

機関番号：14503

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570203

研究課題名 (和文) 鳥類の生殖腺の性分化機構

研究課題名 (英文) The mechanism of gonadal sex determination in avian embryo

研究代表者

吉岡 秀文 (YOSHIOKA HIDEFUMI)

兵庫教育大学 学校教育研究科・教授

研究者番号：40191548

研究成果の概要 (和文)：性染色体の構成が哺乳類では XX-XY であるのに対し、鳥類では ZW-ZZ である。鳥類の性決定機構の解明のため、W 性染色体上に存在する *HINTW* の雌化決定候補遺伝子の機能解析を行った。鳥類生殖腺の性決定遺伝子を同定するため、ニワトリ胚を用いて Z 性染色体上の *HINTZ*、W 性染色体上の *HINTW* との機能解析を行った。その結果、活性を示す HINTZ/HINTZ ホモダイマーが量依存的に雄化を引き起こすのに対して、雌では、*HINTW* が *HINTZ* とヘテロダイマーを形成することでその活性を抑制し、雌化が引き起こされることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：Sex in birds is chromosomally based, as in mammals, but the sex chromosomes are different and the mechanism of avian sex determination has been unknown. In birds, the homogametic sex is male (ZZ) and the hetero-gametic sex is female (ZW). Two hypotheses have been proposed for the mechanism of avian sex determination. The W (female) chromosome may carry a dominant-acting ovary determinant. Alternatively, the dosage of a Z-linked gene may mediate sex determination, two doses being required for male development (ZZ). Recently it is reported that a Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. However, another candidate genes are remained to elucidate. Here we show that *HINTW*, which encodes an aberrant nucleotide hydrolase enzyme, is the candidate ovary-determinant on the W chromosome and *HINTZ*, which encodes a bona fide nucleotide hydrolase enzyme, a Z-linked gene, are also required for sex determination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：生殖腺 性分化 ニワトリ胚 性決定遺伝子 *HINTW* *HINTZ* *DMRT1*

1. 研究開始当初の背景

動物における性分化の研究は哺乳類を対象とした研究が先行している。(A. Swain and

R. Lovell-Badge *Genes & Dev.*, 13, 755 - 767, 1999; A. Ross and B. Capel *Trends in End. and Met.* 16, 19-25, 2005) しかしな

がら、動物種に固有の性分化機構が確立されたため、哺乳類で得られた知見がそのまま鳥類に当てはまるものではない。(C. Smith and AH. Sinclair *Bioassay* 26, 120-132, 2004) 従って、鳥類の性決定機構は鳥類を対象に調べられなければならないのである。農学的な内分泌学研究は鳥類では古くから行われているし、神経系、体軸形成、肢芽などの初期発生の研究ではニワトリ胚は頻りに用いられているが、鳥類生殖腺の発生は発生学的には未開拓の分野である。それは、胚体内部の非常に狭い予定生殖腺領域における外科的操作は、頭部、神経管、体節や肢芽などに比べると、その難易度は格段に高いからである。我々の初期の生殖腺予定領域に的確に細胞を移植する技術 (*Dev Biol.* 2005) は何年もの試行錯誤の上に確立したものであり、他のグループが即座に遂行できるものではない。その技術と経験が本研究の遂行には不可欠である。SRY/Sryの発見者である英国のR. Lovell-Badge 研の関戸が電気穿孔法を使ってニワトリ生殖腺に遺伝子導入する方法を発表した。(*Dev. Biol.* 2006) 我々はその方法をさらに改良して、より初期胚に高効率で導入する方法を開発した。

多くの脊椎動物における生殖腺の性分化は、遺伝的に決定された性に従って起こり、その中心的役割を担うのが、性決定遺伝子である。これまで1990年に哺乳動物で *SRY/Sry* が見つかかり、2002年に魚類のメダカで *DMY* が見つかった。驚いたことに、*DMY* と *SRY/Sry* の構造は全く異なっており、また *DMY* がメダカ種間に共通な性決定遺伝子でないこともわかった。この知見は動物における性決定の仕組みが生物種間で著しく多様性に富むことを示唆している。

