

# インドメダカの生殖腺性分化における *Gsdf* の役割

## Role of *Gsdf* in Gonadal Sex Differentiation in *Oryzias dancena*

竹花 佑介<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Yusuke Takehana<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

<sup>2</sup>Genome 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。一方、性分化遺伝子には共通性がみられ、*Gsdf*が精巣分化に重要な役割をもつことが示唆されつつある。そこで本研究では、XY型のインドメダカ (*Oryzias danena*) について、ゲノム編集技術を用いて *Gsdf* ノックアウト系統を作出し、その表現型を解析した。その結果、機能欠損変異をもつXY個体はメスに性転換し、本種においてもオス分化に必要であることが示された。

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. On the other hand, recent studies have suggested that the *Gsdf* gene has a conserved role in testis differentiation among them. In this study, we generated *Gsdf* knockout strains of *Oryzias danena* using genome editing technology and analyzed their phenotypes. XY knockout fish developed as sex reversed females, suggesting that *Gsdf* was required for male differentiation also in this species.

### 1. はじめに

脊椎動物の多くは性染色体による遺伝性決定であるが、性染色体の起源は分類群によって異なる。特に魚類の多様性は著しく、近縁種が異なる性染色体をもつことも珍しくない。そのため、魚類の進化過程では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頻繁に生じてきたと考えられている。一方、精巣形成や卵巣形成の過程には形態的類似性が認められることから、性決定遺伝子によって活性化される下流の分子機構には、ある程度の共通性が予想される。実際に、*Dmrt1* や *Foxl2* のように、脊椎動物に共通して精巣分化や卵巣分化に関わる遺伝子群が同定されつつある<sup>1-4)</sup>。しかし、これら性分化遺伝子群やその機能にどの程度の共通性があるのかについては、ほとんど理解が進んでいない。

このような種を超えて保存されている性分化遺伝子のひとつに *Gonadal Soma Differentiation Factor* (*Gsdf*) がある<sup>5)</sup>。*Gsdf*は TGF $\beta$  スーパーファミリーに属するリガンドをコードし、2007年にニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の精巣から発見された<sup>6)</sup>。この遺伝子は真骨魚類で広く保存されており、シーラカンスやポリプテルスなどの条鰭類や無尾両生類の一部からも発見されているが、他の四肢類では失われている<sup>7-9)</sup>。また、魚類では共通して精巣のセルトリ細胞と卵巣の顆粒膜細胞で発現し<sup>6),10)-12)</sup>、ゼブラフィッシュでは精巣と卵巣における生殖細胞増殖と卵成熟に関与することが知られている<sup>13)</sup>。さらに、ルソンメダカ (*Oryzias luzonensis*) では、Y染色体上に位置するオス性決定遺伝子として同定された<sup>14)</sup>。本種では、*Gsdf*の対立遺伝子はX染色体とY染色体の両方に存在するが、*Gsdf<sup>Y</sup>*と呼ばれるY対立遺伝子は*Gsdf<sup>X</sup>*よりも早い時期に未分化生殖腺で発現し、この*Gsdf<sup>Y</sup>*を遺伝子導入するとXX個体が雄に性転換することが明らかにされている<sup>14)</sup>。ルソンメダカ以外にも、トラフグ属 (*Takifugu*) の複数種やギンダラ (*Anoplopoma fimbria*) でも*Gsdf*が性決定に関連することが示されており<sup>15)-17)</sup>、*Gsdf*が異なる魚類で独立に性決定遺伝子として進化したことが示唆されている。したがって、*Gsdf*は生殖細胞の増殖や卵成熟だけでなく、一部の魚類では性決定にも関与する分子と考えられている。

