

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：14503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570254

研究課題名(和文)鳥類の性決定遺伝子の機能解析と細胞系譜解析

研究課題名(英文)Functional analysis of avian sex determination gene and cell fate analysis

研究代表者

吉岡 秀文(Hidefumi, Yoshioka)

兵庫教育大学・学校教育研究科(研究院)・教授

研究者番号：40191548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類の性は性染色体(雄ZZ, 雌ZW)によって決定されている。しかしその分子機構はまだ不明なことが多い。未解決な問題として何が性決定をする遺伝子なのか。HINTZはZ染色体上にあり、雄で強く発現する。それに対してHINTWはW染色体にあり、雌でのみ発現する。これらの遺伝子機能を解析した。HINTZの過剰発現もしくはHINTWのノックダウンにより雄特異的遺伝子Sox9は誘導され、雌特異的遺伝子Aromataseは阻害された。このことからHINTZは雄性決定遺伝子としての働きをもつことが示された。

研究成果の概要(英文)：Sex in birds is chromosomally based (ZZ male, ZW female), but the mechanism underlying sex determination remains unknown. An unresolved question is what gene plays a role in avian sex determination. HINTZ is an avian Z chromosome-linked gene and shows higher expression in male gonads. Meanwhile, HINTW/ASW is a tandemly repeated gene conserved on avian W chromosome and its transcript is detected in female gonads. To investigate the roles of these genes in avian sex determination, we performed functional analysis by overexpressing these genes. The expression of gonadal marker gene and morphological change are analyzed. Overexpression of HINTZ and knock-down of HINTW on the left female gonads before sex determination induced up-regulation of male specific SOX9 expression and down-regulation of female specific Aromatase expression in the medulla. We conclude that HINT-Z is included in male sex determination and induced male-to-female sex reversal.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖腺 鳥類の性分化機構 性決定遺伝子 性染色体 DMRT1 HINTW/HINTZ aromatase Sox9

## 1. 研究開始当初の背景

次世代をつくるための機構は生物にとって基本原理の一つである。「性」は生物多様性を確保するためのしくみとして、進化してきた。その性分化の中心的役割を担っている「性決定遺伝子」は動物種によってさまざまであり、決して保存されているわけではない。

また、性染色体の遺伝子量補正はショウジョウバエ、線虫のような下等動物から哺乳類まで生物に広く保存されており、重要な機構であると教科書的には記述されている。しかしながら、鳥類やその他の動物においては、必ずしも性染色体の遺伝子量は保存されていないことが報告されている。そして、その分子的機構も全く不明である。動物における性分化の研究は哺乳類を対象とした研究が先行している。(A. Swain and R. Lovell-Badge *Genes & Dev.*, **13**, 755 - 767, 1999; A. Ross and B. Capel, *Trends in End. and Met.* **16**, 19-25, 2005) しかしながら、動物種に固有の性分化機構が確立されたため、哺乳類で得られた知見がそのまま鳥類に当てはまるものではない。(C. Smith and A.H. Sinclair *Bioassay* **26**, 120-132, 2004) 従って、鳥類の性決定機構は鳥類を対象に調べられなければならない。我々の初期の生殖腺予定領域に的確に細胞を移植する技術 (*Dev Biol.* 2005) は何年もの試行錯誤の上に確立したものであり、その技術と経験が本研究の遂行には不可欠である。SRY/Sryの発見者である英国のR. Lovell-Badge 研の関戸が電気穿孔法を使ってニワトリ生殖腺に遺伝子導入する方法を発表した。(*Dev. Biol.* 2006) 我々はその方法をさらに改良して、より初期胚に高効率で導入する方法を開発した。

ZW による性決定様式を採用する鳥類では W 染色体上に卵巣決定因子が存在するか、または Z 染色体上に遺伝子量依存的な精巣決定因子が存在すると考えられている。先

行研究により、ニワトリの性染色体上に位置する遺伝子が明らかになってきた。その結果、W 染色体に *HINTW*(histidine triad nucleotide binding protein W-linked) 遺伝子 (*Mol. Biol. Cell* **11**, 3645-3660, 2000) が、さらに Z 染色体上には *HINTZ* (histidine triad nucleotide binding protein Z-linked)、*DMRT-1* 遺伝子が同定された。

C. Smith らは *DMRT1* のノックダウンにより雄が雌化したことにより性決定遺伝子であると報告した。(nature 2009) しかしながら、*DMRT1* の過剰発現により雌が雄化することは示せなかった。このことは、まだ他の遺伝子が性決定遺伝子である可能性の余地があるものと考えられる。

