

## 学 位 論 文 要 旨

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

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

今井 拓人

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* の開始コー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、卵巢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巢型の分化に必要であり、後期の精巢の発達・維持には必須ではないことを示している。従って、*Gsdf* は精巢の発達・維持に必須の遺伝子ではなく、性分化初期の生殖腺を精巢方向に導く、精巢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、性分化初期から卵巢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巢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、未分化生殖腺を精巢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システム (*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 個体の生殖腺の精巢分化は、野生型の XY 個体の生殖腺の精巢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、未分化生殖腺の精巢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システムの作出に成功した。

*Gsdf* は生殖腺分化初期に精巢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* の初期精巢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巢分化誘導の分子機構の解明が期待できる。