

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570066

研究課題名(和文)生殖細胞が消失する突然変異メダカの組織学的解析とその原因遺伝子同定

研究課題名(英文) Histological analysis and identification of the gene responsible for a germ cell deficient mutant in medaka

研究代表者

松田 勝 (Masaru, Matsuda)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・教授

研究者番号：20414013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発生過程で生殖細胞の消失する変異体について、その生殖細胞がいつからどのように消失するのかを解析すると共に、染色体の位置情報を基に原因遺伝子の単離・同定を試みた。当初計画していた交配では原因遺伝子周辺の組換え個体をほとんど得られなかったため、交配系統を別の系統にしてその子孫を解析975個体したところ、34個体の組換え体を得ることができた。これらの子孫をさらに交配して解析した結果、XX個体においては孵化後5日の時点で生殖細胞が消失しているにもかかわらず、孵化後30日の時点では卵巣腔の形成されていることが明らかとなった。また、原因遺伝子領域を9万塩基対以内に絞り込む事に成功した。

研究成果の概要(英文)：A germ cell deficient mutant has no germ cells at 30 days after hatching stage. So, I analyzed when the germ cells were missing and I narrowed the chromosomal region located on the responsible gene. First, I searched recombinant progeny of the heterozygous mutant and the HNI strain, and found a few recombinants. Therefore, I mated heterozygous mutant with the Hd-rR strain and found 34 recombinants from 975 progeny. Since these recombinants were heterozygous, I performed mating experiment to obtain homozygous offsprings. Analyses of phenotypes of these homozygous offsprings narrowed the responsible region to 87 kb.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：メダカ 性分化 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、精子もしくは卵に分化する細胞で、唯一次世代に DNA を受け継ぐ細胞である。性決定遺伝子の同定されているメダカは日本で開発された実験動物であり、大きな種内変異を持つ近交系が存在するなどマウスに匹敵する実験動物としてのポテンシャルをもっており、ゲノムシーケンスも公開されている。性に関する研究も、XX-XY 型の性決定機構を明らかとした体色遺伝子の性連鎖 (Aida, 1921) の報告に始まり、性ステロイドホルモンによる性転換に関する研究 (Yamamoto, 1975) 哺乳類以外の脊椎動物で、最初の性決定遺伝子発見 (Matsuda et al, 2002)・同定 (Matsuda et al, 2007) と日本から世界に先駆ける研究がなされてきており、性決定・性分化の研究モデルとして最適な実験動物である。

また、メダカにおいて、Y 染色体特異的な性決定遺伝子は、具体的な機能は未知であるものの、生殖細胞周辺の体細胞で発現し、生殖細胞数の雄特異的な分裂抑制に関与していること (Paul-Presanth et al, 2006) から、生殖細胞の分裂活性に影響していると考えられる。また一方で、生殖細胞と生殖腺分化との関係を示す報告もある。例えば、生殖細胞を初期の段階から欠いた場合、この個体の生殖腺は、遺伝的に関係なく (遺伝的雌でも) 精巢型に分化する (Kurokawa et al, 2007)。逆に、生殖細胞が異常増殖した突然変異個体では、遺伝的雄の生殖腺は卵巢型へと分化する (Morinaga et al, 2007)。これらの結果は、正常な精巢や卵巢の形成には、体細胞と生殖細胞との連携が重要であることを示唆している。

本研究で解析するのは、応募者の発見した突然変異体 (*gcl*) 系統である。この変異体は、誘発突然変異体ライブラリーを用いて他の遺伝子の変異体を解析している過程で、偶然発見された生殖細胞が消失するメダカ変異体である。正常発生において、孵化後 30 日の生殖腺では、多数の生殖細胞が観察され、雌では肥大した卵母細胞が観察できる。一方、この突然変異体では、生殖細胞が見当たらないか、少数の卵母細胞が観察された。また、この形質は、メンデル遺伝し、その遺伝様式から劣性の対立遺伝子であると推察できた。これらのことから、このメダカは生殖細胞の維持に関わる何らかの遺伝子に突然変異が導入された突然変異メダカであると考えられる。

しかしながら、この原因遺伝子近傍の *Dmrt1* に変異が導入されおり、この変異 *Dmrt1* 対立遺伝子をホモに持つ XY 個体は、卵巢を発達させ雌に分化する (Masuyama et al, 2012) ため、XY 個体 (未分化生殖腺が精巢に

分化した時) の表現型は不明であった。

2. 研究の目的

生殖細胞の消失する原因となっている遺伝子を *gcl* とした場合、本研究開始時の変異体では、*gcl* の座乗している染色体に *Dmrt1* の変異対立遺伝子が座乗しているため、*Dmrt1* の変異体の表現型と *gcl* の変異体の表現型とを区別できない。そこで、まず *Dmrt1* と *gcl* との間の組換え個体を得て、生殖細胞が消失する *gcl* 突然変異体の表現型を明らかにする。どの時期にどのような過程で生殖細胞が消失するのかを組織学的に観察することで、生殖腺の体細胞と生殖細胞とが精巢型に分化しているのかそれとも卵巢型に分化しているのかを調べる。さらに、遺伝的背景の異なる系統に交配して組換え個体を得る事で、その責任領域を絞り込み最終的に原因遺伝子の単離・同定を目指した。

3. 研究の方法

原因遺伝子同定に向けた遺伝的地図の作成と共に生殖細胞の消失過程を解明するために組織学的な解析を行った。

ゲノム情報を元に *Dmrt1* 周辺の DNA マーカーを構築した。遺伝的背景の異なる系統間で比較する方が、DNA マーカーの構築が容易であるので、まずは生殖細胞を消失する突然変異体系統と遺伝的背景の大きく異なる HNI 系統との間で有効な DNA マーカーを構築し、組換え個体の探索を行った。

交配 : 組換え個体探索

(*gcl* x HNI) F₁ 同士を交配し、上記 DNA マーカーを用いて組換え個体を探索した。

交配 : 組換え個体探索

(*gcl* x Hd-rR) F₁ 同士を交配し、上記 DNA マーカーを用いて組換え個体を探索した。

交配 : 上記で得られた組換え個体の表現型を解析するための交配

組換え個体 (*gcl*/+) x Hd-rR(+/+)

F₁(*gcl*/+) x F₁(*gcl*/+)

F₂: (*gcl*/*gcl*), (*gcl*/+), (+/+) を比較

4. 研究成果

遺伝的背景の異なる HNI 系統の核ゲノムと突然変異体の発見された Cab 系統の核ゲノムとの間の遺伝的違いは 2-3% であり、遺伝的マーカーを得る目的には最適であると考え

られた(交配)。この HNI との交配で得た子孫 995 個体を調べたところ、*Dmrt1* と原因遺伝子 *gcl* との間での組換え個体を 2 個体得る事はできたものの、これらの個体はいずれも *gcl* 領域は野生型となっていたため、これ以上の解析は不可能であった。

そこで、Cab 系統に近縁な Hd-rR 系統との間で子孫を得て組換え個体を探索した(交配)ところ、多くの組換え個体を得る事ができた。具体的には、995 個体の子孫の遺伝子型を解析することで、34 個体の組換え個体を得た。このうち、*Dmrt1* 領域が野生型で、*gcl* 領域がヘテロとなった組換え個体を選別した。次に、これら選別された組換え個体同士、もしくは、Hd-rR 系統と交配して得た戻し交配世代同士を交配して得た子孫、またはその戻し交配世代を親個体と交配した子孫の遺伝子型とその表現型と調べる(交配)事で、原因遺伝子の責任領域を絞り込んだ。また、上記交配により得た子孫の原因遺伝子周辺の遺伝子型を解析すると共に、遺伝的性別、生殖腺の組織学的解析をそれぞれの交配系統ごとに行うことにより、原因遺伝子がホモの発生過程の表現型を確認した。

