

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 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21570221

研究課題名（和文）メダカ近縁種の種間雑種を用いた性決定遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）Functional Analysis on the sex-related genes using the inter-specific hybrids among *Oryzias* fishes.

研究代表者

濱口 哲 (HAMAGUCHI SATOSHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20126444

研究成果の概要（和文）：

本研究では、メダカ及びその近縁種の種間雑種で性転換個体が生じる現象に着目して、メダカの性決定遺伝子 *Dmy* に始まる性決定過程に関与する遺伝子の機能について検討した。その結果、メダカ近交系 Hd-rR♀とハイナンメダカ♂との雑種からは性転換個体が出現するのに対して HO4C♀とでは出現しない原因を両系統間の多型を利用して解析し、*Dmy* の発現量制御に関わる遺伝子が、連鎖群 17 上の 624KB の領域に存在することを明らかにした。現在、その遺伝子の同定を目指した研究を継続している。

研究成果の概要（英文）：

Inter-specific hybrids between female of Hd-rR strain of medaka and male *Oryzias curvinotus*, all XY fish developed into females, but when we used females of HO4C strain of medaka for hybridization, no sex-reversals appeared. Utilizing the polymorphism between HdrR and HO4C, we conducted a linkage analysis to uncover a locus (*hml*) on the linkage group 17 responsible for the sex reversal. The analysis of the expression of *Dmy* in the hybrid revealed that the sex-reversal resulted from the decrease of the expression of *Dmy* during the sex-determining stage, indicating that *hml* is related to the regulation of *Dmy* expression. Fine mapping for *hml* narrowed the region of the locus on the chromosome 17 to 624 KB. We are continuing the study for the identification of *hml*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：メダカ・性決定・性分化・生殖巣・種間雑種・性転換・*Dmy*

1. 研究開始当初の背景

1991年の *SRY* の発見以来、*SRY* に始まる性決定の分子機構の研究は必ずしもはかばかしい進展を遂げているとは言えない。性的形質の異常を持つヒトの遺伝子解析から性決定/性分化にかかわる常染色体上の遺伝子が同定され、それらについてマウスを用いて詳細な研究が行われてきたが、*SRY* とそれらの遺伝子との関係については確実な知見は得られておらず、*SRY* に始まる性決定の分子機構は未だ未解明の状態にある。ほ乳類の性決定機構研究における一つの制約条件に、性決定にかかわる遺伝子の変異によるほ乳類性転換個体(XX オス、XY メス)は原則として不妊であり、それらの遺伝解析が困難な点がある。

その観点では、メダカでは X 染色体と Y 染色体は性決定遺伝子の存否以外ほとんど分化しておらず、XX♂、XY♀ともに十分な妊性を有することから、さまざまな遺伝解析が可能である。したがって、性決定にかかわる遺伝子間の関係を検討するためには極めて有利である。また、後述するように、性決定遺伝子の異なる種間で交雑が可能なこともメダカ属魚類の研究上の優位な点である。

我々は 2002 年にメダカの性(雄決定)決定遺伝子 *Dmy* の同定に成功した。*Dmy* は脊椎動物で *SRY* に続いて 2 番目に同定された性決定遺伝子であり、その同定により、メダカをモデルとして脊椎動物の性決定分子機構を解明する可能性が開かれたことになる。我々は、メダカの特性を生かして性決定分子機構に迫る目的で 2 つの方向で研究を進めてきた。一つは、東南アジアに生息するメダカ属魚類の性決定機構の検討であり、もう一つは野生メダカ集団内での性決定関連突然変異個体の探索とその原因遺伝子の究明である。前者の研究から、*Dmy* はメダカ属魚類

に共通の性決定遺伝子ではなく、メダカとハイナンメダカのみ性決定遺伝子であること、そして、それ以外の種はそれぞれ異なる性決定遺伝子を持っていることが判明した(図 1)。

