

氏 名 榮 雄大

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2166 号

学位授与の日付 2020 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 飢餓によるメダカ性転換機構の解明

論文審査委員 主 査 教授 藤森 俊彦
教授 高田 慎治
教授 東島 眞一
教授 諸橋 憲一郎
九州大学大学院医学研究院
教授 田中 実
名古屋大学大学院理学研究科

博士論文の要旨

氏 名 Sakae, Yu-ta

論文題目 飢餓によるメダカ性転換機構の解明

Mechanism for sex reversal by starvation in the teleost fish, medaka

Medaka employs an XX/XY genetic sex determination system and shows no sex reversal (SXR) under laboratory conditions. However, sex-reversed individuals are observed at a low frequency in natural environment. Although XY sex-reversed females carry a mutation in the sex determination gene (*dmy*), only a small fraction of sex-reversed XX males carry any genetic mutation. This observation suggests that the sex of medaka is affected by environmental factors. I chose starvation as an environmental factor because metabolism is associated with many reproductive phenomena. Medaka larvae were starved for 5 days starting from the day of hatching during sex differentiation. I found that starvation after 5 days of hatching caused female to male SXR (20%). To examine the mechanism underlying SXR, I counted the number of germ cells because the appropriate regulation of germ cells is important for medaka sex differentiation. Although the number of type I (stem type) germ cells was unchanged following starvation, that of type II (mitotically dividing cystic type) germ cells decreased in starved XX larvae as compared with that in regular feeding XX larvae. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) and principal component analysis (PCA) based on metabolome data (capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry [CE-TOFMS], ion chromatography-Fourier transform mass spectrometry [IC-FTMS], and liquid chromatography tandem mass spectrometry [LC-MS/MS]) indicated that 5 days of starvation induced changes in lipids and water-soluble metabolites.

These results raise the question whether the number of germ cells and/or metabolic changes affect starvation-induced SXR. To address this question, I

generated XX larvae with a low number of germ cells, as seen in starved XX larvae, without any metabolic changes using busulfan (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 ng/mL) treatment. XX larvae treated with busulfan showed no SXR, indicating that metabolic changes may contribute to SXR under starvation conditions.

Pantothenate was identified as a candidate metabolite in starvation-induced SXR based on two different metabolome data (CE-TOFMS and IC-FTMS). While the level of pantothenate increased in starved XX larvae, the downstream metabolites of the pantothenate metabolic pathway did not. The transcript level of *pank1a*, the gene encoding one of the rate-limiting enzymes in the pantothenate metabolism pathway, decreased following starvation. I hypothesized that the suppression of the pantothenate metabolic pathway is related to SXR. Consistently, the 5-day suppression of pantothenate metabolic pathway using a Pank inhibitor (50 μM) after hatching resulted in female to male SXR (15%). The final metabolite of the pantothenate metabolic pathway is CoA, an essential metabolite involved in many metabolic pathways, including the tricarboxylic acid (TCA) cycle, mevalonate pathway, and lipogenesis. Oil Red O staining and HPTLC analysis indicated that the level of triacylglycerol dramatically decreased after 5 days of starvation. The suppression of the first step of lipogenesis, fatty acid synthesis, with C75 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment for 5 days after hatching led to female to male SXR (13%). These observations suggest that the alterations in metabolism, especially pantothenate metabolism and fatty acid synthesis, induce female-to-male SXR. How metabolism is related to SXR is, however, unclear.

I investigated this by evaluating the transcript levels of the already-known sex-related genes (female genes: *foxl2* and *aromatase*; male genes: *gsdf* and *dmrt1*) in XX larvae with RT-qPCR. XX larvae after 5 days of starvation showed a decrease in female genes (*foxl2* and *aromatase*) and an increase in male genes (*dmrt1*), suggesting that the increase in *dmrt1* expression in females may induce

SXR. I confirmed this hypothesis by subjecting *dmrt1* mutants ($\Delta 13$) maintained in my laboratory to starvation for 5 days after hatching. The treated mutant XX failed to show any SXR, indicating that *dmrt1* is necessary for starvation-induced SXR.

Taken together, 5-day starvation suppresses the pantothenic acid metabolism and reduces fatty acid synthesis in XX larvae. Genetic females develop into males owing to *dmrt1* expression. These results raise the possibility that lipids, including fatty acids, repress *dmrt1* expression in female gonads. To address this possibility, I focused on peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) that can recognize some lipids as ligands and regulate the expression of downstream genes. I found that PPAR α was expressed in the XX medaka gonad. Its recognition site was approximately 1 kb upstream from the first ATG of *dmrt1*. Inhibition of PPARs using GSK0660 (20 μ M) induced *dmrt1* expression in XX medaka gonads. All these findings allow me to propose the existence of a novel regulation system for medaka sex differentiation through lipids.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 柴 雄大

Title
論文題目 飢餓によるメダカ性転換機構の解明

申請者は予備審査における博士論文内容に対する指摘を受けて改定を行い、2020年1月30日に行われた本審査会においては約40分間その改定博士論文を口頭発表し、内容について30分ほどの質疑応答を受けた。

博士論文は「遺伝的性決定を行うメダカが、幼魚期に5日間の飢餓状態にさらされると遺伝的性とは異なる性を示す（性染色体 XX をもつメダカが機能的にオスとなる）仕組みを、メダカ変異体やトランスジェニックメダカを用いて、薬理学的実験とメタボロームを通じて解析した内容」である。申請者はメダカ幼魚が飢餓状態になることによって CoA を産生するパントテン酸代謝が低下すること、またトリアシルグリセロール (TG) 産生が有意に減少することを見出し、これらの個体が成熟した時に約10-20%が性転換する (XX オスになる) ことを見出した。さらにパントテン酸代謝やトリアシルグリセロール産生の阻害剤によっても TG 産生が低下してオス化すること、またこの性転換が *dmrt1* 依存的であることを示した。この飢餓メスにおける *dmrt1* 発現誘導がオーファン核受容体 PPAR に関与することも阻害剤実験で示唆した。

以上の研究により申請者は、遺伝的に性が決まるメダカにおいても、飢餓という環境によって性が変わりうる機構を内包し、その機構には脂質代謝という体内代謝が関与していること主張する。本研究は脊椎動物全体の性の研究においても、代謝の制御が性決定分化に関与することを示した初めての研究といえる。

本論文の結果の一部は査読のある国際学術誌 **Biology Open** に受理されている。本論文の内容は新規性が高く、結果に至る十分な質と量の研究がなされていると判断された。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A4 縦型とする。
2. 1行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページ当たり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in