

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25840092

研究課題名(和文) インドメダカSox3遺伝子における性決定機能獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Gain-of-function mechanism of Sox3 as a sex-determining gene in *Oryzias dancena*

研究代表者

竹花 佑介 (TAKEHANA, Yusuke)

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・助教

研究者番号：60432093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集によってSox3ノックアウトメダカを作成したところ、成熟したXX個体はすべてメスに、XY個体はすべてオスに分化したことから、メダカではSox3が性分化に必要ないことが示された。これらの結果から、もともと性分化に関与しないSox3が、既存の遺伝子系を流用することでインドメダカの性決定遺伝子になった(co-option仮説)のではなく、インドメダカで新たな発現パターンを獲得することによって新奇の性決定パスウェイを獲得したこと(de novo仮説)が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study demonstrated that Sox3 on the Y chromosome is the sex-determining gene in *Oryzias dancena*. To elucidate whether Sox3 is originally involved in sex determination/differentiation in *Oryzias*, we generated Sox3-KO *Oryzias latipes* using TALEN technique, and obtained loss-of-function type mutations. Homozygous mutants survived after sexual maturation, and no phenotypic defect is observed. Homozygous XX developed as phenotypic females and YY as males. Furthermore, testis structure of homozygous XY mutant looks normal, suggesting that Sox3 is not necessary for gonadal development or testis differentiation in *O. latipes*. These results suggest that sex-determining function of Sox3 arose through acquisition of the novel expression pattern at developing gonad in *Oryzias dancena*.

研究分野：遺伝学

キーワード：性決定遺伝子

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物では、性染色体の組み合わせによって遺伝的に性が決定される。哺乳類の場合、Y染色体上の性決定遺伝子 *Sry* が胎児期の生殖巣原基で一過的に発現することによって精巢分化が開始される。この *Sry* の祖先遺伝子は *Sox3* であり、原始 Y 染色体上の *Sox3* が性決定機能を獲得することによって *Sry* が生じたと考えられている (Sutton et al., 2011)。一方、哺乳類以外の脊椎動物では *Sry* が見つかっておらず、性染色体の起源も分類群によって全く異なる。また、*Sox3* の中枢神経系での発現は脊椎動物で広く保存されているが、*Sox3* が性決定機能を担っている例はこれまでに知られていない。そのため、脊椎動物の進化過程で何度も新奇の性決定遺伝子が誕生し、それによって異なる性染色体が生じてきたと考えられてきた。実際に、近年脊椎動物で同定された性決定遺伝子はいずれも異なることが示されている。

ところが最近、申請者らは、哺乳類とは独立に、魚類 (インドメダカ) において *Sox3* の Y 染色体アリル (*Sox3^Y*) が性決定遺伝子として機能していることを発見した。これまでにインドメダカの性決定遺伝子座を X 染色体上で 140kb、Y 染色体上で 220kb のノンコーディング領域内に特定し、遺伝子導入実験によって候補遺伝子を探索した。その結果、Y 染色体上の性決定領域内には近傍遺伝子 *Sox3* の生殖巣特異的エンハンサーが存在し、この領域が性決定時期における *Sox3^Y* の一過的発現を誘導することによって、精巢分化が開始されることが示唆された。さらに、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用いて *Sox3^Y* をノックアウトすると XY 個体が雌に性転換することから、*Sox3^Y* が本種の性決定遺伝子であることが確かめられた (Takehana et al., 2014)。これらの結果は、魚類と哺乳類で進化的に独立に、同じ遺伝子 (*Sox3*) が性決定遺伝子として使い回されてきたことを示している。