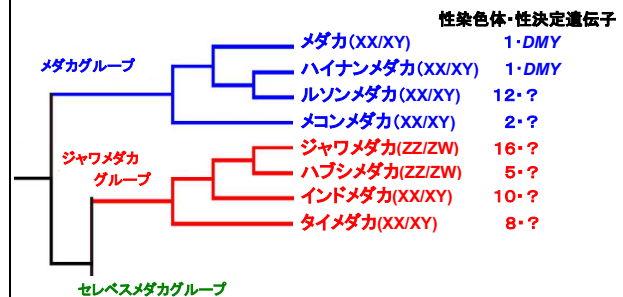


図1. メダカ属魚類の系統関係と性染色体(性決定遺伝子)

一方、野生メダカの研究から、野生集団中には約 1 % 程度の性転換個体(*Dmy* を持つメス、あるいは *Dmy* を持たないオス)が生息していることが明らかになった。*Dmy* を持つメスの解析から、*Dmy* の機能完全喪失型突然変異の場合は全個体がメスに、*Dmy* の発現低下の場合は、発現量が一定以上ではオスのみが、やや少なめでは雌雄の両方が、さらに少ない場合は全てが雌になることが明らかになっている。また、それら XY メスおよび XX メスの遺伝解析からは、常染色体上の性転換関連遺伝子の存在が複数確認され、現在、それらの遺伝子の同定を進めている。

以上のように、現時点では、ほ乳類及びメダカのどちらにおいても、性決定の最初の引き金を引く遺伝子は明らかになっているが、その後の性決定過程については、関与が予想される遺伝子は幾つか指摘されているもの、それらの関係を含めた性決定の分子機構は未だ明らかになっていない。

本研究は、以上の成果に基づき、メダカ属魚類の研究上の優位性を活用して、メダカおよびメダカの姉妹種であるハイナンメダカとルソンメダカの種間雑種の性決定/性分化を詳細に検討して、メダカの性決定/分化の分子機構解明の手がかりを得ようとする

ものである。

2. 研究の目的

今回、研究対象とするメダカ・ハイナンメダカ・ルソンメダカの系統関係は図1に示した通りであり、それらの間での交配実験などから、以下のことが判明している。

1) メダカ、ハイナンメダカの性決定遺伝子は *Dmy* であるが、ルソンメダカの性決定遺伝子は *Dmy* とは別の遺伝子 *Gsdf^Y* であり、その相同遺伝子は、メダカでは *Dmy* の下流で働いていると推定されている。

2) メダカとハイナンメダカの F1 の XX 個体は全メスになるが、XY 個体の全部もしくは一部はメスに性転換する。

3) ハイナンメダカ♀にメダカ♂を交配した場合、使用するメダカ近交系により性転換の出現の有無が異なり、その原因はメダカ近交系間の *Dmy* の機能的差による

4) メダカ♀とハイナンメダカ♂を交配して得られる F1XY の性転換率にも使用するメダカ系統に由来する差があり、Hd-rR 系統と HNI 系統との間の差については、常染色体(連鎖群 17)上の遺伝子(*hml*)が関与している可能性が示唆されている。

5) ハイナンメダカとルソンメダカの F1 は妊性を持ち、子孫を生じ得る。両者の性決定遺伝子が異なることから、F2 以降で性転換個体が得られれば、その遺伝解析から新たな性決定関連遺伝子を見出すことが期待される。

以上の結果を踏まえ、①メダカ(M)とハイナンメダカ(H)の M-H 種間雑種の系で *Dmy* の発現量の違いと種間雑種の遺伝的内容の関係性を明らかにすることにより、*Dmy* の発現量の調節にかかわる遺伝子を同定すること、さらに、②ハイナンメダカとルソンメダカ(L)の H-L/L-H 種間雑種の系で、ルソンメダカの SDF およびその(ハイナン)メダカ相同遺伝子

と *Dmy* との関係、さらに *Dmy* の直下流、あるいは *Gsdf^Y* の直上あるいは下流で機能する遺伝子の同定することが期待でき、それからメダカ属魚類での性決定分子機構全貌解明の手がかりが得ることが出来る。

