

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07167

研究課題名(和文)性決定遺伝子の使い回しの分子機構

研究課題名(英文)The molecular mechanisms for different use of a sex determining gene

研究代表者

三浦 郁夫 (Miura, Ikuo)

広島大学・両生類研究センター・准教授

研究者番号：10173973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ツチガエルにおけるXX-XY型オス決定とZZ-ZW型メス決定の使い回しの分子機構を解明するため、性決定候補遺伝子SOX3の発現調節に注目して調べた。SOX3の発現はXX-XYおよびZZ-ZW型の両方においてメスで高いこと、高発現する雑種XZ雌ではZ-SOX3も発現誘導されることから、SOX3はメス決定が主な機能であり、オス決定はその抑制であることが示唆された。そして発現誘導にはエレメントの存在から自身によるオート制御が関与し、通常抑制されているZ-SOX3では、当該配列近郊のメチル化が抑制解除に関与することが示唆された。ただし、性染色体レベルでのシトシンのメチル化の違いは検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms for different use of a sex determining gene, male or female determination, in the frog *Glandirana rugose*, we studied on the expression regulation of SOX3, a strong candidate gene. It was found that SOX3 was highly expressed both in ZW and XX females and even Z-SOX3 was up-regulated in XZ female hybrids. These imply that the original, major function of SOX3 is a female determination and it is downregulated for male determination. The finding of SOX3 recognition element site on SOX3 upstream region suggests that expression of SOX3 is regulated by its autoregulation, and cytosine methylation analysis implies that methylation of the short sequence close to the SOX3 element is involved in up-regulation of Z-SOX3 by taking off the inhibition. On the other hand, at chromosome level, we did not identify any differences of cytosine methylation patterns among the X, Y, Z and W chromosomes.

研究分野：遺伝学

キーワード：性決定

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物では、これまでのところ基本的に4種類の異なる性決定遺伝子 (Sox3, Dmrt1, TGF- $\beta$  とそのレセプター) が種の間で使い回されていることがわかってきた。すなわち、性決定遺伝子カスケードのトップに君臨できる遺伝子は4つに限られ、それぞれの種の事情によって性決定遺伝子の選択が行われていることを示す。性決定遺伝子が同定された11動物種の中にはXY型が8種、ZW型が3種含まれる。ZW型では、本来、オスを決定する遺伝子 Dmrt1 の退化型 (ドミナントネガティブ型) と欠失型 (2 コピーのオスに対し、メスは1 コピー) がメスを決定しており、ここにXY型とZW型間でひとつの遺伝子の使い回しが見て取れる。性という現象は、生物の生存や進化にとって欠かせない仕組みである。とくに性決定遺伝子の使い回しの進化的理由とその分子機構の解明は、性の仕組みを理解する上で極めて重要であると考えられる。しかし、この課題に関する研究はまだ緒に付いたばかりである。

## 2. 研究の目的

私達はこれまで、日本に生息するツチガエルに注目して性決定に関する研究を展開してきた。このカエルは、地域集団によって性決定機構が異なり、XY型とZW型の2つの様式が存在する。同一種内に2つの性決定機構を有する種は、このカエルが世界に唯一であり、しかも、XY型性染色体とZW型性染色体はお互いに相同である。それゆえ、2つの性決定機構の遺伝的違いは極めて小さいと予想され、性決定の進化機構、とくにXY型とZW型の相互変換の解明には最適の研究材料である。これまでの研究において、性染色体上に乗るSOX3遺伝子の機能解析実験を行い、SOX3がXY型ではオス決定、ZW型ではメス決定への関与を示唆する成果を得た。しかも、両者の翻訳領域の配列には差がないことから、SOX3遺伝子の発現制御 (発現量や発現細胞の違い) によって、XY型とZW型システムの使い分けが可能であることを示唆している。そこで本研究では、X、Y、Z、W染色体のSOX3遺伝子の発現細胞や調節機構を調べることで、ひとつの遺伝子がXY型とZW型の両方で使い回される仕組みの分子基盤を明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗SOX3抗体による免疫染色

