

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570059

研究課題名（和文） DMRT1 突然変異メダカを用いた生殖腺の性的可塑性の解析

研究課題名（英文） Gonadal plasticity of DMRT1 mutants in the medaka

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（和文）：

Dmrt1 は、様々な脊椎動物から見つかっている遺伝子で、そのすべての場合で、精巣分化に関連した発現を示すことから、精巣形成に重要な働きをもつ遺伝子であると推察されている。しかし、マウス以外の脊椎動物種ではその機能は示されていなかった。本研究では、メダカの *Dmrt1* 遺伝子突然変異体の遺伝的雄個体は雌へと分化し、正常な卵を産卵することを見いだした。このことから、*Dmrt1* はメダカの精巣分化に必要な遺伝子であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Dmrt1, which is found in many vertebrates, exhibits testis-specific expression during the sexual differentiation period, suggesting a conserved function of *Dmrt1* in the testicular development of vertebrate gonads. However, functional analyses have been reported only in mammals. The current study focused on the *Dmrt1* function in the teleost medaka, *Oryzias latipes*, which has an XX–XY sex determination system. Although medaka sex is determined by the presence or absence of the Y chromosome-specific gene *Dmy*, we demonstrated that in one *Dmrt1* mutant line, which was found by screening a gene-driven mutagenesis library, XY mutants developed into normal females and laid eggs. These results show that *Dmrt1* is essential to maintain testis differentiation after *Dmy*-triggered male differentiation pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学

キーワード：形態形成、生殖腺性分化、メダカ

1. 研究開始当初の背景

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に従って、メスでは未分化生殖腺が卵巣に、オスでは精巣に分化すること

で、個体の性は決定される。メダカは、遺伝学的解析が容易な上に性決定遺伝子が同定されているので、未分化生殖腺から精巣や卵巣が形成される機構を明らかにする目的に最適な実験動物の一つである。近年、魚類の性決定遺伝子は様々であることがわかって

きたが、その一方、他の生命現象と同様に性分化に関わる遺伝子の脊椎動物における共通性が明らかとなってきた。Dmrt1 遺伝子は様々な脊椎動物種から見つかっている遺伝子その発現パターンから精巣分化に重要な役割があると推察されている。しかし、哺乳類以外の脊椎動物では機能的な解析が行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、メダカを材料として Dmrt1 の機能を解析することを目的とした。すでに整備されていた誘発突然変異ライブラリーより Dmrt1 遺伝子の変異体を見つけたので、これらの変異体の表現型を明らかにし、Dmrt1 遺伝子の生殖腺における機能を調べた。

3. 研究の方法

見つけた 4 つの変異体それぞれについて、交配により突然変異ホモとなる個体を作成し、組織切片を作製して生殖腺の様子を観察した。また、Dmrt1 ゲノム領域を変異体の遺伝的背景に導入した遺伝子導入メダカを作成してその表現型が回復するかどうかを確認した。

4. 研究成果

孵化 30 日後の個体について、生殖腺の組織切片を作製し観察したところ Dmrt1 遺伝子突然変異体のひとつでは、遺伝的雄個体の生殖腺が卵巣へと分化していた。他の突然変異体は明瞭な表現型を示さなかった。また、ふ化後 30 日までの間の生殖腺分化の様子を同じく組織切片を作製して観察したところ、変異体の遺伝的雄個体の生殖腺は、ふ化後 5 日までは、正常雄の生殖腺と類似していたが、ふ化後 10 日では正常雌の生殖腺の様子と類似していた。すなわち、この変異体の雄の生殖腺は、ふ化後 5 日までは精巣方向に分化しているものの、ふ化後 10 日までの間に分化の方向を卵巣方向へと転換しており、その後最終的に正常な卵巣と遜色なく発達することが明らかとなった。

また、この変異体に正常な Dmrt1 ゲノム領域を導入した遺伝的雄の遺伝子導入メダカは、正常な雄へと分化した。このことから、この変異体の表現型は、Dmrt1 遺伝子の変異により生じていることが明らかとなった。

