

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月10日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380122

研究課題名（和文） 雌性生殖細胞標識魚を用いた性分化影響因子の探索

研究課題名（英文） Screening of sex differentiation factors  
using female-gamete labeled fish

研究代表者

木下 政人（KINOSHITA MASATO）

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60263125

研究成果の概要（和文）：

ホンモロコから *vasa*, *42Sp50*, *cyp19a*, *dmrt1*, *foxl2* 遺伝子のクローニングに成功した。RT-PCR 法を用いた仔魚／稚魚期の発現解析の結果からは、性的二型は認められなかった。そのため、今回の結果からは明確な性分化開始時期は明らかにならなかった。メスへ分化が完了した後に発現する *42Sp50* の解析結果では、その発現の見られる個体がメスであることが推測された。*42Sp50* はメスへの分化が顕在化したことを示すマーカー遺伝子として有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We have cloned *vasa*, *52Sp50*, *cyp19a*, *dmrt1*, *foxl2* gene from Hon-moroko (*Gnathopogon caerulescens*). The expression level of *42Sp50* gene, which are know as an oocytes specific gene, gradually increased as sex-differentiation process was advanced and significantly differed among individuals. From these facts, we recognized that the *42Sp50* gene was a good indicator for female and that the individuals expressing *42Sp50* gene must be female.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	15,000,000	4,500,000	1,9500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：遺伝子導入、生殖細胞、性決定、*vasa*、*42Sp50*、GFP

## 1. 研究開始当初の背景

ホンモロコは琵琶湖の固有種であり、重要な水産資源の一つである。しかし、近年漁獲量が激減しており、養殖に寄る生産が進んでいる。また、ホンモロコは卵巣を有する成熟

雌が、市場での商品価値が高く、養殖現場に置いて雌の選択的生産技術の開発が望まれている。しかし、ホンモロコの性決定機構に関しては、遺伝的要因と環境的要因があることが知られているが、その詳細については、

不明であった。本研究開始当初は、ホンモロコに於ける性分化関連遺伝子のクローニングがなされていなかった。また、生殖組織の観察による性分化の決定時期がある程度、同定されていたが確定的な報告は無かった。また、本種は環境要因により、性決定が行われる可能性が示されていたが、どのような環境要因が関与するのかについては、確定的なけんかは無かった。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) ホンモロコに於ける性分化関連遺伝子のクローニングと発現時期の検討、および、2) 簡便、かつ、早期に決定された性を判別できる遺伝子導入ホンモロコを作出し、本種の性分化決定時期を明らかにすることを目的とした。具体的には、これまで魚類を含む多くの生物で性分化に関与すると考えられている遺伝子 (*vasa*, *foxl2*, *cyp19a*, *42Sp50*, *dmrt1*) を単離し、その塩基配列を決定するとともに、成長段階および成魚各組織での、それら遺伝子の発現を解析した。また、従来の組織切片の観察による煩雑な性判別法にかわる、簡便な性判別法の開発として、*vasa*-GFP あるいは *42Sp50*-GFP を有する遺伝子導入ホンモロコ系統の作出を試みた。前者は、全ての生殖細胞に緑色蛍光タンパク質が発現し、後者では、雌性生殖細胞でのみ緑色蛍光タンパク質が発現すると期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) total RNA の抽出

ホンモロコ成魚より、卵巣および精巢組織を単離した。単離後、すみやかに RNA later (Ambion) に浸し、RNA を安定化させた。各組織より Sepasol-RNA I Super (nacalaitesque)、Sepasol-RNA I Super G (nacalaitesque)、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。プロトコールはメーカーの推奨する方法を用いた。

### (2) テンプレート cDNA の作製

抽出した total RNA を SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (invitrogen)、または SuperScript III Reverse Transcriptase (invitrogen)、または PrimeScript Reverse Transcriptase (invitrogen) を用いた逆転写反応に供し、cDNA を作製した。逆転写には、Random Primer (invitrogen)、またはオリゴ dT プライマーを用いた。プロトコールはメーカーの推奨するものを用い、逆転写の反応時間は1時間で行った。

### (3) RT-PCR に用いるコンセンサスプライマーの設計

Ensemble Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) に

において、メダカ、またはゼブラフィッシュにおける *vasa*, *cyp19a*, *42Sp50*, *dmrt1*, *foxl2* の5つの遺伝子の配列情報をそれぞれ入手した。次に、DDBJ の BLAST 検索