ZWによる性決定様式を採用する鳥類ではW染色体上に卵巣決定因子が存在するか、またはZ染色体上に遺伝子量依存的な精巣決定因子が存在すると考えられている。先行研究により、ニワトリの性染色体上に位置する遺伝子が明らかになってきた。その結果、W染色体に *FET-1*(female expressed transcript 1

gene) 遺伝子 (*Mech. Dev.* 2, 83-86, 2002) と *HINTW*(histidine triad nucleotide binding protein W-linked) 遺伝子 (*Mol. Biol. Cell* 11, 3645-3660, 2000) が、さらにZ染色体上には *HINTZ* (histidine triad nucleotide binding protein Z-linked)、*DMRT-1* 遺伝子が同定された。これらの因子はニワトリ胚生殖腺に発現し、生殖腺の性決定に関与すると考えられている。

C. SmithらはDMRT1のノックダウンにより雄が雌化したことにより性決定遺伝子であると昨年報告した。(nature 2009) しかしながら、DMRT1の過剰発現により雌が雄化することは示せなかった。このことは、まだ他の遺伝子が性決定遺伝子である可能性の余地があるものと考えられる。

また2010年にニワトリ2日胚を用いて、雄から雌、雌から雄に生殖予定領域を移植し、9日胚で生殖腺での、細胞系譜と遺伝子発現様式を解析することにより、すでに、DMRTが発現する前の2日胚で既に性分化の決定がなされているという報告がなされた。(nature 2010) この2つの報告は矛盾しており、統一的理解を得る必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、これらの遺伝子の機能解析を通じ、鳥類の性決定遺伝子を同定することを目的とする。つぎにその決定遺伝子と相互作用する因子、ならびに下流の遺伝子を同定する。当該領域の推進に貢献できる点

性決定機構の脊椎動物の全体像の理解が大きく進む。それにより脊椎動物における性決定遺伝子の分子進化というあらたな研究分野が創造できる。新たな研究の創造が期待できる点 本研究は精巣決定因子もしくは卵巣決定遺伝子を同定するものである。この遺伝子の同定によって、精巣優位の性決定(XYによる性決定)と卵巣優位の性決定(ZWによる性決定)の本質的な違いが明らかになると同時に、性決定の多様性についての新たな側面が明らかになることが期待される。

3. 研究の方法

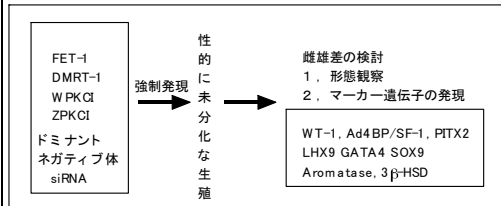
ニワトリの性決定遺伝子の機能解析

既に、哺乳類とメダカの Y 染色体上には精巢決定因子として、それぞれ *SRY* 遺伝子 (Nature 346, 240-244, 1990) と *DMY* 遺伝子 (Nature 417, 559-563, 2002) が同定されている。鳥類は雄が ZZ, 雌が ZW の性染色体をもつことは、1960 年代に大野乾によって報告されている。しかしながら、現在になっても、性決定遺伝子は確定していない。作業仮説として、W 染色体上に卵巣決定因子が存在するか、または Z 染色体上に遺伝子量依存的な性決定因子が存在するという 2 つが考えられる。この両者の可能性を考慮すると同時に、性決定因子を機能解析することが性分化の多様性と普遍性の本質的な理解には不可欠である。

第一の作業仮説の W 染色体上の卵巣決定の候補遺伝子として、W 染色体上の *HINTW* と *FET-1* が存在する。*HINTZ* は塩基とアミノ酸の間を水解する酵素をコードしており、その蛋白は HIT (histidine triad) モチーフという活性基を持っている。この遺伝子は Z 染色体に 1 コピー存在するのに対して、W 染色体に相同遺伝子 *HINTW* がマルチコピー存在する。この遺伝子がコードする蛋白は HIT モチーフをもたないため、*HINTZ* 蛋白に対してドミナントネガティブ体として働くことが *in vitro* 系では判っている (Genome Biolog, 4, R18, 2003)。*FET-1* は他の脊椎動物には相同遺伝子が存在せず、唯一ウイルスのコート蛋白と相同性があるという遺伝子である。細胞内局在を我々が調べたところ、ゴルジ体に局在している像が得られた。

