

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19370026

研究課題名（和文）核とミトコンドリアによる両生類の性決定機構の解明

研究課題名（英文）The study for the mechanism of sex determination by mitochondrial and genomic DNA in amphibians

研究代表者

中村 正久（NAKAMURA MASAHISA）

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：40130025

研究成果の概要（和文）：

ツチガエルから多くの遺伝子 (*Dmrt1*, *WT1*, *CYP17*, *CYP19*, *Sox9*, *AR*, *SF1*, *Sox3* 等) を単離し、FISH 法による染色体マッピングと性決定時期におけるそれらの遺伝子の発現解析を行った。その結果、3つの遺伝子 *AR*, *SF1*, *Sox3* が性染色体の相同組み替えが起きない領域に存在することが判明した。つまり、これらの遺伝子は塩基置換等による遺伝子の損傷が修復できない領域に存在する事から *AR*, *SF1*, *Sox3* は退化しているか、或はやがて退化する運命にあることが分かった。それを実証するために卵核 2 倍性発生法により ZZ, WW 胚を作製して両胚における *SF1*, *Sox3*, *AR* の発現を解析した。ZZ, WW 胚では *SF1* と *Sox3* の発現が同じであるのに対し、*AR* の場合は ZZ 胚 (Z-AR) では正常に発現するが WW 胚 (W-AR) は殆ど発現しない。W-AR が発現しないのは、W-AR の転写調節領域の塩基配列に変異が起きたため、転写調節因子が結合できない可能性を見いだした。その他の常染色体上の遺伝子の発現解析を行ったところ、エストロゲン合成酵素遺伝子 *CYP19* が雌化に、また *CYP19* の転写調節に *Sox3* が関わること、更に *AR* と *CYP17* が雄化に深く関わることを見いだした。*Sox3* 蛋白は直接 *CYP19* の転写調節領域に結合して転写を調節することを、ChIP アッセイ、レポーターアッセイ等の分子生物学的手法を用いて明らかにした。多くの動物はステロイドホルモンの投与によって性が転換するが、その性転換では性決定遺伝子は関与しない。そこで、ツチガエルの性決定にはステロイドホルモンが重要である考え、以下の研究を行った。まず最初に未分化性腺では、ステロイド合成酵素遺伝子が発現し、酵素活性があり、雌はエストロゲンを雄はテストステロンを多く合成する事を見いだした。また、前述した W-AR は発現しないため受容体としての役割を果たさないが、Z-AR は正常に発現するため、ZZ (雄), ZW (雌) 胚では受容体量が 2 : 1 となり、Z-AR とテストステロンの複合体が雄の決定に大きな役割を担う可能性あることも見いだした。更に、ツチガエルの卵細胞質には雌化或は雄化因子の存在が予想されているので、ツチガエル地方 4 集団のミトコンドリア DNA の塩基配列を決定した。XY 型西日本、関東、及び東海集団のミトコンドリア DNA の塩基数は約 17-kbp であるのに対し、ZW 型新潟集団のそれは約 21-kbp であった。塩基配列の解析だけでは雌雄化因子をコードする遺伝子を見つけられなかったため、卵細胞質因子はミトコンドリアのみならずゲノム DNA も深く関わっている可能性があることも分かった。また、脊椎動物の性決定時期は簡便な組織染色法で判定されていたが、基底膜を構成するラミニン蛋白を指標とすると、従来の時期よりもずっと早い時期に性が決定される事も明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We isolated sex-related genes such as *Dmrt1*, *WT1*, *CYP17*, *CYP19*, *Sox9*, *AR*, *SF1* and *Sox3* successfully from the frog *Rana rugosa*. We mapped them on *R. rugosa* chromosomes by FISH and examined their expression in the gonad during sex determination. We found that *SF1*, *Sox3* and *AR* were localized to non recombinant region of X, Y, Z, and W sex chromosomes. After producing ZZ and WW embryos gynogenetically, we examined the expression of *SF1*, *Sox3* and *AR* in the embryos. As a result, we found that *SF1* and *Sox3* were expressed evenly between ZZ and WW embryos. However, *AR* on the W chromosome (W-AR) was barely expressed due to unresponsiveness to unknown transcription factor(s),

