

平成 23 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770070

研究課題名 (和文) メダカ性分化における濾胞刺激ホルモンの役割

研究課題名 (英文) Role of follicle-stimulating hormone on the sexual differentiation in medaka

研究代表者

北野 健 (KITANO TAKESHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：40336219

研究成果の概要 (和文)：メダカ性分化における濾胞刺激ホルモン (FSH) の役割を明らかにするため、FSH 受容体の機能欠損型変異メダカ系統を選別して、その表現型の解析を行った。また、メダカ FSH 受容体の制御領域と GFP 遺伝子とを連結したプラスミドをメダカ受精卵へと顕微注入して *fshr-GFP* トランスジェニック (Tg) メダカ系統の作製を行い、GFP 蛍光で FSH 受容体の発現をモニターできる Tg 系統の作製に成功した。

研究成果の概要 (英文)：To elucidate role of follicle-stimulating hormone (FSH) on the sexual differentiation in medaka, we analyzed loss-of-function of FSH receptor (FSHR) using a FSHR-defective medaka line. Moreover, we successfully established *fshr-GFP* transgenic medaka line by injecting a GFP-plasmid fused the regulatory region of medaka FSHR gene into the fertilized eggs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、性分化、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞は、生殖腺以外の領域で発生し、移動して生殖腺原基に定着した後、生殖腺で発現する性決定遺伝子の方向付けに基づいて精子または卵子へと分化していく。近年、いくつかの生物種において性決定遺伝子が同定されているが、種によって異なる転写因子が性決定遺伝子として機能している事が明らかとなっている。興味深い事に、これ

ら遺伝子は共通して生殖腺体細胞で発現していることから、生殖腺体細胞から何らかのシグナルが生殖細胞へと伝わる事で、生殖細胞が精子または卵子へと分化するものと推測される。しかしながら、生殖腺体細胞から生殖細胞へと送られるシグナル分子の実体は未だに分かっていない。

メダカ (*Oryzias latipes*) は、XY(雄)/XX(雌)型の性決定機構を持つ小型モ

デル動物である。メダカの生殖細胞は生殖腺へ移動した後に雌雄で増殖を開始し、受精後9日目の雌では減数分裂を開始するが、雄では有糸分裂を停止する(生殖細胞数は、雌で100個前後、雄で50個前後と非常に少ないために解析しやすい)(Hamaguchi, 1982)。近年、雄決定遺伝子DMYがXY雄における生殖細胞の増殖と減数分裂の開始を抑制していることが報告されたが(Matsuda et al., 2002)、XX雌において生殖細胞の増殖及び分化を制御する因子は未だに同定されていない。最近、申請者らは、生殖腺刺激ホルモンの一つである濾胞刺激ホルモン(FSH)の受容体(*fshr*) mRNAの発現量が、性分化時期(受精後9日目)においてXY個体よりもXX個体で高い事、またストレスホルモンであるコルチゾルは、*fshr* mRNAの発現及び生殖細胞の増殖を抑制して雄化を引き起こす事を明らかにした(Hayashi et al., 2010)。これらの事から、FSHシグナルはXX雌における生殖細胞の増殖及び分化制御に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、メダカにおけるFSHの役割を明らかにするため、FSH受容体の強制発現系統及び変異系統を作製して表現型解析を行う。また、メダカ性分化時期でのFSH受容体の発現パターンには性差が認められるため、この発現制御機構についても解析する。

3. 研究の方法

メダカFSH受容体の変異系統は、Tillingライブラリー(Taniguchi et al., 2006)からFSH受容体の変異体を選別することにより作製された。また、メダカFSH受容体の強制発現トランスジェニック(Tg)系統は、雌雄の生殖腺体細胞で発現を誘導できる*mis* (Mullerian inhibiting substance; Shiraishi et al., 2008)のプロモーター領域と*fshr*遺伝子を連結したプラスミドをメダカ胚へと顕微注入し、そのF1世代でこのプラスミドがゲノム中に挿入されている個体を選別することにより作製された。さらに、メダカFSH受容体の発現制御機構を解析するため、*fshr-GFP* Tgメダカ系統を上述の方法で作製した。定量的リアルタイムPCRは、LightCycler 480(Roche)により、SYBR Green I Master(Roche)を使用して行った。

4. 研究成果

(1) メダカFSH受容体の過剰発現系統と変異系統の作製及び表現型解析

メダカ性分化時期において、*fshr* mRNAの発現量はXY個体よりXX個体で高い事から(Hayashi et al., 2010)、XY個体でFSH受容体を強制発現するTgメダカ系統の作製を行った結果、1系統の作製に成功した。そこで、このヘテロTgメダカ(孵化後60日目)の生殖腺組織像を観察した結果、正常個体と同様であったことから、FSH受容体の強制発現による生殖腺への影響は認められなかった(Data not shown)。今後は、FSH受容体の発現量からより高いホモTgメダカの表現型を解析する必要があるのではないかと考えられる。

一方、Tillingライブラリーから選別してFSH受容体の変異体の単離を試みた結果、FSH受容体の細胞内ドメインを欠損した系統の単離に成功した。そこで、性分化時期(受精後14日目)におけるこのメダカ仔魚の生殖細胞数を計数した結果、FSH受容体のホモ変異XXメダカにおいては、約半数の個体が正常XX個体と同様の生殖細胞数を示したが、残り半数の個体はXY個体と同様の生殖細胞数を示すことが分かった(Data not shown)。このように、ホモ変異XX個体の約半数は生殖細胞の増殖が抑制され、雄化している可能性が示唆された。しかしながら、本研究においては、成魚での表現型解析までは至らなかったため、今後は成魚での詳細な解析が必要であろう。

