

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570065

研究課題名（和文）メダカ精巣分化過程における性的可塑性の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of sexual plasticity during testicular differentiation and development in the medaka, *Olyzias latipes*

研究代表者

小林 亨 (KOBAYASHI TOHRU)

静岡県立大学・環境科学研究所・教授

研究者番号：30221972

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、魚類性分化機構の研究の最も進展しているメダカのエストロゲンによる性転換誘起系を用いて、精巣分化に伴う精巣構成体細胞の性的可塑性の分子機構について検討した。エストロゲンによって性転換可能な精巣分化期では、エストロゲンによってセルトリ細胞における *foxl2* の誘起がみられ、エストロゲン処理終了後もその発現は継続するが、雄型マーカー遺伝子である *gsdf-1*, *dmrt1* はその発現抑制がみられるようになる。しかし、エストロゲンによるこれらの雄型遺伝子の発現抑制は精巣分化の進行（性転換卵巣分化の不可）に伴って完全には起こらなくなる。このことは精巣組織構築の進行に伴ってセルトリ細胞の性的可塑性が限定されていくことを示唆する。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on the molecular mechanisms of sexual plasticity of testicular somatic cells during testis differentiation and development in the medaka, *Olyzias latipes*. In XY medaka of Hd-rR strain, estrogen treatment induces the female differentiation when estrogen expose to the fry before 30 dph (days post hatching). During XY sex reversal by estrogen, Sertoli cells showed the expression of *foxl2*, whereas the expression of male differentiation maker genes of germ-cell supporting cells were decreased and subsequently suppressed, such as *gsdf* and *dmrt1* etc. Although estrogen induced testis-ova differentiation easily in mature fish, XY sex reversal (ovarian differentiation) was not induced. In mature XY fish treated by estrogen, *foxl2* expression was induced. However, expression of male differentiation maker genes was not suppressed completely. These results suggest strongly that sexual plasticity of Sertoli cells is limited with the progression of testis differentiation in medaka.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,600,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：メダカ、性的可塑性、性分化、精巣卵、エストロゲン、*dmrt1*、*foxl2*

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物では、生殖腺構成細胞（生殖細胞、体細胞）は、完全か否かはともかく、性的可塑性を持つことが知られている。魚類では、自然環境条件下で性転換する種以外においても、最近、性分化の臨界期を過ぎた成熟雌で機能的な性転換を誘起できることから、卵巢構成細胞が成熟個体においても完全な性的可塑性を保持し続けることが明らかとなった。しかし、遺伝的雄から機能的な雌への性転換は性分化の臨界期を超えた場合は誘起されない。実際、メダカ雄では、エストロゲンおよびエストロゲン様物質で極めて容易に精細管中に卵母細胞（精巣卵）の形成が誘起できるが、決して卵巢への性転換は起こらない。ほ乳類では、性染色体であるY染色体上に性決定遺伝子だけでなく、精巣機能に必須な遺伝子が多数集積しており、XX性転換雄は不稔となる。これに対して下等脊椎動物、特に魚類では、メダカでの性決定遺伝子の同定(Matsuda, Kobayashi et al., 2002)等により、遺伝的雌雄の間では性決定遺伝子以外、遺伝子レベルの違いはないことが示唆されている。実際、魚類では自然環境条件、人為的条件によって容易に機能的性転換が起こることからも、この仮説は支持される。

従来、「性分化期を超えた時期（性的臨界期後）では、人為的に性転換は誘起できない」ことが定説となっていた。最近、私たちは、自然環境条件では性転換は決して起こらないティラピア、コイ、メダカ等でアロマトラーゼ阻害剤の長期投与による成熟雌の機能的雄への性転換誘起に成功し、この定説を覆した。しかし、遺伝的雄から機能的な雌への性転換は性分化期においてはホルモン・温度等の人為的刺激により可能であるが、臨界期を超えた場合は、性転換は誘起されない。自然環境条件下で成熟個体の性転換が起こる種においても、雌雄生殖腺を1対ずつもつ種（両方向性転換魚：オキナワベニハゼ等）や、生殖腺内に精巣、卵巢の両方をもつ種（雄性先

熟魚：クロダイ、クマノミ等）以外では、機能的雄から雌への性転換は起こらない。実際、メダカ雄では、エストロゲン作用を示す物質で極めて容易に精細管中に卵母細胞（精巣卵）の形成誘起や卵黄前駆物質であるビテロゲニンの合成は起こるが、決して卵巢への性転換は起こらない(小林、第79回日本動物学会発表)。このことは、精巣構成体細胞は精巣分化に伴って、その性的可塑性を保持しつつけない可能性を示唆する。しかし、精巣構成体細胞の性的可塑性の実態は、生殖腺体細胞の性特異マーカーの欠失によって分子レベルでの解析は困難であった。最近、申請者らは特異抗体の開発により（ティラピア、メダカ等で使用可能）、DMRT1、Foxl2がそれぞれ、雄、雌型生殖細胞支持細胞の、P45011beta、P450aromがそれぞれ、雄、雌型ステロイド産生細胞の性特異マーカーとして使えることを明らかにし、精巣構成体細胞の性的可塑性の問題について分子および組織構築レベルでの解析を可能とした。しかし、魚類を含めて非ほ乳類では、これまでに体細胞の性特異マーカーの開発を含めて精巣構成体細胞の性的可塑性を分子および組織構築レベルで解析した事例は、国内外でない。

