

平成21年 5月 22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19570219

研究課題名（和文） 細胞質因子による性決定 -ミトコンドリアと母性因子-

研究課題名（英文） Cytoplasmic sex determination: mitochondrial and maternal factors

研究代表者

三浦 郁夫 (MIURA IKUO)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10173973

研究成果の概要：

脊椎動物において、卵内に存在する細胞質因子が性決定の重要な役割を担うことを明らかにするため、ツチガエルを用いて、ミトコンドリア由来および、性染色体に由来する細胞質因子の同定を試みた。ミトコンドリアからは D-loop 内に存在する 8 塩基ないし 10 塩基を単位とするくり返し配列に由来するペプチド因子をみつけ、母性因子としては主に 3 種類のガレクチン分子が卵内に特異的に存在することを見つけた。機能解析を行うため、DNA コンストラクトを用いたトランスジェネシスに取り組み、ツチガエルにおける核酸マイクロインジェクション法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：オルガネラ起源、性決定、細胞質、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

生物の性を決定する仕組みには、孵卵温度や社会的因子などの環境による性決定と、遺伝子による遺伝的な性決定の 2 つに大きくわけることができる。

遺伝的に性が決まる場合、通常は、核の性染色体上にある遺伝子はその中心的役割を担うが、無脊椎動物では、遺伝的に決定される本来の性が卵に存在するボルバキア微小細菌や微孢子虫類によって完全な変更を受ける例が古くから知られている。これらは、

卵の細胞質に性決定に深く関与する仕組みの存在することを強く示している。私たちは脊椎動物のツチガエルにおいて、集団間雑種において卵の細胞質の組み合わせを変えることによって、本来の遺伝的な性が大きく変更される実験結果を得ていた。2 つの実験から、その細胞質因子はミトコンドリア由来の因子と、核の性染色体由来の母性因子の両方が示唆された。そして、ミトコンドリア遺伝子の D-loop 領域を解析したところ、10 残基をコードする配列が繰り返して存在し、集団

の間でその配列と繰り返しの数に違いがあることを突き止めた。以上のように、脊椎動物においても、卵の細胞質の中に性の決定を支配する因子の存在することが、ツチガエルの研究によってより具体性を帯びて来た。

## 2. 研究の目的

本研究では、ツチガエルの卵の中に存在し、性の決定に関与する細胞質因子の同定を目的とする。これまでの研究から、その因子として、ミトコンドリア由来の因子と性染色体由来の母性因子が予想されている。そこで、両者の因子の詳細な探索を行い、候補分子を実際に受精卵に RNA ないし DNA の形で導入し、遺伝的な性の変更しうるかどうかを見ることで、因子の同定を行い、最終的に脊椎動物において、無脊椎動物同様、性決定に関与する細胞質因子の存在することを明らかにする。

## 3. 研究の方法

ツチガエルには遺伝的に4つの異なる集団が存在する。性染色体が未分化で形態学的に区別がつかない2つの集団、関東と西日本（いずれも XX/XY 型の性決定機構）、そして、性染色体の分化した ZW 集団と XY 集団である。

ミトコンドリア因子については、正逆交配によって性比が大きく偏る2つの集団（関東と西日本）に加え、ZW と XY 集団の4つの集団について D-loop 領域の配列を解析し、さらに、全ゲノムの塩基配列を決定して4者間の違いを調べた。母性因子については、ZZ 卵と WW 卵のサブトラクションの詳細なスクリーニングを継続し、2つの卵で発現が異なる因子の絞りこみを行った。次に、以上の実験で得られた因子候補を受精卵に導入するため、まず、トランスジェネシスの確立を行った。ツチガエルではこれまで受精卵へのマイクロインジェクションの実績が全くないため、条件設定も含めて検討した。

## 4. 研究成果

### 1) ミトコンドリア因子

相互交配によって性比の大きな偏りを引き起こす2つの集団、西日本と関東について、ミトコンドリアのサイズに約 4kbp の違いが見られることがわかっている。その違いは D-loop 領域のサイズの違いであり、内部に存在する繰り返し数の違いに起因する。今回、各集団で5個体を調べたところ、D-loop 領域に 3.5kbp から 9kb までの変異が見られ、サイズの違いは必ずしも集団に特異的ではないことがわかった。一方、D-loop 領域以外に、遺伝子配列の違いを探るため、残りの領域の配列すべてを決定したが、遺伝子構造と配列に注目すべき違いは認められなかった。それ