以上の結果より、ほ乳類と同様メダカでも Dmrt1 は、精巣分化に必須の遺伝子であることがわかった。脊椎動物の中で、ほ乳類と魚類で共通の機能を持っている Dmrt1 遺伝子は、脊椎動物に共通した生殖腺の精巣分化における主要な遺伝子であると推察できる。

本研究で解析した Dmrt1 変異系統では、Dmrt1 遺伝子座が変異ホモである XY 個体は雌に分化した。一方、Dmrt1 遺伝子座がヘテロの XY 個体は、雄に分化した。つまり、Dmrt1 変異系統では、雄と雌とのゲノムの差は、Dmrt1 の遺伝子座だけである。言い換えると、Dmrt1 遺伝子座の 1 塩基の違いが、雄と雌とを分けているといえる。

これまで哺乳類以外の脊椎動物では、特定の遺伝子を破壊してその遺伝子機能を解析することが難しかった。本研究の誘発突然変異ライブラリーを用いた解析は、メダカを用いて特定遺伝子の機能解析が可能であることを示した一例となった。今後この手法で多くの遺伝子機能の解析が期待できる。

ほ乳類において、性分化関連遺伝子の変異による性転換が報告されているが、それらの場合、完全な性転換は不可能である。本研究の Dmrt1 変異体の場合、完全な性転換が生ずる。この変異体は、Dmrt1 の機能解析に有効な材料である。また、このように完全に性転換するモデルを使うことにより、生殖腺性分化のより詳細な遺伝子機構解明が期待できる。

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 8 件)

- ① Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, Matsuda M (2012) Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. Chromosome Res 20:163-76 (査読有)
DOI: 10.1007/s10577-011-9264-x
- ② Nakamoto M, Fukasawa M, Tanaka S, Shimamori K, Suzuki A, Matsuda M, Kobayashi T, Nagahama Y, Shibata N (2012) Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (hsd3b), star and ad4bp/sf-1 during gonadal development in medaka (Oryzias latipes). Gen Comp Endocrinol 176:222-230 (査読有)

- ③ Fernandino JI, Popesku JT, Paul-Prasanth B, Xiong H, Hattori RS, Oura M, Strussmann CA, Somoza GM, Matsuda M, Nagahama Y, Trudeau VL (2011) Analysis of Sexually Dimorphic Expression of Genes at Early Gonadogenesis of Pejerrey *Odontesthes bonariensis* Using a Heterologous Microarray. *Sex Dev* 5:89-101 (査読有)
- ④ Wang DS, Zhou LY, Kobayashi T, Matsuda M, Shibata Y, Sakai F, Nagahama Y (2010) Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinology* 151:1331-40 (査読有)
- ⑤ Shibata Y, Paul-Prasanth B, Suzuki A, Usami T, Nakamoto M, Matsuda M, Nagahama Y (2010) Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr Patterns* 10:283-289 (査読有)
- ⑥ 松田勝 (2010) メダカの性決定. *水産育種* 40:3-9 (査読有)
- ⑦ Otake H, Masuyama H, Mashima Y, Shinomiya A, Myosho T, Nagahama Y, Matsuda M, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2010) Heritable artificial sex chromosomes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Heredity* 105:247-56 (査読有)
- ⑧ Nakamoto M, Fukasawa M, Orii S, Shimamori K, Maeda T, Suzuki A, Matsuda M, Kobayashi T, Nagahama Y, Shibata N (2010) Cloning and expression of medaka cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 during gonadal development. *Develop. Growth Differ.* 52:385-395 (査読有)
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 松島美喜子, 松田勝 ‘野生メダカ由来 XX 雄系統の生殖腺分化’ 日本動物学会第 64 回関東支部大会, 2012 年 3 月 17 日, 東邦大学 習志野キャンパス.
- ② Matsuda M (2011) ‘Sex Determination by an Autosomal Gene Mutation’ The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, November 24th, 2011, Okazaki, Japan.
- ③ Imai T, Masuyama H, Matsuda M ‘Establishment of FLAG-tagged Dmy Transgenic Medaka’, The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, November 23rd, 2011, Okazaki, Japan.
- ④ 齊野兼太郎, 増山治男, 松田勝 ‘融合 Dmy および Dmrt1 遺伝子導入メダカ系統の樹立’, 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川.
- ⑤ 増山治男, 北野健, 松田勝 ‘メダカ Gsdf 遺伝子の転写制御領域の解析’ 日本動物学会第 82 回大会’, 2011 年 9 月 21 日, 旭川.
- ⑥ 今井拓人, 増山治男, 松田勝 ‘FLAG タグ融合 Dmy 遺伝子導入メダカの樹立’ 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川.
- ⑦ Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, Matsuda M ‘A single basepair difference is sufficient to distinguish males from females in medaka fish’, 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting’, Japan, 8th September 9th, 2011, Mishima.
- ⑧ 増山治男, 松田勝 ‘DMRT1 遺伝子突然変異メダカの解析’ 日本動物学会第 81 回大会. 2010 年 9 月 23 日, 東京.
- ⑨ 増山治男, 亀井保博, 石川智子, 藤堂剛, 飯郷雅之, 松田勝 ‘DMRT1 遺伝子突然変異メダカの解析’ 第 16 回小型魚類研究会, 2010 年 9 月 18-19 日, 埼玉
- ⑩ 松田勝 ‘メダカの性決定’ 水産育種研究会. 2010 年 3 月 27 日, 藤沢.
- ⑪ 増山治男, 松田勝 ‘DMRT1 遺伝子突然変異メダカはオスからメスへ性転換する’ 第 15 回小型魚類研究会, 2009 年 9 月 12-13 日, 名古屋.
- ⑫ 塚田垂矢, 増山治男, 山田雅人, 松田勝 ‘DMRT1 突然変異メダカの解析’ 日本動物学会第 80 回大会. 2009 年 9 月

