

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06278

研究課題名(和文) 内在性レトロウイルスが牽引する同一個体群内における第2・3の性決定遺伝子進化機構

研究課題名(英文) The emergence mechanisms of second and third sex-determining genes in the same medaka population driven by retrotransposon

研究代表者

明正 大純(Myosho, Taijun)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00781808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、性決定遺伝子が頻繁に交代するメダカ属において、複数の性決定遺伝子が共存するミナミメダカの長崎県野生個体群を用いて、新たな性決定遺伝子の誕生メカニズムを解明することを目的とし、以下の成果を得た。

長崎県個体群の全ゲノムの解析から第2の性決定遺伝子であるGsdfeoYの原因となったレトロトランスポゾンが個体群内で高い転移活性を持つこと、またGsdfeoY mRNAによる機能獲得実験からその機能時期を明らかにした。

遺伝子発現と組織学的解析からGsdfeoYを持つ個体を雌にする第3の性決定遺伝子の機能時期、性連鎖解析から第3の性決定遺伝子が存在する複数の遺伝子座を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、性決定遺伝子の交代機構の解明にある。長崎県のミナミメダカ個体群をモデルに、性決定遺伝子がどのように誕生したかの一端を明らかにした。特に、GsdfeoY遺伝子の発現が性決定に重要な役割を果たし、内在性レトロウイルスSushi-ichiの転移がこのプロセスを駆動していることを示した。この成果は、性決定の多様性と進化を理解する上で重要な知見を提供する。

社会的意義として、性決定メカニズムの理解が生物多様性の保全や種の存続に寄与できるさらに、魚類の性決定メカニズムの解明は、養殖業における性制御技術の開発にも貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the birth mechanism of a new sex-determining gene in the genus *Oryzias*, in which sex-determining genes frequently shift, using the wild population of *Oryzias latipes* in Nagasaki Prefecture, in which multiple sex-determining genes coexist, and the following results were obtained.

(i) Analysis of the whole genome of the Nagasaki population revealed that the retrotransposon responsible for the second sex-determining gene, GsdfeoY, has high transfer activity within the population, and experiments on the gain of function by GsdfeoY mRNA revealed its functional timing. (ii) The functional timing of the third sex-determining gene that turns individuals with GsdfeoY female from gene expression and histological analysis, and the multiple loci where the third sex-determining gene is present from sex linkage analysis.

研究分野：遺伝学

キーワード：Oryzias latipes sex-determining gene gsdf gain-of-function whole genome analysis gene expression sex-linkage analysis

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝的多様性を生み出し、それらを維持するために用いられているシステムが有性生殖である。性は遺伝または環境要因によって決まるが、脊椎動物の多くは遺伝性決定を用いている。遺伝性決定を担うのは性染色体上の性決定遺伝子である。これまでに多数の性染色体が同定され、その中の 10 程度の性決定遺伝子が同定されたことにより、その多様性が明らかになってきた。さらに、性決定遺伝子が比較的共通している哺乳類や鳥類でも、*Sry* や *DMRT1* を性決定遺伝子として用いない例外も存在する。これらの結果は、性染色体の構造変化と精巣・精子形成に必須の遺伝子の存在に伴う「性決定遺伝子の固定化」に加えて、「性決定遺伝子の交代」という 2 つの普遍的なシステムによって遺伝性決定が構成されていることを示唆する。遺伝性決定の全容解明には、哺乳類などで研究が進んでいる前者に加え、後者である性決定遺伝子の交代機構の詳細な解明が必須である。

「性決定遺伝子の交代」は、遺伝子レベルで起こる「祖先遺伝子の性決定機能獲得」と個体群レベルで起こる「新旧性決定遺伝子の交代」の 2 段階から構成される。前者は、祖先遺伝子の調節領域やコード領域に性決定機能獲得の原因となる変異が起こる。その変異がもたらす機能変化を特定することで分子機構が明らかになる。しかし、多くの性決定遺伝子は起源が古く、祖先遺伝子からの変化が大きいため、その原因を特定することが困難である。後者は、2 つの性決定遺伝子が同一個体群内に共存し、それらの交代過程にある稀有な野生個体群を解析する必要がある。上記の理由により、両者の機構は不明な部分が多い。

