

令和 5 年 7 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02281

研究課題名(和文)水産育種の新モデルとしてのキタノメダカ性分化・転換の分子機構解明とその応用

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of sex differentiation and sex-reversal in medaka complex, *Oryzias sakaizumii*, as a new model species for aquaculture

研究代表者

小林 亨 (Kobayashi, Tohru)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：30221972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はミナメダカと同様な性分化・性転換のポテンシャルをもつ近縁種であるキタノメダカ(*Oryzias sakaizumii*)の性分化カスケードがミナメダカ(*O. latipes*)とは異なり、水産有用種であるティラピア等と極めて類似していることを初めて見出した。そこで、水産増殖における性統御の技術開発に資するために、本種を新たなモデルとした研究を水産有用種であるティラピア、クエと比較検討しつつ行っている。今回、性決定から生殖腺分化および性転換の分子機構を検討した結果、雄への性転換には、Dmrt1は必要であるが、これまで知られていない新規の分化経路の存在が初めて示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、キタノメダカの性分化、性転換の分子機構を水産有用種であるティラピア、クエの性転換機構と比較検討した結果、雄への性転換には、Dmrt1は必要であるが、その誘導や分化には新規の精巣分化経路が存在することが明らかとなった。このことは、新規の分化経路が、Gsdfの発現が精巣分化誘導と相関しない種やDmrt1の発現が精巣分化と相関しない種の精巣分化(性転換を含)においても共通である可能性を強く示唆するものであり、水産増殖における性統御に資する技術開発を前進させる成果である

研究成果の概要(英文)：The sex differentiation cascade of *Oryzias sakaizumii* is very similar to that of Nile tilapia, a useful fisheries species for aquaculture, unlike *O. latipes*. This study is conducting research using this species as a new model by comparing it to sex differentiation and masculinization in tilapia and masculinization in Grouper. In this study, we examined the molecular mechanisms of gonadal differentiation and sex change from sex determination. Thus we demonstrate the existence of an unknown testis differentiation pathway as the primary pathway for sex transdifferentiation to the testis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：性分化・性転換 メダカ gsdf dmrt1 amh

1. 研究開始当初の背景

水産増養殖産業において性統御技術開発の要望が極めて高い魚種は多い。例えば、世界中で大規模に養殖されているナイルティラピア（ティラピア: *Oreochromis niloticus*）では全雄生産、高級魚で雌性先熟魚であるハタでは雄への早期成熟・雄への性転換阻止、キャビアが高価なチョウザメでは全雌生産の技術開発が望まれている。しかし、魚類の性決定・分化様式は多様であり、性統御技術開発は種ごとに多大な労力と時間を要し、実現が困難である。

この要因は一部の魚種を除いて遺伝的性が判断できないこと、性分化開始・進行のメカニズムが未だによく理解できていないことによる。このためモデル種での理解が各魚種での性統御に効率良く反映できることは重要である。

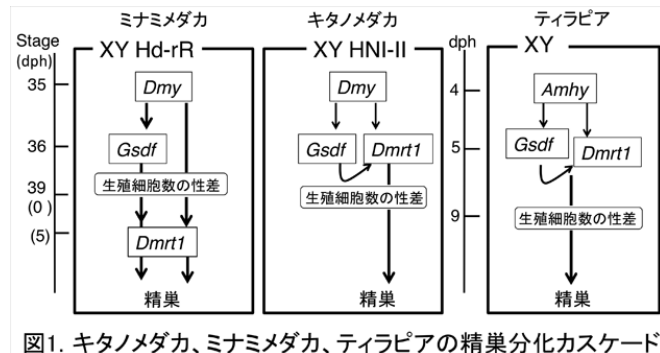


図1. キタノメダカ、ミナミメダカ、ティラピアの精巣分化カスケード

は重要である。モデル魚種であるミナミメダカ (*Oryzias latipes*) では、精巣分化決定遺伝子である *Dmrt1* の発現パターンが、既知の水産有用魚種とは異なるため、その性分化カスケードと分子機構の理解をそのまま有用種に反映できず、水産有用種のモデルとしては不適である。日本の野生メダカは2012年にキタノメダカ (*O. sakaizumii*) とミナミメダカに再分類され、両者は同じ性決定遺伝子 *Dmy* をもち、交雑可能で雑種は稔性をもつ。 *Dmy* による精巣分化は、その下流で *Gsdf*, *Dmrt1* が重要な機能を果たす。最近、私たちはミナミメダカと同様なポテンシャルをもつ近縁種であるキタノメダカ (*O. sakaizumii*) の性分化カスケードがミナミメダカとは異なり、水産有用種であるティラピア等と極めて類似していることを初めて報告した。このことは、キタノメダカが水産有用種の繁殖育種のための良いモデルとなりうることを示唆する。

