

飢餓によるメダカ性転換機構の解明

榮 雄大

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科

基礎生物学専攻

令和元（2019）年度

背景

動物における性の決定様式は、遺伝的性決定もしくは環境的性決定に大別される (Bull, 1985; Marin and Baker, 1998; Zarkower, 2001)。遺伝的性決定をする動物ではマウスの *Sry* に始まり、アフリカツメガエルの *DM-W* やメダカの *DMY/dmrt1bY* が性決定遺伝子として同定されている (Koopman et al., 1991; Yoshimoto et al., 2007; Matsuda et al., 2002; Matson and Zarkower, 2012)。一方で環境的性決定をする動物において、多くの爬虫類で温度が、アブラムシでは光周期が性を決める環境要因として報告されている (Bull, 1985; Guler et al., 2012; Hardie, 1981)。

多くの哺乳類が遺伝的に性を決めるのに対して、魚類の性の決定様式は多様である。性決定遺伝子を持つ遺伝的性決定の魚種だけでなく、温度や pH などの環境によって性を決める種や、性決定遺伝子を持つが温度によっても性が制御されるヨーロッパシーバスなどの種も認められる (Saillant et al., 2002; Rubin et al., 1985; Blanche Capel, 2017;)。

本研究で使用しているメダカは、Y 染色体上にある性決定遺伝子 *DMY/dmrt1bY* によって性が決まり、通常飼育環境では性転換しない。しかし、野生メダカ集団からはまれに性転換個体が認められる (Shinomiya et al., 2004)。オス (XY) からメスへの性転換個体では、性決定遺伝子 *DMY/dmrt1bY* への自然突然変異が原因であることが報告されているが、メス (XX) からオスへの性転換個体では、一部の個体例で遺伝性的の変異であることが調べられたのみで、他の個体例に関しては性転換した機構は未だ不明である (Otake et al., 2008; Shinomiya et al., 2010; Shinomiya et al., 2004)。このことは、他の魚種での性決定様式を考えると、メダカが環境によっても性が影響されうる可能性も暗示していた。実際に、環境要因によってもメダカの性は影響を受け、胚性期からの高温処理によって遺伝的にメスのメダカ (XX) がオスへと性転換し、そこではコルチゾールの関与が示唆されている (Hayashi., 2010)。以上のことは、メダカは性決定遺伝子 *DMY/dmrt1bY* を持つ遺伝性決定動物であるにもかかわらず、環境要因にも応答して性が制御されることを示している。

また所属研究室により、メダカの性は性分化時期の生殖細胞の数によっても制御されることが明らかにされている (Morinaga et al., 2004; Morinaga et al., 2007; Kurokawa et al., 2007; Nakamura et al., 2012)。メダカにおける性分化時期の生殖細胞の数は形態学的に認められる最初の性差で、遺伝的メス (XX) メダカは XY メダカよりも多くの生殖細胞を持つ。生殖細胞が異常に増える *hotei* 変異体では、約半数の XY メダカがメスへと性転換する (Morinaga et al., 2007; Nakamura et al., 2012)。一

方で、生殖細胞を失った XX メダカはオスへと性転換する (Morinaga et al., 2004; Kurokawa et al., 2007)。これらのことは、メダカの性分化には生殖細胞数の適切な制御が重要であることと、生殖細胞にメス化を維持または促す能力があることを示している。その一方で、環境要因で生殖細胞の数が増減すれば、メダカの性も影響を受けることが示唆される。

ショウジョウバエ卵巣の Germarium には、幹細胞ニッチに隣接する卵原細胞、幹細胞ニッチから離れ分化していくシストブラスト、不完全な細胞質分離を行うシストと濾胞の 4 種類の生殖細胞が存在している (Dániel Kirilly & Ting Xie, 2007)。5 日間の低栄養状態で処理されたショウジョウバエの卵巣では、アポトーシスによりシストの数が減少し、卵巣が退縮する (Barbosa and Spradling, 2001)。また通常の栄養条件から低栄養条件へ切り替えると 1 日後には産卵しなくなり、逆に低栄養条件から通常の栄養条件へと切り替えると切り替えの 2 日後から産卵が認められる (Barbosa and Spradling, 2001)。これらは栄養状態によって生殖細胞の数や分化が制御されることを示唆した。

そこで、栄養状態がメダカの生殖細胞数や性決定・性分化に影響を与えないかをメダカの性分化時期に飢餓処理をすることで検討し研究を進めた。

材料及び方法

1. メダカの飼育と薬理処理

メダカ (OK-Cab 系統、d-rR 系統) は、 $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、明期 14 時間暗期 10 時間の長日条件下で飼育した。飢餓処理した仔魚の成魚での性転換の確認には OK-Cab 系統と d-rR 系統の 2 種類を用い、他のすべての実験では OK-Cab 系統を用いた。飢餓、ブスルファン (300 pg/mL, 3 ng/mL, 30 ng/mL, 300 ng/mL, 3 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$)、パントテン酸 (20 μM , 200 μM , 2 mM, 033-14165, Wako) 処理では孵化直後のメダカ仔魚最大 50 匹を 1 L の止水処理水で飼育し、飼育水は毎日交換した。パントテン酸キナーゼ (Pank) 阻害剤 (1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 537983, MERCK)、C75 (FAS 阻害剤, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, C5490, MILLIPORE SIGMA) と GSK0660 (20 μM , ab141428, abcam) 処理では、最大 30 匹の孵化直後の仔魚を 90 mm シャーレ (山本製作所) を用いて 30 mL の処理水で処理し、毎日処理水を交換した。処理用の水は、阻害剤投与前に 0.22 μm フィルター (Merck Millipore) で滅菌した。餌はオトヒメ B2 (日清丸紅飼料) を使用した。

2. 遺伝的性の判定 (性タイピング)

遺伝的性を判定するために、孵化後 5 日目のメダカ仔魚もしくは孵化後 3 か月のメダカ成魚の尾ヒレの末端を切り、10 μL の lysis バッファーとともに 8 連 PCR チューブ (NIPPON Genetics) に入れた。-80°C で 10 分間凍結し、95°C で 15 分煮沸した後、滅菌水 40 μL を加えて、13,000 rpm で 1 分遠心した。遠心後の上澄み 0.3 μL を 2.25 μL の PCR 反応液と混合し、Y 染色体上の性決定遺伝子 *DMY/dmrt1bY* と常染色体 (ポジティブコントロール) 上の *cyp19a* に対する 2 種類の TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR には StepOne Plus (Applied Biosystems) を使用した。*DMY/dmrt1bY* の増幅が認められた個体を XY とした。PCR サイクルは、25°C 30 秒; 95°C 20 秒; [95°C 3 秒; 60°C 20 秒]x30 で行った。TaqMan プローブとプライマーは表 1 に示す。

