

## 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25年 6月 3日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870036

研究課題名（和文） トランスジェニック技術を用いたインドメダカ性決定遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the sex-determining gene in *Oryzias dancena* using transgenic techniques

研究代表者

竹花 佑介（TAKEHANA YUSUKE）

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・助教

研究者番号：60432093

研究成果の概要（和文）:

インドメダカY染色体上の性決定領域内には近傍遺伝子 *Sox3* の生殖巣特異的エンハンサーが存在し、この領域が性決定時期における *Sox3* の一過的発現を誘導することによって、精巣分化が開始されることが判明した。さらに、Y染色体上の *Sox3* を機能欠損させたXY個体は雌に性転換したところから、Y染色体上の *Sox3* が本種の性決定遺伝子であることが確かめられた。このことは、魚類と哺乳類で進化的に独立に、同じ遺伝子が性決定遺伝子として使い回されてきたことを示している。

研究成果の概要（英文）:

In this study, we identified the sex-determining locus of *Oryzias dancena* by positional cloning, and found that this region on the Y chromosome contains an enhancer that upregulates the *Sox3* specifically in gonads. Sex reversed phenotypes in transgenic fish and zinc-finger nuclease-induced mutants of the Y chromosomal *Sox3* allele all point its critical role in sex determination, suggesting that the neo-Y chromosome of *O. dancena* arose by co-option of *Sox3*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：性染色体・性決定遺伝子・遺伝子導入

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の性決定機構は極めて多様であるが、これまでに「性決定遺伝子」としての機能が証明された例は、哺乳類の *Sry* とメダカの *Dmy* など数例のみである。これらの遺伝子は共に転写因子をコードするが、異なる遺伝子ファミリーに属し、ターゲット遺伝子も

異なる。そのため、性決定の分子機構について、その多様性や共通性の程度はこれまでほとんど明らかにされてこなかった。したがって、性決定機構の多様化メカニズムを理解するには、新奇の性決定遺伝子を同定し、その分子機構を明らかにすることが重要である。メダカ属魚類の性決定機構は変異に富み、

XY 型と ZW 型の性決定様式が混在するだけでなく、性染色体も種によって異なる。さらに、*Dmy* はメダカとハイナンメダカ以外の近縁種に存在しないことから、他のメダカ属魚類は別の性決定遺伝子をもつと予想された。そこで申請者らは、メダカ属から新規の性決定遺伝子を同定するため、インドメダカについて性決定遺伝子のポジショナルクローニングを計画した。これまでに性決定遺伝子座の詳細な組換え地図作製、BAC クローンを用いた染色体歩行、BAC の全塩基配列決定を行い、性決定領域を約 140kb (X 染色体) および約 290kb (Y 染色体) の範囲に特定した (図 1)。しかしながら、遺伝子予測や比較ゲノム解析による遺伝子探索からは、この領域内に候補遺伝子を発見できなかったため、本領域が非

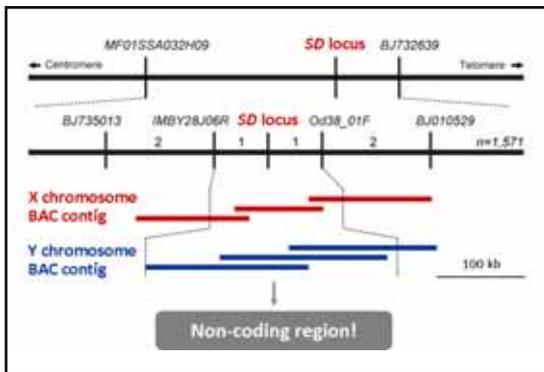


図 1. インドメダカ性決定領域の遺伝地図と物理地図

コード領域であると考えられた。次に、この領域をカバーする BAC クローンをすべて (15 クローン) 用いて遺伝子導入実験を行ったところ、性転換個体 (XX オス) を生じる遺伝子導入システムを 1 系統得た (IMBY64F09; 図 2)。このシステムに導入した BAC クローンは性決定領域とその外側領域を含み、この外側の領域には 1 つの遺伝子 (*SRY-box containing gene 3*; *Sox3*) が存在した。このことから、*Sox3* が本種の性決定遺伝子であり、生殖巣特異的遠位エンハンサーが Y 染色体の性決定領域内に存在することが示唆された。しかし、性転換が得られたのは 5 系統のうち 1 系統であり、このクローンが必要なエレメントを十分含んでいない可能性が示された。そこで本研究では、機能獲得実験および機能喪失実験を行って、*Sox3* の機能解析を行うことを目的とした。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、トランスジェニック技術を用いた機能獲得実験およびジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた機能喪失実験により、本遺伝子がインドメダカの性決定遺伝子であることを証明する。さらに、*Sox3* のターゲット遺伝子解析、および他の近縁種にお