2. 研究の目的

魚類の性決定以降の生殖腺性分化では、精巣分化における *Gsdf*, *Dmrt1*, *Amhr2*系、卵巣分化における *Foxl2*, *Cyp19* (芳香化酵素: エストロゲン合成酵素) 等、魚種間で共通するメカニズムがみられるが、種によって性分化のタイミングと様式は異なり、現状ではこれらの普遍性を考察することは難しい。現在、図2に示すようにこれらの因子がキタノメダカの性分化・性転換誘導に参与することは解ってきたが、それらがどのように作用しあって卵巣または精巣への分化開始を導くかは不明なままである。このようにキタノメダカの性決定・分化機構を詳細に調

べることで、性決定・分化機構を高解像度に解明できる可能性が高い。さらにキタノメダカで得られた知見は他魚種での汎用性も高く、速やかな応用が可能であると考えられる。本研究では水産有用種のための新規モデルとしてのキタノメダカ性決定・性分化・性転換の分子制御機構の解明とそれに基づく性統御技術開発の確立を目指す。

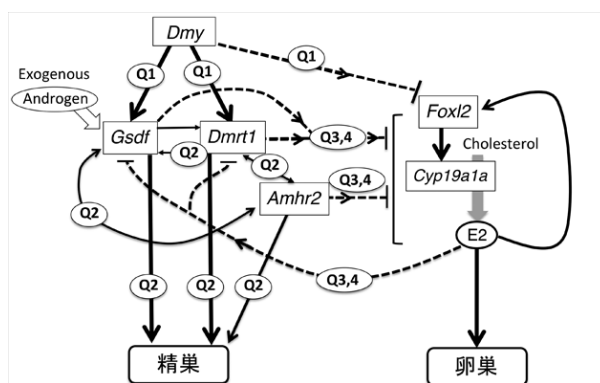


図2. キタノメダカ性決定・分化の分子機構: 解明した点, 残る疑問点

3. 研究の方法

本研究では図2に示す研究によりキタノメダカ性分化・性転換の分子機構を解明し、性統御技術の開発に応用することで水産業への貢献に資することを目的に以下の研究課題を行った。

- (1) キタノメダカの性決定・性分化・性転換過程におけるDmy, Gsdf, Dmrt1, Amhr2系, Foxl2発現制御の作用機序の解明
- (2) ティラピアの性分化・性転換過程における精巣分化シグナルネットワークの解明
- (3) ハタ科クエ(*Epinephelus bruneus*)での成熟雌から雄への性転換制御や性転換雄の早期作出のために性分化・性転換に関わる因子群の探索

4. 研究成果

- (1) キタノメダカの性決定・性分化・性転換過程における性分化関連遺伝子シグナルネットワーク発現制御の作用機序の解明

キタノメダカHNI-II系統では、St. 38で見られる生殖細胞数の性差が最初の形態学的性差である。形態学的性差が見られる前のSt. 36のXYにおいて、GsdfのXYドミナントな発現が認められる。また、ミナメダカとは異なり、Dmrt1の発現も見られる。Dmrt1欠損変異体は、ミナメダカと同様に、全て個体でメスへの分化、成熟を示す。一方、Gsdf欠損変異体は、ミナメダカと異なり、高い頻度でオスへの分化・成熟がみられた。しかし、その初期生殖腺分化過程では、全ての個体で卵巢分化を示すこと、生殖細胞数の著しい増加を示すことが明らかとなった。これらから、性決定遺伝子DmyとGsdf, Dmrt1の関係は、Dmrt1はオス分化・成熟に必須であること、生殖腺性分化初期過程では、Dmrt1はGsdf欠損の補償作用はもたないことを示唆する。ミナメダカYY-Gsdf欠損変異体では、オスへの分化頻度がXY変異体と比べて高いが、生殖腺初期過程では全ての個体は卵巢分化を示した。また、ミナメダカYY-Dmrt1欠損変異

体は、全ての個体がメス分化を示した。これらから、*Dmy*による精巣分化経路においては、その下流で*Gsdf*、*Dmrt1*以外の精巣分化誘導因子の存在が強く示唆される。また、これらと*amh*関連遺伝子との関係については、現在、*amh*、*amhr2*欠損変異体の解析が進行中であり、今後に期待されたい。

(2) ティラピアの性分化・性転換過程における精巣分化シグナルネットワークの解明

ニールティラピアの遺伝的オス(XY)で見られる精巣分化においては、*Gsdf*、*Dmrt1*はキタノメダカと同様な発現パターンを示す。両者の発現は生殖細胞支持細胞群に局在する。一方、性決定遺伝子である*AmhY*および、*Amh*の発現は、生殖細胞支持細胞ではなく、精細管原基を取り囲む間充織細胞に特異的に局在する。アンドロゲン投与による遺伝的メス(XX)性転換精巣分化誘導過程を調べたところ、XX生殖腺では、*Amh*の局在は見られないが、アンドロゲン投与によって、*Amh*の発現は生殖細胞支持細胞の外側（基底膜の外側）を取り囲む位置にある間充織細胞に誘導される。この時、*Gsdf*、*Dmrt 1*の発現は間充織細胞ではなく、XY生殖腺の生殖細胞を取り囲む上皮系体細胞群で特異的な発現誘導がみられた。