他の多くの発生プログラムでは、既存の遺伝子ネットワークの流用 (co-option) が、新奇形質の獲得に重要な役割を果たしてきたことが示されている。そこで本研究では、インドメダカの *Sox3* が、既存の遺伝子系を流用することで性決定遺伝子として成立したのか (co-option 仮説) あるいは全く新奇に遺伝子ネットワークを構築することによって性決定機能を獲得したのか (*de novo* 仮説) を明らかにする。哺乳類では、マウスにおいて *Sry* や *Sox3* の機能解析が行われているが、*Sry* が誕生してから 1 億年以上が経過しているため、*Sry* と *Sox3* の機能分化過程を追跡するのは困難である。一方、インドメ

ダカの *Sox3^Y* は性決定機能を獲得してからまだ数百万年程度しか経過していないため、進化過程の追跡が容易である。そこで本申請研究では、インドメダカ *Sox3^Y* が性決定機能を獲得するに至った過程を解明し、これらの仮説を検証した。

2. 研究の目的

本研究ではインドメダカの *Sox3* が、既存の遺伝子系を流用することで性決定遺伝子として成立したのか (co-option 仮説) あるいは全く新奇に遺伝子ネットワークを構築することによって性決定機能を獲得したのか (*de novo* 仮説) を解明する。これにより、魚類と哺乳類で独立に *Sox3* が性決定遺伝子として成立した理由を明らかにする。

3. 研究の方法

Sox3 の発現解析: *in situ* ハイブリダイゼーションおよび、*Sox3* 抗体を用いた免疫組織化学によって発現解析を行った。メダカ各種について発生段階を追ってサンプリングし、*Sox3* の発現パターンを比較した。

トランスジェニック系統の作出: BAC ライブラリーが作製から *Sox3* を含む BAC クローンを単離した。大腸菌の相同組換えを利用した BAC 改変技術を用いて、各 BAC クローンの *Sox3* 遺伝子領域を GFP に置換したコンストラクト (*Sox3*-GFP) を作製した。すべてのコンストラクトには Tol2 トランスポゾンのシス配列を付加しておき、Tol2 転移酵素を介した高頻度遺伝子導入法を利用できるようにした。作製した各コンストラクトの DNA と Tol2 転移酵素 mRNA を 1 細胞期の胚に顕微注入し、得られた遺伝子導入個体を成魚になるまで (孵化後 2 ヶ月以上) 飼育した。これらを交配して遺伝子導入系統を複数樹立し、Tg (*Sox3*-GFP) 系統については GFP の発現パターンを解析した。

Sox3 変異体の作出と表現型解析: インドメダカについてはすでに ZFN によって *Sox3* 変異体を作出したので、本研究ではメダカの変異体を作出した。ゲノム編集 (TALEN) によって *Sox3* 遺伝子に挿入・欠失変異を導入し、F1 世代で機能欠損型の変異をもつ個体を選抜した。選抜したヘテロ接合体を交配し、F2 以降の世代で変異ホモ (*Sox3*^{-/-}) 個体を作製した。これらのノックアウト個体について表現型解析を行い、生殖巣における *Sox3* の機能を明らかにした。これらの実験から、インドメダカ *Sox3^Y* が性決定機能を獲得した過程を推定した。

4. 研究成果

メダカ *Sox3* ペプチドを合成してポリ

クローナル抗体の作製を試みた。しかし、ELISA レベルでは検出可能な抗体は得られたものの、免疫組織化学で使用可能な抗体は得られなかった。

そこで、レポーター遺伝子によって *Sox3* 発現を検出できるトランスジェニックシステムを作出するため、*Sox3* を含む BAC クローンをスクリーニングした。インドメダカについて *Sox3^Y* および *Sox3^X* を含む BAC クローンを単離し、その *Sox3* 遺伝子領域を GFP に置換したコンストラクトを作成した。これをインドメダカ胚にマイクロインジェクションすることによって *Sox3* 発現を可視化できるトランスジェニックシステムを樹立し、これらのシステムの解析を行った。その結果、*Sox3^X* トランスジェニックシステムでは、脳や感覚器官での発現が認められた。一方、*Sox3^Y* システムでは、これらの組織での発現に加えて、性決定時期の生殖巣での発現が観察された。インドメダカ以外の近縁種では、生殖巣における *Sox3* 発現が認められなかったため、インドメダカ Y 染色体上の *Sox3* が新たな発現パターンを獲得することによって性決定遺伝子として成立したことが示された。