具体的には、本研究期間で以下の知見を得ることを期待している。

1) これまでの研究から存在が明らかになっている連鎖群 17 上の遺伝子について、染色体上の位置のさらなる絞り込みを行い、メダカゲノム情報を利用して候補遺伝子を同定を目指す。

2) ハイナンメダカとルソンメダカの種間雑種の F2 (BC1) 世代以降の性転換の出現を検討する。

3) 種間雑種個体の性転換過程の分子/形態レベルでの挙動を記載し、正常な性分化過程のどの段階から逸脱して性転換するのかを検討する。

3. 研究の方法

1) メダカとハイナンメダカの種間雑種性転換に関与する常染色体上の因子(*hml*)の探索

メダカ Hd-rR 系統♀との雑種では全個体が性転換するのに対して、HNI 系統♀では一部、HO4C 系統では性転換が起らないことから、Hd-rR と HO4C 系統の間で雑種の性と両系統間の多型マーカーの間での連鎖解析を行うことにより、関連遺伝子を探索する。

2) 種間雑種の性決定関連遺伝子の発現解析
メダカの性決定遺伝子 *Dmy* や *Gsdf* をはじめとする性分化過程で発現することが知られている遺伝子の性転換過程での発現動態を RT-PCR により調べるとともに、形態的手法により、生殖巣を構成する各種細胞の動態を検討する。

3) ルソンメダカとハイナンメダカの種間雑種個体の性の検討

両種間で両方向の交配を行い、得られた F1 個体をそれぞれの性決定遺伝子を持たない種に戻し交配して得た BC1 世代の性を調べるとともに、十分数の個体を得られたら、その個体の遺伝子解析を行い、正常な性分化に必要な遺伝子の所在を連鎖解析により探索する。

4. 研究成果

(1) *hml* の探索

(Hd-rR♀ × HO4C♂) ハイナンメダカ♂ の交配 (図 2) で得られた G2XY 個体について LG17 のマーカーを用いた連鎖解析を行い、組換え個体の作出により *hml* 領域の絞り込みを行った。

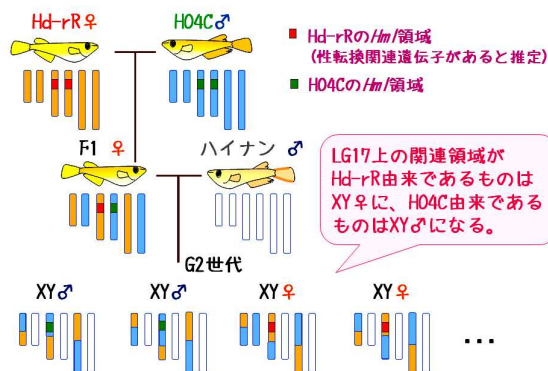


図 2 メダカとハイナンメダカの交配図

G2 世代を XX が 871 個体、XY が 1166 個体、計 2037 個体得た。XY 個体について連鎖解析を行った結果、組換え個体を 7 個体得た。それにより、*hml* はマーカー *sca164start* と *sca435-1* に挟まれ、遺伝距離は 0.2cM、物理距離で 624kb (gap 領域を含む) の領域に存在することが明らかになった (図 3)。この領域には 30 個の遺伝子 (PG) が予測され、それらのいずれかが *hml* であることが推測された。

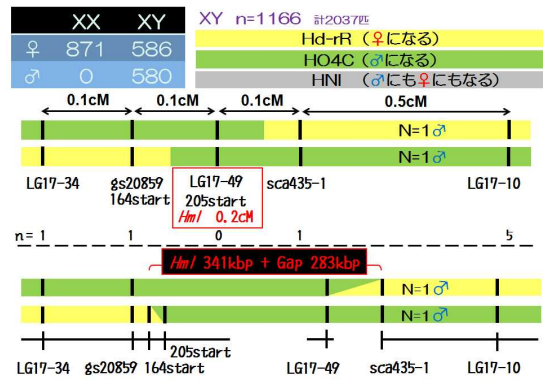


図 3. 連鎖解析の結果 (左上表: 解析個体数 中段: *Hml* 領域の遺伝距離 下段: 物理距離)