ツチガエル生殖腺におけるSOX3タンパクの局在を同定するため、SOX3の合成ペプチドを抗原としてウサギによる抗SOX3抗体を作製した。この抗体により、ツチガエル幼生の未分化生殖腺の組織切片を用いて免疫染色を行った。

### (2) SOX3遺伝子3'末端へのEGFPノックインカエルの作成

発生初期から成体まで、生体におけるSOX3

遺伝子の発現を網羅的に解析するため、SOX3遺伝子領域へのEGFPノックインカエルの作成を行った。EGFPのコード領域 (714塩基) とその両端にsox3遺伝子配列 (60塩基と58塩基、ストップコドンを含む領域) を含む836塩基を合成し、その一本鎖をCrispra/Cas9と共に受精卵へ導入した。

### (3) 性染色体のメチル化の検出

染色体レベルでDNAのメチル化を検出するため、DNAメチルシトシン (5mC) およびその酸化産物であるDNAヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に特異的な抗体を用いて、XX、XYおよびZZ、ZW細胞の染色体で免疫染色を行い、シトシンのメチル化パターンの比較を行った。また、染色体標本は血液を採取し、リンパ球の短期培養によって中期像を得て作成した。

### (4) CG islandのメチル化検出

SOX3遺伝子上流領域におけるCGダイマーのメチル化を検出するため、バイサルファイト法 (Wako) を用いた。

### (5) XZ個体の作成と性

ZZ-ZW型の大坂集団、XX-XY型の関ヶ原および浜松集団を用いて、XX x ZZの交配を行いXZを作成した。さらに、このXZを用いてXZ x ZZないしXX x XZの戻し交配を行い、XZの性を生殖腺の形態に基づいて調べた。

## 4. 研究成果

### (1) XY型とZW型集団におけるSOX3遺伝子の発現細胞

これまでの研究において、ZWメスの未分化生殖腺におけるSOX3タンパク質は中腎細胞に局在し、未分化生殖腺の中央部 (髄部) への移動を示唆する結果を得ている。これはまだ報告がない新規の発

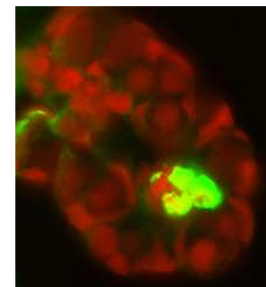


図1 XXメスの未分化生殖腺におけるSOX3の発現細胞 (緑)

現パターンであり、メス決定との深い関連性が推測される。今回、XY集団において、抗SOX3抗体による免疫染色を行って調べたところ、XX雌 (13日以降の幼生) においてもZW雌と同様、生殖腺の髄部に陽性の体細胞を確認した (図1)。とくに髄質部と皮質部の境界に陽性細胞が位置しており、ZW雌と同様の発現細胞と予想された。一方、XY雄の生殖腺ではいずれのステージにおいても明確なシグナルを観察できなかった。

### (2) ノックインによるSOX3遺伝子の発現解析

ツチガエルにおいてSOX3遺伝子の発現を幼生期から網羅的に正確に検出するため、SOX3遺伝子翻訳領域末端へEGFP断片を導入

し、ゲノム内で融合遺伝子の作成を行った。その結果、2種類の導入結果が得られた。一つは、計画通り、終止コドン直前に断片が組み込まれた。ただし、導入されたEGFPは285塩基と短く、半分ほどの領域が欠失していた。また、SOX3の3'側の終止コドンTAA下流には7塩基の重複が生じていた。もう一つは、終止コドンのTを含み上流の393塩基を欠失していた。いずれもほぼ予定領域で正確な切断が生じたが、欠失を伴い、個体は幼生期中で発生が停止した。この実験は平成29年度も行っており、受精卵の取得が夏の後半であったため、現時点で導入個体は幼生の状態に留まっており結果を確認できていない。

### (3) XY型とZW型集団における常染色体と性染色体のメチル化

DNAメチルシトシン(5mC)およびその酸化産物であるDNAヒドロキシメチルシトシン(5hmC)に特異的な抗体を用いて、XX, XYおよびZZ, ZW細胞の染色体で免疫染色を行い、シ

