

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03269

研究課題名（和文）XY型からZW型への性決定システムの進化

研究課題名（英文）Evolution of XY and ZW sex determination systems

研究代表者

竹花 佑介（Takehana, Yusuke）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：60432093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：メダカ属javanicusグループに属する全5種の性決定機構を解明するため、全ゲノム解析やトランスクリプトーム解析を行った。これにより、各種の性染色体構造や性決定遺伝子候補を明らかにし、一部については機能解析を行うことでその性決定機能を解明できた。これらの結果から、本グループの祖先において一度XY型からZW型が生じ、そこからさらに新規のXY型が複数回独立に生じたことが推定された。また、ZW型からXY型が生じる際には、Dmrt1が性決定機能を獲得することが重要であり、これによって新規のY染色体が生じてきたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでほとんど未解明であったZW型の性決定機構やXY型とZW型の交代過程について、そのメカニズムの一端を明らかにしたという点でその学術的意義は大きい。また、本研究により、メダカ属各種の遺伝的性の判別マーカーを開発することもできた。これらの性判別マーカーが野生集団でも利用可能であり、ジャワメダカを始めとしたメダカ属魚類が東南アジアの毒性学分野でモデル魚として利用されていることを考慮すると、これら性判別マーカーの開発は、内分泌攪乱物質の評価など、本分野において大きな意義をもつ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed whole genome sequencing and transcriptome analyses of all five medaka species in the javanicus group of *Oryzias*, and revealed the sex chromosome structures and the candidate for sex-determining genes. Functional analyses of such candidates demonstrated their sex-determining functions. These results suggested that the ZW system arose once from the XY system in the ancestor of this group, and that new XY systems arose independently multiple times from the ZW system. In the latter process, the acquisition of sex-determining function by *Dmrt1* seems to be important, which may have led to the occurrence of the new Y chromosomes.

研究分野：遺伝学

キーワード：性決定遺伝子 性染色体 メダカ属魚類

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物では、性染色体の組み合わせによって遺伝的にオス・メスが決定される。この性染色体による性決定システムにはXY型とZW型の2パターンが存在し、XY型の場合は性染色体がヘテロ接合になるとオスに分化し、ZW型の場合は性染色体がヘテロ接合になるとメスに分化する。XY型、ZW型いずれの場合でも、性染色体には生殖巣の分化方向を決定するマスターレギュレーター(性決定遺伝子)が存在するはずであるが、これまでに同定された8つの性決定遺伝子のうち7つがXY型に由来するため(Capel, Nat Rev Genet 2017 他) ZW型性決定システムの分子基盤はほとんど未解明であった。

また、哺乳類は基本的にXY型、鳥類やヘビ類の多くはZW型であるなど、脊椎動物にはXY型とZW型の性決定システムが混在している(Eزاز et al, Curr Biol 2006 他)。しかも、性染色体や性決定遺伝子の種類はXY型とZW型で異なり、同じXY型であっても種間で異なる。これらのことから、脊椎動物の進化過程では新奇の性決定遺伝子が何度も誕生し、それによって異なる性決定システムや性染色体が頻繁に生じてきたと考えられてきた。研究代表者らが実際に異なるY染色体から別の性決定遺伝子を相次いで発見したことで、XY型から別のXY型への進化メカニズムが明らかにされつつある(Takehana et al., Nature Commun 2014 他)。しかし、XY型からZW型が生じた過程は全く明らかにされていなかった。

研究代表者らはこれまでに、メダカ属にはXY型とZW型の性決定システムが混在し、解析したすべての種が異なる性染色体をもつという、驚くべき多様性を明らかにしてきた(Takehana et al., Genetics 2007 他)。ZW型はメダカ属 *javanicus* グループの2種(ジャワメダカとハブスメダカ)のみで認められ、近縁な3種(ハウザンメダカ、インドメダカ、タイメダカ)はXY型である(図1)。