第二の作業仮説の Z 染色体上の精巢決定の候補遺伝子として、*DMRT1* がある。これはショウジョウバエの *doublesex*, 線虫の *mab-3* の脊椎動物の相同遺伝子のひとつであり、魚類から哺乳類まで保存されたファミリーを形成し、*DMRT-1* は精巢分化のカスケードに関与している。鳥類ではこの遺伝子が原始

は虫類から鳥類に進化するときに性染色体の Z 染色体上で性決定遺伝子として進化したと考えられている。

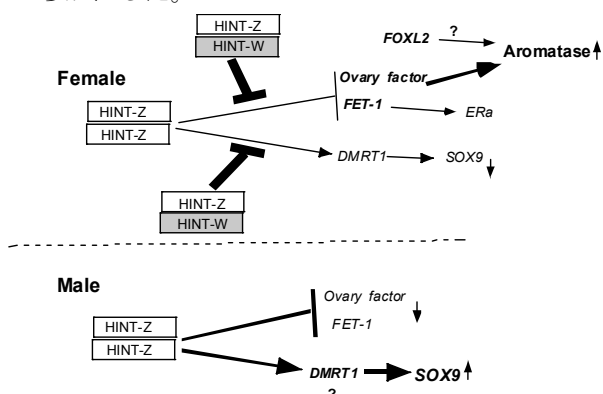


以上のこれらの遺伝子組み換えたウイルス発現ベクター RCAS をニワトリ初期胚の予定生殖腺領域へ電気穿孔法で導入する (機能獲得実験)。また、それぞれの遺伝子の siRNA を組み込んだレトロウイルスベクター RCAS を用いることで、遺伝子のノックダウンが出来るという報告があった (Dev. Biol. 294, 554-563, 2006)。この系を用いて、ノックダウンを行った

4. 研究成果

鳥類と哺乳類の生殖腺で多くの共通な相同遺伝子が発現しており、形態的にもほとんど同じ発生を示すことから、両者の間には共通なメカニズムが存在すると容易に想定できる。しかしながら、性染色体の構成が哺乳類では XX-XY であるのに対し、鳥類では ZW-ZZ である。鳥類の性決定機構の解明のため、W 性染色体上に存在する *HINT-W*, *FET-1* の雌化決定候補遺伝子の機能解析を行った。目的遺伝子を組み込んだ組み換え遺伝子を初期ニワトリ胚の予定生殖領域に発現させ、性分化時期の生殖腺の各種マーカー遺伝子発現と形態変化を解析した。*HINT-Z* が活性部位を保持しているのに対して *HINT-W* はその部位が変異しているためドミナントネガティブ型として機能することが構造上予想された。鳥類生殖腺の性決定遺伝子を同定するため、ニワトリ胚を用いて Z 性染色体上の *HINT-Z*, W 性染色体上の *HINT-W* と *FET-1* の機能解析を行った。その結果、活性を示す *HINT-Z/HINT-Z* ホモダイマーが量依存的に雄化を引き起こすのに対して、雌では、*HINT-W* が *HINT-Z* とヘテロダイマーを形成することでその活性

を抑制し、雌化が引き起こされることを見出した。さらに、この性決定メカニズムの雌化の下流因子として *FET-1* が機能することも明らかにした。



教授

研究者番号：20243347

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 1 件)

Mechanism of asymmetric ovarian development in avian

Yoshiyasu Ishimaru, Tomoko Komatsu, Megumi Kasahara, Yuko Kato-Fukui, Yoshiro Toyama, Mamiko Maekawa, Kiyotaka Toshimori, Roshantha A. S. Chandraratna, Ken-ichirou Morohashi, and Hidefumi Yoshioka,

Development 135, 677-685, 2008

[学会発表] (計 2 件)

①石丸善康 鳥類の性決定遺伝子の探索
日本分子生物学会 2008年12月8日 横浜

②吉岡秀文 HINTW/HINTZ 遺伝子による鳥類の性決定機構
日本分子生物学会 2010年12月9日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 秀文 (YOSHIOKA HIDEFUMI)
兵庫教育大学 大学院学校教育研究科・教授
研究者番号：40191548

(2) 研究分担者

笠原 恵 (KASAHARA MEGUMI)
兵庫教育大学 大学院学校教育研究科・准