(2) メダカFSH受容体の発現制御機構の解析

メダカ性分化時期において、*fshr* mRNAの発現パターンには性差が認められる事、またコルチゾルは*fshr*の発現を抑制して雄化を引き起こす事が明らかとなっている(Hayashi et al., 2010)。これらの分子機構を解明するため、*fshr-GFP* Tgメダカ系統の作製を行った。まず、メダカ*fshr* 5'上流域3745bとGFP遺伝子を連結したベクターを作製し、これをメダカ胚に顕微注入してF0世代を得た。次に、生殖腺でGFP蛍光を保持する個体(F1世代)を選別し、この個体同士を交配してホモ型F2世代を作出し、この系統を実験に使用した。最初に、この系統でのコルチゾルによるGFP遺伝子等の発現変化を調べるため、生殖腺領域における*GFP* mRNAの発現パターンを定量的リアルタイムPCRにより解析した。その結果、性分化時期(受精後9日目)での*fshr*及び*GFP* mRNAの発現量には性差が認められ、XX個体での*fshr*及び*GFP* mRNAの発現は

、コルチゾル投与により有意に抑制される事が分かった(下図)。これらの事から、メダカ性分化時期でのFSH受容体の発現制御には、5'上流域3745bが重要であると考えられる。一方、グルココルチコイド受容体(*gr*) mRNAの発現はコルチゾル投与により抑制されたが、転写誘導因子(*sf-1*) mRNAの発現は、逆にコルチゾルにより有意に上昇することが明らかとなった(下図)。このように、このTgメダカは、FSH受容体の発現制御機構を解析する上で、大変有効なモデル動物となりうると考えられた。

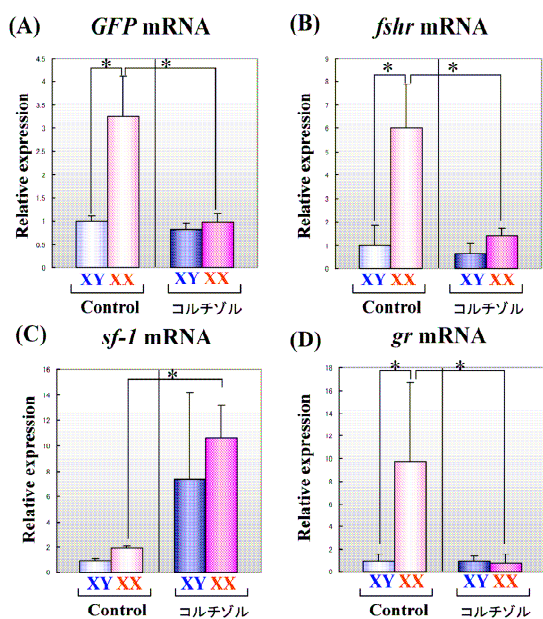


図 *fshr*-GFP Tgメダカにおける *GFP*, *fshr*, *sf-1*, *gr* mRNAの発現解析

(数値は、内部標準である*ef-1α*に対する相対値を示す。)

*: P<0.05)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Yamaguchi T., Yoshinaga N., Yazawa T., Gen K. and Kitano T. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* (査読有), 151, 3900-3908 (2010).
- (2) Hayashi Y., Kobira H., Yamaguchi T., Shiraishi E., Yazawa T., Hirai T., Kamei Y. and Kitano T. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol. Reprod. Dev.*

(査読有), 77, 679-686 (2010).

- (3) Oda S., Mikami S., Urushihara Y., Murata Y., Kamei Y., Deguchi T., Kitano T., Fujimori K., Yuba S., Todo T. and Mitani H. Identification of a functional Medaka heat shock promoter and characterization of its ability to induce in vitro and in vivo exogenous gene expression in Medaka. *Zool. Sci.* (査読有), 27, 410-415 (2010).
- (4) Seki D., Obata S., Shirozu T., Kitano T. and Saitoh H. Identification of four SUMO paralogs in the medaka fish, *Oryzias latipes*, and their classification in two subfamilies. *Biochem. Genet.* (査読有), 48, 737-750 (2010).

[学会発表] (計 18 件)

- (1) Kitano T. (Invited). Molecular mechanism of environmental sex determination in fish. The 4th Bilateral Seminar Japan-Italy: Physical and chemical impacts on marine organisms (Aichi Prefectural University, Nagoya), 25 October, 2010.
- (2) Uchikawa T., Kobira H., Hirai T. and Kitano T. Regulational mechanism of follicle-stimulating hormone receptor expression in medaka (*Oryzias latipes*). 第43回日本発生生物学会大会(京都国際会議場), 2010年6月21日.
- (3) Uchimura T., Hayashi Y., Shiraishi E. and Kitano T. Gene expression profiling induced by high temperature treatment in medaka (*Oryzias latipes*). 第43回日本発生生物学会大会(京都国際会議場), 2010年6月21日.
- (4) Kataura H, Ichimaru H, Shiraishi E, Kanamori A, Hirai T, Kitano T. Functional analysis of follicle-stimulating hormone (FSH) and FSH-receptor in early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). 16th International Congress of Comparative Endocrinology (University of Hong Kong, Hong Kong), 22-26 June, 2009.
- (5) Hayashi Y, Hisaka T, Yamada C, Kitano T. Effect of cortisol on sex differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). 16th International Congress of Comparative Endocrinology

(University of Hong Kong, Hong Kong),
22-26 June, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北野 健 (KITANO TAKESHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：4 0 3 3 6 2 1 9