

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370030

研究課題名(和文)環境依存的性決定の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of environmental sex determination

研究代表者

北野 健(KITANO, TAKESHI)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：40336219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、コルチゾルが温度依存的性決定に深く関与することを見出している。そこで本研究では、まず、高水温が及ぼすメダカ生殖腺への影響を調べたところ、高水温またはコルチゾル処理したXXメダカにおいて、fshr及びcyp19a1 mRNAの発現が抑制され、gsdf mRNAの発現が誘導されることが分かった。次に、これら遺伝子の機能解析を行った結果、GSDF過剰発現XXメダカにおいて完全な雄化が誘導された。これらの結果から、高水温によるメダカの雄化は、コルチゾルがgsdf mRNAの発現を誘導し、fshrやcyp19a1 mRNAの発現を抑制することにより引き起こされると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have already reported that cortisol is deeply involved in temperature-dependent sex determination. Here, we first showed that exposure to high temperature (HT) or cortisol after hatching inhibited the expression of fshr and cyp19a1 mRNAs, and induced the expression of gsdf mRNA in XX gonads during gonadal sex differentiation. Next, we analyzed the phenotypes of FSHR-knockout, CYP19A1-knockout and GSDF-overexpressed transgenic medaka. As results, among these medaka lines only GSDF-overexpressed XX medaka were completely sex-reversed into phenotypic males. Furthermore, quantitative real-time PCR analysis showed that the overexpression suppressed the expression of fshr and cyp19a1 mRNAs in XX gonads during gonadal sex differentiation. These results strongly suggest that HT induces masculinization of XX medaka by elevation of cortisol levels, which, in turn, causes suppression of fshr and cyp19a1 expression while inducing gsdf expression in XX gonads.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：性決定 性分化 コルチゾル メダカ

### 1. 研究開始当初の背景

魚類を含む多くの生物は、様々な環境に適応して子孫を存続させるため、温度等の環境に依存した性決定システムを進化させている。このシステムは、基本的に遺伝的な性決定を行う一部の生物種においても、保持されていることが最近明らかとなっている。しかしながら、この環境依存的性決定の分子機構は、未だに不明な点が多く残されている。

研究代表者らは、XX-XY 型の性決定システムを持つ魚類であるヒラメ、メダカを用いて、温度依存的性決定の分子機構を研究してきた。その研究成果としては、ヒラメ、メダカともに、性分化時期に高温で飼育することにより、生体内のコルチゾル量が上昇すること、性分化時期に高温処理またはコルチゾル処理を行うと XX 個体が雄化すること、高温飼育下でコルチゾル合成阻害剤処理を行うと XX 個体の雄化が阻害されること等である (Hayashi et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010)。さらに、XX ヒラメの生殖腺をコルチゾル処理下で約 2 週間培養したところ、雌化マーカーである卵巣型アロマトラーゼ (*cyp19a1*) mRNA の発現が抑制され、雄化マーカーである Mullerian inhibiting substance (*mis*) mRNA の発現が誘導されることが確認された (Yamaguchi et al., 2010)。これらのことから、コルチゾルが温度依存的性決定に深く関与していることが明らかとなった。

コルチゾル量の増加は、下垂体での副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌により引き起こされ、ACTH の分泌は視床下部での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) により誘導されることが分かっている。最近、研究代表者らは、視床下部内のコルチゾル制御因子を同定するため、メダカ視床下部を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、高温により 10 倍以上発現が上昇する因子 65 個、抑制される因子 55 個を単離した。高温により発現が上昇する因子の中には、*crh* に加えて、ヒートショックプロテイン 70 (*hsp70*) や *hsp30* 等の分子シャペロンが多く含まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず、高温ストレスによる雄化と HSP、CRH との関連性を調べるため、HSP 発現誘導因子である heat-shock factor 1 (HSF1) 及び CRH のノックアウト (KO) メダカ系統の作製及び表現型解析を試みる。次に、高温ストレスが及ぼすメダカ生殖腺への影響を調べるため、性分化時期におけるいくつかの性分化関連遺伝子の発現パターンを解析する。さらに、高温ストレスにより発現変動した性分化関連遺伝子について機能解析を実施する。