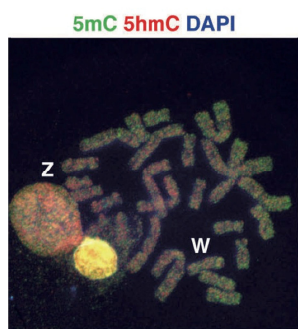


図2 ZW雌染色体のメチルシトシン(緑)およびヒドロキシメチルシトシン(赤)の抗体染色

トシンのメチル化パターンの比較を行った(図2)。その結果、両タイプにおいて、常染色体と性染色体の間、ないしZ, W, X, Y性染色体それぞれ間に染色パターンの違いを見いだすことはできなかった。これら4種の性染色体間におけるメチル化の程度はほ乳類や鳥類とは異なり、極めて小さいことが予想された。

(4) XZ個体の性とSOX3遺伝子のメチル化  
ツチガエルのXY型とZW型の性染色体はお互いに相同である。さらに両者の雑種XZも同じ染色体の形態を示す。そこで、XZ個体の生殖腺性分化の確認を行った。XX x ZZの4組の雑種交雑では、XZの83.1%がメス、残りがオスに分化した。一方、XX x XZないし、XZ x ZZの合計7組の戻し交雑では、XZの49.5%がメス、50.5%がオスに分化した。以上から、雑種交雑ではXZの多くがメスに分化する一方、戻し交雑ではXZが雌雄半々に分化することがわかった。

XZ成体の生殖腺と脳におけるSOX3遺伝子の発現をQ-PCR法で調べたところ、精巣で低く、卵巣及び脳で高い発現が観察された。特に、高発現を示す脳と卵巣ではZアレルの発現がXアレルより高いことがわかった。そこで、SOX3遺伝子の上流領域の配列を決定した

ところ、SOX3結合配列が見つかり、その5'側には、Z-SOX3には存在するがX-SOX3遺伝子には存在しない12塩基の特異的配列が見つかった。このZ特異的配列の内部に存在するCGダイマーのメチル化を調べたところ、Zアレルが高発現するXZ個体ではメチル化の比率が高い傾向が示された。この結果から、Z特異的配列が負の発現調節をしており、そのメチル化は発現抑制を解除することが示唆された。以上から、XZ個体におけるSOX3遺伝子の発現差にはZアレルの発現が鍵であり、Z特異的配列のメチル化を介したオートレギュレーションの差が個体間の発現差を生じ、これが雌雄決定に関与している可能性が示された。

### (5) まとめと展望

本研究では、SOX3遺伝子のオス決定とメス決定の使い分けの分子機構を解明する目的でSOX3遺伝子の発現調節機構に注目して調べた。発現は雌で高いこと、高発現するXZ雌個体ではZ-SOX3が発現誘導されていることから、SOX3はメス決定が主な機能であり、オス決定はその抑制による低発現で誘導されることが示唆された。そして発現誘導には自身によるオート制御が関与し、Z-SOX3ではそれが抑制されていること、抑制解除にはDNAのメチル化の関与がXZの解析で示唆された。ただし、染色体レベルでのDNAのメチル化の違いは検出できなかった。今後、より正確で網羅的なSOX3の発現解析を行うためEGFPのノックインの改良を行う。そして、ツチガエルにおけるXY型とZW型性決定の分子機構全体像の解明を目指す。

### 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 14件)

1. Miura I. (2018) Anomalies in the Coloration of Japanese Amphibians and Their Applications in Genetic Research. *KnE Life Sciences*, p97-107. DOI 10.18502/kls.v4i3.2110 査読なし
2. Nagai Y, Doi T, Ito K, Yuasa Y, Fujitani T, Naito J, Ogata M and Miura I. (2018). The distributions and boundary of two distinct, local forms of Japanese pond frog, *Pelophylax porosus brevipodus*, inferred from sequences of mitochondrial DNA. *Frontiers in Genetics*. 査読有り doi.org/10.3389/fgene.2018.00079.
3. Miura I. (2017) Sex determination and sex chromosomes in Amphibia. *Sexual Development*. 11:298-306. DOI:10.1159/000485270 査読有り
4. Miura I., Tagami M, Fujitani T, and Ogata M. (2017) Spontaneous tyrosinase mutations identified in