3. メダカ仔魚の卵黄の観察と体長の計測

メダカ仔魚における卵黄の有無を確認するために、MS-222 (160 mg/mL) /1x BSS で麻酔した後に開腹して卵黄嚢を実体顕微鏡下 (Olympus, SZX12) で視認した。メダカ仔魚の体長の計測には、後述の免疫染色用に 4% PFA/ 1x PBST で一晩固定したメダカ仔魚の頭部の先端から尾ヒレの末端までを使用した。

4. Oil Red O による中性脂質の染色

孵化後 5 日目のメダカ仔魚を開腹せずに 10% ホルムアルデヒド液で固定した (4°C、少なくとも 10 時間)。1x PBS で 10 分 3 回室温で洗浄後、60% の 2-プロパノールに通してサンプルとした。Oil Red O (SIGMA, O0625-25G) を 3 mg/mL の濃度で 2-プロパノールに溶かしてストック液とした。染色直前に上述のストック液を滅菌水と 3:2 (ストック:水) で混合し、10 分室温で静置した後に 0.22 μm フィルター (Merck Millipore) で溶けきらなかった結晶を除去し染色液とした。2-プロパノールを除去したサンプルを染色液に浸し、振盪して染色した。染色後のサンプルは、60% の 2-プロパノールで 10 分間 3 回室温で洗浄し、実体顕微鏡 (Olympus) で観察し撮影した。

5. 高感度薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による脂質分析

Bligh and Dyer, 1959; Mita *et al.*, 1989 に記載のプロトコルに従い、以下の手順で孵化後 5 日目のメダカ仔魚サンプルから脂質を全抽出した。4 匹の孵化後 5 日目のメダカ仔魚を 1.5 mL のホモジェナイズ用チューブ (ニッピ) と BiomasherII (ニッピ) を用いて 500 μL の氷冷した MilliQ 水とともにホモジェナイズした。ホモジェナイズし

た溶液 400 μL を 1.5 mL の抽出液（クロロホルム：メタノール=1:2）とネジ付試験管内（Iwaki, TST-SCR15）で混合し、軽くボルテックスした後、室温で 30 分から 2 時間静置した。その間、15 分毎にボルテックスをした。脂質抽出液を静置している間に、後の作業で使用するネジ付試験管（Iwaki, TST-SCR15）、ガラス漏斗（アズワン、ガラスロート 30）および濾紙（アドバンテック, No.2）を抽出液で共洗いした。脂質抽出液をガラス漏斗と濾紙で濾過し、濾液は共洗いした別のネジ付試験管に受けた。750 μL の抽出液で脂質抽出液が入っていた古いネジ付試験管を洗い、先ほどのガラス漏斗と濾紙で濾過した。濾液に 750 μL のクロロホルムと 1.1 mL の MilliQ 水を加えてボルテックスした後、300 rpm で 15 分室温で遠心した。分離した下層全量をパスツールピペット（Iwaki, IK-PAS-5P）で 2.0 mL チューブに移し（約 900 μl ）、ベンゼンを 2 滴ほど加えた。窒素ガスを吹きつけて溶媒を完全に揮発させた後、20 μL の再懸濁用液（クロロホルム：メタノール=1：1）に再懸濁した。4.5 μL の全脂質溶液を HPTLC プレート（Merck Millipore, Silica gel 60 F₂₅₄ 25size 20x20 cm）にマイクロシリンジ（Hamilton, 7105KH pst-3）を用いて塗布した。

脂質の展開には、3 種類の展開液が別々に入った 3 つの展開層を使用して行った。HPTLC プレートは、脂質サンプルを塗布する前に TLC 用展開層 1 中で展開液 1（クロロホルム：メタノール：水=60：35：4）によって洗浄した。脂質サンプルを塗布した洗浄済みの HPTLC プレートを展開層 2 に入れて展開液 2（クロロホルム：メタノール：酢酸：ギ酸：水=35：15：6：2：0.5）で HPTLC プレートの下から 4.5 cm まで展開した。HPTLC プレートを取り出し乾燥後、展開層 3 に入れ展開液 3（n-ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸=70：30：1）で HPTLC プレートの下から 8 cm まで展開した。展開層 3 から HPTLC プレートを取り出して、乾燥させた。展開した脂質を染色するために、酢酸銅/リン酸溶液に浸してから乾燥させた。乾燥した HPTLC プレートを 140-180°C ホットプレートで 15 分程度熱して、各脂質成分のバンドを検出した。染色後の HPTLC プレートを直ちに Printgraph (ATTO) で撮影し、撮影像から Fiji を用いて各脂質バンドの輝度を計測して比較した。

6. 性転換の同定

孵化後 3 か月のメダカ成魚の表現型の性を、尻ビレと背ビレの形態、そして泌尿生殖突起の有無によって判定し、尾ビレの末端を切り取り、メダカは個々に小カップに移した。遺伝的性は切り取った尾ビレの末端を用いて「2. 遺伝的性の判定 (性タイピング)」に記した通りに行った。

7. ホームマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH)

孵化後 5 日または 6 日目のメダカ仔魚を MS-222 (160 mg/mL) / 1x BSS で麻酔後に開腹して、4%PFA/ 1xPBST で一晩固定後、100%メタノールで脱水して WISH 用サンプルとした。PBST で洗浄後、PBST 中で表皮をピンセットを用いて除去し、Aoki et al., 2008 に記載されたプロトコールに従って WISH を行った。各プローブ合成に使う DNA 鋳型は、孵化後 5 日目のメダカ仔魚 (XX と XY の混合) から抽出した *toatl* RNA から合成した cDNA をもとに各遺伝子に特異的な T7 プロモーターのタグ付き R プライマーと F プライマーを用いて作製した (表 1)。Total RNA の抽出法は「13. RT-qPCR による遺伝子発現解析」に記載した。

8. 蛍光免疫染色と生殖細胞数のカウント

上記 WISH と同様に用意した孵化後 5 日目のメダカ仔魚サンプルに対して、Nakamura et al., (2006) に記載のプロトコールに従って蛍光免疫染色を行った。使用した一次抗体は、anti-OLVAS (medaka Vasa antibody, 1/100, rat)、anti-GFP (1:100, mouse; Clontech)。また、Alexa 488-conjugated secondary antibodies (1:100)、Alexa 568-conjugated secondary antibodies (1:100)、Alexa 647-conjugated secondary antibodies (1:100) を二次抗体として使用した。実体顕微鏡下で免疫染色したサンプルから腸を外し、生殖腺を露出させた身体全体をスライドガラスの上に塗布した 1.4% アガロースに VECTASHIELD (VECTOR LABORATORIES) とともにマウントした。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS, FV-1000) で Z スタックも含めて生殖腺全体を撮影した。撮影像を FV10-ASW 2.1 Viewer (OLYMPUS) で観察し、マニュアルで I 型と II 型生殖細胞を区別して全て計測した。