2. 研究の目的

これまでに筆者は、メダカ属内の近縁種の 10 種類以上の性染色体を同定することによってそれらが頻繁に交代していること、それに加え、異なる性染色体からは異なる性決定遺伝子が同定されることを明らかにした（ルソンメダカ：*Gsdf^Y*、インドメダカ：*Sox3^Y*、マーモラタスメダカ：*Sox3^Y*、ペクトラリスメダカ：*Gsdfb^Y*、長崎県産ミナミメダカ：*Gsdf^{neoY 1-3}*）。これらの結果は、性決定遺伝子が頻繁に交代していることを実証し、「メダカ属が性決定遺伝子の交代機構を解明する最適なモデルである」ことを強く支持する。また、これらの発見は、独立に何度と同じ祖先遺伝子から性決定遺伝子に進化するような、性決定遺伝子に進化しやすい遺伝子（*Sox3*, *Gsdf* など）があるという共通機構の発見に大きく貢献した。

メダカ近縁種の性決定遺伝子の探索過程において、申請者はメコンメダカとハイナンメダカでは種内の系統間で性染色体が異なることを明らかにし、両種では種内にそれぞれ 2 つの性決定遺伝子が存在することを示唆した。申請者らによって、同様の状況が日本のメダカにおいても観察している。これまでに一万個体以上の日本の野生メダカ個体群から約 1%の性転換個体（日本のメダカの共通の性決定遺伝子 *Dmy(+)* の雌、*Dmy(-)* の雄）を発見している。これらの性転換

個体は遺伝的 or 非遺伝的なものが約半数ずつであったことから、新たな性転換因子/新規の性決定遺伝子が次々と誕生している可能性を示す同時に、「日本の野生メダカが性決定遺伝子の交代機構を解明するより最適なモデルである」ことを示唆している。

それらの個体群の中で最も解析が進んでいるのが長崎県の野生個体群であり、*Dmy* に加えて第2の性決定遺伝子である *Gsdf^{neoY}* が共存することを発見した⁴⁾。そして、*Gsdf^{neoY}* の性決定機能獲得の原因配列が、祖先遺伝子である常染色体の *Gsdf* の上流配列に内在性レトロウイルスである *Sushi-ichi* の挿入であることを明らかにした⁴⁾。そして、*Gsdf^{neoY}* の発現が *Sushi-ichi* のマイナス鎖の発現と *Gsdf* の組み合わせであることから、*Sushi-ichi* の転移抑制機構を利用して *Gsdf^{neoY}* の性決定機能を獲得した可能性を示唆した⁴⁾ (図1)。また、経年的なこの個体群の調査と予備的な交配実験から、*Gsdf^{neoY}* の *Sushi-ichi* 特異的に抑制する第3の性決定遺伝子の存在を示唆している (図1)。本研究では、「第2の性決定遺伝子 *Gsdf^{neoY}* の原因となった *Sushi-ichi* の転移能力の検証」と、「第3の性決定遺伝子の同定」を行うことによって内在性レトロウイルスの転移機構が牽引した連鎖的な性決定遺伝子誕生機構の解明を目的とすした。



図1 長崎個体群における3つの性決定カスケード

3. 研究の方法

(1) 遺伝的性の判定

DNAを尾鰭、または尾部から抽出した。PCRによるDNA増幅はKAPATaq EXtra PCR Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)を用い、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動によって、遺伝子型の判定を行った。

(2) 生殖腺の観察

稚魚をブアン氏固定液で固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン標本は、回転式マイクロームで厚さ5 μmの連続横断組織切片を作成し、組織標本とし、生殖腺の観察を行った。

(3) 遺伝子発現解析

稚魚をRNAlater (Thermo, Kanagawa, Japan)で固定し、RNA抽出をNucleoSpin® RNA (Takara, Shiga, Japan)を用いて行った。得られたTotal RNAは5×Prime Script RT Master Mix (Takara, Shiga, Japan)を用いてcDNA溶液とした。RT-qPCRはSYBR® Green I Master (Roche, Indianapolis, USA)とLightCycler® 480 System (Roche, Indianapolis, USA)を用いて行った。