- 17日, 静岡.
- ⑬ 増山治男, 松田勝 ‘メダカ性決定遺伝子 DMY は、いつ性分化の決め手となるのか?’ 日本動物学会第 80 回大会. 2009 年 9 月 17 日, 静岡.
- ⑭ Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, Matsuda M ‘A mutation in DMRT1 causes male to female sex reversal in medaka’ 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009 年 5 月 28-31 日. Niigata.
- ⑮ Otake H, Matsuda M, Sakaizumi M, Hamaguchi S ‘Conservation of regulatory mechanisms of DMY, the sex-determining gene in the medaka’ 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009 年 5 月 28-31 日. Niigata.
- ⑯ Masuyama H, Nagahama Y, Matsuda M ‘Establishment of a transgenic line with the sex-determining gene, Dmy, in the teleost fish medaka, *Oryzias latipes*’, 5th International Symposium on Vertebrate Sex Determination, 2009 年 4 月 23 日 Kona. Hawaii, USA.
- ⑰ Matsuda M ‘Dmrt1 is required for testicular development in the medaka, *Oryzias latipes*’, 5th International Symposium on Vertebrate Sex Determination, 2009 年 4 月 20-24 日, Kona Hawaii, USA.
- ⑱ Otake H, Matsuda M, Hamaguchi S, Sakaizumi M ‘Quick-change of sex chromosomes in the medaka’ 5th International Symposium on Vertebrate Sex Determination’, 2009 年 4 月 20-24 日, Kona. Hawaii, USA.

[図書] (計 2 件)

- ① Matsuda M (2011) The sex-determining gene in medaka. in K Naruse M Tanaka and H Takeda (eds.) *Medaka A model for Organogenesis, Human Disease, and Evolution*. Tokyo: Springer, pp255-267.
- ② Matsuda M, Sakaizumi M (2009) Sex Determination. in BGM Jamieson (ed.) *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*,

vol. 8. Enfield, NH, USA: Science Publishers, pp331-350.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/>

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

研究者番号: 20414013

(2) 研究分担者 なし

(13) 連携研究者 なし