また、*Sox3* の生殖巣における機能の有無を確認するため、TALEN によって *Sox3* ノックアウトメダカを作出した。その結果、どのノックアウト個体も正常に発生し、初期性分化過程も正常であった。さらに、成熟した XX 個体はすべてメスに、XY 個体はすべてオスに分化したことから、メダカでは *Sox3* が性分化に必要ないことが示された。これらの結果から、もともと性分化に関与しない *Sox3* が、インドメダカで新たな発現パターンを獲得することによって新奇の性決定パスウェイを獲得したこと (de novo 仮説) が示唆された。

さらに、セレベスメダカグループのメダカ近縁種 2 種 (マーモラタスメダカおよびプロファンディコラメダカ) でも、性決定遺伝子の有力候補として *Sox3* が同定された。これらの近縁種では、*Sox3* の近傍に Y 染色体特異的な 0.5kb の挿入配列が同定され、この配列の有無と表現型のオス・メスが完全に連鎖した。しかし、この挿入配列はインドメダカの性決定領域に存在しないため、メダカ属では独立に 2 回 *Sox3* が性決定遺伝子として獲得されてきた可能性が示唆された。

しかし、インドメダカ *Sox3^Y* を導入したトランスジェニックメダカや、*Amh* プロモータによって *Sox3* を強制発現させたトランスジェニックメダカを作出し、生殖巣体細胞における *Sox3* 発現の誘導を試みたが、これまでに性転換個体は得られていない。今後は、これらのトランスジェニックメダカにおいて生殖巣体細胞

での *Sox3* 発現を誘導できているかについて精査する必要がある。

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 10 件)

- (1) Kimura T, Takehana Y, Naruse K (2017) *pnp4a* is the causal gene of the medaka iridophore mutant *guanineless*. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 7:1357-1363. (査読有り) DOI:10.1534/g3.117.040675
- (2) Sagai T, Amano T, Maeno A, Kimura T, Nakamoto M, Takehana Y, Naruse Y, Okada N, Kiyonari H, Shiroishi T (2017) Evolution of Shh endoderm enhancers during morphological transition from ventral lungs to dorsal gas bladder. **Nature Communications** 8:14300. (査読有り) DOI:10.1038/ncomms14300.
- (3) Takehana Y, Sakai M, Narita T, Sato T, Naruse K, Sakaizumi M (2016) Origin of the boundary populations in medaka (*Oryzias latipes* species complex). **Zoological Science** 33:125-131. (査読有り) DOI:10.2108/zs150144
- (4) Takehana Y, Matsuda Y, Ikuta J, Kryukov AP, Sakaizumi M (2016) Genetic population structure of the Japanese grass lizard, *Takydromus tachydromoides* (Reptilia: Squamata), inferred from mitochondrial cytochrome *b* variations. **Current Herpetology** 35:22-32. (査読有り) DOI: 10.2108/zs150144
- (5) Kagawa N, Honda A, Zenno A, Omoto R, Imanaka S, Takehana Y, Naruse K (2016) Arginine vasotocin neuronal development and its projection in the adult brain of the medaka. **Neuroscience Letters** 613:47-53. (査読有り) DOI:10.1016/j.neulet.2015.12.049
- (6) Myosho T, Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2015) Turnover of sex chromosomes in *celebensis* group medaka fishes. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 5:2685-2691. (査読有り) DOI:10.1534/g3.115.021543
- (7) Hayakawa H, Le QD, Kinoshita M, Takehana Y, Sakuma K, Takeshima H, Kojima S, Naruse K, Inoue K (2015) Genetic similarity of the Hainan medaka populations collected from hyper- and hypoosmotic environments in northern Vietnam. **Ocean Science Journal** 50:231-235. (査読有り) DOI:

- 10.1007/s12601-015-0020-6
- (8) Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K (2014) Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications* 5:4157. (査読有り) DOI:10.1038/ncomms5157
- (9) Uno Y, Asada Y, Nishida C, Takehana Y, Sakaizumi M, Matsuda Y (2013) Divergence of repetitive DNA sequences in the heterochromatin of medaka fishes: molecular cytogenetic characterization of constitutive heterochromatin in two medaka species: *Oryzias hubbsi* and *O. celebensis* (Adrianichthyidae, Beloniformes). *Cytogenetic and Genome Research* 141:212–226. (査読有り) DOI: 10.1159/000354668
- (10) Kawaguchi M, Takahashi H, Takehana Y, Naruse K, Nishida M, Yasumasu S (2013) Sub-functionalization of duplicated genes in the evolution of nine-spined stickleback hatching enzyme. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 320:140–150. (査読有り) DOI:10.1002/jez.b.22490

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) Takehana Y, Yasugi M, Nagano A, Naruse K “Sex-determining locus of the medaka-related fish, *Oryzias haugiagensis*.” 8th Aquatic Animal Models of Human Disease Conference. The University of Alabama, Birmingham, USA, 2017 年 1 月 7 日 ~ 12 日
- (2) Takehana Y, Yasugi M, Nagano A, Naruse K “Identification of sex-determining locus in the medaka-related fish, *Oryzias haugiagensis* collected at southern Vietnam.” 22th International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan. OIST (Onna-son)/Okinawa Convention Center (Naha), Okinawa, 2016 年 11 月 14 日 ~ 19 日
- (3) Takehana Y, Myosho T, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K “Repeated co-option of *Sox3* as the sex-determining gene in *Oryzias*.” 8th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology. The University of Hong Kong, Hong Kong,

China, 2016 年 6 月 20 日 ~ 24 日 (招待講演)

- (4) Takehana Y, Myosho T, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K “Repeated independent evolution of *Sox3* as the sex-determining gene in *Oryzias*.” 5th International Symposium of *Oryzias* Fish. Mahasarakham, Thailand, 2015 年 11 月 12 日 ~ 14 日
- (5) 竹花佑介, 成瀬清 「ハウザンメダカ性決定遺伝子座の同定」日本動物学会第 86 回大会, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市), 2015 年 9 月 17 日 ~ 19 日
- (6) Takehana Y, Naruse K “Co-option of *Sox3* as the sex-determining factor in a medaka fish *Oryzias dancena*.” 7th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Hawaii, USA, 2015 年 4 月 13 日 ~ 17 日
- (7) 竹花佑介, 成瀬清 「インドメダカ *Sox3*^Y はメダカでも XX 性転換を誘導する」日本動物学会第 85 回大会, 東北大学 (宮城県仙台市), 2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日
- (8) 竹花佑介, 成瀬清 「メダカ属における ZW 型性決定様式の単系統的起源」日本動物学会第 84 回大会, 岡山大学 (岡山県岡山市), 2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日
- (9) 竹花佑介, 濱口哲, 酒泉満, 成瀬清 「メダカ属における新奇性決定遺伝子の進化」日本進化学会大 15 回大会, 筑波大学 (茨城県つくば市), 2013 年 8 月 28 日 ~ 30 日
- (10) Takehana Y, Matsuda M, Masuyama H, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K “Evolution of the neo-Y chromosome through co-option of *Sox3* in a medaka-related fish.” 8th European Zebrafish Meeting, The Palau de Congressos de Catalunya, Barcelona, Spain, 2013 年 7 月 9 日 ~ 13 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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
プレスリリース「インドメダカの性決定
遺伝子を発見 ～性染色体の多様化機構
の一端を解明～」
[http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2014/
06/20.html](http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2014/06/20.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

竹花 佑介 (TAKEHANA Yusuke)
基礎生物学研究所・バイオリソース研
究室・助教
研究者番号：60432093

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()