

## 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 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570239

研究課題名（和文） 性決定元祖遺伝子の双方向進化 -精巣および卵巣決定-

研究課題名（英文） Bidirectional evolution of an ancestral gene for sex determination: testis and ovary determination

## 研究代表者

三浦 郁夫 (MIURA IKUO)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10173973

## 研究成果の概要（和文）：

ツチガエルの性連鎖遺伝子 *SOX3* (哺乳類の雄決定遺伝子 *SRY* の元祖遺伝子) の卵巣決定機能を解析した。対立遺伝子 *W-SOX3* と *Z-SOX3* の 5' 上流領域にそれぞれに特異的な 2 種類のエレメントを同定した。ZW 雌の未分化生殖腺では *W-SOX3* の発現が特に高く、*CYP19* や *FOXL2* の性的二型発現開始に先んじて発現した。ZZ の受精卵へ *W-SOX3* 遺伝子を導入し、生殖細胞への導入個体を得たが、卵巣分化は誘導されなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined the function of the sex-linked *SOX3* for ovarian differentiation in the frog *Rana rugosa*. *SOX3* is known to be an ancestral gene of the male determining gene *SRY* in eutherian mammals. Short nucleotide elements specific to the upstream regions of *W-SOX3* and *Z-SOX3*, respectively, were identified. In the undifferentiated gonads of ZW, *W-SOX3* was highly expressed and the higher expression preceded the onset of sexually dimorphic expression of *CYP19* and *FOXL2*. Using transgenesis, we successfully obtained ZZ frogs of which germ cells were introduced by the *W-SOX3*, but their gonads did not differentiate ovaries.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：性決定、*SRY*、卵巣決定、*SOX3*

## 1. 研究開始当初の背景

性の仕組みは、個体間における遺伝子の相互組換えを誘導し、遺伝的多様性を生み出すことから、生物の繁殖や進化にとって極めて重要な生体機能のひとつであると考えられている。オスあるいはメスの性を決定する様

式には、孵卵温度や社会的シグナルを要因とする環境による性決定と、受精時に性が決まる遺伝的性決定の大きく 2 つが存在する。後者は、さらにヒトを含む XY 型と鳥類に代表される ZW 型に分ける事ができる。

ヒトのY染色体上に存在する睾丸決定遺伝子 *SRY* は、1990年に Sinclair らによって発見された。それ以来、メダカ、アフリカツメガエル、ニワトリにおいて、転写因子 *Dmrt1* およびその重複遺伝子がオスあるいはメス決定遺伝子として同定されている。今後、様々な動物で性決定遺伝子の同定が期待されるが、同時に、性決定のマスター遺伝子は進化を通じて高度に保存されているのか、あるいは、多数の遺伝子はその役割を担い得るのか、という次なる議論が展開されている。また、同じ遺伝子が一方でオス決定、他方でメス決定という全く相反する機能を担う事ができるのか、それが可能である場合、どのような仕組みによるのかという疑問も存在する。さらに、遺伝子のリクルートによって性決定遺伝子が進化したケースも見つかっており、これは、形態形成の遺伝子カスケードの形成機構にも共通する重要な研究テーマとなっている。

## 2. 研究の目的

本邦産ツチガエルは、地域集団によって性決定機構が異なり、XY型とZW型の2つのタイプが存在する。そのZW型集団において、性連鎖遺伝子の1つ、*SOX3* がメスの未分化生殖腺で高く発現することが見いだされ、卵巣決定機能が示唆された。*SOX3* は元来、真獣類の雄決定遺伝子 *SRY* の元祖遺伝子であることが知られているが、ツチガエルで予想される機能はそれとは真逆となっている。*SOX3* 遺伝子がメス決定の機能を有しているのであれば、同一の遺伝子が一方で雄決定、他方でメス決定を担いうるということを証明することができる。そこで、ツチガエルの *SOX3* 遺伝子の5'上流領域の構造や、発現様式を調べ、さらに機能解析を行うことにより、*SOX3* 遺伝子のメス決定機能の解明を行うのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノムライブラリーの作製とスクリーニング

ZW雌およびXY雄のゲノムDNAを *Bam*HI で切断し、電気泳動によって切り出した15-20kb断片をλFixの *Xho*I site (fill-in)へ組み込みゲノムライブラリーを作製した。ツチガエル *SOX3* DNAをDigoxigeninでラベルし、スクリーニングを行った。