魚類のなかでも、メダカ属 (*Oryzias*) は著しく多様な性決定遺伝子をもつが、異なる性決定遺伝子の下流で *Gsdf* が共通してオス分化に関与することが示唆されている。近年の研究から、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ことが明らかにされた<sup>18)-23)</sup>。これらのうち、上述のルソンメダカ以外にも、メダカ (*O. latipes*) とインドメダカ (*O. dancena*) の Y 染色体からそれぞれ異なる性決定遺伝子 (*Dmy* および *Sox3*) が同定された<sup>24)-25)</sup>。ところが、これら3種の XY 個体では共通して、*Gsdf* が高発現する<sup>12),14),25)</sup>。ルソンメダカでは Y 染色体上の *Gsdf<sup>Y</sup>* が性決定遺伝子そのものであるが、メダカでは *Dmy* と *Gsdf* が同一のセルトリ前駆細胞で共発現する<sup>12)</sup>。しかも、メダカにおいて *Gsdf* をノックアウトすると XY 個体がメスに<sup>26)</sup>、*Gsdf* を強制発現させると XX 個体がオスに性転換する<sup>27)</sup>ことから、転写因子である *DMY* が *Gsdf* を活性化してオス分化を導くと考えられている。

インドメダカにおいても、オス決定遺伝子である *Sox3<sup>Y</sup>* 依存的に *Gsdf* 発現が誘導され、*Gsdf* の強制発現によって XX 個体がオスに性転換すること<sup>25)</sup>から、*Gsdf* が *Sox3<sup>Y</sup>* 下流のオス分化遺伝子であることが示唆されている。そこで本研究では、インドメダカで *Gsdf* がオス分化に必要なかどうか明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Gsdf* ノックアウトシステムを作出し、その表現型を解析した。

## 2. *Gsdf* のノックアウト

*Gsdf* の性分化における役割を明らかにするため、CRISPR/Cas9 を用いて第1エクソンに挿入欠失変異を誘導した。14塩基の挿入変異をもつ ins14 系統と37塩基の欠失変異をもつ del37 系統の2系統を作出した。これらの変異はいずれもフレームシフトを生じ、変異対立遺伝子からは216残

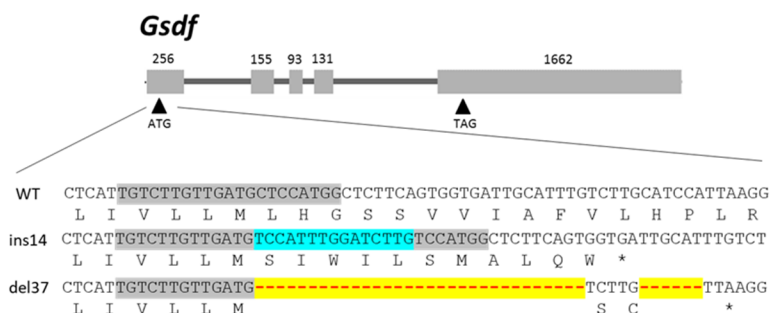


図1. *Gsdf* 遺伝子の構造と挿入欠失変異

網掛けはCRISPRターゲット配列を示し、水色の網掛けは挿入配列、赤字のハイフンは欠失配列を示す。

基の正常な GSDF タンパク質ではなく、フレームアウトとした不完全な配列を含む 12~21 残基の短いタンパク質が予測された。これらの変異はプロドメインを破壊し、TGF $\beta$  ドメインを完全に欠くため、これらの変異 GSDF タンパク質は完全に機能を失っていると考えられた。