4. 研究のと成果

(1) 全ゲノム解析を用いた $Gsdf^{neoY}$ 誕生の原因となった *Sushi-ichi* の個体群内における転移活性の推定

長崎県個体群の2個体の全ゲノムを次世代シーケンサーで読み、100箇所以上の *Sushi-ichi* の挿入力の候補から15カ所をPCRによって検出可能にした。その後、PCRによって15カ所の挿入の有無を確認した。その結果、全ての個体で挿入が確認できたのは3カ所のみであったことから、*Sushi-ichi* は $Gsdf^{neoY}$ を持つ個体群内で高い転移活性を持つことが推定された。

(2) $Gsdf^{neoY}$ mRNAを用いた機能獲得実験による機能時期の決定

$Gsdf^{neoY}$ mRNAを1細胞期の受精卵にmicroinjectionを行ったところ、孵化日のXX仔魚において $Gsdf^{neoY}$ mRNA が検出できないにもかかわらず、XYと同様に常染色体の $Gsdf$ の高発現が誘導されていた。そして、孵化後10日においても多くの個体がXYと同様の性分化関連遺伝子の発現様式を示し、成魚においてXX雄個体を得ることができた。つまり、孵化までの $Gsdf^{neoY}$ 発現が第2の性決定遺伝子として十分な能力を持つことが示唆された。

(3) 遺伝子発現と生殖腺の組織学的解析による第3の性決定遺伝子の機能時期の推定

第3の性決定遺伝子を持つと推定される、 $Gsdf^{neoY}$ (+)雌が約半数出現する維持系統の初期生殖腺分化を解析した。その結果、孵化後10日において $Gsdf^{neoY}$ の高発現を示すにもかかわらず、卵減数分裂の指標となる遺伝子である42sp50の高発現が半数で確認できた。この結果は、これまでに同定されてきたメダカの性決定遺伝子と同様に第3の性決定遺伝子が、孵化後10日までに機能することが示唆された。

(4) 性連鎖解析による第3の性決定遺伝子の探索

第3の性決定遺伝子を持つ $Gsdf^{neoY}$ (+)雌とHd-rR雄を交配したG1から $Gsdf^{neoY}$ (+)雌が出現し、G1から $Gsdf^{neoY}$ (+)雌とHd-rR雄を交配したG2から $Gsdf^{neoY}$ (+)雌が得られている。その雌を用いて性連鎖解析によって第3の性決定遺伝子の遺伝子座を探索したところ、LG8、17、22、24が有力候補となった。第3の性決定遺伝子を持つ $Gsdf^{neoY}$ (+)雌とHd-rR雄を交配したG1の $Gsdf^{neoY}$ (+)雌と、Hd-rR雄を交配したG2に出現した $Gsdf^{neoY}$ (+)雌の性連鎖解析によって絞り込んだ4遺伝子座 (LG8、17、22、24) を対象とした。この4遺伝子座がヘテロ接合で得られる、そして $Gsdf^{neoY}$ (+)雌の出現率の増加が期待できる4遺伝子座がヘテロ接合で得られる交配を行い、それぞれ300以上のG3個体を得た。G3の $Gsdf^{neoY}$ (+)雌の出現割合は低く、4遺伝子座は連鎖しなかった。これらの結果は第3の性決定遺伝子の存在よりも、 $Gsdf^{neoY}$ (+)の雄決定能力が

100%ではない数%浸透度の低い性決定遺伝子であることを示唆した。

< 引用文献 >

- 1) **Myosho T** et al.: Turnover of sex chromosomes in *celebensis* group medaka fishes. **Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)**. 5, 2685-91 (2015).
- 2) **Myosho T** et al.: Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. **Genetics**. 191(1), 163-70 (2012).
- 3) Takehana Y, **Myosho T et al.**: Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. **Nature Communication** 20(5), 4157 (2014).
- 4) **明正大純**: *Gsdf*から性決定遺伝子へ独立に進化した3種のメダカの性決定遺伝子誕生機構の解明、日本学術振興会：文部科学省科学研究費補助金(若手研究B)(2017-2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 明正大純、藤本真悟、小林亨
2. 発表標題 ミナミメダカ長崎県平戸個体群におけるDmyに次ぐ第2と第3の性決定遺伝子の連続的な誕生機構の探索
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 明正大純、藤本真悟、小林亨
2. 発表標題 長崎県平戸産ミナミメダカ個体群におけるDmyに次ぐ第2の性決定遺伝子GsdneoYの獲得機構と第3の性決定遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------