9. 全 XX メダカ仔魚の準備

Kurokawa et al., (2007) に記載の *cxcr4* (1000 ng/mL) と *nanos3* (1000 ng/mL) のモルフォリーノのカクテルを 1-2 細胞期の受精卵にマイクロインジェクションして、生殖細胞が少ないメダカを作出した。マイクロインジェクションから約 3 か月後に「6. 性転換の同定」に従って、遺伝的メス (XX) からオスへの性転換個体を抽出し、稔性のある性転換オス (XX) を通常メス (XX) と交配し、全 XX メダカ仔魚の受精卵を得た。

10. メタボローム解析 (CE-TOF-MS)

孵化後 5 日目の全 XX メダカの仔魚 (給餌、飢餓)、20 匹を 1 実験として 3 実験分用意した。MS-222/1x BSS で麻酔した 20 匹の全 XX メダカの仔魚を迅速にジルコニアビーズ 5MM (Retsch) とともに 2.0 mL チューブ (SARSTEDT) へ入れ、水分を除去して直ちに液体窒素で凍結した。

10-1. 代謝物サンプルの準備

凍結された 20 匹の孵化後 5 日目のメダカ仔魚由来の水溶性代謝物を、ミキサーミル (Retsch, MM310, 周波数 27 Hz で 1 分間) を使用して、8 μ M の参照化合物 (陽イオン分析: メチオニンスルホン、陰イオン: 10-カンファースルホン酸) を含むメタノール 500 μ L に抽出した。抽出物を遠心分離 (4°C、15,000 g、3 分間) した後、上清をチューブに移し、そこに 500 μ L のクロロホルムと 200 μ L の水を加えた。上層を遠心濃縮機を使用して 45°C で 30 分間蒸発させて 2 層を得た。オリゴ糖などの高分子量化合物を除去するため、4°C で 90 分間、9,100 g のカットオフフィルター (PALL Nanosep, 3-kDa) で上層を遠心ろ過した。ろ液を遠心濃縮機で 120 分間乾燥させた。残留物 (各サンプル約 25 mg) を、200 μ M 内部標準 (陽イオン分析: 3-アミノピロリジン、陰イオン分析: トリメシン酸) を含む 20 μ L の水に溶解し、ピーク注釈ステップにおける移動時間の補正に使用した。

10-2. CE-TOF-MS の条件

Agilent G7100A CE 機器 (Agilent Technologies)、Agilent G6224A TOF LC / MS システム、Agilent 1200 Infinity シリーズ G1311C クアッドポンプ VL、G1603A Agilent CE を使用した。MS アダプタ、および G1607A Agilent CE-ESI-MS スプレーヤキット、ソフトウェア G1601BA 3D-CE ChemStation for CE は、G3335-64002 MH ワークステーションで使用した。分離は、陽イオン分析用の 1 M ギ酸または陰イオン分析用の 20 mM ギ酸アンモニウム (pH 10.0) を電解質として充填したフューズドシリカキャピラリー (内径 50 μ m × 全長 100 cm) を使用した。キャピラリーの温度を 20°C に維持し、サンプル溶液を 50 ミリバールで 15 秒間 (15 nL) 注入した。分離の際に印加される電圧は 30 kV だった。0.5 μ M のレセルピンを含む 50% (v/v) のメタノール/水を、シース液として 10 μ L/min で使用した。エレクトロスプレーイオン化 (ESI)-TOF-MS は、陽イオン分析では陽イオンモードで、陰イオン分析では陰イオンモードで行い、キャピラリー電圧は 30 kV に設定した。また、加熱乾燥窒素ガス (ヒーター温度 300°C) の流量を 10 L/min に維持した。フラグメンター、スキマー、および Oct RFV 電圧は自動的に最適値に設定された。取得した各スペクトルの自動再キャリブレーション

ンは、参照化合物の参照質量を使用して実行した。カチオン分析用のメタノール二量体イオン ($[2M + H]^+$ 、 m/z 65.0597) およびレセルピン ($[M + H]^+$ 、 m/z 609.2806) またはギ酸二量体イオン ($[2M-H]^-$ 、 m/z 91.0037) およびアニオン分析用のレセルピン ($[MH]^-$ 、 m/z 607.2661) は、正確な質量測定のためのロック質量を提供した。正確な質量データは、50~1000 m/z の範囲で 1.5 サイクル/秒の速度で取得された。CE-TOF-MS システムでのすべての単一シーケンス分析 (最大 36 サンプル) で、サンプル分析の開始時と終了時に標準化合物混合物を分析した。

10-3. CE-TOF-MS データのデータ処理

RIKEN の社内ソフトウェア (非公開) を使用して、元のデータファイル (.d) を一意のバイナリファイル (.kiff) に変換した。サンプルのピークピッキングとアライメントは、別の社内ソフトウェアを使用して自動的に実行された (非公開)。検出された内部標準を含む標準化合物の m/z および移動時間の値とは対照的に、同じソフトウェアを使用してピークに自動的に注釈が付けられた。正規化のために、検出されたピークの個々の面積を内部参照標準のピーク面積で割った。標準化合物の検量線に基づいて、ピーク面積値を量に対応する値に変換した。

11. メタボローム解析 (IC-FTMS と LC-MS/MS)

各処理後のメダカ仔魚 (孵化後 5 日目) の尾ヒレの先端を切除し、10 μ L の lysis バッファーが入った 8 連 PCR チューブに移し、「2. メダカの遺伝的性の判定 (性タイピング)」に従って *DMY/dmrt1bY* 遺伝子の有無にもとづく遺伝的性の判定を行った。残った身体は尾ヒレ切除後、直ちに 1.5 mL チューブに移して水分を可能な限り除去して液体窒素で凍結しサンプルとした。1 匹を 1 実験として $n = 4\sim 5$ で解析を行った。

11-1. メタボローム分析のための代謝物サンプルの調製

メタボローム分析のための代謝物抽出は、Oka et al., (2017), Miyazawa et al., (2017) に記載されている方法に従った。1 匹の孵化後 5 日目の凍結メダカ仔魚と内部標準 (IS) 化合物 (以下を参照) を、手動ホモジェナイザー (Sarstedt, Finger Masher (AM79330)) を使用して氷冷メタノール (500 μ L) 中でホモジェナイズし、その後、等量のクロロホルムと 0.4 倍量の超純水 (LC / MS グレード、和光) を加えた。次いで、懸濁液を 15,000 g で 4°C で 15 分間遠心分離した。遠心分離後、限外濾過チューブ (Human Metabolome Technologies, Ultrafree MC-PLHCC) を使用して水層を限外濾過した。ろ液を真空濃縮器 (Thermo, SpeedVac) で濃縮し、濃縮されたろ液を 50 μ L の超純水に溶解し、LC-MS / MS および IC-MS 分析に使用した。

