

魚類における性決定と生殖腺の性分化

長濱 嘉孝

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所

この最初のスライドは、魚類における生殖腺の性分化と配偶子形成の過程を示しますが、このうち配偶子形成の制御についてはホルモンが重要な役割を果たすことが知られております。我々もこれまで、精子形成、卵形成、および最終的な卵成熟と精子成熟に関わっている3種類のステロイド性のメディエーターを同定しました。これらの配偶子形成過程は内分泌攪乱化学物質の重要なターゲットである可能性があります。内分泌攪乱化学物質のもう一つのターゲットとして考えられるのは、性決定と生殖腺の性分化の過程です。しかし、他の脊椎動物と同様に、魚類における性決定と生殖腺の性分化のメカニズムについてはあまりよく分かっていません。したがって、本日は、まず性決定、続いて生殖腺の性分化について我々の最近の研究を中心としてお話ししたいと思います。また最後に、魚類でみつけた知見をヒトまたは哺乳動物の研究に関連付けてみたいと思っております。

このスライドは、脊椎動物における性決定と生殖腺の性分化を示しています。前の講演でも触れられておりましたように、哺乳動物の性決定遺伝子である **SRY** は 1990 年に発見されました。それ以来、**SRY** を含む多くの遺伝子が生殖腺の性分化に関わっていると報告されています。しかし、**SRY** による生殖腺の性分化カスケードについてはまだよく分かっていません。

鳥類や魚類を含む哺乳類以外の脊椎動物では、**SRY** または同等の遺伝子はこれまで同定されていません。その代わりに、温度または水温などの環境因子や性ステロイドホルモンが、これらの脊椎動物における生殖腺の性分化に関わっていると報告されています。我々は、数種の魚類を用いて性決定および性分化を研究しています。例えば、生殖腺の性分化についてはティラピア、性決定性遺伝子についてはメダカなどを用いていますが、本日はこれらについてお話しします。また、性転換する魚類も対象にしていますが、それについては本日は触れません。

ティラピアでは、アンドロゲン処理による **XX** 雄、エストロゲン処理による **XY** 雌、さらに、**YY** であるスーパー雄などを作出することが可能で、それらの魚を交配することで遺伝的な全雄、全雌を作り出すことができます。このようなことができるのは、多くの魚類でエストロゲンやアンドロゲンなどの性ステロイドホルモン処理により、比較的容易に不可逆的、機能的性転換を起こすことができるからなのです。しかし、性ステロイドホルモンにより性転換を効率良く誘導することができる時期は限られており、一般的には孵化後直後から生殖腺の形態的性分化が起こるまでの時期と考えられております。ティラピアでは孵化後 20 日までの期間です。この時期は臨界期と呼ばれ (**narrow window**)、内分泌攪乱化学物質のもっとも可能性の高いターゲットとして考えられます。

ここでいう生殖腺の性分化というのは、形態的に精巣と卵巣が区別できるようになることであり、ティラピアの場合には孵化後 20~25 日に起こる輸精管 (精巣) 卵巣腔 (卵巣) の出現により判別できるようになります。この図は魚類の生殖腺のステロイド合成経路を示しています。魚類と他の脊椎動物や哺乳動物との違いは、テストステロンが強力なアンドロゲンである 11-ケトテストステロンと強力なエストロゲンであるエストラジオール-17 β の両方の基質であるということです。我々は魚類のステロイド合成に関わる遺伝子の大部分をクローニングし、これらのタンパク質の一部に対する抗体も作製しました。

まず、芳香化酵素遺伝子に関する **RT-PCR** 解析をご覧ください。これらが遺伝的雌 (**XX**) と遺伝的雄 (**XY**) です。ご覧の通り、**XX** 個体の生殖腺では卵巣分化が起こる 10 日~2 週間前でも芳香化酵素遺伝子が発現しています。この写真は孵化後 7 日のものであり、この細胞が芳香化酵素遺伝子の発現が見られるステロイド産生細胞です。*in situ* ハイブリダイゼーションや **RT-PCR** などの解析から、**XX** 雌では、ご覧の通り孵化後 5~10 日の間に、エストロゲンの生成に必要なこれらすべてのステロイド合成酵素が合成されているか、或いは少なくとも遺伝子、タンパク質レベルでは発現しております。しかし、アンドロゲン合成のための酵素は発現しておりません。