また 2010 年にニワトリ 2 日胚を用いて、雄から雌、雌から雄に生殖腺予定領域を移植し、9 日胚で生殖腺での、細胞系譜と遺伝子発現様式を解析することにより、すでに、*DMRT* が発現する前の 2 日胚で既に性分化の決定がなされているという報告がなされた。(nature 2010) すでに 2 日胚で性決定がされていることが本当に事実なら、その時期には発現していない *DMRT1* が雄化の遺伝子であるという実験結果は説明できない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これらの遺伝子の機能解析を通じ、鳥類の性決定遺伝子を中心とした遺伝子カスケードを解明することをひとつの目的とする。

## 3. 研究の方法

*HINTW*, *HINTZ*, *Ad4BP/SF-1*, *DMRT1*, *FoxL2*, 遺伝子 や、それぞれの遺伝子に対する siRNA をニワトリ 2 日胚の生殖腺予定領域に電気穿孔法で導入し、性分化後の生殖腺の形態変化やマーカー遺伝子の発現解析により、生殖腺の体細胞の性分化の可能性を探る。

また、*lacZ* 遺伝子を体腔上皮細胞に遺伝子導入したり、中腎中胚葉細胞に蛍光色素を微小注入することにより生殖腺形成予定領域の細胞を特異的に標識し、計時的に細胞系譜を調べた。*HINTW*, *HINTZ*,

Ad4BP/SF-1,DMRT1 に対する特異的抗体を使い、生殖腺を形成する体細胞のうち、雌雄の支持細胞やステロイド産生細胞の系譜を解析することで、生殖腺の形成の機構を解明した。

#### 4. 研究成果

##### 1 切片化したニワトリ生殖腺における、各性分化因子の発現様式

まず、ニワトリ生殖腺において性分化因子 *SOX9*, *AROM*, *DMRT1*, *Ad4BP*, *HINTZ*, *HINTW* 遺伝子の発現を検出できる条件を予備的に検討した。それぞれの遺伝子に対応するプローブをフルオルセイン (FITC) またはジゴキシゲニン (DIG) でラベルの違いで蛍光の検出の有無が変わる場合があるため、その条件検討を行った。12日胚の雄と雌の生殖腺に対して *in situ* section hybridization 法で、mRNA の発現を蛍光で検出した。雄のマーカー遺伝子である *SOX9* は、前任者の研究で DIG ラベルのプローブを用いて検出することが最適条件であることが分かっている。そこで、今回は *AROM* との組み合わせを考えてこのプローブに緑の発色試薬を用いて検出した。それに対して雌のマーカー遺伝子である *AROM* は DIG もしくは FITC ラベルのプローブに赤の発色試薬を用いて検出した (Fig1)。*SOX9* については、雄の生殖腺の精細管で発現が見られた (Fig1, A)。*AROM* については、同じく雌の生殖腺の髄質で発現が見られた (Fig1, D,F)。この発現様式は今までの知見と一致して再現性があった。これらの結果から *AROM* の検出は DIG ラベルと FITC ラベルのプローブを用途に応じて使い分けることにした。雄の 3.5 日胚のみにおいて発現される *DMRT1* は、12 日胚の雄の生殖腺において FITC ラベルのプローブを用いたときに精細管での発現が見られた (Fig2, C)。一方、DIG ラベルのプローブでは、雄の生殖腺において精細管での発現が見られず (Fig2, A)、雌の

生殖腺との有意差も見られなかった (Fig2, B)。性分化前のオスと雌の生殖腺形成に関与する因子である *Ad4BP* は、雄の生殖腺において FITC と DIG ラベルのプローブのいずれを用いた場合でも精細管における発現が見られた (Fig2 E, G)。それに対して同じ露光時間で撮影した雌の生殖腺では FITC ラベルのプローブを用いた場合、髄質における発現が見られたが (Fig2 H)、DIG ラベルのプローブを用いた場合、発現が見られなかった (Fig2 F)。これらの結果から *DMRT1* と *Ad4BP* の検出は共に FITC ラベルのプローブを用いることにした。Z 染色体上に存在し、オスの生殖腺で優位に発現する *HINTZ* と W 染色体上に存在し、雌の生殖腺のみで発現する *HINTW* は *DMRT1* との組み合わせを考えて、これらのプローブに緑の発色試薬をかけて検出した (Fig3)。*HINTZ* については、雄の生殖腺において FITC と DIG ラベルのプローブの両方で、精細管における発現が見られた (Fig3 A, C)。それに対して、同じ露光時間で撮影した雌の生殖腺では FITC と DIG ラベルのプローブのいずれを用いた場合でも、発現がほぼ見られなかった (Fig3 B, C)。*HINTW* については、雌の生殖腺において FITC と DIG ラベルのプローブの両方で、髄質における発現が見られた (Fig3 F, H)。これらの結果から *HINTZ* と *HINTW* の検出は DIG ラベルと FITC ラベルのプローブを用途に応じて使い分けることにした。