whereas *Z-AR* expression occurred normally, indicating that *W-AR* is in the middle of degeneration. We next examined the expression of other genes on autosomes of *R. rugosa*. Among genes examined, *CYP17* and *Z-AR* expression was up-regulated in the indifferent gonad of males during sex determination, whereas *CYP19* expression was enhanced. Interestingly, we found by ChIP and reporter assays that Sox3 directly bound to the *CYP19* promoter region and up-regulated its expression in A6 cells derived from *Xenopus* kidney epithelial cells. It is well-known that the sex of many animals can be reversed by steroid hormones, but a sex-determining gene is not required for the sex-reversal. Thus, we hypothesized that steroid hormones are the key factor for sex determination in *R. rugosa*. Of great interest, we found that steroidogenic genes were expressed in the indifferent gonad of *R. rugosa* tadpoles during sex determination, and that steroidogenic enzymes were biologically active in that period. In addition, testosterone was produced more in the indifferent gonad of male tadpoles, whereas estrogen was produced more in that of female tadpoles. These results suggest that steroid hormones can be the main factor for sex determination in *R. rugosa*. The previous study showed that there is a masculinizing factor in the cytoplasm of oocytes in *R. rugosa* living in western Japan, whereas a feminizing factor in that of oocytes in the frog living in northern Japan. Then, we determined all nucleotide sequences of mitochondrial DNA in this species living in four different regions of Japan. As a result, mitochondrial DNA of *R. rugosa* from northern Japan was 21 kbp long, whereas that from ones living in other three different regions was 17 kbp long. Unfortunately, we could not find any gene encoding those factors, indicating that mitochondrial DNA may not encode the factors. Instead, genomic DNA probably encodes those feminizing and masculinizing factors. Finally, by immunohistological staining using the antibody of laminin, a component in the basement membrane, the sex of *R. rugosa* is determined far before the stage previously reported.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
平成20年度	3,200,000	960,000	4,160,000
平成21年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：性決定、核、ミトコンドリア、ステロイドホルモン、両生類

#### 1. 研究開始当初の背景

動物の性は受精時の性染色体の組み合わせで遺伝的に決まるだけではなく、卵の孵化温度、個体の大きさなどでも決まり、性決定のしくみは多様である。両生類の性決定及び性分化機構を解明する研究は哺乳類や魚類(メダカ)に比べるとかなり遅れていた。しかし、無尾類(ZW型ツチガエル)初の性判別DNAマーカーを見出したので、ツチガエル性腺から遺伝子を単離して性決定時の発現パターンを調べた。しかし、遺伝子マッピングと発現解析の結果からいずれも性決定遺伝子とは考えにくく、本体は別の遺伝子と判断した。我々はミトコンドリアの遺伝子産物が細胞質因子と考え、両生類(ツチガエル)の性決定の仕組みを解明するには性決定遺伝子に加え、細胞質因子も同定して、それらの相互関係を調べる必要があると考えた。そこで、両生類の性決定機構を分子レベルで解明し脊椎動物の性決定機構を明らかにする事が必要であると考え本研究を行うことにした。

#### 2. 研究の目的

- (1) 両生類(ツチガエル)の性決定遺伝子を単離し、遺伝子導入によりその働きを実証する。
- (2) 性決定遺伝子に加え、細胞質因子も性決定に関わることを明らかにする。

#### 3. 研究の方法

- (1) 性決定に関わるミトコンドリア因子の実体を解明するため、ツチガエル4地方集団のミトコンドリアを分離しそのDNAの塩基配列を決定する。
- (2) 卵核2倍性発生法によりZZ, WW胚を複製し、ディファレンシャルディスプレイ法等を用いて両胚に特異的に発現する遺伝

子を見いだす事により、ZW型性決定遺伝子を単離し、その遺伝子の発現解析と遺伝子マッピングを行う。また、遺伝子導入によって性を決定する遺伝子であるかどうかを調べる。

#### 4. 研究成果

ツチガエルから多くの遺伝子 (*Dmrt1*, *WT1*, *CYP17*, *CYP19*, *Sox9*, *AR*, *SF1*, *Sox3* 等) を単離し、FISH 法による染色体マッピングと性決定時期におけるそれらの遺伝子の発現解析を行った。3つの遺伝子 *AR*, *SF1*, *Sox3* が性染色体の相同組み替えが起かない領域に存在することが判明した。

卵核 2 倍性発生法により ZZ, WW 胚を作製し *SF1*, *Sox3*, *AR* の発現を解析した。ZZ, WW 胚では *SF1* と *Sox3* の発現に差がないのに対し、*AR* は WW 胚 (*W-AR*) では殆ど発現しない。*W-AR* が発現しないのは、*W-AR* の転写調節領域の塩基配列の変異に起因すると考えられた。

