

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22132003

研究課題名（和文）W染色体とY染色体に制御される性差構築

研究課題名（英文）sex differences regulated by W- and Y-sex chromosomes

研究代表者

伊藤 道彦 (Ito, Michihiko)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：90240994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 79,700,000円

研究成果の概要（和文）：性決定遺伝子の機能・分子進化や初期性差構築の分子機構を、ZW型のアフリカツメガエル(*X. laevis*)、さらにXY型のマウスやメダカで比較解析を行い、以下のことが示唆された。1. *X. laevis* WリンクDM-Wはアンチ精巣型の性（雌）決定遺伝子である。2. *Dmrt1*はイントロンをプロモーターに分子進化させ、オス化機能を獲得した。3. 性ホルモン産生細胞の集団からなるmass-in-line構造を*X. laevis*生殖巣で発見した。4. オスを介して促進される突然変異（オス駆動進化）は、減数分裂時の組換えによって抑制される5. 脊椎動物において、性染色体と性決定遺伝子の共進化仮説を提唱した。

研究成果の概要（英文）：We examined sex-determining and -differentiating mechanisms in various vertebrate species including African clawed frogs *Xenopus laevis*, sand lamprey, leopard gecko, mouse, and teleost fish medaka, and obtained the following conclusion. 1. DM-W may be a sex (female)-determining gene as an anti-testis forming gene in *X. laevis*. 2. *Dmrt1* got another promoter within the first intron for masculinization of somatic cells during vertebrate evolution. 3. We discovered the 'mass-in-line' structure in *X. laevis*, of which analysis suggests that the default sex is female in the species. 4. Undifferentiated sex chromosomes easily allow replacement of a sex-determining gene with another new one. 5. Meiotic recombination counteracts male-biased mutation (male-driven evolution).

研究分野：分子発生進化学

キーワード：性決定 性分化 性染色体 雄駆動進化 プロモーター 性ホルモン アフリカツメガエル 転写因子

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の性染色体に依存した性決定様式は、雄ヘテロ (XX♀/XY♂) 型と雌ヘテロ (ZZ♂/ZW♀) 型に大別される。XX/XY 型の哺乳類あるいは魚類メダカでは、Y染色体上にオス誘導の性決定遺伝子として **SRY** (1990年) あるいは **DMY** (2002年) が同定されていた。我々は、アフリカツメガエルの性決定遺伝子 **DM-W** の単離・解析を 2008 年に報告したが、この報告は、脊椎動物の性決定遺伝子として 3 番目、ZZ/ZW 型あるいはメス決定遺伝子としては初であった。特筆すべきは、アフリカツメガエル **DM-W** とメダカ **DMY** は、両者共に DM 型遺伝子ファミリーに属する **DMRT1** 遺伝子の重複によって新たに誕生した性決定遺伝子である点である。すなわち、両種においては、XX/XY、ZZ/ZW と性決定様式は逆であるが、性決定の分子機構に共通性 (普遍性) が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、WおよびY染色体上に座位する性決定遺伝子の機能と分子進化、および性決定遺伝子有無による初期性差構築の分子機構を各種脊椎動物種で比較解析し、脊椎動物における性差構築システムの多様性および普遍性を考察することである。

3. 研究の方法

(1) 動物：主に ZZ/ZW 型の両生類アフリカツメガエルを用いて解析を行った。更に、その比較解析等を目的として、XX/XY 型の哺乳類マウスと真骨魚類メダカ、ZZ/ZW 型のニワトリ、両様式をもつ両生類ツチガエル、爬虫類レパードゲッコー、無顎類スナヤツメウナギを用いた。

(2) トランスジェニックスの作製：アフリカツメガエルにおいて、**DM-W** あるいはその祖先遺伝子 **DMRT1** の short-hairpin 型のノックダウンベクターを精子核と共に顕微受精時に導入した。

(3) マイクロアレイ解析：アフリカツメガエルの性定期直後の ZZ および ZW 生殖巣の RNA を抽出後、(株)DNA チップ研究所に解析を委託した。

(4) 5'- および 3'-RACE: 脊椎動物各種の精巣から RNA を抽出し、**DMRT1** に特異的なプライマーを用いて、5'-、3'-RACE を行った。

(4) 組織学的発現解析：各遺伝子特異的プローブを用い、whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション後、切片を作製した。