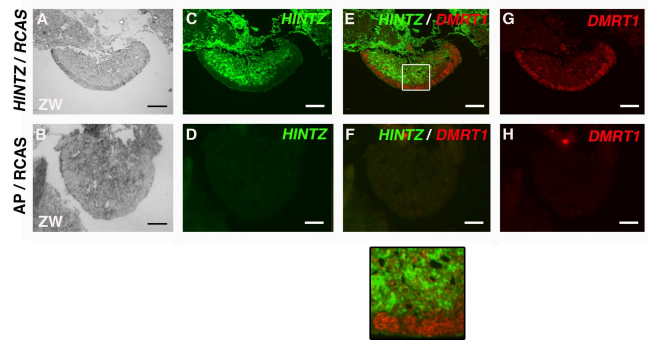
また、性分化因子の AMH と *AROM* に関してはそれらのタンパク質を標的化する市販の抗体が存在するため、mRNA の発現に伴ってタンパク質の発現もあるかどうかを抗体の濃度検討と合わせて実験した (Fig4)。すると、AMH タンパク質は雄の生殖腺の精細管において発現が見られた。*AMH* は雄だけに働く因子で *SOX9* と同様に雄のマーカー遺伝子として生殖腺の雌雄

判定に用いることができる因子であり、*SOX9* 遺伝子と同様の場所で発現することが分かった。また、*AROM* タンパク質は *AROM* 遺伝子と同様に雌の生殖腺の髄質において発現が見られた。

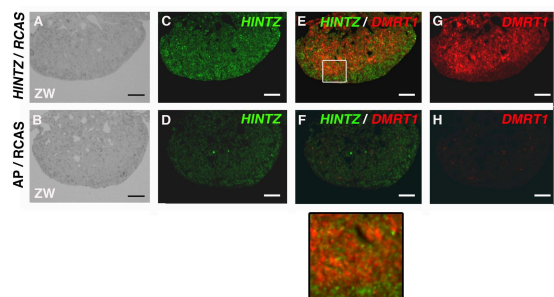
## 2 *HINTZ* を過剰発現させた雌のニワトリ生殖腺における、各性分化因子の発現様式

上記の実験において、雄の生殖腺と比べて雌の生殖腺では *HINTZ* 遺伝子はほとんど発現していないことが分かった (Fig3 B, C)。 *HINTZ* 遺伝子は Z 染色体の遺伝子量に依存しているのでは無く、雄の方が雌よりも有意に高い発現を示している。また、雄の生殖腺において *HINTZ* タンパク質はホモ二量体を形成することにより活性型として働くと考えられている。これらのことを踏まえて、*HINTZ* を雌の生殖腺において過剰発現させることによって、雌における *HINTZ* 同士の二量体形成を雌本来の *HINTZ* と *HINTW* との二量体形成より優位な状態にすると、各性分化因子の発現様式に通常雌の生殖腺との間で違いが生じるのではないかと考えた。そこで、雌の生殖腺において *HINTZ* を過剰発現させた際の各性分化因子の発現様式を調べるために、2 日胚の時にエレクトロポレーションを行い、*HINTZ* の cDNA 配列を組み込んだウイルスベクターを導入した 10 日胚の雌の生殖腺に対して *in situ* section hybridization 法で、mRNA の発現を二種類のプローブ (DIG or FITC) を用いて二種類の蛍光 (赤と緑) で検出した (Fig5~8 上段)。また対照実験として、アルカリフォスファターゼ (*AP*) の cDNA 配列を組み込んだウイルスベクターを導入した 10 日胚の雌の生殖腺に対して同様の検出を行った (Fig5~8 下段)。まず *HINTZ* と *DMRT1* の二種類の発現様式を調べた (Fig5-1, 5-2)。Z 染色体上にあり、雄優位に発現す