ける *Sox3* の機能解析を行い、性決定機構の多様化メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

改変した BAC や強制発現用プロモーターを用いた機能獲得実験と、ジンクフィンガーヌクレアーゼを利用した遺伝子ノックアウト実験を行い、*Sox3* がインドメダカの性決定遺伝子であることを証明する。また、インドメダカの *Gsdf* についてレポーターアッセイを行い、*Sox3* が *Gsdf* の発現制御に直接関与しているかどうかを明らかにする。さらに、異なる性決定遺伝子をもつメダカやルソンメダカでも *Sox3* の機能獲得実験を行い、*Sox3* より下流の分子機構が近縁種間で保存されているかどうかを検討する。これらの実験から、メダカ属魚類における性決定遺伝子の多様化機構を解明する。

## 4. 研究成果

機能獲得実験については、*Sox3* 遺伝子から性決定領域内のエンハンサー領域までを十分含むと考えられる 240kb の BAC クローン (BAC240)、および本クローンの候補遺伝子領域を GFP に置換した BAC (BAC240GFP) を作製し、これらを導入したトランスジェニックシステムをそれぞれ 3 系統および 2 系統得ることができた。前者のトランスジェニックシステムすべてから性転換 XX オス個体が得られ (4/4)、後者からは全く得られなかったことから (0/2)、本遺伝子が性決定機能を有することが示された。

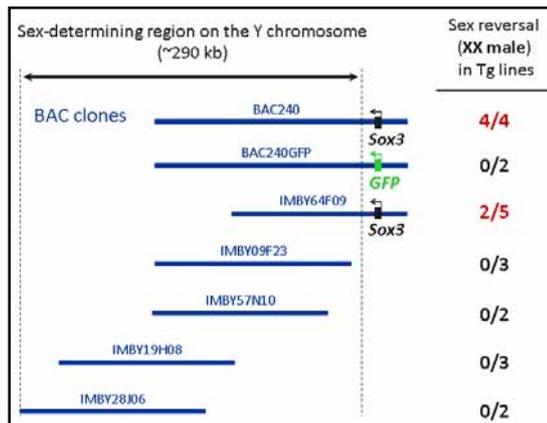


図 2. インドメダカ性決定遺伝子の機能獲得実験

また、本候補遺伝子の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析したところ、受精後 5 日胚の生殖巣体細胞で発現が認められた。上記の BAC240GFP 系統においても生殖巣で同様の GFP 蛍光を観察することができ、経時観察によって受精後 5 ~ 6 日が発現のピークであることが判明した。

これらの結果から、*Sox3* 遺伝子の一過的な発現によって精巢分化が開始されることが判明した。

機能喪失実験については、*Sox3* 遺伝子をターゲットとしたジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を設計し、この mRNA を 1 細胞期の胚に導入した。導入個体およびその子孫から挿入および欠失変異をもつ突然変異個体を複数得ることができ、そのすべてがフレームシフトを引き起こす機能欠損型の変異であることが判明した (図 3 a, b)。これらの変異体についてその表現型を解析したところ、Y 染色体上の *Sox3* を機能欠損した XY 個体はメスへ性転換することが明らかになった (図 3 c-j)。X 染色体上の *Sox3* 変異は性転換を誘導しなかったことから、Y 染色体上の *Sox3* が本種のオス決定遺伝子であることが確かめられた。これらの結果は、魚類と哺乳類で進化的に独立に、同じ遺伝子 (*Sox3*) が性決定遺伝子として使い回されてきたことを示しており、性決定遺伝子の進化を理解する上で極めて貴重な知見である。