### (2) 定量PCR

幼生の生殖腺を中腎に結合した状態で取り出し、RNAlater (キアゲン) に浸した後、-80度で保存した。各発生時期の幼生10匹分の生殖腺をまとめてすりつぶし、トータルRNAを抽出した (Roche, RNA isolation kit)。RNA 1μgからcDNAを合成し (Roche, transcriptor first strand cDNA kit)、0.5

μlを使用して、定量PCR (Smart cycler, Takara) を行った。β-actinの発現の相対量を計算し、*SOX3*の発現量を定量化した。

### (3) トランスジェネシス

受精卵への遺伝子導入には2つの方法を用いた。一つは、メダカのトランスポゼース Tol2 の mRNA とコンストラクトを共導入する方法で、もう一つは Meganuclease の I-*Sce* I でコンストラクトを消化し、その反応液を注入する方法である。*SOX3* は自身のプロモーター約3kbの下流に接続してコンストラクトを作製し、同時にアフリカツメガエルの EF1α プロモーター+EGFPを同じコンストラクト内に配置して、導入のマーカーとした。導入した受精卵は変態後、開腹して生殖腺の蛍光にて導入を判断した。生殖腺は、ナワシン液で固定し、パラフィン切片を作製後、ヘマトキシレン・エオシンで染色し、構造を顕微鏡下で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ZとW染色体上にある *SOX3* 遺伝子の5'上流領域の解析

ZW雌のゲノムDNAライブラリーから *SOX3* 遺伝子領域をスクリーニングして、5'上流領域3kbの塩基配列を決定した。Z-*SOX3* と W-*SOX3* を比較したところ、翻訳開始点から上流300塩基は両者間で高度に配列

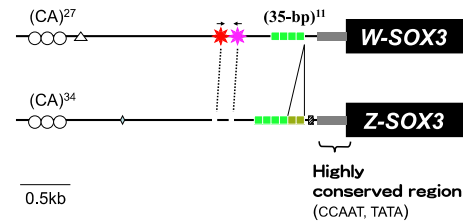


図1 *SOX3* 遺伝子の5'上流領域

が保存されていた。一方、約1kbp上流にはW-*SOX3*に特異的な2種類の7塩基配列を同定した (図1, 星印)。この両配列はほぼ完全なパルンドローム構造を示し、転写因子の結合エレメントの可能性はある。一方、Z-*SOX3*では約500塩基上流に35塩基からなる特異的な2つの配列と12塩基からなる1つの配列が見つかった (図1, 四角)。以上の特異的な配列がZないしW-*SOX3* 遺伝子の特異的な発現を制御している可能性がある。

一方、XY型集団のX-*SOX3*とY-*SOX3* 遺伝子についても、5'上流領域の配列を決定し、両者間、あるいはZやW-*SOX3*の配列と比較検討した。その結果、X-*SOX3*はW-*SOX3*とほぼ同一の配列を示し、極めて高い相同性を示した。ただし、X-*SOX3*にはも

うひとつ異なるクローンが存在し、この遺伝子は翻訳領域が全く同一配列であるにもかかわらず、約 500bp 上流に Z-*SOX3* に見られる 35 塩基の配列がひとつ存在した。一方、Y-*SOX3* は W-*SOX3* に特異的な 1 kb 上流の 7 塩基配列を 2 つ、Z-*SOX3* に特異的な約 500bp 上流の 12 塩基の配列を持つ。一方、Z-*SOX3* に特有の 3 5 塩基の配列は欠失していた。したがって、Y-*SOX3* は Z や W-*SOX3* のいずれとも異なる発現を示すことが予想された。

## (2) *SOX3* 遺伝子の発現

ZW 型性染色体をもつ新潟と金沢の 2 つの集団を用いて、*SOX3* 遺伝子の生殖腺における発現時期を調べた。さらに、生殖腺で性的二

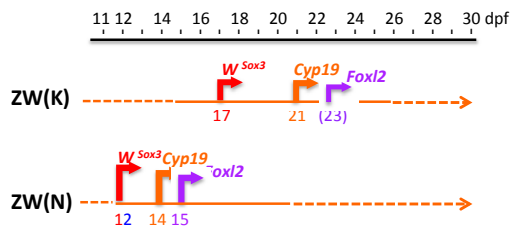


図2 *SOX3* 遺伝子の発現時期

K, 金沢集団 N, 新潟集団 dpf, 受精後

型発現を示す 2 つの遺伝子、*Cyp19* と *Foxl2* の発現も調べ、*SOX3* 遺伝子の発現開始時期との比較検討を行った。新潟集団の ZW 雌では、*SOX3* の発現が受精後 1 2 日目 (12dpf) に ZZ 雄よりも高くなり、*Cyp19* および *Foxl2* の性的二型発現時期の 14, 15dpf よりも早いことがわかった (図 2)。金沢集団の *SOX3* 発現は 17dpf と少し遅いが、同様に *Cyp19* と *Foxl2* の発現開始に先んじていた (図 2)。