### 3. 研究の方法

ゲノム編集技術の一つである transcription activator-like effector

nuclease (TALEN) を利用して HSF1 ノックアウト (HSF1-KO) メダカ、CRH ノックアウト (CRH-KO) メダカ、卵巣型アロマトラーゼノックアウト (*CYP19A1*-KO) メダカを作製するため、それぞれの標的遺伝子に特異的な TALEN を作製した後、この TALEN を FLFlI メダカの 1 細胞期胚に顕微注入して成魚まで飼育し、変異導入個体を選別した。次に、変異導入個体と野生個体を交配してヘテロ変異個体を得た後、ヘテロ変異個体同士を交配して KO 個体を作製した。一方、濾胞刺激ホルモン受容体 KO (FSHR-KO) メダカ系統は、target induced local lesion in genomes (Tilling) ライブラリー (Taniguchi et al., 2006) からナンセンス変異を選別することにより作製された (Murozumi et al., 2014)。さらに、分泌性増殖因子 gonadal soma-derived growth factor (GSDF) の過剰発現トランスジェニック (Tg) メダカ系統は、生殖腺体細胞特異のプロモーター *mis* (Shiraishi et al., 2008) と *gsdf* を連結したプラスミドと、生殖細胞特異のプロモーター *olvas* と DsRedExpress を連結したプラスミド (Hayashi et al., 2010) を同時に、FLFlI メダカの 1 細胞期胚に顕微注入して成魚まで飼育し、両プラスミドが導入された個体を選別して作製された。

高温処理及びコルチゾル処理は、孵化後 0 日目から 5 日目まで、Hayashi et al. (2010) の方法に従って実行された (Kitano et al., 2012)。生殖細胞数は、DsRed 蛍光で可視化されたすべての生殖細胞数を計数した。また、遺伝子発現パターンを調べるため、性分化関連遺伝子の発現を RT-PCR 及び定量的リアルタイム PCR により解析した。エストロゲン量は、enzyme immunoassay により測定された (Murozumi et al., 2014)。さらに、雌雄判別については、生殖腺の組織像を観察して判定した。

### 4. 研究成果

(1) メダカ視床下部における高温ストレス応答因子の機能解析

HSF1-KO メダカにおいては、XY 雄は妊性があったが XX 雌は不妊となることが分かった。また、この KO メダカにおける全身での *hsp70* mRNA の発現量は、高温処理を行っても上昇しないことが確認された。一方、CRH-KO メダカにおいては、雌雄ともに妊性があり、この KO 個体同士を交配して次世代を作製することが可能であった。今後は、これら KO メダカ系統を利用して、高温ストレスによる雄化と HSP、CRH との関連性を調べる必要がある。

(2) 高水温及びコルチゾルが及ぼすメダカ生殖腺への影響

通常水温で飼育した XX 個体の雄化率は 0% であったのに対して、短期間 (孵化後 0-5 日間) の高水温飼育またはコルチゾル処理を行った XX 個体の雄化率は、それぞれ 14%、80%

であったことから、短期間の高水温またはコルチゾル処理でも XX メダカは雄化することが確認された (Kitano et al., 2012)。一方、高水温またはコルチゾル処理した孵化後 5 日目の XX 個体の生殖腺において、cyp19a1 mRNA の発現が抑制され、逆に gsdf mRNA の発現が誘導されることが分かった (Kitano et al., 2012)。さらに、この高水温及びコルチゾル処理による影響は、エストロゲンの投与により完全にレスキューされた。これらの結果から、高水温によるメダカの雄化は、最終的にはエストロゲン量が増加しないことが原因である可能性が示唆された。

### (3) 濾胞刺激ホルモン受容体ノックアウトメダカの表現型解析

メダカ性分化時期において、XX 個体の生殖腺における fshr mRNA の発現量は、XY 個体に比べて明らかに高いが、高水温またはコルチゾル処理により有意に減少することが報告されている (Hayashi et al., 2010)。

そこで、Tilling ライブラリーから選別した FSHR-KO メダカ系統の表現型解析を行った。その結果、この系統の XY 個体はすべて正常な精巣を持っており妊性が確認されたが、XX 個体においては、10 尾中 1 尾は機能的な精巣を持っており、他の 9 尾は卵巣を持っていたが不妊であった (Murozumi et al., 2014)。これら XX 雌の生殖腺の組織学的観察を行ったところ、卵黄形成が阻害されていることが分かった。一方、FSHR-KO メダカの XX 個体の生殖腺における cyp19a1 mRNA の発現量及びエストロゲン量は、ともに野生型 XX 個体と比べて有意に減少していた (Murozumi et al., 2014)。これらのことから、FSHR-KO メダカの XX 個体は、エストロゲン量が増加しないことにより、一部の個体が雄化する一方、多くの個体が雌のままで卵黄形成が抑制されるのではないかと考えられた。

### (4) 卵巣型アロマトラーゼノックアウトメダカの表現型解析

CYP19A1-KO メダカ成魚の生殖腺を観察したところ、この XX メダカの生殖腺では、卵母細胞の退縮が確認され、一部では精子形成が進行していた。一方、この XY メダカの生殖腺では、野生型個体と同様に正常な精巣が観察された。さらに、CYP19A1-KO XX メダカの生殖腺を用いて免疫組織化学染色を行った結果、アロマトラーゼ抗体ではシグナルが検出されなかったが、GSDF 抗体では生殖腺体細胞においてシグナルが検出された。このように、メダカにおける卵巣型アロマトラーゼは、卵母細胞の維持に関与していることが示唆された。

### (5) GSDF 過剰発現メダカの表現型解析

GSDF 過剰発現 XX メダカは、すべての個体で正常な精巣を持っており妊性が確認された。また、孵化時期の生殖細胞数を計数した

ところ、GSDF 過剰発現 XX 個体では通常 XY 個体と同程度の数であり、通常 XX 個体に比べて減少していた。さらに、定量的リアルタイム PCR の結果、GSDF 過剰発現 XX 個体では、fshr や CYP19A1 mRNA の発現が抑制されていた。これらの結果から、GSDF 過剰発現 XX メダカは、高水温またはコルチゾル処理した XX メダカと同様な雄化パターンを示すことが分かった。

これらの結果から、高水温によるメダカの雄化は、高温ストレスにより上昇したコルチゾルが生殖腺での gsdf mRNA の発現を誘導した後、fshr や cyp19a1 mRNA の発現を抑制することにより引き起こされているのではないかと考えられた。今後は、コルチゾルがどのような分子機構で gsdf 発現を誘導するのか、gsdf がどのようなシグナル伝達経路を介して雄化を引き起こすのか等を解析する必要がある。

## 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) Murozumi N., Nakashima R., Hirai T., Kamei Y., Ishikawa-Fujiwara T., Todo T. and Kitano T. Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka.

*Endocrinology* (査読有), 155, 3136-3145 (2014).

(2) Shiraishi E., Hosseini H., Kang D.K., Kitano T. and Akiyama H. Nanosecond pulsed electric field suppresses development of eyes and germ cells through blocking synthesis of retinoic acid in medaka (*Oryzias latipes*).

*PLoS One* (査読有), e70670 (2013).

(3) Yazawa T., Kawabe S., Kanno M., Mizutani T., Imamichi Y., Ju Y., Matsumura T., Yamazaki Y., Usami Y., Kuribayashi M., Shimada M., Kitano T., Umezawa A. and Miyamoto K. Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells.

*Mol. Cell. Endocrinol.* (査読有), 369, 42-51 (2013).