(3) ハタ科クエ(*Epinephelus bruneus*)での成熟雌から雄への性転換制御や性転換雄の早期作出のために性分化・性転換に関わる因子群の探索

雌性先熟魚種であり、水産有用種であるクエ (*Epinephelus bruneus*)は他のハタ科魚類と比べて著しく成長が遅いため、本種の養殖は容易ではない。そのため、成長が早い優良種苗の作出が望まれているが、本種の雌の初回成熟には最低8年必要であり、その後、性転換し、雄として成熟するには更に長い年月を要する。クエのメス(6歳魚:1.6-3.8kg)に合成アンドロゲン(MT):二濃度区(低濃度群:MT 1mg/kg, 高濃度群:MT:2mg/kg)、を投与し人為的な性転換誘導条件を検討した。投与後1~2ヶ月でMT投与した全ての試験区において性転換誘導および排精が確認された。特に高濃度処理群では排精個体率が100%と高かった。得られた精子を用いた人工授精試験においても正常孵化を示すことから、クエはMTペレット処理により2ヶ月程度で雄性化が可能で有ることが明らかになった。さらに性転換誘導脳を検討した結果、幼魚(1~2歳)へのアンドロゲン投与により、従来よりも低年齢で未熟な卵巣を成熟精巣へと性転換させることができた。この技術により作出した小型オスから得られた精子は受精能を有すること、及び、飼育水温23°Cが最も排精率を向上させることが明らかとなった。本研究により、クエでは年齢を問わず、いつでもメスからオスへの機能的性転換の誘導が可能となった。

MT投与により、機能的精子を有する成熟雄への性転換を2ヶ月で誘導する条件を確立できたことから、優良系統確立のための基盤整備として、卵巣と精巣でドミナントに発現する遺伝子を探索するため、RNA-seqを行った。その結果、現在までに185,486本

の contig を得ており (N50 = 1453bp)、その中でアノテーションが付いた遺伝子数は 66,625 本であった。現在、これらの中で性転換精巣分化に関与する候補遺伝子を抽出し、それらのメダカ精巣分化過程における挙動の網羅的解析を行っている。

クエの性転換精巣分化過程における組織構築の再編の詳細を明らかにするため、卵巣白膜に存在するステロイドホルモン産生細胞群 (SPCs) の挙動を解析した。その結果、性転換初期の白膜に局在した SPCs の一部が生殖腺実質部へと移動することが明らかとなった。この事象に関して、メダカ性転換精巣分化における SPC の分化動態を解析しており、その共通性に関して検討を行っている。

5. 総括

本研究により、メダカでは、*Dmrt1* はオス分化には必須であるが、精巣分化のトリガーではないことが、初めて明らかとなった。このことは、これまでの *Dmrt1* の発現パターンが性分化後に起こると報告されている魚種の精巣分化との共通性であることを示唆する。また、本研究結果から、*Dmrt1* による精巣分化決定に至るまでの過程で、*Gsdf* 以外の因子が関与すること、そして、これは *Gsdf* が生殖腺性分化初期に関与しない種との共通性であることが示唆される。今後、性決定遺伝子と *Dmrt1* を繋ぐ新たな精巣分化経路を明らかにすることが、魚類の性分化機構の理解及び、新たな性統御技術の開発には不可欠であると考えられる。