また、**XX** 雌では卵巣分化以前にもエストロゲン受容体 α と β もすでに発現しています。これは免疫細

胞化学の写真ですが、P450_{scc}、3 β -HSD、P450_{arom}などのステロイド代謝酵素がタンパク質レベルで性分化が起こる前のXX生殖腺で発現していることが明確に示されております。XX生殖腺では、先ずエストロゲンが合成、分泌される、それによって卵巣分化が起こる可能性があります。したがって、エストロゲンが卵巣の分化で重要な役割を果たしていると考えられるわけです。

内因性のエストロゲンまたはエストロゲン受容体が卵巣分化に関わっていることを証明するためには、XX雌に芳香化酵素阻害剤やエストロゲン受容体アンタゴニストを処理し、その後の生殖腺の性転換を調べる方法があります。我々もティラピアの全雌群を芳香化酵素阻害剤であるファドロゾールやタモキシフェンで処理してみましたが、これらの処理で雌から雄への性転換を誘発させることができました。タモキシフェン処理では、卵巣と精巣が混在している雌雄同体個体も観察されました。

したがって、エストロゲンやエストロゲン受容体が卵巣の分化に深く関わっていることが考えられます。このステロイド合成酵素遺伝子発現パターンは、XX雌に特異的であり、また発生時期（孵化後5~7日）と細胞（ステロイド合成酵素生産細胞）に特異的な現象です。こちらはエストロゲン作用を示していますが、現在我々はこのエストロゲンのターゲット遺伝子を探しています。

ここで芳香化酵素遺伝子の発現制御について簡単に触れておきます。哺乳類などとは異なり、魚類には2種類の芳香化酵素（卵巣型と脳型）がありますが、ここでは卵巣に強く発現する卵巣型芳香化酵素についてのみ触れます。我々は先ず、ティラピアの芳香化酵素遺伝子5'上流域に哺乳類の芳香化酵素遺伝子の5'上流域にある同じAd4配列が存在することを示すとともに、この配列が卵巣型芳香化酵素遺伝子の発現に必要であることを示しました。次いで、ティラピアのAd4BP/SF-1遺伝子をクローニングするとともに、ゲルシフト解析によりティラピアAd4BP/SF-1がAd4配列に実際に結合することを示しました。また、卵黄形成中の卵胞の濾胞細胞から得られた核抽出もAd4配列に結合することを確認しました。

次に、生殖腺の性分化過程におけるAd4BP/SF-1と芳香化酵素のmRNAレベルでの変化を観察しました。ここでも、芳香化酵素遺伝子の発現が卵巣分化の前に見られますが、雄では見られません。また、ご覧の通り、Ad4BP/SF-1の発現も芳香化酵素の場合と同様にXX雌の卵巣分化前の生殖腺に観察されますが、XY雄では見られません。これらの結果から、Ad4BP/SF-1はティラピアの芳香化酵素遺伝子の発現に重要な役割を果たしていると考えられます。

このスライドは、*vasa*、Ad4BP/SF-1及び芳香化酵素の遺伝子発現を示しています。孵化後1日で、始原生殖細胞が体腔上皮に現れます。3日までに、その細胞（ステロイド産生細胞と考えられる）は血管の近くに移り、Ad4BP/SF-1と芳香化酵素に陽性です。10日までにこの細胞は増殖します。これが卵巣の分化過程です。次に精巣の分化に進みます。

精巣の形態的分化はやはり20~25日に起こります。しかし、卵巣の分化と異なり、精巣の分化の前にステロイド合成酵素の発現やアンドロゲン受容体 α と β の発現はありません。したがって、雄と雌では著しく異なります。