(4) Obata S., Yuasa E., Seki D., Kitano T. and Saitoh H. Molecular cloning and bacterial expression of the catalytic domain of the SENP1 gene of *Oryzias latipes*.

*Biosci. Biotech. Biochem.* (査読有), 77, 1788-1791 (2013).

(5) Yamaguchi T. and Kitano T. High temperature induces cyp26b1 mRNA

expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder.

**Biochem. Biophys. Res. Commun.** (査読有), 419, 287-292 (2012).

(6) Kitano T., Hayashi Y., Shiraishi E. and Kamei Y. Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature.

**Mol. Reprod. Dev.** (査読有), 79, 719-726 (2012).

(7) Ohta K., Sakai M., Sundaray J.K., Kitano T., Takeda T., Yamaguchi A. and Matsuyama M. Bidirectional sex change induced by sex steroid implantation in the hermaphrodite fish, *Pseudolabrus sieboldi*.

**J. Exp. Zool. A** (査読有), 317, 552-560 (2012).

(8) Ansai S., Ochiai H., Kanie Y., Kamei Y., Goh Y., Kitano T., Yamamoto T. and Kinoshita M. Targeted disruption of exogenous EGFP gene in medaka using zinc-finger nucleases.

**Dev. Growth Differ.** (査読有), 54, 546-556 (2012).

〔学会発表〕(計 30 件)

(1) 北野健. (招待講演) 魚類における温度依存性性決定の分子機構. 第 37 回日本比較内分泌学会大会シンポジウム. 2012 年 11 月 30 日.

(2) 北野健. (招待講演) 温度依存性性決定の分子メカニズム. 平成 23 年度温熱生理研究会. 2011 年 9 月 2 日.

(3) 村上貴浩、高崎裕太、長船奈津美、高木久徳、井尻成保、山本卓、北野健. 卵巣型 aromatase ノックアウトメダカの作製とその表現型解析. 日本水産学会春季大会. 2015 年 3 月 28 日.

(4) 永田大生、木村武志、松川誠、内川拓、北野健. シカメガキにおける hsp70 の発現. 日本水産学会春季大会. 2015 年 3 月 28 日.

(5) Uchikawa T, Kobira H, Hirai T, Kitano T. Gonadal soma-derived growth factor suppresses the expression of follicle-stimulating hormone receptor in medaka. 10th International Symposium of on Reproductive Physiology of Fish, Portugal, 2014 年 5 月 27 日.

(6) Murozumi N, Nakashima R, Hirai T, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Kitano T. Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka. 10th International Symposium of on Reproductive Physiology of Fish, Portugal, 2014 年 5 月 27 日.

(7) 竹中亨彰、濱崎心、内村友哉、長船奈津美、高木久徳、佐久間哲史、山本卓、北野健. TALEN を用いたメダカの環境依存的性決定機構の解析. 第 4 回ゲノム編集研究会. 2014 年 10 月 6 日.

(8) 室積典和、中島良、平井俊朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健. 性分化時期における濾胞刺激ホルモン受容体機能欠損メダカの表現型解析. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月 28 日.

(9) 内川拓、小平博史、平井俊朗、北野健. メダカ gonadal soma-derived growth factor による濾胞刺激ホルモン受容体の発現抑制機構の解析. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月 28 日.

(10) 川辺敏晃、長船奈津美、白石絵吏、宮崎誠生、柳美穂、井上聖也、北野健. 体外培養したメダカ始原生殖細胞の遺伝子発現パターン解析. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月 28 日.

(11) Kitano T., Hayashi Y, Shiraishi E. High temperature and cortisol cause masculinization of genetically female medaka by suppression of cyp19a1 expression. 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, Spain, 2013 年 7 月 16 日.

(12) Uchikawa T, Kobira, Hirai T, Kitano T. Down-regulation of follicle-stimulating hormone receptor expression by gonadal soma-derived growth factor in medaka. 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, Spain, 2013 年 7 月 16 日.

(13) Shiraishi E, Kitano T. Generation of nanog-GFP transgenic medaka line. 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, Spain, 2013 年 7 月 16 日.