- albinos of three wild frog species. *Genes and Genetic Systems*. 92: 189-196. DOI: [10.1266/ggs.16-00061](https://doi.org/10.1266/ggs.16-00061) 査読有り
5. 三浦郁夫、尾形光昭(2017) カエルW染色体のターンオーバー 比較内分泌学 43 (161): 82-83. 査読有り
  6. 三浦郁夫 (2017) ニホンアマガエル、東西で遺伝的に違う 自然保護(日本自然保護協会) 556: 24-25. 査読なし
  7. Dufresnes C, Litvinchuk SN, Borzee A, Jang Y, Li J, Miura I, Perrin N, Stock M. (2016) Phylogeography reveals an ancient cryptic radiation in East-Asian tree frogs (*Hyla japonica* group) and complex relationships between continental and island lineages. *BioMed Central Evolutionary Biology*. 16: 253. DOI : 10.1186/s12862-016-0814-x 査読有り
  8. Miura I, Ohtani H, Ogata M, Ezaz T. (2016) Evolutionary changes in sensitivity to hormonally induced gonadal sex reversal in a frog species. *Sexual Development* 10(2):79-90. DOI:10.1159/000445848. 査読有り
  9. Mawaribuchi S, Ito M, Ogata M, Oota H, Katsumura T, Takamatsu N, Miura I. (2016) Meiotic recombination counteracts male-biased mutation (male-driven evolution). *Proc Biol Sci*. doi: 10.1098/rspb.2015.2691. 査読有り
  10. 三浦郁夫 (2016) ニホンアマガエル、実は日本国内東西で別種か *Academist Journal* 2016年12月24日 page 1-8. <https://academist-cf.com/journal/?p=2970> 査読なし
  11. 三浦郁夫、尾形光昭 (2016) カエル性染色体のリサイクル 生物の科学 遺伝 70(5): 385-387. 査読なし
  12. Miura I, Ohtani H, Fujitani T. (2015) Unusual ratios and developmental mortality in the rice frog *Fejervarya kawamurai*. *Chromosome Science* 18: 53-57. 査読有り
  13. Kubiura M, Miura I, Tada M (2015) Chromosomal distribution patterns of global 5mC and 5hmC on the ZZ/ZW and XX/XY chromosomes in the Japanese wrinkled frog, *Rana rugosa*, induced by Tet methylcytosine dioxygenase enzymes. *Chromosome Science* 18: 3-8. 査読有り
  14. 三浦郁夫 (2015) オオサンショウウオの遺伝的地域分化 -西側の集団は過去に一度絶滅を経験したという仮説- *SUZUKURI* 44: 10-11. 査読なし
- [学会発表](計 22件)
1. 三浦郁夫、イワンシトニコフ、ウラジミールファーシニン ロシア産ヨーロッパトノサマガエルの雑種発生について 日本爬虫両棲類学会第56回大会 11月26日 熊本市 2017年
  2. 檜垣友哉、尾形光昭、藤谷武史、田上正隆、関慎太郎、三浦郁夫 ニホンアマガエルの遺伝的地域差:日本東西の主要2グループと分布境界について 日本爬虫両棲類学会第56回大会 11月25日 熊本市 2017年
  3. Miura I, Ogata M, Ezaz T. Evolutionary reasons why a sex determining gene turnovers. Workshop "Cytogenetics in the genomic era" 2-3 February, 2017 Canberra, Australia
  4. Miura I, Ohtani H, Ogata M and Ezaz T. Evolutionary change of gonadal sex-reversal sensitivity to sex steroids and its relation to turnover of sex chromosomes in a frog. 9<sup>th</sup> international symposium on amphibian and reptilian endocrinology and neurobiology (ISAREN). 4-9 June 2017, Alberta, Canada.
  5. 三浦郁夫、尾形光昭、Tariq Ezaz ツチガエルW染色体のターンオーバー 染色体学会第67回大会 11月4日 東京 2016年
  6. 尾形光昭、丸野内淳介、田上正隆、伊藤道彦、三浦郁夫 長野県内におけるツチガエルの3つの異なる地域集団の分布 日本爬虫両棲類学会第55回大会 11月26日 沖縄県中頭郡西原町 2016年
  7. 檜垣友哉、尾形光昭、藤谷武史、田上正隆、関慎太郎、三浦郁夫 ニホンアマガエルの遺伝的地域差日本爬虫両棲類学会第55回大会 11月26日 沖縄県中頭郡西原町 2016年
  8. 三浦郁夫、田上正隆、藤谷武史、尾形光昭 カエル3種のアルビノに見つかったチロシナーゼ遺伝子の突然変異 日本爬虫両棲類学会第55回大会 11月26日 沖縄県中頭郡西原町 2016年
  9. 三浦郁夫 性決定遺伝子・性染色体はなぜターンオーバーを繰り返すのか 性と生殖に関するワークショップ 1月24日 名古屋大学 2016年
  10. 三浦郁夫 性染色体のリサイクル 国立成育医療研究センター 特別セミナー 4月22日(金)午後4時-5時 2016年
  11. Miura I. Anomalies in coloration of