2. 研究の目的

本研究では、エストロゲンによる性転換誘起系を用いて、(1) 精巣分化に伴う精巣構成体細胞の性的可塑性の変化および、(2) 組織構築の不可逆性を体細胞の性特異マーカーを駆使して解析するとともに、(3) 組織構築の不可逆性に関与する分子の実体を明らかにする。これら一連の研究により、精巣分化に伴う精巣構成体細胞の性的可塑性の分子機構の実態を明らかにすることを目的とした。

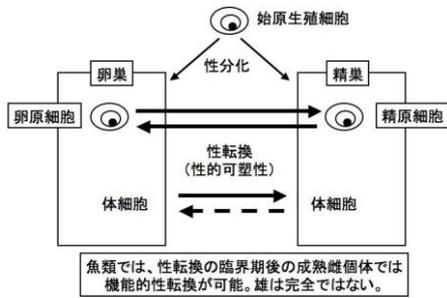


図1.本申請に関わる概念図

3. 研究の方法

(1) 精巣分化に伴う精巣構成体細胞の性的可塑性

性分化の臨界期から成熟精巣までの様々な時期の雄メダカをエストロゲン処理し、時期による卵巣への性転換能を調べた。それぞれの XY 性転換誘導系において生殖細胞支持細胞の雌雄性マーカー遺伝子である *DMRT1*、*Foxl2* 等の発現解析を特異抗体による免疫2重染色法等を行い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。これによりセトリ細胞が完全な雌型にどの時期から分化転換できなくなるかを明らかにする。

(2) 精巣から卵巣への性転換における鍵遺伝子の検索

卵巣への性転換可能または不可能な時期の雄をエストロゲン処理し、両者の精巣で発現の異なる遺伝子をサブトラクション法、マイクロアレイ等で検索し、候補遺伝子の発現解析を行い、候補遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 精巣分化に伴う精巣構成体細胞の性的可塑性

エストロゲン処理によって XY 個体が性転換可能な時期を検討したところ、精細管構造が形成され始める 30dph 以降は、完全な性転換の誘導が起こらなくなった。エストロゲンによって性転換可能な精巣分化期では、エストロゲン処理によってセトリ細胞で生殖細胞支持細胞の雌型マーカー遺伝子である

foxl2 の誘導がみられた。*foxl2* の発現は、エストロゲン処理終了後も継続発現した。雄型マーカー遺伝子である *gsdf*、*dmrt1* は、エストロゲン処理によってその発現抑制がみられるようになった。一方、エストロゲン処理

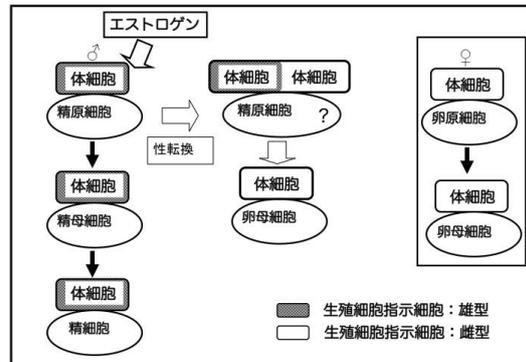
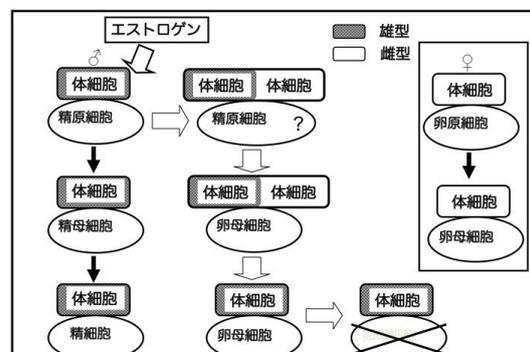


図2. 精巣分化期におけるセトリ細胞の性的可塑性

によって性転換の誘導されない成熟雄個体では、エストロゲン処理によって容易に精巣卵の分化が誘導された。この時、精巣卵分化の誘導に先行して、セトリ細胞で *foxl2* の発現誘導がみられた。しかし、性転換可能な精巣分化期でみられたエストロゲン処理による *gsdf*、*dmrt1* 等の雄型遺伝子の完全な発現抑制はみられなかった。精巣卵は分化後、肥大卵母細胞期になった後、退化する。*gsdf*、*dmrt1* 等の雄型遺伝子は精巣卵分化・退化期を通じて、その発現は維持された。