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 3件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Myosho T, Hattori M, Yamamoto J, Toda M, Okamura T, Onishi Y, Takehana Y, Kobayashi T. | 4. 巻 274 |
| 2. 論文標題 Effects of synthetic sex steroid hormone exposures on gonadal sex differentiation and dynamics of a male-related gene, Gonadal soma-derived factor (Gsdf) and an estrogen up-regulated gene, Choriogenine-H (ChgH) gene expression in the euryhaline Javafish medaka, <i>Oryzias javanicus</i> , based on genetic sexes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemosphere | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2021.129893. | 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 Taketeru Tomita, Masaru Nakamura, Yasuhisa Kobayashi, Atsushi Yoshinaka, Kiyomi Murakumo | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Eats a lot but poops nothing: embryonic mechanisms to maintain a clean uterine environment in a viviparous stingray | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7378 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64271-2. | 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 Takashi Iwamatsu, Shoji Oda, Hirokuni Kobayashi, Lynne R. Parenti, Yasuhisa Kobayashi | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Shift of the Vegetal Pole Area of Full-Grown Oocytes Toward the Ovulatory Site of the Ovary in the Medaka Fish, <i>Oryzias latipes</i> (Belontiiformes: Adrianichthyidae) | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The Biological Bulletin | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1086/708304. | 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 村田良介, 野津了, 小林靖尚, 中村將 | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 ハタ科魚類の性分化と性転換に関する形態学および生理学的研究 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 日本水産学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2331/suisan.20-00003 | 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 Myosho, T., Sato, T., Nishiyama, H., Watanabe, A., Yamamoto, J., Okamura, T., Onishi, Y., Fujimaki, R., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. and Kobayashi, T | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Inter- and intraspecific variation in sex hormone induced sex-reversal in medakas, <i>Oryzias latipes</i> and <i>Oryzias sakaizumi</i> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Zoological Science | 6. 最初と最後の頁 425-431 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs180194. | 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 Watanabe, A., Myosho, T., Ishibashi, A., Yamamoto J., Toda, M., Onishi, Y., Kobayashi, T. | 4. 巻 876 |
| 2. 論文標題 Levonorgestrel causes feminization and dose-dependent masculinization in medaka fish (<i>Oryzias latipes</i>): endocrine-disrupting activity and its correlation with sex reversal. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Science of the Total Environment | 6. 最初と最後の頁 162740 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2023.162740. | 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 - |

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 明正 大純、藤本慎吾、小林 亨 |
| 2. 発表標題 新旧性決定遺伝子Dmy とGsdfneoY が共存する長崎県平戸産野生ミナミメダカ個体群. |
| 3. 学会等名 第67回日本生態学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 明正 大純、藤本慎吾、小林 亨 |
| 2. 発表標題 長崎県平戸産ミナミメダカ個体群におけるRet rot ransposonの挿入による新規性決定遺伝子GsdfneoYへの進化. |
| 3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 明正 大純、渡邊 明帆、小林 亨 |
| 2. 発表標題 ミナミメダカとキタノメダカにおける性ホルモン曝露による性転換誘導の種間・種内多様性とGsdFの関係 |
| 3. 学会等名 公益社団法人日本動物学会第90回大阪大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 明正 大純、西山 ひろか、渡邊 明帆、小林 亨 |
| 2. 発表標題 ミナミメダカのエストロゲンによる性転換誘導における感受性の系統差はGsdFの発現制御と関連する |
| 3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会（東京） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 渡邊 明帆、明正 大純、小林 亨 |
| 2. 発表標題 プロゲステロン曝露によるメダカの性転換 III |
| 3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会（東京） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林 亨 |
| 2. 発表標題 ナイルティラピアの生殖腺性分化・転換過程におけるAmhの発現動態 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第89回（札幌） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 明正 大純, 佐藤 忠, 酒泉 満, 小林 亨 |
| 2. 発表標題 キタノメダカHNI-II系統における性決定初期に高発現するDmrt1の種内共通性の探索とその機能解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第89回 (札幌) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 松谷 優佳里, 明正 大純, 小林 亨 |
| 2. 発表標題 EE2曝露によるメダカエストロゲン応答遺伝子の反応性 |
| 3. 学会等名 環境ホルモン学会第21回研究発表会 (東京) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計5件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 小林靖尚, 野津了, 中村將 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 恒星社厚生閣 | 5. 総ページ数 21 |
| 3. 書名 軟骨魚類の繁殖と性分化. In魚類の性決定・性分化・性転換-これまでとこれから (e-水産学シリーズ). 第7章. 145-166. | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 野津了, 小林靖尚, 中村將 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 恒星社厚生閣 | 5. 総ページ数 23 |
| 3. 書名 魚類の性転換-多様な性転換から見えてきた共通性. In 魚類の性決定・性分化・性転換-これまでとこれから (e-水産学シリーズ). 第8章. 167-190. | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Yasuhisa Kobayashi, Ryo Nozu, Ryo Horiguchi, Masaru Nakamura | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 26 |
| 3. 書名 Variety of Sex Change in Tropical Fish. In: Reproductive and Developmental Strategies. | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Masaru Nakamura, Yasuhisa Kobayashi | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 Wiley-Blackwell | 5. 総ページ数 15 |
| 3. 書名 Sex Differentiation, Sex Change, and Sex Control in Groupers. In: Sex Control in Aquaculture. | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 明正 大純 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 丸善出版 | 5. 総ページ数 808 |
| 3. 書名 日本動物学会（編）動物学の百科事典. 4章-12 解析手法としての遺伝学 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 明正 大純 (Myosho Taijun) (00781808) | 静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803) | |
| 研究分担者 | 小林 靖尚 (Kobayashi Yasuhisa) (10643786) | 近畿大学・農学部・准教授 (34419) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|