11-2. 内部および外部標準による代謝産物の定量化

代謝物の濃度計算には、内部（抽出前に組織に追加）および外部（各化合物の検量線の作成に使用）標準化合物の両方を使用した。

<内部標準 (IS) 化合物>

陰イオン代謝物の IS として、2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) および 1,3,5-ベンゼントリカルボン酸 (トリメセート) を使用した。これらの化合物は組織には存在しない。サンプル調製中の内因性代謝物の損失は、各サンプル測定のリcovery率 (%) を計算することで修正した。

11-3. 陰イオン代謝物測定のための IC-FTMS 分析

アニオン代謝物のメタボローム分析では、フーリエ変換質量分析器 (FTMS) (Thermo Fisher Scientific, Q-Exactive focus) を使用して測定した。イオンクロマトグラフィー (IC) 分離およびフーリエ変換 MS の原理により、選択性が高く高感度な代謝物の定量化を可能にする高性能イオンクロマトグラフィーシステム (Thermo Fisher Scientific, ICS-5000 +) を使用した。IC には陰イオン電解サプレッサー (Thermo Scientific Dionex AERS 500) が装備されており、サンプルが質量分析計に入る前に水酸化カリウム勾配を純水に変換した。分離は、Thermo Scientific Dionex IonPac AS11-HC、4 μm 粒子径カラムを使用して実施した。IC 流量は、ポストカラムに補充された 0.25 mL/min で、MeOH は 0.18 mL/min の補給流量だった。IC 分離の水酸化カリウム勾配条件は、1 mM~100 mM (0~40 分)、100 mM (40~50 分)、1 mM (50.1~60 分)、カラム温度 30°C で行った。

FTMS は、全ての検出に対して ESI ネガティブモードで使用した。フルマススキャン (m/z 70-900) は、70,000 の解像度で使用した。自動ゲイン制御 (AGC) ターゲットは 3×10^6 イオンに設定し、最大イオン注入時間 (IT) は 100 ms だった。ソースイオン化パラメーターは、3 kV のスプレー電圧で最適化し、他のパラメーターは次の通り：転写温度 320°C、S レンズレベル 50、ヒーター温度 300°C、シースガス 36、補助ガス 10 で行った。

11-4. カチオン代謝物測定のための LC-MS/MS 分析

液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を使用して、カチオンの量を定量化した。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) イオン源 (島津製作所, LCMS-8040) を備えたトリプル四重極質量分析計 (MS/MS) (Shimadzu Corporation, LCMS-8040) を、ポジティブおよびネガティブ ESI および多重反応モニタリング (MRM) モードで使用した。サンプルは、移動相 A (0.1%ギ酸塩) と移動相 B (0.1%アセトニトリル)

をステップ勾配として使用し、Discovery HS F5-3 カラム (Sigma-Aldrich , 2.1 mmI.D. x 150 mmL, 3 μ m 粒子) で分離した。比率は、100 : 0 (0-5 分)、75 : 25 (5-11 分)、65 : 35 (11-15 分)、5 : 95 (15-20 分)、および 100 : 0 (20-25 分)、流量 0.25 mL/min、カラム温度 40°C で行った。

12. メタボロームデータの解析

IC-FTMS と LC-MS/MS で得られた代謝物の量の比較では、スペクトグラムで得られた各代謝物のピーク面積値を代謝物の量として扱った。

主成分分析には Metaboanalyst (ver.4, <https://www.metaboanalyst.ca/>) オンラインソフトウェアを用いた。Excel で整形したメタボロームデータを csv 形式で保存し、Metaboanalyst にアップロードした。データスケールリングではオートスケールリングを適用し、主成分分析図と Loading plot を得た。主成分分析の結果から、PC1 軸に対する各代謝物の中で有意性のある代謝物を抽出した、因子負荷量 (loading) が飢餓処理したメダカ仔魚のクラスターが位置する方向に (正側) に高いものをリスト化した。

13. RT-qPCR による遺伝子発現解析

各処理が終わった孵化後 5 日目のメダカ仔魚から性タイピング (XX/XY) 用に尾ビレの先端を切り取った後、残りの身体を直ちに 1.5 mL チューブに移して液体窒素で凍結した。性タイピング後、仔魚 1 匹を BiomasherII (ニッピ) を用いて 50 μ L の TRIZORE (MRC) 中でホモジェナイズした。TRIZORE のプロトコールに従い RNA を抽出した後、RevaTraAce with genome remover (TOYOBO) で cDNA を合成し RT-qPCR の鋳型とした。RT-qPCR は KOD SYBR (TOYOBO) と StepOne Plus (Applied Biosystems) を用いて行った。各遺伝子 (*β -actin*, *foxl2*, *aromatase*, *gsdf*, *dmrt1*, *pank1a*, *pank2*, *pank4*, *fasn*) に対するプライマーは表 1 に全て記した。PCR のプログラムは、95°C 60 秒; [95°C 15 秒; 60°C 30 秒]x40。

14. CRISPR/Cas9 による *fasn* 変異体 (G0 世代) の作出

Cas9 mRNA は pCS2+hSpCas9 ベクターを鋳型に Nishimura et al., 2018 に既報のプロトコールに従って合成した。gRNA は、CCTop オンラインソフトウェア (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>) を用いて *fasn* の第 4 エクソンに 2 種類設計し、Liang X, et al., (2015) と Kikuchi, (2018 博士論文) に記載のプロトコールに従って合成・精製した。50 ng/mL の *Cas9* mRNA と gRNAs (gRNA1: 100 ng/ μ L, gRNA2: 250

ng/ μ L) を *dmrt1*-EGFP トランスジェニックメダカの受精卵の 1-2 細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした。

15. TALEN 法を用いた *dmrt1* 変異体 ($\Delta 13$) の作出

TALEN ターゲットプログラムを用いて *dmrt1* のターゲット部位を探索した (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>)。探索時のパラメーターは以下のとおり、スペーサー長:15-18 bp, リピートアレイ:16-18 bp, 上流の塩基は T のみ。TALEN のアッセムブリー以降の作業は、Nishimura et al., 2018 に既報のプロトコールに従った。得られた左 TALEN と右 TALEN の mRNA を 1-2 細胞期の受精卵にマイクロインジェクションし、G0 ファウンダーを得た。G0 ファウンダーを野生型と交配し、F1 世代で見つかった 13 塩基の欠損を持つヘテロ変異体を系統化に使用した。

