

魚類の性分化制御に関する分子・細胞学的研究

Molecular Mechanisms of

Sex Determination and Differentiation in Fish

（研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96L00401）

プロジェクトリーダー

長濱 嘉孝 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所・教授

コアメンバー

嶋 昭紘 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

尾里建二郎 名古屋大学生物分子応答研究センター・教授



1. 研究目的

本研究プロジェクトでは、魚類を用いて性決定と生殖腺の性分化機構を明らかにすることを目的として以下の3つの研究を行ったが、あわせて今後の性分化研究のためのモデル生物の開発も行った。実験材料としては、遺伝的全雌、全雄を作出することができるメダカ (*Oryzias latipes*) とティラピア (*Oreochromis niloticus*) を用いた。

- (1) 魚類の生殖腺性分化の制御機構
(長濱嘉孝、嶋 昭紘)
- (2) メダカの性決定遺伝子のポジショナルクローニング (長濱嘉孝、酒泉 満、濱口 哲、嶋 昭紘)
- (3) メダカの核移植と透明メダカ
(尾里建二郎)

2. 研究成果概要

(1) 魚類の生殖腺性分化の制御機構

1) ティラピアの未分化生殖腺の卵巣への分化には内在性のエストロゲン/エストロゲン受容体系の関与が不可欠であることを示すとともに、エストロゲンの主要な作用が卵巣における卵原細胞の増殖を起こすことであることを明らかにした (図1)。また、この遺伝的雌の生殖腺におけるエストロゲン合成酵素、特に芳香化酵素遺伝子の発現を制御する転写因子として Ad4BP/SF-1 を同定した。2) 遺伝的雄では、精巣の分化に先だつてアンドロゲン/アンドロゲン受容体 (AR) の発現はみられないことを示すことにより、精巣の分化に果たすアンドロゲンの関与を否定した。また、2種類の AR 遺伝子を脊椎動物ではじめてクローニングした¹⁾。さらに、孵化直後の遺伝的雄のセルトリ細胞で特異的に発現する遺伝子 (*DMRT1*) を同定するとともに²⁾ (図1) この遺伝子が孵化直後の遺伝的雌 (XX) にアンドロゲン処理して得た性転換雄の精巣でも発現することにより、*DMRT1* 遺伝子が精巣分化に重要な役割を果たすことを示唆した。3) ハワイ産ベラにおける雌から雄への性転換は、卵巣の顆粒膜細胞における芳香化酵素遺伝子の発現の急激な抑制によるエストロゲンの合成阻害が引き金となり起こることを示した。



図1. 魚類の性決定と生殖腺の性分化機構

以上の研究成果の他に、生殖細胞に特異的に発現する遺伝子 *Vasa* を利用して、光る生殖細胞をもつトランスジェニックメダカ系統を作出することに世界に先駆け成功した³⁾ (図2)。このトランスジェニックメダカ系統は生殖細胞の分化機構や生殖細胞系列の制御に関わる遺伝子のスクリーニングなどの研究に大きく貢献することが期待される。また、初期胚 (受精後2日) で性の判別 (97%) が可能なメダカ系統 (Qurt: Q系統) を作出した⁴⁾ (図3)。

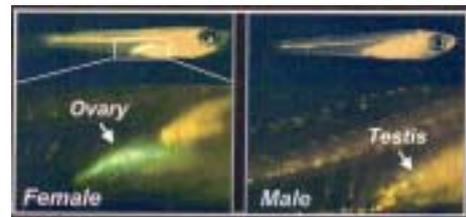


図2. 生殖細胞が光るトランスジェニックメダカ系統



図3. 初期胚で性別可能なメダカ系統 (矢印、leucophores)

(2) メダカの性決定遺伝子のポジショナルクローニング

メダカでは、XとYの性染色体は互いにほぼ相同であり、形態的にも区別がつかない。雄では、セントロメアの近くにある性決定遺伝子の近傍の領域は雄で組換えが起こりにくく、逆に雌では両端のテロメア側で起こりにくいことを明らかにした。