- Japanese amphibians and its application to genetic research. The 2<sup>nd</sup> international conference "Amphibian and reptiles anomalies and pathology: methodology, evolutionary significance, monitoring and environmental health" 6-10 September 2016, Ekaterinburg, Russia
12. Miura I. Application of genetic resources of Japanese frogs to the studies on evolution of sex determination and sex chromosome. The 2<sup>nd</sup> international conference "Amphibian and reptiles anomalies and pathology: methodology, evolutionary significance, monitoring and environmental health". 6-10 September 2016, Ekaterinburg, Russia.
  13. 三浦郁夫 カエル W 染色体のターンオーバー 日本比較内分泌学会シンポジウム 12月9-11日 2016年、相模原市(北里大学)
  14. 三浦郁夫、尾形光昭、長谷川嘉則、大谷浩己 ツチガエルの XX-XY 型および ZZ-ZW 型性決定 日本動物学会第86回年会 9月19日 新潟 2015年
  15. 三浦郁夫、尾形光昭 カエルの W 染色体の若返り 日本進化学会第17回年大会 8月20日 東京 2015年
  16. 尾形光昭、太田宏、丸野内淳介、Ezaz Tariq、三浦郁夫 ツチガエルの性決定様式が異なる集団間境界における個体群動態 日本爬虫両棲類学会第54回大会 12月5日 習志野 2015年
  17. Kubiura M, Miura I., Tada M 2015 Intra-chromosomal distribution pattern of DNA methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosin in mitogen-induced amphibian peripheral blood cells. The 5<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium 29 April-2 May, 2015. Bangkok, Thailand.
  18. Matsubara, K, Gamble T, O' Meally D, Edwards M, Holleley C, Georges A, Sare S, Matsuda Y, Miura I., Deakin J, Zhang X, Livernois A, Zarkower D, Graves J, Azad B, Ezaz T 2015 Comparative genomics of sex chromosomes in amniotes: Lessons from reptiles. The 5<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium 29 April-2 May, 2015. Bangkok, Thailand.
  19. Miura I. A double sex-determining gene in the frog. IAE seminar, university of Canberra, 6<sup>th</sup> March 2015 University of Canberra, Canberra, Australia
  20. Miura I. Functional analyses of Sox3 for sex determination in XY and ZW systems in the frog. Miniworkshop, 4<sup>th</sup> March 2015, University of Canberra, Canberra, Australia.
  21. Miura I. Renewal of sex chromosome and a novel sex-determining mechanism. Wildlife genetics lab meeting. 6<sup>th</sup> March 2015, University of Canberra, Canberra, Australia.
  22. Miura I. A double sex-determining gene in the frog *Glandirana rugosa*. The 5<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium. 29 April - 2 May, 2015. Bangkok (Kasetsart University), Thailand
- 〔図書〕(計1件)
1. 伊藤道彦、三浦郁夫 (2016) 両生類の性決定・性分化・性成熟 ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ III P107-122 日本比較内分泌学会編集委員会 伊藤道彦、高橋明義 共編 裳華房
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/amphibia/miura/first.html>
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
三浦 郁夫 (MIURA IKUO)  
広島大学・両生類研究センター・准教授  
研究者番号：10173973