ここで、*SOX3* の対立遺伝子 Z と W 発現の相互比率を調べたところ、新潟 ZW では終始対立遺伝子 W の発現が高く、Z は低いことがわかった (図 3)。金沢 ZW では、対立遺伝子 W の発現は最初から高く、Z の発現が発生とともに低下していくことがわかった (図 3)。以上から、性連鎖遺伝子 *SOX3* は *Cyp19* や *Foxl2* の性的二型発現に先んじて ZW 雌で高い発現を示し、しかも、それは対立遺伝子 W の高い発現に起因していることがわかった。

次に、発現細胞を同定するため in situ hybridization を行ったところ、生殖腺全体に発現が見られた。そこで、哺乳類の CHO 細胞に自身のプロモータを有する *SOX3* に IRES を介して GFP を接続したコンストラクトをトランスフェクションしたところ、*SOX3* の mRNA を検出し、しかも GFP 蛍光を観察することができた (図 4)。このことから、卵巣の体細胞で発現することが示唆された。一方、同様の *SOX3* コンストラクトを用いたトランスジェニック実験 (後述) によって生殖細胞だけ

に導入された個体を得られ、雌の生殖細胞

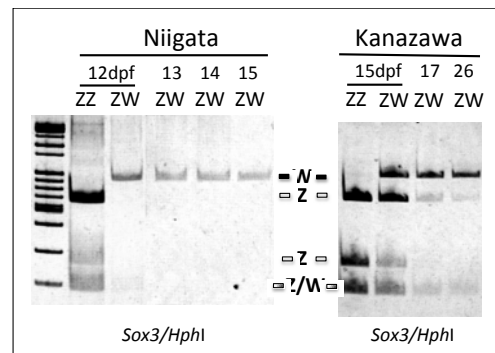


図3 *SOX3* の対立遺伝子 W と Z の発現比較

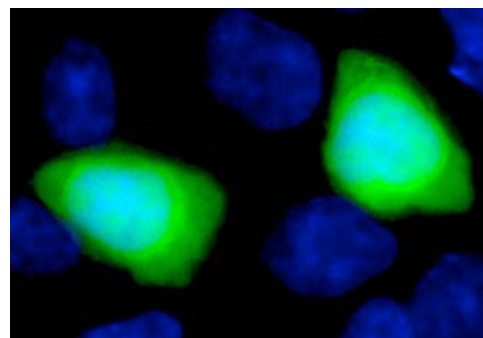


図4 CHO 細胞における *SOX3*-IRES-GFP の発現

での発現を確認できたが、雄の精巣の生殖細胞では極めて低い発現であった。以上から、*SOX3* は卵巣の体細胞と生殖細胞の両方で強く発現するが、精巣の生殖細胞では発現が極めて低いと予想される。なお、アフリカツメガエルの腎臓由来の培養細胞 A6 でトランスフェクションを試みたところ、*SOX3* の発現は全く誘導されなかったことから、腎臓細胞では *SOX3* が発現していないことが示唆された。

一方、XY 集団では、XX 雌で *SOX3* 遺伝子の発現が 1 5 日目から高く、ZW 同様、*Cyp19* の性的二型発現開始時期に先行していた。ただし、2 0 日目には逆に、XY 雄で *SOX3* の発現が高まり、ZW 集団とは異なる逆転現象が生じている事がわかった。

## (3) *SOX3* 遺伝子の機能解析

*SOX3* 自身のプロモータを接続した *SOX3* 遺伝子と EF1 $\alpha$  プロモータ+EGFP を一緒に配置したコンストラクトをツチガエルの受精卵へ導入した。その結果、遺伝子導入が確認された 6 個体の ZZ が得られ、その内 5 個体は生殖細胞のみへの導入であった。体細胞にも導入された 1 個体の生殖腺は基本的に精巣構造を示したが、周辺部は卵黄様の物質を抱えた大きな細胞が配置