(14) Murozumi N, Nakashima R, Hirai T, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Kitano T. Loss-of-function of follicle-stimulating hormone receptor causes suppression of ovarian development in medaka (*Oryzias latipes*). 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, Spain, 2013 年 7 月 16 日.

(15) 内川拓、小平博史、平井俊朗、北野健. メダカ性分化における gonadal soma-derived growth factor による濾胞刺激ホルモン受容体の発現制御. 第 38 回日本比較内分泌学会大会. 2013 年 10 月 25 日.

(16) 内村友哉、田代真也、白石絵吏、矢澤隆志、北野健. メダカ副腎皮質ホルモン放出ホルモンの発現制御におけるヒートショックプロテインの関与. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 2013 年 3 月 28 日.

(17) 室積典和、中島良、平井俊朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健. 濾胞刺激ホルモン受容体の機能欠損はメダカ雌の性成熟を阻害する. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 2013 年 3 月 28 日.

(18)川辺敏晃、江祐紀、白石絵吏、宮崎誠生、柳美穂、井上聖也、北野健。平成 25 年度日本水産学会春季大会。2013 年 3 月 28 日。

(19)内村友哉、田代真也、白石絵吏、矢澤隆志、北野健。メダカにおける副腎皮質ホルモン放出ホルモンの発現制御機構の解析。第 37 回日本比較内分泌学会。2012 年 11 月 30 日。

(20)室積典和、中島良、平井敏朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健。濾胞刺激ホルモン受容体の機能欠損メダカの表現型解析。第 37 回日本比較内分泌学会。2012 年 11 月 30 日。

(21) Shiraishi E, Hosseini SHR, Kang DK, Kitano T. Effects of nanosecond pulsed power on gene expression in medaka. Bioelectrics 2012, Kumamoto, 2012 年 9 月 5-8 日。

(22)内川拓、小平博史、平井敏朗、北野健。メダカ濾胞刺激ホルモン受容体の発現制御機構の解析。平成 24 年度日本水産学会春季大会。2012 年 3 月 28 日。

(23)木寺智則、内川拓、白石絵吏、松田勝、井尻成保、北野健。GSDF はメダカ遺伝的雌の雄化を引き起こす。平成 24 年度日本水産学会春季大会。2012 年 3 月 28 日。

(24)亀井保博、浦和博子、木村英二、出口友則、伊藤真理子、北野健、尾田正二等。赤外線レーザーによる遺伝子発現システム (IR-LEGO) の様々なモデル生物への応用。第 34 回日本分子生物学会年会。2011 年 12 月 15 日。

(25)Ansai S, Gou Y, Kitano T, Ochiai H, Kamei Y, Yamamoto T, Kinoshita M. Targeted gene disruption in medaka using zinc-finger nucleases-knock out of GFP gene. 第 34 回日本分子生物学会年会。2011 年 12 月 15 日。

(26)北野健、林裕輝、白石絵吏。コルチゾルは高温によるメダカの雄化に関与する。第 36 回日本比較内分泌学会大会。2011 年 11 月 23 日。

(27)木寺智則、白石絵吏、松田勝、井尻成保、北野健。メダカにおける Gonadal Soma-Derived Factor(GSDF)の機能解析。第 36 回日本比較内分泌学会大会。2011 年 11 月 23 日。

(28)Kitano T, Hayashi H, Yamaguchi T, Shiraishi E. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol level. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011 年 8 月 9-12 日。

(29)Uchikawa T, Kobira H, Hirai T, Kitano T. Analysis of regulational mechanism of follicle-stimulating hormone receptor (fshr) expression using fshr-GFP transgenic medaka. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011 年 8 月 9-12 日。

(30)Uchimura T, Hayashi Y, Tashiro S, Shiraishi E, Kitano T. Analysis of genes regulated by high temperature in medaka. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011 年 8 月 9-12 日。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

北野 健 (KITANO TAKESHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号：40336219