この結果、原因遺伝子の責任領域を 9 万塩基対以内(約 87kbp)にまで絞り込むことができた。一方、孵化後 5 日の生殖腺において生殖細胞の消失する表現型がすでに表れていることが明らかとなった。また、これまで不明であった、生殖腺が精巢型に分化した場合の(XY 個体における)表現型が明らかとなった。すなわち、未分化生殖腺が精巢に分化した場合でも生殖細胞は消失することが明らかとなった。一方、XX 個体の生殖腺は生殖細胞が消失しているものの、卵巣腔の形成は行われることが明らかとなった。

現在、絞り込まれた領域内での組換え個体を得られているので、今後その子孫の表現型解析により、より原因遺伝子領域を絞り込む事が可能となり、原因遺伝子同定にむけて大きな手がかりを得る事ができた。

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 3 件)

Gladys FM, Matsuda M, Lim Y, Jackin BJ, Imai T, Otani Y, Yatagai T, Cense B., 2015. Developmental and morphological studies in Japanese medaka with ultra-high resolution optical coherence tomography. Biomedical Optics Express 6, 297-308. 査読有
DOI: 10.1364/B0E.6.000297

Watanabe K, Koga H, Nakamura K, Fujita A, Hattori A, Matsuda M, Koga A, 2014. Spontaneous germline excision of *Tol1*, a DNA-based transposable element naturally occurring in the medaka fish genome. Genome 57, 193-199. 査読有
DOI: 10.1139/gen-2014-0011

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
DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.01.019

〔学会発表〕(計 11 件)

Matsuda M (2014) Evolution of the sex-determining gene in fish. International Conference on Frontiers in Comparative Endocrinology and Neurobiology, Hyderabad, India, 2014 年 11 月 25-28 日

佐藤忠, 今井拓人, 松田勝, 酒泉満, 濱口哲 (2014) XX メダカの性転換誘導における性決定関連遺伝子 *Gsdf* の役割. 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月 11 日-13 日.

Imai T, Saino K, Matsuda M (2014) The involvement of *Gsdf* in sex determination of the medaka, *Oryzias latipes*. 2nd Strategical Meeting for Medaka Research. Seville, Spain, April 10-12, 2014.

Gladys FM, Lim Y, Matsuda M, Cense B (2013) In-vivo OCT imaging of Medaka fish. Optics & Photonics Japan 2013, Nara, Japan, 12, November 2013.

今井拓人, 齊野兼太郎, 松田勝 (2013) *Gsdf* の変異は XY メダカを雄へと性転換させる. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 2013 年 9 月 26-28 日.

Imai T, Saino K, Matsuda M (2013) *Gsdf* mutation causes a male-to-female sex reversal in the medaka, *Oryzias latipes*. 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Sendai, Japan, September 20 - 21, 2013.

Gladys FM, Lim Y, Matsuda M, Cense B (2013) Non-invasive in vivo 3D imaging of medaka using ultra high resolution spectral domain optical coherence tomography. 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Sendai, Japan, September 20 - 21, 2013.

齊野兼太郎, 今井拓人, 増山治男, 松田勝 (2013) *Gsdf* 遺伝子破壊メダカの作出. 日本動物学会第 65 回関東支部大会, 東京工業大学, 2013 年 3 月 16 日.

齊野兼太郎, 増山治男, 松田勝 (2012) 人工制限酵素を用いた性分化関連遺伝子の破壊. 第 2 回宇都宮大学オプト-バイオシンポジウム, 宇都宮, 2012 年 12 月 12 日.

今井拓人, 松島美喜子, 松田勝 (2012) XX 性転換変異体メダカの解析. 日本動物学会第 83 回大会, 大阪大学豊中キャンパス, 2012 年 9 月 13-15 日.

Matsuda M (2012) *Dmrt1* mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *6th International Symposium on Vertebrate Sex Determination* Kona, Hawaii, USA, 2012 年 4 月 23-27 日.

〔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・教授

研究者番号：20414013