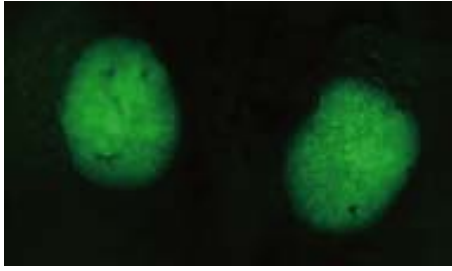


図5 *SOX3*と*EGFP*を共導入したZZ雄の生殖腺

しており、卵母細胞の様相を呈したが分子的確証は得ていない。生殖細胞へ導入された5個体のZZは全て正常な精巣構造を示した(図5)。一方、XY集団へも同様の遺伝子導入を行い、生殖細胞へ導入されたXYを4個体得たが、すべて正常な精巣構造を示した。

#### (4) 結論と考察

以上の結果から、ツチガエルの*SOX3*はW染色体上の対立遺伝子の発現が発生初期の生殖腺で強く、しかも、*Cyp19*や*Foxl2*の性的二型発現の時期よりも早い時期に開始していることがわかった。また、卵巣の体細胞と生殖細胞の両方で発現していることも確認され、卵巣決定遺伝子としての機能が示唆された。しかし、受精卵への遺伝子導入による機能解析では、少なくとも生殖細胞での発現は生殖腺の卵巣決定を誘導しないことがわかった。しかし、体細胞で発現した場合の機能については結論を得る事ができなかった。今後、F1を調べることで、*SOX3*が生殖腺の体細胞で発現した場合に卵巣決定を誘導できるのかどうか、その結論を得る事ができると考えている。

#### 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. Miura I, Ohtani H, and Ogata M Independent degeneration of the W and Y sex chromosomes in frog *Rana rugosa*. *Chromosome Res.* 査読有 2012 20:47-55.  
DOI: 10.1007/s10577-011-9258-8
2. Ohtani H, Sekiya K, Ogata M, and Miura I The postzygotic isolation of a unique morphotype of frog *Rana rugosa* found on Sado Island, Japan. *J. Herpet. F* 査読有 2012 In press.

3. Miura I, Kitamoto H, Koizumi Y, Ogata M, and Sasaki K. An X-linked body color gene of the frog *Rana rugosa* and its application to the molecular analysis of gonadal sex differentiation. *Sex Develop* 査読有 2011 5:250-258.  
DOI: 10.1159/000330365
4. Akiyama S, Iwao Y, and Miura I Evidence for true fall-mating in Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*. *Zoological Science* 査読有 2011 28(10):758-763.  
<http://dx.doi.org/10.2108/zsj.28.758>
5. 尾形光昭, 三浦郁夫 ツチカ・エルの日本国内における生息場所について 爬虫両棲類学報 査読有 2011 2011(1): 24-25.
6. Sekiya K, Ohtani H, Ogata, M, and Miura I Phyletic diversity in the frog *Rana rugosa* (Anura: Ranidae) with special reference to a unique morphotype found from Sado Island, Japan. *Current Herpetology* 査読 2010 29(2): 69-78.  
<http://dx.doi.org/10.3105/018.029.0202>
7. 三浦郁夫 カエルにおける色彩発現の遺伝的メカニズム 爬虫両棲類学会報 査読有 2009 2009(2): 151-160.
8. 尾形光昭, 三浦郁夫 2つの性決定機構をもつツチガエル “生物の科学 遺伝” NTS 査読有 2009 1: 32-37.

[学会発表] (計18件)

1. Miura I Recent topics on sex of the frog *Rana rugosa*. Workshop “Evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates. 20-22 April (2011), Canberra, Australia
2. 原とおる、山本博章、三浦郁夫、古賀章彦 脊椎動物の体色変異体を用いた活性型トランスポゾン探索 日本遺伝学会 2011年9月21日 京都市
3. 三浦郁夫、小泉雄紀、大谷浩己、尾形光昭 生殖腺の性分化決定機構の進化—性ホルモン依存から非依存へ— 染色体学会 2011年11月11日 平塚市
4. 三浦郁夫、綿貫岳人、市川洋子、藤田宏之 ナガレタゴガエルの性染色体

