

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770058

研究課題名(和文) 魚類性転換の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of sex change in the protogynous fish

研究代表者

堀口 涼 (Horiguchi, Ryo)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70452969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の性転換現象は、脊椎動物の性決定・分化のメカニズムや性の可塑性(変わりやすさ)を研究するための良いモデルである。本研究では、魚類の性転換メカニズムを理解するために、性転換初期に発現する *gsdf* 遺伝子に焦点を当て、細胞・分子生物学的解析を行った。卵巢から精巢への性転換過程の生殖細胞の追跡によって、卵巢に存在する生殖原細胞が精子の起源であること、また、これらに隣接する支持細胞は *gsdf* を発現しており、*gsdf* が生殖細胞の増殖や雄化に関与する可能性をみいだした。

研究成果の概要(英文)：Sex change in fishes provides a good model for studying sex determination, differentiation and sexual plasticity in vertebrates. In the present study, we examined cellular and molecular process of sex change in the protogynous wrasse focusing on *gsdf* in order to understand the mechanism of sex change. Pulse chase analysis during sex change from ovary to testis shows that gonial germ cells in the ovary are the origin of sperm. The expression of *gsdf* was observed in the supporting cells surrounding gonial germ cells, suggesting that *gsdf* may be involved in the proliferation and masculinization of gonial germ cells in the early process of the sex change.

研究分野：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：性転換 性的可塑性 性決定 性分化 精巢 卵巢 魚類 ミツボシキュウセン

1. 研究開始当初の背景

魚類の性決定システムは多様で、他の脊椎動物にみられる遺伝的な、或いは温度など環境的な要因による性決定システムだけではなく、成魚においても性を転換する性転換現象が存在する。このように魚類が雌雄性という基本原理を保持しつつ多様な生殖様式を展開するためには、性決定・性分化の過程で共通する機構に加えて種ごとに異なる機構があると考えられる。性を転換する生物の性決定メカニズムの研究は、動物の性決定研究における 2 つの極めて根源的な問題を明らかにする端緒となり得る。「どのようにして性は獲得されるのか」と「どのようにして性は維持されるのか」である。その中で、今回、私が提案する研究は、性転換魚を用いて「どのようにして性は獲得されるのか」を問うものである。

本研究で用いるベラ科のミツボシキウセン (*Halichoeres trimaculatus*) は、雌から雄へと性転換する雌性先熟型の性転換魚である。ミツボシキウセンの性転換は、社会環境の変化が起因となり、生殖腺ではエストロゲンの低下が引き金になり性転換を引き起こす。成熟した雌の卵巣内に精巣組織はみられないが、性転換が始まると卵巣組織は崩壊し、最終的に完全に精巣に置き換わる。

これまでの研究において、エストロゲンの合成阻害により実験的に性転換を誘導した時、生殖腺における *gsdf* の遺伝子発現の上昇が、他の精巣分化関連遺伝子よりも早いタイミングで、生殖原細胞に隣接する支持細胞系列の細胞に観察された。これらの結果から *gsdf* が性転換の初期過程に発現し、生殖原細胞や支持細胞自身の雄化や精子形成の誘導に関与する可能性が示唆されている。また、本種が性転換できるのは、生殖腺に存在する生殖細胞、および支持細胞など生殖腺体細胞に性的可塑性(変わりやすさ)が維持されているためだと考えられるが、その分子メカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ミツボシキウセンの性転換誘導直後の支持細胞に発現誘導される *gsdf* に着目し、性転換過程における支持細胞と、隣接する生殖細胞の雌雄分化メカニズムを分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BrdU を用いた性転換過程における生殖細胞の追跡

性転換初期過程の生殖腺では、卵巣組織の崩壊に続いて、生殖原細胞の増殖が観察される。これらの生殖原細胞が精子の起源となるのかどうかを明らかにするために、性転換誘導後 1 週間の雌個体に BrdU を腹腔注射し、2 時間後、さらに 2 週間後の生殖腺を観察し、BrdU ラベルされた生殖細胞の追跡を試みた。

(2) *gsdf* のプロモーター領域の同定

ミツボシキウセンの *gsdf* の mRNA 発現は精巣に特異的で、卵巣での発現はほとんどみられない。このことは卵巣、精巣の両方で発現するとされるメダカやゼブラフィッシュの報告とは異なり、ミツボシキウセン独自の発現調節機構の存在が推測される。このことを明らかにするために、ミツボシキウセンのゲノムライブラリーを構築し、*gsdf* 遺伝子上流領域の単離し、推定される転写調節因子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) BrdU を用いた性転換過程における生殖細胞の追跡