16. *dmrt1* 変異体 ($\Delta 13$) を用いた飢餓処理とジェノタイピング

系統化された *dmrt1* 変異体 ($\Delta 13$) のホモ変異体メス (XX) とヘテロ変異体オス (XY) を交配して得られた受精卵を 29°C で振とうしながら発生させた。孵化した仔魚を給餌条件もしくは飢餓条件で孵化後 5 日目まで止水で飼育し、毎日処理水を交換した。孵化後 6 日目から循環式システムに移して、成魚になるまで約 3 か月間飼育した。成魚の性転換は「6. 性転換の同定」に記載した通りに判定した。また遺伝的性の判定に計画した方法で調整したゲノム抽出液を使用して *dmrt1* の遺伝子型判別を行った。KOD SYBR (TOYOBO) のプロトコールに従って反応液を調整し、StepOne Plus (Applied Biosystems) を用いて、リアルタイム PCR とその後に続く融解曲線分析によりヘテロ変異体とホモ変異体とを判定した。PCR サイクルは 95°C 10 分; [95°C 15 秒; 60°C 1 分]x40 で行った。

結果

飢餓によって遺伝的メス (XX) が機能的なオスへ性転換する

飢餓処理の性分化への影響を確認するために、まず最初に孵化直後の性分化時期における飢餓処理の生残率を測定した。その結果、孵化直後から 6 日間の飢餓処理で生残率が顕著に減少した。また魚類の仔魚は卵黄を持ち、そこから孵化後のある期間は栄養を得ていると考えられる。そこで卵黄がいつ使い切られて消失するかを調べた。その結果、給餌したメダカ仔魚では孵化後 2 日後には視認できる卵黄は消失していた。一方で、飢

餓処理したメダカ仔魚では孵化後 3 日目まで卵黄の存在が確認できた。以上 2 つの結果を合わせて、今後行う全ての餓処理は孵化直後から 5 日間とした。

次に、餓処理のメダカ仔魚の成長への影響を調べるために体長を計測した。給餌したメダカ仔魚で卵黄の消失を確認した孵化後 2 日目までは、給餌したメダカ仔魚と餓処理したメダカ仔魚との間に体長の差はないが、3 日目以降では餓処理したメダカ仔魚で体長が有意に短くなった。また、餓処理は生体内の脂質量を減少させることが知られているため (Mcgarry et al., 1973)、Oil Red O による中性脂質の染色を行った。その結果、孵化後 5 日目の給餌したメダカ仔魚の肝臓や体腔でシグナルが検出されたが、餓処理したメダカ仔魚ではほとんど認められなかった。これは餓処理したメダカ仔魚で中性脂質 (トリアシルグリセロール) の量が減少していることを示唆する。そこで給餌したメダカ仔魚と餓処理したメダカ仔魚のそれぞれから抽出した全脂質の組成を高感度薄層クロマトグラフィー (HPTLC) で確認したところ、Oil Red O 染色の結果と同様に、顕著なトリアシルグリセロール (TG) の減少が認められた。これら低身長と低 TG 量は、孵化直後から 5 日間の餓処理したメダカ仔魚が餓状態にあることを示唆した。

餓処理したメダカ仔魚 (OK-Cab, d-rR 系統) を表現型の性が観察できるようになるまで約 3 ヶ月間以上通常の給餌を行って飼育した後、遺伝子型の性を性決定遺伝子 *DMY/dmrt1bY* のタイピングで、表現型の性を背ビレと尻ビレの形態で判定し、性転換の有無を評価した。その結果、遺伝的メス (XX) がオスへと性転換していることが認められた (OK-Cab: 20%, dr-R: 8%)。また性転換した XX オス個体は通常メスと生殖が可能で、その生殖腺は通常オスと同様の精巣の外部形態を示した。

以上のことから、性分化時期における 5 日間の餓処理はメダカの 2 つの系統においてメスからオスへの性転換を引き起こすことが示された。

5 日間の餓処理は生殖細胞数と代謝に影響を与える

今回見出された餓処理による性転換のメカニズムを知るために、まず生殖細胞の数に着目した。メダカの性分化において、生殖細胞数の適切な制御が重要であることが所属研究室によって明らかにされてきた (Morinaga et al., 2004; Morinaga et al., 2007; Kurokawa et al., 2007; Nakamura et al., 2012)。事実、生殖細胞が異常に増加する変異体 *hotei* の遺伝的オス (XY) の約 50%は卵巣を持つメスへと性分化する (Morinaga et al., 2007; Nakamura et al., 2012)。一方で、発生期における生殖細胞の生殖腺への移動を阻害して作出された生殖細胞が完全でない遺伝的メス (XX) メダカは全てオス

へと性転換する (Morinaga et al., 2004; Kurokawa et al., 2007)。これらの知見から、飢餓処理により生殖細胞数が変化したことで性転換が引き起こされたのではないかと考えた。

性分化時期のXXメダカ仔魚の生殖腺には2種類の体細胞分裂をしている生殖細胞が存在する (Saito et al., 2007)。I型生殖細胞は間欠的に分裂する幹細胞様の生殖細胞で、分裂後の娘細胞はそれぞれ独立して体細胞に囲まれる。II型生殖細胞は同調的に且つ連続的に体細胞分裂をする生殖細胞で、その娘細胞は細胞間架橋によって繋がっているためシストを形成する。II型生殖細胞は、このシストを1単位として体細胞に囲まれている。免疫染色した生殖腺の全体像を共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得し、I型（幹細胞型）生殖細胞の数とII型（シスト型）生殖細胞のシストの数を計測した。サンプルとして孵化直後、2日後そして5日後を準備して生殖細胞数の経時変化についても調べた。その結果、給餌したメダカ仔魚では、I型（幹細胞型）生殖細胞の数は孵化後の日数が経つにつれてその数が増加した。また孵化後5日目の給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚における、I型（幹細胞型）生殖細胞数を比較しても有意な差はなかった。一方、II型（シスト型）生殖細胞のシストの数は、給餌したメダカ仔魚では孵化後からその数が増加するが、飢餓処理したメダカ仔魚では孵化後2日目と5日目に有意な差は認められなかった。また孵化後5日目の給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚との間で、II型（シスト型）生殖細胞のシストの数を比較すると有意な差が認められた。

次に代謝に着目した。HPTLC解析で、飢餓処理による脂質組成への影響が認められたことから、仔魚の身体全体における代謝が変化していることが考えられた。孵化直後から5日間の飢餓処理による代謝への影響を網羅的に把握するために、給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚の身体全体から抽出した水溶性代謝物を用いたメタボローム解析を計画した。代謝物の分離分析装置と質量分析計が異なる方法で2種類のメタボローム解析（①CE-TOFMS: capillary electrophoresis- time of flight mass spectrometry, ②IC-FTMS: ion chromatography- fourier transform mass spectrometry（アニオン代謝物解析）とLC-MS/MS: liquid chromatography- tandem mass spectrometry（カチオン代謝物分析））を行い、代謝プロファイルを得た。得られた孵化後5日目の給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚の代謝プロファイルを用いて主成分分析を行った。2種類のメタボロームデータにおいて、給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚とが明らかに異なる位置にクラスターを形成した。この結果は、給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚は異なる代謝プロファイルを

