

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04401

研究課題名(和文) 平胸類エミューを用いた鳥類の性決定遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of a sex-determining gene in Emu

研究代表者

黒岩 麻里 (Kuroiwa, Asato)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20372261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類のW染色体には古くから卵巣決定遺伝子が存在することが予想されているが、未だ同定に至っていない。本研究の目的は、未だ明らかとなっていない鳥類の性決定(卵巣決定)遺伝子を、Z染色体とW染色体の差が小さいエミューを用いて同定することである。そのために、以下の3つの研究計画を実施した。(1) 細胞培養, 染色体標本作製, マイクロダイセクションとZ, W染色体DNAの抽出、(2) 性決定時期の確定、(3) RNA-seqによるメス特異的な転写産物の同定。その結果、ZおよびW染色体上の候補配列を選定するとともに、DMRT1遺伝子にバリエーションが存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A sex of birds is genetically determined. However, the female sex-determining gene on the W chromosome has been not identified. To identify a novel gene located on the W which function on the ovary differentiation in emu, I performed three approaches: 1) cell culture, chromosome preparation, micro dissection, DNA purification of Z and W chromosome, 2) identification of sex-determining stage of embryo, 3) mRNA-seq analysis in gonads. I identified candidates genes for sex-determination located on the Z and W chromosomes. Furthermore, transcriptional variants of DMRT1 in emu were detected.

研究分野：生殖発生学

キーワード：W染色体 性決定機構

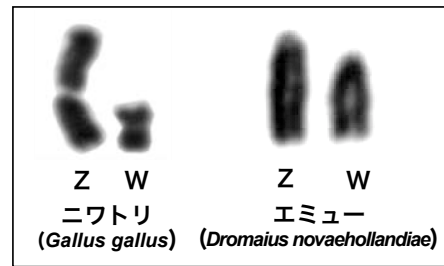
### 1. 研究開始当初の背景

鳥類は ZZ/ZW 型の性染色体をもち、遺伝的に性が決定される。鳥類の性決定様式については古くから議論があり、「Z 遺伝子量説」と「優性 W 遺伝子説」の二つが提唱されている。前者を支持するのが *DMRT1* 遺伝子の存在である。*DMRT1* 遺伝子は、ショウジョウバエや線虫から脊椎動物まで広く保存されており、脊椎動物においては精巣分化に重要な役割を果たす。鳥類の *DMRT1* 遺伝子は Z 染色体上に存在し雌雄間で遺伝子量が異なること（鳥類では遺伝子量補償機構がないと考えられている。Kuroiwa et al, *Cytogenet Genome Res*, 99:310-4, 2002）、性決定時期にオスの生殖腺で発現が認められること、本遺伝子をノックダウンすると ZZ 個体の生殖腺が卵巣様になり (Smith et al, *Nature* 461:267-71, 2009)、過剰発現させると ZW 個体の生殖腺で精巣分化に働く他の遺伝子の発現が認められること (Lambeth et al, *Dev Biol* 389:160-72, 2014, 申請者は 4 番目の著者) などから、現在 *DMRT1* 遺伝子は、最も有力な鳥類の性決定遺伝子の候補として考えられている。

しかし「優性 W 遺伝子説」を完全に棄却することはできない。その理由として、多くの鳥類種において野生下での性転換が報告されているが、その全てはメスからオスへの性転換であり、オスからメスへの報告は一例もないことが挙げられる。これはすなわち、W 染色体なくしてメスにはなり得ないことを示唆する。よって申請者は、精巣分化に主に働く *DMRT1* 遺伝子に加え、卵巣分化に積極的に働く（あるいは精巣分化を阻害する）W 染色体上の遺伝子が必ず存在すると考えている (Kuroiwa, *Nature* 462:34, 2009, 申請者コメント記事, 査読なし)。

これまでにいくつかの W 染色体上の遺伝子が鳥類の性決定遺伝子の候補として報告されているが、現在はこれらすべてが性決定に寄与しないことが明らかとなっている。また、ニワトリは鳥類の代表的なモデル動物であり、ドラフト状態ではあるがゲノム配列が解読されている。しかし、W 染色体には多くの反復配列や転移因子配列が蓄積しており、解読が非常に難しい状況にある。さらにニワトリの Z と W 染色体は大きく分化しその差が著しく、W 染色体特異的な配列が膨大に存在することから、候補遺伝子を特定することが極めて困難である。

そこで、本研究は Z と W の分化の程度が小さいエミューに着目した。ニワトリを含め多くの鳥類種は深胸類に属し、深胸類の Z と W は形態的にも分子的にも大きく異なる (右上図)。



ニワトリは大きく分化しているのに対し、エミューは分化の程度が小さい。逆位などの構造変化により、両種のZW染色体の形態は異なる。Nishida-Umehara et al. 2007, Fig.7を改編。

しかし、地上棲へと進化した平胸類（走鳥類）の Z と W 染色体は、若干の形態的な差が認められるものの相同領域を大きく残している。つまり、エミューの W 染色体の大部分は Z 染色体で相同であり、限られた W 染色体特異的な配列を効率よく絞り込むことができる。本研究は、エミューの W 染色体特異的なゲノム配列を得て、性決定時期のメスの生殖腺に発現している転写産物の配列と比較することにより、W 染色体上の性決定候補遺伝子を絞り込む。



