



# 野生メダカの性分化異常に関わる 基礎的情報の収集と解析

濱口 哲  
(新潟大学・自然科学系)



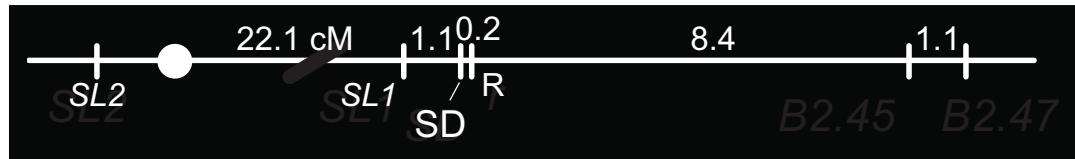
# 研究目的とこれまでの経緯

## メダカと内分泌かく乱現象

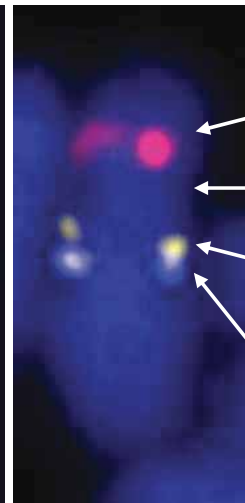
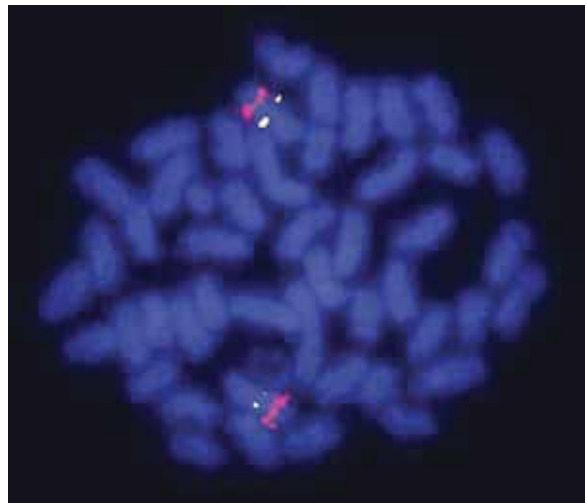
1. 野生生物への影響モニタリングのための指標生物
2. 内分泌かく乱物質の生物検定のためのモデル生物

- ・野生モニタリング:”何が異常で、何が正常か“を判断するために必要な基礎情報
- ・生物検定のモデル生物:データ評価のための基礎情報  
→→ (野生)メダカにおける性関連遺伝子の多型性