(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて、他魚種で報告された5つの遺伝子の配列情報をそれぞれ収集した。そして、得られた配列をそれぞれ遺伝子ごとにマルチプルアライメント解析に供し、配列が高度に保存されている部位にプライマーを設計した。

### (4) RT-PCR

(2) で作製した cDNA、および (3) で作製したプライマーを用いて RT-PCR を行った。酵素は TAKARA Ex Taq (TaKaRa)、または Advantage 2 Polymerase Mix (clontech) を使用し、PCR 反応液の組成はメーカーの推奨するプロトコールに従って調製した。また、反応条件は TAKARA Ex Taq では 94°C 2分、94°C 30秒・55°C 30秒・72°C 3分を35サイクル、72°C 3分で行った。Advantage 2 Polymerase Mix では 94°C 2分、94°C 30秒・55°C 30秒・68°C 3分を35サイクル、68°C 3分で行った。得られた PCR 産物を1%アガロースゲル電気泳動に供し、予想される分子量に増幅産物が認められることを確認した。

### (5) RT-PCR によるホンモロコ *foxl2* の5'断片配列のクローニング

*foxl2* の5'断片配列は、(4) の手法により決定できなかった。そこで、ホンモロコと DNA 配列が高度に一致していると思われる *Gobiocypris rarus* の *foxl2* 配列を参照して、5'末端領域にプライマーを設計した。そのプライマーと (4) で作製した *foxl2* の5'-RACE GSP を用いて (3) で作製した cDNA をテンプレートとして、RT-PCR を行った。PCR は、Advantage 2 Polymerase Mix を用い、反応条件は 96°C 2分、96°C 30秒・60°C 30秒・72°C 45秒を35サイクル、72°C 3分で行った。得られた DNA 断片を B-4 と同様の手法で TA クローニングとシーケンス解析に供し、断片配列を決定した。

### (6) *in silico* 解析

得られた cDNA 配列を DDBJ の BLAST 検索に供し、相同性の高い配列を検索した。決定したそれぞれの cDNA 配列から演繹アミノ酸配列を得、それらと他種生物のアミノ酸配列とのアライメント解析を Vector NTI

(invitrogen) により行い、配列の相同性を解析した。そして、アライメント解析の結果を基に近隣結合法により分子系統樹を作製した。また、Pfam

(<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence/>) によりそれぞれの cDNA 配列のモチーフ検索を行った。

### (7) RT-PCR による発現解析

各組織 (脳・心臓・肝臓・腎臓・腸・骨格

筋・卵巣・精巣) からテンプレート cDNA を作製した。作製した cDNA を RQ1 RNase-Free DNase (Promega) による DNase 処理に供した。次に、DNase 処理済みの cDNA をテンプレートにして A) で設計したプライマーにより RT-PCR を行った。酵素は Blend Taq Plus を用い、反応液の組成はメーカーの推奨するプロトコールに従った。また、サーマルサイクラーのプログラムは、94°C 2 分、94°C 30 秒・58°C 30 秒・72°C 60 秒を 28、または 35 サイクル、72°C 3 分で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *vasa*

ホンモロコ *vasa* cDNA は、ORF が 2172bp、724 残基のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*) の *vasa* 塩基配列と最も高い相同性を示した。また、アライメント解析の結果、特にコイ科魚類の *Vasa* アミノ酸配列と相同性が高かった (Table 4)。分子系統樹の結果より、DEAD-box ファミリーの中で *vasa* クラスターに含まれることが明らかになった。また、モチーフ検索の結果、DEAD/DEAH box helicase 領域と Helicase conserved C-terminal domain 領域が存在した。RT-PCR による発現解析によって、雌雄の生殖腺双方に強い発現が認められ、その発現量に明確な差異は認められなかった。また、これまでに *vasa* 遺伝子の発現解析は、硬骨魚類ではゼブラフィッシュ、メダカ、ニジマスなどで行われているが (Olsen et al., 1997; Yoon et al., 1997; Braat et al., 1999; Weidinger et al., 1999; Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2000)、いずれの結果も始原生殖細胞系列での発現が認められると報告されており、本研究の結果と一致している。以上の結果より、ホンモロコ *vasa* 遺伝子の組織における発現様式が保存されていることが示された。