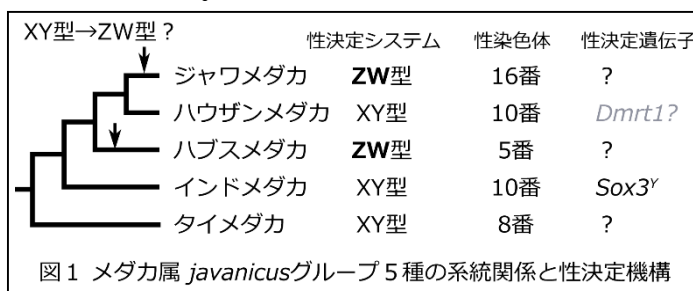


図1 メダカ属 *javanicus*グループ5種の系統関係と性決定機構

このことから、メダカ属ではXY型からZW型への転換が1回以上生じたことが示唆された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ZW型のジャワメダカとハブスメダカ、XY型のハウザンメダカとタイメダカについて、全ゲノム解析とトランスクリプトーム解析、およびゲノム編集技術を駆使することで、近縁種群においてXY型とZW型両方の性決定遺伝子を明らかにすることを目的とした。さらに、インドメダカを含めた全5種において、系統関係に基づいて性決定カスケードを比較することで、XY型からZW型が生じた進化メカニズムを解明し、脊椎動物における性決定システム進化の基本原則を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

XY型のハウザンメダカでは、性決定遺伝子座のポジショナルクローニングにより、常染色体上の *Dmrt1* がY染色体に遺伝子重複して *Dmrt1^Y* が生じたことが判明しており、これが性決定遺伝子である可能性が極めて高い。しかし、残る3種(ZW型のジャワメダカとハブスメダカ、およびXY型のタイメダカ)については、未だ候補遺伝子を特定できていない。その理由として、ZW型の2種は性染色体間の組換え抑制領域が広く、ポジショナルクローニング法による遺伝学的な性決定領域の限定が不可能であったこと、PacBioによる長鎖配列データを取得しても単純なゲノム解析ではジャワメダカ性染色体(ZとW)を区別してアセンブルするのが困難であったこと、3種とも既知の性関連遺伝子が性決定領域内に存在しなかったこと、が考えられた。

そこで本研究では、「性染色体に組換え抑制がある魚種から新規性決定遺伝子を探索する」ための限定要因(上記事項)を克服し、性決定システムの転換をもたらした分子メカニズムを解明するため、以下のストラテジーを考案した。

- (1) 半数体や超雄を用いてゲノム解析を行い、W特異的あるいはY特異的な性決定領域を特定する。
- (2) 性決定時期前後のトランスクリプトーム解析を行い、性特異的発現を示す遺伝子を探索する
- (3) 候補遺伝子の機能解析から性決定遺伝子を同定する。

以上のストラテジーから、XY型からZW型が生じた進化過程とその分子メカニズムを解明することにした。

(1) ゲノム解析による性決定領域の特定

ジャワメダカについては、すでにPacBioデータから高品質のゲノム配列を得ており、これをリファレンスとして利用した。ハブスメダカについてはPacBioのHiFiリードを、ハウザンメダカ

とタイメダカについては Oxford Nanopore の長鎖リードと Illumina の短鎖リードを取得し、*de novo* アセンブルを行ってリファレンスゲノムを構築した。また、ZW 型のジャワメダカとハブスメダカについては、紫外線照射して不活化した精子を用いて人工授精を行い、Z 染色体と W 染色体のどちらか一方をもつ半数体胚を作出した。これらの半数体個体から DNA を抽出し、次世代シーケンサー解析に供した。半数体の Illumina リードをリファレンスゲノムにマッピングすることで、性染色体 (Z あるいは W) の塩基配列を決定した。性染色体間で塩基配列を比較することにより、W 染色体特異的、あるいは Y 染色体特異的な性決定領域を特定した。

(2) トランスクリプトーム解析 (RNA シークエンス)

