

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570202
 研究課題名（和文）ルソンメダカを利用したメダカ性決定遺伝子 *DMY* のターゲット遺伝子同定
 研究課題名（英文）Identification of target genes for medaka sex determining gene *DMY* using *Oryzias luzonensis*.
 研究代表者
 柴田 直樹（SHIBATA NAOKI）
 信州大学・理学部・准教授
 研究者番号：20252059

研究成果の概要：

メダカ性決定遺伝子 *DMY* のターゲットとなる遺伝子を見つけるために、近縁種で性分化タイミングが若干遅いルソンメダカを利用し、性分化直後の孵化日にメダカでのみ発現し、同時期のルソンメダカでは発現の見られない遺伝子を探索した。その結果メダカ雄でのみ発現しているおよそ 720bp の遺伝子断片を見いだした。この遺伝子断片の塩基配列を調べたところ、既知の遺伝子データベースには類似したものが存在せず、新たな遺伝子が見つかったと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：生殖生物学、性決定、性分化、メダカ

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの脊椎動物は雄、雌という性的な二型を示す。表現型として現れるこれらの二

型は、精巣または卵巢により制御されている。すなわち性決定・性分化とは、性的に未分化な生殖巣原基が精巣または卵巢に分化することに還元される。

精巣、卵巣は、精子や卵という非常にユニークであるものの、それぞれは動物間で非常によく似た性質をもつ細胞を形成すること、減数分裂という特異的な細胞分裂を制御していること、動物間でまったく同様な性ステロイドホルモンを産生すること、など機能的に極めてよく似ている。さらに、その構造も良く類似しており、形成機構にも動物間で共通性があること、すなわち進化的によく保存された仕組みが存在することが示唆される。このため、この形成機構の分子メカニズムについては強い関心が持たれてきた。

マウスでは 1990 年に性決定遺伝子として *Sry* が同定され、その後、初期性分化時の発現パターン、トランスジェニックマウスを用いた解析、ノックアウトマウスの解析などから、性分化に関わると考えられるいくつかの重要な遺伝子が見いだされてきた。しかし、カスケード上流からターゲット遺伝子を探す場合には適切な方法がないことによる。性分化関連遺伝子群の中から本研究開始後の 2008 年に至り、ようやく *Sox9* がそのターゲット遺伝子（の一つ）であることが、*Sox9* のエンハンサー解析により示された。このエンハンサー領域は遺伝子領域から予想外離れていたことが、これまで見つからなかった原因である。いずれにしろターゲット遺伝子の候補を得ることがまず重要である。一方、哺乳類以外の脊椎動物では、精巣形成の類似性にもかかわらず、遺伝的に雄ヘテロ型（XX-XY 型）の性決定様式を示す場合でも、*Sry* は存在しない。したがって多くの共通性が予想されているものの、マウスのみを基盤にしたアプローチは停滞している。

このような中で 2002 年にメダカで性決定遺伝子として *DMY* が同定され、これにより性分化開始時期が特定され、下等脊椎動物で唯一、メダカで性決定遺伝子のターゲット、

およびそれに続く初期カスケードの解析が可能となった。しかし、メダカでも本研究発表者らにより *Sox9* 遺伝子群が同定されその発現パターンが明らかにされたが、*DMY* 発現以前から雌雄ともに生殖巣原器で発現がみられることから、性分化開始後に雄特異的な発現パターンを示すようになるものの、*DMY* のターゲットではないことが強く示唆された。したがって *DMY* のターゲット遺伝子を探るには、まずその候補遺伝子を探すことが重要となる。

メダカ属にはおよそ 20 種が含まれ、系統解析によりメダカにもっとも近縁なグループとして 3 種が知られている。その中でルソンメダカ (*Oryzias luzonensis*) は、発生速度（孵化日数）、成長速度（成熟日数）、成熟サイズ、などが、メダカとよく一致している。また遺伝学的に、性決定様式も XX-XY 型であること、*DMY* はもたず異なる染色体上の別な遺伝子（およそその範囲はマップされている）が性決定遺伝子として働くことがないこと、が知られている。初期性分化過程の解析から、孵化日には生殖細胞数、およびいくつかの性分化関連遺伝子の発現のいずれにも性差は見られないこと、ふ化後 5 日には生殖細胞数に雌雄差が見られることが明らかとなった。すなわちルソンメダカでは、性決定遺伝子は孵化の時点ではまだ発現を開始せずに性的に未分化な生殖巣が保持され、ふ化後に性分化が始まると考えられる。したがって、メダカで *DMY*、およびそのターゲット遺伝子が発現していると考えられる孵化日に、ルソンメダカの生殖巣原器は性的には未分化な状態になる。このことは、この時期の生殖巣でルソンメダカと比較してメダカ特異的に発現する遺伝子があれば、その中に *DMY* のターゲット遺伝子が含まれていることを意味する。

2. 研究の目的

本研究では、メダカ性決定遺伝子 *DMY* のターゲット遺伝子を、性分化タイミングの異なり、精巣分化がメダカよりも遅く、かつ、他の発生過程はほぼ同様に進行するルソンメダカで発現する遺伝子との比較から推定することで候補遺伝子を得る。その後、機能解析により実際に性分化に関わるかどうかを解析する。

3. 研究の方法

ルソンメダカは、発生速度（孵化日数）、成長速度（成熟日数）、成熟サイズ、などが、メダカとよく一致している。また遺伝学的に、性決定様式も XX-XY 型であること、*DMY* はもたず異なる染色体上の別な遺伝子（おおよその範囲はマップされている）が性決定遺伝子として働くことがないこと、が知られている。応募者が初期性分化過程を予備的に解析した結果、孵化日には生殖細胞数、およびいくつかの性分化関連遺伝子の発現のいずれにも性差は見られないこと、ふ化後5日には生殖細胞数に雌雄差が見られることが明らかとなった。すなわちルソンメダカでは、性決定遺伝子は孵化の時点ではまだ発現を開始せずに性的に未分化な生殖巣が保持され、ふ化後に性分化が始まると考えられる。

