

学位論文

遺伝子改変メダカを用いた精巣初期分化の分子機構の解析

Molecular mechanism of early testicular development using genetically modified
medaka strains

2016. 3

東京農工大学大学院

連合農学研究科

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

今井 拓人

Takuto Imai

目次

略語一覧	4
緒言	6
第1章 <i>Gsdf</i> 欠損メダカの解析	13
1 序論	13
2 材料および方法	15
2-1 研究に用いたメダカ系統とメダカの飼育	15
2-2 TALEN の設計	16
2-3 RNA の合成と顕微注入	16
2-4 変異体のスクリーニング	17
2-5 遺伝子型判定	17
2-6 組織学的解析	18
3 結果	19
3-1 <i>Gsdf</i> 欠損メダカの作出	19
3-2 <i>Gsdf</i> 欠損メダカの生殖腺初期分化	20
3-3 <i>Gsdf</i> と <i>Dmrt1</i> 二重欠損変異体の解析	21
4 考察	22
4-1 <i>Gsdf</i> は未分化生殖腺の精巢分化に重要な遺伝子である	22
4-2 <i>Gsdf</i> は後期の精巢発達に必須ではない	23
4-3 <i>Dmrt1</i> は <i>Gsdf</i> よりも後に機能する	23
第2章 FLAG タグ融合 <i>Dmy</i> を発現する遺伝子導入メダカの樹立と <i>Dmy</i> の可視化	25
1 序論	25
2 材料および方法	27
2-1 研究に供試したメダカ系統とメダカの飼育	27
2-2 <i>Dmy-FLAG</i> Tg 系統の作出	28

2-3	外来性 <i>Dmy</i> の検出およびゲノム DNA 内, mRNA 内の FLAG 配列の検出	28
2-4	組織切片による表現型の解析	29
2-5	免疫組織化学	30
3	結果	30
3-1	<i>Dmy-FLAG</i> Tg 系統の樹立	30
3-2	<i>Dmy-FLAG</i> Tg 個体の解析	31
4	考察	33
4-1	<i>Dmy-FLAG</i> は本来の <i>Dmy</i> と同様に生殖腺の精巣分化を決定づける	33
4-2	<i>Dmy-FLAG</i> の <i>in vivo</i> での特異的検出	33
4-3	<i>Dmy-FLAG</i> Tg 系統の有用性	34
第3章	総合考察	36
	要旨	39
	謝辞	42
	引用文献	43
	図表	53

略語一覧

略語	正式名称
Amh	Anti-Müllerian hormone
Amhr	Amh receptor
Amhy	Y chromosome-specific amh
BAC	Bacterial artificial chromosome
Cas9	CRISPR-associated 9
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
Cyp19a	Cytochrome P450, family 19, subfamily A
DAB	3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩
Dmrt1	Doublesex and mab-3-related transcription factor 1
Dmy	DM-domain related gene on Y chromosome
Dmy-FLAG	FLAG タグ融合 Dmy
DM ドメイン	Doublesex and mab-3 domain
Foxl2	Forkhead box 12
GFP	Green fluorescent protein
Gsdf	Gonadal soma-derived factor
Gsdf ^Y	Gonadal soma-derived growth factor on the Y chromosome
HRM	High resolution melting
mab-3	male abnormal-3
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RFP	Red fluorescent protein
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SdY	Sexually dimorphic on the Y chromosome
Sox3 ^Y	SRY-related High Mobility Group-box on the Y chromosome
SRY/Sry	Sex-determining region Y
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
Tg	Transgenic
TGF- β	Transforming growth factor β
UTR	Untranslated region

ZFN	Zinc Finger Nuclease
-----	----------------------

緒言

水産養殖魚の中には、雌雄で商品価値の異なる魚種が数多く存在する。トラフグでは、成熟した精巢（白子）は非常に高価であり、一方で、卵巣は神経毒であるテトロドトキシンを蓄積するため、食する事はできない。従って、雄の価値は雌よりも高い。チョウザメでは、雌の卵は「キャビア」として非常に高価であり、雌のみに高い価値がある。また、高級魚として知られるクエなどの一部のハタ科の魚種は完全養殖の確立を望まれているが、雌性先熟であるために雄親魚の獲得までに時間を要することが完全養殖の障壁となっている。これらの魚種では、人為的に性を統御する技術の開発が強く望まれている。魚類は性の可塑性が大きく、多くの魚種では性ステロイドホルモン処理などにより性転換を誘導することが可能である。しかしながら、これらの性転換の分子メカニズムは不明である。また、性ステロイドホルモンはヒトや水圏環境に存在する様々な生物の体内でも活性を有するため、食や環境に対する悪影響が懸念されており、養殖環境下での使用は忌避されている。

発生初期の個体は、精巢にも卵巣にも分化する事ができる未分化生殖腺を有している。個体の性はこの未分化生殖腺が精巢に分化するか、卵巣に分化するかにより決定される。未分化生殖腺の分化方向の決定づけは性決定と呼ばれている。性決定以降、未分化生殖腺では、精巢分化に重要な遺伝子や卵巣分化に重要な遺伝子をそれぞれ発現し、精巢・卵巣を構築する。分化した生殖腺内では性ホルモンが合成され、この性ホルモンの影響により、脳の性差や二次性徴などが構築され、個体の性が確立される。性決定以降、個体の性が確立されるまでの一連の過程は性分化と呼ばれている。

性決定は大きく 2 つの様式に分類することができる。1 つ目は遺伝性決定である。遺伝

性決定では、雌雄間で染色体構成が異なり、染色体の組み合わせにより性が決定される。性決定を司る性染色体には性決定遺伝子が座乗しており、性決定遺伝子の有無あるいは量で性が決定される。魚類では、現在、6種類の性決定遺伝子の候補が同定されている (Matsuda et al., 2002; Myosho et al., 2012; Hattori et al., 2012; Yano et al., 2012; Kamiya et al., 2012; Takehana et al., 2014; Li et al., 2015)。2つ目の性決定様式は環境性決定である。環境性決定では、性決定時期の外部環境の影響を受け、性が決定される。環境性決定では、多くの爬虫類の温度依存性決定が知られている (Janzen and Paukstis, 1991)。魚類においても、ペヘレイという魚種が温度依存性決定を行うと報告されている (Strüssmann et al., 1997)。加えて、*Cichlasoma citrinellum* の社会要因による性決定 (Francis and Barlow, 1993) などが知られている。このように、魚類の性決定様式は非常に多様である。性決定様式が多様である一方で、魚類の生殖腺初期分化の分子機構は広く保存されていると考えられている。例えば、メダカの生殖腺分化期に XX 個体特異的に高発現する *Foxl2* や *Cyp19a* は生殖腺分化期のナイルティラピアでも XX 個体特異的な高発現を示す (Ijiri et al., 2008)。同様に、メダカの精巣分化に重要な *Dmrt1* の XY 個体特異的な発現パターンは、ナイルティラピアでも保存されている (Kobayashi et al., 2008)。このように、生殖腺分化時期に発現する遺伝子はほとんど共通しており、性分化の分子機構は高く保存されていると考えられる。実際に、*Dmrt1* はシベリアチョウザメやカラシン科の *Astyanax altiparanae* においても精巣特異的な発現を示すことや (Berbejillo et al., 2013; Adolphi et al., 2015)、*Foxl2* はカムルチーの生殖腺分化時期の卵巣で高く発現することが報告されている (Wang et al., 2015)。

遺伝性決定を行う魚種でも、外的要因の影響により性転換を起こす場合がある。メダカでは、XX の受精卵を男性ホルモンの 1 種であるメチルテストステロンで処理すると、機能

的な精巣を有する雄へと性転換する(Yamamoto, 1958). 反対に, XY の受精卵を女性ホルモンの 1 種であるエストラジオール-17 β で処理すると, 機能的な卵巣を有する雌へと性転換する(Yamamoto, 1965). また, XX の受精卵を 32°C の高水温下で飼育することで, 同様に雄へと性転換させる事ができる(Sato et al., 2005; Hattori et al., 2007). このような高水温処理による性転換にはストレスホルモンの 1 種であるコルチゾールが関与する(Hayashi et al., 2010). 実際に, XX の受精卵をコルチゾールで処理すると, 雄への性転換を誘導することができる. このような環境依存性転換は, 環境性決定の分子機構を解明するモデルとして有用であると期待されている.

これまでに, 魚類の性決定遺伝子の候補として, 6 つの遺伝子が同定されている. メダカの *Dmy* は, Y 染色体特異的な性決定遺伝子として 2002 年に同定された(Matsuda et al., 2002). *Dmy* は *Dmrt1* の重複・転座により生じたと考えられている(Kondo et al., 2006). *Dmy* の発見以降, 様々な魚種で *Dmy* オーソログの単離が試みられてきたが, *Dmy* はメダカとメダカの近縁種であるハイナンメダカのみには存在しなかった(Matsuda et al., 2003). 2012 年には, パタゴニアペヘレイ, トラフグ, ルソンメダカ, ニジマスの性決定遺伝子の候補が同定された. パタゴニアペヘレイでは, *Amh* のホモログである *amhy* が性決定遺伝子の候補として同定されている(Hattori et al., 2012). *Amh* は哺乳類の卵巣構造であるミュラー管の形成を抑制し, 精巣構造であるウォルフ管の形成を促す因子である(Behringer, 1994). また, トラフグの性決定遺伝子として考えられている *Amhr2* は *Amh* の受容体である *Amhr* のホモログである(Kamiya et al., 2012). ルソンメダカでは, *Gsdf^f* が性決定遺伝子の候補として同定されている(Myosho et al., 2012). また, ニジマスで性決定遺伝子として同定された *sdY* はアミノ酸配列の C 末端領域でインターフェロン調節因子 9 と高い相同性を示している(Yano et al., 2012). 2014 年には, インドメダカの性決定遺伝子 *Sox3Y*

が同定されている (Takehana et al., 2014). 2015 年には, *amhy* がナイルティラピアの性決定遺伝子の候補として報告されている (Li et al., 2015).

性決定・性分化の研究を進める上で, 個体の遺伝的性を判別できることが望まれる. すなわち, 性決定遺伝子が既に同定されている種をモデルに用いることが望ましい. 前述の性決定遺伝子が同定されている種の中で, これまでに, メダカが性決定・性分化研究に用いられてきた. メダカ (本稿ではミナミメダカ *Oryzias latipes* とキタノメダカ *O. sakaizumii* の 2 種を総称してメダカと呼ぶ) は, 飼育が容易なことや, 世代時間が短いこと, 毎日産卵し大量の個体数を確保できるなどの利点から, 分子遺伝学的なモデル生物として用いられてきた. メダカでは, 複数の近交系の樹立や, 2007 年にはゲノム解読も完了している (Kasahara et al., 2007).

メダカの胚は, 27°C 飼育下では受精後約 8 日で孵化し, 受精から孵化までの胚発生は 39 のステージに区分されている (Iwamatsu, 2004). メダカの性決定・性分化はステージ 36 (孵化約 3 日前) の *Dmy* の XY 特異的な発現により開始される (Kobayashi et al., 2004). メダカの性分化において最初に観察される雌雄間の差異は, ステージ 38 以降の生殖細胞の動態にみられる (Kobayashi et al., 2004). メダカの生殖細胞の分裂様式には, 2 つの型が存在する (Saito et al., 2007). 1 つ目は, 緩やかに体細胞分裂を行う I 型である. 2 つ目は, 2~4 段階の連続した細胞分裂であり, 4 個, 8 個あるいは 16 個の生殖細胞のシストを形成する II 型である. II 型の細胞分裂の後, 生殖細胞は減数分裂に入る. ステージ 37 までは, XX 個体, XY 個体の生殖細胞ともに I 型の細胞分裂のみを行い, 緩やかに増殖する. ステージ 38 以降に XX 個体の一部の生殖細胞は II 型の細胞分裂に入るが, XY 個体の生殖細胞では孵化 20 日後以降まで II 型の細胞分裂は抑制されている. この結果, ステージ 38 以降に, XX 個体の生殖細胞数は XY 個体の生殖細胞数よりも多くなり, 孵化 1 日後以降には, XX 個

体の生殖腺のみで減数分裂細胞を観察できるようになる。孵化 30 日後ごろになると、生殖腺の構造に雌雄差が観察できる。XX 個体では、生殖腺の背側に卵巣腔が形成され、XY 個体では、生殖腺の中心部に体細胞が密集し、やがて輸精管を形成する (Kobayashi et al., 2004)。

メダカの生殖腺初期分化では、*Dmy*, *Gsdf*, *Dmrt1* の 3 つの遺伝子の発現が、XY 個体特異的に上昇する。従って、これらの 3 遺伝子は未分化生殖腺の精巣分化に特に重要な遺伝子であると考えられている。*Dmy* は孵化 3 日前であるステージ 36 に mRNA レベルで XY 特異的に発現を検出できる (Kobayashi et al., 2004)。その後、ステージ 37 には、*Gsdf* の発現が XY 個体特異的に上昇する (Shibata et al., 2010)。*Dmrt1* が XY 個体特異的に発現するのは孵化 11 日後以降である (Kobayashi et al., 2004)。これらの遺伝子は、いずれも、生殖細胞を取り囲む体細胞で発現することが報告されている。

Dmy は Y 染色体特異的な遺伝子であり、メダカの雄を決定する性決定遺伝子として同定された (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002)。XY 個体の *Dmy* の機能不全は、未分化生殖腺の卵巣分化を引き起こすことや (Paul-Prasanth et al., 2006; Matsuda et al., 2002)、XX 個体に *Dmy* を遺伝子導入すると、精巣を有する雄へと性転換することが報告されている (Matsuda et al., 2007; Otake et al., 2010)。*Dmy* 発現後、XY 個体の生殖腺特異的に *Gsdf* や *Dmrt1* の発現が上昇することから、*Dmy* の下流のシグナルが *Gsdf* や *Dmrt1* の発現を制御していると考えられるが、その分子機構は明らかになっていない。また、*Dmy* 発現後、XY 生殖腺の生殖細胞における II 型の細胞分裂抑制の分子機構も不明である (図. 0-1)。*Dmy* は DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを含んでいるため (Matsuda et al., 2002)、転写因子であると考えられている。しかしながら、*Dmy* に対して特異的かつ強力に結合する抗体を作製できていないことが障壁となっており、*Dmy* の転写因子としての機能

は未だに解明されていない。

*Gsdf*はTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子であり、ニジマスで最初に発見された(Sawatari et al., 2007)。*Gsdf*のホモログは多くの魚種で報告されており、*Gsdf*は魚類（四肢動物を除く硬骨魚類）に特異的な遺伝子であると考えられている。メダカでは、ステージ37以降に、XY個体の生殖腺特異的に*Gsdf*の発現がmRNAレベルで上昇する(Saito et al., 2007)。この時期の*Gsdf*の発現は生殖細胞を取り囲む体細胞で見られ、*Dmy*の発現領域と一致することが報告されている。さらに、ステージ38から雌雄の生殖腺形態に差異が現れるため(Kobayashi et al., 2004)、*Gsdf*は生殖腺の初期分化に関与すると考えられている。しかしながら、*Gsdf*が生殖腺初期分化にどのような機能を担っているかについては未解明である。

*Dmrt1*は、脊椎動物内で広く保存されている遺伝子であり、精巣分化に重要な遺伝子であると考えられている。メダカでは、孵化11日後以降にXY個体特異的にmRNAを検出できる(Kobayashi et al., 2004)。*Dmrt1*は*Dmy*との相同性がDNA配列レベルで93%と非常に高く、*in situ* hybridization法により*Dmrt1*の局在のみを観察することは困難である。成魚の精巣における*Dmy*と*Dmrt1*のmRNAの共染では、精巣内の体細胞にシグナルが検出される(Otake et al., 2008)。また、性転換XX雄の精巣では、*Dmrt1*は生殖細胞を取り囲む体細胞で発現することが報告されている(Otake et al., 2008)。従って、*Dmrt1*は精巣内の生殖細胞を取り囲む体細胞で発現すると考えられている。また、性分化における*Dmrt1*の機能は、*Dmrt1*欠損メダカの解析により解明されている(Masuyama et al., 2012)。すなわち、*Dmrt1*欠損XYメダカの生殖腺は、孵化5日後までは正常な精巣分化を辿るが、孵化10日後以降から生殖細胞のII型の細胞分裂及び卵母細胞が観察され、最終的に機能的な卵巣へと分化する。従って、*Dmrt1*は孵化5日後以降のXYメダカの精巣分化に重要であるこ

とが明らかになっている。

本研究では、産業有用魚種の性統御法開発に向けた基礎研究として、メダカの未分化生殖腺の精巣分化初期の分子機構の解明を目指すこととした。特に、精巣分化に重要な2つの機能未知遺伝子 *Dmy* と *Gsdf* に焦点を当てた。第1章では、性決定直後のXY個体の生殖腺特異的に発現する機能未知遺伝子 *Gsdf* の遺伝子欠損メダカを作製し、*Gsdf* の機能解析を行った。第2章では、*Dmy* タンパク質の機能を解析するために、FLAGタグ融合 *Dmy* 遺伝子導入メダカを樹立し、*Dmy* タンパク質の特異的検出を試みた。

第1章 *Gsdf*欠損メダカの解析

1 序論

Gsdf は TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子であり, 2007 年にニジマスで発見された (Sawatari et al., 2007). その後, 多くの魚種で *Gsdf* の存在が報告されているが, その他の脊椎動物 (四肢動物) では *Gsdf* は発見されておらず, 魚類特異的な遺伝子であると考えられている. 近年, 脊椎動物の進化の基部に位置するシーラカンスの一種 *Latimeria menadoensis* が *Gsdf* を有すると報告された (Forconi et al., 2013). これらの報告は, *Gsdf* が脊椎動物の進化の基部で生じ, その後, 四肢動物の進化に伴い消失したことを示唆している.

