

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570070

研究課題名(和文)野生メダカ由来性転換系統を用いた性決定/分化制御機構の解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of the sex-determining cascade of medaka, *Oryzias latipes*, using sex-reversals identified in wild populations.

研究代表者

濱口 哲 (Hamaguchi, Satoshi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20126444

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)：メダカの性は雄決定遺伝子Dmyの存否で決まるが、野生メダカにはXY雌、XX雄が約1%の割合で存在する。本研究ではDmyの始まる性決定機構を解明することを目的に、それら突然変異の原因探求を行った。本研究期間に、1)新潟県白根野生集団中のXY は4番染色体上の遺伝子の変異とDmyの変異によりDmyの発現低下がおり雌になること。2)仙台のXY はDmy自身の発現調節領域の変異で発現量が低下し性転換すること、3)平戸のXX はDmyの下流で働いている遺伝子GsdgがDmy無しに発現することにより雄になることが判明した。野生メダカ中の変異体の解析は、性決定機構解明に重要な情報を提供することが分かった。

研究成果の概要(英文)：The sex determining gene of medaka was identified as Dmy in 2002, but the molecular mechanism of the downstream of Dmy has not been clarified so far. In wild population of medaka, we can find 1% of XX-male or XY-female. By analysing the causal genes of these sex-reversals, we can expect to identify new genes related to the sex determination. In the present study, we investigated three mutants, XY female from Shirone (Niigata Pref.), XY female from Sendai (Miyagi Pref.), and XX male from Hirado (Nagasaki Pref.). In the XY female from Shirone, some mutations on Dmy and a gene on chromosomes 4 were involved in the down regulation of Dmy expression. XY female from Sendai resulted from some mutation on the promoter region of the Dmy. XX male from Hirado had a mutated Gsdg, a downstream gene of Dmy, which can exhibit high expression without Dmy. These results ascertain that wild populations of medaka present us important key of the door to the sex determining cascade of this fish.

研究分野：発生生物学

キーワード：メダカ 性決定 性分化 野生 突然変異 Dmy Gsdg

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは 2002 年にメダカの性決定遺伝子 *Dmy* の同定に成功した。脊椎動物の性決定遺伝子はその当時はほ乳類で性決定遺伝子 *Sry* が同定されていたが、*Dmy* は脊椎動物で 2 番目に見つかった性決定遺伝子であった。ほ乳類の *Sry* はほとんどのほ乳類共通のものであったが、*Dmy* は魚類全体はおろか、メダカ属魚類ですら共通の性決定遺伝子ではなく、メダカの性決定遺伝子はきわめて変わりやすいものであると思われた。また、性を決めるといことは、種の存続にとってきわめて重要な機能であり、進化の過程で保存性の高いものであることが予測されるにもかかわらず、その引き金を引く遺伝子が多様であることは非常に興味深いことであり、*Sry* あるいは *Dmy* に始まる性決定分子機構(カスケード)の全貌を明らかにして、どの部分が保存的であり、どの部分が多様であるかを検討することは動物の性決定機構全体を俯瞰する上で興味深いものであるが、性決定カスケードについての情報はきわめて限られていた。

そこにブレークスルーを作るために、我々は 2 つのメダカの特徴を生かした研究戦略により研究を進めてきた。一つは野生メダカ集団中の性決定に関連する突然変異体を解析して、その原因遺伝子を特定、それらの情報を組み合わせて *Dmy* に始まる性決定機構を明らかにしようというものであり、もう一方は「進化の実験の跡をたどる」、つまりメダカ近縁種の性決定遺伝子を同定し、系統関係を踏まえてそれらの関係を明らかにしようというものである。本研究はその前者の研究戦略上のものである。

2. 研究の目的

メダカの性決定遺伝子 *Dmy* の発見以来、野生メダカ集団から得た性転換個体 (XY♀, XX♂ : 自然突然変異体) の原因遺伝子解析による新規性分化関連遺伝子の探索を進めている。本

研究は、宮城県仙台市の野生メダカ集団から得られた XY♀ が *Dmy* の下流の雄分化カスケードの遺伝子の変異による可能性が示唆されたことから、その原因遺伝子を同定して、性決定カスケード上の位置づけを明らかにすることを目的としている。

併せて、同様に野生集団中に認められる XY♀ あるいは XX♂ の解析を進める。XY♀ としては新潟県白根で見いだされたものが本研究室で系統化されており、XX♂ としては長崎県平戸、栃木県市貝など数カ所のもので遺伝的に安定して性転換個体が得られている。