##### (2) *cyp19a*

ホンモロコ *cyp19a* cDNA は、ORF が 1536bp、512 残基のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、*Gobiocypris rarus* の *cyp19a* 塩基配列と最も高い相同性を示した。また、アライメント解析の結果、コイ科魚類と高い相同性があり、中でも *Gobiocypris rarus* の *Cyp19a* アミノ酸配列と高い相同性を示した。分子系統樹の結果より、*cyp19a* ファミリーの中で ovarian type のクラスターに含まれることが明らかとなった。また、モチーフ検索の結果、Cytochrome P450 領域が存在した。RT-PCR による発現解析によって、生殖腺に強い発現が認められ、28 サイクルの結果より卵巣において精巣よりも強い発現が確認された。これまでに行われたゼブラフィッシュ、*Silurus meridionalis* Chen における *cyp19a* の発現解析の結果において、卵巣型のアロマ

ターゼは成熟卵巣では精巣よりも強い発現が認められており (Sawer et al., 2006; Liu et al., 2007)、本研究の結果と一致している。また、様々な魚類における発現解析の結果から、生殖腺以外にも微弱な発現が認められることがあり、それらは生物種間で決まったパターンが存在しないことが報告されており (Piferrer and Blázquez, 2005)、今回心臓で見られた弱い発現もそれらの一種であることが考えられる。以上より、ホンモロコ *cyp19a* 遺伝子の組織における発現様式は保存されていることが示された。

##### (3) *42Sp50*

クローニングの結果、ホンモロコ *42Sp50* cDNA は、ORF が 1374bp、458 残基のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、メダカ (*Pagrus major*) の *42Sp50* 塩基配列と最も高い相同性を示した。また、アライメント解析の結果、コイ科魚類であるゼブラフィッシュと高い相同性を示した。分子系統樹の結果より、Elongation factor 1 family の中で *42Sp50* のクラスターに含まれることが明らかとなった。また、モチーフ検索の結果、Elongation factor Tu GTP binding domain、Elongation factor Tu domain 2、Elongation factor Tu C-terminal domain が存在した。RT-PCR による発現解析によって、生殖腺に強い発現が認められ、28 サイクルの結果より卵巣において精巣よりも強い発現が確認された。これまでのメダカ、およびアフリカツメガエルにおける発現解析の結果では、卵母細胞に特異的に発現する遺伝子として報告されており (Kanamori, 2000; Viel et al., 1991)、本研究で観察された精巣での発現は、これらに反する。しかし、一章の結果よりその配列は高度に保存されていることが示され、その機能も保存されていると示唆されることから、ホンモロコにおいてもその発現様式は保存されていると推測される。そこで、精巣において増幅産物が検出された原因には、ファミリー遺伝子である EF-1 $\alpha$  を非特異的に検出している可能性が考えられる。しかし、用いたフォワード側のプライマー配列は EF-1 $\alpha$  のものとは 10 塩基異なっており、EF-1 $\alpha$  が発現する他の組織において増幅産物が検出されていないことから、この可能性は少ないと考えられた。よって、精巣での増幅産物は RT-PCR 法の検出感度の高さにより、わずかに存在する雌性生殖細胞の発現を検出したものではないかと推測した。そこで、これらの真偽を確認するため、*in situ* hybridization により組織上でその発現細胞を特定することが必要であると示された。

##### (4) *dmrt1*

クローニングの結果、ホンモロコ *dmrt1* cDNA は、ORF が 618bp、206 残基のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、ゼブ

ラフィッシュ (*Danio rerio*) の *dmrt1* 塩基配列と最も高い相同性を示した。また、アライメント解析の結果、メダカとはそれほど高い相同性が見られなかったが、コイ科魚類であるゼブラフィッシュとは高い相同性を示した。分子系統樹の結果より、*dmrt* ファミリーの中でも、魚類の *dmrt1* のクラスターに含まれることが明らかとなった。また、モチーフ検索の結果、Double-sex mab3 related transcription factor 1 の一部が存在していた。RT-PCR による発現解析によって、生殖腺に強い発現が認められ、28 サイクルの結果より精巣において卵巣よりも強い発現が確認された。これまでのニジマス、およびゼブラフィッシュ、*Silurus meridionalis* Chen における発現解析の結果では、いずれも精巣のほうが卵巣よりも強い発現が報告されており (Marchand et al., 2000; Guo et al., 2005; Liu et al., 2007)、このことは本研究における結果と一致する。また、メダカにおいて *dmrt1* が生殖細胞以外にも弱い発現が見られることが報告されており (Ohmuro-Matsuyama, 2003)、このことも今回、脳と腸に見られた弱い発現と一致する。以上より、ホンモロコ *dmrt1* 遺伝子の組織における発現様式は保存されていることが示された。

