

氏 名 谷津 遼平

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1844 号

学位授与の日付 平成28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 Research on the mechanisms of temperature-dependent sex  
determination in American alligator (*Alligator  
mississippiensis*)

論文審査委員 主 査 教授 吉田 松生  
教授 井口 泰泉  
准教授 成瀬 清  
准教授 伊藤 道彦 北里大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Reproduction is one of the core aspects of life science, and has vast implications from genetic to population level studies. Gonochorism is widely employed among vertebrates to allow reproduction, and many of the individual variation in genetics, physiology, and behavior result from the sex of the individual, and hence sex determination mechanism is one of the key areas of interest in biology. In vertebrates, sex determination system can be broadly subdivided into two categories. Sex determination system based on intrinsic genotypic factors, in which the sex is determined at fertilization, is more commonly observed among the vertebrates, and can mainly be classified by heterochromosomes, such as XX/XY, ZW/ZZ systems. This system results in a 50:50 ratio between male and female production, and is a highly stable system. In contrast, sex determination system can also be regulated by biotic or physiological environmental factors, such as population density, photoperiod and temperature. Sex determination regulated by the latter is known as temperature-dependent sex determination (TSD), in which the temperature of the surrounding environment during embryonic development determines the sexual fate of the individual. TSD is most notably present among reptiles such as crocodylians, turtles, and a few lizards. This includes the American alligator, *Alligator mississippiensis*. In *A. mississippiensis*, egg incubation at 30°C and lower temperatures induces female development, while incubation at slightly higher temperature 33.5°C induces male development. However, much of the details concerning its underlying molecular mechanism remain unelucidated, and the genetic framework that allows transfer of thermal signal to activation of male/female sex determination cascade is little understood. This is further hindered by the fact that, at the moment, reptiles are one of the vertebrate clades that cannot be genetically manipulated effectively.

In this thesis, the contribution and the further advancements toward understanding the TSD mechanism using American alligator is documented. The thesis is composed of two chapters. First chapter examines the initial elusive thermosensitivity mechanism and provides evidence for involvement of thermosensitive cation channel Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) in the alligator TSD. Second chapter examines the transcriptome of the gonad during the initial phases of sex determination, one of the least understood periods of TSD, and comprehensively categorizes gene expression changes that might be part of the sex determination cascade in alligators. These two chapters provide novel insight of TSD that has neither been observed in other TSD species nor in GSD species as well.

Molecular link between temperature and genetic cascade has been one of the key missing links to explain the genetic framework behind TSD. In the past, several candidate genes and theories have been proposed. Here, a prominent vertebrate environmental sensor Transient Receptor Potential (TRP) channels are focused upon, and high TRPV4 expression was found in the gonad during sex determination period in alligator embryos. Functional characterization of alligator TRPV4 channel via voltage-clamp method revealed that alligator TRPV4 is activated in warm temperature environment, proximate to the temperature range associated with alligator TSD. Using *in ovo* drug administration experiment, selective inhibition and activation of TRPV4 channel were shown to induce both down and upregulation of key genes involved in male sex differentiation. Inhibition of TRPV4 at male producing temperature resulted in partial feminization in some of the individuals, such as increase in Müllerian duct prominence.

Additionally, much of the genetic information on crocodylians were, until fairly recently, unavailable. Hence, knowledge on the gene expressions was very limited, especially during the initial phases of TSD, in which very little apparent sexual dimorphism are present. RNAseq analysis on the developing gonads during TSD allowed comprehensive characterization of the gonadal transcriptome. Potential clues to TSD mechanisms were observed, such as immediate temperature-dependent downregulation of jumonji protein *KDM6B* and *JARID2*, associated with histone modification, and upregulation of transcription factor *C/EBPA*. Two hundred thirty genes were deemed as potentially involved in sex determination, which included few non-coding RNAs, and genes known to function in sex determination of other species, such as *HEMGN*, and *ARX*. Nine transcription factors were also identified, and an inferred regulatory gene network was constructed.