本研究では、原則として、遺伝学的方法(連鎖解析)により性転換に関与する遺伝子を探索するとともに、性決定関連遺伝子の発現解析を含む、性転換過程の解析をもとに、性転換に関わる遺伝子がどのような機能を持っているかを検討する。本研究を通じて、メダカの *Dmy* に始まる性決定機構に一端が明らかになることを期待している。

3. 研究の方法

1) 遺伝解析(原因遺伝子のポジショナルクローニング) 野生由来の性転換個体を近交系と交配し、その F1 あるいは BC1 世代の性転換個体の持つ野生系統由来遺伝子部分の特定から、性転換に関わる遺伝子の同定を目指す。

2) 突然変異系統の性分化過程の解析 系統化した野生由来突然変異系統について、発生過程の形態学的解析から、どのような経過を経て性転換が起こるかを観察するとともに、性決定関連遺伝子である *Dmy*, *Gsdf*, *Scp3*, *Figa* の発現解析を行い、その正常発生からの逸脱の経緯を検討する。

4. 研究成果

1) 宮城県仙台野生集団由来の XY♀ の解析

仙台 XY* では雌雄両者が出現することから、*Dmy* が完全に機能を失っていない変異であると考えられ、これまでの研究ではその発現

低下は認められないこと、Y*Y*個体にも性転換個体が出現することから、その原因は*Dmy*タンパク質の致命的な変異や単純な発現低下ではないと推定されてきた。

原因遺伝子のマッピングを目的に、HNI系統との交配で得られたF3世代のXY*♀とY*Y*雄との交配から得られたF4個体の解析を行った。その結果、XY*個体およびY*Y*個体では雌雄がおおよそ同数出現することが確認された。さらに、F4世代個体の生殖巣の発生過程の組織学的解析から、XY*個体はふ化後5日目では既に雌方向に分化を始めており、その後ふ化後30日までに明確に雄に分化する個体と雌に分化する個体が区別できることが明らかになった。つまり、この性転換に関わる原因因子は性決定/性分化の極めて初期過程に関わっていると推定された。雄分化に関わる遺伝子の発現状況を孵化0日で確認を試みたところ、過去の結果と異なり、*Dmy*、*Gsdf*ともにほとんど発現が認められないことが判明し、この突然変異による性転換は*Dmy*の発言量の低下を介して生じることが明らかになった。さらに、交配を継続し、F9世代および、F10世代をえたところ、ほとんどの個体が雌になった。この間の交配で、*Dmy*以外のほとんどの染色体領域は近交系と交代していると考えられることから、原因は仙台の野生メダカが持っていた*Dmy*そのものにあると推定できた。プロモーター領域の何らかの変異により、他の遺伝子との不適合で発現低下が起こると考えられるが、その原因となる変異の特定は今後の課題である。

2)新潟県白根野生集団由来のXY♀

白根野生集団由来の性転換は、性分化期初期からXYでありながら♀方向に分化すること、*Dmy*および*Gsdf*の顕著な発現低下が認められることから、何らかの原因による*Dmy*の発現低下が性転換を引き起こしていると推定された。その後の交配から、この性転換には野生集団中の性転換個体由来の*Dmy*と4番染色

体上の遺伝子(*sda-2*)が必須であることが判明し、この*sda-2*が*Dmy*と何らかの相互作用して発現低下を引き起こすことが推察できた。

*Sda-2*を同定することにより、*Dmy*の上流の制御機能に迫ることが期待できるとともに、*Dmy*そのものの変異を特定することにより、*Dmy*の発現調節に関わる領域を明らかにすることが期待できる。

3)長崎県平戸野生集団由来のXX♂

長崎県平戸で見いだされたXX♂は交配実験から優性で働く♂化遺伝因子であることが明らかになった。性分化過程の観察からは、♂方向への分化は通常の性分化過程とほぼ同様の時間経過で生じていること、♂分化のマーカーであり、*Dmy*直下で誘導されると考えられている*Gsdf*の高発現が認められることが判明した。BC127個体を用いた連鎖解析結果からは、原因遺伝子は12番染色体のマーカーが連鎖すること、さらに多数個体を用いたファインマッピングから12番染色体上の*Gsdf*そのものが原因である可能性が高いことが判明した。メダカの近縁種であるルソンメダカでは、祖先は*Dmy*を性決定遺伝子としていたと推定されるが、現在は*Dmy*無しに高発現する*Gsdf*が性決定遺伝子であることが知られている。平戸の♂化遺伝子は、ルソンメダカで起こったと同様の変異が平戸の野生集団中の個体で生じたものと思われ、種分化に伴って生じた性決定遺伝子の多様化がメダカの野生集団で現に起こっていると考えられる例で、きわめて興味深い。*Gsdf*高発現の分子機構の解明を目指して、プロモーター領域のヌクレオチド配列の詳細解析を現在行っている。