我々は、*Sox9*や*DAX1*、またその他の遺伝子の発現を詳しく調べましたが、これらの遺伝子では性分化の前や途中や後で性差は見られませんでした。

私はここまで、XXの遺伝的雌ではエストロゲンとエストロゲン受容体が卵巣の分化に重要な役割を果たしていることをお話しました。しかし、遺伝的XY雄ではアンドロゲン合成酵素またはアンドロゲン受容体が精巣の分化の前に発現することはありません。それでは、精巣の分化には何が重要なのでしょうか。

そこで我々はDMドメイン遺伝子と呼ばれる遺伝子に注目しました。皆さんも恐らくこのDMドメイン遺伝子が、ショウジョウバエ*Doublesex*と*C. elegans nematode Mab-3*に共通して見られるDNA結合モチーフを持つことはよくご存知であると思います。*Doublesex*と*Mab-3*は、ショウジョウバエと線虫の性決定の過程で重要な役割を果たしていると考えられている遺伝子です。

このDMドメイン遺伝子はヒトを含むいろいろな脊椎動物に存在することが分かっています。我々は、DMドメイン遺伝子の1つであるDMRT1遺伝子に注目し、その発現を詳しく解析しました。この遺伝子は、成魚では精巣に特異的な遺伝子で、*in situ*ハイブリダイゼーションにより成熟精巣のセルトリ細胞でDMRT1が発現していることが示されました。次に、孵化後15日にDMRT1の*in situ*ハイブリダイゼーシ

オンを観察しました。これらは孵化後 15 日の遺伝的な雄と雌の生殖腺ですが、ご覧のとおり、DMRT1 遺伝子の発現は、XY 生殖腺の体細胞のセルトリ細胞でのみ認められ、雌の生殖腺には決して発現していません。したがって、DMRT1 の発現は、性（雄）、ステージ（精巣分化の前）、細胞（セルトリ細胞）に特異的です。現在我々は、DMRT1 遺伝子の発現制御や作用（標的遺伝子の探索）の機構を解析しております。

これまでの話を要約しますと、遺伝的雄（XY）における精巣形成には、セルトリ細胞での DMRT1 の特異的発現、また遺伝的雌（XX）における卵巣形成には、ステロイド産生細胞でのエストロゲンが重要であるということがいえます。また前述しましたように、性分化が起こる前のこの時期（臨界期）は、環境中にある攪乱物質を含めたいろいろなものに対して非常に感受性が高いということが知られております。しかし、内分泌攪乱化学物質の影響を調べるためには、先ず我々は、対象とする個体の遺伝的性を知る必要があります。このことによって、内分泌攪乱化学物質の影響が遺伝的なものか、或いは後成的なものであるかを判断することができるのです。

そのためには、それぞれの種の性決定遺伝子について知る必要があります。既にお話しした通り、性決定遺伝子はヒトを含む哺乳動物において 1990 年に発見されたのが唯一です。SRY 遺伝子は、Y 染色体の短腕にあり、マウスでは SRY の発現は一過性で 10.5~11.5 dpc です。しかし、既にお話しした通り、哺乳類以外の脊椎動物では SRY または同等の遺伝子はまだ同定されていません。

最近我々はメダカの性決定遺伝子の最有力候補遺伝子を同定しました。メダカでは、Y 染色体を細胞学的に区別することは難しいのですが、哺乳類と同様に雄ヘテロで性が決定されると考えられております。メダカの性決定遺伝子をポジショナルクローニング法で同定するために、我々は 2 種のメダカ近交系を利用して X と Y 染色体の遺伝的な違いが明確な Y コンジェニック系統を作成しました。この Y コンジェニック系統は、Hd-rR 系統の背景にある HNI 系統に由来する 1 つの性決定領域を持っているため、位置の確認が非常に容易です。この系統を用いてメダカ性染色体の遺伝地図を作成するとともに BAC ライブラリーを作成しました。この BAC クローンの一つを用いた FISH 法により、Y 染色体上の性決定領域を決定することができました。