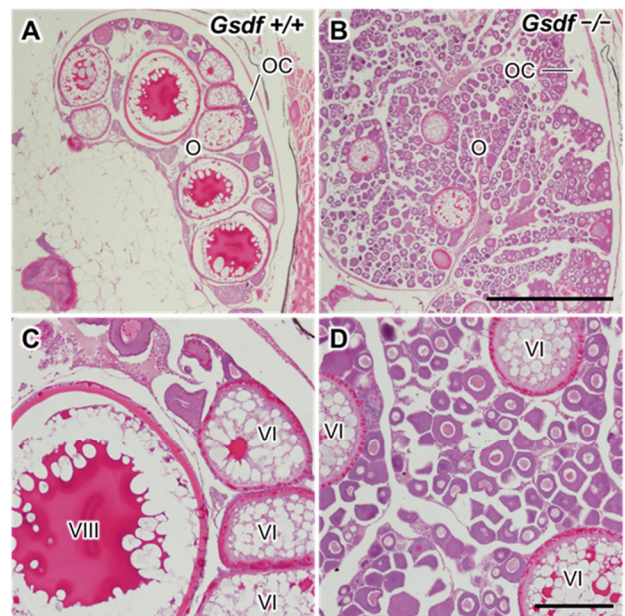
### 3. ノックアウト個体における表現型の性

上記の *Gsdf* 変異をヘテロ接合でもつ個体同士を交配し、次世代を成魚まで育てて表現型の性と遺伝子型の性を判定した。その結果、XX 個体は変異の有無にかかわらずすべてがメスに分化した。一方、XY 個体では、野生型ホモ接合 (+/+) 個体と変異をヘテロ接合でもつ (+/-) 個体はすべてオスに分化したが、変異をホモ接合でもつノックアウト (-/-) 個体の一部はメスに性転換した。性転換の頻度は、ins14 系統では 12 個体中 10 個体 (83%)、del137 系統では 12 個体中 8 個体 (67%) であった。これらの結果から、*Gsdf* が本種のオス分化に必要であることが示された。

### 4. ノックアウト個体における生殖腺の組織学的解析

生殖腺形成における *Gsdf* の役割を明らかにするため、インドメダカのノックアウト個体について、生殖腺の組織学的解析を行った。ノックアウト個体のオスでは野生型よりも大きな肥大化した精巣が認められ、生殖細胞が著しく増加していた。ノックアウト個体でも野生型と同様に成熟精子を含むすべての精子発生段階を含むが、すべての段階のシスト数が増加しており、断面積は野生型精巣の約 3 倍であった。このことから、*Gsdf* は精子の形成や成熟に必要ではなく、生殖細胞の増殖や精巣サイズの調節に関与することが示唆された。

卵巣についても、両種のノックアウト個体では野生型よりも大型で肥大化した卵巣が認められ、生殖細胞も著しく増加していた (図 2)。また、ノックアウト個体の卵巣は野生型に比べて若いステージの卵胞が多く、古いステージの卵胞が少なかった。野生型卵巣には多くの成熟卵胞が存在するのに対し、ノックアウト卵巣には卵黄形成期の卵胞しかなく、ステージ VI 以降の卵胞は認められなかった。これらのことから、*Gsdf* は生殖細胞の増殖や卵巣サイズの調節だけでなく、若い卵胞が蓄積しないように、卵母細胞がステージ VII を超えて成熟するのにも必要であることが示唆された。



**図 2. インドメダカの *Gsdf* ノックアウト (ins14) 系統成魚における卵巣組織像**  
野生型 (*Gsdf* +/+) XY 個体 (A)、およびノックアウト (*Gsdf* -/-) XY 個体 (B) の卵巣と、それらの拡大像 (C および D)。O、卵巣；OC、卵巣腔；VI；卵母細胞 (ステージ VI)；VIII；卵母細胞 (ステージ VIII)。スケールバーは 1 mm (A、B)、あるいは 200  $\mu$ m (C、D) を示す。