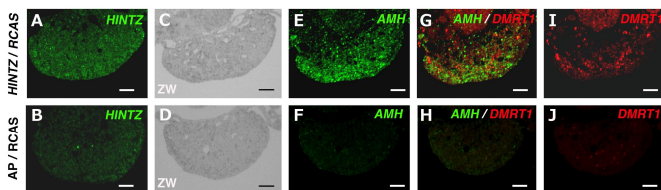
る *HINTZ* は *AP* を導入した雌の生殖腺では発現がほぼ見られなかった (Fig5-1 D)。それに対して *HINTZ* を導入した雌の生殖腺では、髄質で強い発現が見られた (Fig5-1 C)。一方、雄特異的に発現する *DMRT1* は *AP* を導入した雌の生殖腺では発現が見られない (Fig5-1 H)。それに対して *HINTZ* を導入した雌の生殖腺では、皮質で発現が見られた (Fig5-1 G)。そして、二つの発現はマージしていなかった (Fig5-1 E)。同様の実験を別個体の雌の生殖腺で行うと (Fig5-2)、雄優位に発現する



*HINTZ* は、*AP* を導入した雌の生殖腺では発現がほぼ見られなかった (Fig5-2 D)。それに対して *HINTZ* を導入した雌の生殖腺全体において強い発現が見られた (Fig5-2 C)。一方、雄特異的に発現する *DMRT1* は *AP* を導入した雌の生殖腺では発現が見られない (Fig5-2 H)。それに対して *HINTZ* を導入した雌の生殖腺では、髄質で発現が見られた (Fig5-2 G)。そして、二つの発現は Fig5-1 の実験と同様にマージしていなかった (Fig5-2 E)。これらの結果から雌の生殖腺での *HINTZ* 過剰発現により、*DMRT1* が間接的に発現誘導されることが分かった。次に *SOX9* と *DMRT1* は転



写因子であり、DMRT1の下流にSOX9の存在が想定されているので、それぞれの遺伝子が同一の細胞で発現しているのかどうかを調べた (Fig6-1, 6-2)。同一個体の別の切片での HINTZ の発現を、HINTZ と AP をそれぞれ導入した雌の生殖腺で見比べると前者において HINTZ が導入されていることが分かる (Fig6-1, 6-2 A, B)。雄のマーカー遺伝子である SOX9 は AP を導入した雌の生殖腺では発現が見られなかった (Fig6-1, 6-2 F)。それに対して HINTZ を導入した雌の生殖腺では、生殖腺全体で発現が見られ、やや皮質の発現が強かった (Fig6-1, 6-2 E)。一方、DMRT1 は Fig5-1 と同様に HINTZ を導入した雌の生殖腺において皮質での発現が見られた (Fig6-1, 6-2 I)。そして、二つの発現は皮質でマージした (Fig6-1, 6-2 G)。これらの結果から雌の生殖腺での HINTZ 過剰発現による DMRT1 の発現に伴って SOX9 が発現誘導されることが分かった。次に AMH と DMRT1 の二種類の発現様式を調べた (Fig7)。同一個体の別の切片での HINTZ の発現を、HINTZ と AP をそれぞれ導入した雌の生殖腺で見比べると、前者において HINTZ が導入されていることが分かる (Fig7 A, B)。AP を導入した雌の生殖腺では AMH の発現が見られなかった (Fig7 F)。それに対して HINTZ を導入した雌の生殖



腺では、生殖腺全体で発現が見られた (Fig7 E)。一方 DMRT1 は Fig4-2 と同様に HINTZ を導入した雌の生殖腺において髄質での発現が見られた (Fig7 I)。そして、二つの発現はマージしていなかった (Fig7 G)。これらの結果から雌の HINTZ 過剰発現により、AMH が間接的に発現誘導され

ることが分かった。次に SOX9 と AROM の二種類の発現様式を調べた (Fig8-1, 8-2)。同一個体の別の切片での HINTZ の発現を、HINTZ と AP をそれぞれ導入した雌の生殖腺で見比べると、前者において HINTZ が導入されていることが分かる (Fig8-1, 8-2 A, B)。SOX9 は HINTZ を導入した二個体の雌の生殖腺において、いずれも生殖腺全体に発現が見られ、やや髄質で強く発現していた (Fig8-1, 8-2 E)。一方、雌のマーカー遺伝子である AROM は HINTZ, AP を導入した雌の生殖腺ともに髄質において発現していた (Fig8-1, 8-2 I, J)。そして、二つの発現は髄質でマージした (Fig8-1, 8-2 G)。これらの結果から雌の HINTZ 過剰発現により、AROM の発現が抑制されることはないということが分かった。