#### (5) *foxl2*

クローニングの結果、ホンモロコ *foxl2* cDNA は、ORF が 918bp、306 残基のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、*Gobiocypris rarus* の *foxl2* 塩基配列と最も高い相同性を示した。また、アライメント解析の結果、コイ科魚類と高い相同性を示し、中でも *Gobiocypris rarus* の *Foxl2* アミノ酸配列とは、100% と非常に高い相同性を示した。分子系統樹の結果よりコイ科魚類のクラスターに含まれることが明らかとなった。また、モチーフ検索の結果、Fork head domain が存在していた。RT-PCR による発現解析によって、生殖腺のうちで卵巣に強い発現が認められた。また、脳においても同様に強い発現が認められた。これまでに、硬骨魚類ではナイルティラピアとカンモンハタにおいて、脳、下垂体、鰓、卵巣において発現が認められており (Wang et al., 2004; Alam, 2008)、本研究における結果と一致する。以上より、ホンモロコ *foxl2* 遺伝子の組織における発現様式は保存されていることが示された。

#### (6) まとめ

ホンモロコから *vasa*, *42Sp50*, *cyp19a*, *dmrt1*, *foxl2* 遺伝子のクローニングに成功した。いずれの遺伝子においても、配列中の機能領域が強く保存されており、その機能が保存されていることが示唆されたことから、当初目的としていたマーカー遺伝子として用いることが可能であると判断した。

また、5 種の遺伝子を通じて近縁種である

コイ科魚類との配列類似性が高く、今後、他の遺伝子クローニングを行う際には、それらの配列情報を参照することでスムーズなクローニングが行えるものと期待できた。特に、*Gobiocypris rarus* とは ORF 領域だけではなく 5'、3' -UTR 領域においても配列が高度に一致しているため、その配列情報は重要なものとなるだろう。*42Sp50* はメスへの分化が顕在化したことを示すマーカー遺伝子として有用であることが示された。孵化後 40 日前後からメス分化が完了する個体が発現することは明らかとなった。5 種の遺伝子のうち、*42Sp50* を除く 4 種では、いずれもその発現様式が既報のものと同じであり、組織における発現様式の保存性が確認された。*42Sp50* では、卵巣に強い発現が見られる点では、他魚種の既報のものと同様であったが、精巣においても発現が検出されたことから、その発現細胞を確認するため、*in situ* hybridization により組織上でその発現細胞を特定することが必要であると考えられた。

また、遺伝子導入ホンモロコの作製を試み、導入遺伝子を約 200 個の受精卵にマイクロインジェクション法により導入したが、導入遺伝子を次世代に持つ個体を得ることはできなかった。

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

① 芦田裕史・木下政人、小林 徹 : ホンモロコ仔魚における性分化関連遺伝子の発現動態。平成 24 年度日本水産学会春季大会 2012 年 3 月 27 日 東京海洋大に於いて

② 芦田裕史・上山直城・木下政人・小林徹 : ホンモロコ性分化関連遺伝子の発現解析。平成 23 年度 日本水産学会 秋季大会 2011 年 9 月 29 日 長崎大学に於いて

③ 芦田裕史・上山直城・木下政人・小林 徹 : ホンモロコの性分化に関与する遺伝子、*Foxl2*, *Dmrt1* の単離と発現解析。平成 23 年度日本水産学会春季大会 2011 年 3 月 30 日 東京海洋大に於いて

④ 上山直城・芦田裕史・小林徹・村井直正・木下政人 : ホンモロコ *vasa*, *42Sp50*, *CYP19a* 遺伝子クローニングと発現解析。平成 21 年度 日本水産学会 秋季大会 2009 年 10 月 2 日 いわて県情報交流センター・アイーナに於いて

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 政人 (KINOSHITA MASATO)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：60263125

(2)研究分担者

小林 徹 (KOBAYASHI TOURU)  
近畿大学・農学部・准教授  
研究者番号：00298944

(3)連携研究者

( )

研究者番号：