エミュー卵と胚

### 2. 研究の目的

本研究では、分化の程度が小さいエミューの Z と W 染色体のゲノム配列を比較解析する。胚の発生ステージを行い、エミューの性決定時期を推定するとともに、性分化関連遺伝子の配列決定と発生ステージに応じて発現量を確認し、発現様式を決定する。さらに、性決定時期および性決定後の生殖腺の転写産物を網羅的に比較解析する。以上の解析を行い、W 染色体上の新規性決定（卵巣決定）遺伝子を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養、染色体標本作製、マイクロダイセクションと Z, W 染色体 DNA の抽出

エミューの受精卵をハッチする。初期胚の一部から DNA を抽出し、PCR による性別判定にてメス (ZW 型) と判明した初期胚から繊維芽細胞を培養し、染色体標本作製する。

マイクロダイセクションにより Z, W 染色体をそれぞれ採取し、DOP-PCR による増幅を行う。

## (2) 性決定時期の確定

エミュー初期生殖腺の発生ステージングを雌雄ともに行い、エミューの性決定時期を推定する。エミュー初期胚の発生ステージについては、先行研究において詳細に報告されており (Nagai et al, *Dev Dyn* 240:162-75, 2011)、ニワトリの発生ステージと比較することにより、エミューの性決定時期を大まかに予測することができる。その上で、精巣および卵巣分化に機能することが知られている遺伝子群をマーカーとし、詳細な性決定時期を確定する。

ニワトリで報告されている精巣および卵巣マーカー遺伝子のエミューホモログの単離を行い、エミュー初期生殖腺での発現様式を確認することにより、性決定時期を確定する。

## (3) RNA-seq によるメス特異的な転写産物の同定

性決定時期と、性決定時期の1日前、性決定時期の1日後、計3つの発生ステージのエミューの生殖腺を雌雄別にサンプリングし、RNAを抽出、精製する。初期胚の性は、血液からDNAを抽出しPCRにより判別する。

RNAの品質確認を行い、ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーMiSeqで解析を行う。

雌雄間および発生ステージ間で比較し、メス特異的かつ性決定時期に発現がみられる転写産物を同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞培養、染色体標本作製、マイクロダイセクションとZ, W染色体DNAの抽出

染色体標本からのマイクロダイセクションは、Z、W、一対の4番染色体の形態が類似しており、顕微鏡観察では判別が難しかった。そこで、各染色体からDOP-PCRによってDNAを増幅した後、Z由来、W由来のDNAであることを確認するためにPCR判定を行った。判定に用いたマーカーは研究分担者の西田氏と松田氏により報告されているkw1配列(W特異的)とCHD1遺伝子配列(ZとWに共通)を用いた (Ishijima et al, *Cytogenet Genome Res* 142:255-67, 2014)。しかし、染色体1本から得た増幅DNAを鋳型とすると、PCR増幅が不安定であったため、判別はできなかった。そこで、4本を同時に採取し、プールしてDNA増幅を行った。配列解析の結果、複数の性染色体連鎖遺伝子配列を得ることができた。

### (2) 性決定時期の確定

性決定前、性決定時期、性決定後の3ステージに分けてサンプリングした雌雄の生殖腺において解析を行い、質、量ともに十分なリードを得ることができた。得られたリードは、報告されているニワトリのZ染色体ゲノ

ム相列を参考に、性染色体上のものを選別し、さらに雌雄間で比較することにより、ZあるいはW染色体上の配列を選定した。

ニワトリにおいて精巣分化および卵巣分化に働くことが知られている性分化関連遺伝子のエミューホモログについて、配列を決定し、発現定量を行った。対象とした遺伝子は、*DMRT1*、*AMH*、*CYP19A1* (aromatase)、*FOXL2*である。

RT-PCRおよびqRT-PCRによる発現定量を行った。発生ステージが進むにつれ、各遺伝子の発現量は増加し、ニワトリで報告されている発現様式と類似していたことから、これら遺伝子はエミューにおいても同様の働きを担っていることが示唆された。*DMRT1*はZ染色体上に存在し、鳥類の精巣決定遺伝子と考えられている。本研究より、エミューの*DMRT1*には複数のバリエーションが存在することが示唆された。さらにエミューでは選択的ポリアダニル化によりバリエーションが生じていることが確認できた。本遺伝子における選択的ポリアダニル化は報告がないため、この成果は鳥類の性決定メカニズムを研究する上で重要な知見となる。

## 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 0件)

[学会発表] (計 1件)

Sakurai S, Kuroiwa A.

Emu (*Dromaius novaehollandiae*), a new model for molecular mechanism of sex-determining in birds. *Advanced genome science international symposium "The start of new genomics"*, Jan 2017

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒岩 麻里 (KUROIWA, Asato)  
北海道大学・理学研究院・教授  
研究者番号: 20372261

### (2) 研究分担者

河野 友宏 (KOUNO, Tomohiro)

東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：80153485

松田 洋一 (MATSUDA, Yoichi)  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号：70165835

西田 千鶴子 (NISHIDA, Chizuko)  
北海道大学・大学院理学研究院・助手  
研究者番号：50106580

(3) 連携研究者  
該当なし

(4) 研究協力者  
該当なし