### 3 HINTW をロックダウンさせた雌のニトリ生殖腺における、各性分化因子の発現様式

上記の実験により、雌の生殖腺での HINTZ 過剰発現によって各性分化因子の発現様式に変化が生じることが分かった。この結果は活性型である HINTZ タンパク質のホモ二量体が雌の生殖腺で多く生産され、本来雌の生殖腺で作られる不活性型の HINTZ タンパク質と HINTW タンパク質とのヘテロ二量体より優位に働くからであると推察できる。このことから、本来雌で発現される HINTW をロックダウンし、ヘテロ二量体を作ることができない状態にすると、各性分化因子の発現様式に通常の雌の生殖腺との間で違いが生じ、上記の HINTZ を過剰発現させた場合と同様の結果が得られるのではと考えた。そこで、雌の生殖腺において HINTW をロックダウンさせた際の各性分化因子の発現様式を調べるために、2 日胚の時にエレクトロポレーションを行い、HINTW の siRNA 配列を組

み込んだウイルスベクターを導入した 10 日胚の雌の生殖腺に対して in situ section hybridization 法で、mRNA の発現を二種類のプローブ( DIG or FITC )を用いて二種類の蛍光(赤と緑)で検出した( Fig9~10 上段)。また対照実験として、性分化因子に対して影響を及ぼさないランダム of the siRNA 配列を組み込んだウイルスベクターを導入した 10 日胚の雌の生殖腺に対して同様の検出を行った( Fig9~10 下段)。まず、*HINTW* と *DMRT1* の二種類の発現様式を調べた( Fig9 )。W 染色体上にあり、雌のみで発現する *HINTW* は、ランダム of the siRNA を導入した雌の生殖腺全体で発現が見られた( Fig9 D )。それに対して *HINTW* の siRNA を導入した雌の生殖腺ではノックダウンにより発現抑制された( Fig9 C )。一方、雄特異的に発現する *DMRT1* は *Random*, *HINTW* の siRNA を導入した雌の生殖腺ともに発現が見られなかった( Fig9 G, H)。これらの結果から、雌生殖腺の *HINTW* ノックダウンによって *DMRT1* は発現誘導されないことが分かった。次に *AMH* と *DMRT1* の二種類の発現様式を調べた( Fig10 )。雄のマーカー遺伝子である *AMH* は、ランダム of the siRNA を導入した雌の生殖腺で発現しない( Fig10 F)。それに対して、*HINTW* の siRNA を導入した雌の生殖腺全体で *AMH* の発現が見られた( Fig10 E)。一方 *DMRT1* は Fig9 と同様に、*Random*, *HINTW* の siRNA を導入した雌の生殖腺ともに発現が見られなかった( Fig10 I, J)。これらの結果から、雌生殖腺の *HINTW* ノックダウンによって *DMRT1* の発現誘導なしに *AMH* が発現誘導を受けることがわかった。

#### 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 1 件)

A genetically female brain is required for a regular reproductive cycle in chicken brain chimeras

*Nature Communications* 4, Article number:1372 doi:10.1038/ncomms2372

Fumihiko Maekawa<sup>1†</sup>, Miyano Sakurai<sup>1,2</sup>, Yuki Yamashita<sup>1</sup>, Kohichi Tanaka<sup>1</sup>, Kazutoshi Yamamoto<sup>3</sup>, Kazuyoshi Tsutsui<sup>3</sup>, Hidefumi Yoshioka<sup>4</sup>, Shizuko Murakami<sup>5</sup>, Ryo Tadano<sup>6</sup>, Tatsuhiko Goto<sup>6</sup>, Jun-ichi Shiraishi<sup>7</sup>, Takashi Bungo<sup>7,9</sup>, Teruo Maeda<sup>8,9</sup>, Masaaki Tsudzuki<sup>6,9</sup> and Hiroko Ohki-Hamazaki<sup>1</sup>.

〔学会発表〕(計 1 件)

分子生物学会 2013 (神戸)  
*HINTZ/HINTW* の鳥類の性分化カスケードへの関与 上田博司、吉岡秀文

〔図書〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉岡秀文 ( YOSHIOKA Hidefumi )  
兵庫教育大学 学校教育研究科 教授  
研究者番号：40191548

##### (2) 研究分担者

笠原 恵 ( KASAHARA Megumi )  
兵庫教育大学 学校教育研究科 准教授  
研究者番号：20243347