さらにこれらのコンジェニックメダカを用いて見つけた二つの DNA マーカーで性決定領域中に性決定遺伝子を挟むことができました。

我々は、この性決定領域についてショットガン塩基配列決定を行いました。全部で、422,202 のヌクレオチドの配列を決定するとともに、この領域が 4 つの BAC クローンでカバーされ、530 kb であることが分かりました。次に、コンピュータ分析を行い、52 個の予測していた遺伝子、PG 遺伝子がこれらの 4 つの BAC クローンに存在していたことを確認しました。遺伝子を同定するために、さらに絞込みを行う必要がありました。それから我々は実験室で飼育されているメダカのなかで突然変異種の XY 雌を発見しました。この領域を観察したところ、この特定の突然変異にはこの領域が欠損していることを発見しました。それで、530 から 250 kb に絞り込むことが可能になり、27 の遺伝子が発見しました。次に、これら 27 の遺伝子のうち 3 つの遺伝子のみが性分化期に発現していることを確認しました。これら 3 つのうち 1 つ (PG17、予測遺伝子 17) のみが Y 特異的でした。残りの 2 つの遺伝子は Y 特異的ではなく、XX と XY の両方にありました。

この PG17 は 6 つのエクソンを持っており、267 のアミノ酸をコードしており、よく保存された DM ドメインを持っていました。前述しましたように、DM ドメインは Doublesex と Mab3 に共通な配列です。そこで我々は、Y 染色体上に DM ドメインを持つ遺伝子という意味で、メダカの性決定遺伝子を DMY と命名しました。次に、DMY とそれに非常に似た遺伝子である DMRT1 について、性分化期における発現を詳しく観察しました。RT-PCR の解析から、DMY は精巣分化の期間中に発現し、DMRT1 は精巣分化の後に発現することが分かりました。また、*in situ* ハイブリダイゼーションでは性分化期の雄生殖腺の体細胞（セルトリ細胞）に DMY が特異的に強く発現していました。勿論、DMY が雌の生殖腺では決して発現しません。

ここで重要なことは、メダカの性決定遺伝子である DMY は、SRY とは構造上全く類似性がないということです。その一方で DMY は、SRY と同様に、Y 染色体特異的であり、性分化期の精巣の体細胞（セル

トリ細胞)に特異的に発現します。また、SRYもDMYもそれぞれ転写因子(HMGボックスとDMドメイン)を含みます。

このように、DMYはY染色体の性決定領域に存在し、Y特異的であり、性分化期及びそれ以前のXY生殖腺の体細胞性セルトリ細胞に発現し、さらにDMドメインを有する転写因子です。それ故、DMYはメダカの性決定遺伝子として非常に有力な候補であると考えられます。しかし、DMYがメダカの性決定遺伝子であると結論するためには、gain-of-functionとloss-of-functionの証明が必要です。前者の実験について我々は、DMYでXXメダカに精巣を発達させることを試みております。

一方で我々は、2つの異なる野生集団(アワラ、シロネ)で見つかった二尾の野生突然変異体(XY雌)を解析することからDMYが精巣分化に重要であることを決定的に示しました。次に、これら2つの野生突然変異体のDMY遺伝子を詳しく調べてみたところ、アワラ突然変異体ではエクソン3に単一ヌクレオチド(C)が挿入されていることを見出し、このために不完全なDMYタンパク質がつけられていることが分かりました。これはアワラ突然変異体のXYで、突然変異体Yを持つすべてのXY出生子は雌でした。また、白根の突然変異体の場合には、突然変異体Yを持つ子孫の60%が雌として成長します。したがって、これは決定的な証拠といえます。

これらは正常な雌と雄の表現型です。雌は白、雄は黄色です。アワラ突然変異体を見てください。体色は雄ですが、尻鰭は雌の形をしています。それでは、生殖腺はどうでしょうか。もちろん、正常のXXは卵巣、XYは精巣を持っています。では、XYのDMY突然変異体はどうでしょうか。生殖腺は卵巣です。したがって、それは完全な性転換です。

では、他のメダカにもDMYが存在するのでしょうか。少なくとも、ハイナンメダカにはDMYが存在することが分かりました。次に、日本メダカとハイナンメダカのDMYとDMRT1について進化系統樹を作成し比較してみたところ、2つのDMYは日本メダカとハイナンメダカが種分化する直前にDMRT1から生じたものであることが判明しました。