ゆえ、ミトコンドリアゲノムに由来する性決定関連因子が存在するとすれば、当初の予想通り、D-loop 領域の繰り返し配列にあると考えられた。そこで、残り2つの XY 型集団と ZW 型集団について繰り返し単位の配列を調べたところ、XY 型は関東と同一の 10 塩基を繰り返し単位とし、ZW 型は西日本の 12 塩基のうちの4塩基を欠失した 8 塩基を単位としていることがわかった。ZW 集団のミトコンドリアは西日本集団 (XX/XY 型の性決定機構をもつ) に由来することがわかっていることから、メスヘテロの性決定機構を獲得することと、繰り返し単位の配列変化との関連が期待される。ZW 集団では単位が 8 塩基になったことで、3通りのフレームいずれにおいても同じペプチドが翻訳可能となる (図1)。

関東/XY:	TATACATGTG/	MHVYTCVYMC
西日本:	TATATATGTATG	
ZW:	TATATATG/	MYMCMYVY

図1 繰り返し単位と翻訳可能なペプチド

この繰り返し配列の機能解析を行うため、その配列に由来する RNA を導入するマイクロインジェクション法の確立に取り組んだ (後述)。

### 2) 母性因子

ZW メスに XY オスを交配して WY 個体をつくるとオスの性となるが、同じ XY オスを WW メスに交配すると WY 個体はメスとなる。この実験結果は、性染色体に由来し、性の決定に関与する母性因子が卵内に存在することを示している。そこで、WW 卵と ZZ 卵を作成し、RNA のサブトラクションを行ってきた。その過程において、両サンプル間で発現差を示す遺伝子の中でもっとも多く取られたクローンはガレクチンであった。しかし、この遺伝子は複数種類が含まれているため、分子種の

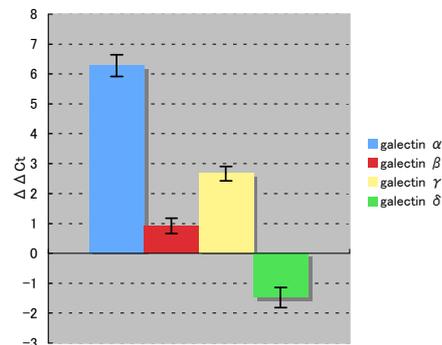


図2 4種ガレクチン分子の WW 卵と ZW 卵での発現差

正確な同定が困難であった。本研究では、得られた配列情報を解析し、少なくとも4種の

ガレクチンが存在することを明らかにし、それぞれに特異的なプライマーを設計して、リアルタイム PCR 法によって、WW 卵と ZW 卵での発現差を確認した。その結果、2 種のガレクチン  $\alpha$  と  $\gamma$  は WW 卵での発現は高いが、 $\beta$  に明瞭な違いはなく、 $\delta$  は ZW 卵の方でむしろ高い発現を示した (図 2; WW/ZW の  $\Delta \Delta Ct$  を示す)。よって、卵内における種々のガレクチン分子の発現量の違いが細胞質因子として機能している可能性が考えられた。

### 3) マイクロインジェクション

以上の実験で得られた細胞質因子候補分子を実際に受精卵に導入し、遺伝的な性が変更されるかどうかを調べるため、まず、マイクロインジェクション法の検討を行った。ツチガエルはこれまで核酸導入の実績が全くないことから、DNA コンストラクト導入によるトランスジェネシスの検討を行った。

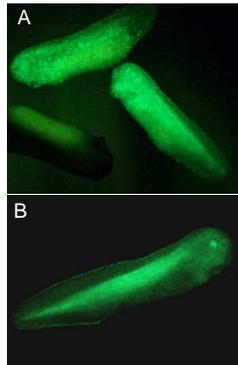


図 3 I-SceI 法とメダカ Tol2 法によるツチガエルトランスジェネシス

両生類は卵内に卵黄が多いため、トランスジェネシスによる遺伝子導入が極めて困難であった。しかし、近年、メガヌクレアーゼ I-SceI との共導入の方法が有効であることが報告された。そこで、この方法に基づき、CMV-GFP コンストラクトの導入を行ったところ、生存率が 8.9%、GFP 蛍光を発したのが 4.8%、DNA の組み込みを確認したのが、1.2%であった (図 3-A)。さらに高い導入効率が期待されるメダカトランスポゾン Tol2 の RNA との共導入法を試みたところ、ふ化生存率が 8.3%で、組換え率は 2.1% (図 3-B) であった。以上のことから、組換え率は低いものの、DNA のマイクロインジェクション法がツチガエルにおいても有効に機能することがわかった。以上の結果から、実験 1) と 2) で得られた性決定関連の細胞質因子候補の mRNA ないし DNA の導入を行う用意を整えることができた。

