

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570073

研究課題名(和文)メダカにおける人為的性転換反応の多様性と逆説的性転換

研究課題名(英文)Artificial-induced sex reversal and paradoxical sex reversal in medaka

研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA, Naoki)

信州大学・理学部・准教授

研究者番号：20252059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：メダカを用いて、胚へ性ステロイドを投与した時に起こる性転換について6つの近交系間の比較を行った。雌性ステロイドホルモンを投与した場合5系統でオスからメスへの性転換を誘導できたが、全ての個体には性転換を起こせない系統、通常の1/10量でも100%の個体が性転換する系統が見られた。一方、雄性ステロイドホルモンを投与した場合には、通常のメスからオスへの性転換以外に高濃度を投与した場合オスからメスへの「逆説的性転換」が、4系統で見られたが、その程度は様々であった。またMT投与群ではほとんどの系統でXX、XYいずれの場合も投与後に生殖巣が萎縮し、その後回復するものの発達過程は正常と比較して遅れていた。

研究成果の概要(英文)：Using six medaka inbred strains, their sex reversal process after administration of sex steroids to embryos were investigated. After estrogen administration, XY females were appeared in 5 strains, but the sensitivity and/or degree of sex-reversal were different among strains. Administration of androgen to XX specimen caused female to male sex reversal in various degree. On the other hand, male to female sex reversal in XY specimens termed paradoxical sex reversal were also observed at high dose of androgen in 4 strains. Thus the sex reversal process were highly varied among strains. In most strains, gonads showed strong atrophy after androgen administration. After hatching when clearing the exogenous androgen, these gonads were eventually recovered but their growth and the sexual differentiation were remarkably delayed.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：性転換 性ステロイド投与 メダカ 逆説的性転換 近交系 系統差

1. 研究開始当初の背景

遺伝的に性が決まる脊椎動物の中で、メダカは世界で初めて人為的に遺伝的性とは異なる性へ発生させ得ることが示された動物である。このときは、孵化後から成熟期に至までエサに性ステロイドホルモンを混ぜて与え、伴性遺伝する体色を目印としてXYのメス個体、XXのオス個体が生じたことが示された。これをきっかけとして、下等脊椎動物では人為的に性ステロイドを投与することで、雄性ステロイドではメスからオスへの、雌性ステロイドはオスからメスへの性転換を引き起こせることが知られてきた。このため、漠然と投与した性ステロイドが本来の内在性ステロイドと変わらない働きをして性転換を引き起こすと想定されてきた。

近年メダカでは、胚時期に飼育水に性ステロイドを添加し、孵化までの期間のみ投与することで性転換を引き起こせることが知られてきた。しかし、内在的なステロイド産生機構に関わる酵素群の遺伝子発現を調べたところ、この時期にはいずれの酵素も発現していないことが示され、性ステロイドによる性転換は本来の性分化とはまったく異なる現象であることが考えられた。さらに雌性ステロイドを投与されたオス個体は、性分化最初期には、いったんは精巢形成方向への分化を開始する、すなわち正常な性分化を開始するが、孵化後すぐに改めて卵巣を発達させることで性が転換していることが示された。一方、例えば通常は雄性ステロイドを投与されたオスは遺伝的にしたがって精巢を発達させる（性転換は起こらない）が、その発達過程が正常な精巢の発達と同様であるかについても、疑問の余地があった。このように、性転換という現象は比較的容易に観察できるものの、実際にメダカ胚に投与された外来性の性ステロイドがどのようなメカニズムで性転換を引き起こしているかは不明である。