These findings from each chapter are documented in two papers. These findings provide opportunity for several further insights to TSD, and can be powerful tools for future studies, and serve as basis for further understanding gonadal fate pathway during vertebrate sex determination.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

地球上の生物が見せる多様な性決定様式は、生物の繁栄と多様性を司る重要な基盤の一つである。動物の性決定様式は、大きく遺伝型性決定と環境依存型性決定の二つに分類される。遺伝型性決定は染色体の構成など、遺伝的要素により個体の性が決まり、多くの動物で見られる。一方、環境依存型性決定は、発生時期における温度、栄養状態、光周期等の環境条件により性が決まる。脊椎動物においては、卵の孵卵温度により性が決まる温度依存型性決定がワニやカメ等の一部の爬虫類で報告されている。しかしながら、特に初期に温度環境を受容する仕組みや、その下流となる遺伝子発現制御などは十分に解析されておらず、その分子機構の詳細は未だ不明であった。本学位論文は、爬虫類における温度依存型性決定・分化の分子機構の一端を明らかにしたものである。

ミシシッピーワニは発生時期に30℃、若しくは33.5℃で孵卵温度を維持した場合、最終的にそれぞれ雌、雄に性分化する。過去の知見から、温度受容機構は生殖腺に内在されている事が示唆されているが、様々な温度受容機構が想定されている。その中で、出願者は動物で主要な環境センサーとして知られているTransient Receptor Potential (TRP) イオンチャネル群に注目した。TRPイオンチャネルは生体膜に局在し、温度を含む様々な外部刺激によって活性化され、カルシウム等のカチオンが流入することで細胞内に情報を伝達する。本研究ではまず、ワニの性決定時期における生殖腺で発現しているTRPチャネルをクローニングした。その中の一つであるTRPV4で、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理実験を行ったところ、このTRPチャネルはワニの雄産生温度領域付近での活性が確認された。したがって、TRPV4がワニの温度依存型性決定における温度受容因子の候補であることがわかった。そこで、性決定時期のワニの卵にTRPV4チャネルの阻害剤あるいは活性剤を暴露し、数週間後に性分化への影響を調べた。その結果、雄産生温度（33.5℃）で孵卵した胚の生殖腺において、TRPV4チャネル活性を阻害することで、精巣化に重要な遺伝子である*AMH*と*SOX9*の発現が抑えられることが明らかとなった。さらに、生殖腺の形態や卵管原基（ミュラー管）の発達等、表現型が雌性化した個体が認められた。一方で、*CYP19A1*等の卵巣化に重要な遺伝子の発現は、薬剤曝露による影響は見られなかった。以上の結果から、TRPV4は、主に生殖腺の雄性化に寄与する可能性が示唆された。

孵卵温度による生殖腺への初期影響について、温度受容後の遺伝子発現を時系列的かつ網羅的に解析するために、性決定期直前から性分化の期間中の生殖腺のトランスクリプトーム解析を行った。雌誘導温度、雄誘導温度で孵卵した胚の生殖腺のトランスクリプトームを比較解析した。温度変化に応答性が見られた遺伝子を調べた結果、*KDM6B*や*JARID2*等のヒストン修飾、*UCP2*等のエネルギー代謝、及び*C/EBPA*等の転写制御に関連する遺伝子に発現変動が見られた。これらの遺伝子は、温度依存型性決定において、外部環境シグナルが生体内シグナルに変換されるメカニズムに迫るための重要な候補遺伝子となるものである。

以上の結果から、本研究はミシシッピーワニにおける温度依存型性決定を用いて、初期の環境温度受容機構の候補因子を同定し、さらに遺伝子発現解析による温度依存型性決定・性分化機構の分子基盤の整備を行ったものであり、その成果は国際誌に発表されてい

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

る。本論文は、ミシシッピーワニを用いて温度依存型性決定の分子機構の一端を明らかにした点において、博士論文として十分値するものであると、審査員全員一致で結論した。