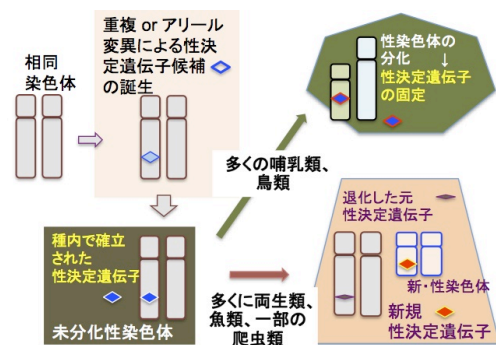
4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル雌ゲノム特異的遺伝子 **DM-W** による性決定の分子機構 -**DM-W** はアンチ精巣型の性 (雌) 決定遺伝子である-

アフリカツメガエルで **DM-W** ノックダウン個体を作製したところ、ZZ 胚は正常な雄成体に成長したが、ZW 胚は、卵巣の成長・成熟が見られない、あるいは、精巣を保持 (性転換) した成体に成長した。性転換した精巣の中に精子が認められた事から、アフリカツメガエルでは、**DM-W** 1 個の遺伝子の発現低下で正常なオス個体ができると考えられた。また、**DMRT1** 過剰発現 ZW 幼生に精巣構造が認められた事、培養細胞系で **DM-W** は **DMRT1** の転写因子としての機能を抑制する事から、**DM-W** は、**DMRT1** の雄化機能を抑制することによって、結果的に、雌化 (卵巣形成) を誘導する分子機構が示唆された (Yoshimoto et al. Development 2010)。

(2) 性決定遺伝子の分子進化および性染色体の共進化 -性染色体分化の進行は性決定遺伝子を固定化させる-

3 種の転写因子をコードする性決定遺伝子『**SRY** および **DM-W**, **DMY**』とそれらの祖先遺伝子『**SOX3** および **DMRT1**』を、哺乳類各種、メダカ・アフリカツメガエルとその近縁種で塩基配列の分子進化解析を行ったところ、3 つの性決定遺伝子は共に、祖先遺伝子に比べ、進化速度が早い事がわかった。また、脊椎動物における性決定遺伝子とその性染色体との関連を考察し、性染色体未分化時は性決定遺伝子

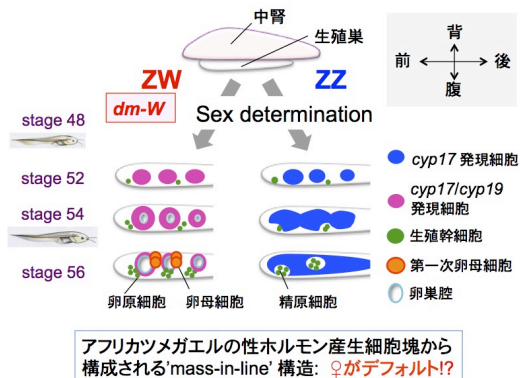


脊椎動物における性決定遺伝子と性染色体との共進化

の変化が起りやすいのに対し、一端、性染色体の分化が進行すると、性決定遺伝子は固定化される傾向がある、という説を提唱した (Mawaribuchi et al. Chromosome Res. 2012).

**(4) アフリカツメガエル初期雌雄生殖巣形成における mass-in-line 構造の発見** -この種では形態学的観点からはメスがデフォルトである-

アフリカツメガエルの性決定直後の遺伝的雌雄の生殖巣由来の RNA を用いたマイクロアレイ解析によって、アンドロゲン合成酵素遺伝子の 1 つ *Cyp17* が ZW に比べ ZZ で多量に発現している事がわかった。そこで、エストロゲン構成酵素遺伝子の 1 つ *Cyp19* と共に real-time PCR あるいは in situ ハイブリダイゼーション解析を行った。その結果、哺乳類マウスとは違い、アフリカツメガエルでは、性決定直後から性ホルモン合成系遺伝子 *Cyp17* が遺伝的雌雄 (ZZ で少量, ZW で多量) 共に、*Cyp19* が遺伝的雌 (ZZ) に特異的に発現していることがわかった。興味深い事に、性決定期後の生殖巣において、*Cyp17* の発現細胞の塊が、前後軸に沿ってドット状 ("mass-in-line" と呼称) の存在が観察された。分化に伴い、この "mass-in-line" 構造は ZZ では消失したが、ZW では維持された。ZW では、*Cyp19* も "mass-in-line" の発現を示し、卵母細胞が出現する頃、その細胞塊内に卵巣腔が生じた。これらの事から、この性ホルモン産生細胞集団からなる "mass-in-line" 構造は、卵巣腔構築に直接関与し、エストロゲンがその構築に重要な機能を果たすことが示唆された。更に、この "mass-in-line" 構造は、雌雄共に性決定直後から構築され、オスだけ脱構築されることから、卵巣腔を作るためにアプライオリに準備されていたと考えられ、この種では構造的にはメスがデフォルトでと考えられた (Mawaribuchi et al. Endocrinology 2014)。