性転換誘導後 1 週間の個体に BrdU を腹腔注射し、2 時間後に生検により生殖腺を一部採取した。続いて、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色により、卵巣薄板周辺に BrdU 陽性の生殖原細胞が確認された。また、*gsdf* の ISH との二重染色において、すべての BrdU 陽性の生殖原細胞は *gsdf* 陽性の支持細胞に隣接していることが観察された(図 1, 2 hours)。さらに 2 週間後、生殖腺を摘出し、同様に BrdU ラベルされた生殖細胞を観察した結果、精子形成が進行した生殖腺の中に、BrdU 陽性の精原細胞、精母細胞、精細胞が確認された(図 1, 2 weeks)。この結果から、性転換初期に卵巣薄板周辺で分裂していた生殖原細胞が精子の起源となっていること、また、その増殖や精子形成の進行に隣接する *gsdf* 陽性の支持細胞が関与することを示唆している。興味深い事に、2 週間後の生殖腺内に、精子形成過程の生殖細胞と比較して核径の大きな BrdU 陽性の生殖細胞が観察された。これらの細胞は形態的特徴から、減数分裂直後の卵母細胞である可能性が高く、卵形成過程の減数分裂に進行した時点で性的な可塑性を喪失したのではないかと考えられるが、今後、詳細に解析を進めていきたい。

(2) *gsdf* のプロモーター領域の同定

ミツボシキウセンの IP 雄および IP 雌の生殖腺からゲノム DNA を抽出し、それぞれのゲノムライブラリーを作成した。*gsdf* の開始コドンを含む 3' プライマーを合成し、アダプタープライマーとの PCR 増幅を行った。ゲノムウォーキングにより、最終的に開始コドンから約 3kb の上流領域が単離された。シーケンスの後、雌雄の配列を比較したところ、ほとんどの配列は一致していたが、2 カ所の短い繰り返し配列に違いがみられた。この配列の相違が雌雄差かどうか、今後、解析する個体数を増やして精査していく予定である。また、転写調節因子の結合モチーフの検索を行い、開始コドンから上流 500bp の領域に GATA や SF-1 が確認された。この領域は魚類を通じてよく保存されており、これらの因子が生殖腺支持細胞における特異的発現に関

与すると考えられている。しかしながら、ミツボシキウセンにおいてエストロゲンによる抑制的な転写調節を予想していたが、ERE 等の配列は調べた範囲で見つからず、今後、他の調節機構の可能性についても調べたい。

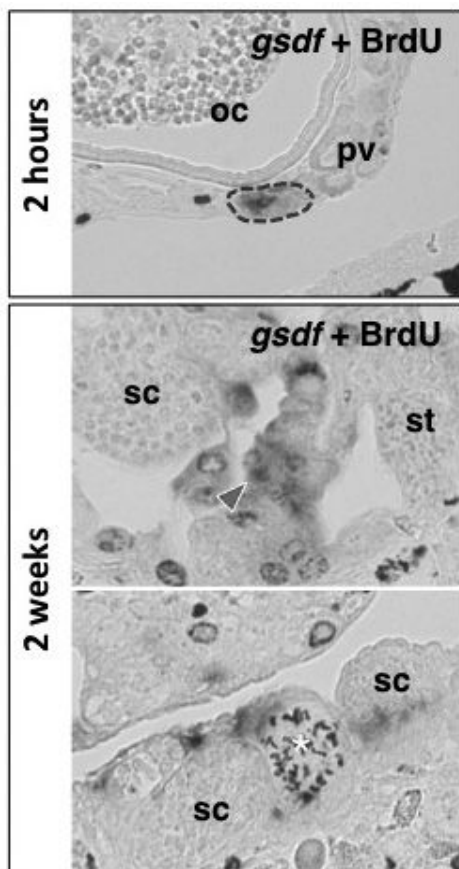


図 1 BrdU を用いた性転換過程における生殖細胞の追跡(上)BrdU 投与後、二時間の性転換過程の生殖腺。卵巣薄板周辺にラベルされた生殖原細胞が観察された(点線内)。(下)BrdU 投与後、二週間の性転換過程の生殖腺。性転換が進行し、ラベルされた精原細胞(矢頭)と精母細胞(アスタリスク)が観察される。oc 卵母細胞、pv 周辺仁期の卵母細胞、sc 精母細胞、st 精細胞

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 2 件)

R. Horiguchi, R. Nozu, T. Hirai, Y. Kobayashi, Y. Nagahama and M. Nakamura. Characterization of gonadal soma-derived factor expression during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Dev. Dyn. (2013) 242, 388-399. DOI:10.1002/dvdy.23929

R. Nozu, R. Horiguchi, R. Murata, Y.

Kobayashi and M. Nakamura. Survival of ovarian somatic cells during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Fish Physiol. Biochem. (2013) 39, 47-51. DOI:10.1007/s10695-012-9632-2

[学会発表](計 1 件)

堀口 涼、野津 了、平井俊朗、小林靖尚、長濱嘉孝、中村 将 ミツボシキウセンの性転換過程の生殖腺における *gsdf* の発現解析 日本動物学会第 84 回岡山大会 岡山大学(岡山県岡山市)2013 年 9 月 27 日

[図書](計 1 件)

堀口涼: コラム 5 魚類の性転換, 研究者が教える動物飼育 第 3 巻 - ウニ, ナマコから脊椎動物へ -, 共立出版, 77-78, 2012.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀口 涼 (HORIGUCHI, Ryo)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号: 7 0 4 5 2 9 6 9

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：