上記 4 種について、形態的雌雄差が現れるステージ前後の生殖巣を経時的にサンプリングし、RNA を調製した。これらのサンプルを次世代シーケンサーに供し、各種の全ゲノムデータをリファレンス配列とした RNA-seq 解析を行った。これにより、性決定時期にオス特異的あるいはメス特異的発現を示す遺伝子群を探索した。

(3) 性決定遺伝子候補の機能解析

上記のとおり解析から、性決定領域に存在し、かつ性決定時期の生殖巣で発現する「性決定遺伝子候補」を探索した。これらの候補遺伝子について、ゲノム編集を用いた機能喪失実験を行い、候補遺伝子が真に性決定遺伝子であるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) ジャワメダカ Penang 系統の性決定機構

ZW 型を示すジャワメダカの Penang 系統 (マレーシア) については、すでに先行研究によって参照ゲノム配列を構築している (Takehana et al., 2020)。そこで、Z あるいは W のみをもつ半数体を用いたゲノム解析、および野生集団を用いた集団ゲノム解析を実施したところ、W 染色体特異的な約 150kb の scaffold を同定することができた。この scaffold 内には 2 つの候補遺伝子 (機能未知遺伝子および *Tpx2W* 遺伝子) が予測された。これらの遺伝子はいずれも既知の性決定分化遺伝子ではないが、RNA-seq 解析によって孵化直後の ZW 個体で高発現していることが判明した。さらに、ゲノム qPCR によってこれらの候補遺伝子のコピー数を定量したところ、W 染色体上で 4 ~ 6 コピー程度遺伝子重複していることが示唆された。そこで、これらの候補遺伝子が性決定に関与するかどうかを明らかにするため、CRISPR/Cas9 法を用いてノックアウト解析を行った。その結果、機能未知遺伝子のノックアウト系統では性転換が認められなかったが、*Tpx2W* のノックアウト系統では、ZW 個体においてメスからオスへの性転換が認められた。これにより、*Tpx2W* が本系統の性決定遺伝子である可能性が考えられた。

(2) ハブスメダカの性決定機構

ジャワメダカと同様に ZW 型を示すハブスメダカについては、ゲノム解析によって高精度の Z 染色体配列と W 染色体配列の構築に成功し、W 特異的な 2 つの候補遺伝子を得た。興味深いことに、これらの候補遺伝子はジャワメダカの W 特異的領域の遺伝子と同じであった。このことから、両者の性染色体は異なるが、W 特異的領域の起源は同一であることが示唆された。したがって、ジャワメダカとハブスメダカの共通祖先で ZW 性染色体が生じ、どちらかでその性決定領域が転座することで、異なる W 染色体が生じたと考えられた。

(3) ジャワメダカ Jeneponto 系統の性決定機構

また、ジャワメダカの Jeneponto 系統では、性決定様式が XY 型であり、性染色体はメダカ 9 番染色体と相同であることが判明した。さらに、Y 染色体には *Dmrt1Y* 遺伝子が 40 コピー程度多重重複 (*Dmrt1Y*) しており、この *Dmrt1Y* をノックアウトすると XY 個体がメスに性転換することも明らかになった。このことから、本系統の性決定遺伝子が *Dmrt1Y* であることも判明した。したがって、ジャワメダカ種内に異なる性決定様式 (ZW 型と XY 型) が存在することが明らかになった。さらに、Penang 系統と Jeneponto 系統の交配実験から、W 染色体に対して Y 染色体が上位であることも示された。これらのことから、ジャワメダカとハブスメダカの共通祖先で生じた ZW 型は、Jeneponto 周辺の集団において *Dmrt1Y* を獲得することで ZW 型から XY 型に交代した可能性が考えられた。

(4) ハウザンメダカの性決定機構

また、同じく XY 型を示すハウザンメダカでも 10 番染色体の片方 (Y 染色体) に *Dmrt1* が 10 コピー以上遺伝子重複している (*Dmrt1Y*) ことを見出した。*Dmrt1Y* は性決定時期の XY 個体で高発現し、複数の *Dmrt1Y* コピーをノックアウトするとメスに性転換することも明らかになった。したがって、*Dmrt1* が遺伝子重複して性決定機能を獲得することにより、ハウザンメダカとジャワメダカ (Jeneponto 系統) で独立に新規の Y 染色体が進化してきたことが明らかになった。