- 日本爬虫両生類学会 2011年10月10日 京都市
5. 尾形光昭、関谷國男、長谷川嘉則、大谷浩己、三浦郁夫 佐渡島産ツチガエルの鳴き声について 日本爬虫両生類学会 2011年10月10日 京都市
  6. 長井悠佳里、土井敏男、伊藤邦夫、藤谷武史、湯浅義明、小泉雄紀、尾形光昭、三浦郁夫 ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化(II) -とくに岡山集団と名古屋集団が接する境界領域について- 日本爬虫両生類学会 2011年10月10日 京都市
  7. 秋山繁治、小泉雄紀、三浦郁夫 アカハライモリの秋から春をまたぐ多重交配について -両季節の精子が受精に利用されている遺伝学的証拠- 日本爬虫両生類学会第49回大会 2010年10月9日-10日 横浜(神奈川)
  8. 長井悠佳里、土井敏男、湯浅義明、藤谷武史、伊藤邦夫、小泉雄紀、三浦郁夫 ナゴヤダルマガエルの遺伝的地域分化 -とくに岡山集団と名古屋集団が接する境界領域について- 日本爬虫両生類学会第49回大会 2010年10月9日-10日 横浜(神奈川)
  9. 小泉雄紀、森淳、三浦郁夫 ニホンアカガエルの新規色彩変異 -体色と眼は正常だがメスのもつ卵だけが白い- 日本爬虫両生類学会第49回大会 2010年10月9日-10日 横浜(神奈川)
  10. 尾形光昭、関谷國男、三浦郁夫 佐渡島産ツチガエルの外部形態について 日本爬虫両生類学会第49回大会 2010年10月9日-10日 横浜(神奈川)
  11. 北本光、佐々木健、三浦郁夫 オタマジャクシの性を色で見分ける -山口県産ツチガエルの性に連鎖した色彩変異遺伝子の同定- 日本爬虫両生類学会第49回大会 2010年10月9日-10日 横浜(神奈川)
  12. 小泉雄紀、大谷浩己、三浦郁夫 XY型とZW型の遺伝子発現のちがい 染色体学会第61回年会 2010年11月5日-7日 習志野(千葉)
  13. 三浦郁夫 ツチガエルの地域集団における生殖腺性差構築機構の解明 文部科学省：新学術領域研究「性差構築の分子基盤」 第2回領域会議・公開研究会 2010年12月15日-17日 逗子(神奈川)
  14. 宇野好宣、西田千鶴子、大島裕希、横山聡、三浦郁夫、中村正久、松田洋一 性染色体構成が異なるツチガエルの集団における性染色体の起源と分化過程について 日本進化学会第11回 2009年9月2日-4日 札幌(北海道)
  15. 三浦郁夫、大谷浩己、尾形光昭 ツチガエル性染色体の二重起源と地域分化 日本爬虫両生類学会第48回年会 2009年11月7日-8日 天理(奈良)
  16. 三浦郁夫、大谷浩己、尾形光昭 ツチガエルの性染色体は2重の起源をもつ 染色体学会第60回年会 2009年11月12日-14日 松江(島根)
  17. 三浦郁夫、藤谷武史、田上正隆、小泉雄紀、大谷浩己 野生ガエルにみられた変態異常 日本環境ホルモン学会第12回年会 2009年12月7日-8日 本郷(東京)
  18. Miura, I., Ezaz, T., Ohtani, H., Uno, Y., Nishida, N., Matsuda, Y., and Graves, JAM. The W chromosome evolution and sex-linked gene expression in the Japanese frog *Rana rugosa*. Fifth international symposium on the biology of vertebrate sex determination. April 20-24, (2009) Kona, Hawaii, USA
- [図書] (計2件)
1. Miura I, Ezaz T, Ohtani H, and Graves JAM. Molecular characterization of ZW sex chromosomes and the prototype chromosome in the frog *Rana rugosa*. *Advances in chromosome sciences* 2009 vol.3: 101.
  2. Miura I, Ezaz T, Ohtani H, Uno Y, Nishida C, Matsuda Y, and Graves JAM. The W chromosome evolution and sex-linked gene expression in the Japanese frog *Rana rugosa*. Nova Science Publishers Inc. 2009 pp123-140
- [その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 郁夫 (MIURA IKUO)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：10173973

(3) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

大谷 浩己 (OHTANI HIROMI)  
広島大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号：20106800

市川 洋子 (ICHIKAWA YOUKO)  
県立広島大学・生命環境学部・准教授  
研究者番号：20084163