このように、例えば孵化日には、発生段階はほぼ等しいが、生殖巣では *DMY* は存在しないゆえ当然発現せず、さらにルソン性決定遺伝子もまだ発現していない未分化な生殖巣が得られることになる。そこで妥当な時期を選んで

{(メダカ♂) - (ルソン♂)} = 精巣分化開始時に発現が誘起される遺伝子

{(ルソン♂) - (メダカ♂)} = 精巣分化開始時に発現が抑制される遺伝子

が効率的に得られことになる。さらに、申請者がこれまでクローニングしたルソンメダカ遺伝子群の cDNA 配列は、メダカの相同遺伝子と 90%以上一致していた。すなわちハイブリダイゼーションベースのサブトラクシオンは十分に有効である。

さらに生殖巣以外の部分で発現する遺伝子にも種差がある可能性を考慮し実験精度を上げるために、サブトラクティブ PCR に用いる RNA ソースには、まずレーザーマイクロダイセクション法により、生殖巣由来の mRNA を得る系を確立する。これを用いて、上記二つの組み合わせでサブトラクティブ PCR を行い、得られた産物をすべてクローニングする。その後雄生殖巣での特異的な発現の有無をメルクマールに候補遺伝子を絞り込み、強制発現系およびノックダウン系により機能解析を行い、ターゲット遺伝子を同定する。

4. 研究成果

初期性分化時期のメダカおよびルソンメダカ雄生殖巣領域組織をレーザーダイセクション法により摘出した。これらの組織のみ由来する mRNA をソースとして両方向のサブトラクティブ PCR を行い、得られた PCR 産物をライブラリー化した。

研究年度内におよそ 1000 クローンの配列を決定した。これをもとにクローンの重複を考

慮し、かつ配列情報なども検討し、まず候補となる可能性のある 11 クローンを識別した。RT-PCR を行った結果、性分化直後の孵化 0 日に雄特異的な発現を示すバンドが得られた

(図)。しかし、当初の予測されたサイズとは異なるサイズであった。この原因は不明である。この新たに得られた配列をもとに BLAST 検索を行った結果、配列全体としてはホメオドメインを持つ *evx1* と類似していることが示された。しかし配列全体にわたり短い相同領域が散在しており、その相同性は種内の比較であることを考慮するときわめて低いと判断された。またメダカゲノム情報からも高い相同性のある領域は得られず、新規未知遺伝子の部分配列である可能性が高い。その後、RACE 法による全長配列の決定と *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を開始したが、研究年度内に結果を得るまでには至らなかった。現在、解析を継続中である。

2002 年に *DMY* が発見されてから、それ以前に蓄積された性分化過程に関する知見と、性分化関連遺伝子の発現解析が進められてきている。しかしこれまでに *DMY* の機能に関する知見はまったく得られていない。本研究では、これまで脊椎動物で知られている遺伝子に含まれない性分化関連遺伝子を得た可能性が高く、今後、研究を進展させる最初の段階を築いたといえる。また、作成されたサブトラクティブライブラリーの中には、他にもこのような遺伝子が含まれている可能性があり、今後の解析材料としても重要である(解析継続中である)。さらに、近縁種を利用した解析が端緒となっており、メダカバイオリソースの有効利用を提示するという点でもきわめて有意義であると考えられる。

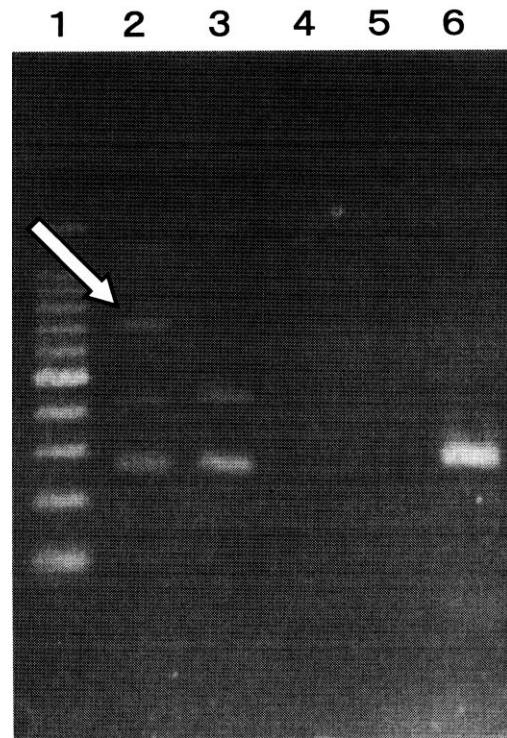


図 メダカ孵化日の RT-PCR。

メダカ孵化日雄特異的に発現する遺伝子が検出された(矢印)。レーン 1 ; 100bp ラダー、2 ; 孵化日雄、3 ; 孵化日雌、4 ; 孵化日雄 RT-、5 ; 孵化日雌 RT-、6 ; 孵化日雄 EF1 α

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 1 件)

Nakamoto, M., Muramatsu S., Yoshida, S., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2009 May)

Gonadal sex differentiation and expression of Sox9a2, Dmrt1, and Foxl2 in *Oryzias luzonensis*.

Genesis 47(5)、289-299 (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)

信州大学・理学部・准教授

研究者番号：20252059

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし