗, 長濱嘉孝, 松田勝, 外来の性決定遺伝子 D M Y を持った XX メダカ系統樹立. 日本動物学会第78回大会 弘前大学 文京町キャンパス: 2007年2009月 2020日-2022日, 2007.

研究者番号:20414013

- (2)研究分担者
該当なし
- (3)連携研究者
該当なし
- (4)研究協力者
増山 治男
宇都宮大学大学院・農学研究科・学生

[図書] (計 1 件)

- ① M. Matsuda, and M. Sakaizumi, Sex determination. in Reproductive Biology and Phylogeny in Fish, edited by BGM Jamieson. in press 2009

[その他]

- ① ホームページ等
<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/lab/matsuda.html>
- ② 平成20年度 ひらめき☆ときめき サイエンス～ようこそ大学の研究室へ～ K A K E N H I (研究成果の社会還元・普及事業) 「バイテク体験講座 ～おコメのDNA鑑定に挑戦しよう、光る大腸菌を作ろう～」2008年8月1日-2日実施
- ③ 平成19年度 地域科学技術理解増進活動推進事業 機関活動支援「親子で学ぶDNA鑑定」2007年12月21日実施

6. 研究組織

- (1)研究代表者
松田 勝 (MATSUDA MASARU)
宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授