現在、絞り込んだ *hml* 領域をカバーする 6 つの BAC を含むコンストラクトを作製し、ハイナンメダカの受精直後の卵に遺伝子導入を行った。遺伝子導入されていることが確認された成魚 82 個体を得たが、現時点で性転換魚は得られていない。今後、遺伝子導入魚の次世代の魚を得て、その中で性転換を検討する予定である。

(2) 性転換過程の検討

ハイナンメダカ、(HO4C♀ × ハイナンメダカ♂) F1XY、(Hd-rR♀ × ハイナンメダカ♂) F1XY の受精後 8 日目の孵化稚魚について RT-PCR 法によって *Dmy* の発現を調べるとともに、その性転換過程を形態学的に検討した。その結果、HO4C♀ × ハイナンメダカ♂) F1XY では、ハイナンメダカ孵化稚魚と同等の *Dmy* 発現量が見られたが、(Hd-rR♀ × ハイナンメダカ♂) F1XY では著しく低かった。

さらに、雑種性転換個体の生殖巣の性分化過程の形態学的観察と生殖細胞の計数の結果、雑種性転換個体は性分化初期から♀方向に分化していることが判明した。

これらの結果から、(メダカ♀ × ハイナンメダカ♂) F1 において *Dmy* の発現量は系統によって差がある、つまり、*hml* は *Dmy* の

発現制御にかかわる遺伝子であることが示唆された。

(3) ハイナンメダカとルソンメダカの種間雑種の検討

両種の F1 雑種を得て、その性と遺伝的性(性決定遺伝子の有無)を検討した。その結果、いずれかの種の性決定遺伝子を持っている個体は♂に分化すること、また、どちらの性決定遺伝子を持たない個体の中にも雄が生じることが明らかになり、この両種の種間雑種の性決定の制御はかなり複雑なものであることが想定された。

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 8 件)

① Myosho T., Otake H., et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191, 163-170, 2012, 査読有り

② Takehana Y., Naruse K., et al. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the W chromosomes of medaka fishes. *Chromosome Research*, 20, 71-81, 2012, 査読有り

③ Kato M., Takehana Y. et al. An autosomal locus controls sex reversal in interspecific XY hybrids of the medaka fishes. *Heredity*, 107, 523-529, 2011, 査読有り

④ Shinomiya A., Otake H. et al. Inherited XX sex reversal originating from wild medaka population. *Heredity*, 105, 443-448, 2010, 査読有り

⑤ Otake H., Masuyama H. et al. Heritable artificial sex chromosomes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Heredity*, 105, 247-256, 2010, 査読有り

⑥ Kato M., Takehana Y., et al. A sex-determining region on the Y chromosome controls the sex-reversal ratio in interspecific hybrids between *Oryzias curvinotus* females and *Oryzias latipes* males. *Heredity*, 104, 191-195, 2010, 査読有り

⑦ Selim K.M., Shinomiya A. et al. Effects of high temperature on the sex differentiation and germ cell population in medaka,

Oryzias latipes. *Aquaculture*, 289, 340-349, 2009, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① S. Hamaguchi, Evolution of the sex determining system in *Oryzias* fishes. Workshop on Evolution of Sex Chromosomes and the Sex Determination in Vertebrates, (Cambera University, Canberra, Australia) (招待講演), 2011年4月21日

② S. Hamaguchi, Evolution of the sex determining system in *Oryzias* fishes: Changeability of the morphologically undifferentiated sex chromosomes. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution. (Lyon Convention Center, Lyon, France), 2010年7月5日

③ 濱口 哲, メダカの性決定遺伝子 DMY とメダカ属魚類性決定機構の多様性, 日本動物学会第80回大会シンポジウム, 静岡, 2009年9月17日, (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口 哲 (HAMAGUCHI SATOSHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20126444

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：