# メダカ性決定遺伝子 *DMY* の同定 (2002)



メダカ性染色体の遺伝子地図

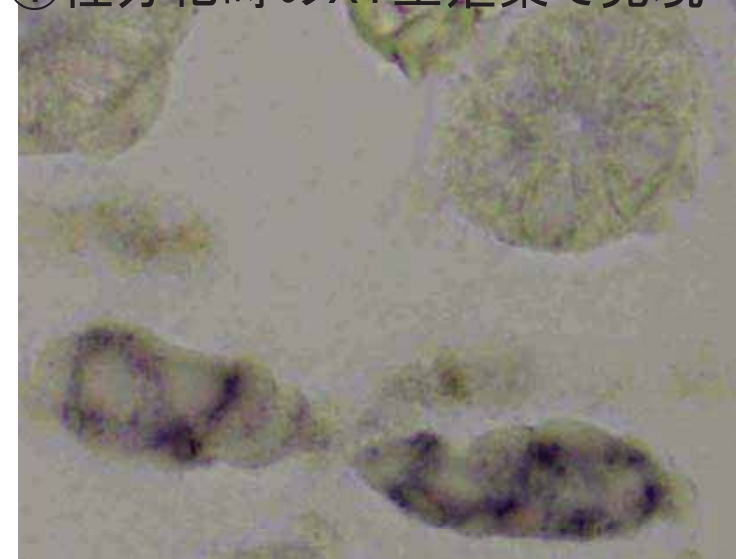


SL2  
動原体  
SL1  
SD



候補遺伝子の絞込

① 性分化時のXY生殖巣で発現



- ② XY雌でフレームシフト変異
- ③ 遺伝子導入によるXX個体の性転換

メダカ性決定遺伝子として *Dmy* を同定



cDNA全長1,320塩基  
6つのエクソン  
ゲノム55,913塩基  
267アミノ酸

*Dmy* の存否を指標として個体の遺伝的性を正確に決定できる。

# 具体的研究内容

## 1. 野生集団メダカ中の性転換個体の探索

1-1 野生集団の探索結果

1-2 XY雌の原因因子の検討

1-3 XX雄の原因因子の検討

## 2. 性転換に関わる遺伝的多型性

2-1 エストラジオール(E2)感受性

2-2 テストステロン感受性

2-3 高水温による性転換

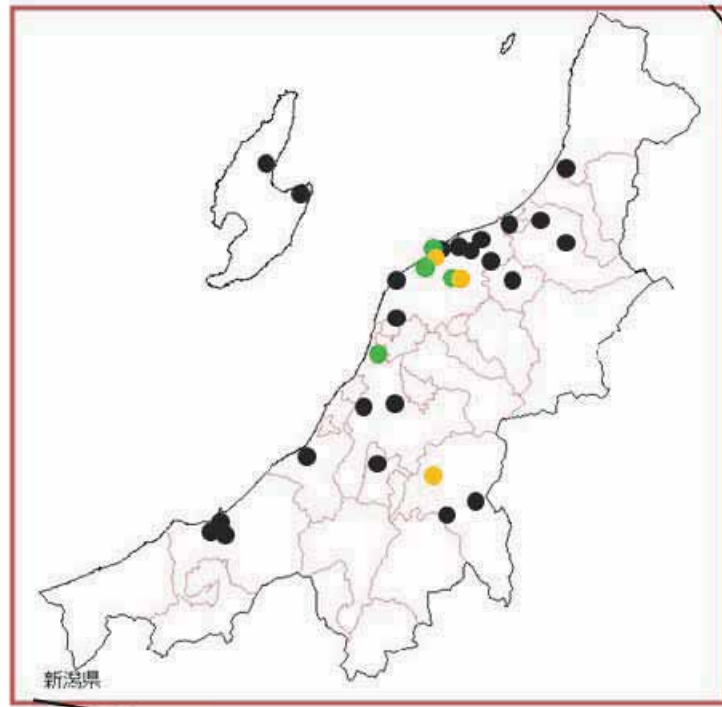
## 3. まとめ

# 野生メダカの都道府県別採集地点数

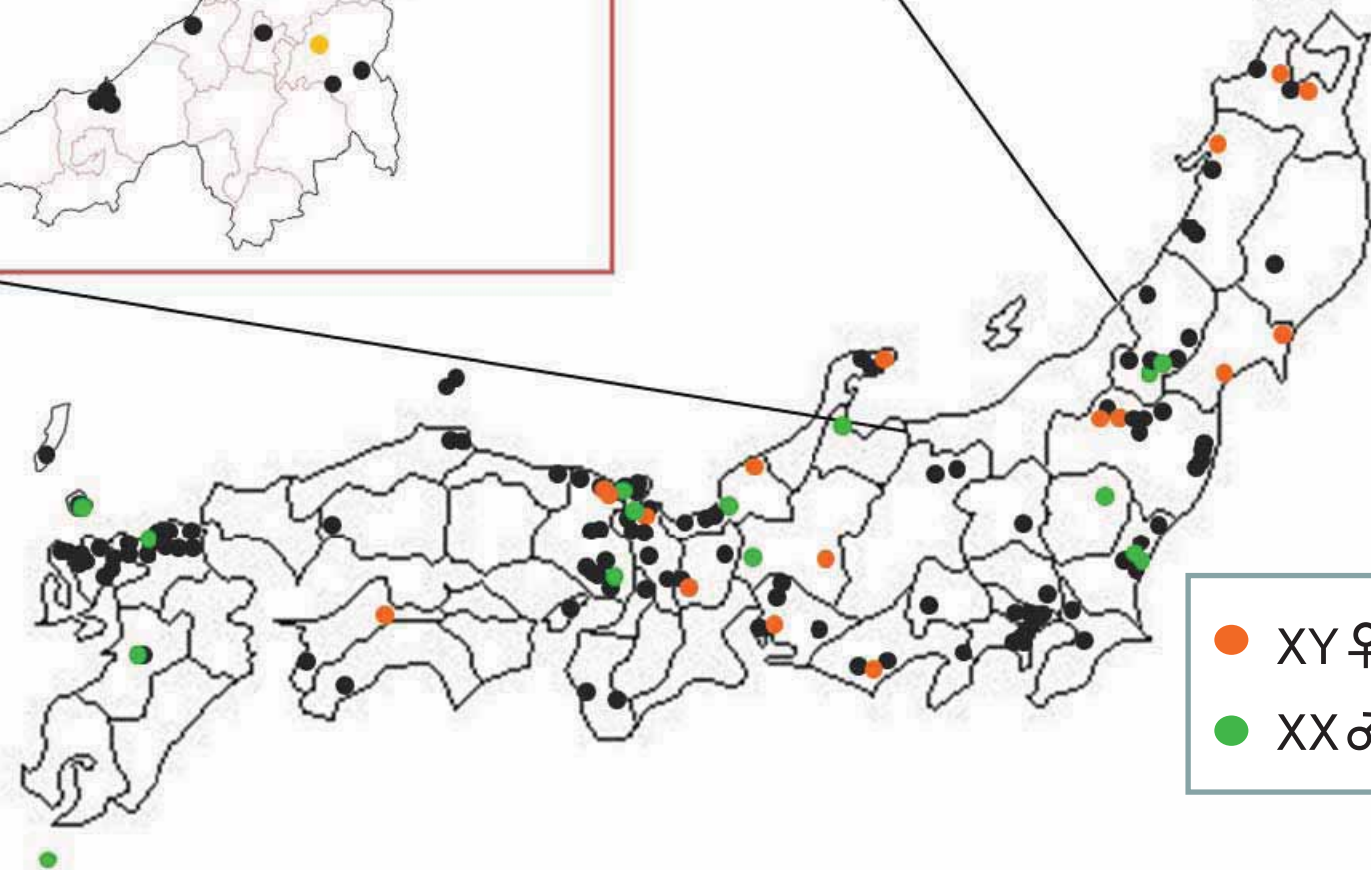
都道府県	野生集団	野生系統	都道府県	野生集団	野生系統	都道府県	野生集団	野生系統
北海道		1	山梨	1	1	広島	1	1
青森	4	2	富山	1	2	島根	4	2
秋田	4	3	石川	3	1	山口		2
岩手	1	1	福井	6		香川		
山形	7	1	岐阜	5		徳島		
宮城	1	2	静岡	5	1	愛媛	2	1
福島	16	1	愛知	5	1	高知	1	1
茨城	11		滋賀	3	1	福岡	37	
千葉	1		三重		2	大分		1
群馬	1		京都	25	6	佐賀	10	1
栃木	2	2	大阪	2		長崎	8	1
埼玉	2	2	奈良			熊本	3	
東京	4	1	和歌山	2		宮崎		2
神奈川	9	9	兵庫	18	6	鹿児島	1	3
新潟	41	5	岡山			沖縄		3
長野	2		鳥取	1		外国		14



# 野生メダカ採集地点



野生個体：  
218地点  
野生系統：  
84地点



● XY ♀ 出現地点  
● XX ♂ 出現地点

# 通算

2009年度までの解析結果			
	XX	XY	total:11,042
Female	5443	85	
Male	42	5472	

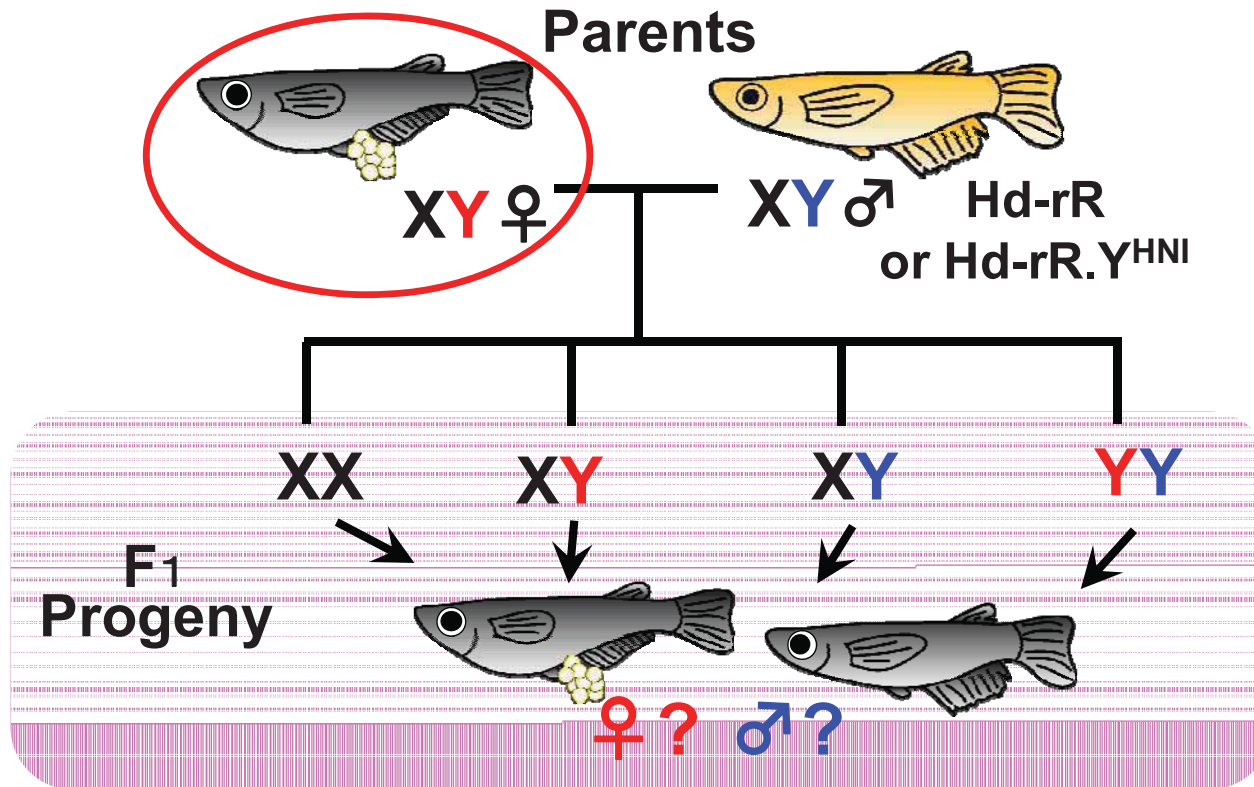
- メダカの性は、地域に関わらず、*DMY*の存否で決まる。  
(*DMY*はメダカに普遍的な性決定遺伝子である。)
- 野生集団中には、約1%程度のXX雄、XY雌個体が存在し、  
その殆どは遺伝的要因による。  
(現時点で、後天的性転換を指標とした場合に、大きな内分泌かく乱を疑うべき  
状況は認められなかった。)

# 1. 野生集団メダカ中の性転換個体の探索

1-1 野生集団の探索結果

1-2 XY雌の原因因子の検討

1-3 XX雄の原因因子の検討



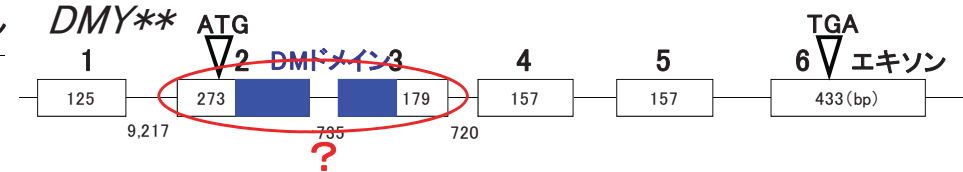
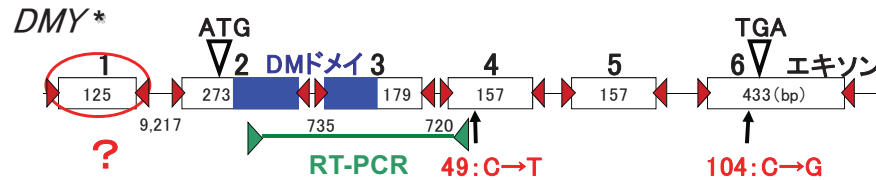
遺伝解析 →→ 原因因子の同定