**(5) アフリカツメガエル DMRT1 の 2 つのプロモーターと機能** -DMRT1 は体細胞のオス化だけでなく、生殖細胞の発生に与する-

アフリカツメガエルの *DMRT1* の mRNA と遺伝子構造を解析したところ、雌雄の生殖幹細胞で発現するためにプロモーターが非コードエクソン 1 の上流に、生殖巣の体細胞で発現するためにプロモーターが第 1 イントロン内に存在する事がわかった。非コードエクソン 1 由来の mRNA を特異的にノックダウンした個体を作製し、雌雄分化が見られる幼生期で生殖巣を解析したところ、ZZ, ZW 共に生殖細胞数の減少が認められた。また、ZW 生殖巣の中には、生殖細胞減少が原因かと考えられる精巢構造の出現 (ZW のオス化) が少数ながら認められた。

**(6) 脊椎動物における Dmrt1 遺伝子の分子進化と機能** -Dmrt1 の体細胞オス化機能は無顎類以降の魚類進化過程で獲得された可能性がある-

さまざま動物種で、*Dmrt1* 関連のデータベース解析、動物間でのシntenニー解析、および発現解析を行った。その結果、*Dmrt1* は脊椎動物祖先で誕生し、当初は生殖細胞で発現・機能したと考えられるが、魚類以降の進化過程で、イントロン 1 内に体細胞発現用のプロモーターが分子進化し、体細胞でのオス化機能を獲得したと考えられた。

**(7) オス駆動進化と減数分裂時の相同組換えとの関連性** -減数分裂時の相同組換えはオス駆動進化を抑制する-

地域集団によって、XX/XY あるいは ZZ/ZW 型の性決定様式をもつツチガエルを用いて、性染色体リンクの相同領域 4ヶ所に関して、集団間で変異解析を行った。その結果、ツチガエルも、哺乳類や鳥類と同様に、オスを介して促進される突然変異 (オス駆動進化・male-driven evolution/male-biased mutation) が成立していることがわかった。更に、減数分裂像の観察と XY 集団と ZW 集団との突然変異率の相違の解析から、このオス駆動進化は減数分裂時の組換えによって抑制されることが示唆さ

れた。

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)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Tamura, K., Takayama, S., Ishii, T., Mawaribuchi, S., Takamatsu, N., and Ito, M. Apoptosis and differentiation of *Xenopus* tail-derived myoblasts by thyroid hormone. *J. Mol. Endocrinol.* **54**, 185-92, 2015. 査読有. doi: 10.1530/JME-14-0327.
- ② Tamura, K., Takamatsu, N., and Ito, M. Erythropoietin protects adult-type red blood cells from TRAIL1-induced cell death during red blood cell transition in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biochem.* **398**, 73-81, 2015. 査読有. doi: 10.1007/s11010-014-2206-0.
- ③ Mawaribuchi, S., Ikeda, N., Fujitani, K., Ito, Y., Onuma, Y., Komiya, T., Takamatsu, N., Ito, M. Cell-mass structures expressing the aromatase gene Cyp19a1 lead to ovarian cavities in *Xenopus laevis*. *Endocrinology* **155**, 3996-4005, 2014. 査読有. doi: 10.1210/en.2014-1096.
- ④ 回瀬 修治, 伊藤 道彦. アフリカツメガエルの性決定・性分化システム～脊椎動物における内分泌学的・進化的な性システム比較～. *比較内分泌学* **40**, 71-73, 2014. 査読無. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/nl2008jsce/40/152/40\\_71/article/references/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/nl2008jsce/40/152/40_71/article/references/-char/ja/)
- ⑤ Enomoto, A., Fukasawa, T., Takamatsu, N., Ito, M., Morita, A., Hosoi, Y., and Miyagawa, The HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin modulates radio sensitivity by downregulating serine/threonine kinase 38 via Sp1 inhibition. *Eur. J. Cancer* **49**, 3547- 3558, 2013. 査読有. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.034.
- ⑥ Molecular evolution of genes involved in vertebrate sex determination. Ito, M., Mawaribuchi, S. *eLS (Encyclopedia of Life Sciences)* 2013. **Review** 査読有. doi:10.1002/9780470015902.a0024948. <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0024948.html>
- ⑦ 伊藤 道彦 (全 1 人) 両生類・爬虫類・鳥類の性決定システムおよびその分子機構. *細胞工学* **32**, 181-187, 2013. 査読無. <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901399.html>
- ⑧ Molecular evolution of vertebrate sex-determining genes. Mawaribuchi, S., Yoshimoto, S., Ohashi, S., Takamatsu, N., and Ito, M. *Chromosome Res.* **20**, 139-151, 2012. 査読有. doi: 10.1007/s10577-011-9265-9.
- ⑨ Apoptotic and survival signaling mediated through death receptor members during metamorphosis in the African clawed frog *Xenopus laevis*. Ito, M., Tamura, K., Mawaribuchi, S., Takamatsu, N. *Gen. Comp. Endocrinol.* **176**, 461-464, 2012. 査読有. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.12.037.
- ⑩ Serine-Threonine Kinase 38 is regulated by Glycogen Synthase Kinase-3 and modulates oxidative stress-induced cell death. Enomoto, A., Kido, N., Ito, M., Takamatsu, N., Miyagawa, K. *Free Radic Biol Med.* **52**, 507-515, 2012. 査読有. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.006.
- ⑪ A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. Yoshimoto, S., Ito, M. *FEBS Journal* **278**, 1020-1026, 2011. **Review** 査読有. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.12.037.
- ⑫ Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: Implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. Yoshimoto, S., Ikeda, N., Izutsu, Y., Shiba, T., Takamatsu, N. Ito, M., *Development*, **137**, 2519-2526, 2010. doi: 10.1242/dev.048751.