持つことを示した。

以上をまとめると、孵化後の5日間の飢餓処理によって、メダカ性分化に重要である生殖細胞の数と仔魚の身体全体の代謝プロファイルが変化していることが明らかになった。しかし、生殖細胞の数の変化と代謝プロファイルの変化の両方が飢餓処理による性転換の原因となるのか、そのどちらかが原因となるかが次の疑問点として挙げられた。

飢餓処理したメダカ程度の生殖細胞の減少だけでは性転換は起きない

前述の疑問点を解決するため、孵化後5日間の飢餓処理をしたメダカ仔魚で認められた代謝プロファイルの変化を伴わずに、生殖細胞数を飢餓処理したメダカ仔魚と同程度まで低下させたメダカの作出を試みた。孵化して5日後の生殖細胞数がゼロではなく、飢餓処理したメダカ仔魚と同程度になるようなブスルファンの濃度条件(300 pg/mL, 3 ng/mL, 30 ng/mL, 300 ng/mL, 3 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL)を探索した。ブスルファンが持つメダカ仔魚の生存や成長への影響を把握するために、ブスルファンで処理中の孵化後から5日間の生残率と処理後の体長を計測した。上記7種類のいずれのブスルファン濃度においても、処理期間中に生存率の顕著な低下は認められなかった。また、体長も給餌した対照群のメダカ仔魚とブスルファン処理したメダカ仔魚との間で有意な差は認められなかった。300 pg/mL、30 ng/mLと3 µg/mLの濃度のブスルファン処理したメダカの生殖細胞を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で生殖腺全体を撮影し、生殖細胞数を計測すると、どの濃度でもI型(幹細胞型)生殖細胞数に変化はないが、30 ng/mLと3 µg/mLで飢餓処理したメダカと同程度のII型(シスト型)生殖細胞の低下が認められた。

次に各濃度のブスルファン(300 pg/mL, 30 ng/mL, 3 µg/mL)の代謝への影響を調べるために、3種類の孵化後5日目メダカ仔魚(給餌したメダカ仔魚・飢餓処理したメダカ仔魚・ブスルファン処理したメダカ仔魚)の身体全体から抽出した脂質の組成を高感度薄層クロマトグラフィー(HPTLC)により評価した。3 µg/mLの濃度のブスルファンで処理したメダカ仔魚でフォスファチジルコリンの量が、給餌したメダカ仔魚と比べて減少していたが、飢餓処理したメダカ仔魚で観察されるトリアシルグリセロール量の顕著な減少は認められなかった。また、300 pg/mLと30 ng/mLの濃度のブスルファンで処理したメダカ仔魚の各脂質の量を、給餌したメダカ仔魚と比較しても有意な差はほとんど認められなかった。

3 µg/mLの濃度のブスルファン処理による代謝への影響を網羅的に調べるために、3種類の孵化後5日目メダカ仔魚(給餌したメダカ仔魚・飢餓処理したメダカ仔魚・ブス

ルファン (3 µg/mL) 処理したメダカ仔魚) のそれぞれの身体全体から抽出した水溶性代謝物を用いて、アニオン代謝物を IC-FTMS でカチオン代謝物を IC-MS/MS で分析するメタボローム解析を行った。メタボローム解析の結果得られた 3 種類の代謝プロファイルを用いて主成分分析をしたところ、ブスルファン (3 µg/mL) で処理したメダカ仔魚のクラスターは、飢餓処理したメダカ仔魚のクラスターよりも給餌したメダカ仔魚のクラスターの近傍に位置していた。このことは、3 µg/mL の濃度でブスルファン処理したメダカ仔魚の代謝プロファイルは飢餓処理したメダカ仔魚よりも給餌したメダカ仔魚に似ていることを示唆する。以上の結果は、30 ng/mL と 3 µg/mL の濃度のブスルファン処理によって、脂質量や代謝プロファイルは給餌したメダカ仔魚に類似しているが、生殖細胞数は飢餓処理したメダカ仔魚と同程度のメダカを作出することができたことを示す。

そこで、ブスルファン (300 pg/mL, 30 ng/mL, 3 µg/mL) で処理したメダカ仔魚の成魚における遺伝的な性と表現型の性を孵化後 3 か月で確認したところ、性転換個体はいずれの濃度でも認められなかった。

以上の結果から、飢餓処理によって観察されたメスからオスへの性転換は、飢餓処理したメダカ仔魚で認められた程度の生殖細胞数の低下が原因と考えるより、代謝の変化が原因となった可能性が考えられた。

パントテン酸の代謝経路の抑制はメスからオスへの性転換を引き起こす

飢餓処理によって変化する代謝プロファイルの中から、飢餓処理によるメスからオスへの性転換の原因となる代謝物または代謝経路を探索するために、メタボローム解析の主成分分析の結果を再び用いた。2 種類のメタボローム (①CE-TOFMS, ②IC-FTMS と LC-MS/MS) で得られた代謝プロファイルの 2 つの主成分分析においても、PC1 軸が給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚のクラスターとの差を表していると考えられたため、PC1 軸の+側に寄与率の高い代謝物に着目した。因子負荷量 (loading) を指標に、2 種類のメタボローム解析の主成分分析結果で共通していた代謝物をリストアップしたところ、パントテン酸がその一つに挙げられた。パントテン酸は、Loading plot において Loadings 1 (PC1) 軸の+側に高い Loading 値を示した。次にこのパントテン酸の量を給餌したメダカ仔魚と飢餓処理したメダカ仔魚で比較した。その結果、飢餓処理したメダカ仔魚で給餌したメダカ仔魚よりパントテン酸量が増加していた。

そこでパントテン酸の増加がメスからオスへの性転換に関連するかを明らかにするために、孵化直後からメダカ仔魚をパントテン酸 (20 µM, 200 µM, 2 mM) で 5 日間、

給餌条件下で処理した。各濃度のパントテン酸処理によって、生残率や体長、生殖細胞の数に影響は認められなかった。パントテン酸 (20 μ M, 200 μ M, 2 mM) で処理したメダカ仔魚を成魚まで育てて性転換の有無を確認したが、いずれの濃度においても性転換個体は観察されなかった。