今回の研究から、精巣分化・発達過程におけるエストロゲン処理によるセトリ細胞における雌型遺伝子である *foxl2* の発現誘導は処理時期に関係なく誘導できるが、雄型遺伝子の発現抑制は、精巣分化の進行（性転換卵巣分化の不可）に伴って完全には起こらなくなる事が明らかとなった。以上のことから、精巣組織構築の進行に伴ってセトリ細胞の性的可塑性が限定されていくことが強く示唆された。



(2) 精巣から卵巣への性転換における鍵遺伝子の検索

卵巣への性転換可能または不可能な時期の雄をエストロゲン処理し、両者の精巣で発現の異なる遺伝子をサブトラクション法、マイクロアレイ等で検索し、候補遺伝子の発現解析を行った。その結果、*fig-alpha*、*42Sp50*、*ZPA*、*ZPC5* 等の卵母細胞で特異的に発現する遺伝子が同定された。しかし、体細胞系列で特異的に発現の変化するような遺伝子については、現在、さらなる検討を続けている。

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 5 件)

1. **Kobayashi, T.** (2010)
In vitro germ cell differentiation during sex differentiation in a teleost fish.
Int. J. Dev. Biol., **54**, 105-111.
2. Nakamoto, M., Fukasawa, M., Orii, S., Shimamori, K., Maeda, T., Suzuki, A., Matsuda, M., **Kobayashi, T.**, Nagahama, Y. and Shibata, N. (2010)
The cloning and expression of medaka cholesterol side chain cleavage cytochrome P450(P450_{scc}) during gonadal development.
Develop. Growth and Differ., **52**, 385-395.
3. Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushutani, H., **Kobayashi, T.**, Hirai, T.,

Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R. and Iguchi, T. (2011)

Comparative Responsiveness to Natural and Synthetic Estrogens of Fish Species Commonly Used in the Laboratory and Field Monitoring.

Aquatic Toxicology, **109**, 250-258.

4. Hirakawa, I., Miyagawa, S., Katsu, Y., Kagami, Y., Tatarazako, N., **Kobayashi, T.**, Kusano, T., Ogino, Y., Ohta, Y. and Iguchi, T. (2011)

Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol.

Chemosphere, **87**, 668-674.

5. Nakamoto, M., Fukasawa, M., Tanaka, S., Shimamori, K., Suzuki, A., Matsuda, M., **Kobayashi, T.**, Nagahama, Y. and Shibata, N. (2012)

Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (*hsd3b*), *star* and *ad4bp/sf-1* during gonadal development in medaka (*Oryzias latipes*).

Gen. Comp. Endocrinol., **176**, 222-230.

[学会発表] (計 8 件)

国際学会等

1. **Kobayashi, T.** (2009)
Testicular differentiation in teleosts: Formation of seminiferous tubule structure. Fifth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination (Kona, Hawaii).
2. Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushutani, H., **Kobayashi, T.**, Hirai, T., Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto,

J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R. and Iguchi, T. (2011)
Comparative Responsiveness to test and sentinel fish species to natural and synthetic oestrogens.

9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (India).

3. **Kobayashi, T.** (2012)
Sexual dimorphisms in somatic cells in the testis of medaka during estrogen-induced testis-ova differentiation.
Sixth International symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination (Kona, Hawaii).

国内学会等

招待講演

1. **小林 亨** (2011)
魚類の生殖腺性分化と性的可塑性.
海洋博覧会記念公園管理財団・琉球大学熱帯生物圏研究センター共催のシンポジウム：沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用.

一般発表

1. **小林 亨** (2009)
魚類性分化過程における体細胞の動態.
第81回日本動物学会大会 (静岡)
2. **小林 亨**・堀江好文・千葉文香 (2010)
魚類性分化過程における組織構築と性的可塑性.
第82回日本動物学会大会 (東京)
3. Hirakawa, H., Kagami, Y., Tatarazako, N., **Kobayashi, T.**, Kusano, T., Ogino, Y., Ohta, Y., Miyagawa, S., Iguchi, T. (2010)

Histology and gene expression analysis in testis of medaka exposed by ethinylestradiol. 環境ホルモン学会第13回研究発表会 (東京)

4. 宮川信一・平川郁美・勝義直・**小林 亨**・井口泰泉 (2011)
メダカ精巣卵誘起時における遺伝子発現解析.
第83回日本動物学会大会 (旭川)
5. 千葉文香・佐藤 忠・井口泰泉・濱口 哲・**小林 亨** (2011)
エストロゲンによるメダカ精巣卵形成誘起過程における精原細胞の動態.
第36回日本比較内分泌学会大会 (東京)

[図書] (計1件)

1. **小林 亨**:「性は面白い」 静岡県立大学公開講座要旨集 2010 Vol. 24., pp. 37-44.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 亨 (KOBAYASHI TOHRU)

静岡県立大学・環境科学研究所・教授
研究者番号：30221972