常染色体上の遺伝子の発現解析を行ったところ、エストロゲン合成酵素遺伝子 *CYP19* が雌化に、また *CYP19* の転写調節に *Sox3* が関わること、更に *AR* と *CYP17* が雄化に深く関わることを見いだした。

*Sox3* 蛋白は直接 *CYP19* の転写調節領域に結合して転写を調節することを、ChIP アッセイ、レポーターアッセイ等により明らかにした。未分化性腺において、ステロイド合成酵素遺伝子の発現、酵素活性の存在、雌のエストロゲン合成、雄のテストステロン合成を見いだした。ステロイドホルモンが性決定の主役になり得る。

*W-AR* は発現しないが、*Z-AR* は正常に発現するため、ZZ (雄), ZW (雌) 胚では *AR* 受容体量が 2:1 となることから、*Z-AR* とテストステロンの複合体が雄の決定に大きな役割を担う可能性を見いだした。

ツチガエルの卵細胞質には雌化或は雄化因子の存在が予想されていたので、ツチガエル地方 4 集団のミトコンドリア DNA の全塩基配列を決定した。その結果、塩基配列の解析だけでは雌雄化因子をコードする遺伝子を見つけれなかった。

脊椎動物の性決定時期は基底膜を構成するラミニン蛋白の抗体を用い、従来考えられていた時期よりもずっと早い時期に性が決定される可能性があることを見いだした。

以上の成果は、脊椎動物、特に両生類の性決定機構の解明において多大な貢献をする事は明らかである。ステロイドホルモンが両生類 (ツチガエル) の性決定の主役になり得る事を示した成果は特筆される。また、性染色体上の遺伝子が退化しつつある事を示した事例はなく、世界で初めての成果として評価されるべきものである。

#### 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 20 件)(すべて査読有り)

1. M. Nakamura. The mechanism of sex

Determination and differentiation in amphibians – Are sex steroids a key factor? – (Review) J Expt Zool Part A. 311A 2010. In press.

2. T. Saotome, T. Isomura, T. Seki, Y.

Nakamura, M. Nakamura. Structural changes in gonadal basement membranes during sex differentiation in the frog *Rana rugosa*. J Expt Zool Part A. 311A 2010. In press.

3. M. Nakamura. Sex determination in amphibians. Seminars in Cell and Developmental Biology (review) 20 (2009) 271-282.

4. J. Watanabe, T. Nakamachi, T. Ogawa, A. Naganuma, M. Nakamura, E. DiCicco-Bloom, S. Shioda, and S. Nakajo. Characterization of antioxidant protection of cultured neural progenitor methylmercury toxicity. J Toxicol Sci 34 (2009) 315-325.

5. T. Ikegami, K. Azuma, M. Nakamura, N. Suzuki, A. Hattori, Hironori Ando. Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. Comp Biochem and Physiol Part A. 152 (2009) 219-224.

6. Y. Oshima, K. Naruse, Y. Nakamura, M. Nakamura. Transcriptional regulation of the *CYP19* (cytochrome P450 aromatase) gene by *Sox3* in the frog *Rana rugosa*. Gene 445 (2009) 38-48.

7. S. Yokoyama, Y. Oshima, J. Tokita, M. Suda, T. Shinozuka, M. Nakamura. Androgen Receptor of the Frog *Rana rugosa*: Molecular Cloning and Its Characterization. J Expt Zool Part A. 311A (2009) 1-17.

8. Y. Uno, C. Nishida, Y. Oshima, S. Yokoyama, I. Miura, Y. Matsuda, M. Nakamura. Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangement in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*) with ZW and XY sex chromosome system. Chromosome Res 16 (2008) 637-647.

9. G. Okada, K. Maruo, M. Nakamura. Differential display analysis of gene expression in female-to-male sex-reversing gonads of the frog *Rana rugosa*. Gen Comp Endocrinol 155 (2008) 623-634.

10. R. Matsuno, H. Ohtaki, T. Nakamachi, J. Watanabe, S. Yofu, D. Hayashi, T. Takeda, T. Nonaka, M. Seki, M. Nakamura, K. Itabashi, S. Shioda. Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-specific receptor (PAC1R) in the rostral

migratory stream of the infant mouse brain. Regul. Pept 145 (2008) 80-87.

