

研究課題別評価

1. 研究課題名: メダカ未分化生殖腺の精巣への分化のしくみ

2. 研究者氏名: 松田 勝(自然科学研究機構・基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門)

3. 研究の狙い:

ほとんどの生物は有性生殖を行い、減数分裂を経た配偶子を混ぜることで、種の多様性を生み出している。その配偶子を形成する「場」である生殖腺は、未分化な時には精巣、卵巣の両方向へ分化可能である。遺伝的に性の決定されている動物では、遺伝的な性に従って未分化生殖腺は、雄では精巣へ雌では卵巣へと分化する。ほ乳類ではこの生殖腺性分化の引き金的遺伝子(性決定遺伝子, *SRY/Sry*)は 1990 年に発見されたが、現在でも生殖腺の性分化機構はよくわかっていない。一方、哺乳類以外の脊椎動物においては、*SRY/Sry* の相同遺伝子は見つかっていないが、生殖腺の性分化に性ホルモンが重要な役割を果たすことが知られている。特に硬骨魚類では、孵化直後の生殖腺がまだ性的に未分化な時期に性ホルモンを投与することで遺伝的な性に関係なく不可逆的な機能的性転換を引き起こすことができる。従って、これらの魚類で性決定遺伝子を同定し、その遺伝子と性ホルモンとの関連を解析できれば、精巣、卵巣の形成機構の研究に突破口を開くことができると考えられる。

最近我々は、哺乳類以外の脊椎動物で最初の性決定遺伝子となる *DMY* を発見した。*DMY* はメダカ Y 性染色体上の性決定領域に存在しており、*DMY* の突然変異体は雌へ分化することから、通常発生において雄への分化に必須の遺伝子であることがわかった。そこで、本研究では、*DMY* がメダカの性決定遺伝子であることを示し、この遺伝子の生殖腺の性(精巣)分化の引き金的役割としての機能、さらにはその下流に作動する遺伝子カスケードを解析することにより、メダカの精巣分化のしくみを分子レベルで明らかにすることを目的とした。*DMY* と *DMRT1* 遺伝子それぞれの機能解析を行うと共に、精巣分化に重要な時期に精巣特異的に発現する遺伝子探索することで、*DMY* に始まる精巣分化の遺伝子カスケードを明らかにしたいと考えた。また、ENU を用いた性分化関連遺伝子誘発突然変異体探索を加えることで、精巣分化関連遺伝子の解析に有効な突然変異体を単離する計画をたてた。

4. 研究結果:

DMY と *DMRT1* の機能解析

DMY のゲノム領域、および CMV プロモーターの制御下に *DMY* の cDNA をつないだコンストラクトをトランスジェニックしたメダカから XX ながら雄へ分化する個体を得ることができた。これによって、*DMY* がメダカの性決定遺伝子であることを示すことができた。

DMY の相同遺伝子でもある *DMRT1* は、多くの脊椎動物において精巣分化に重要な働きがあると考えられている遺伝子である。親の精巣では両方の遺伝子が発現していることがわかっていたので、両遺伝子がいつから発現するかを詳細に検討した。その結果、*DMY* は孵化 2 日前の st.36 から発現が始まり、その後、親でも発現が続くこと、*DMRT1* の発現は孵化後 20 日頃から顕著になることがわかった。

DMY の機能阻害の実験系として gripNA を用いたノックダウンを試みた。*DMY* と *DMRT1* に特異的な gripNA を設計し、一細胞期の XY 卵に注入した。*DMY* をノックダウンすることで、雌の様に生殖細胞は増殖し、減数分裂特異的なマーカーである Scp3 の発現が観察された。これらのことから、*DMY* は生殖細胞の増殖に関する働きのあることが推察できた。

DMY/DMRT1 の発現する細胞を可視化するために、これらのプロモーター領域に蛍光レポーター

一をつないだトランスジェニックメダカを作出した。現在ホモ系統ができてきており、免疫組織化学やISH法でレポーター遺伝子の発現部位と本来の遺伝子それとを比較したところ、DMY-EGFP系統では、EGFPの発現はDMYの発現部位と一致していた。残念ながらEGFPの蛍光は体の外から観察できるほど強くなく、取り出した精巣を押しつぶすかばらして正立蛍光顕微鏡で観察する必要がある。

DMRT1はDNA結合型の転写因子だと考えられているので、DMYとDMRT1の結合DNA配列を同定するためのBinding site selectionを行った。DMYについて3種の結合配列を得た。これらの配列は、DMY、DMRT1の両方に結合することがゲルシフトアッセイにより確認された。

精巣分化に重要な時期に精巣特異的に発現する遺伝子の探索と解析

精巣特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法とマイクロアレイ解析さらにISH法による探索を経て収集する計画を立てた。cDNAサブトラクションには、ふ化後5日、10日、20日のXX個体の生殖腺とXY個体の生殖腺より抽出したmRNAから合成したcDNAを用いた。作成したサブトラクションライブラリーから約1万クローンをシーケンス後、重複を減らして3,840のクローンに絞り込みそれらをスライドガラスにプリントした。一方、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、精巣の特定の発達段階の生殖細胞とその周辺の細胞よりRNAを抽出し、マイクロアレイで解析することに成功した。このことにより、精巣の特定の細胞特異的に発現する遺伝子を効率よく同定できるようになった。現在、親の精巣を用いたISH解析を進めており、この結果とマイクロアレイのデータを照らし合わせながら、遺伝子を絞り込んでいる。