## 参考文献

- 1 ) Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J., Zarkower, D., Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. **Nature** 391, 691-695, (1998).
- 2 ) Smith, C.A., McClive, P.J., Western, P.S., Reed, K.J., Sinclair, A.H., Conservation of a sex-determining gene. **Nature** 402, 601-602, (1999).
- 3 ) Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz J.E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G., Schlessinger, D., *Foxl2* is required for commitment to ovary differentiation. **Hum. Mol. Genet.**, 14, 2053-2062, (2005).
- 4 ) Li, M.H., Yang, H.H., Li, M.R., Sun, Y.L., Jiang, X.L., Xie, Q.P., Wang, T.R., Shi, H.J., Sun, L.N., Zhou, L.Y., Wang, D.S., Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs. **Endocrinology**, 154, 4814-4825, (2013).
- 5 ) Hsu, C.W., Chung, B.C., Evolution, expression, and function of gonadal somatic cell-derived factor. **Front. Cell Dev. Biol.** 9, 684352, (2021).
- 6 ) Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 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, (2007).
- 7 ) Forconi M, Canapa A, Barucca M, Biscotti MA, Capriglione T, Buonocore F, Fausto AM, Makapedua DM, Pallavicini A, Gerdol M, De Moro G, Scapigliati G, Olmo E, Scharl M: Characterization of sex determination and sex differentiation genes in Latimeria.. **PLoS One** 8:e56006,2013
- 8 ) Biscotti, M.A., Adolphi, M.C., Barucca, M., Forconi, M., Pallavicini, A., Gerdol, M., Canapa, A., Scharl, M., A comparative view on sex differentiation and gametogenesis genes in lungfish and coelacanths. **Genome Biol. Evol.** 10, 1430-1444, (2018).
- 9 ) Biscotti, M.A., Carducci, F., Barucca, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Scharl, M., Canapa, A., Adolphi, M.C., The transcriptome of the newt *Cynops orientalis* provides new insights into evolution and function of sexual gene networks in sarcopterygians. **Sci. Rep.** 10, 5445, (2020).
- 1 0 ) Gautier, A., Le Gac, F., Lareyre, J.J., The *gsdf* gene locus harbors evolutionary conserved and clustered genes preferentially expressed in fish previtellogenic oocytes. **Gene** 472, 7-17, (2011).
- 1 1 ) Kaneko, H., Ijiri, S., Kobayashi, T., Izumi, H., Kuramochi, Y., Wang, D.S., Mizuno, S., Nagahama, Y., *Gonadal soma-derived factor (gsdf)*, a TGF-beta superfamily gene, induces testis differentiation in the teleost fish *Oreochromis niloticus*. **Mol. Cell Endocrinol.** 415, 87-99, (2015).
- 1 2 ) Shibata, Y., Paul Prasanth, B., Suzuki, A., Usami, T., Nakamoto, M., Matsuda, M., Nagahama, Y., Expression of *gonadal soma derived factor (GSDF)* is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. **Gene Expr. Patterns** 10, 283-289, (2010).
- 1 3 ) Yan, Y.L., Desvignes, T., Bremiller, R., Wilson, C., Dillon, D., High, S., Draper, B., Buck, C.L., Postlethwait, J., Gonadal soma controls ovarian follicle proliferation through *Gsdf* in zebrafish. **Dev. Dyn.** 246, 925-945, (2017).
- 1 4 ) 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 5 ) Rondeau, E.B., Messmer, A.M., Sanderson, D.S., Jantzen, S.G., von Schalburg, K.R., Minkley, D.R., Leong, J.S.,

- Macdonald, G.M., Davidsen, A.E., Parker, W.A., Mazzola, R.S., Campbell, B., Koop, B.F., Genomics of sablefish (*Anoplopoma fimbria*): expressed genes, mitochondrial phylogeny, linkage map and identification of a putative sex gene. **BMC Genomics** 14, 452, (2013).
- 1 6) Herpin, A., Scharl, M., Depincé, A., Guiguen, Y., Bobe, J., Hua-Van, A., Hayman, E.S., Octavera, A., Yoshizaki, G., Nichols, K.M., Goetz, G.W., Luckenbach, J.A., Allelic diversification after transposable element exaptation promoted *gsdf* as the master sex determining gene of sablefish. **Genome Res.** 31, 1366-1380, (2021).
- 1 7) Kabir, A., Ieda, R., Hosoya, S., Fujikawa, D., Atsumi, K., Tajima, S., Nozawa, A., Hirase, S., Koyama, T., Nakamura, O., Kadota, M., Nishimura, O., Kuraku, S., Nakamura, Y., Kobayashi, H., Toyota, S., Tasumi, S., Kikuchi, K., Repeated translocation of a supergene underlying rapid sex chromosome turnover in *Takifugu* fish. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 119, e2121469119, (2022).
- 1 8) 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).
- 1 9) 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).
- 2 0) 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).
- 2 1) Nagai, T., Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Identification of the sex-determining locus in the Thai medaka, *Oryzias minutillus*., **Cytogenet. Genome Res.** 121, 137–142, (2008).
- 2 2) 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).
- 2 3) Myosho, T., Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Turnover of sex chromosomes in *celebensis* group medaka fishes., **G3.** 5, 2685–2691, (2015).
- 2 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).
- 2 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*., **Nat. Commun.** 5, 4157 (2014).
- 2 6) Imai, T., Saino, K., Matsuda, M., Mutation of *Gonadal soma-derived factor* induces medaka XY gonads to undergo ovarian development. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 467:109-114, (2015).
- 2 7) Zhang, X., Guan, G., Li, M., Zhu, F., Liu, Q., Naruse, K., Herpin, A., Nagahama, Y., Li, J., Hong, Y., Autosomal *gsdf* acts as a male sex initiator in the fish medaka. **Sci. Rep.** 6:19738,2016