(5) タイメダカの性決定機構

さらに、XY 型を示すタイメダカについて Oxford Nanopore の長鎖リードと、Illumina の短鎖リードを組み合わせて、参照ゲノム配列を構築した。集団ゲノム解析やトランスクリプトーム解析を

併用して性決定遺伝子を探索したところ、8番染色体にY染色体特異的な約60kbの挿入配列を見出した。この領域内を詳細に解析したところ、性決定遺伝子候補として*Sox3*を同定することができた。この遺伝子はインドメダカやマーモラタスメダカの性決定遺伝子であり、10番染色体に位置している。そのため、タイメダカでは10番染色体から8番染色体の片方(原始Y染色体)に重複転座し、性決定機能を獲得することで性決定遺伝子へと進化してきたことが予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rusni Suhaila, Sassa Mieko, Takagi Toshiyuki, Kinoshita Masato, Takehana Yusuke, Inoue Koji	4. 巻 178
2. 論文標題 Establishment of cytochrome P450 1a gene-knockout Javanese medaka, <i>Oryzias javanicus</i> , which distinguishes toxicity modes of the polycyclic aromatic hydrocarbons, pyrene and phenanthrene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 113578 ~ 113578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marpolbul.2022.113578	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 Myosho Taijun, Hattori Minako, Yamamoto Jun, Toda Misa, Okamura Tetsuro, Onishi Yuta, Takehana Yusuke, Kobayashi Tohru	4. 巻 274
2. 論文標題 Effects of synthetic sex steroid hormone exposures on gonadal sex differentiation and dynamics of a male-related gene, Gonadal soma-derived factor (Gsd) and an estrogen up-regulated gene, Choriogenine-H (ChgH) gene expression in the euryhaline Javafish medaka, <i>Oryzias javanicus</i> , based on genetic sexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 129893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2021.129893	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 -
1. 著者名 Yamahira Kazunori, Ansai Satoshi, Kakioka Ryo, Yaguchi Hajime, Kon Takeshi, Montenegro Javier, Kobayashi Hirozumi, Fujimoto Shingo, Kimura Ryosuke, Takehana Yusuke et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Mesozoic origin and 'out-of-India' radiation of ricefishes (Adrianichthyidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Letters	6. 最初と最後の頁 20210212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsbl.2021.0212	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 該当する
1. 著者名 Rusni S, Sassa M, Takehana Y, Kinoshita M, Inoue K	4. 巻 86
2. 論文標題 Correlation between cytochrome P450 1A (cyp1A) mRNA expression and ambient phenanthrene and pyrene concentration in Javanese medaka, <i>Oryzias javanicus</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 605-613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01428-y	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 -

1. 著者名 Nakayama Tomoya, Shimmura Tsuyoshi, Shinomiya Ai, Okimura Kousuke, Takehana Yusuke, Furukawa Yuko, Shimo Takayuki, Senga Takumi, Nakatsukasa Mana, Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru, Okubo Kataaki, Kamei Yasuhiro, Naruse Kiyoshi, Yoshimura Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Seasonal regulation of the lncRNA LDAIR modulates self-protective behaviours during the breeding season	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 845 ~ 852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-019-0866-6	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 -

1. 著者名 Ishikawa Asano, Kabeya Naoki, Ikeya Koki, Kakioka Ryo, Cech Jennifer N., Osada Naoki, Leal Miguel C., Inoue Jun, Kume Manabu, Toyoda Atsushi, Tezuka Ayumi, Nagano Atsushi J., Yamasaki Yo Y., Suzuki Yuto, Kokita Tomoyuki, Takahashi Hiroshi, Lucek Kay, Marques David, Takehana Yusuke, Naruse Kiyoshi, Mori Seiichi, 他8名	4. 巻 364
2. 論文標題 A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 886 ~ 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aau5656	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 該当する