ENUを用いた性分化関連遺伝子誘発突然変異体の探索

東京大学武田洋幸教授の突然変異体スクリーニングチームよりスクリーニングの終了したF₂を譲り受けF₃スクリーニングを行った。XXの雄を得たので、交配による確認作業を続けたが、戻し交配個体や次世代にXX雄は得られなかった。

5. 自己評価:

これまで、メダカの性分化関連遺伝子の機能解析の系は全くなかったが、本研究によりgripNAによるノックダウンやCMVプロモーターによる強制発現の系が有効であることがわかった。これらの系は、近い将来発見されると期待されるメダカ近縁種の性決定遺伝子やDMY発現以降に働く遺伝子の機能解析に有効であると考えられる。

マイクロアレイを用いた解析は、一度に多くの遺伝子の発現を解析できるが、胚全体や生殖腺全体からのRNAを材料とした解析でははっきりしたことがわかりにくかった。そこで、細胞の種類を絞り込むことで、解析が容易に成るのではないかと考え、LMD法により切り出した凍結切片由来のRNAを用いた解析を行った。この結果は予想通りであり、LMD法を組み合わせたマイクロアレイ解析は、特定の発達段階の生殖細胞もしくは体細胞に発現する遺伝子の同定に有効であることがわかった。これまで生殖腺を取り出すことの不可能だった孵化前後の稚魚においても凍結切片を作成することができたので、今後孵化前後の稚魚の生殖腺由来のRNAを用いて解析を進めることが可能だと思われる。

当初考えていたよりも、突然変異体のスクリーニングとトランスジェニック系統の飼育・選抜に多大な時間を割く必要があった。そのため、精巣特異的に発現する遺伝子の収集が思うように進まなかった。しかし、最近それらの実験系が整備でき、急速にデータを蓄積している。あと数ヶ月の間に精巣分化の指標となるような遺伝子の見つかることを期待している。また、精巣分化に関連する遺伝子の機能を解析するためには、孵化後の生殖腺を用いて遺伝子機能を解析できる系が必要であるが、このための系を構築するには至らなかった。器官培養系などの実験系の構築は今後の課題として残った。

6. 研究総括の見解:

ほ乳類以外の脊椎動物については、未だ、SRY/Sryに相当する遺伝子は見出されていない。本研究はメダカを用い、SRY/Sryに相当な性決定遺伝子を探索し、魚類における精巣及び卵巣の形成機構を解明しようとするものである。

トランスジェニックメダカによる解析や機能阻害実験などから、DMYの生殖細胞の分化における役割を解析し、その一端を明らかにした。研究着手の当初から課題の困難度は予想されたが、努力の結果、細胞を特異的に分離し得るLMD法とマイクロアレイ解析法を駆使し、候補分子の分離に成功した。近い将来、精巣特異的遺伝子の同定が十分期待でき、本研究は当初の目的をほぼ達成したと評価できる。

7. 主な論文等:

主な論文

- Nakamoto, M., Suzuki, A., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2005) Testicular type *Sox9* is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* **333**(3), 729–736.
- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N. and Nagahama, Y. (2004) Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* **231**(3), 518–526.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Matsuda, C., Kobayashi, T., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003) The sex determining gene of medaka: a Y-specific DM-domain gene (*DMY*) is required for male development. *Fish Phys. Biochem* **28**, 135–139
- Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T., Ikeuchi, T. and Nagahama, Y. (2003) Expression of *DMY* and *DMRT1* in various tissues of the medaka (*Oryzias latipes*). *Zoolog Sci* **20**(11), 1395–1398.

総説

- Matsuda, M. (2005) Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 293–307.
- 長濱嘉孝, 小林亨, 松田勝. (2004) 魚類の性決定と生殖腺の性分化/性転換. *蛋白質核酸酵素* **49**(2), 116–123
- Matsuda, M. (2003) Sex determination in fish: Lessons from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ* **45**(5–6), 397–403.

口頭発表

- 松田勝, Bindhu Paul-Prasanth, 劉恩良, 長濱嘉孝: メダカ性決定遺伝子 DMY の機能解析. 日本動物学会第 75 回大会、2005 年 10 月 6–8 日
- 松田勝: メダカ生殖腺の器官形成〜未分化生殖腺からの精巣・卵巣形成〜. 日本発生生物学会第 37 回大会、名古屋、2004 年 6 月 5 日
- Masaru Matsuda : The sex determining gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). 第 76 回日本生化学会、横浜、2003 年 10 月 18 日
- 松田勝, 四宮愛, 木下政人, 小林亨, 劉恩良, 濱口哲, 酒泉満, 長濱嘉孝: メダカ性決定遺伝子 DMY の同定とその機能解析. 日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 23–26 日
- Masaru Matsuda, Yoshitaka Nagahama, Tohru Kobayashi, Satoshi Hamaguchi & Mitsuru Sakaizumi: The sex determining gene of medaka fish: a Y-specific DM-domain gene (*DMY*) is required for male development. Third International Symposium On Vertebrate Sex Determination, ハワイ、2003 年 3 月 24 日

招待講演

The sex determining gene of medaka: a Y-specific DM-domain gene(*DMY*) is required for male development. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 18-23rd May 2003 in Mie, Japan.

取材

サイエンスチャンネル「メッセージフロームサイエンティスト」

受賞など

日本遺伝学会第75回大会 Best Papers 賞