11. R. Iwade, K. Maruo, G. Okada, M. Nakamura. Elevated expression of *P450c17* (*CYP17*) during testicular formation in the frog. Gen Comp Endocrinol 155 (2008) 79-87.
12. M. Kaneko, R. Okada, K. Yamamoto, M. Nakamura, G. Alberta, M. Polzonetti-Magni, S. Kikuyama. Bisphenol A acts differentially from and independently of thyroid hormone in suppressing tyrotropin release from the bullfrog pituitary. Gen. Comp. Endocrinol. 155 (2008) 574-580.
13. K. Maruo, M. Suda, S. Yokoyama, Y. Oshima, M. Nakamura. Steroidogenic gene expression during sex determination in the frog, *Rana rugosa*. Gen Comp Endocrinol. 158 (2008) 87-94.
14. N. Suzuki, K. Omori, M. Nakamura, M. Tabata, J. Ikegame, K. Ijiri, K. Kitamura, T. Nemoto, N. Shimizu, T. Kondo, K. Matsuda, H. Ando, H. Kasahara, M. Nagase, M. Nara, A. Hattori. Scale osteoblasts and osteoclasts sensitively respond to low-gravity loading by centrifuge. Biol Sci Space 44 (2008) 326-334.
15. N. Sakurai, K. Maruo, S. Haraguchi, Y. Uno, Y. Oshima, K. Tsutsui, Y. Matsuda, G. Pelletier, H. Vaudry, M. Nakamura. Immunohistochemical and biological activities of CYP17 (*P450c17*) in the indifferent gonad of the frog *Rana rugosa*. J Steroid Biochem Mol Biol. 112 (2008) 5-12.
16. Y. Uno, C. Nishida, S. Yoshimoto, M. Ito, Y. Oshima, S. Yokoyama, M. Nakamura, Y. Matsuda. A diversity of sex chromosomal origins in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three anuran species. Chromosome Res 16 (2008) 999-1011.
17. Y. Matsushita, Y. Oshima, M. Nakamura. Expression of *DMRT* genes in the gonads of *Rana rugosa* during sex determination. Zool Sci 24 (2007) 95-99.
18. Y. Oshima, K. Noguchi, M. Nakamura. Expression of *Lhx9* isoforms in the developing gonads of *Rana rugosa*. Zool Sci 24 (2007) 798-802.
19. J. Watanabe, T. Nakamachi, R. Matsuno, D. Hayashi, M. Nakamura, S. Kikuyama, S. Nakajo, S. Shioda. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. Peptides 28 (2007) 1713-1719.
20. K. Azuma, M. Kobayashi, M. Nakamura, N. Suzuki, S. Yashima, S. Iwamuro, M. Ikegame, T. Yamamoto, A. Hattori. Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362 (2007) 594-600.

[学会発表](計 15 件)

1. M. Nakamura, S. Yokoyama Androgen Receptor (AR) Expression in ZZ- and WW-Embryos of the Frog

*Rana Rugosa*. The 42nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Pittsburgh, Pennsylvania, USA. 18-22 July 2009 (Biol Reprod June 15, 2009 81 (1 Supplement) 649)

2. 第 80 回動物学会静岡大会 (2009 年) シンポジウム 1-4 「脊椎動物の性決定遺伝子の普遍性と多様性-DM 遺伝子とは?-」のオーガナイザー(中村正久)
3. 第 80 回動物学会静岡大会 (2009 年) 須田茉莉, 大島祐希, 中村正久 「ツチガエルに存在する 2 つの CYP17 遺伝子の解析」
4. 第 79 回動物学会福岡大会 (2008 年) シンポジウム A 「脊椎動物の性決定・性分化とステロイドホルモン」のオーガナイザー(中村正久)及び発表中村正久 「両生類の性決定・性分化とステロイド合成酵素遺伝子 *CYP17* 及び *CYP19*」
5. 第 78 回動物学会弘前大会 (2007 年) シンポジウム C 「脊椎動物性染色体の進化学」のオーガナイザー(中村正久)
6. M. Nakamura, G. Okada, K. Maruo, S. Funada. Stage-dependant expression of three genes in growing oocytes of the frog *Rana rugosa*. The 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. July 21-25, 2007, San Antonio, TX, USA
7. 第 77 回動物学会島根大会 (2006 年) シンポジウム 1L 公開国際シンポジウムのオーガナイザー(中村正久): Molecular mechanism of sex determination and differentiation, 科研特定領域 『性分化』との共催

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村正久 (MASAHISA NAKAMURA)  
早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授  
研究者番号: 40130025

### (3) 連携研究者

松田洋一 (YOICHI MATSUDA)  
北海道大学・理学(系)大学院・教授  
研究者番号: 70165835

松井久美 (KUMI MATSUI)  
麻布大学・獣医学部・講師  
研究者番号: 70367019

大島祐希 (YUKI OSHIMA)  
早稲田大学・教育・総合科学学術院・助手  
研究者番号: 470454014