Parent-XY ♀	XX		XY		XY		YY	
Collection site (N)	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Aomori (2)	33	0	63	0	0	57	0	45
Aizu-bange (1)	14	0	18	0	0	20	0	11
Awara (1)	26	0	23	0	0	16	0	21
Suzu (1)	32	0	31	0	0	37	0	27
Kurobe (2)	13	0	8	0	0	28	0	9
Aki (1)	21	0	19	0	0	13	0	25
Saigo (3)	33	0	46	0	0	44	0	36
Oura (2)	26	0	19	0	0	43	0	0
Kesen-numa (2)	20	0	4	14	0	12	0	23
Shirone (1)	26	0	18	10	0	27	0	11
Aizu-wakamatsu (2)	67	0	38	9	0	47	0	54

- すべてのFYXY ♀ は *Dmy* と連鎖 → → *Dmy* に原因
- 2種類の形質
  - ① F1XY のすべてが雌になる。 → → *Dmy* の機能欠損 (フレームシフト/indel)
  - ② F1XY で雌雄両者が出現する。 → → *Dmy* の機能低下 (cDNA の配列は正常)

# 機能欠損型 *Dmy* の挙動(大府の Y\* と Y\*\*)



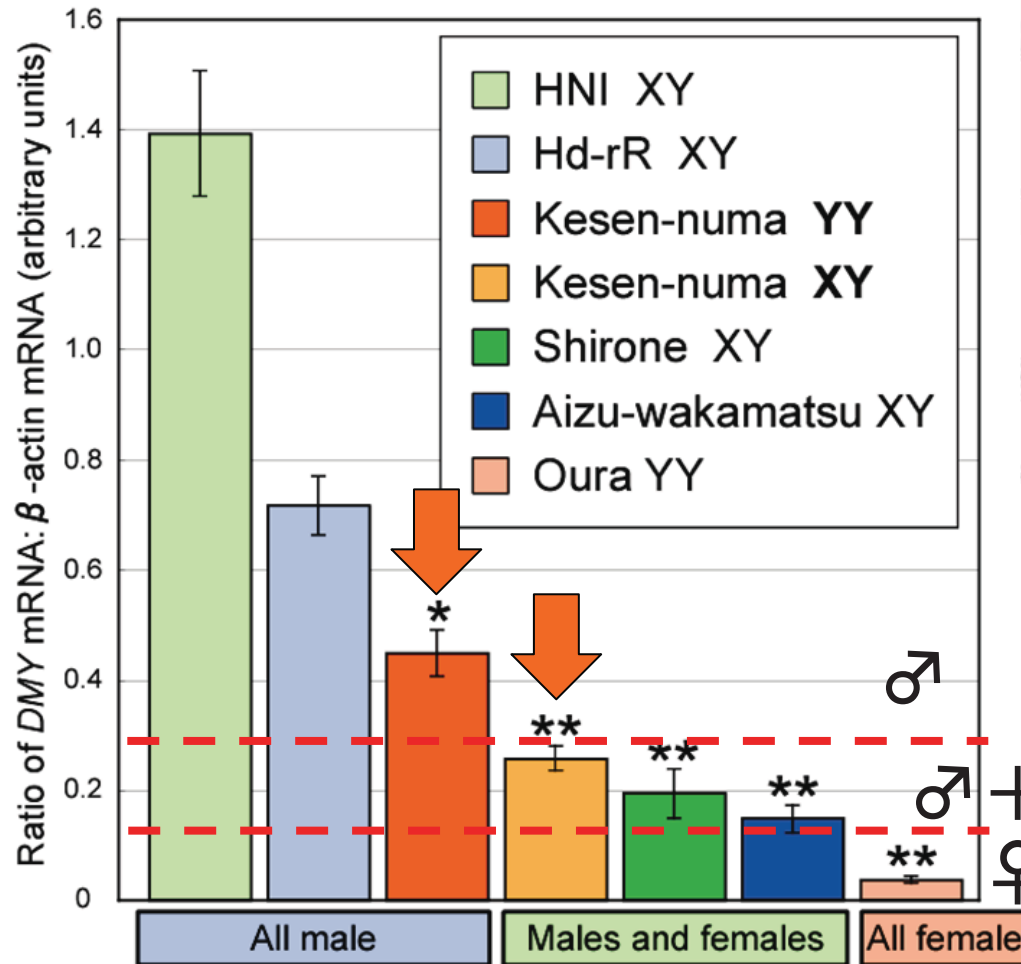
第1エクソンが増幅できない→欠失?  
 第4、6エクソンで1塩基置換 (synonymous)  
 → 翻訳領域内のアミノ酸配列は正常  
 著しい発現低下(消失?)

第2、3エクソンの存在が確認できない  
 (1、4、5、6は正常)  
 機能欠損

世代	合計	♀					♂		
		XX	XY*	Y*Y*	XY**	Y*Y**	XY	Y*Y	Y**Y
2001	16	5	2	0	0	0	7	1	1
2003	113	34	14	2	1	1	58	3	0
2004	131	46	12	0	0	0	59	14	0
2005	55	10	14	1	0	0	27	3	0
2006	113	52	9	0	0	0	36	13	3
合計	428	147	51	3	1	1	187	34	4
		203					225		

機能欠損型の *Dmy* を含む Y 染色体は、正常な X 染色体として集団中に保持される。

機能低下型 *Dmy* は発現の低下による。  
 発現低下の程度はそれぞれ異なる。



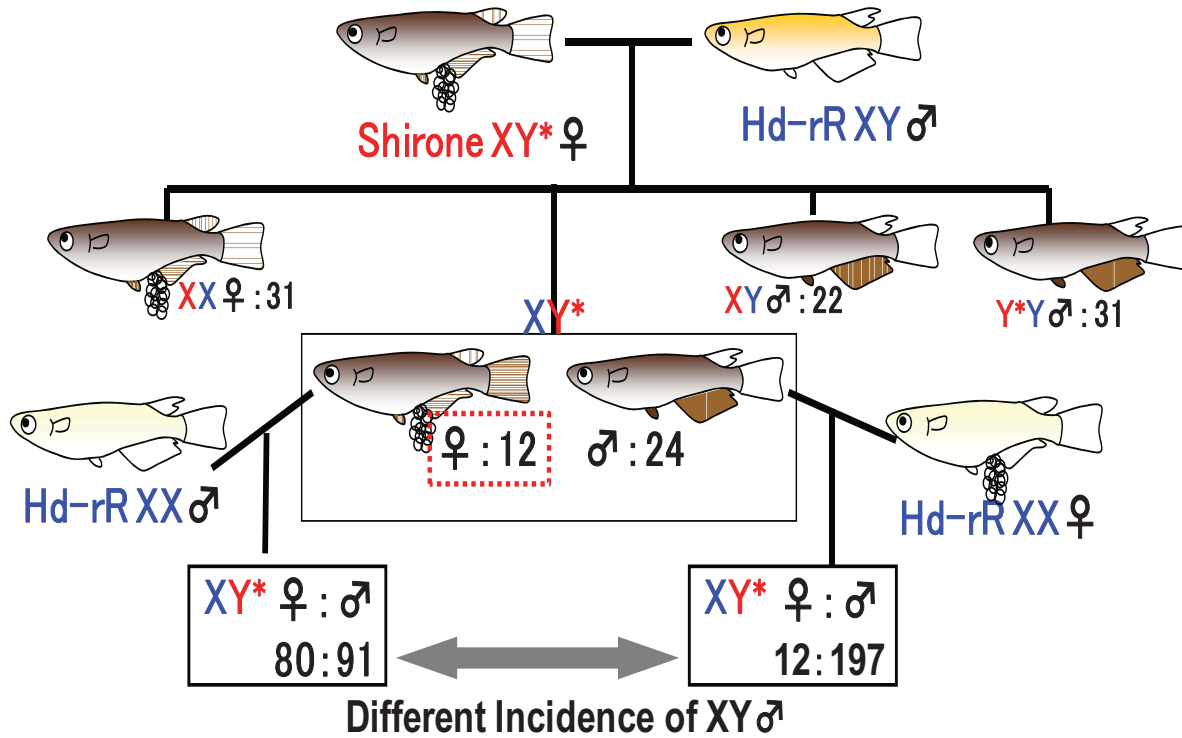
Mutants	XY <sup>m</sup>		Y <sup>m</sup> Y <sup>m</sup>	
	Female	Male	Female	Male
Kesen-numa	22	13	0	41
Shirone	18	10	-	-
Aizu-wakamatsu	22	4	-	-
Oura	34	0	33	0