ヒトを含む動物と一部の寄生性バクテリアは、パントテン酸の生合成酵素を持たないためパントテン酸の新規合成ができず、摂食によって体内にパントテン酸を取り込んでいる (Leonardi et al., 2005)。しかし、摂食をしていない孵化後 5 日目の飢餓処理したメダカ仔魚でパントテン酸の増加が認められた。これは飢餓処理したメダカ仔魚ではパントテン酸の下流の代謝経路が抑制されたため、飢餓処理したメダカ仔魚でパントテン酸が蓄積したことを示唆する。そこでパントテン酸の代謝経路の経路図をメタボローム解析 (CE-TOFMS) を用いて作成した。その結果、メタボローム解析で検出できたパントテン酸下流の代謝物 (DP-CoA: デホスホ-補酵素 A, CoA: 補酵素 A) では、飢餓処理による増加は認められなかった。この結果は、パントテン酸代謝経路が飢餓処理によって抑制された可能性をさらに示唆した。パントテン酸代謝経路においては、パントテン酸を 4'-ホスホパントテテインへと代謝するパントテン酸キナーゼ (Pantothenate kinase: Pank) が律速酵素である (Jackowski and Rock et al., 1981; Robishaw et al., 1982)。

飢餓処理によるメダカ *pank* 遺伝子 (*pank1a*, *pank2*, *pank4*) の発現への影響を RT-qPCR で確認した結果、*pank1a* の発現が飢餓処理により有意な低下を示した。これらの結果は、飢餓処理におけるパントテン酸の増加は、飢餓処理によってパントテン酸経路が部分的に抑制され、パントテン酸が代謝されずに蓄積したことを示唆した。

そこで飢餓処理と同様の孵化後から 5 日間、給餌しているメダカ仔魚へのパントテン酸代謝の律速酵素 (Pank) の阻害剤 (Sharma et al., 2015) 処理を計画した。まず始めに、処理中 5 日間における Pank 阻害剤 (1, 10, 50, 100 μ M) で処理したメダカ仔魚の生残率を計測した。その結果、1, 10, 50 μ M の濃度の Pank 阻害剤で処理したメダカ仔魚は処理終了の孵化後 5 日目まで生残した一方で、100 μ M の濃度で処理したメダカ仔魚は全て処理後 2 日までに死亡した。そこで次に 50 μ M の Pank 阻害剤で処理したメダカ仔魚における、成長への影響を調べた。体長や体重に有意な差は認められないことから、50 μ M の阻害剤処理は仔魚の成長度合いには影響を与えていないと考えられた。また 50 μ M の Pank 阻害剤の薬理効果を確認するために、IC-FTMS を用いて Pank 阻害剤で処理したメダカ仔魚における、パントテン酸とパントテン酸代謝物 (4'-ホスホパントテテイン) を測定した。その結果、Pank 阻害剤で処理した XX メダカ仔魚で、

対照群の XX メダカ仔魚と比べてパントテン酸の増加が認められた。また Pank 阻害効果の評価指標として考えられるパントテン酸と 4-ホスホパントテテインとの比 (pantothenate / 4-phosphopantetheine) は、Pank 阻害剤処理した XX メダカ仔魚で給餌した XX メダカ仔魚と比べて有意に高く、飢餓処理した XX メダカ仔魚との間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、Pank 阻害剤 (50 μ M) での処理は、パントテン酸代謝を飢餓処理と同程度に抑制していると結論付けた。

次に Pank 阻害剤 (50 μ M) 処理後の XX メダカ仔魚を免疫染色し生殖細胞数を計測した。Pank 阻害剤処理をした XX メダカ仔魚と対照群の給餌した XX メダカ仔魚の間には、I 型 (幹細胞型) 生殖細胞の数や II 型 (シスト型) 生殖細胞のシストの数に有意な差は認められなかった。また Pank 阻害剤処理の代謝への影響を検証するために、Pank 阻害剤処理したメダカ仔魚と対照群の給餌したメダカ仔魚の身体全体から抽出した脂質を用いた高感度薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による脂質組成分析と、水溶性代謝物を用いたメタボローム解析 (アニオン; IC-FTMS, カチオン; LC-MS/MS) の結果に基づく主成分分析を行った。高感度薄層クロマトグラフィー (HPTLC) の結果、Pank 阻害剤で処理したメダカ仔魚のトリアシルグリセロール量は、給餌したメダカ仔魚の約 60%を示し、飢餓処理したメダカ仔魚ほどではないが有意な低下を示した。また主成分分析の結果から、Pank 阻害剤で処理したメダカ仔魚のクラスターは飢餓処理したメダカ仔魚のクラスターの近傍に位置していた。以上の結果から Pank 阻害剤 (50 μ M) 処理は、仔魚の成長や生殖細胞数には影響を与えないが、代謝プロファイルは飢餓処理したメダカ仔魚に似ていることを示していると考えられた。

最後に Pank 阻害剤 (50 μ M) で孵化後から 5 日間処理したメダカ仔魚を成魚まで育て、性転換の有無を確認したところメスからオスへの性転換が認められた。また性転換個体の生殖腺は、飢餓処理したメダカ仔魚と同様に通常の精巢を示した。これらの結果は、パントテン酸代謝の抑制が飢餓処理による性転換の原因である可能性を示唆した。

脂肪酸合成の抑制は性分化に影響を与える

飢餓処理や代謝変化が性に及ぼす影響をさら調べるために、パントテン酸代謝経路の下流のどのような代謝が性分化に関与するかを検討した。パントテン酸代謝経路の最終代謝物は補酵素 A (coenzyme A: CoA) であることから、CoA 合成経路とも呼ばれる (Jackowski et al., 1981; Leonardi., 2005)。CoA は、TCA 回路やコレステロール合成、脂質合成などの 100 以上もの代謝反応に必須な補助因子である (Leonardi., 2005)。これまでの実験結果より、顕著なトリアシルグリセロールの減少が飢餓処理や Pank 阻害

剤処理で認められていたため、脂質合成経路に着目した。脂質合成経路は脂肪酸合成から始まる。脂肪酸合成では、脂肪酸合成酵素（FAS）が酪酸（4:0, 短鎖脂肪酸）からパルミチン酸（16:0, 比較的短い長鎖脂肪酸）までの 7 種類の脂肪酸全てを合成する。FAS は 7 種のドメインからなる多機能酵素（Liu et al., 2010）で、FAS 阻害剤として C75 が報告されている（Rendina et al., 2005）。

そこで C75（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で孵化直後から 5 日間処理する脂肪酸合成の阻害実験を計画した。C75 で処理したメダカ仔魚の身体全体での脂質組成を高感度薄層クロマトグラフィ（HPTLC）で確認すると、フォスファチジルコリンで給餌メダカ仔魚と比較して有意な低下が認められるが、トリアシルグリセロールほど顕著ではなかった。また孵化後 5 日目の 3 種類のメダカ仔魚（給餌したメダカ仔魚・飢餓処理したメダカ仔魚・C75 処理したメダカ仔魚）から抽出した水溶性代謝物に対して、IC-FTMS（アニオン）と LC-MS/MS（カチオン）によるメタボローム解析をして主成分分析を行ったところ、C75 で処理したメダカ仔魚のクラスターは給餌したメダカ仔魚のクラスター近傍に位置した。以上のことから C75 処理は、確かにトリアシルグリセロール量を低下させるが、水溶性代謝物から判断する身体全体の代謝プロファイルは給餌メダカ仔魚に類似していたことが示された。