メダカでは多くの近交系が確立されており、その中では特にHd-rR系統が様々な実験解析に用いられてきた。また、種内に地方集団が識別できて遺伝的にも異なっており、2012年になって改めて別種として記載されたグループに由来するHNI系統も、Hd-rR系統との遺伝的差違を利用できることから、しばしば実験解析に用いられている。この2系統（およびこれらが由来する集団）は十分に交配可能であり、そのF₁には稔性があり、発生過程や様々な遺伝子発現パターンなどにもほとんど違いは見られない。しかし、胚へのステロイド投与による性転換が試されたところ、大きな違い見いだされた。すなわち、Hd-rR系統では雌性ステロイドによるオスからメスへの性転換は容易に起こせるが、雄性ステロイドによるメスからオスへの性転換は難しく、XX個体の卵巣発達には異常をきたすものの機能的な精巢を持たせることは困難であった。一方、HNI系統では雄性ステロイドによるメスからオスへの性転換は容易に引き起こせるが、雌性ステロイド投与によるオスからメスへの性転換は、投与された胚が孵化できなくなることから不可能であった。つまり通常の性転換に関しては、それぞれの系統で片側方向への性転換しか引き起こすことができないということになる。さらに予備的ながらより高濃度の雄性ステロイドホルモンを投与した場合、HNI系統ではやはりメスからオスへの性転換が起こるが、Hd-rR系統では通常想定されるメスからオスではなく、逆に雄性ステロイドにも関わらずオスからメスへの性転換が誘導される「逆説的性転換」として知られる現象が引き起こされることがあることも示された。この点では系統によりまったく逆の反応が見られることになる。またCab系統、H04C系統でも異なる反応が見られる可能性が示唆されていた。

メダカでは、上記した系統以外にも複数の近交系が確立されている。近交系は個体間で

の遺伝的ばらつきを無視できるため、優れた実験動物といえる。一方、近交系作出時には連続した兄妹交配が行われるため、どのような形質がその系統に固定されるかはランダムである。その結果、種としては同じ「メダカ」であっても、系統間に何らかの差が生じる可能性がある。実際、マウスでは亜種間での系統間では性分化の動態にわずかながら差がみられ、交配実験をした場合には用いる系統によって結果が異なることが示されている。したがって、何らかのメカニズムを解析する場合には、対象となる現象に系統差がある場合、どのような性質なのかをふまえて系統を選択することが重要となる。しかし、これまでに性転換における系統差を解析した例はなく、また、同種内でも系統によって様々な性転換反応が見られることは、まったく予想されていなかった。

2. 研究の目的

上記した背景のように一部の系統で性転換反応に系統差が見られることが示唆されたことから、その性転換過程、さらに他の系統での性転換反応を解析し比較することにより、実際に性ステロイドがどのような影響を与えているかを推定する。また、新たに他のメダカ近交系に対し胚への性ステロイドの投与を行い、性転換反応にさらに違いが見られるかどうかを明らかにし、また、これまで希な現象とされてきた逆説的性転換についても、他の系統では見られないのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 性ステロイドホルモンの投与

雄性ステロイドホルモンとしてメチルテストステロン(MT)を、雌性ステロイドホルモンとしてエストラジオール17(E₂)を用いた。それぞれ、Dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解した後、目的の最終濃度となるよう飼育水に添加した。胚は、授精日に採卵し1日メ

チレンブルーを適宜添加した飼育水(汲み置き水道水)で発生させ、染色された死亡卵を除いてから実験に用い、受精後1日から孵化日まで性ステロイドを投与した。

(2) 遺伝的性判別

試料から組織を一部採取しDNeasy(QIAGEN)を用いてトータルDNAを採取し、これを鋳型としてメダカY染色体上の性決定遺伝子*dmy*の遺伝子断片をPCR法により増幅、産物の有無によりY染色体の有無を識別することにより、遺伝的性を判別した。