気仙沼, 白根, 会津若松, 大浦

- ・ *DMY* が雄決定遺伝子として働くためには、一定レベル以上の発現量が必要。

(Otake et al. 2006)

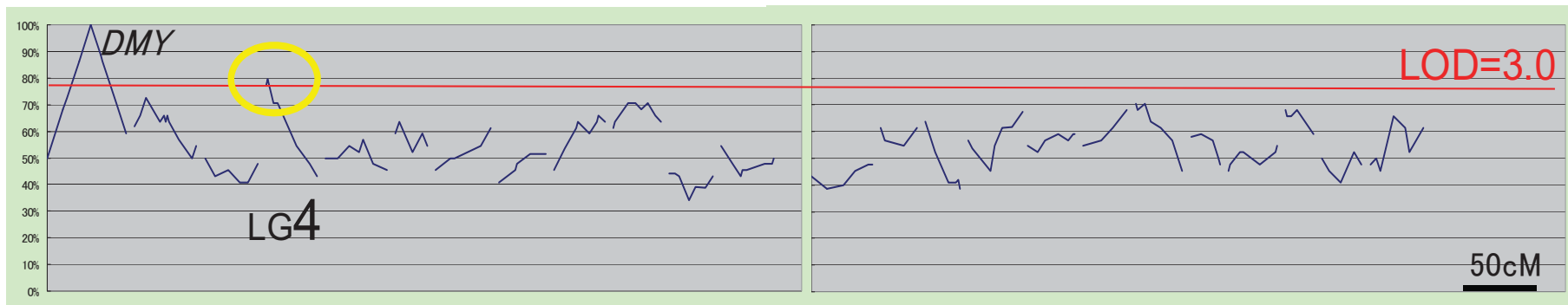
# *Dmy*の発現低下に影響を及ぼす 常染色体上の遺伝子もある。



4番染色体上に *DMY* の発現に関与する遺伝子がある。

つまり、

*DMY* に加えて常染色体上の性関連遺伝子の多型により、いろいろな性転換個体が生じうる。



# 1. 野生集団メダカ中の性転換個体の探索

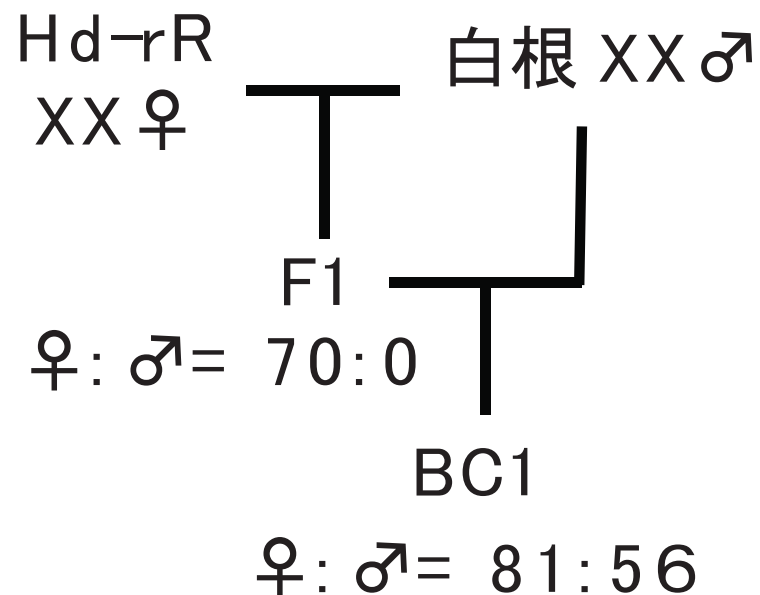
1-1 野生集団の探索結果

1-2 XY雌の原因因子の検討

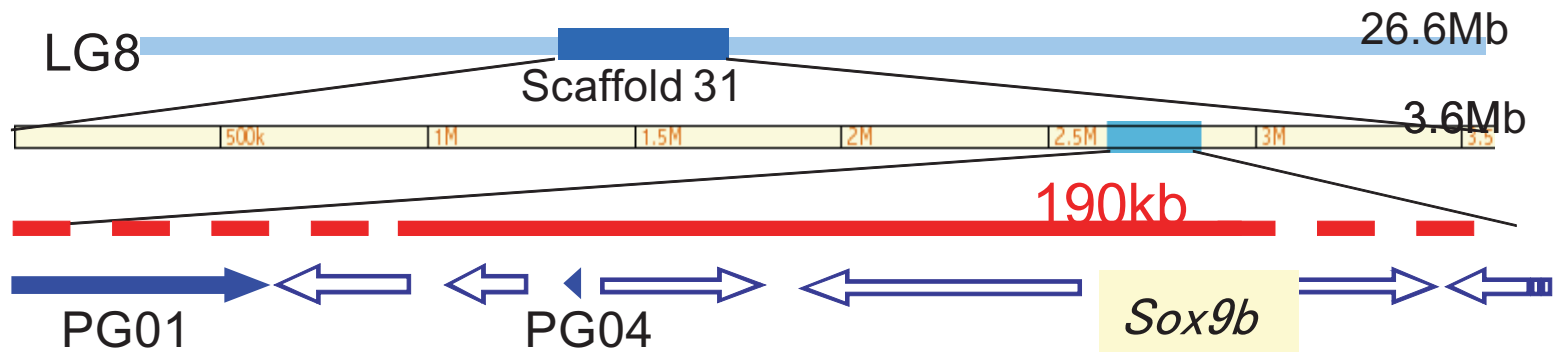
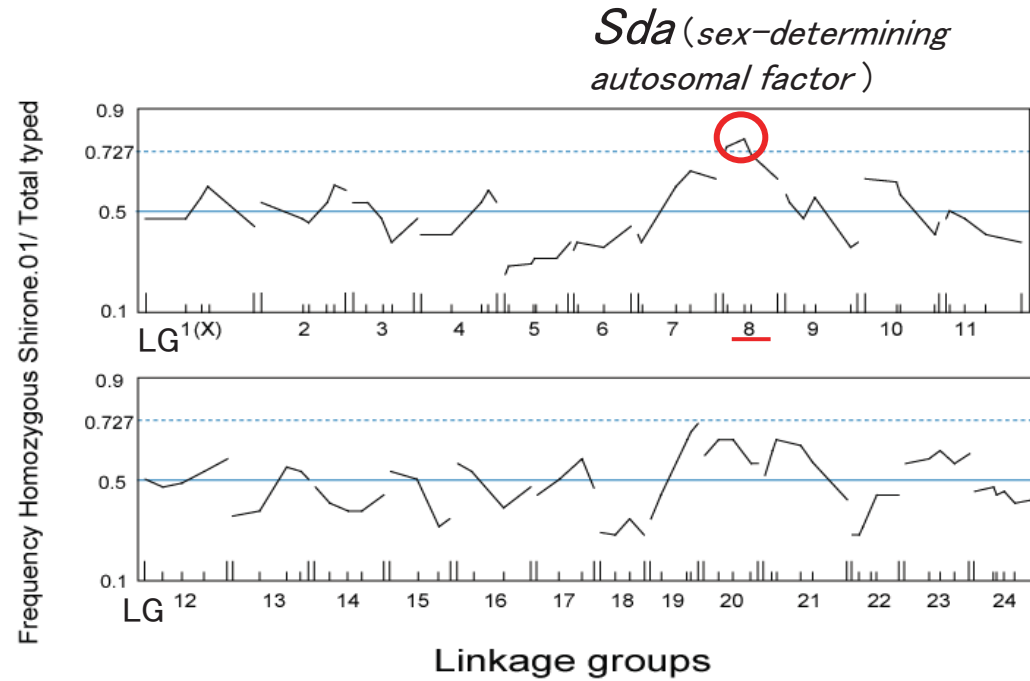
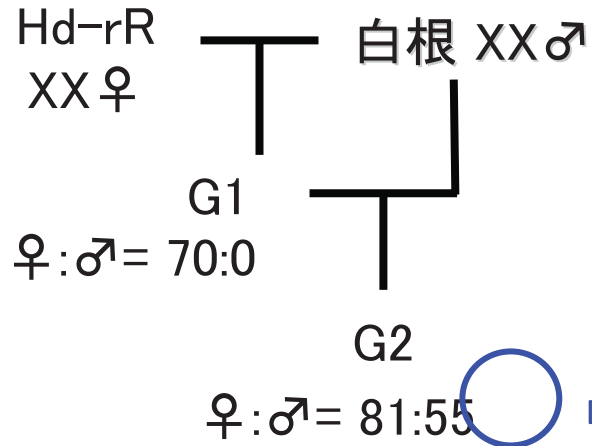
1-3 XX雄の原因因子の検討

採集地点	F 1		B C 1	
	♀	♂	♀	♂
新潟市白根 1	70	0	81	56
白根 2	72	1	27	0
新潟市佐潟	23	0	3	1
鶴岡 (山形)	70	0	101	5
仁賀保 (秋田)	28	0	78	5
寺泊 (新潟)	55	0	5	0
新潟市新津	132	0	82	1
厚木 (神奈川)	28	3	35	4
水戸 (茨城)	40	0	23	1
横浜 1 (神奈川)	88	0	94	14
横浜 2 (神奈川)	64	0	135	2
三田 (兵庫)	70	0	46	3

遺伝解析の例(白根)



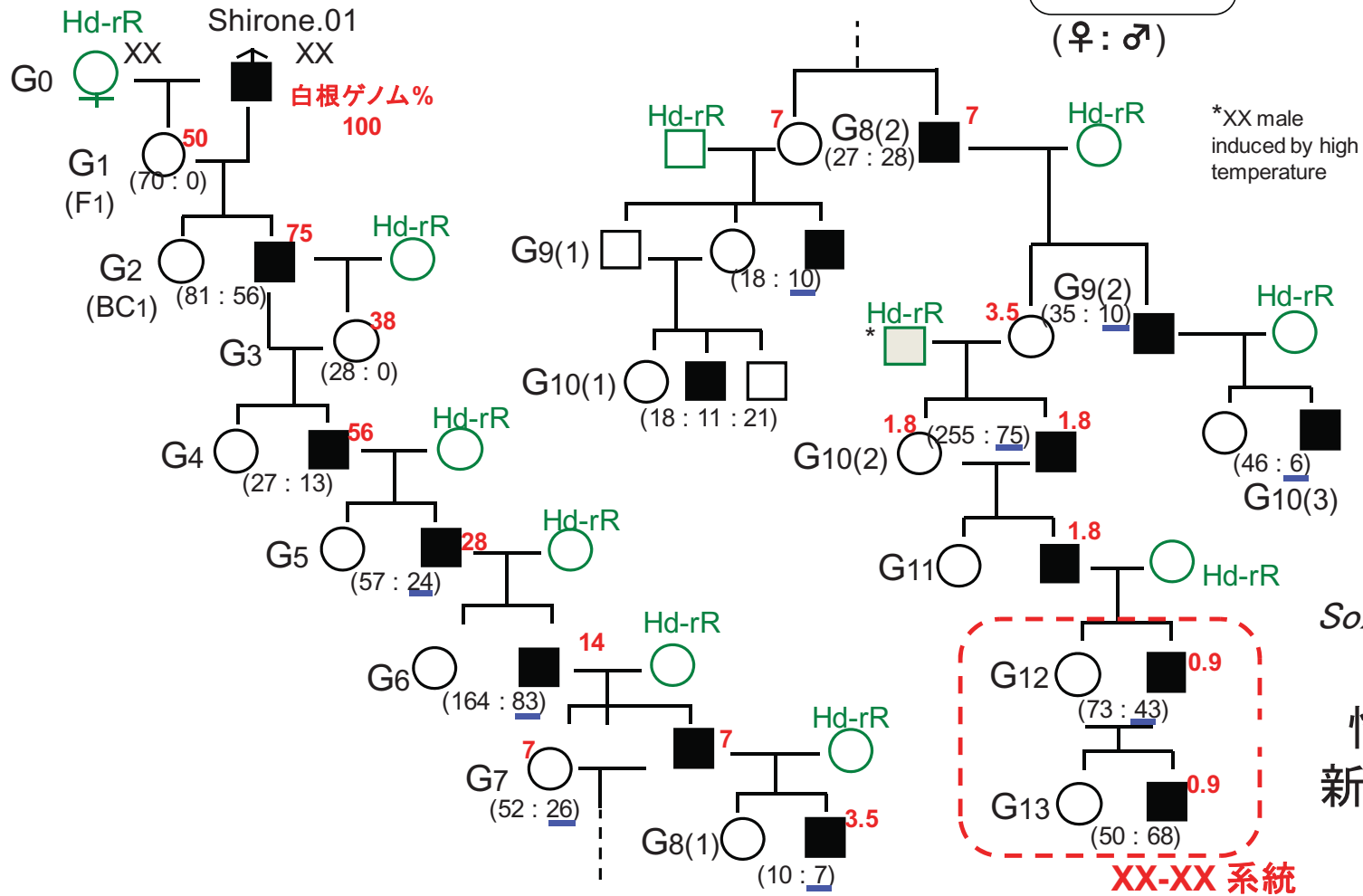
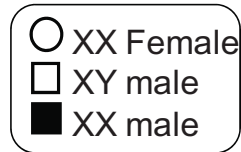
# 白根のXX オスの原因遺伝子



*Sox9b* の発現低下がオス分化をひきおこす.



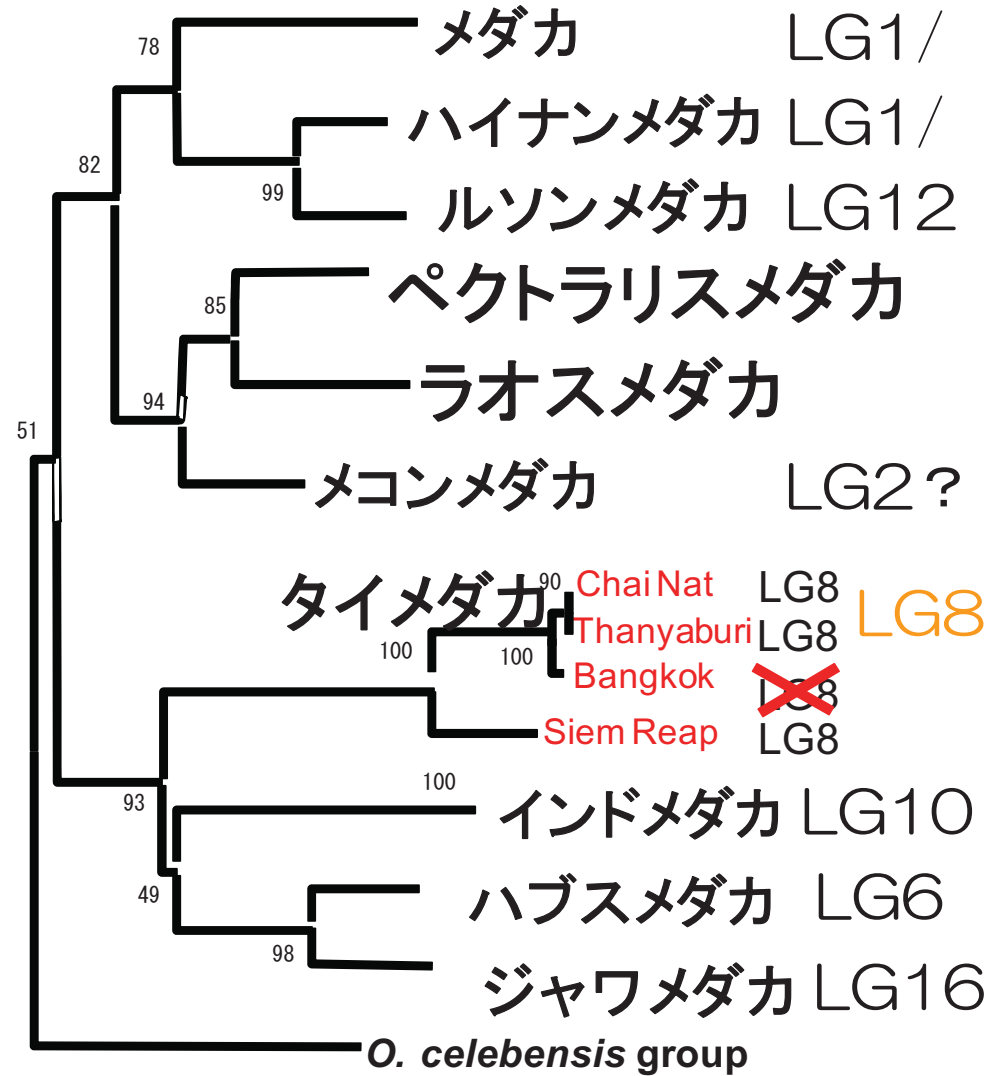
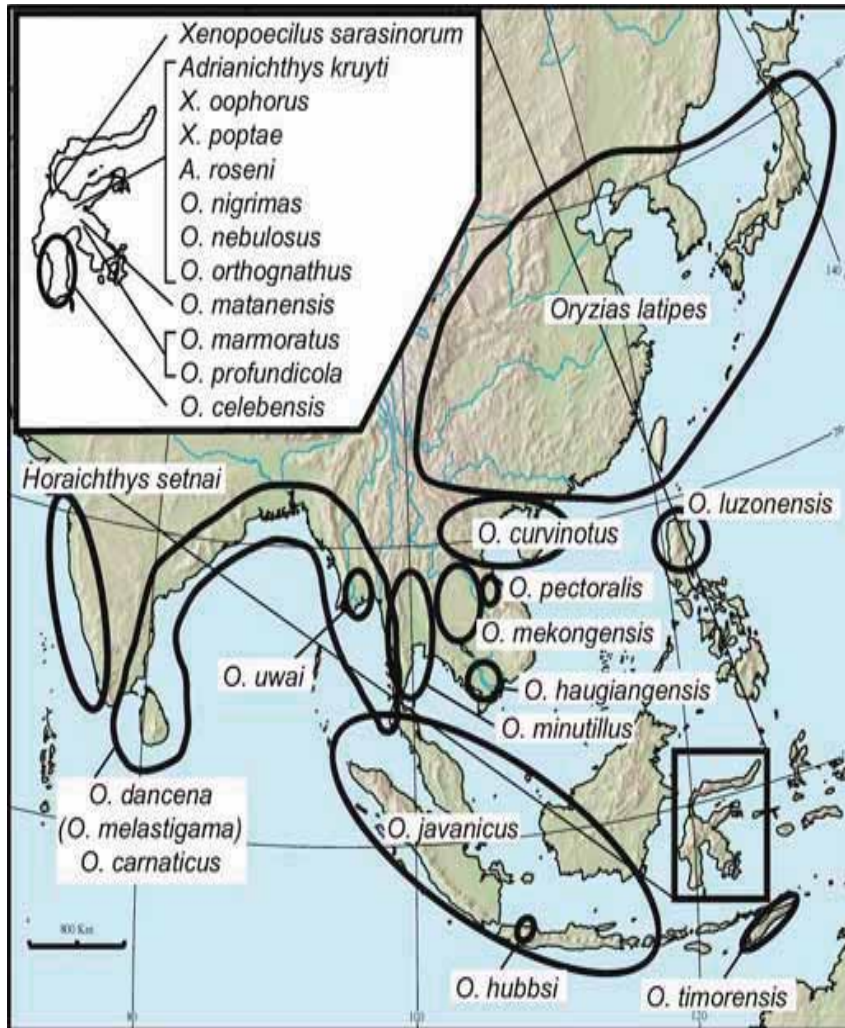
# 白根XXオス由来の“XX-XX 系統”



Sox9b が存在する8番染色体を性染色体とする新XX-XYシステム.

性分化に関連する遺伝子の突然変異により、メダカ地域集団で生殖的隔離が成立すると(→種分化に伴って)新たな性染色体の出現も可能である。

メダカ属魚類の性決定機構(性染色体・性決定遺伝子)は  
きわめて多様である。



16S rRNAによるメダカ属の分子系統樹

## 2. 性転換に関わる遺伝的多型性

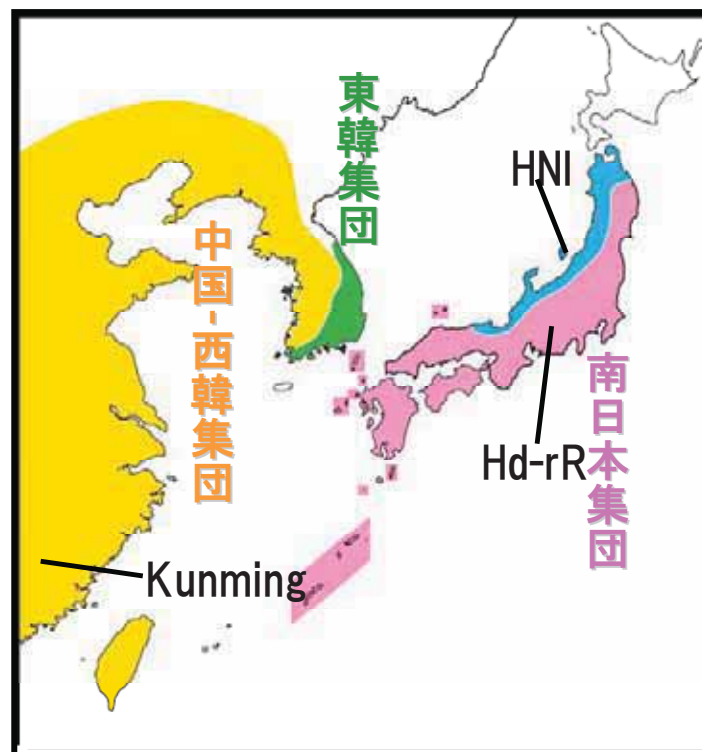
2-1 エストラジオール(E2)感受性

2-2 メチルテストステロン感受性

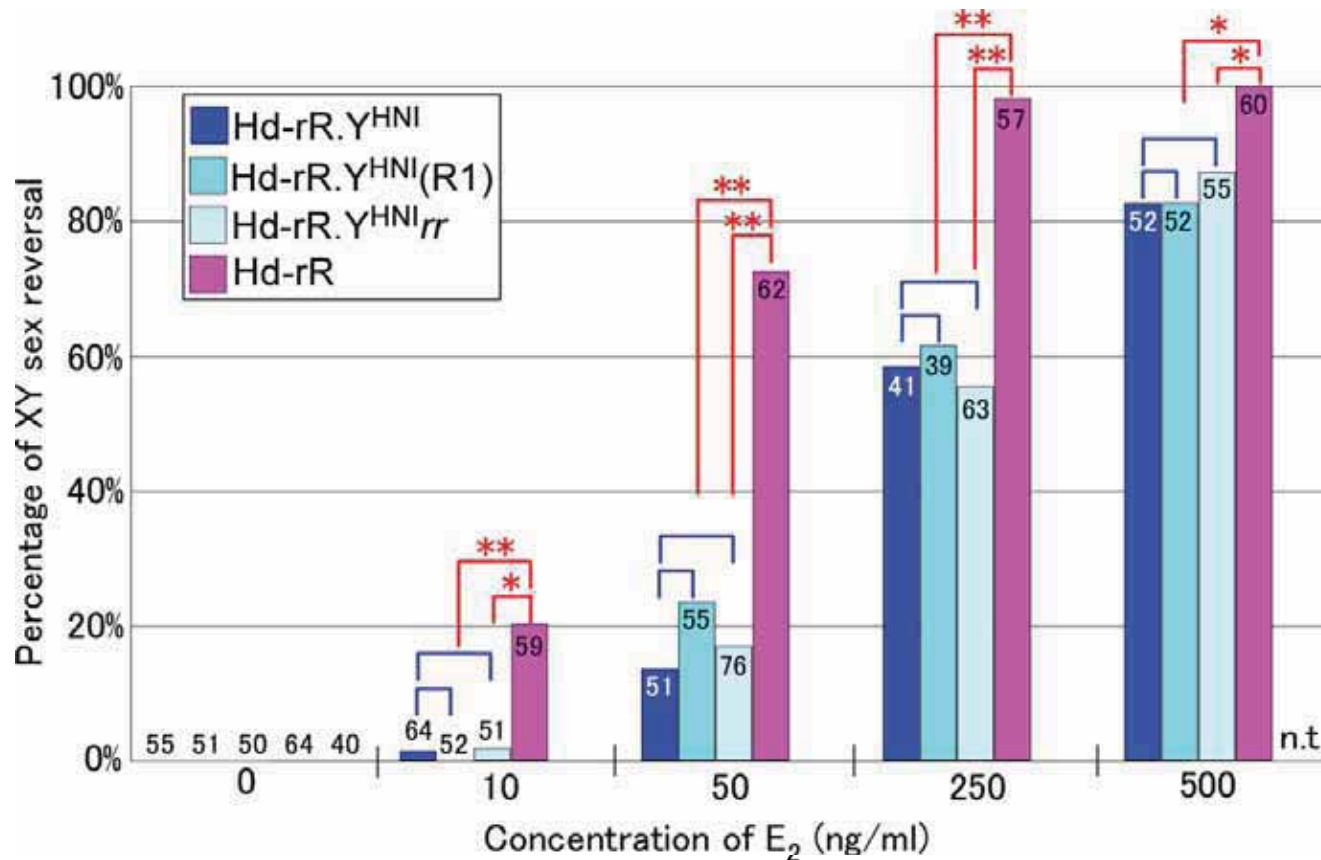
2-3 高水温による性転換

処理濃度	Hd-rR	HNI
50ng/ml	73% (45/62)	7% (4/56)
250ng/ml	98% (56/57)	19% (10/52)

近交系間でE2感受性が異なる。



# Hd-rRとHNI間のコンジェニック系統、リコンビナント系統のE2感受性の検討



•HNI系統Y染色体の  
*Dmy*近傍領域を持てば  
 低感受性



•Y染色体の*Dmy*近傍  
 領域にE2感受性因子  
 が存在

同一集団内の野生個体間にE2感受性の多型性が存在する。

新潟市秋葉区(新津)新潟県魚沼市(広神)で採集した野生メダカから各2ペアを作り、得られる卵をE2処理。

		卵	孵化	XX♀	XX♂	XY♂	XY♀	成魚	性転換率
新津①	control	189	171	10	4	9	0	23	0%
	0.05	191	152	10	1	12	1	24	8%
新津②	control	204	197	20	4	43	0	67	0%
	0.05	134	123	29	0	27	2	58	7%
		処理卵数	孵化数	XX♀	XX♂	XY♂	XY♀	検査数	性転換率
広神①	control	212	209	4	0	21	0	25	0%
	0.05	203	198	11	0	9	8	28	47%
広神②	control	218	204	3	0	42	0	45	0%
	0.05	206	193	6	0	21	4	31	16%

新津集団2ペアのF1の性転換率はHNI(7%)に近い。ペア間で差がない。  
 広神集団2ペアのF1の性転換率はHNIより高く、両ペア間でも差がある。

メダカ種内でE2感受性には大きな個体差がある。

→→ 生物検定にメダカを使う際には要注意。

## 2. 性転換に関わる遺伝的多型性

2-1 エストラジオール(E2)感受性

2-2 メチルテストステロン感受性

2-3 高水温による性転換



メチルテストステロンについても、近交系間には感受性に差がある。

MT treatment	HNI		HSOK		Hd-rR		F1 (HNI ♂ X HSOK ♀)	
	XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY
Control	1/37 2.5%	0/32 0%	0/41 0%	0/34 0%	0/39 0%	0/41 0%	0/31 0%	0/38 0%
MT 1 ng/ml	47/47 100%	0/39 0%	21/39 53.9%	0/37 0%	24/48 50.0%	2/44 4.5%	39/44 88.6%	0/37 0%
MT 5 ng/ml	43/43 100%	0/47 0%	1/45 2.2%	18/41 43.9%	7/39 18%	19/45 42.2%	7/10 70.0%	0/12 0%

- ・性転換率は近交系間で異なる。 HNI>Hd-rR=HSOK
- ・HSOKとHd-rRでは、高濃度のアンドロゲンでXY♀が出現する。

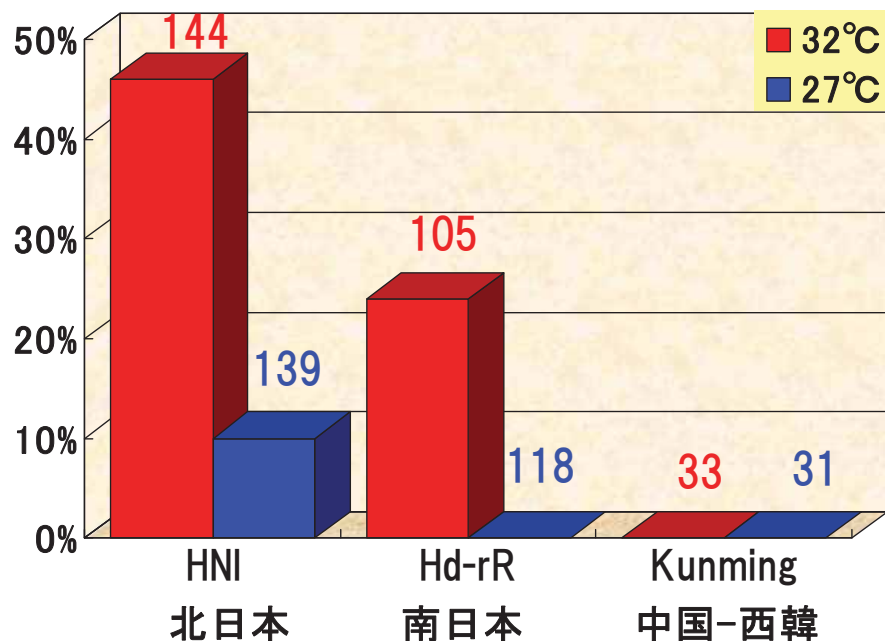
→→ 性転換についてのMT感受性に関わる遺伝子の多型

## 2. 性転換に関わる遺伝的多型性

2-1 エストラジオール(E2)感受性

2-2 メチルテストステロン感受性

2-3 高水温による性転換



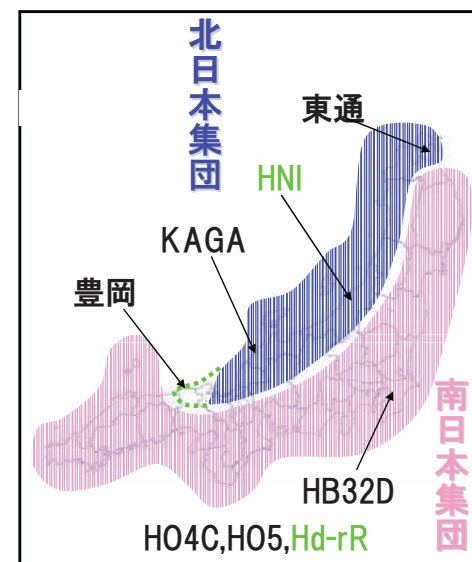
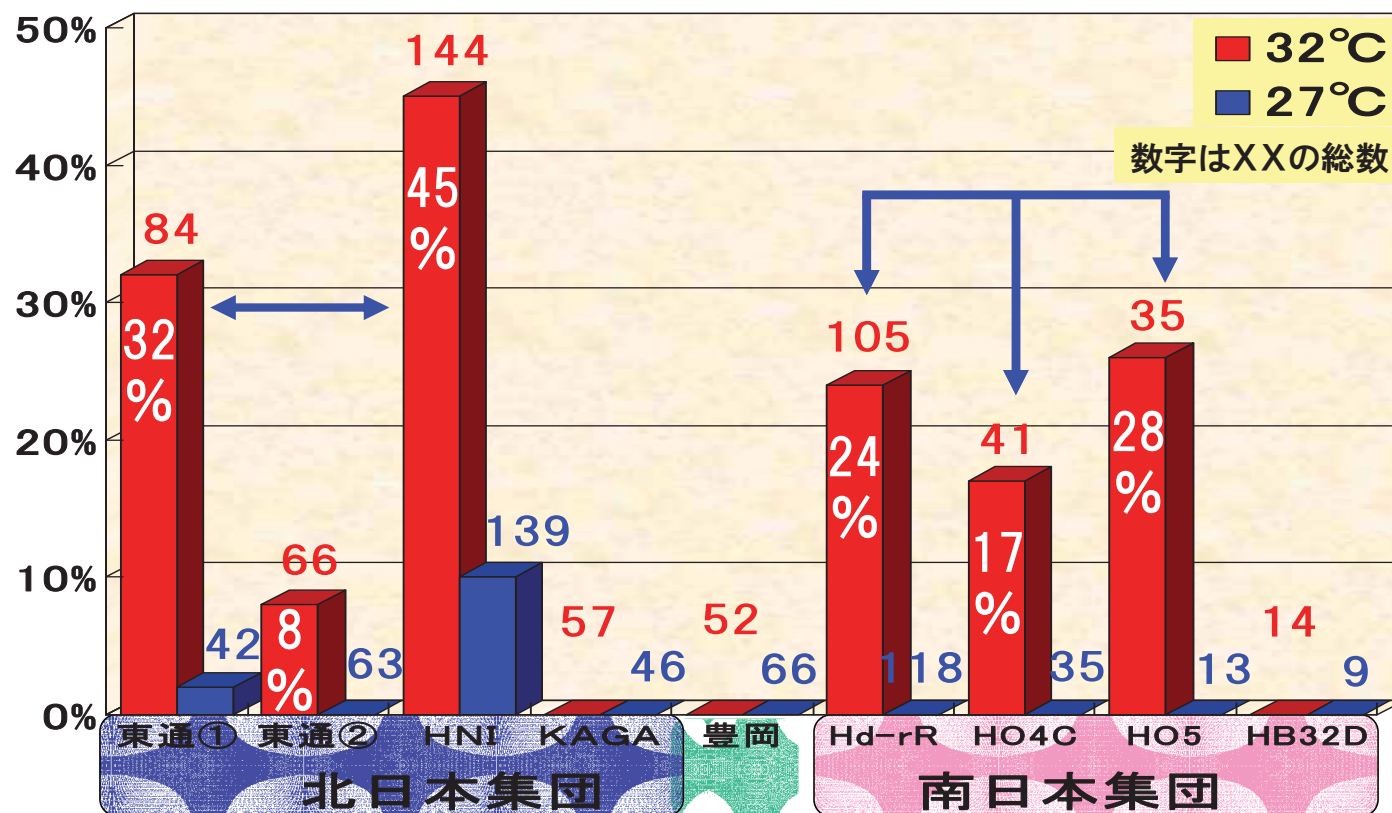
高温処理で誘導されるXX♂出現率は近交系間で差がある。

