

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07465

研究課題名(和文) 生殖腺性転換の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of gonadal sex reversal

研究代表者

松田 勝 (Matsuda, Masasru)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で用いた一つの遺伝子の欠損で性転換する遺伝子破壊メダカは、精巣特異的に発現する(働く)遺伝子の機能不全により、遺伝的雄の生殖腺は、発生初期には精巣方向に分化が進むものの途中で卵巣方向への分化へと切り替わる。本研究ではこの性分化の切り替え時に発現変動する遺伝子群を網羅的に解析するために、野生型の孵化稚魚と遺伝子変異をホモに持つ孵化稚魚に発現する遺伝子群を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析することで、正常な性分化や遺伝子欠損による性転換時に遺伝子発現の変動する遺伝子群を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの脊椎動物の性別は遺伝的に決められているものの、魚類では自然に性転換したり、人為的に性転換を誘導できる種が多い。ほ乳類では不可能な性分化途中での性転換の機構を生殖腺の可塑性の大きな魚類をモデルに解明していくことで、精巣や卵巣の形成・維持において、動物に共通な分子機構を明らかにするとともに、動物の性決定・性分化の共通性や普遍性の理解に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a gene knockout medaka that causes sex reversal due to dysfunction of testis-specific genes. This XY gonad differentiate toward the testis in the early stage of development, but switch to the ovary in the middle of development. In order to analyze the genes whose expression changes during this sexual differentiation, we used a next-generation sequencer. We compared mRNA expression among wild-type XX and XY, and mutant XX and XY. As a result, we identified genes whose expression changes during normal sex differentiation or sex reversal due to gene dysfunction.

研究分野：魚類発生遺伝学

キーワード：メダカ 性決定 性分化 性転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの生物は有性生殖を行い、減数分裂を経た配偶子を混ぜることで、種の多様性を生み出している。動物の配偶子は雄では精子、雌では卵であり、それらを形成するための「場」が精巣と卵巣である。精巣もしくは卵巣に分化することのできる未分化生殖腺は、始原生殖細胞と体腔上皮細胞由来の体細胞から構成されている。始原生殖細胞は、将来生殖腺が形成される場所とは離れた場所で生じ、細胞自立的に予定生殖腺領域に移動してきて生殖腺を構成する体細胞に取り囲まれる。その後、生殖細胞は、雄では精原細胞、雌では卵原細胞へと分化する。一方、生殖腺体細胞は雄ではセルトリ細胞とライディッヒ細胞へ、雌では顆粒膜細胞と莢膜細胞へと分化する。このように未分化生殖腺から精巣と卵巣がそれぞれ形成されることは多くの動物に共通の現象である。しかし、未分化生殖腺から精巣や卵巣がそれぞれ形成される際にどのような遺伝子がどのように働いているのかという生殖腺性分化の分子機構については、ほ乳類について知見が得られ始めているものも未だよく分かっていない。

メダカは、性決定・性分化の研究モデルとして最適な実験動物であり、日本から世界に先駆ける研究がなされてきた。私たちは、脊椎動物 2 番目となる性決定遺伝子の同定 (Matsuda et al. 2002, 2007) に始まり、メダカ近縁種 (ルソンメダカ、インドメダカ) の性決定遺伝子同定 (Myosyo et al. 2012, Takehana et al. 2014) を通し、魚類の性染色体間には、ほとんど差のないことを明らかにしてきた。つまり、雄のゲノムと雌のそれとの間にほとんど差がないということである。この事実こそが、自然性転換する種の存在や、完全な性転換誘導が可能であるなど魚類の生殖腺性分化における、哺乳類と比較した場合の大きな可塑性の遺伝的基盤となっている。一方、魚類の性転換に関する研究もメダカを用いた研究が世界牽引してきた。1950 年代の山本時男による性ステロイドホルモンによる性転換に関する研究 (Yamamoto 1953) に始まり、近年では高温で誘導される性転換の原因がストレス応答ホルモンであるコルチゾールに依ることが示されている (Kitano et al. 2012)。