(3) 表現型としての性判別

試料の生殖巣領域をブワン氏液で固定した後、定法に従いパラフィン包埋し、連続切片を作製して組織像を観察した。孵化時および孵化直後の稚魚については、個体当たりの全生殖幹細胞数をカウントして初期性分化が精巣、卵巣、どちらへと進行しているかを判定した。これは、最も最初に見られる性差が生殖幹細胞数の差で、卵巣分化を開始した生殖巣の方が、より多くの生殖幹細胞を持つことによる。その後孵化後20日ごろまでの稚魚では卵母細胞を持つ生殖巣を発達中の卵巣、持たないものを発達中の精巣と判定した。また孵化後30日以上では、これに加えて精細管構造、輸出管の形成を精巣形成と見なし、卵巣腔の形成が見られるものを卵巣と判定した。上記(2)の遺伝的性と生殖巣の性が一致しないものを、性転換したものと見なした。また、一部の実験で両方の性の形態が混在する組織像が見られたが、この場合には、それぞれについて特徴を記載し、区別して扱った。

(4) マーカー遺伝子の発現

正常発生では*dmt1*は精巣分化過程で孵化後10日前後から発現が見られようになり、精巣特異的発現が最も早く見られる遺伝子ではない。しかしメダカ性決定遺伝子*dmy*は*dmt*遺伝子ファミリーに属するため、メスが性転換する際にはXX個体で異所的な*dmt1*の発現が誘起され、これが精巣分化を起こす可能性

が考えられる。一方、卵巣分化では *foxl2* は最も早く検出される卵巣特異的遺伝子で、孵化日前後から発現することが知られている。これらのことを考慮し、精巣の分化マーカーとして、精巣体細胞で発現する *dmrt1* を、また卵巣分化マーカーとして *foxl2* の発現を、ジゴキシゲニンラベルしたプローブを用いた通常の section *in situ* hybridization 法により検出した。

4. 研究の成果

以下、調べた各系統の性転換における主な特徴を系統ごとに示す。なお、ステロイド投与量は E_2 では Hd-rR 系統で 100% オスからメスへの性転換がみられた $0.2 \mu\text{g/ml}$ を、MT では HNI 系統で 100% メスからオスへの性転換が見られた 1ng/ml を基準として用い、系統によっては必用に応じて他の濃度も段階的に投与し反応を調べた。

(1) Hd-rR 系統

高濃度 ($0.4 \mu\text{g/ml}$) の E_2 を投与した場合でもオスからメスへ、ほぼ 100% の性転換が見られた。ただし、高濃度下での性転換個体では低濃度のときに比べ卵巣発達に大きな遅れが見られ、性転換ルートが一つではない可能性が示唆された。一方、MT 投与した XX 個体では濃度を上げて最大で半数の個体程度しか性転換せず、他の個体は遺伝的性に従った卵巣を形成していた。ただしいずれの場合も孵化後 10 日前後には生殖巣が著しく萎縮していた。一方 XY 個体では MT の投与濃度を基本濃度の 1ng/ml から 100ng/ml までの区間を調べた結果、いずれの濃度でも 50~80% の個体が卵巣を形成し、極めて高頻度で逆説的性転換が起こっていた。

(2) HNI 系統

Hd-rR 系統の結果をもとに、逆説的性転換の有無を調べた。その結果 100ng/ml まで濃度を上げて、まったく逆説的性転換は見られず、全て通常の性転換 (XX 個体がオスになる)

であった。また、これらの MT 投与 XX 個体では、孵化日に *dmrt1* の異所的な発現が観察みられ、これが性決定遺伝子 *dmy* の代わりに働いた可能性が示唆された。

(3) H04C 系統

E_2 投与群では、濃度上昇に伴い孵化率が著しく低下した (2 倍に当たる $0.4 \mu\text{g/ml}$ でも孵化率 10% 以下)。しかし $0.2 \mu\text{g/ml}$ では孵化 10 日の時点では全ての XY 個体が性転換していた。ただし、その後、同様に E_2 投与した個体を孵化後 30 日まで成長させて調べたところ、およそ 40% の個体は精巣を形成し、最終的には性転換していなかった。 E_2 により性転換するもの高濃度では孵化できないという性質は、ちょうど Hd-rR 系統と HNI 系統両方の性質をもつように見える。一方、MT 投与では、XX 個体全てが性転換していた。これは HNI 系統と同様な性質である。

(4) H05 系統

E_2 投与群では、基準の 1/10 の濃度である 20ng/ml でもほとんどの XY 個体が性転換していた (この濃度では Hd-rR 系統ではほとんど性転換がみられない)。この結果をもとに MT 処理でも低濃度を試したところ、 0.5ng/ml 、 0.05ng/ml でも XX 個体が 100% 性転換していた。 E_2 、MT の作用はまったく異なるものと考えられるが、この系統はいずれに対しても極めて敏感であることが見いだされた。また MT の濃度を上げたところ (10 および 50ng/ml)、XY 個体の内およそ半数で逆説的性転換が見られた。またこのとき、結果的に精巣を形成するか卵巣を形成するかに関わらず、孵化直後の生殖幹細胞数は著しく減少していた。

E_2 を投与され、性転換する XY 個体では、孵化直後まで *dmy/dmrt1* の発現が見られたものの孵化 3 日前後でこの発現が消失し、入れ替わり *foxl2* の発現が検出された。一方、MT を投与され性転換する XX 個体では、孵化日から *dmrt1* の発現が見られた。

(5) HB11A 系統

0.2 µg/ml以上のE₂投与で、ほぼ100%オスからメスへの性転換が見られた。一方MT投与では0.5ng/ml ~ 1ng/mlの範囲では通常のメスからオスへの性転換が見られたが、このとき、HNI系統とは異なり*dmlrt1*の発現は見られなかった。より高濃度になった場合、遺伝的性に関わらず大半の個体が少数の卵母細胞をもつ萎縮した生殖巣を形成していた。また0.1 µg/mlでは、XX個体、XY個体いずれでも、ほぼ全ての個体で卵巣が形成されていた（この場合、XY個体に見られた卵巣形成は逆説的性転換である）。同一個体の生殖巣内に精巣分化している部分と卵巣分化している部分が見られる、いわゆる卵精巣も観察された。XX, XYいずれでも精巣が形成されたことも考え合わせると、MT投与後には本来の精巣分化ルートとはまったく異なる機構が働いたと考えられる。

(6) Cab系統

E₂投与では、基準濃度ではオスからメスへの性転換は30%程度しか起こらず、10倍濃度投与することで100%の性転換率となった。H05系統とは逆に感受性が極めて低い系統と言える。MT投与ではXX、XYいずれでも生殖巣の矮小化が顕著で、その後の発達にも遅れが見られた。一方性転換に関しては、XX、XY、いずれの場合にも性転換した個体としない個体が見られ、どちらの場合も精巣を形成する個体と卵巣を形成する個体の両方が見られたが（XYでの卵巣形成は逆説的性転換となる）、遺伝的性と表現型の性が異なる個体の割合はいずれも20%程度であった。MTについては、生殖巣の発達度合いから見ると感受性はあるものの、性分化については抵抗性があると言える。

以上をまとめると、今回の結果はメダカ近交系間では性転換反応に様々な違いが見られ、パターンを類型化することが困難であると言える。この中でH05系統では適切な

投与濃度においては、系統内で100%の確率で両方向の性転換が起こることが見いだされた。例えばXX個体に精巣が形成されるメスからオスへの性転換の場合、単純に正常な精巣形成過程（MT非投与）と性転換で精巣が形成される場合の比較のみならず、同じMT投与下でのXY個体での精巣形成過程（MTを投与しているので、正常とは異なる可能性がある）、さらには正常なXX個体との比較からどのように卵巣形成過程から逸脱するか、を比較する必要がある。当然、同様なことはオスからメスへの性転換でも考慮する必要がある。したがってメダカの性転換過程の解析には、調べた中ではH05系統が最適であるということが言える。一方、実験動物として良く用いられているHd-rR系統、HNI系統は、それぞれクセがある系統であり、性転換過程の解析には必ずしも適するわけではないということになる。

MT投与条件では、Hd-rR以外にも、高濃度で投与した場合には程度の差こそあるものの複数の系統で逆説的性転換が見いだされた。このことから、これまで希な現象と考えられている逆説的性転換がメダカではある程度の確率で起こり得る、あるいは実験的なMT濃度を上げることで他の動物でも誘導できる可能性があることが示唆された。

性転換パターンには共通するパターンを見いだすことはできなかった一方で、MT投与群ではいずれの系統でも、また系統内のXX, XY個体のいずれでも（つまり遺伝的性に関わらず）、さらに最終的に精巣を形成するか卵巣を形成するかとも無関係に、投与直後に生殖幹細胞が減少するという傾向が見られ、一部の系統ではこの様子が顕著であった。通常、精巣分化過程では生殖幹細胞の分裂が抑制され卵巣分化に比べ細胞数が少なくなることが知られているが、MT投与下ではこの精巣分化で見られる細胞数よりもさらに少ない細胞数となっていた。つまり、この幹細胞の

減少は一見すると精巣分化が誘導されたように見えるが、実際には一時的に生殖巣の分化発達が阻害されていたということ、つまりMTはオス分化機構をオンにする働きをしているわけではないということが示唆される。実験に用いた投与量の範囲では孵化率、孵化後の生存率・成長度合いには大きな違いが見られず、一方、矮小化された生殖巣は非常にしばしば見られたことから、メダカ生殖巣はこの阻害効果に対し他の器官よりも敏感であることが考えられる。さらに、今回の実験では孵化後はMTを投与せずに成長させたため、この阻害効果は孵化後に解除され、その後の発生・発達過程において生殖巣は「回復」過程を経るものと考えられる。一般に生殖巣元基が発達する場合、性的に未分化な状態は維持されず、精巣または卵巣のいずれかへ分化せざるを得ない性質を持つと言われている。したがって、MTを投与された個体は、「回復」後に本来の発生スケジュールとはまったく異なるタイミングで改めて精巣または卵巣を形成し始めることになる。

通常メダカでは、孵化以前のステージ38ごろにXY個体で性決定遺伝子*dmy*が発現することにより性決定がおこり精巣の分化を開始し、一方、この遺伝子の発現が起こらない場合は同じ時期に卵巣の分化を開始し*foxl2*が発現するようになると考えられている。MT投与個体では上記したように、この時期ではなく孵化後に、本来の性決定機構が発動する時期からは遙かに遅れて性分化を開始することも見なすことができる。したがって、このときにはどちらの性へ分化するかの制御を受けない形で生殖巣は再発達し始めることになる。このタイミングのずれから精巣または卵巣分化関連遺伝子が上位の制御を受けないためストキャスティック（確率的）な発現が起こっている可能性がある。一般に、精巣、卵巣それぞれの分化は拮抗的に制御され、一度精巣または卵巣どちらかの分化へ傾くと逆方向への

分化が阻害されることで、ますます傾きが大きくなり、精巣か卵巣のいずれかのみが形成されると考えられている。MTの投与、特に高濃度の投与に対する反応が系統によって大きく異なっていたのは、このストキャスティックな発現において系統間でのゲノムのわずかな違いにより性分化方向に「バイアス」がかかっていたと解釈することができる。さらに、しばしば一過性の卵精巣なども見られており、これは「回復」過程が一つの器官内でもタイミングがずれてしまい、制御が乱れたまま器官の部分ごとに精巣または卵巣が発達してしまった結果と見なすこともできる。

このような「バイアス」を想定すると、性転換パターンが類型化できなかったのは系統ごとにバイアスの方向、すなわち精巣、卵巣いずれの方向へ分化しやすいのか、またこのときのバイアスの強度すなわち分化の起こりやすさ、が異なっていたためと考えることができる。今後は各系統のゲノム内でのバイアスの実体を明らかにするとともに、性転換、性分化を解析する際には、このような系統間の性分化バイアスの存在を考慮して解析することが必要であろう。

5．主な発表論文等

該当なし

6．研究組織

(1) 研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA, Naoki)

信州大学・理学部・准教授

研究者番号：20252059