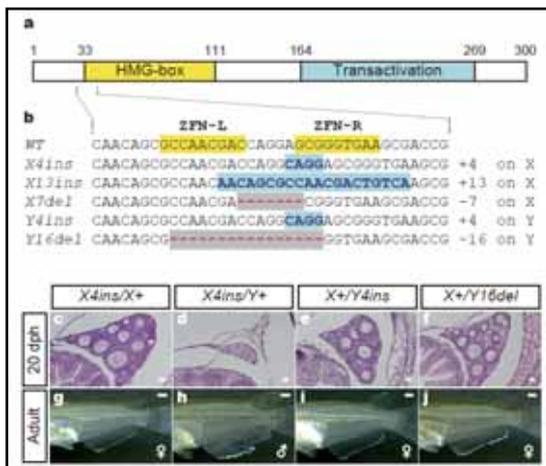


図 3 . インドメダカ性決定遺伝子の機能喪失実験

また、他のメダカ近縁種では、これまでに 2 つのオス決定遺伝子が同定されている (メダカの *Dmy* およびルソンメダカの *Gsdf*; 図 4)。

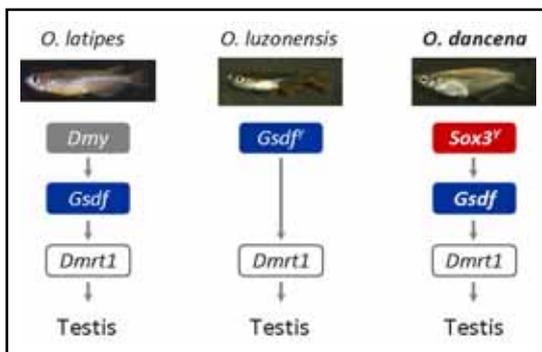


図 4 . メダカ属 3 種の性決定機構

インドメダカに *Dmy* は存在しないが、*Gsdf* はインドメダカでも XY 特異的に高発現していることが確認された。ルシフェラーゼアッセイの結果、*Sox3* と *Sf1* の同時トランスフェクションによって *Gsdf* のプロモータ活性が上昇することから、*Sox3* は *Gsdf* の転写制御を介して精巢分化を誘導していることが示唆された。これらの研究成果は、メダカ属では *Gsdf* が精巢分化の中心的役割を担っており、その転写制御因子の多様化によって異なる性決定機構が進化してきたことを強く示唆している。

#### 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 2 件)

Takehana Y, Naruse K, Asada Y, Matsuda Y, Shin-I T, Kohara Y, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the W chromosomes of medaka fishes. *Chromosome Research* 20 (2012) 71-81.

doi:10.1007/s10577-011-9259-7

Kato M, Takehana Y, Fukuda Y, Naruse K, Sakaizumi M, Hamaguchi S. An autosomal locus controls sex reversal in interspecific XY hybrids of the medaka fishes. *Heredity* 107 (2011) 523-529.

doi:10.1038/hdy.2011.38.

[学会発表] (計 7 件)

竹花佑介 . インドメダカ性決定遺伝子の同定 . 日本動物学会第 83 回大会 . 2012 年 09 月 13-15 日 , 大阪大学 (大阪) .

Takehana Y. Evolution of diverse sex determination mechanisms in the medaka fishes. 7th International Conference on Stickleback Behavior and Evolution. 29 July-3 August 2012, Seattle, USA.

Takehana Y. Independent evolution of sex chromosomes through recurrent use of *Sox3* in a medaka fish and mammals. The 58th/60th NIBB Conference, Germline -Specification, Sex, and Stem Cells-. 17-21 July, 2012, Okazaki, Aichi, Japan.

Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Different origin of sex chromosomes in the medaka fishes. The 8th Okazaki Biology Conference. 18-23 March, 2012, Okazaki, Aichi, Japan.

Takehana Y. Molecular phylogeny of the medaka fishes. A mini-symposium, "What is medaka? (from the biological point of view)". 29 January, 2012, Nagoya, Aichi, Japan.

Takehana Y., Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Turnover of sex chromosomes in the medaka fishes. National BioResource Project Medaka, The 1st Strategic Meeting for Medaka Research. 23-24 November, 2011, Okazaki, Aichi, Japan.

竹花 佑介 . メダカ属魚類における新規性決定遺伝子の進化機構 . 日本動物学会第82回大会 . 2011年9月21-23日, 旭川市大雪クリスタルホール (北海道旭川市).

〔図書〕(計1件)

Kimura T, Kamei Y, Takehana Y., Sasado T, Naruse K. Springer. Medaka genomics and the methods and resources for decoding genomic functions. In Genome Mapping and Genomics in Laboratory Animals, P. Denny and C. Kole, eds. (2012) 159-182.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹花 佑介 (YUSUKE TAKEHANA)  
基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・助教  
研究者番号 : 60432093

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :