

セレベスメダカの性決定遺伝子座に存在する *Sox7* の機能解析

Functional analysis of *Sox7* at the sex-determining locus in *Oryzias celebensis*

竹花 佑介^{1,2}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部アニマルバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Yusuke Takehana^{1,2}

¹Department of Animal Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

²Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

メダカ属には XY 型と ZW 型の性決定様式が混在し、性染色体も種によって異なる。このような多様性は、頻繁な新規性決定遺伝子の獲得によって生じてきたと考えられている。近年の研究から、XY 型の性決定様式をもつセレベスメダカ (*Oryzias celebensis*) の性決定遺伝子座から *Sox7* が同定され、これが新規の性決定遺伝子である可能性が考えられた。そこで本研究では、この遺伝子が本当に性決定機能を有するかどうかを検討するため、ゲノム編集技術を用いてノックアウト実験を行った。しかし、機能欠損変異をもつ個体は性転換しなかったことから、本種の性決定遺伝子が *Sox7* ではないことが示唆された。

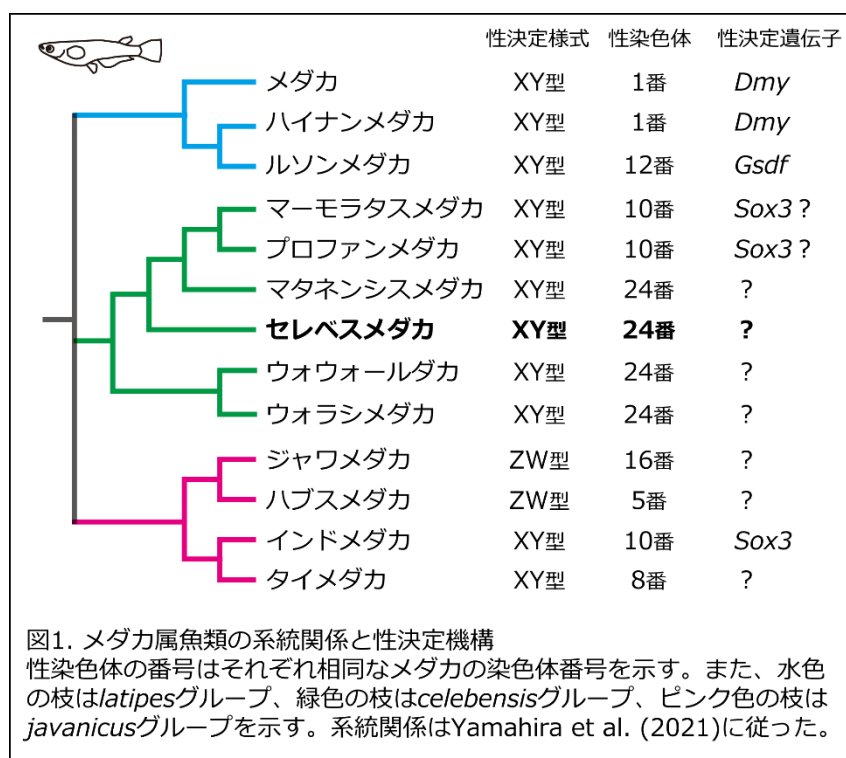
Medaka fishes in the genus *Oryzias* have both XY and ZW sex determination systems, and their sex chromosomes differ among species, suggesting that this diversity have resulted from the acquisition of novel sex-determining genes. Recent studies have identified *Sox7* as a novel candidate sex-determining gene on the XY sex chromosomes of the Celebes medaka (*Oryzias celebensis*). In this study, we conducted a knockout experiment using genome editing technology to examine whether this gene has a sex-determining function. However, knockout fish with the loss-of-function mutations did not show sex reversal, suggesting that this species has a different sex-determining gene.

1. はじめに —メダカ属魚類における多様な性決定機構—

多くの脊椎動物では、性染色体によって遺伝的に雌雄が決定される。性染色体には「性決定遺伝子」が存在し、これが雌雄を決定するマスター因子として働く。例えば、哺乳類は XY 型の性染色体をもち、Y 染色体にはオス決定遺伝子の *Sry* が存在する。ところが、哺乳類以外の脊椎動物には *Sry* が存在せず、性染色体は分類群によって異なることが報告されている。特に魚類の性染色体は多様であり、どの染色体が性染色体になるかは近縁種でさえ異なる場合がある。そのため、魚類の進化過程で新規の性決

定遺伝子が何度も誕生し、それによって異なる性染色体が生じてきたと考えられている¹⁾。実際に、トラフグやパタゴニアペヘレイなどから新規の性決定遺伝子が同定され、TGFβ シグナリングや特定の転写因子群 (DMRT や SOX) の遺伝子が繰り返し性決定機能を獲得してきたことが示唆された²⁻⁵⁾。しかし、それら以外の性決定遺伝子や、その機能獲得機構はほとんどの魚種において明らかにされていない。

魚類のなかでも、メダカ属 (*Oryzias*) は著しく多様な性染色体をもち、それぞれから異なる性決定遺伝子が同定されつつあり、性決定機構の進化研究における重要なモデルとなっている。彼らは XY 型と ZW 型の性決定様式を示し、性染色体も種ごとに異なる⁶⁻¹¹⁾ (図1)。さらに、メダカ (*O. latipes*)、ルソンメダカ (*O. luzonensis*)、およびインドメダカ (*O. dancena*) の Y 染色体からは、それぞれ異なる性決定遺伝子 (*Dmy*、*Gsdf* および *Sox3*) が同定されている^{4),5),12)}。これらのうち、*Dmy* と *Sox3* はそれぞれ異なる DNA 結合ドメインをもつ転写因子をコードするが、*Gsdf* は TGFβ スーパーファミリーに属するリガンドをコードする。また、*Gsdf* はメダカやインドメダカにも存在し、それぞれの性決定遺伝子の下流で精巣分化に関与することから、メダカ属では *Gsdf* がオス決定経路の中心的役割を担っており、*Gsdf* そのもの、あるいはその転写制御因子の多様化によって異なる性決定機構が進化してきたと考えられている。しかし、これら3種以外の近縁種では性決定遺伝子は同定されておらず、その多様化機構の全体像はまだ解明されていない。

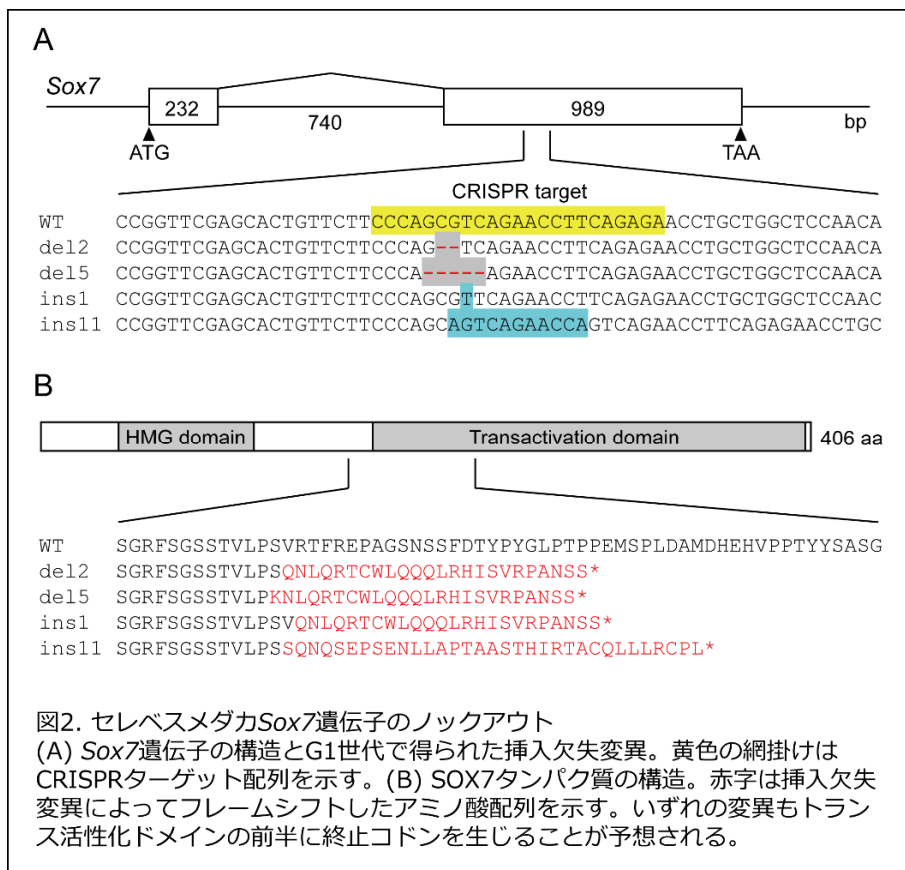


セレベスメダカ (*O. celebensis*) はインドネシア・スラウェシ島の固有種で、性決定遺伝子が解明された上記3種とは異なる *celebensis* グループに属する¹³⁾⁻¹⁴⁾ (図1)。これまでの研究から、本種と近縁な3種 (マタネンシスメダカ、ウォウォールメダカ、およびウォラシメダカ) は共通して XY 型の性決定様式をもち、性染色体はメダカの24番染色体と相同であることが判明している⁹⁾。さらに、その

性決定遺伝子座から *Sox7* 遺伝子が同定され、X 染色体にも Y 染色体にも対立遺伝子が存在することが示された。*Sox7* は *Sox3* や *Sry* と同じ SOX ファミリーに属する転写因子をコードすることから、この遺伝子が本種の性決定遺伝子である可能性が予想された。そこで本研究では、*Sox7* 遺伝子がセレベスメダカにおいて性決定に関与するかどうかを検討するため、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト実験を行った。