ニジマスでは, *Gsdf* が胚発生時期の始原生殖細胞を取り囲む体細胞で発現する (Sawatari et al., 2007). また, 成魚の生殖腺のセルトリ細胞・顆粒膜細胞で発現し, 始原生殖細胞や精原細胞の増殖に重要な役割を果たすことが報告されている. ニジマスやギンザケ, メダカ属の2種, ゼブラフィッシュのような多くの魚種で, *Gsdf* の発現は生殖腺特異的である (Luckenbach et al., 2008; Shibata et al., 2010; Gautier et al., 2011). メダカでは, 性分化初期の *Dmy* 発現直後の XY 個体の生殖腺で, *Gsdf* の発現が特異的に上昇する (Shibata et al., 2010). 雄性先熟を行うキチヌでは, 性分化期の卵精巣内の精巣領域の体細胞で, *Gsdf* が高く発現する (Chen et al., 2015). また, メダカの近縁種であるルソンメダカでは, *Gsdf* のホモログが性染色体上の性決定遺伝子の候補として同定されている (Myosho et al., 2012). 実際に, Y 染色体型の *Gsdf* を導入した XX のルソンメダカは雄へと発達する. これらの報告は, *Gsdf* が精巣分化に重要な機能を担っており, その機能は魚

類の中で広く保存されていることを示唆している。

メダカの性決定遺伝子 *Dmy* は DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを持つが、その標的遺伝子は不明である。また、性分化期の XY 個体では、*Dmy* 発現の直後に *Dmy* 発現細胞と同じ細胞集団で *Gsdf* の発現が上昇する (Shibata et al., 2010)。さらに *Gsdf* 発現の直後から、雌雄間の最初の性差である、生殖細胞数の性差が観察される。すなわち、XX 個体の生殖細胞は活発に増殖し (II 型の細胞分裂)、その後減数分裂を開始するのに対し、XY 個体では、この時期の生殖細胞の増殖・減数分裂は抑制されている。進化の過程で *Dmy* を消失したルソンメダカでは、Y 染色体上の *Gsdf^f* が特異的に発現上昇することで、XY 個体は雄への分化を開始する (Myosho et al., 2012)。加えて、メダカ XX 個体への *Gsdf^f* の遺伝子導入は、雄への性転換を引き起こす。これらの報告は、*Dmy* の標的遺伝子のひとつは *Gsdf* であり、*Gsdf* は未分化生殖腺の精巣分化に重要な役割を担っていることを示唆している。

遺伝子の機能を解析する方法としては、順遺伝学的解析と逆遺伝学的解析がある。順遺伝学的解析は、個体の表現型から原因遺伝子を同定することで、遺伝子の機能を解析する方法である。一方で、逆遺伝学的解析は、機能未知の遺伝子の機能を解析する方法であり、目的の遺伝子の欠損変異体を作成し、表現型を観察することで遺伝子の機能を解析する方法である。近年、特定の遺伝子を破壊する手法として、ZFN や TALEN、CRISPR-Cas9 システムなどの人工制限酵素を用いる方法が開発されている (Christian et al., 2010; Porteus and Carroll, 2005; Jinek et al., 2012)。これらは、人工制限酵素を用いて、ゲノム内の標的遺伝子配列内の 2 本鎖 DNA の切断を誘導する方法である。2 本鎖切断を起こした DNA は非相同末端連結により修復されるが、その時に一定の確率で変異が導入される。

TALEN は、植物の病原菌 *Xanthomonas* が持つ Transcription Activator-Like (TAL) effector と呼ばれる DNA 結合性タンパク質と、2 量体形成時に 2 本鎖 DNA 切断活性を示す

Fok I のヌクレアーゼドメインとを融合させたタンパク質である。TALEN の標的配列を、変異を導入したい DNA の近傍に向かい合わせに設計することで、*Fok I* が 2 量体を形成し、標的の DNA を切断する。TALEN を用いた遺伝子破壊システムがメダカ生体内で機能することは、既に報告されている (Ansai et al., 2013)。

本章では、TALEN を用いて *Gsdf* 欠損メダカを作出し、*Gsdf* 欠損メダカの表現型を組織学的に観察することで、*Gsdf* の性分化における機能を解析した。さらに、*Gsdf* と *Dmrt1* との関連性を検討するために、*Gsdf* と *Dmrt1* の二重欠損変異体の生殖腺を組織学的に観察した。

2 材料および方法

2-1 研究に用いたメダカ系統とメダカの飼育

本研究では、ミナミメダカ由来の近交系、Hd-rR 系統を用いた。近交系とは兄妹交配を 20 世代以上繰り返すことで、遺伝的な背景を均一化した系統である。Hd-rR 系統は、1984 年に田口泰子氏によって樹立された。この系統では、Y 染色体上に体色の緋色を決定する優性の遺伝子 *R* が存在するため、 X^rY^R 個体の体色は緋色、 X^rX^r 個体の体色は白色となる。このため、体色により性染色体の組み合わせを判断することが出来る。また、BAC (バクテリア人工染色体) ゲノムライブラリーの作製や、全ゲノム塩基配列の決定に用いられたのもこの系統である。メダカの飼育は 26°C・明期 14 時間/暗期 10 時間条件下で行った。メダカはマウスケージ内を用いて止水環境で飼育し、必要に応じて換水・部分換水を行った。給餌は、一日数回、おとひめ (日清丸紅飼料社) を適量与えた。*Gsdf* と *Dmrt1* の二重欠損変異体の表現型観察には、*Dmrt1*^{C53R} 変異体を用いた。*Dmrt1*^{C53R} 変異体は、*Dmrt1* のアミノ酸配列内の 53 番目のシステイン残基がアルギニン残基に置換するような点変異を有する

Dmrt1 欠損メダカ系統であり, 2012 年に Masuyama らにより作出された (Masuyama et al., 2012).

2-2 TALEN の設計

本研究では, ZiFiT Targeter (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/Disclaimer.aspx>) を用いて *Gsdf* 開始コドンの直後を標的とするような TALEN を設計した (図. 1-1). REAL (Restriction Enzyme And Ligation) アセンブリ法により, *Gsdf* 内に 2 組の TALEN 標的部位を設計した. 1 組目の TALEN の標的部位は, 18 bp の TALEN-L 結合部位 (5' TCC ACC ATG TCT TTG GCA-3'), 16 bp のスペーサーと 18 bp の TALEN-R 結合部位 (5' -TTG AAG AGC CAA GAA GCA-3') を, 2 組目の TALEN の標的部位は, 18 bp の TALEN-L 結合部位 (5' -TGT CTT TGG CAC TCA TTG-3'), 16 bp のスペーサーと 18 bp の TALEN-R 結合部位 (5' -TAA CCA TTG AAG AGC CAA-3') を含む.

2-3 RNA の合成と顕微注入

AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Marker Kit (CELLSCRIPT™) を用いて, 5' キャップを付加したそれぞれの TALEN の mRNA を *in vitro* 転写した. また, mRNA の顕微注入が成功したかどうかを示す指標として, *GFP* に *nanos* 遺伝子の 3' 非翻訳領域を繋いだ mRNA を転写した. すなわち, 注入した mRNA が生殖細胞内でタンパク質に翻訳されている個体は, 生殖細胞で GFP を発現する. *GFP* mRNA を 25ng/ μ l, TALEN mRNA を 100ng/ μ l となるように混合し, 1 細胞期のメダカの受精卵に顕微注入した. 顕微注入した胚 (F_0) のうち, 生殖腺内で GFP 蛍光を発する個体を選抜し, 次世代 (F_1) を得るために野生型個体と掛け合わせた.

2-4 変異体のスクリーニング

TALEN 標的部位に変異を持つ個体をスクリーニングするために, HRM 解析を行った. HRM は PCR 産物の中の DNA 配列の多型を検出する方法である. GFP を生殖腺領域に発現する孵化直後の F₀ 胚の DNA を抽出した. 1 組目の TALEN を顕微注入した合計 40 個体の胚と, 2 組目の TALEN を顕微注入した合計 32 個体の胚を解析した. DNA の抽出は, 第 1 章と同様の方法で行った. 0.5 μ l の DNA を鋳型に EmeraldAmp MAX Master Mix (TaKaRa) を用いて *Gsdf* の TALEN 標的領域を PCR 増幅した (1st PCR). GSDF.6f (5' -TAC CAA GCG CAG CAT CAG TCT C-3') 及び GSDF.17r (5' -ACA AGG CAA GTG AGA TCA TCA CAA TC-3') のプライマーセットを用いて, 95°C で 5 分保温後, 96°C 20 秒, 55°C 20 秒, 72°C 30 秒を 30 サイクル繰り返し, 72°C で 5 分間保温の条件で PCR 反応を行った. PCR 産物を滅菌水で 20 倍希釈し, 希釈された PCR 産物 0.5 μ l を鋳型に, Hot-Start Gene *Taq* NT (Nippon Gene) 及び 0.5 nM SYTO[®]9 (Life Technologies), 1st PCR と同じプライマーセットを用いて 2nd PCR-HRM を行った. PCR-HRM 解析には LightCycler[®] 480 (Roche) を用いた.

F₁ スクリーニングでは, F₁ 個体の尾鰭の一部を切り, TE/PK 溶液 (200 ng/ μ l Proteinase K, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) の中に入れた. その後, 65°C で 30 分間保温して溶解したのち, 95°C で 15 分間処理することで PK を不活性化した. PCR と HRM の条件は, 上述の F₀ スクリーニングと同様である.

2-5 遺伝子型判定

尾鰭の一部を切り, TE/PK 溶液に入れ, 65°C で 1 時間溶解した. この溶解液を PCR 増幅の鋳型として使用した.

それぞれの個体の遺伝的性は *Dmrt1* と *Dmy* に共通するプライマーセット, PG17.5 (5' -CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG-3') および PG17.6 (5' -GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA-3'), を用いた PCR により判別した. PCR は EmeraldAmp MAX Master Mix を用いて, 95°C で 5 分保温後, 96°C 20 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒を 30 サイクル繰り返し, 72°C で 5 分間保温の条件で行った.

Gsdf の野生型と変異型の判別は, *Gsdf* を特異的に増幅するプライマーセット (GSDF. 6f および GSDF. 17r) を用いた PCR により行った. PCR の条件は上述のスクリーニングと同様である. 増幅した PCR 産物は, MultiNA 自動電気泳動システム (SHIMADZU) を用いて解析した.

Dmrt1 の野生型と変異型の判別は, PCR-HRM 解析により行った. *Dmrt1* を特異的に増幅するプライマーセット, DM29s (5' -CTG TAC AAG TGA CCC CGC CT-3') および DM30r (5' -GCG GTG TTT TGT TTC GGT G-3'), を用いて 1st PCR を行った. 1st PCR の条件は, *Gsdf* の遺伝子型判別と同じ条件である. 1st PCR 産物を滅菌水で 20 倍に希釈し, 希釈された PCR 産物 0.5 μ l を 2nd PCR-HRM の鋳型として用いた. 2nd PCR-HRM は, DM48s (5' -GAA CCA CGG CTT CGT GTC T-3') および DM49r (5' -CTC TCT GGC GCT CCG C-3') のプライマーセットにより, Hot-Start Gene Taq NT および 0.5 nM SYTO[®]9 を用いて, 1st PCR と同条件で増幅した後, HRM 解析した. 2nd PCR-HRM には LightCycler[®] 480 を用いた.

2-6 組織学的解析

Gsdf 欠損メダカの生殖腺初期分化の動態を観察するために, ステージ 37 (孵化 2 日前), ステージ 38 (孵化 1 日前), ステージ 39 (孵化 0 日後), 孵化 5 日後, 孵化 30 日後の個体の生殖腺を組織学的に観察した. それぞれの個体の尾鰭の一部を切り, 遺伝子型を判定し,

残りの体はブアン氏液（飽和ピクリン酸 15：ホルマリン 5：酢酸 1）に浸し，室温で 2 時間固定した．固定後，エタノール系列を用いて脱水，レモゾールへの置換の後，パラフィンに包埋した．その後，マイクロトームを用いて厚さ 5 μ m に薄切し，ヘマトキシリン-エオシン染色を施した．ステージ 37，ステージ 38，孵化 0 日後，孵化 5 日後の個体では，生殖腺領域に存在する全ての生殖細胞数を計測した．生殖細胞数の有意検定は t 検定により行った．

3 結果

3-1 *Gsdf* 欠損メダカの作出

メダカの *Gsdf* は 5 つのエクソンから成り，216 残基のアミノ酸をコードしている（図. 1-1）．本研究では，*Gsdf* の開始コドン直後を標的とする 2 組の TALEN を設計した．それぞれのペアの TALEN をコードする mRNA を *GFP-nanos* の mRNA とともにミナミメダカ近交系の 1 細胞期の受精卵に顕微注入し，生殖細胞で GFP 蛍光を発する個体を選抜した．HRM による F_0 スクリーニングの結果，1 組目の TALEN を顕微注入した F_0 世代 40 個体からは，融解曲線のシフトは見られなかった．一方で，2 組目の TALEN（図. 1-1）では，解析した 32 個体の全てで，融解曲線のシフトが観察された．このため，2 組目の TALEN を顕微注入した 15 個体の F_0 を成魚まで飼育した．その後，これら F_0 個体を野生型個体とそれぞれ交配することで F_1 個体を得た．15 個体の F_0 から得られた，合計 614 個体の F_1 について，HRM による変異のスクリーニングを行った．15 個体の F_0 個体のうち，2 個体から得られた F_1 では，融解曲線のシフトが観察されなかった．また，残りの 13 個体の F_0 から得られた合計 170 個体の F_1 で融解曲線のシフトが見られた．それぞれの F_0 個体における変異の頻度は，0% から 100%

であった (表. 1-1). 融解曲線のシフトが見られた F₁ 個体の *Gsdf* の塩基配列を決定した結果, 33 種類の変異が検出された (表. 1-2). これらの変異は, 1 bp から 28 bp の挿入・欠損変異を含んでいた.

表現型の観察のために, #11 (14 bp の欠損) および #31 (19 bp の欠損) の 2 つの異なる変異を持つ系統を用いた. これらの系統では, フレームシフトにより不完全な *Gsdf* タンパク質が発現していると予想される (図. 1-2).

3-2 *Gsdf* 欠損メダカの生殖腺初期分化

変異体の表現型を観察するために, *Gsdf* の変異をヘテロに持つ個体の雌雄を掛けあわせた. 従って, 次世代では, 野生型の個体 (*Gsdf*^{+/+}), 変異をヘテロに持つ個体 (*Gsdf*^{+/-}), 変異をホモに持つ個体 (*Gsdf*^{-/-}) を得られる. 本研究では, ステージ 37, ステージ 38, ステージ 39 (孵化 0 日後), 孵化 5 日後の 4 つの発達段階で, 合計 591 個体を採集した. 採集した 591 個体の *Gsdf* の遺伝子型を判別したところ, 3 つの遺伝子型の出現頻度は χ^2 分布に従っており, メンデルの分離比の理論値と適合していた (自由度=5, $\chi^2 \doteq 2.9560$). また, XX と XY の割合もおおよそ 1:1 になっており, χ^2 検定の結果, 理論値と適合していた (自由度=1, $\chi^2 \doteq 0.0423$; 表. 1-3).

Gsdf 欠損メダカの生殖腺初期分化を観察するために, ステージ 37, ステージ 38, ステージ 39 (孵化 0 日後), 孵化 5 日後の個体の生殖腺の組織切片を作製し, 生殖細胞の発達段階を観察した. 加えて, 生殖腺領域の組織切片から, それぞれの個体が持つ全生殖細胞数を計測した (図. 1-3). ステージ 37 では, それぞれの遺伝子型の生殖細胞数に有意な差は見られなかった. ステージ 39 および孵化 5 日後では, XX *Gsdf*^{+/+}, XX *Gsdf*^{+/-}, XX *Gsdf*^{-/-}, XY *Gsdf*^{-/-} の生殖細胞数が, XY *Gsdf*^{+/+}, XY *Gsdf*^{+/-} よりも有意に高い値となった (P <

0.01). また、孵化 5 日後では、全ての XX *Gsdf*^{+/+}, XX *Gsdf*^{+/-}, XX *Gsdf*^{-/-}, XY *Gsdf*^{-/-} 個体の生殖腺内に、減数分裂を開始した卵母細胞が観察された (図. 1-4 B~D). 一方で、XY *Gsdf*^{+/+}, XY *Gsdf*^{+/-} 個体の生殖腺内には、このような卵母細胞は観察されなかった (図. 2-4 A).

Gsdf 欠損変異体の生殖腺分化後期の生殖腺発達を観察するために、生殖腺内の体細胞が精巣・卵巣構造を形成している孵化 30 日後において、生殖腺の組織学的観察を行った. XY *Gsdf*^{+/+} (n = 3) では、生殖腺内に増殖した生殖原細胞や、生殖腺中心部に輸精管原基が観察され (精巣型)、精巣へと分化していた (図. 1-4 E). 一方、XX *Gsdf*^{+/+} (n = 3) では、多数の卵母細胞や、生殖腺の背側に卵巣腔が形成されており、卵巣へと分化していた (図. 1-4 F). XX *Gsdf*^{+/-} (n = 3; データ未記載) と XX *Gsdf*^{-/-} (n = 3; 図. 1-4 G) では、生殖腺内に多数の卵母細胞を含んでおり、卵巣へと分化していた. XY *Gsdf*^{+/-} (n = 3) の生殖腺は精巣型であり (データ未記載), XY *Gsdf*^{-/-} (n = 7) の生殖腺は卵巣型 (n = 2; 図. 1-4 H) と精巣型 (n = 5; 図. 1-4 I) の 2 つの表現型に分かれていた.

加えて、尻鰭と背鰭の二次性徴から成魚の性比を算出した (表. 1-4). *Gsdf* の遺伝子型に関わらず、すべての XX 個体は雌型の鰭の形状を示していた (図. 1-4 K, N). *Gsdf*^{+/+} (図. 1-4 J) と *Gsdf*^{+/-} の XY 個体はすべての個体が雄の二次性徴を示していた. しかしながら、40 個体の XY *Gsdf*^{-/-} 個体のうち 26 個体は雄へ (図. 1-4 M), 14 個体は雌へと発達していた (図. 1-4 L).

3-3 *Gsdf* と *Dmrt1* 二重欠損変異体の解析

Gsdf と *Dmrt1* の二重欠損変異体の表現型を観察するために、*Gsdf* の変異をヘテロに持つ雄を、*Dmrt1* の変異をホモに持つ XX 雌個体と掛けあわせた. その後、得られた次世代の

うち *Gsdf* と *Dmrt1* との両方がヘテロである個体の雌雄を掛けあわせ、得られた稚魚の生殖腺分化を孵化 5 日後のステージで解析した。野生型の XY 個体の生殖腺では生殖原細胞のみが観察され（精巢型）、一方で、野生型 XX 個体の生殖腺では、減数分裂を開始した卵母細胞が観察された（卵巢型）。XX 個体の生殖腺は、*Gsdf*、*Dmrt1* の遺伝子型に関わらず、卵巢型を示した。野生型の XY 個体や、ほとんどの *Dmrt1* 欠損 XY 個体は精巢型を示したが、*Gsdf* 欠損 XY 個体および、2 重欠損変異 XY 個体は卵巢型を示した（図. 1-5; 表. 1-5）。

4 考察

4-1 *Gsdf* は未分化生殖腺の精巢分化に重要な遺伝子である

本研究では、TALEN を用いた遺伝子破壊により、*Gsdf* コード領域内に変異を持つ複数の個体を得ることが出来た。このうち、表現型の解析に用いた 2 系統では、*Gsdf* の開始コードンの直後からフレームシフトが生じ、*Gsdf* の機能は完全に失われていると予想された。性分化初期のメダカでは、XX 個体の生殖腺特異的に II 型の細胞分裂や減数分裂が観察される。一方で、この時期の XY 個体の生殖腺では、生殖細胞の増殖や減数分裂は抑制されている。このような性差は、雌雄間で見られる最初の形態的な差異である。本研究の結果、孵化 5 日後の *Gsdf* 欠損 XY 個体の生殖腺は卵巢型に発達していた。この結果は、*Gsdf* が、初期精巢分化に重要な役割を担っていることを示している。*Gsdf* の mRNA 発現は、生殖細胞を取り囲む体細胞でのみ観察されることが報告されている (Shibata et al., 2010)。また、この時期の雌雄の生殖腺の形態的な差異は生殖細胞のみで見られる (Kobayashi et al., 2004)。従って、*Gsdf* は生殖細胞の増殖や減数分裂を抑制することで、生殖細胞の発達を制御し、未分化生殖腺の精巢分化を誘導していると考えられた。また、*Gsdf* は成熟した XX

個体の卵巣内の、前卵黄形成濾胞で弱く発現することが報告されている (Kobayashi et al., 2004). XX 個体における *Gsdf* の mRNA 発現は孵化前から検出できる. しかしながら, 孵化 5 日後において *Gsdf* 欠損 XX 個体, *Gsdf* の変異をヘテロに持つ XX 個体ともに, 顕著な表現型は観察されず, 生殖腺分化は正常であるようにみえた.

4-2 *Gsdf* は後期の精巣発達に必須ではない

孵化 5 日後の *Gsdf* 欠損 XY 個体の生殖腺は, 解析したすべての個体 (n = 11) で卵巣型を示していたにも関わらず, 孵化 30 日後以降の *Gsdf* 欠損 XY 個体の約 3 分の 2 は精巣を有する雄へと分化していた. 従って, *Gsdf* 欠損 XY 個体の 3 分の 1 の個体の生殖腺は卵巣へと分化したが, 3 分の 2 の個体の生殖腺は孵化 5 日後までは卵巣へと分化し, その後精巣へと戻ったと考えられる. これらの結果は, *Gsdf* は XY 個体の初期精巣分化に重要であり, 生殖腺分化後期の精巣の維持及び発達には重要でないことを示唆している. 生殖腺分化後期の精巣の維持・発達には, *Gsdf* 以外の別の因子が重要であり, *Dmy* 発現後, *Gsdf* を介さずにその因子を活性化させる制御機構が存在すると考えられた.

4-3 *Dmrt1* は *Gsdf* よりも後に機能する

雌雄異体の魚種のみではなく, 性転換を行う雌雄同体の魚種においても, *Gsdf* 発現パターンと *Dmrt1* 発現パターンは相関している (Horiguchi et al., 2013). *Dmrt1* 欠損メダカでは全ての XY 個体の生殖腺は卵巣へと分化する (Masuyama et al., 2012). しかし, *Dmrt1* 欠損 XY 個体の性転換のパターンは, *Gsdf* 欠損 XY 個体の性転換とは異なる. *Dmrt1* 欠損 XY 個体の生殖腺は, 孵化 0 日後, 孵化 5 日後では卵母細胞を含まず精巣型である. しかし, 孵化 10 日後には, すべての個体の生殖腺内に卵母細胞が見られ, 卵巣型へと転換する. 一

方で、*Gsdf* 欠損 XY 個体の生殖腺は、性分化初期（孵化 0 日後，孵化 5 日後）から卵巢へと分化している。*Gsdf* と *Dmrt1* の 2 重欠損 XY 個体の生殖腺は、性分化初期から卵巢へと分化しており、この結果は、*Dmrt1* が *Gsdf* よりも後に機能することを示している。従って、*Dmrt1* は精巣の維持・発達に重要であるが、*Gsdf* は精巣の維持・発達には重要ではないことが示唆された。

第2章 FLAG タグ融合 *Dmy* を発現する遺伝子導入メダカの樹立と *Dmy* の可視化

1 序論

脊椎動物の性決定遺伝子は、ヒトの *SRY* が初めての報告である (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). *SRY/Sry* は哺乳類で広く保存されている性決定遺伝子である (Wallis et al., 2008). 脊椎動物で2番目の性決定遺伝子として、メダカの性決定遺伝子 *Dmy* が同定されている (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002). *Dmy* 発見当初, *Dmy* は魚類で広く保存されていると考えられていた. しかし, *Dmy* はメダカとメダカの近縁種であるハイナンメダカのみが存在する性決定遺伝子であった (Matsuda et al., 2003; Kondo et al., 2006).

Dmy は Y 染色体に存在し, 性と 100%連鎖する (Matsuda et al., 2002). メダカ XY 個体の *Dmy* の抑制は雌への分化を引き起こし, 一方で, XX 個体に *Dmy* を遺伝子導入すると雄への分化を引き起こすことが報告されている (Paul-Prasanth et al., 2006; Matsuda et al., 2007). このように, *Dmy* は精巣分化の引き金を引く性決定遺伝子である. XY 個体では, ステージ 36 以降に mRNA レベルで *Dmy* の発現を検出できる (Kobayashi et al., 2004). 性決定時期の *Dmy* の発現は生殖細胞を取り囲む体細胞でのみ検出される (Kobayashi et al., 2004). また, *Dmy* はアミノ酸配列内に DM ドメインと呼ばれる領域を含んでいる (Matsuda et al., 2002). DM ドメインは, キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の doublesex (*dsx*) タンパク質と, 線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* の male abnormal 3 (*mab-3*) タンパク質に共通する領域である (Burtis and Baker, 1989; Raymond et al., 1998; Shen and Hodgkin, 1988; Yi et al., 2000). *dsx* 遺伝子と *mab-3* 遺伝子は性分化

に関わる転写因子として同定されており、DM ドメインはこれらのタンパク質の DNA 結合ドメインである (Raymond et al., 1998). 従って、Dmy は転写因子であると考えられる. これらの報告から、Dmy は生殖細胞を取り囲む体細胞で、精巣分化に重要な遺伝子群の転写を上昇させることで、未分化生殖腺の精巣分化を導いているようにみえる.

Dmy 発現開始後に、精巣分化に重要であると考えられている *Gsdf* と *Dmrt1* の 2 遺伝子の発現が XY 個体特異的に上昇する. *Gsdf* は *Dmy* 発現の直後のステージ 37 から発現し、*Dmy* 発現細胞と同じ細胞で発現することが報告されている (Shibata et al., 2010). *Dmrt1* の mRNA 発現は *Gsdf* 発現の約 7 日後の孵化 5 日後以降に検出できる (Kobayashi et al., 2004). 従って、Dmy が生殖細胞を取り囲む体細胞で *Gsdf* や *Dmrt1* の転写を活性化させていると考えられる. しかしながら、Dmy が直接的に *Gsdf* や *Dmrt1* の発現を上昇させるという証明はなされていない.

転写因子の標的遺伝子の同定には、タンパク質-DNA 間の結合を検出するゲルシフトアッセイやクロマチン免疫沈降 (ChIP), 培養細胞内の転写の増減を検出するレポーターアッセイなどが知られている. ゲルシフトアッセイは、*in vitro* で転写・翻訳させたタンパク質と特定の配列の DNA を結合させた後に電気泳動し、タンパク質と DNA の結合を検出する方法である. ChIP は、培養細胞内あるいは生体内でのタンパク質-DNA の複合体を、タンパク質に対する抗体を用いた免疫沈降を行うことで精製し、結合している DNA の配列を同定する方法である. レポーターアッセイは、解析したいプロモーター領域とレポーター遺伝子を繋いだプラスミドを培養細胞にトランスフェクションさせ、発現されたレポータータンパク質の量から、遺伝子発現の活性を測定する方法である. メダカの生体外で Dmy を発現・機能させるゲルシフトアッセイやレポーターアッセイなどの *in vitro* の実験系では、Dmy の高次構造が正しく形成されていない恐れがある. 従って、Dmy の機能を解析するために

は、ChIP のような *in vivo* の実験系が必要不可欠である。

ChIP アッセイでは、目的のタンパク質に対して特異的かつ強力に結合する抗体が必要である。これまでに、Dmy に特異的かつ強力に結合する抗体の作製が試みられてきた。しかしながら、ChIP アッセイに使用できる抗 Dmy 抗体は、これまでに作製されていない。Dmy は、Dmy のパラログである *Dmrt1* と DNA レベルで 93% 相同であり (Kobayashi et al., 2004), Dmy に対する特異抗体を作製する上で障壁となっていた。

Dmy を XX 個体に遺伝子導入することで、精巣分化を誘導できることが既に報告されている (Matsuda et al., 2007; Otake et al., 2010)。そこで本研究では、アミノ酸配列の C 末端に 3×FLAG タグを融合した Dmy (以下、Dmy-FLAG) を発現する遺伝子導入系統 (以下、Dmy-FLAG Tg 系統) を作出した。また、Dmy-FLAG Tg 系統の性が、導入した Dmy-FLAG の働きにより決定されていることを調べるために、野生型の Dmy をゲノム中に含んでいないか、FLAG タグ配列がゲノム及び mRNA 内に保存されているか、精巣分化に異常が生じていないかを調べた。さらに、抗 FLAG 抗体を用いて Dmy-FLAG を特異的に検出できるかどうかを、免疫組織化学的手法により解析した。

2 材料および方法

2-1 研究に供試したメダカ系統とメダカの飼育

本研究では、ミナミメダカ由来の近交系、Hd-rR 系統を用いた (第 1 章参照)。飼育方法に関しては、第 1 章と同様である。

2-2 *Dmy-FLAG* Tg 系統の作出

本研究では、大竹らの報告(Otake et al., 2010)にある BAC クローン pCC1_DMYge を改変し、遺伝子導入のための組換えプラスミドを作製した(図. 2-1A). この BAC クローンは、キタノメダカ近交系 HNI 系統由来の *Dmy* (以下、*Dmy*^{HNI} と表記する) と、生殖細胞で GFP を発現させるための *vasaGFP*(図. 2-1B), 水晶体で DsRed Express を発現させる *crystallinRFP* (図. 2-1C) を含む. pCC1_DMYge の *Dmy*^{HNI} のストップコドン直前に、C 末端融合となるように 3xFLAG タグ配列を組み込んだ. FLAG タグは His タグや HA タグなどの他の一般的なタグと比較して親水性が高い. 従って、*Dmy* に付加することで *Dmy* を変性あるいは不活性化させにくいと考えられる. BAC クローンの改変には、BAC MODIFICATION KIT-Red/ET System (Epicentre Technologies) を用いた. 作製した遺伝子導入コンストラクトを、ミナミメダカ近交系 Hd-rR 系統の 1 細胞期の受精卵に顕微注入した.

2-3 外来性 *Dmy* の検出およびゲノム DNA 内、mRNA 内の FLAG 配列の検出

メダカのゲノム DNA の抽出では、メダカの一部を、Lysis Buffer (100mM EDTA, 50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl, 1% Sodium Dodecyl Sulfate, 100 μ g/ml Proteinase K) を用いて溶解した後、MagExtractor® -Genome- (TOYOBO) を用いた. PCR 解析には EmeraldAmp (TaKaRa) を用いた. 外来性 *Dmy* と内在性 *Dmy* の判別には、(5' -GAA CCA CAG CTT GAA GAC CCC GCT GA-3') と (5' -GCA TCT GCT GGT ACT GCT GGT AGT TG-3') のプライマーセットを用い、95°C で 3 分保温後、96°C 20 秒、60°C 20 秒、72°C 50 秒を 35 サイクル繰り返す、72°C で 5 分保温した. その後、増幅した DNA を制限酵素 *Stu*I (NEW ENGLAND BioLabs) を用いて消化した. ゲノム DNA 内の FLAG 配列の検出には (5' -GTC ATT AAC ACA ACG CAC AAC AAC TT-3') と (5' -TTT ATA AAG AAG AGT TTT AAA TTC AGC-3') のプライマーセットを

用い、95°Cで3分保温後、96°C 20秒、55°C 20秒、72°C 30秒を35サイクル繰り返し、72°Cで3分保温した。PCR産物をShrimp Alkaline Phosphatase (usb) と Exonuclease I (NEW ENGLAND BioLabs) によって処理した。その後、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。反応条件は、96°Cで1分保温後、96°C 1分、50°C 5秒、60°C 4分を30サイクル繰り返した。その後、Genetic analyzer 3500 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。RT-PCR解析では、成魚の精巣から全RNAを抽出後、逆転写反応により合成したcDNAを鋳型にPCR増幅した。全RNAの抽出にはRN easy Mini Kit (QIAGEN) を用いた。逆転写反応には、QuantiTect® Reverse Transcription (QIAGEN) を用いた。合成したcDNAを、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を用いてPCR増幅した。RT-PCRでは、(5' -CCT CCT ACT ACA ACT TCT ACC AGC CTT C-3') と (5' -TTT ATA AAG AAG AGT TTT AAA TTC AGC-3') のプライマーセットを用い、95°Cで3分保温後、96°C 20秒、58°C 30秒、72°C 30秒を40サイクル繰り返し、72°Cで5分保温した。

2-4 組織切片による表現型の解析

孵化0日後、孵化5日後、孵化15日後、成魚の段階の個体を導入遺伝子の有無で選別したのち、孵化0日後、孵化5日後および孵化15日後では個体全体を、成魚では生殖腺を摘出し、ブアン氏液（飽和ピクリン酸 15：ホルマリン 5：酢酸 1）を用いて室温で2時間固定した。導入遺伝子の有無は、水晶体のRFP蛍光の観察により判別した。固定後、エタノール系列を用いて脱水、レモゾールへの置換の後、パラフィンに包埋した。その後、ミクロトームを用いて厚さ5 μ mに薄切し、ヘマトキシリン-エオシン染色を施した。孵化0日後と孵化5日後の個体では、生殖腺領域に存在する全ての生殖細胞数を計測した。生殖

細胞数の有意検定は t 検定により行った。

2-5 免疫組織化学実験

免疫組織化学実験に用いる組織切片は、摘出した成魚の精巣を用いて表現型の解析を同様の手法で作製した。キシロールによる脱パラフィン、エタノール系列による加水、TBST への置換ののち、0.5% Membrane Blocking Agent (GE Healthcare) / TBST 溶液を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後、Anti-DDDDK-tag マウス IgG (Medical & Biological Laboratories) をブロッキング溶液で 2000 倍希釈したものを用いて、4°C で 12 時間の一次抗体反応を行った。二次抗体反応には、ImmPRESS REAGENT KIT PEROXIDASE Anti-MOUSE Ig (VECTOR) を用いて室温で 30 分間反応させた。その後、ImmPACT DAB Peroxidase Substrate Kit (VECTOR) を用いて室温・遮光条件下で 5 分間発色させた。DAB (3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩) はペルオキシダーゼの基質であり、ペルオキシダーゼに代謝されることで茶褐色を呈する。

3 結果

3-1 *Dmy-FLAG* Tg 系統の樹立

作製した遺伝子導入コンストラクトを Hd-rR 系統の 1 細胞期の受精卵に顕微注入した。顕微注入を行った F₀ 個体のうち、生殖細胞で GFP を発現する個体を 1 個体得た。この個体を Hd-rR 系統の野生型 XX 雌へと交配させたところ、水晶体で RFP を発現し白い体色の F₁ 個体を 6 個体得た。本研究で用いた Hd-rR 系統は、Y 染色体特異的に体色の緋色を決定する *R* が座乗するため、XY 個体の体色は緋色であり、一方で XX 個体の体色は白色になる。

従って、これらの6個体の性染色体はXXであると考えられるが、これらの個体は雄へと発達した。この6個体をA~Fとし、それぞれ野生型のXX雌と交配させ、系統化した(A系統~F系統)。現在、A系統、C系統、F系統の3系統を維持している。これらの系統は導入遺伝子をヘテロ接合で持ち、野生型のXX雌とかけ合わせることでこれらの系統を維持している(図. 2-2)。通常、Hd-rR系統のXY個体は緋色の体色であり、雄へと発達する(図. 2-3A)。Dmy-FLAG Tg 個体と野生型XX雌との交配から生じる次世代は全て白色の体色であり、水晶体でRFPを発現しない個体(野生型XX個体)は雌へ(図. 2-3B)、水晶体でRFPを発現するDmy-FLAG Tg 個体は雄へ(図. 2-3C)と発達した。

3-2 Dmy-FLAG Tg 個体の解析

3-2-1 Dmy-FLAG Tg 個体は導入したDmy-FLAGを発現する

Dmy-FLAG Tg 個体のDmyが、Hd-rR系統が本来持つDmy(以下、 Dmy^{Hd-rR} と表記する)か導入した Dmy^{HNI} かどうかを解析した。 Dmy^{Hd-rR} と Dmy^{HNI} との間の多型はPCR-RFLPにより判別することができる(Matsuda et al., 2007)。すなわち、Dmy領域をPCR増幅して制限酵素StuIで処理した時、 Dmy^{Hd-rR} のみが切断され、 Dmy^{HNI} は切断されない。Dmy-FLAG Tg 個体では、A系統、C系統、F系統のいずれの系統でも、 Dmy^{HNI} のみが検出され、 Dmy^{Hd-rR} は検出されなかった(図. 2-4A)。次に、Dmy-FLAG Tg 個体のDmy配列内に、3xFLAGタグ配列が存在するかどうかを解析した。3xFLAGタグ領域(100 bp)を含んだDmyをPCR増幅した結果、Dmy-FLAG Tg 個体のDmyは野生型のDmyと比較し、100 bpほど長いバンドとして検出された(図. 2-4B)。シーケンス解析の結果、3xFLAGタグの配列を確認した。Dmy構造の模式図と3xFLAGタグ周辺の配列を図. 2-5に示した。さらに、精巣から抽出した全RNAを鋳型にRT-PCRを行った結果、DmyのmRNA内にも3xFLAGタグ配列を確認した。(図. 2-4C)

3-2-2 *Dmy-FLAG* Tg 個体の表現型の観察

続いて、*Dmy-FLAG*が正しいタイミングで、正常な精巣分化を引き起こしているかどうかを解析した。*Dmy-FLAG*が誤ったタイミングで発現していた場合や、異なる機能によって精巣分化を導いていた場合、精巣分化過程に異常が観察されるはずである。そこで、*Dmy-FLAG* Tg 個体の生殖腺分化過程を組織学的に観察した。孵化 0 日後では、*Dmy-FLAG* Tg 個体と導入遺伝子を持たない XX 個体（以下、野生型 XX 個体）ともに減数分裂細胞は見られなかった（図. 2-6AB）。孵化 5 日後では、野生型 XX 個体の生殖細胞でのみ減数分裂が観察され、*Dmy-FLAG* Tg 個体の生殖細胞は始原生殖細胞のみであった（図. 2-6CD）。生殖細胞数を計測した結果、孵化 0 日後・孵化 5 日後共に、*Dmy-FLAG* Tg 個体の生殖細胞数は野生型 XX 個体よりも有意に少ない値となった（図. 2-7）。孵化 15 日後では、野生型 XX 個体の生殖腺内に発達した多数の卵母細胞が観察されたが（図. 2-8A）、*Dmy-FLAG* Tg 個体の生殖腺内には、卵母細胞や減数分裂細胞は観察されなかった。孵化 15 日後の *Dmy-FLAG* Tg 個体の生殖腺内には、輸精管原基の特徴であるアキナス構造が観察された（図. 2-8A）。野生型 XX 個体の生殖腺では、アキナス構造は観察されず、発達した卵母細胞が見られた（図. 2-8B）。*Dmy-FLAG* Tg 個体の成魚の生殖腺には、精原細胞、精母細胞、精細胞、精子といった精子形成における様々な段階の生殖細胞がシスト状に観察され、典型的な精巣形態を示していた（図. 2-9）。

3-2-3 *Dmy-FLAG* の特異的検出と *Dmy-FLAG* の局在

抗 FLAG 抗体を用いて、*Dmy-FLAG* を特異的に検出できるかどうかを調べるために、免疫組織化学実験を行った。その結果、*Dmy-FLAG* Tg 個体の精巣の精原細胞を取り囲むセルトリ細胞の核に、茶褐色に染色された DAB のシグナルを観察することができた（図. 2-10A）。Hd-rR 系統の XY 雄個体の精巣内では、このようなシグナルは観察されなかった（図. 2-10B）。

4 考察

4-1 Dmy-FLAG は本来の Dmy と同様に生殖腺の精巣分化を決定づける

本研究に用いたメダカ近交系 Hd-rR 系統は、Y 染色体のみに体色の緋色を決定する優性遺伝子 *R* が座乗するため、XX 個体の体色は白色、XY 個体の体色は緋色となる。Dmy-FLAG Tg 個体は、体色は白であるにも関わらず雄へと発達した。さらに、Dmy-FLAG Tg 個体の持つ Dmy を解析した結果、Dmy-FLAG Tg 個体の持つ Dmy は Dmy^{HNI} であり、Dmy^{Hd-rR} を持たなかった。これらの結果は、Dmy-FLAG Tg 個体の性染色体型は XX であるが、導入した Dmy-FLAG の働きで雄へと発達したことを示している。また、Dmy-FLAG の mRNA 内には FLAG タグが含まれており、Dmy-FLAG は FLAG タグを含んだまま発現されていることが示された。Hd-rR 系統の XY 個体の Dmy は孵化 3 日前のステージ 36 から発現し、その後、ステージ 38 から雄の表現型を観察することが出来る (Kobayashi et al., 2004)。さらに、XY 個体では、孵化約 15 日後から精巣構造の特徴である輸精管原基 (アキナス構造) が観察されるようになる。Dmy-FLAG Tg 個体の精巣発達過程を観察した結果、Dmy-FLAG Tg 個体の生殖腺は野生型の XY 個体と遜色なく精巣分化を辿っていた。これらの結果は、Dmy-FLAG が野生型の Dmy と発現時期的にも機能的にも等しいことを示しており、Dmy-FLAG の機能を解明することで、野生型の Dmy の機能を明らかに出来ることを示唆している。

4-2 Dmy-FLAG の *in vivo* での特異的検出

抗 FLAG タグ抗体を用いた免疫組織化学実験では、Tg 個体の成魚の精巣内に DAB シグナルを観察できた。一方で、Hd-rR 系統の XY 個体の精巣内にはこのようなシグナルが見ら

れなかったことから、このシグナルは導入した *Dmy*-FLAG であると考えられる。また、これまでの研究により、*Dmy* は生殖細胞を取り囲むセルトリ細胞に局在することが報告されている (Kobayashi et al., 2004)。本研究の免疫組織化学実験における DAB シグナルは、精原細胞の周辺のセルトリ細胞のみで検出され、Kobayashi らの報告と一致していた。これらの結果は、*Dmy*-FLAG Tg 系統では、*Dmy*-FLAG を *in vivo* で特異的に検出できることを示している。

4-3 *Dmy*-FLAG Tg 系統の有用性

メダカ近交系 Hd-rR 系統では、孵化約 2 日前に XY 個体特異的に *Dmy* が発現し、その後、XX 個体特異的に一部の生殖細胞が II 型の細胞分裂を起こす (Kobayashi et al., 2004)。生殖細胞の II 型の細胞分裂では、生殖細胞が 2~4 回の連続した細胞分裂を行い、4~16 個の小さな娘細胞のシスト (細胞の集団) を形成する。II 型の細胞分裂後、これらの娘細胞は減数分裂を開始する (Saito et al., 2007)。このことにより、XX 個体と XY 個体との間の生殖細胞数や減数分裂細胞の性差が現れると考えられている。近年、メダカにおいて、生殖細胞の消失は XX 個体を雄へと性転換させ、生殖細胞の異常増殖は XY 個体を雌へと性転換させることが報告されている (Morinaga et al., 2007)。これらの報告から、生殖細胞数は個体の性決定に非常に重要な要因であると考えられる。また、XY 個体では、XX 個体の生殖細胞が II 型の細胞分裂を開始する頃である *Dmy* 発現直後に、*Gsdf* の発現量が上昇する (Shibata et al., 2010)。*Gsdf* はニジマスにおいて始原生殖細胞と精原細胞の増殖を制御する因子として発見された (Sawatari et al., 2007)。従って、*Gsdf* は生殖細胞の II 型の細胞分裂を抑制しているように見える。以上のことから、*Dmy* が *Gsdf* の発現を直接あるいは間接的に上昇させ、*Gsdf* が生殖細胞の増殖を制御しているという仮説が考えられる。本

研究で作出された *Dmy-FLAG* Tg 個体では, *Dmy-FLAG* を *in vivo* で特異的に検出することが出来る. さらに, 野生型 XY 個体と *Dmy-FLAG*Tg 個体の精巣分化に大きな違いが見られないことから, *Dmy-FLAG* は野生型の *Dmy* と同じ機能を持つと考えられる. 今後, FLAG タグに対する抗体を用いて ChIP アッセイなど行うことで, *Dmy* の標的遺伝子を解明できると期待される.

第3章 総合考察

ここでは、本研究の各章で得られた結果と考察を統括し、本研究により見えてきたメダカの性決定・性分化の分子機構や、今後の課題について考察する。

本研究の第1章では、*Gsdf*欠損メダカを作製し、*Gsdf*の機能を逆遺伝学的に解析した。性分化初期の孵化0日後、孵化5日後では、全ての*Gsdf*欠損XY個体の生殖腺は卵巣型の分化を示していた。この結果から、*Gsdf*が初期精巣分化における生殖細胞増殖の抑制や減数分裂の抑制を制御していることが明らかになった(図. 3-1)。その後、孵化30日後および成魚の段階では、*Gsdf*欠損XY個体の約3分の2は雄へと発達していた。この結果から、*Gsdf*は生殖腺分化後期の精巣構造の発達や維持には必須の遺伝子ではないことが明らかとなった。第2章では、*Dmy*のC末端に3xFLAGタグを融合した*Dmy*-FLAGを発現する遺伝子組み換えメダカ系統(*Dmy*-FLAG Tg 系統)を作出した。この系統では、抗FLAG抗体を用いて*Dmy*-FLAGを特異的に検出することができた。従って、この系統を用いて*Dmy*の標的遺伝子を同定できると期待される。

XYメダカの精巣の発達・維持に必要な遺伝子として、*Dmrt1*が報告されている(Masuyama et al., 2012)。*Dmrt1*は脊椎動物の精巣分化に非常に重要な役割を果たしている。ヒトでは、*Dmrt1*の欠損は、正常な精巣および精子の形成不全を引き起こし、結果として男性から女性への性転換を引き起こす(Raymond et al., 1999)。また、*Dmrt1*欠損XYマウスも同様に、正常な精子形成に失敗する(Raymond et al., 2000)。鳥類では、*Dmrt1*はZ染色体上に存在し、性決定遺伝子であると考えられている(Smith et al., 2009)。このように、*Dmrt1*の精巣分化・発達・維持における重要性は脊椎動物で広く保存されている。メダカの*Dmrt1*欠損XY個体の生殖腺は、孵化5日後までは精巣分化型の表現型を示し、孵化10

日後には卵巣分化型に転換する (Masuyama et al., 2012). 一方で, *Gsdf* 欠損 XY 個体の生殖腺は, 孵化 0 日後には既に卵巣分化型であった. また, *Gsdf* と *Dmrt1* の二重欠損変異体の解析の結果, 二重欠損 XY 個体では, *Dmrt1* 欠損 XY 個体よりも早い時期に性転換を起こしており, *Dmrt1* の機能する時期は *Gsdf* の機能する時期よりも遅いことを示していた. これらの結果から, *Gsdf* は精巣分化の誘導因子として孵化 5 日後ごろまで働き, それ以降の精巣の発達・維持には *Dmrt1* が重要に働いていると考えられる.

Dmy はステージ 36 に生殖細胞を取り囲む体細胞で発現する (Kobayashi et al., 2004). *Dmy* は転写因子であると考えられているが, その標的遺伝子は不明である. *Dmy* 発現の直後に, *Dmy* 発現細胞と同じ細胞系列で, *Gsdf* の発現が XY 個体特異的に上昇する (Shibata et al., 2010). このことから, *Dmy* は *Gsdf* の発現を上昇させることで, 未分化生殖腺の精巣分化を開始させていると考えられる. メダカの近縁種であるルソンメダカでは, *Gsdf* の転写制御領域が *Dmy* 非存在下で *Gsdf* の発現を上昇させるように変異したことで, *Dmy* に依存しない新たな性決定機構へ進化したと考えられている (Myosho et al., 2012). このルソンメダカの性決定遺伝子 *Gsdf^f* のメダカへの遺伝子導入は, XX メダカの雄への性転換を引き起こす. このことは, メダカの *Gsdf* を高発現させることで, *Dmy* 非存在下であっても生殖腺の精巣分化を誘導出来ることを示している. 精巣の発達・維持には *Dmrt1* の発現が必須であるため, *Gsdf* の下流に *Dmrt1* を発現させる分子経路が存在すると考えられる (図. 3-1).

Gsdf 欠損 XY の一部の個体の生殖腺は精巣へと分化したことから, *Gsdf* は精巣の発達・維持に必須の遺伝子ではないと考えられる. 一方で, *Gsdf* は, 魚類で広く保存されており, また, 多くの魚種で, *Gsdf* は性分化期に雄特異的な高発現を示す. これらの報告は, *Gsdf* を介した精巣分化の分子機構が魚類で広く保存されていることを示唆している. 従って, 魚類では *Gsdf* を介した精巣分化の誘導が重要であるように見える. つまり, このような精

巢分化誘導の分子機構を解明し，人為的に精巢分化を誘導する技術を確立できれば，産業有用魚種の性統御も可能になると期待できる．今後，*Dmy-FLAG Tg* 系統や *Gsdf* 欠損メダカ系統を用いて，*Dmy* による *Gsdf* 発現制御機構や *Gsdf* シグナルの下流に存在する精巢分化誘導の分子機構を解明することで，産業有用魚種の性統御法確立に繋がると期待できる．

要旨

産業有用魚種の中には、雌雄間で成長速度や商品価値の異なる魚種が数多く存在する。これらの魚種の性統御法の確立により、生産性の向上や商品価値の向上が期待できる。一般的に脊椎動物では、発生初期の個体は精巣にも卵巣にも分化できる未分化生殖腺を有しており、個体の性は、この未分化生殖腺が精巣に分化するか、卵巣に分化するかにより決定される。従って、性統御法を確立するためには、未分化生殖腺分化の分子機構を解明することが望まれる。メダカは、性染色体上の性決定遺伝子が魚類で初めて同定された種であり、性分化の分子機構を解明するためのモデルとして用いられてきた。XY メダカでは、孵化約 2 日前に、Y 染色体に座乗する性決定遺伝子 *Dmy* の発現により、未分化生殖腺の精巣分化が開始される。一方で、Y 染色体を持たない XX メダカでは、生殖腺は卵巣へと分化する。XY メダカの生殖腺では、*Dmy* 発現後に *Gsdf* と *Dmrt1* の mRNA 発現量が上昇する。従って、*Dmy*, *Gsdf*, *Dmrt1* の 3 つの遺伝子が未分化生殖腺の精巣分化に重要であると考えられている。近年、*Dmrt1* が孵化 5 日後以降の後期の精巣発達・維持に必須の遺伝子であると報告されている。しかしながら、これらの 3 つの遺伝子がどのような分子経路により精巣分化を導くかは明らかになっていない。

本研究の第 1 章では、これまで機能未知であった *Gsdf* が精巣初期分化においてどのような機能を果たしているかを明らかにするために、*Gsdf* 欠損メダカを作出し、*Gsdf* の機能を逆遺伝学的に解析した。*Gsdf* 欠損メダカの作出には、人工制限酵素の 1 つである TALENs (Transcription Activator-like Effector Nucleases) を用いた。*Gsdf* の開始コドンの直後を標的とした TALENs を設計し、その mRNA を 1 細胞期のメダカの受精卵に顕微注入することで、*Gsdf* タンパク質コード領域内の標的部位に挿入/欠損変異を持つ個体を複数得

た。これらのうち、フレームシフトが生じていると予想された 2 系統を用いて、生殖腺分化過程を組織学的に観察した。この結果、性分化の初期段階である孵化 0 日後および孵化 5 日後では、全ての *Gsdf* 欠損 XY 個体の生殖腺は、卵巣分化型の表現型を示した。一方で、孵化 30 日後および成魚では、*Gsdf* 欠損 XY 個体の約 3 分の 2 は雄へと発達していた。これらの結果は、*Gsdf* は性分化初期の生殖腺の精巣型の分化に必要であり、後期の精巣の発達・維持には必須ではないことを示している。従って、*Gsdf* は精巣の発達・維持に必須の遺伝子ではなく、性分化初期の生殖腺を精巣方向に導く、精巣分化誘導因子であると考えられる。また、*Dmrt1* および *Gsdf* の二重欠損 XY 個体の生殖腺は、性分化初期から卵巣分化へと転換しており、*Gsdf* 欠損 XY 個体と同じ表現型を示していた。この結果は、*Gsdf* が *Dmrt1* よりも早い時期に働くことを示している。つまり *Gsdf* シグナルの下流で *Dmrt1* が働いていると考えられる。また、*Gsdf* 欠損 XY 個体の一部は、生殖腺分化初期では卵巣型を示していたにも関わらず雄へと発達しており、*Gsdf* 非存在下でも *Dmrt1* が活性化されることを示していた。つまり、*Dmy* から *Gsdf* を介さずに *Dmrt1* を活性化させる分子経路が存在すると考えられた。従って、*Dmy* シグナルの下流には、*Gsdf* 発現を活性化させ、未分化生殖腺を精巣分化方向へと導く経路と、*Dmrt1* 発現を活性化させる 2 つの経路が存在すると考えられた。

Dmy は DM ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを有するため、転写調節因子であると考えられているが、その標的遺伝子は不明である。*Dmy* から *Gsdf* や *Dmrt1* への分子経路を明らかにするためには、抗体を用いて *Dmy* を特異的に検出し、クロマチン免疫沈降アッセイなどのタンパク質-DNA 間の相互作用解析を行う必要がある。しかしながら、*Dmy* に特異的かつ強力に結合する抗体が作製されておらず、*Dmy* の機能を解析する上での障壁となっている。本研究の第 2 章では、*Dmy* を特異的に検出するために、*Dmy* の C 末端に 3xFLAG タグ

を融合した Dmy-FLAG を発現する遺伝子導入系統 (*Dmy-FLAG* Tg 系統) を作出した. 作出した *Dmy-FLAG* Tg 個体は Y 染色体を持っておらず, 導入した *Dmy-FLAG* により雄へと発達していた. また, *Dmy-FLAG* Tg 個体の生殖腺の精巣分化は, 野生型の XY 個体の生殖腺の精巣分化と顕著な違いは見られなかった. 従って, 外来の Dmy-FLAG は, 本来の Dmy と同様に機能し, 未分化生殖腺の精巣分化を誘導していると考えられた. さらに, 抗 FLAG 抗体を用いた免疫組織化学の結果, Dmy-FLAG タンパク質を特異的に検出することができた. 従って, 本研究では, 抗 FLAG 抗体を用いることで, Dmy-FLAG を特異的に検出できる有用な遺伝子導入系統の作出に成功した.

Gsdf は生殖腺分化初期に精巣分化特異的な高発現を示すことが多くの魚種で報告されており, *Gsdf* の初期精巣分化への重要性は魚類の中で広く保存されているように見える. 従って, *Gsdf* による精巣分化誘導の分子機構を解明し, 人為的に精巣分化を誘導する技術を確立できれば, 産業有用魚種の性統御も可能になると考えられる. 今後, *Dmy-FLAG* Tg 系統や *Gsdf* 欠損メダカ系統を用いて, Dmy による *Gsdf* や *Dmrt1* の発現制御機構の解明や *Gsdf* シグナルの下流に存在する精巣分化誘導の分子機構の解明が期待できる.

謝辞

本研究を遂行し学位論文にまとめるにあたり，終始熱心かつ適切なお指導，ご助言を賜りました宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの松田勝教授に深甚なる感謝の意を表します。優しく，時に厳しくご指導いただいたことや，国外出張などの様々な経験をさせて頂いたことは，今後の人生の糧になるものです。そして，本研究を進めるにあたり，多くのご助言を賜りました宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの児玉豊准教授に深く感謝の意を表します。

学位論文の審査並びに御校閲を賜りました東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設の新井克彦教授，茨城大学遺伝子実験施設の安西弘行教授，宇都宮大学農学部の飯郷雅之教授に厚く御礼申し上げます。

新潟大学理学部濱口哲教授と同大学理学部酒泉満教授ならびに明正大純博士，佐藤忠博士には多くのご助言を頂きました。深く感謝しております。加えて，組織学的解析において多くのご助言を頂いた静岡県立大学食品栄養科学部小林亨教授ならびに堀江好文博士に感謝の意を表します。

最後に，研究室生活において多くのご助言・ご協力を頂いた宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの皆様や先輩方，博士過程の生活に関して多くのご助言を頂いた増山治男博士に深く感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

- Adolfi, M.C., Carreira, A.C., Jesus, L.W., Bogerd, J., Funes, R.M., Schartl, M., Sogayar, M.C., Borella, M.I., 2015. Molecular Cloning and Expression Analysis of *Dmrt1* and *Sox9* During Gonad Development and Male Reproductive Cycle in the Lambari Fish, *Astyanax altiparanae*. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 2.
- Aida, T., 1921. On the Inheritance of Color in a Fresh-Water Fish, *Aplocheilichthys Latipes* Temmick and Schlegel, with Special Reference to Sex-Linked Inheritance. *Genetics* 6, 554-573.
- Ansai, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Ariga, H., Uemura, N., Takahashi, R., Kinoshita, M., 2013. Efficient Targeted Mutagenesis in Medaka Using Custom-Designed Transcription Activator-Like Effector Nucleases. *Genetics* 193, 739-749.
- Behringer, R.R., 1994. The *in vivo* Roles of Mullerian-Inhibiting Substance. *Curr Top Dev Biol* 29, 171-187.
- Berbejillo, J., Martinez-Bengochea, A., Bedo, G., Vizziano-Cantonnet, D., 2013. Expression of *Dmrt1* and *Sox9* During Gonadal Development in the Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiol Biochem* 39, 91-94.
- Burtis, K.C., Baker, B.S., 1989. *Drosophila Doublesex* Gene Controls Somatic Sexual Differentiation by Producing Alternatively Spliced mRNAs Encoding Related Sex-Specific Polypeptides. *Cell* 56, 997-1010.

- Chen, Y., Hong, W.S., Wang, Q., Chen, S.X., 2015. Cloning and Expression Pattern of *Gsdf* During the First Maleness Reproductive Phase in the Protandrous *Acanthopagrus latus*. *Gen Comp Endocrinol* 217–218, 71–80.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757–761.
- Forconi, M., Canapa, A., Barucca, M., Biscotti, M.A., Capriglione, T., Buonocore, F., Fausto, A.M., Makapedua, D.M., Pallavicini, A., Gerdol, M., De Moro, G., Scapigliati, G., Olmo, E., Schartl, M., 2013. Characterization of Sex Determination and Sex Differentiation Genes in *Latimeria*. *PLoS One* 8, e56006.
- Francis, R.C., Barlow, G.W., 1993. Social Control of Primary Sex Differentiation in the Midas Cichlid. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10673–10675.
- Gautier, A., Sohm, F., Joly, J.S., Le Gac, F., Lareyre, J.J., 2011. The Proximal Promoter Region of the Zebrafish *Gsdf* Gene is Sufficient to Mimic the Spatio-Temporal Expression Pattern of the Endogenous Gene in Sertoli and Granulosa cells. *Biol Reprod* 85, 1240–1251.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1990. A Gene Mapping to the Sex-Determining Region of the Mouse Y Chromosome is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes. *Nature* 346, 245–250.
- Hattori, R.S., Gould, R.J., Fujioka, T., Saito, T., Kurita, J., Strussmann, C.A., Yokota, M., Watanabe, S., 2007. Temperature-Dependent Sex Determination in Hd-rR

- Medaka *Oryzias latipes*: Gender Sensitivity, Thermal Threshold, Critical Period, and *DMRT1* Expression Profile. *Sex Dev* 1, 138–146.
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., Strussmann, C. A., 2012. A Y-Linked Anti-Mullerian Hormone Duplication Takes Over a Critical Role in Sex Determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 2955–2959.
- Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., Kitano, T., 2010. High Temperature Causes Masculinization of Genetically Female Medaka by Elevation of Cortisol. *Mol Reprod Dev* 77, 679–686.
- Horiguchi, R., Nozu, R., Hirai, T., Kobayashi, Y., Nagahama, Y., Nakamura, M., 2013. Characterization of Gonadal Soma-Derived Factor Expression During Sex Change in the Protogynous Wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Dev Dyn* 242, 388–399.
- Hyodo-Taguchi, Y., Matsudaira, H., 1987. Higher Susceptibility to N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine-Induced Tumorigenesis in an Interstrain Hybrid of the Fish, *Oryzias latipes* (medaka). *Jpn J Cancer Res* 78, 487–493.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., Nagahama, Y., 2008. Sexual Dimorphic Expression of Genes in Gonads During Early Differentiation of a Teleost Fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 78, 333–341.
- Iwamatsu, T., 2004. Stages of Normal Development in the Medaka *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121, 605–618.

- Janzen, F.J., Paukstis, G.L., 1991. Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Design. *Q Rev Biol* 66, 149–179.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821.
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., Kikuchi, K., 2012. A Trans-Species Missense SNP in *Amhr2* is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet* 8, e1002798.
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin, I.T., Takeda, H., Morishita, S., Kohara, Y., 2007. The Medaka Draft Genome and Insights into Vertebrate Genome Evolution. *Nature* 447, 714–719.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., Nagahama, Y., 2008. Sexual Dimorphic Expression of *Dmrt1* and *Sox9a* During Gonadal Differentiation and Hormone-Induced Sex Reversal in the Teleost Fish Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev Dyn* 237, 297–306.

- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N., Nagahama, Y., 2004. Two DM Domain Genes, *DMY* and *DMRT1*, Involved in Testicular Differentiation and Development in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* 231, 518–526.
- Kondo, M., Hornung, U., Nanda, I., Imai, S., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Hori, H., Schmid, M., Shimizu, N., Schartl, M., 2006. Genomic Organization of the Sex-Determining and Adjacent Regions of the Sex Chromosomes of Medaka. *Genome Res* 16, 815–826.
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Schmid, M., Schartl, M., 2004. Evolutionary Origin of the Medaka Y Chromosome. *Curr Biol* 14, 1664–1669.
- Li, M., Sun, Y., Zhao, J., Shi, H., Zeng, S., Ye, K., Jiang, D., Zhou, L., Sun, L., Tao, W., Nagahama, Y., Kocher, T. D., Wang, D., 2015. A Tandem Duplikate of *Anti-Mullerian Hormone* with a Missense SNP on the Y Chromosome is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS Genet* 11, 11. e1005678.
- Luckenbach, J.A., Iliev, D.B., Goetz, F.W., Swanson, P., 2008. Identification of Differentially Expressed Ovarian Genes During Primary and Early Secondary Oocyte Growth in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 2.
- Masuyama, H., Yamada, M., Kamei, Y., Fujiwara-Ishikawa, T., Todo, T., Nagahama, Y., Matsuda, M., 2012. *Dmrt1* Mutation Causes a Male-to-Female Sex Reversal After the Sex Determination by *Dmy* in the Medaka. *Chromosome Res* 20, 163–176.

- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2002. *DMY* is a Y-specific DM-Domain Gene Required for Male Development in the Medaka Fish. *Nature* 417, 559–563.
- Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2003. *Oryzias curvinotus* Has *DMY*, a Gene That is Required for Male Development in the Medaka, *O. latipes*. *Zoolog Sci* 20, 159–161.
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Nagahama, Y., 2007. *DMY* Gene Induces Male Development in Genetically Female (XX) Medaka Fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3865–3870.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., Kondoh, H., 2007. The *hotei* Mutation of Medaka in the Anti-Mullerian Hormone Receptor Causes the Dysregulation of Germ Cell and Sexual Development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 9691–9696.
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2012. Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191, 163–170.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., Schartl, M., 2002. A Duplicated Copy of *DMRT1* in the Sex-Determining Region of the Y Chromosome of the Medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11778–11783.

- Otake, H., Masuyama, H., Mashima, Y., Shinomiya, A., Myosho, T., Nagahama, Y., Matsuda, M., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2010. Heritable Artificial Sex Chromosomes in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Heredity* 105, 247–256.
- Otake, H., Shinomiya, A., Kawaguchi, A., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2008. The Medaka Sex-Determining Gene *DMY* Acquired a Novel Temporal Expression Pattern After Duplication of *DMRT1*. *Genesis* 46, 719–723.
- Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Lau, E.L., Suzuki, A., Sakai, F., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2006. Knock-Down of *DMY* Initiates Female Pathway in the Genetic Male Medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 815–819.
- Porteus, M.H., Carroll, D., 2005. Gene Targeting Using Zinc Finger Nucleases. *Nat Biotechnol* 23, 967–973.
- Raymond, C.S., Kettlewell, J.R., Hirsch, B., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 1999. Expression of *Dmrt1* in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development. *Dev Biol* 215, 208–220.
- Raymond, C.S., Murphy, M.W., O'Sullivan, M.G., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2000. *Dmrt1*, a Gene Related to Worm and Fly Sexual Regulators, is Required for Mammalian Testis Differentiation. *Genes Dev* 14, 2587–2595.
- Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J., Zarkower, D., 1998. Evidence for Evolutionary Conservation of Sex-Determining Genes. *Nature* 391, 691–695.
- Saito, D., Morinaga, C., Aoki, Y., Nakamura, S., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H., Tanaka, M., 2007. Proliferation of Germ Cells During Gonadal Sex

- Differentiation in Medaka: Insights From Germ Cell-Depleted Mutant *zenzai*. *Dev Biol* 310, 280–290.
- Sato, T., Endo, T., Yamahira, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2005. Induction of Female-to-Male Sex Reversal by High Temperature Treatment in Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoolog Sci* 22, 985–988.
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. A Novel Transforming Growth Factor-Beta Superfamily Member Expressed in Gonadal Somatic Cells Enhances Primordial Germ Cell and Spermatogonial Proliferation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Biol* 301, 266–275.
- Shen, M.M., Hodgkin, J., 1988. *mab-3*, a Gene Required for Sex-Specific Yolk Protein Expression and a Male-Specific Lineage in *C. elegans*. *Cell* 54, 1019–1031.
- Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Usami, T., Nakamoto, M., Matsuda, M., Nagahama, Y., 2010. Expression of *Gonadal Soma Derived Factor* (GSDF) is Spatially and Temporally Correlated with Early Testicular Differentiation in Medaka. *Gene Expr Patterns* 10, 283–289.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif. *Nature* 346, 240–244.
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., Sinclair, A.H., 2009. The Avian Z-Linked Gene *DMRT1* is Required for Male Sex Determination in the Chicken. *Nature* 461, 267–271.

- Strüssmann, C. A., Saito, T., Usui, M., Yamada, H., Takashima, F., 1997. Thermal Thresholds and Critical Period of Thermolabile Sex Determination in Two Atherinid Fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. J Exp Zool 278, 167–177.
- Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M. L., Kawakami, K., Shin, I. T., Kohara, Y., Kuroki, Y., Toyoda, A., Fujiyama, A., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Naruse, K., 2014. Co-Option of *Sox3* as the Male-Determining Factor on the Y Chromosome in the Fish *Oryzias dancena*. Nat Commun 5, 4157.
- Wallis, M. C., Waters, P. D., Graves, J. A., 2008. Sex Determination in Mammals—Before and After the Evolution of *SRX*. Cell Mol Life Sci 65, 3182–3195.
- Wang, D. D., Zhang, G. R., Wei, K. J., Ji, W., Gardner, J. P., Yang, R. B., Chen, K. C., 2015. Molecular Identification and Expression of the *FoxI2* Gene During Gonadal Sex Differentiation in Northern Snakehead *Channa argus*. Fish Physiol Biochem 41, 1419–1433.
- Yamamoto, T., 1958. Artificial Induction of Functional Sex-Reversal in Genotypic Females of the Medaka (*Oryzias latipes*). J Exp Zool 137, 227–263.
- Yamamoto, T., 1965. Estriol-Induced XY Females of the Medaka (*Oryzias latipes*) and Their Progenies. Gen Comp Endocrinol 5, 527–533.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., Guiguen, Y., 2012. An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Curr Biol 22, 1423–1428.

Yi, W., Ross, J.M., Zarkower, D., 2000. *Mab-3* is a Direct *tra-1* Target Gene Regulating Diverse Aspects of *C. elegans* Male Sexual Development and Behavior. *Development* 127, 4469-4480.

図表

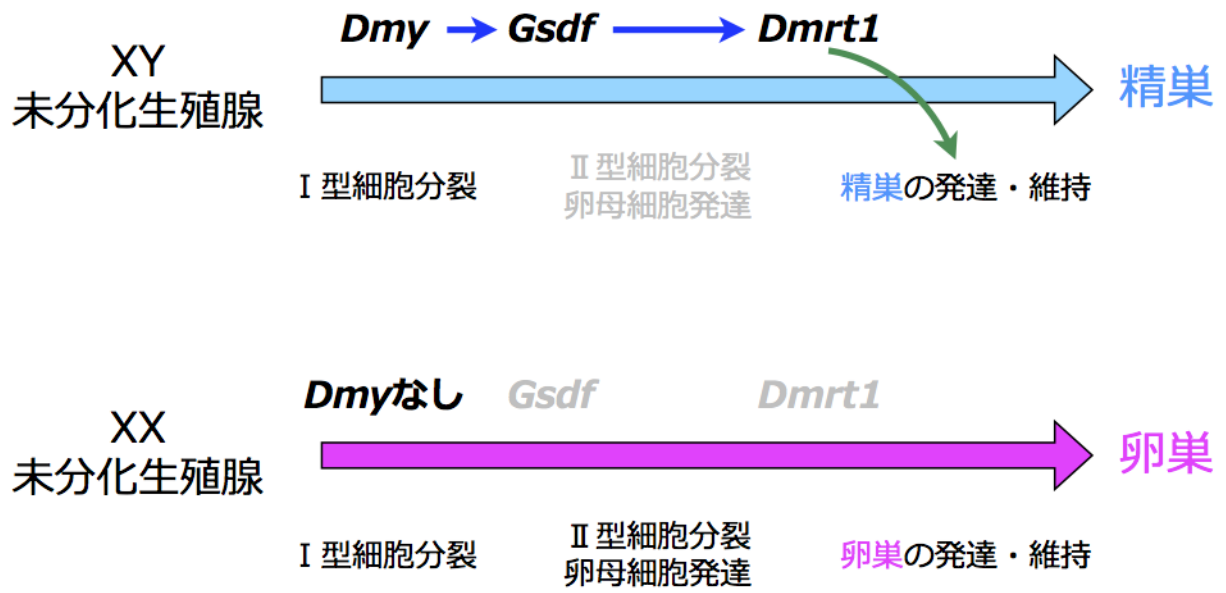


図. 0-1 メダカの生殖腺初期分化機構

青色の矢印：遺伝子発現の調節，緑色の矢印：表現型の促進.

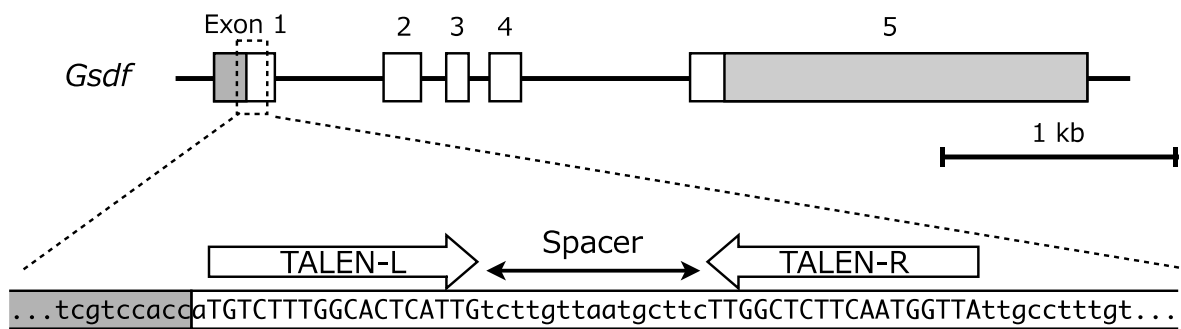


図. 1-1 *Gsdf* の遺伝子構造と設計した TALEN の標的配列

ボックスはエクソン，水平線はイントロンをそれぞれ示している．灰色のボックス：3' および 5' 非翻訳領域，白色のボックス：タンパク質コード領域，白色の矢印および大文字の塩基：設計した TALEN の標的配列．

表. 1-1 F₁世代における変異の頻度

F ₀		F ₁		
ID	性別	合計個体数	変異を持つ個体数 (発見された変異の数)	変異の頻度
01	♂	29	13 (5)	44.8%
02	♂	85	23 (6)	27.1%
03	♂	80	16 (4)	20.0%
04	♂	82	24 (4)	29.3%
05	♂	80	31 (7)	38.8%
06	♂	6	0 (0)	0.0%
07	♂	22	2 (2)	9.1%
08	♂	39	0 (0)	0.0%
09	♂	42	17 (7)	40.5%
10	♂	45	13 (4)	28.9%
11	♂	41	6 (4)	14.6%
12	♂	31	1 (1)	3.2%
14	♀	18	10 (3)	55.6%
15	♀	14	14 (5)	100.0%
合計		614	170	27.7%

表. 1-2 F1 世代で発見された変異の種類

ID 性別	対立遺伝子	塩基配列*	挿入・欠損†	
	WT	<u>TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTTGTTAATGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA</u>		
01 ♂	#1	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTTGTTAA a ATGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+1	3
	#2	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTTGTTAATGCTTCTT g ACTCTTCAATGGTTA	+1Δ1	1
	#3	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTG-----CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ6	2
	#4	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTTA-----TTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ7	2
	#5	TGTCCTTTGGC-----TCTTCAATGGTTA	Δ28	2
02 ♂	#6	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTT cttg GCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+4Δ3	3
	#7	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTT-ATGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ1	2
	#8	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTT----CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ4	1
	#9	TGTCCTTTGGCACTCATTG-----CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ11	9
	#10	TGTCCTTTGGCAC-----GCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ16	4
	#11	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTTA-----TGTTA	Δ19	4
03 ♂	#12	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTG---ATGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ3	2
	#8		Δ4	8
	#13	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGT----CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ5	2
	#14	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCT-----CTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ10	1
04 ♂	#15	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTT---GCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ3	9
	#13	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGT----CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ5	1
	#3		Δ6	1
	#14		Δ10	1
05 ♂	#16	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGT cattgt CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+6Δ5	3
	#7		Δ1	1
	#15		Δ3	1
	#17	TG----- ctcgtccaccatgtctttggcactcat TGGCTCTTCAATGGTTA	+28Δ33	2
	#13		Δ5	3
	#9		Δ11	1
	#18	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTG-----GCTCTTCAATGGTTA	Δ13	9
06 ♂	§			
07 ♂	#19	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTTAATG tg CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+2	1
	#20	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCCTGTTAAT t GCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+1	1

08 ♂	§			
09 ♂	#7		Δ1	2
	#21	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT-- gt CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+2Δ4	3
	#22	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT--TGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ2	3
	#15		Δ3	1
	#8		Δ4	1
	#3		Δ6	3
	#18		Δ13	4
10 ♂	#23	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTG--AATGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ2	4
	#13		Δ5	3
	#24	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT-----CTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ7	1
	#25	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTTAATG-----TCTTCAATGGTTA	Δ9	1
11 ♂	#26	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT ggctcttga GCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+6	1
	#27	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT cttg GCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+4Δ3	2
	#28	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGT-----CTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ8	1
	#14		Δ10	2
12 ♂	#29	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT-----TCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ6	1
14 ♀	#30	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCT cattgctcat TGCTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+10Δ4	4
	#31	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCT-----GGCTCTTCAATGGTTA	Δ14	3
	#32	TGTCCTTTGGCACT-----TCTTGGCTCTTCAATGGTTA	Δ18	3
15 ♀	#33	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGTT cttcttgg CTTCTTGGCTCTTCAATGGTTA	+8Δ4	1
	#15		Δ3	1
	#14		Δ10	10
	#34	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTG-----GCTCTTCAATGGTTA	Δ13	1
	#35	TGTCCTTTGGCACTCATTGTCTTGT-----TCTTCAATGGTTA	Δ14	1

* TALEN 標的配列を下線で示した。 “-” は欠損，太い小文字は挿入した塩基を示している。

† 欠損変異の塩基数を “Δ”，挿入変異の塩基数を “+” で示した。

§ ♂06 および♂08 の F₀ 個体からは変異体は得られなかった。

Signal peptide			
WT	1	MSLALIVLLMLLGGSSMVIAFVLHPSREPEAASPASTVSHHRCQDESLSFRKSLLEALSQTPEPRLPAGG	70
#11	1	MSLALIVLLWLLPLSCIRQGKSLQPLLHLLFPTTGVRMHCSPSGRVSLKLSACRRSHACQLAGWTLFES	39
#30	1	MSLALIVWLFNGYCLCPASVKGRACSLSCIYCFPPQVSG.	70
WT	71	LDTIREQWQRTFNAAMGVTDTTAPVLSSSSVSCDSENDTSLKCCSMATEVFMKDLGWDNWWIYPLSLIID	140
#11	71	SGREPSMPPWVSRTLQLQCSPAPLCHATVKMIPA.	104
TGF-β domain			
WT	141	RCALCNSSDQIAQCPAAHDGVQIRGSQDQASCCKPTSLEIVPIVFMDETSTIVISSVQLARGCGCGPGSA	210
WT	211	QQPCKK.	216

図. 1-2 野生型および解析に用いた変異体の Gsdf の予想されるアミノ酸配列

野生型 (WT) の配列を上部に示した. シグナルペプチド領域を下線で, TGF-β ドメインを灰色の BOX で示した. フレームシフトが予想される領域を, 斜体で示した.

表. 1-3 組織学的観察のために採集した個体数

ステージ	XX			XY			合計
	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	
ステージ37	14	28	18	5	35	9	109
ステージ38	10	17	14	9	14	6	70
ステージ39	30	45	33	24	64	35	231
孵化5日後	25	46	18	30	38	24	181
合計	79	136	83	68	151	74	591

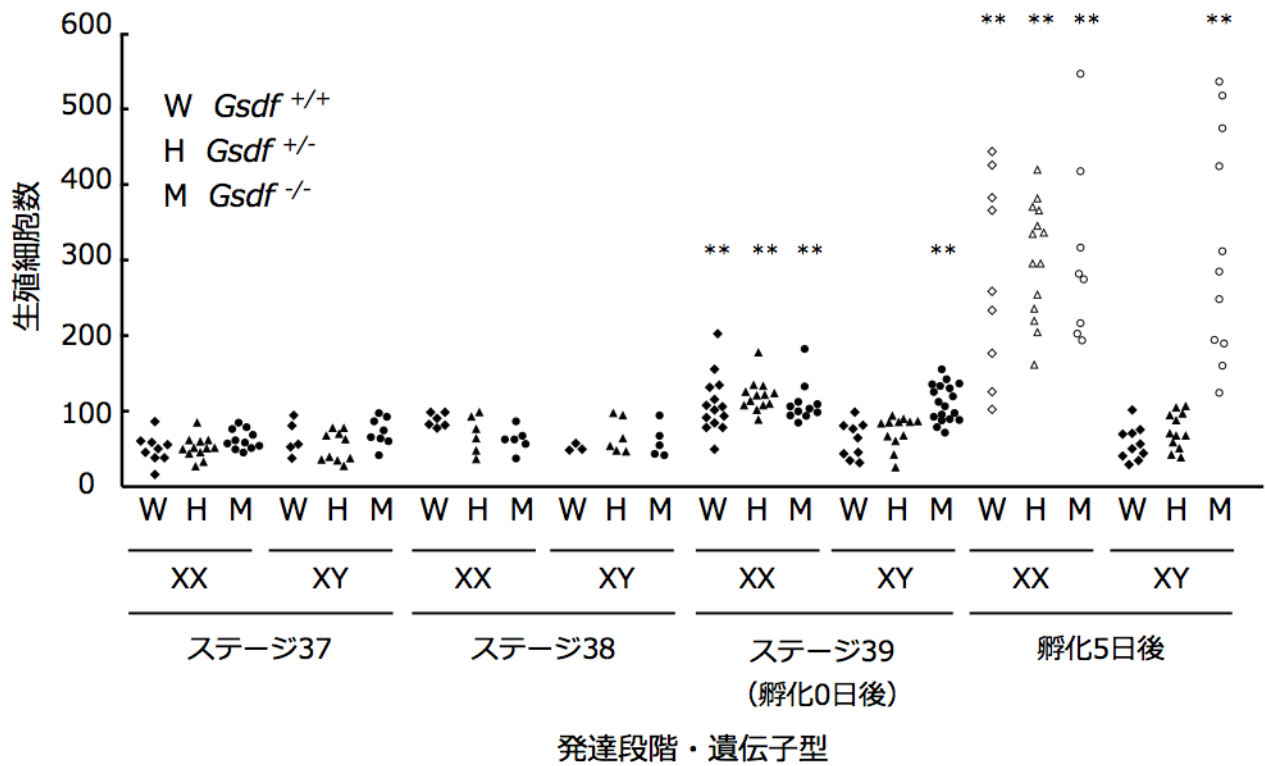


図. 1-3 生殖腺分化初期の *Gsdf* 欠損メダカの生殖細胞数

それぞれのプロットは個体の生殖細胞数を示している. 黒色のプロット: 減数分裂細胞を含まない個体, 白色のプロット: 減数分裂細胞 (卵母細胞) を含む個体. ** $P < 0.01$.

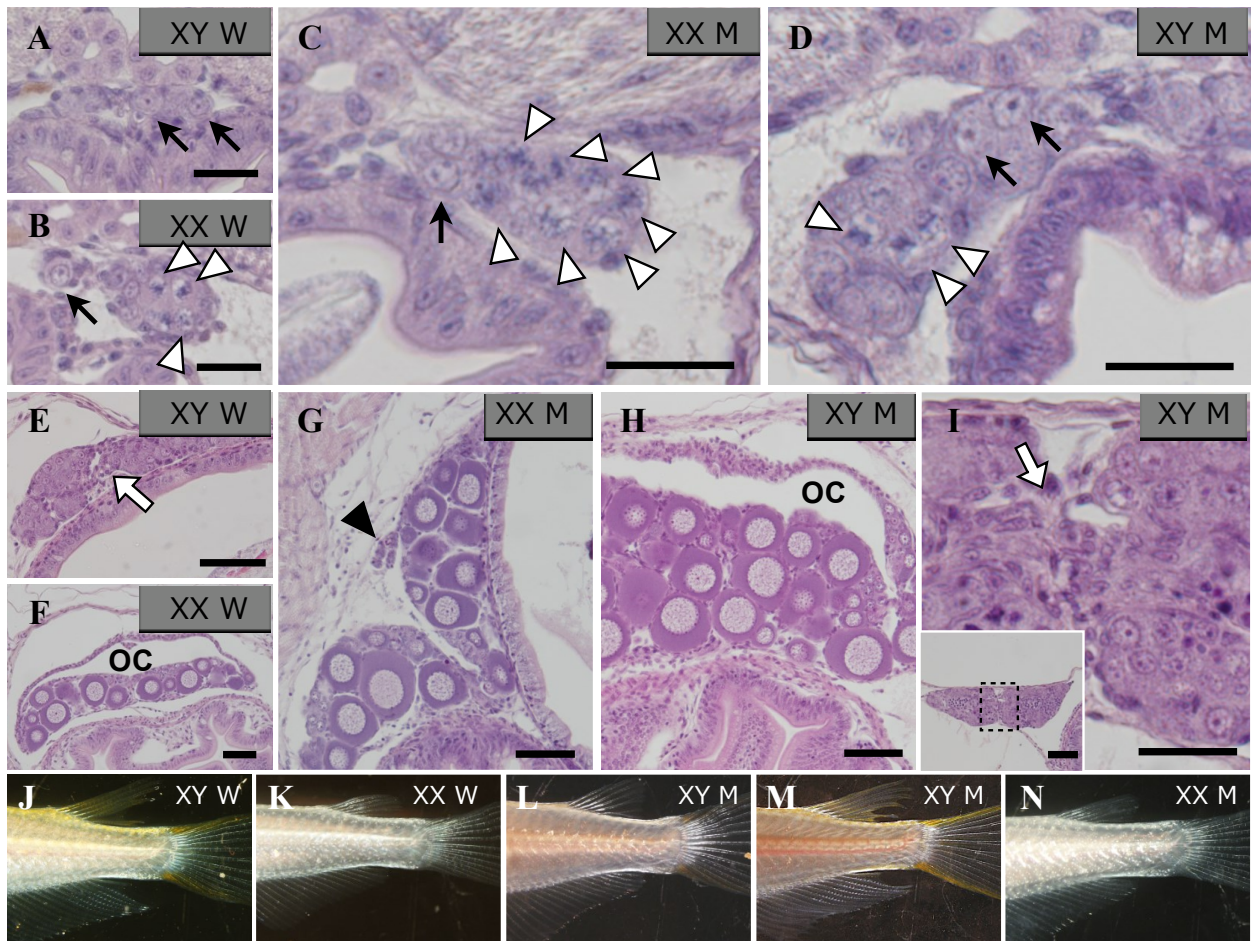


図. 1-4 *Gsdf*欠損メダカの表現型

A-D : 孵化 5 日後の個体の生殖腺組織像. E-I : 孵化 30 日後の個体の生殖腺組織像, J-N : 成魚におけるヒレの 2 次性徴. A, E, J : 野生型 XY 個体, B, F, K : 野生型 XX 個体, C, G, N : *Gsdf*^{-/-} XX 個体, D, H, I, L, M : *Gsdf*^{-/-} XY 個体. 黒色の矢印 : 始原生殖細胞, 白色の矢頭 : 減数分裂細胞 (卵母細胞), 白色の矢印 : 輸精管原基, 黒色の矢頭 : 卵巢腔原基, OC : 卵巢腔. スケールバー = 20 μ m (A, B, C, D, I), 50 μ m (E, F, G, H, I 挿入図).

表. 1-4 成魚の*Gsdf*の遺伝子型と表現型

<i>Gsdf</i> 遺伝子型	XX		XY	
	♂	♀	♂	♀
+/+	0	19	26	0
+/#11	0	35	42	0
#11/#11	0	46	21	12
+/#30	0	11	12	0
#30/#30	0	3	5	2

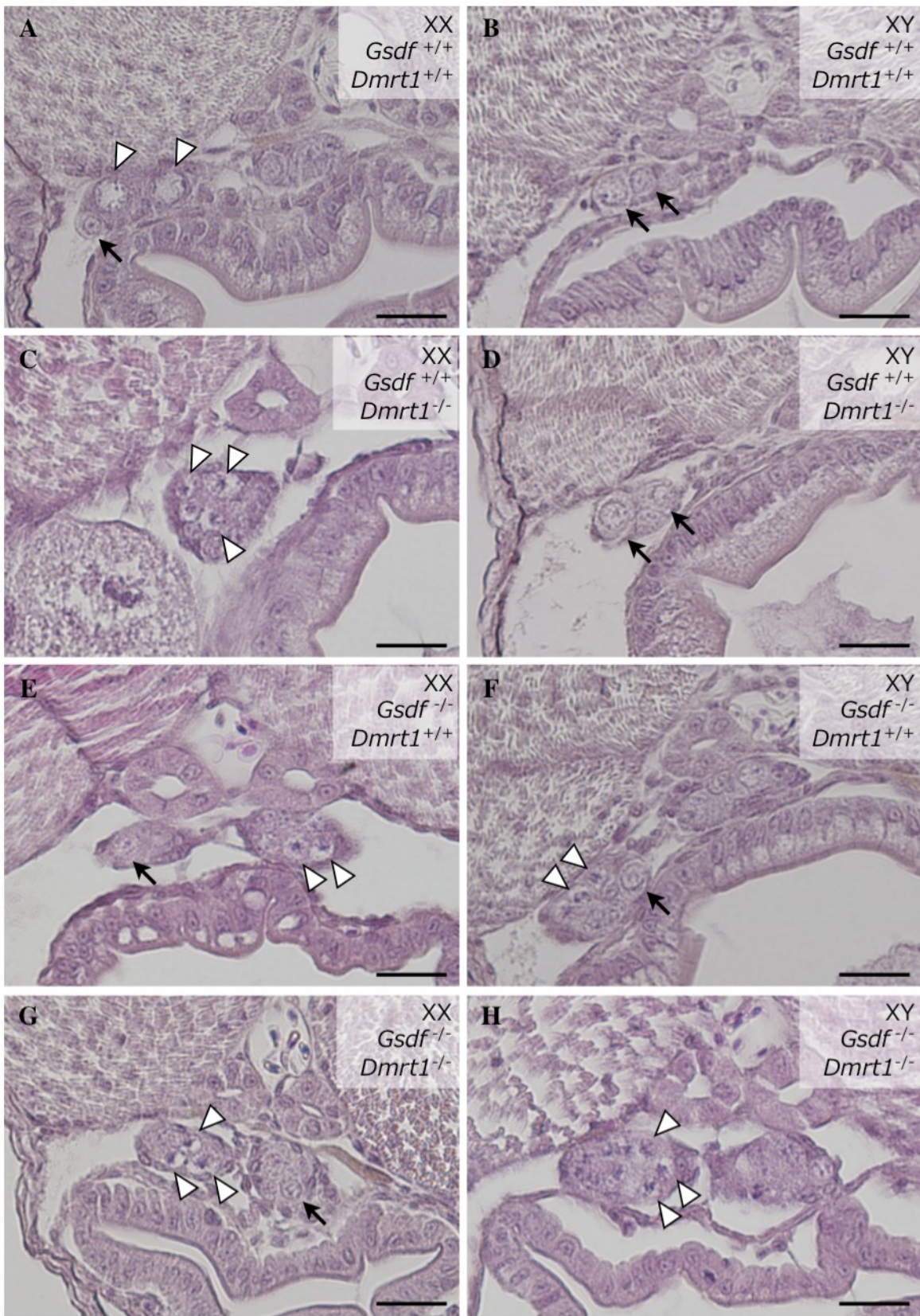


図. 1-5 *Gsdf*と*Dmrt1*の二重欠損メダカの孵化5日後の組織像

A, C, E, G : XX 個体, B, D, F, H : XY 個体, A, B : 野生型, C, D : $Gsdf^{+/+} Dmrt1^{-/-}$, E, F : $Gsdf^{-/-} Dmrt1^{+/+}$, G, H : $Gsdf^{-/-} Dmrt1^{-/-}$. 黒色の矢印 : 始原生殖細胞, 白色の矢頭 : 減数分裂を開始した卵母細胞. スケールバー = 20 μ m.

表. 1-5 *Gsdf*と*Dmrt1*の遺伝子型と表現型

<i>Gsdf</i> 遺伝子型	<i>Dmrt1</i> 遺伝子型	XX		XY	
		卵巢分化型	精巢分化型	卵巢分化型	精巢分化型
+/+	+/+	4	0	0	6
+/+	-/-	5	0	1	5*
-/-	+/+	6	0	6	0
-/-	-/-	5	0	6	0

*これらの5個体の生殖腺は減数分裂細胞を含まないが，生殖細胞のシストを含んでいた。

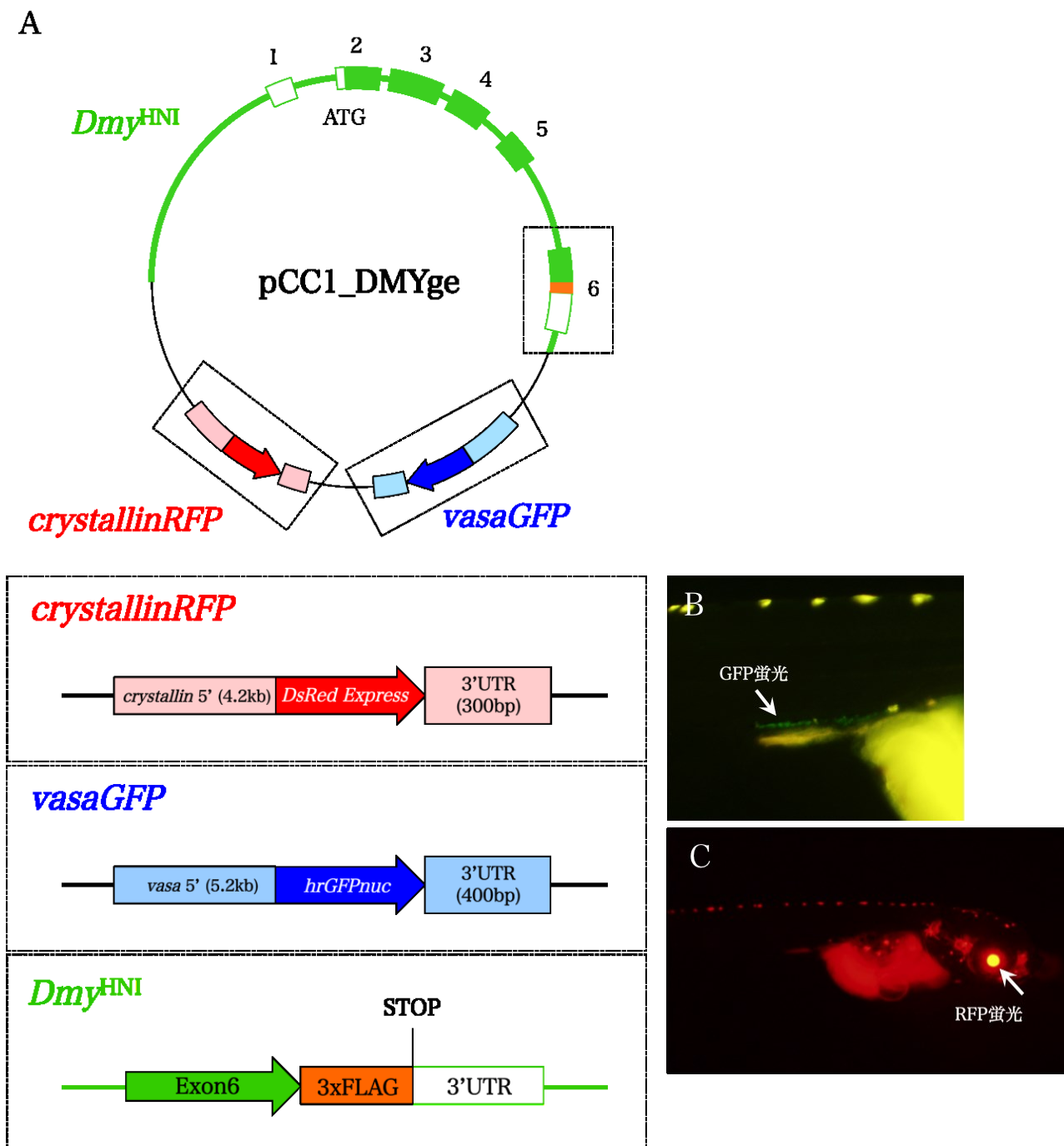


図. 2-1 顕微注入に用いた導入遺伝子コンストラクトとレポーター遺伝子

A. 遺伝子導入コンストラクトの模式図.

B. *vasaGFP* 遺伝子の導入により GFP を発現するメダカの生殖腺.

C. *crystallinRFP* 遺伝子の導入により RFP を発現するメダカの水晶体.

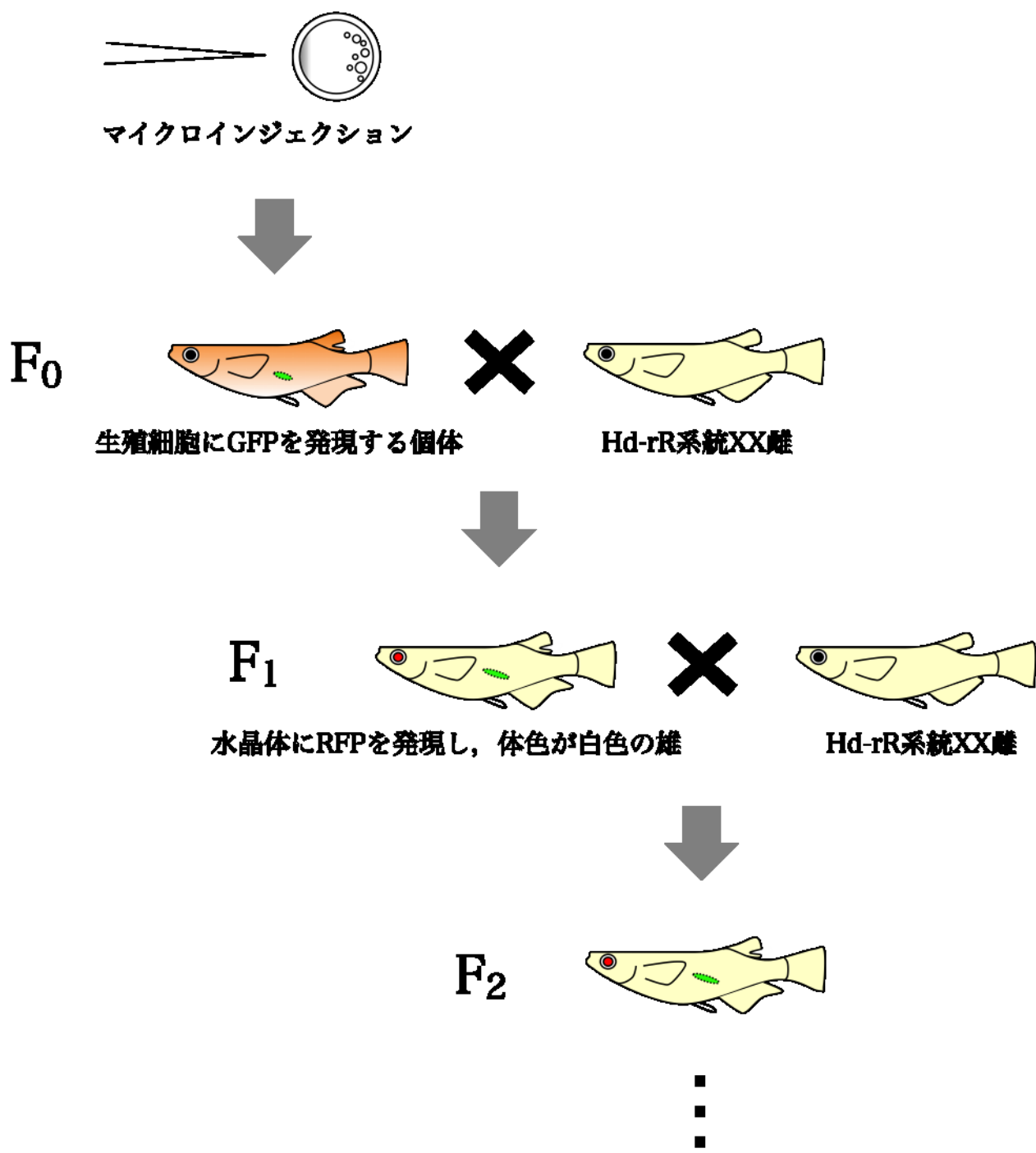


図. 2-2 遺伝子導入操作から系統樹立までの交配図と系統維持

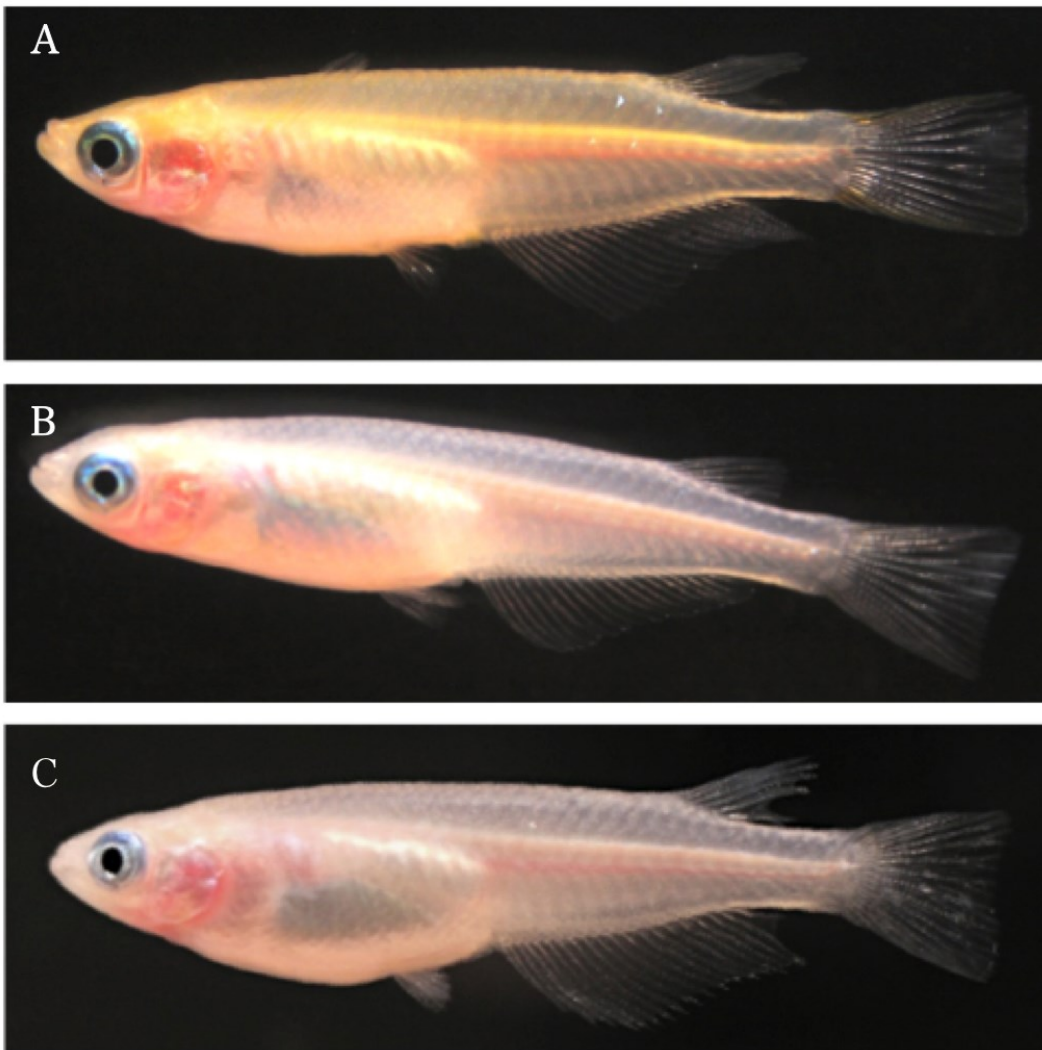


図. 2-3 本研究で作出された *Dmy-FLAG* Tg 個体と野生型 Hd-rR 系統の外観

A. 野生型 Hd-rR 系統の XY 雄

B. 野生型 Hd-rR 系統の XX 雌

C. *Dmy-FLAG* Tg 系統の XX 雄

Hd-rR 系統では、体色の緋色を決定する R が Y 染色体特異的に座乗している。このため、XX 個体の体色は白色、XY 個体の体色は緋色となる。また、メダカの二次性徴では、雄は背鰭に切れ込みが入り、尻鰭は平行四辺形となる。雌は背鰭の切れ込みは無く、尻鰭は三角形状になる。*Dmy-FLAG* Tg 系統は Y 染色体を持たないため、体色は白色だが二次性徴は雄を示している。

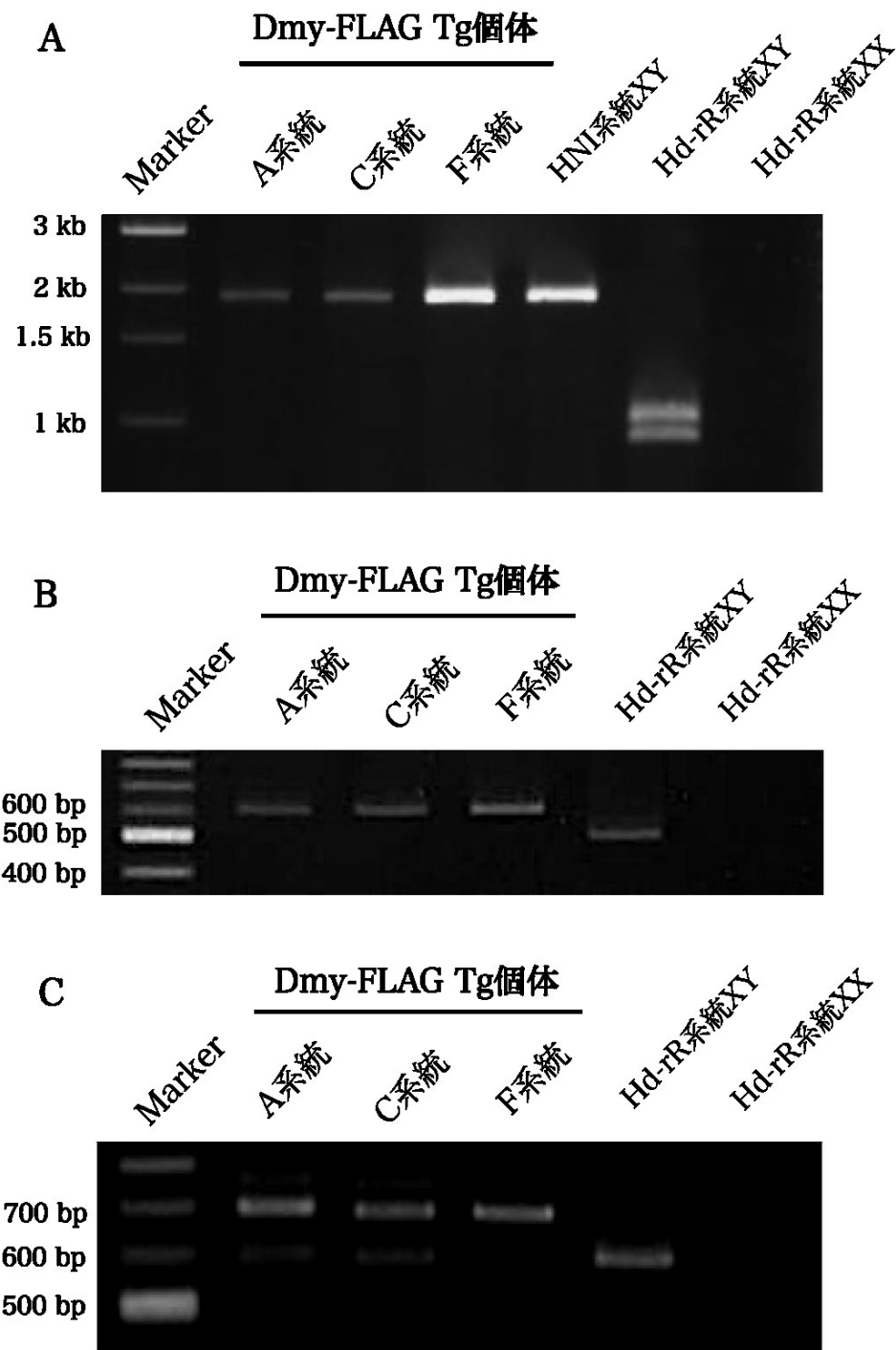


図. 2-4 *Dmy* を標的とした PCR 及び RT-PCR の結果の電気泳動像

A. PCR-RFLP による *Dmy*^{Hd-rR} と *Dmy*^{HNI} の判別

B. ゲノム PCR による FLAG タグを含む *Dmy* 領域の増幅

C. RT-PCR による *Dmy* の mRNA 内の FLAG タグ領域の増幅

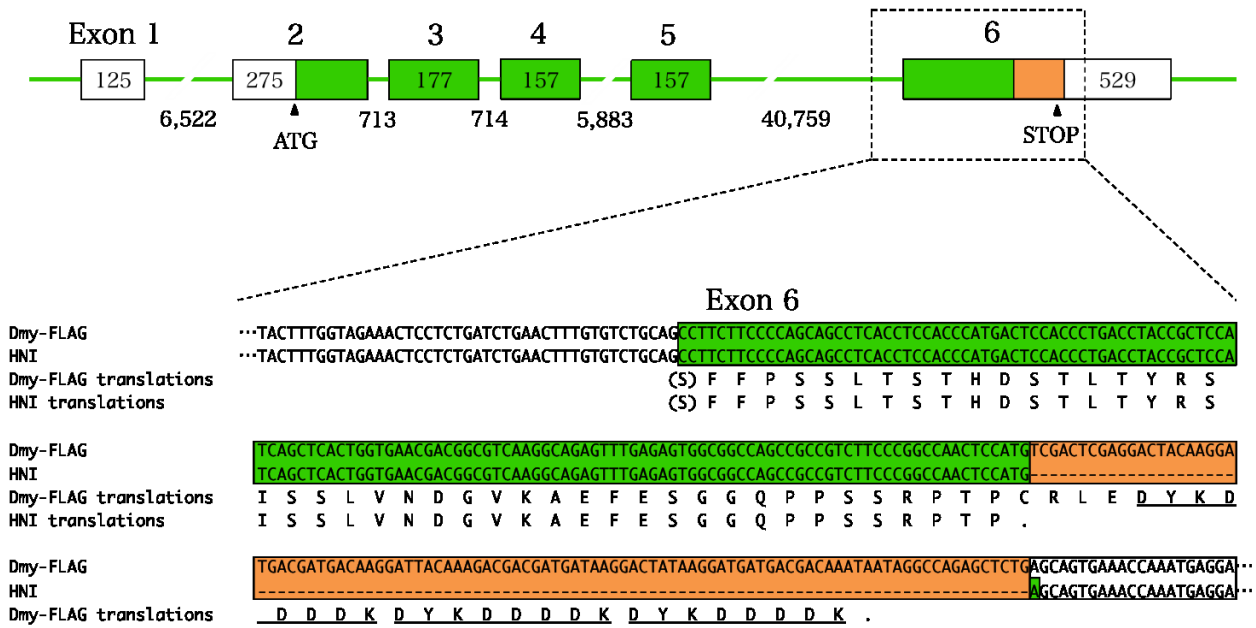


図. 2-5 *Dmy-FLAG* の模式図と FLAG タグ領域周辺の塩基配列及び予想されるアミノ酸配列
 白色のボックス：エクソン内の非翻訳領域，緑色のボックス：*Dmy* のタンパク質コード領域，
 橙色のボックス：3xFLAG タグ領域，アミノ酸配列内の下線部は FLAG タグ配列を示している。
 ボックス内及びボックス間の数はエクソン及びイントロンの塩基数を示している。

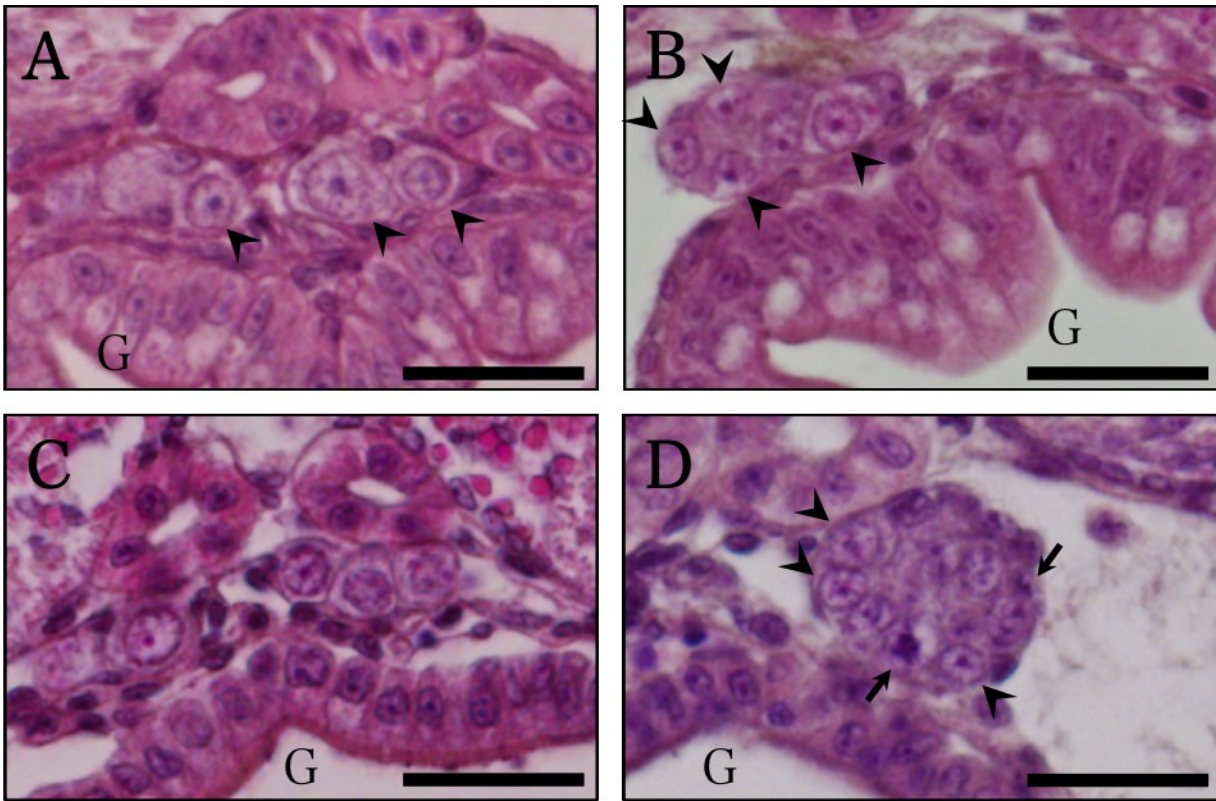


図. 2-6 生殖腺分化初期の生殖腺の組織像

A. 孵化 0 日後の *Dmy-FLAG* Tg 個体

B. 孵化 0 日後の野生型 XX 個体

C. 孵化 5 日後の *Dmy-FLAG* Tg 個体

D. 孵化 5 日後の野生型 XX 個体

矢頭：始原生殖細胞，矢印：減数分裂を開始した生殖細胞，G：腸管，スケールバー＝20

μm .