一方、誘発突然変異による遺伝子破壊個体の探索や最近のゲノム編集技術により性分化に関連した遺伝子の機能を破壊した場合に性転換が起こることもわかってきた。*dmrt1* や *gsdf* 遺伝子は、遺伝的雌を雄へと性転換させた場合に発現が上昇することからも精巣分化に重要であると考えられている。これらの遺伝子破壊メダカを応募者らは作出し、これらの XY メダカが性転換することを示した (Masuyama et al. 2012, Imai et al. 2015)。しかし、その性転換パターンは少し異なる。すなわち、*dmrt1* 破壊 XY メダカの生殖腺は、孵化 5 日までは精巣方向へ分化するが、10 日には卵巣方向へと分化転換していた (Masuyama et al. 2012)。一方、*gsdf* 破壊メダカのそれは、最初から卵巣方向へと分化が進むが、その後 (孵化後 5 日以降) 一部 (約 2/3) の個体は精巣へと分化転換していた (Imai et al. 2015)。

2. 研究の目的

正常発生と比較して遺伝子変異による性転換時にどのような遺伝子が発現変動するのかを把握するために、本研究では、性分化途中での性転換の機構を生殖腺の可塑性の大きな魚類をモデルに解明していくこととした。正常発生と比較して遺伝子変異による性転換時にどのような遺伝子が発現変動するのかを明らかにしていくことで、精巣や卵巣の形成・維持において、動物に共通な分子機構を明らかにするとともに、動物の性決定・性分化の共通性や普遍性の理解に大きく貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

最初に、変異体の背景となっている近交系の Hd-rR (野生型) 系統と *gsdf* 破壊 (*gsdf*-KO) 系統それぞれの孵化稚魚を用いて孵化 0 日の発現プロファイルを比較することとした。それぞれ

の系統から採卵し、インキュベータ内で孵化まで保温した。同日に採卵した一腹の卵も孵化日は同日ではなく2-3日にわたることが多い。今回は受精後12日目に孵化した稚魚それぞれからRNAとDNAを同時に抽出し、DNAから性染色体型と遺伝子型とを判定した。野生型のXXとXY、*gsdf*変異ホモのXXとXY、それぞれ5個体ずつのRNAをプールし、それを3セット作成し、それぞれ次世代シーケンサー(NGS)を用いたmRNA-Seq解析に供した。

4. 研究成果

17,531遺伝子についてその発現を解析することができた。野生型XXと野生型XYとを比較した場合に野生型XX特異的に発現量の多い(5倍以上の)遺伝子は8個、野生型XY特異的に発現している遺伝子は23個であった。一方、*gsdf*-K0 XXと*gsdf*-K0 XYとを比較した場合に*gsdf*-K0 XX特異的に発現量の多い遺伝子は6個、*gsdf*-K0 XY特異的に発現している遺伝子は40個であった。またこれらの比較において野生型XX特異的な8遺伝子と*gsdf*-K0 XX特異的な6遺伝子に同じ遺伝子はなく、野生型XY特異的な23遺伝子と*gsdf*-K0 XY特異的な40遺伝子のうち7遺伝子のみが共通であった。これらの結果から一対一の比較ではなく、遺伝子発現の変動を見ることにした。その結果、次の様にまとめることができた。XYと比較してXXで発現量が高い遺伝子群(5遺伝子)、XXと比較してXYで発現量が高い遺伝子群(25)、*gsdf*-K0と比較して野生型で発現量が高い遺伝子群(18)、野生型と比較して*gsdf*-K0で発現量が高い遺伝子群(10)、他と比較して野生型XYのみで発現量が下がっている遺伝子群(12)である。*gsdf*遺伝子は含まれていた。このことは、*gsdf*-K0の変異が翻訳開始点の直下の変異で、*gsdf*遺伝子の機能は破壊されているがmRNAの発現は影響を受けていないと予測できると一致していた。やの遺伝子群は*gsdf*の影響を受けていない遺伝子群であると考えられる。一方、の遺伝子群は本来XY個体で抑えられている遺伝子が*gsdf*-K0により性転換する際に発現が上昇してきている遺伝子群であると考えられる。今後これらの遺伝子の発現制御を解析していくことで性転換の分子メカニズムの解明の糸口が得られることが期待できる。