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 4 件)

1. Takehana Y., Matsuda M., et al. (13人中11番目) Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias*

- dancena*. Nature Communications
DOI: 10.1038/ncomms157 (2014) 査読有り
2. Kikuchi K., Hamaguchi S. Nobel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics* 242 339-353 (2013) 査読有り
 3. 菊池 潔、濱口 哲 魚類性決定遺伝子の多様性と進化 *細胞工学* 32, 164-169 (2013) 査読なし
 4. Myosho T., Otake H., et al. (9人中8番目) Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191, 163-170 (2012) 査読有り
- [学会発表](計 14 件)
1. 堀江好文、明正大純、佐藤忠、酒泉満、濱口哲、小林亨 メダカにおけるXX性転換誘起機構 日本動物学会第85回大会 仙台 2014年9月13日
 2. 明正大純、濱口哲、酒泉満 Sox3がマーマラタスメダカの性決定遺伝子の有力候補である。 日本動物学会第85回大会 仙台 2014年9月11日
 3. 永井宏明、富井充、佐藤忠、明正大純、濱口哲、酒泉満 ハイナンメダカとメダカの雑種を用いた性転換原因遺伝子の探索 日本動物学会第85回大会 仙台 2014年9月11日
 4. 大坪沙都希、佐藤忠、明正大純、酒泉満、濱口哲 長崎県平戸産XX♂変異体の性転換原因遺伝子の探索 日本動物学会第85回大会 仙台 2014年9月11日
 5. 佐藤忠、今井拓人、松田勝、酒泉満、濱口哲 XXメダカの性転換機構における性決定遺伝子 *Gsdf* の役割 日本動物学会第85回大会 仙台 2014年9月11日
 6. Hamaguchi S., Myosho T., Yoshida K., Takahashi H., Sakaizumi M. The diversity of *Oryzias* fishes in Sulawesi Island and their potentials for biological studies: evolution in karyotype, osmoregulation, and sex chromosome. 4th International Symposium of *Oryzias* Fish Hasanuddin University, South Sulawesi, Indonesia 2013年10月9日
 7. 佐藤忠、小池由麻、酒泉満、濱口哲 新潟県長岡産野生メダカ由来XX♂の発生遺伝学的研究 日本動物学会第84回大会 岡山 2013年9月26日
 8. 永井宏明、佐藤忠、富井充、濱口哲、酒泉満 (ハイナンメダカ♀×メダカ♂)F1XY個体の性転換機構 日本動物学会第84回大会 岡山 2013年9月26日
 9. 佐藤未来、佐藤忠、酒泉満、濱口哲 新潟県白根産XY♀メダカ性転換関連遺伝子 *Sda-2* の機能の検討 日本動物学会第84回大会 岡山 2013年9月26日
 10. 明正大純、松田勝、濱口哲、酒泉満 ルソンメダカ♂分化には *GsdfY* が必要である。 日本動物学会第84回大会 岡山 2013年9月26日
 11. 福田弥生、佐藤忠、竹花佑介、明正大純、酒泉満、濱口哲 雑種性転換 *Hml* を含むメダカBACcloneはハイナンメダカにXY性転換を誘導する 日本動物学会第83回大会 大阪 2012年9月13日
 12. 富井充、明正大純、濱口哲、酒泉満 性染色体の異なる2系統のハイナンメダカを用いた新規性決定遺伝子の探索 日本動物学会第83回大会 大阪 2012年9月13日
 13. 明正大純、竹花佑介、濱口哲、酒泉満 メダカ属は2度 *Gsdf* が性決定遺伝子に進化した 日本動物学会第83回大会 大阪 2012年9月13日
 14. Hamaguchi S. Sex determining gene is not conserved in *Oryzias* fishes with homomorphic chromosome. Sixth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination Kona Hawaii, USA 2012年4月25日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口 哲 (HAMAGUCHI SATOSHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20126444

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：