[学会発表] (計 20 件)

【招待講演】を記載

- ① 伊藤 道彦 Molecular mechanisms of sex-determining system in *Xenopus laevis* and system evolution for sex determination. 日本遺伝学会 第86回大会. 2014. 9.17. 長浜バイオ大学 (滋賀県・長浜市)

- ② 伊藤 道彦 両生類の性決定・性分化機構  
第38回日本比較内分泌学会. 2013.10.26. 宮  
崎市民プラザ (宮崎県・宮崎市)
- ③ 伊藤 道彦 他4人. 両生類の雌雄生殖巣  
形成と性ホルモン産生制御. 日本下垂  
体研究会第28回学術集会, 2013. 8. 8. 花  
巻温泉千秋閣 (岩手県・花巻市),
- ④ Ito, M., Yoshimoto, S., Mawaribuchi, S.,  
Ikeda, N., Fujitani, K., Tamura, K.,  
Takamatsu, N. Opposite roles of *DMRT1*  
and its W-linked paralogue, *DM-W*, in the  
ZZ/ZW-type sex-determination in *Xenopus*  
*leavis*. NASCE 2011 (North American Society  
for Comparative Endocrinology), 2011. 7. 14.  
(Ann Arbor, USA).
- ⑤ Ito, M., Tamura, K., Mawaribuchi, S.,  
Takamatsu, N. Transition of blood cells from  
larva to adult. ISAREN 2011 (International  
Symposium on Amphibian and Reptilian  
Endocrinology and Neurobiology) 2011. 7.  
12. (Ann Arbor, USA).

[その他]

ホームページ

<http://www.seisa.med.kyushu-u.ac.jp/index.html>

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/joho/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 道彦 (ITO, Michihiko)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号 : 90240994

### (2) 連携研究者

田村 啓 (TAMURA Kei)

北里大学・理学部・助教

研究者番号 : 50458767

### (3) 研究協力者

柴田 安志 (SHIBATA, Yasushi)

高松 信彦 (TAKAMATSU, Nobuhiko)

回渕 修治 (MAWARIBUCHI, Shuuji)

藤谷 和子 (FUJITANI, Kazuko)

池田 望 (IKEDA, Nozomi)

大友 麻子 (OTOMO, Asako)

和田 美加子 (WADA, Mikako)

武蔵島 正人 (MUSASHIJIMA, Masato)

中迫 啓 (NAKASAKO, Kei)

岡野 則仁 (OKANO, Norihito)

大橋 俊太郎 (OHASHI, Shuntaro)

鎌田 洋輔 (KAMATA, Yosuke)

村田 恵理子 (MURATA, Eriko)

野上 明日香 (NOGAMI, Asuka)