メダカの性決定遺伝子をポジショナルクローニングにより同定した。Y染色体上の性決定領域に存在する52個の遺伝子のうち、DMドメインを有するPGI7 (predicted gene 17) 遺伝子が唯一、Y染色体特異的であることから、DMYと命名した(図1)。DMYに変異がある2つの野生突然変異体を発見し、これらの解析からDMYが精巢形成に必要であることがわかった。また、DMYは性分化期のメダカ精巢の体細胞(セルトリ細胞)に強く発現していた。これらの結果から、DMYがメダカの性決定遺伝子であると結論された⁵⁾(図4)。

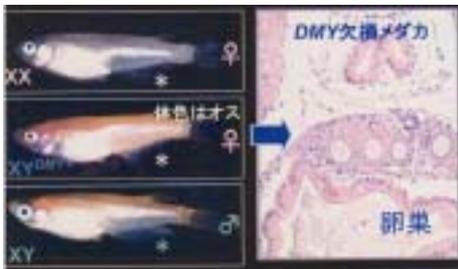


図4 . DMY 遺伝子を欠損するメダカ(中図)
体色は雄型、尻鰭は雌型、生殖腺は雌型(卵巣)。

(3) メダカの核移植

メダカを用いた新しい遺伝子ノックアウト法を開発するための第一段階として、生殖能力を持つ2倍体の核移植個体を作製することに成功した。この個体はEF-1 α -A/GFPトランスジェニック系統の胞胚期胚細胞の核をヒメダカの除核した未受精卵に移植して作製された⁶⁾(図5)。また、多くの臓器が成体においても外部から透視できる「透明メダカ」の系統を確立した⁷⁾。名古屋大学に維持されている約50種類の体色に関する自然突然変異の中にはどれか一種類の色素のみを欠く系統がある。透明メダカは、このような突然変異から4系統を選び、交配して作出された。



図5 . メダカの核移植個体(2倍体で生殖能力を持つ)
鱗はアーティファクト。

3. 結論

本研究プロジェクトで、魚類の性決定と生殖腺の性分化の分子機構について明らかにされた主なことは以下のとおりである。1) ティラピアの卵巣分化には、内因性のエストロゲン/

エストロゲン受容体系が重要な役割を果たす、2) ティラピアの精巢分化には、内因性のアンドロゲン/アンドロゲン受容体系ではなく、セルトリ細胞におけるDMRT1 遺伝子の発現が重要である、3) ハワイ産ベラのメスからオスへの性転換は、芳香化酵素遺伝子の発現低下/エストロゲンの産生低下が引き金となって起こる、4) ポジショナルクローニングにより、メダカの性決定遺伝子を同定することに成功し、この遺伝子がY染色体に局在しDM-domainを持つことからDMYと命名した、5) メダカの胞胚期胚細胞の核を除核した未受精卵に移植することにより核移植個体を作製することに成功した。

主な発表論文

- (1) T. Ikeuchi, T. Todo, T. Kobayashi and Y. Nagahama: "cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype," J. Biol. Chem. **274** (1999) 25205-25209.
- (2) G. Guan, T. Kobayashi and Y. Nagahama: "Sexually dimorphic expression of DM (*Doublesex/Mab-3*)-domain genes during gonadal differentiation in tilapia," Biochem. Biophys. Res. Comm. **272** (2000) 662-666.
- (3) M. Tanaka, M. Kinoshita and Y. Nagahama: "Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of GFP fluorescence exclusively in germline cells: a useful model to monitor germline cells in a live vertebrate," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001) 2544-2549.
- (4) H. Wada, A. Shimada, S. Fukamachi, K. Naruse, and A. Shima: "Sex-linked inheritance of the *lf* locus in the medaka fish (*Oryzias latipes*)," Zool. Sci. **15** (1998) 123-126.
- (5) M. Matsuda, Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, C. Matsuda, T. Kobayashi, C.E. Morrey, N. Shibata, S. Asakawa, N. Shimizu, H. Hori, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi: "DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish," Nature (2002)(in press).
- (6) Y. Wakamatsu, B. Ju, L. Pristyaznhyuk, K. Niwa, T. Ladygina, M. Kinoshita, K. Araki and K. Ozato: "Fertile and diploid nuclear transplantation derived from embryonic cells of medaka, *Oryzias latipes*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001) 1071-1076.
- (7) Y. Wakamatsu, L. Pristyaznhyuk, M. Kinoshita, M. Tanaka and K. Ozato: "The see-through medaka: A fish model that is transparent throughout life," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001) 10040-10050.