最後に、ヒトの性染色体とメダカの性染色体を比較しています。哺乳類のXとYの染色体は大きさもまた遺伝子量も異なります。ヒトのX染色体は165-Mbで約1500の遺伝子が含まれています。Y染色体は小さく、遺伝子もほとんどありません。ヒトのY染色体は60-Mbで約50の遺伝子のみを含んでいます。これらY染色体の少なくとも半分は性と精子形成に関連して特殊化しております。これとは異なり、メダカのXとY染色体はほとんど同一なのです。

SRYとDMYはいずれもY染色体にあります。重要なことはそれらの間で配列の相同性がまったく無いことです。しかし、SRYとDMYはどちらも転写因子であり、SRYにはHMGボックスがあり、DMYにはDMドメインがあります。そしてどちらも遺伝的雄の生殖腺の性分化の時期にセルトリ細胞において発現します。

まだまだ多くの興味ある疑問が残されており、今後解決されなければなりません。脊椎動物間でのDMYの共通性? DMYはメダカに限られた性決定遺伝子なのか? もしそうなら、他の脊椎動物ではどうなのか? DMYはどのようなメカニズムで性分化を起こすのか? 脊椎動物におけるY染色体の進化は? これらはすべてとても興味ある問題で、今後の脊椎動物一般における性決定と分化の分子メカニズムの研究に有益な基礎的知見を与えるのみならず、エストロゲンに感受性が高いと考えられている生殖腺の性分化過程に及ぶ内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムを明らかにするためにも重要です。

ここで、性決定の研究に関する共同研究者らに感謝の意を表します。私の研究室のポスドクである松田博士、新潟大学の酒泉教授および濱口教授等です。また、生殖腺の性分化に関しては、小林助手、及び琉球大学の中村教授に感謝します。

最後に、メダカの性決定遺伝子に関してはJSPSおよび環境省、ティラピアの生殖腺性分化の研究に関してはCRESTの支援に感謝の意を表します。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

佐久間：長濱教授、どうもありがとうございます。長濱教授の講演についての質問とコメントをどうぞ。少しの時間ですが質問を受けたいと思います。どうぞ前へお進みください。

質問：メダカでは X 染色体と Y 染色体にあまり差がないとお話でした。実際に、研究を始めるときには、どのようにしてそれらを区別することができるのですか。2 つは形態学的に非常に類似しているということですね。では、メダカをどうさされているのでしょうか。

長濱：現在我々は、X と Y 染色体の構造を解析しております。メダカの性決定遺伝子の同定には、近交系のメダカを用いて X と Y との間の遺伝的差異をはっきりさせるためにコンジェニック系統を作出しました。この系統では、性にリンクした色素遺伝子が Y 染色体にのみにあります。

質問：分かりました。ありがとうございます。もう 1 つ質問があります。哺乳動物では、一般的に言って、エストロゲン受容体 α が基本的に雌の一般的な性ホルモン作用の受容体です。しかし、魚に関する文献によりますと、エストロゲン受容体 α と β の発現が異なるケースが多々あるようです。例

えば、ある場合にはエストロゲン受容体 β はほぼすべての組織で非常に高いといったようなことです。魚類におけるエストロゲン α と β の生理学的な違いをご存知でしたら、お教え下さい。

長濱：我々は生殖腺に集中して研究を行っておりますので、他の組織や細胞での発現や機能を詳しく調べておりませんので、ご質問の点につきましてはよく分かりません。性分化期の卵巣を *In situ* ハイブリダイゼーションで観察しますと、ER α と β の位置に若干の差があり、それらの間で機能的な差があることを示唆しているようにも思えます。今後、卵胞における 2 つの受容体の発現が、卵の成長や成熟に伴ってどのように変動するのかを詳しく解析する必要があります。

佐久間：お話を中断して申し訳ありませんが、もう時間がなくなってしまいました。係の方々からこのセッションを時間どおりに終了するようにと言われております。長濱教授をはじめ講師の先生方々の素晴らしい講演に感謝致します。特に夜遅くまでこの貴重なミーティングにお時間を割いてくださった聴衆の方々に感謝いたします。ご清聴ありがとうございました。