## 2. 性転換に関わる遺伝的多型性

2-1 エストラジオール(E2)感受性

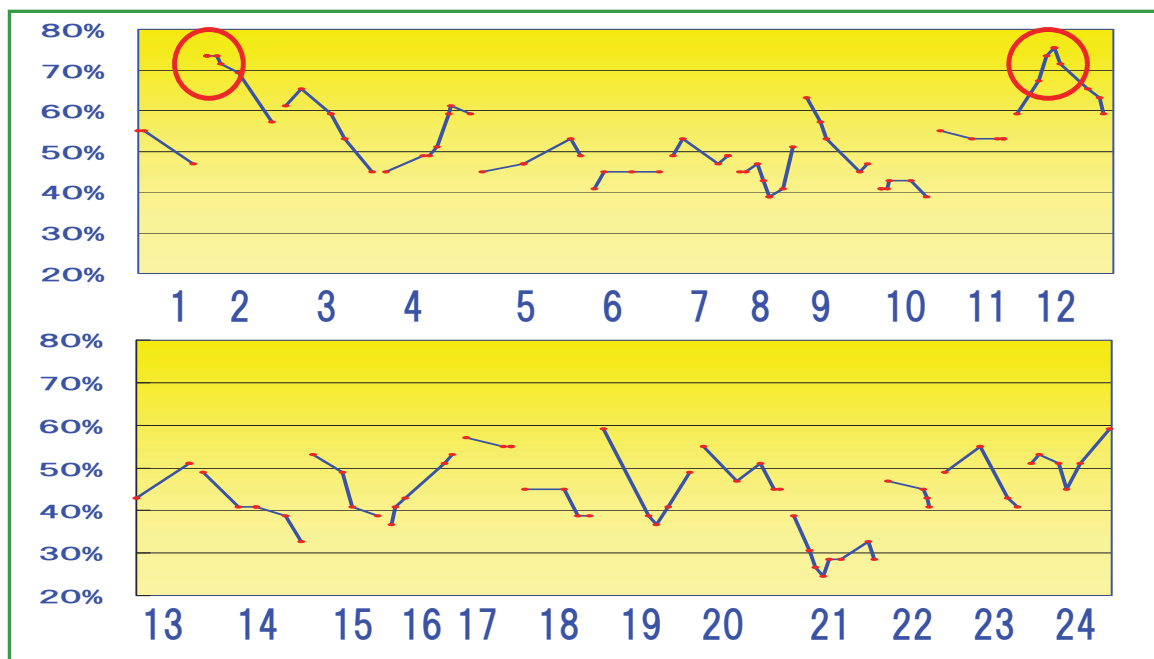
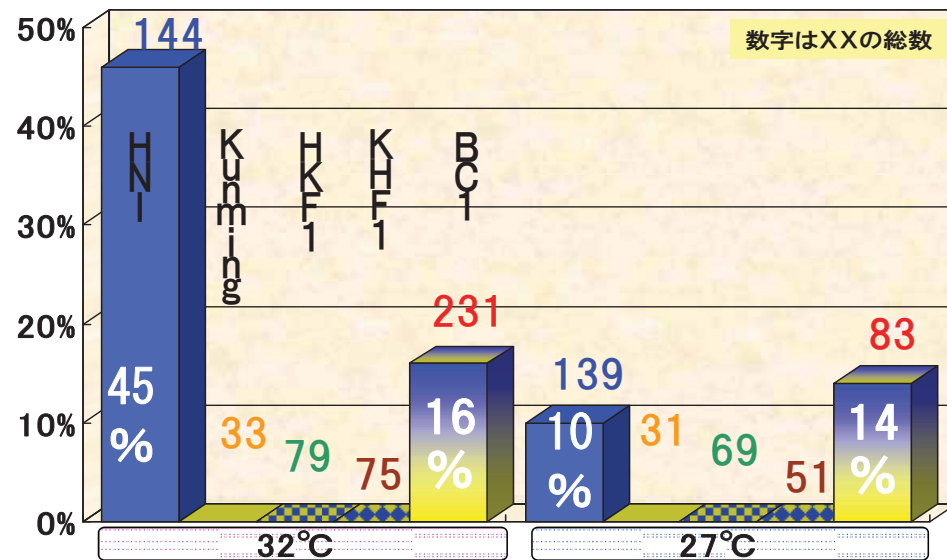
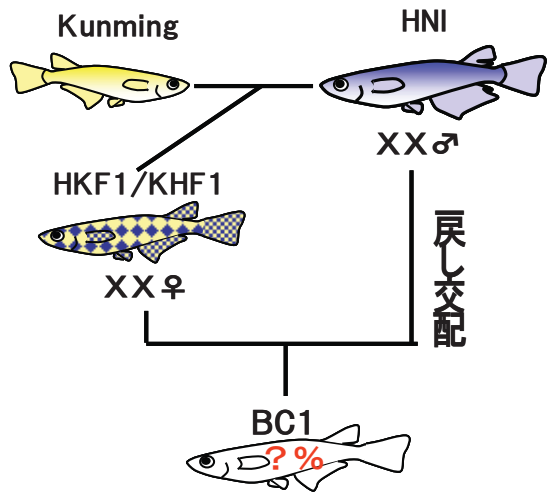
2-2 メチルテストステロン感受性

2-3 高水温による性転換



高温処理で誘導されるXX♂出現率は近交系間で差がある。

# HNIとKunming(昆明)のメダカのXX♂出現率の違いの遺伝様式



BC1個体の連鎖解析から2番および12番染色体上に高温による性転換に関与する遺伝子が存在する可能性が示唆

## 結果のまとめ

- ①メダカ11,042尾の約99%の性は*Dmy*の存否と一致。  
→→*Dmy*はメダカの普遍的性決定遺伝子
- ②*Dmy*の「雄決定力」にはいろいろな多型がある。
- ③*Dmy*の機能に影響する複数の常染色体上の遺伝子が存在。
- ④ XX♂を作る遺伝子として、8番染色体上の*Sox9b*をはじめ、複数の遺伝子の存在が示唆。  
→→ *Dmy*に取って代わる能力のある雄決定遺伝子
- ⑤メダカの性を後天的に転換する性ホルモンや高温などに対する反応性に関わる遺伝子にも種内に様々な多型性が保持。

1. メダカに普遍的な性決定遺伝子 *Dmy* が同定されたことから、野生メダカの性転換を指標とした環境中の内分泌かく乱物質モニタリングが可能である。 →→ 性決定関連遺伝子の多型などの遺伝的要因による性転換、および温度性転換の可能性についての検討が不可欠。
2. メダカ種内には性決定/性分化関連遺伝子の多型に起因するホルモン感受性の違いが、系統間、或いは個体間に認められる。  
→→ メダカを生物検定のモデル生物として使用する場合にはその遺伝的背景に十分な配慮が必要になる。