2. セレベスメダカにおける *Sox7* のノックアウト

Sox7 の性決定における役割を明らかにするため、CRISPR/Cas9 を用いて第 2 エキソンに挿入欠失変異を誘導した。マイクロインジェクションによって sgRNA と Cas9 mRNA を導入した XY 個体 (G0) を正常個体と交配し、G1 個体を得た。これら G1 胚について変異の有無を調べたところ、すべての個体において挿入欠失変異が検出され、X 染色体と Y 染色体のどちらの対立遺伝子にも変異が導入されていることが確認できた。また、塩基配列を決定してその変異を同定したところ、2 塩基欠失 (*del2*)、5 塩基欠失 (*del5*)、1 塩基挿入 (*ins1*) および 11 塩基挿入 (*ins11*) の 4 種類の変異が認められた (図 2 A)。*del2* は X 染色体と Y 染色体の両方の対立遺伝子から検出されたが、*ins1* は X 染色体からのみ、*del5* と *ins11* は Y 染色体からのみ認められた。いずれもの変異もフレームシフトを生じ、トランス活性化ドメインの大部分を欠くため、これらの変異 SOX7 タンパク質は完全に機能を失っていると考えられた (図 2 B)。



これらノックアウト G1 個体を成魚まで飼育し、その遺伝子型の性と表現型の性を判定した。その結果、X 染色体対立遺伝子の変異 (*Xdel2* および *Xins1*) をもつ XX 個体は 9 個体すべてがメスに、Y 染色体対立遺伝子の変異 (*Ydel2*, *Ydel5* および *Yins11*) をもつ XY 個体は 10 個体すべてがオスに分化し、性転換個体は得られなかった (表 1)。これらノックアウト個体同士の交配から受精卵が得られたことから、これらの個体は妊性をもつ機能的なオスおよびメスであることが示された。メダカ属における性決定遺伝子の機能喪失変異は、いずれのケースでも完全な性転換個体 (XY メス) を誘導することから¹¹⁾⁻¹²⁾、セレベスメダカの *Sox7* は性決定機能をもたないことが示唆される。今後、本種の性決定遺伝子座を詳細に解析することにより、未知の性決定遺伝子を同定できる可能性がある。

表 1. *Sox7* ノックアウト個体における遺伝子型の性と表現型の性

| ノックアウト 対立遺伝子 | XX* | | XY* | |
|-----------------|-----|----|-----|----|
| | メス | オス | メス | オス |
| <i>Xdel2</i> | 8 | 0 | | |
| <i>Xins1</i> | 1 | 0 | | |
| <i>Ydel2</i> | | | 0 | 1 |
| <i>Ydel5</i> | | | 0 | 5 |
| <i>Yins11</i> | | | 0 | 4 |
| 合計 | 9 | 0 | 0 | 10 |

参考文献

- 1) Bachtrog, D., Mank, J.E., Peichel, C.L., Kirkpatrick, M., Otto, S.P., Ashman, T.L., Hahn, M.W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., Vamosi, J.C., Sex determination: why so many ways of doing it?, **PLoS Biol.** 12, e1001899, (2014).
- 2) 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. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). **PLoS Genet.** 8, e1002798, (2012).
- 3) 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. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. **Proc Natl Acad Sci USA.** 109, 2955-2959, (2012).
- 4) 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., *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish., **Nature.** 417, 559-563, (2002).
- 5) 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., Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*., **Nature Communications.** 5, 4157 (2014).
- 6) Tanaka, K., Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related medaka fishes, Substitution of the master sex-determining gene., **Genetics.** 177, 2075-2081, (2007).
- 7) Takehana, Y., Demiyah, D., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*., **Genetics.** 175, 1335-1340, (2007)
- 8) Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in

- the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*., **Chromosoma**. 116, 463–470, (2007).
- 9) Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*., **Chromosome Res.** 16, 801–811, (2008).
- 1 0) Nagai, T., Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Identification of the sex-determining locus in the Thai medaka, *Oryzias minutillus*., **Cytogenetic and Genome Research**. 121, 137–142, (2008).
- 1 1) Myosho, T., Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Turnover of sex chromosomes in *celebensis* group medaka fishes., **G3**. 5, 2685–2691, (2015).
- 1 2) Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*., **Genetics** 191, 163–170, (2012).
- 1 3) Takehana, Y., Naruse, K., Sakaizumi, M., Molecular phylogeny of the medaka fishes genus *Oryzias* (Belontiiformes: Adrianichthyidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 36, 417–428, (2005).
- 1 4) Yamahira, K., Ansai, S., Kakioka, R., Yaguchi, H., Kon, T., Montenegro, J., Kobayashi, H., Fujimoto, S., Kimura, R., Takehana, Y., Setiamarga, D.H.E., Takami, Y., Tanaka, R., Maeda, K., Tran, H.D., Koizumi, N., Morioka, S., Bounsong, V., Watanabe, K., Musikasinthorn, P., Tun, S., Yun, L.K.C., Masengi, K.W.A., Anoop, V.K., Raghavan, R., Kitano, J., Mesozoic origin and ‘out-of-India’ radiation of ricefishes (Adrianichthyidae). **Biol Lett**. 17, 20210212, (2021).