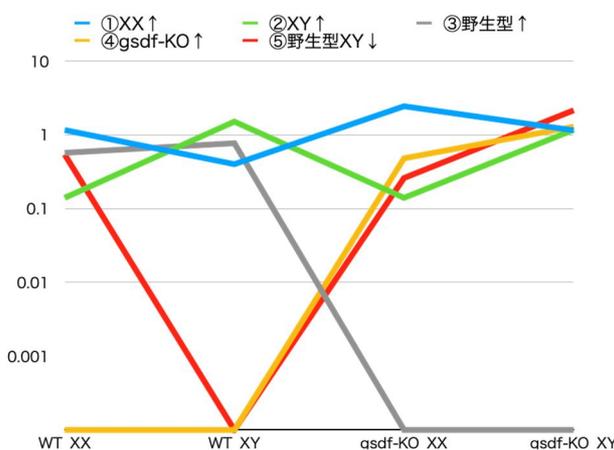


図 遺伝子発現変動のパターン

代表的な遺伝子の発現パターンをそれぞれ一つずつ示している。

<引用文献>

Imai T, Saino K, Matsuda M. Mutation of Gonadal soma-derived factor induces medaka XY gonads to undergo ovarian development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;467.

Kitano T, Hayashi Y, Shiraishi E, Kamei Y. Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature. *Mol Reprod Dev.* 2012;79.

Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, et al. Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosom Res.* 2012;20:163-76.

Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature.* 2002;417:559-63.

Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, et al. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:3865-70.

Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics.* 2012;191:163-70.

Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, et al. Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nat Commun.* 2014;5.

Yamamoto T -O. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp Zool.* 1953;123.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinotsuka Ryo, Oba Toru, Mitome Takahiro, Masuya Takuto, Ito Satoshi, Murakami Yukie, Kagenishi Tomoko, Kodama Yutaka, Matsuda Masaru, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi	4. 巻 382
2. 論文標題 Synthesis of quinolyl-pyrrole derivatives as novel environment-sensitive fluorescent probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 111900 ~ 111900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotochem.2019.111900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Yuta, Kawasaki Hiromu, Watanabe Kanon, Hara Hiroyuki, Anraku Kyoya, Shoji Misaki, Oba Toru, Matsuda Masaru, Jiang Weihua, Sunahara Atsushi, Nishikino Masaharu, Namba Shinichi, O' Sullivan Gerry, Higashiguchi Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Optimized highly charged ion production for strong soft x-ray sources obeying a quasi-Moseley's law	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 115315 ~ 115315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5127943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogita Yusaku, Mawaribuchi Shuuji, Nakasako Kei, Tamura Kei, Matsuda Masaru, Katsumura Takafumi, Oota Hiroki, Watanabe Go, Yoneda Shigetaka, Takamatsu Nobuhiko, Ito Michihiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Parallel Evolution of Two dmrt1-Derived Genes, dmy and dm-W, for Vertebrate Sex Determination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100757 ~ 100757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.100757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iguchi Yuka, Nakao Ryohei, Matsuda Masaru, Takata Keisuke, Kitagawa Tadao	4. 巻 66
2. 論文標題 Origin of the widely and discontinuously distributed mitochondrial genotypes of <i>Oryzias latipes</i> : introduced or native genotypes?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	6. 最初と最後の頁 183 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10228-018-0662-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Akiko, Suzuki Tomohiro, Gotoh Saki, Kono Haruka, Matsui Megumi, Aoki Daichi, Matsuda Masaru, Kawagishi Hirokazu, Ogata Makoto	4. 巻 475
2. 論文標題 Structural investigation of α -L-fucosidase from the pancreas of <i>Patiria pectinifera</i> , based on molecular cloning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 27 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2019.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Shuhei, Takano Wataru, Hagen Nathan, Matsuda Masaru, Otani Yukitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Video-rate quantitative phase analysis by a DIC microscope using a polarization camera	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1273 ~ 1273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.10.001273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Akira Seto
2. 発表標題 Genetic analysis of the dorsal-fin less mutant in the medaka
3. 学会等名 The 25th Japanese Medaka and Zebrafish meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田 勝
2. 発表標題 メダカ属魚類の性決定遺伝子
3. 学会等名 日本水産学会平成30年秋季大会シンポジウム「魚類の性決定・性分化・性転換—これまでとこれから—」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Karin Yanagita
2. 発表標題 Intra- and inter-species variation in egg size in <i>Oryzias latipes</i> species complex
3. 学会等名 The 26th Japanese Medaka and Zebrafish meeting
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松田 勝 (菊池 潔、井尻成保、北野 健 編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 258
3. 書名 魚類の性決定・性分化・性転換	

〔産業財産権〕

〔その他〕

宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100757 宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------