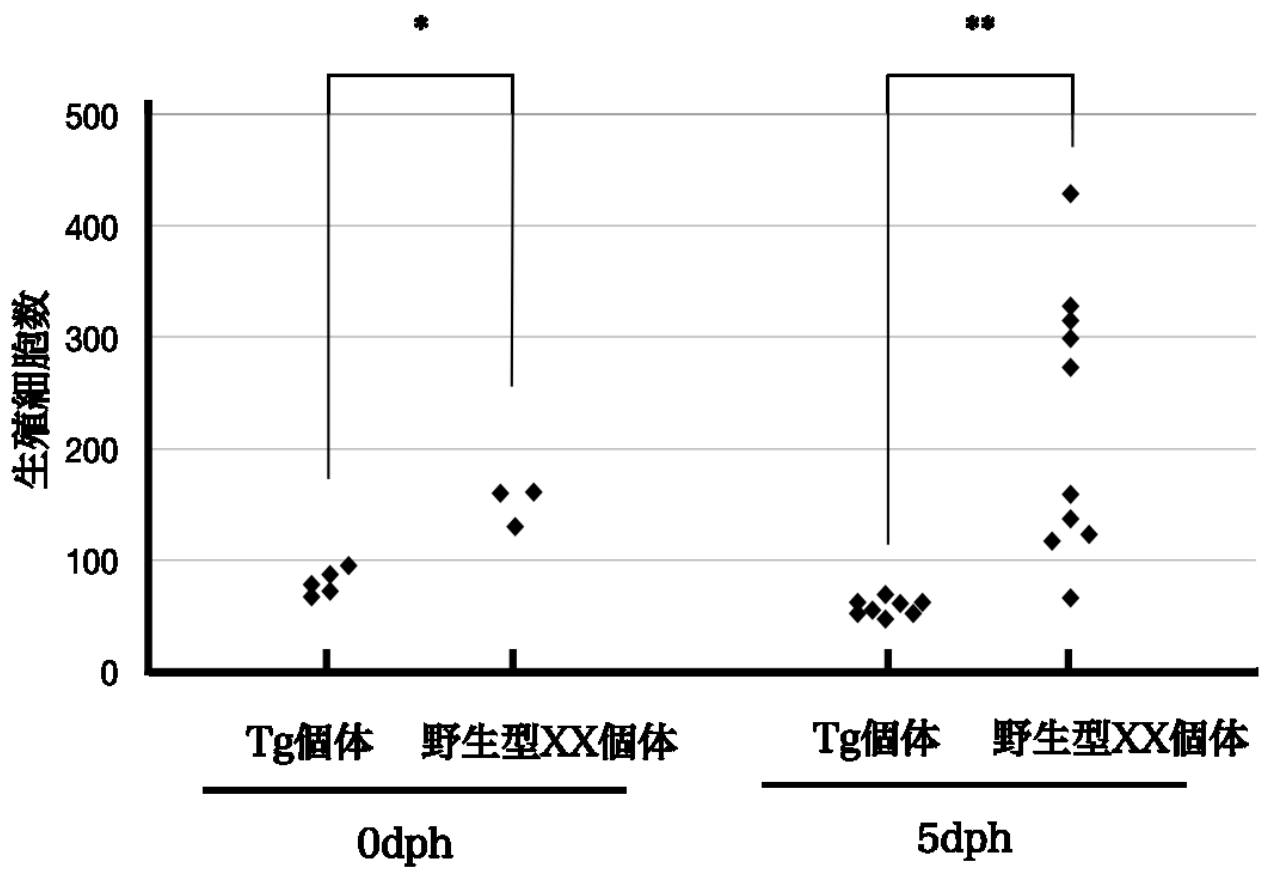


図. 2-7 *Dmy-FLAG* Tg 個体 (C 系統) と野生型 XX 個体の生殖細胞数

各プロットは、個体ごとの生殖細胞数を表している. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.



図. 2-8 孵化 15 日後の生殖腺組織像

A. *Dmy-FLAG* Tg 個体 (C 系統)

B. 野生型 XX 個体

矢頭：始原生殖細胞，G：腸管，P：腎管，AC：アキナス構造，LO：レプトテン期の生殖細胞，DO：ディプロテン期の生殖細胞，スケールバー=20 μ m.

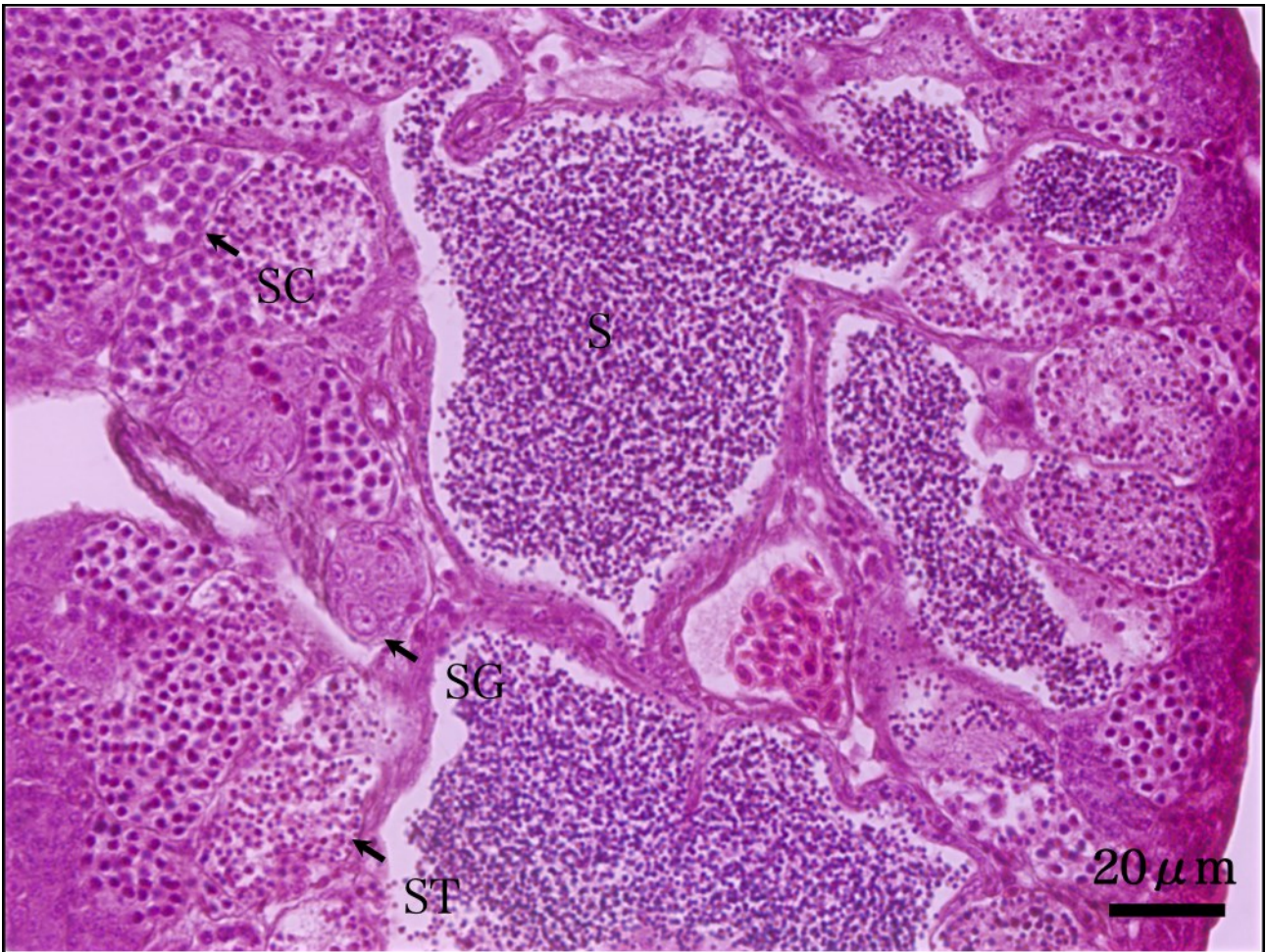


図. 2-9 *Dmy-FLAG* Tg 個体 (C 系統) 成魚 (孵化約 90 日後) の生殖腺組織像

SG : 精原細胞, SC : 精母細胞, ST : 精細胞, S : 精子, スケールバー = 20 μ m.

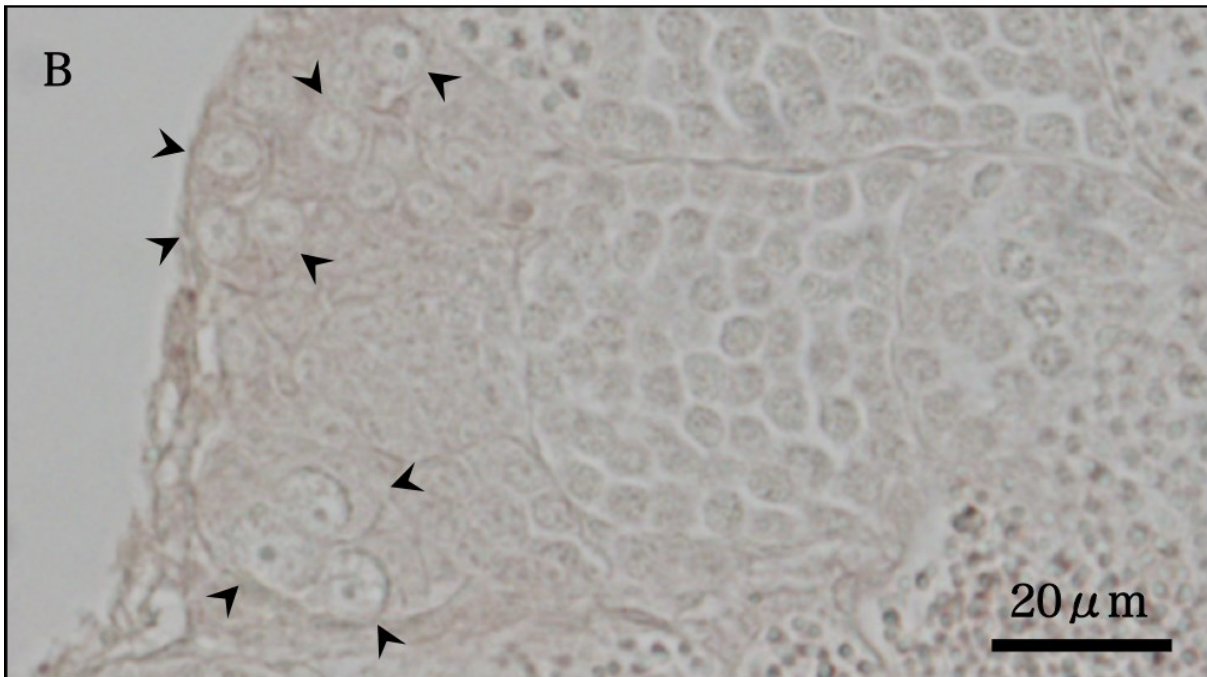
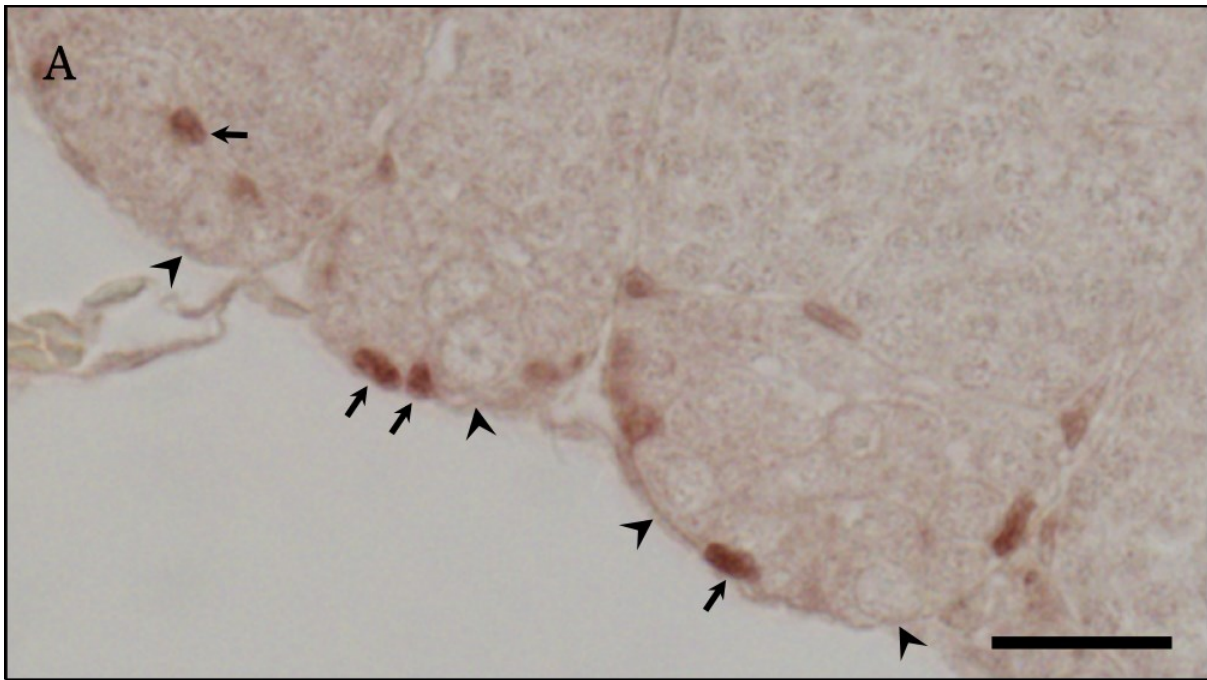


図. 2-10 成魚（孵化約 90 日後）の生殖腺切片における免疫組織化学

A. *Dmy-FLAG* Tg 個体（C 系統）

B. 野生型 Hd-rR 系統 XY 個体

矢頭：精原細胞，矢印：DAB シグナル，スケールバー＝20 μ m

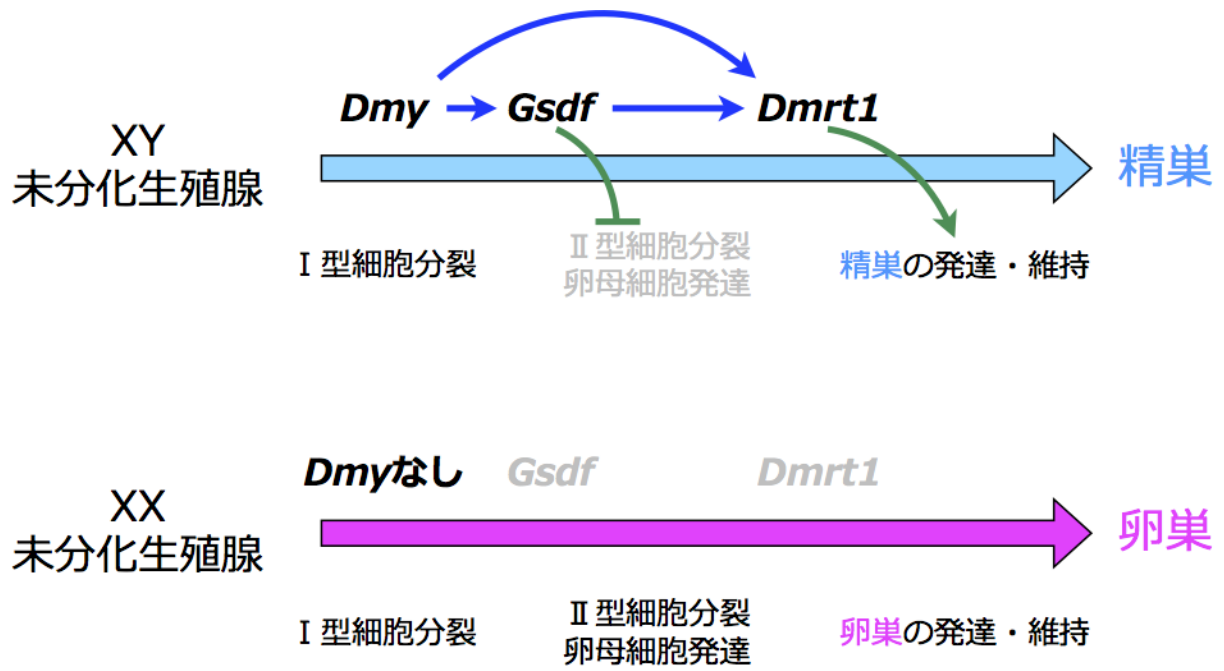


図. 3-1 メダカの生殖腺初期分化機構

青色の矢印：遺伝子発現の促進，緑色の線：表現型の促進，緑色の T バー：表現型の抑制.