### 4) まとめと展望

本研究では、性決定に関連する卵内の細胞質因子の候補遺伝子を単離したが、その遺伝子構造の解析と受精卵への導入による機能解析までは至らなかった。現在、研究を継続中である。無脊椎動物の性決定に特有と考えられていた細胞質因子が、脊椎動物においても同様に重要な機能を担っていることを明らかにしていきたい。

## 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 7 件)

- ① 尾形光昭、三浦郁夫 2 つの性決定機構をもつツチガエル “生物の科学 遺伝” NTS. 1, 32-37, 2009 査読なし.
- ② Ogata M, Hasegawa Y, Ohtani H, Mineyama M, Miura I. The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. Heredity. 100(1), 92-99, 2008, 査読あり
- ③ Uno Y, Nishida C, Oshima Y, Yokoyama S, Miura I, Matsuda Y, Nakamura M. Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. Chromosome Res. 16, 637-647, 2008, 査読あり.
- ④ Matsuba C, Miura I, and Merila J. Disentangling genetic vs. environmental causes of sex determination in the common frog, *Rana temporaria*. BMC Genet. 9(1), 1-5, 2008, 査読あり.
- ⑤ 三浦郁夫 生物進化の矛盾を楽しむ 生物工学会誌, 86(1) 35, 2008 査読なし.
- ⑥ 三浦郁夫 両生類の性決定: XY 型と ZW 型のちがい アニテックス 5 月号 19(3), 27-33, 2008 査読なし.
- ⑦ Miura, I. An evolutionary witness: the frog *Rana rugosa* underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. Sexual development. 1(6), 323-331, 2007, 査読あり.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Miura, I, Tariq, E., Ohtani, H. and

- Graves JAM. Molecular characterization of ZW sex chromosomes and the prototype chromosomes in the frog *Rana rugosa*. The 3<sup>rd</sup> Asian chromosome colloquim, 1-4<sup>th</sup> December, 2008, Osaka, Japan.
- ② Uno, I., Nishida, C., Oshima, Y., Yokoyama, S., Miura, I., Nakamura, M. and Matsuda, Y. Molecular cytogenetic study on the origin and evolution of sex chromosomes in different genetic forms of the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae). The 3<sup>rd</sup> Asian chromosome colloquim, 1-4<sup>th</sup> December, 2008, Osaka, Japan.
- ③ 尾形光昭、三浦郁夫 ツチガエルにおける Z 染色体と Y 染色体の起源と進化 日本爬虫両生類学会第 47 回年会 10 月 25-26 日 2008 年 宇都宮 (栃木)
- ④ 小泉雄紀、内藤順一、秋山繁治、藤谷武史、三浦郁夫 広島県に残されたダルマガエル 3 集団の遺伝的特徴 日本爬虫両生類学会第 47 回年会 10 月 25-26 日 2008 年 宇都宮 (栃木)
- ⑤ 小泉雄紀、藤谷武史、大谷浩己、矢尾板芳郎、三浦郁夫 尻尾のあるトノサマガエル 日本爬虫両生類学会第 47 回年会 10 月 25-26 日 2008 年 宇都宮 (栃木)
- ⑥ Ogata, M., Ohtani, H., Miura, I. An exceptional frog proves the rule of heterogametic sex shift. International symposium of gonad and brain sex differentiation. 14-16 September 2008, Fukuoka, Japan.
- ⑦ 三浦郁夫、大谷浩己、池野正史、長谷川嘉則 性決定候補遺伝子の機能解析に向けたトランスジェニック・ツチガエルの作成 染色体学会第 58 回年会 11 月 2

6 日-28 日 2007 年 三浦郡葉山町 (神奈川)

- ⑧ 尾形光昭、大谷浩己、長谷川嘉則、三浦郁夫 ツチガエルの近畿地方と中国地方の境界領域における遺伝的調査 日本爬虫両生類学会第 46 回年会 11 月 17-18 日、2007 年 沖縄県中頭郡西原町

[図書] (計 1 件)

- ① Miura I., Ezaz T, Ohtani H., Uno Y, Nishida C, Matsuda Y, and Graves JAM. The W chromosome evolution and sex-linked gene expression in the Japanese frog *Rana rugosa*. Sex Chromosomes: Genetics, Abnormalities, and Disorders. Nova Science Publishers, Inc., In press. 2009,

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三浦 郁夫 (MIURA IKUO)  
 広島大学・大学院理学研究科・准教授  
 研究者番号：10173973

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

大谷 浩己 (OTANI HIROMI)  
 広島大学・大学院理学研究科・助手  
 研究者番号：20106800