1. 著者名 Lee Bo-Young, Kim Min-Sub, Choi Beom-Soon, Nagano Atsushi J., Au Doris Wai Ting, Wu Rudolf Shiu Sun, Takehana Yusuke, Lee Jae-Seong	4. 巻 9
2. 論文標題 Construction of High-Resolution RAD-Seq Based Linkage Map, Anchoring Reference Genome, and QTL Mapping of the Sex Chromosome in the Marine Medaka <i>Oryzias melastigma</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 G3; Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 3537 ~ 3545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/g3.119.400708	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 Takehana Yusuke, Zahm Margot, Cabau Cedric, Klopp Christophe, Roques Celine, Bouchez Olivier, Donnadiou Cecile, Barrachina Celia, Journot Laurent, Kawaguchi Mari, Yasumasu Shigeki, Ansai Satoshi, Naruse Kiyoshi, Inoue Koji, Shinzato Chuya, Schartl Manfred, Guiguen Yann, Herpin Amaury	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome Sequence of the Euryhaline Javafish Medaka, <i>Oryzias javanicus</i> : A Small Aquarium Fish Model for Studies on Adaptation to Salinity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 G3; Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 907 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/g3.119.400725	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 村田芽吹、竹花佑介
2. 発表標題 ジャワメダカにおける性決定様式の種内多様性
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立道花林、竹花佑介
2. 発表標題 メダカの生殖腺性分化におけるSox3の役割
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田芽吹、安齋賢、竹花佑介
2. 発表標題 スラウェシ産ジャワメダカでは多重重複したDmrt1がオス決定に関与する
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会、オンライン/米子
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立道花林、竹花佑介
2. 発表標題 マーモラタスメダカY染色体特異的エンハンサーの機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会、オンライン/米子
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村優太、竹花佑介、小川聖貴
2. 発表標題 インドメダカとハブスメダカにおけるオス分化因子Gsdfの解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会、オンライン/米子
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehana Y
2. 発表標題 Genome changes leading to diverse sex chromosomes in fish.
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takehana Y
2. 発表標題 Evolution of sex-determining pathways in <i>Oryzias</i> .
3. 学会等名 6th International Symposium of <i>Oryzias</i> fish (ISOF), Bukit Tinggi, Malaysia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Yamada, Yoshinobu Uno, Atsushi G Nagano, Kiyoshi Naruse, Yusuke Takehana
2. 発表標題 Is the sex determining gene of <i>Oryzias haugiangensis</i> <i>Dmrt1</i> ?
3. 学会等名 第25回小型魚類研究会，宇都宮大学（宇都宮）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Kimura, Masaki Ogawa, Yusuke Takehana
2. 発表標題 Is Gsdf a common male differentiation factor to medaka fishes?
3. 学会等名 第25回小型魚類研究会, 宇都宮大学(宇都宮)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田裕太, 宇野好宣, 八杉公基, 永野惇, 成瀬清, 竹花佑介
2. 発表標題 ハウザンメダカの性決定遺伝子はDmrt1か?
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会, 大阪市立大学(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹花佑介
2. 発表標題 オスとメスを決める遺伝子の意外な多様性とオス化メス化の変わらない骨組み
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会, 大阪市立大学(大阪)(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 日本実験動物協会 編	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 200
3. 書名 実験動物の技術と応用 入門編 増補改訂版	

1. 著者名 日本実験動物協会 編	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 396
3. 書名 実験動物の技術と応用 実践編 増補改訂版	

1. 著者名 竹花佑介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 480
3. 書名 第13章「オスとメスを決める遺伝子の意外な多様性とオス化メス化の変わらない骨組み」 神田真司編 『遺伝子から解き明かす魚の不思議な世界』	

〔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	安齋 賢 (Ansay Satoshi) (20779467)	東北大学・生命科学研究科・助教 (11301)	

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			
マレーシア	CEMACS, USM			