次に C75 処理後（孵化後 5 日目）における仔魚の成長と生殖細胞数への影響を検証した。その結果、体長や生殖細胞数に C75 処理による有意な差は認められなかった。最後に孵化後から 5 日間の C75 処理の性分化への影響を検証するために、C75 で処理した仔魚を成魚まで育て性転換の有無を確認した。その結果、C75 処理した 13% の遺伝的メス（XX）メダカがオスへと性転換おり、性転換体の生殖腺は通常の精巣と同様の外部形態を示した。以上の結果は、孵化後 5 日間における脂肪酸合成がメダカのメス性分化に関与することを強く示唆した。

***dmrt1* は飢餓による性転換に必要**

これまでの結果は、孵化後 5 日間の飢餓処理によって、パントテン酸の代謝産物量が低下し、脂質（特にトリアシルグリセロール）量も減少することを示している。また脂質が減少したメダカ仔魚が成魚になった時には性転換（XX オス）が生じていることを示した。しかしながら飢餓処理を始めとする一連の代謝変化と性分化との因果関係は、依然不明である。飢餓処理や代謝変化と性分化との関連を調べるために、メダカで既に報告のある性に関連する遺伝子（メス：*foxl2*, *aromatase*, オス：*gsdf*, *dmrt1*）（Nakamoto et al., 2006; Nakamoto et al., 2018; Nakamura et al., 2009; Imai et al.,

2015; Masuyama et al., 2012) の発現を検証した。

孵化後 5 日の給餌した XX メダカ仔魚 (n=16) と飢餓処理した XX メダカ仔魚 (n=14) の 1 匹の身体全体から抽出した RNA を鋳型にして合成した cDNA を用いて、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、5 日間の飢餓処理した XX メダカ仔魚で、メス性分化で発現する遺伝子 *foxl2* と *aromatase* の発現減少とオス分化に重要な遺伝子 *dmrt1* の発現上昇が認められた。この *dmrt1* の発現上昇は、メスからオスへの性転換が観察された孵化後から 5 日間の Pank 阻害剤 (50 μ M) や C75 (FAS 阻害剤, 20 μ g/mL) で処理した XX メダカ仔魚でも認められたが、性転換が観察されなかったブスルファン (3 μ g/mL) 処理した XX メダカ仔魚では認められなかった。また、*dmrt1* の発現をモニターできる *dmrt1*-EGFP トランスジェニックメダカ (以降、*dmrt1*-EGFP メダカ) を用いて、飢餓処理による孵化後 5 日目の XX メダカ仔魚の生殖腺での *dmrt1* の発現を EGFP の免疫染色によって検証した。給餌した孵化後 5 日目の XX メダカ仔魚では、観察した 12 個体の全ての個体で EGFP のシグナルは検出されなかった。一方で、飢餓処理した孵化後 5 日目の XX メダカでは、観察した 16 個体の全ての個体に EGFP のシグナルが検出された。この結果は、5 日間の飢餓処理によって全ての XX メダカ仔魚の生殖腺で *dmrt1* が発現することを示唆する。

RT-qPCR で観察された *dmrt1* の発現上昇が脂肪酸合成酵素 (FAS/*fasn*) を介しているかを確認するために、*dmrt1*-EGFP メダカと CRISPR/Cas9 システムを用いて、*fasn* 変異体の孵化後 5 日目の XX 仔魚の生殖腺における *dmrt1* の発現検証を試みた。

マウスの *fasn* 変異体は胚性致死 (E7.5) である (Chirala et al., 2003)。メダカにも *fasn* 遺伝子は 1 つしか見出されなかったため、メダカ *fasn* 変異体は致死になることが十分に考えられる。そこで G0 世代での解析を試みた。孵化後 5 日目の野生型の *dmrt1*-EGFP メダカの XY 仔魚の生殖腺では、生殖細胞を取り囲む体細胞 (支持細胞) で EGFP が認められた。孵化後 5 日目の *fasn* 変異体 (G0 世代) の *dmrt1*-EGFP メダカの XY 仔魚でも、gRNA をマイクロインジェクションしていない野生型と同様に生殖腺体細胞で EGFP の発現が認められた。一方で孵化後 5 日目の野生型の *dmrt1*-EGFP メダカの XX 仔魚の生殖腺体細胞に EGFP のシグナルは認められない。しかし、*fasn* 変異体 (G0 世代) の *dmrt1*-EGFP メダカ XX 仔魚は、野生型の *dmrt1*-EGFP メダカ XX 仔魚と同様に野生型 XY メダカ仔魚よりも多くの生殖細胞と発達中の卵胞が認められるにもかかわらず、*dmrt1* 発現細胞が生殖腺体細胞と生殖細胞の一部で観察された。以上の結果から、*fasn* 遺伝子が壊れると遺伝的メス (XX) のメダカ仔魚の生殖腺でオス分化に重要な *dmrt1* が発現することが示唆された。

メダカがオスに性分化するには *dmrt1* が必須であり、*dmrt1* 変異体では通常給餌条件下において遺伝的オス (XY) がメスへと性転換する。そこで、*dmrt1* 変異体 ($\Delta 13$) の仔魚に孵化後 5 日間の飢餓処理をして、3-4 か月齢の成魚でその遺伝子型の性と表現型の性を調べたが、メスからオスへの性転換体は認められなかった。このことは、今回の飢餓処理による性転換には *dmrt1* が必要であることを示している。

脂質による *dmrt1* の発現制御機構の探索

C75 (FAS 阻害剤) 処理や *fasn* 遺伝子の変異により脂質 (特にトリアシルグリセロール) 量が低下し、また孵化後から 5 日間 C75 処理したメダカの成魚がメスからオスへの性転換を示したことや、C75 処理による *dmrt1* の発現が上昇と、*fasn* に変異を持つ *dmrt1*-EGFP メダカ XX 仔魚で EGFP 陽性の *dmrt1* 発現細胞が認められたことから、脂質が *dmrt1* の発現を制御していると考えられた。では実際に、どのような分子基盤で脂質が *dmrt1* の発現制御を行うのか。

はじめに、孵化後 5 日目の生殖腺でパントテン酸代謝と脂肪酸代謝が働いているかを検討するために、ホールマウント *in-situ* ハイブリダイゼーションで孵化後 5 日目における *pank1a* と *fasn* の発現解析を行った。*pank1a* は主に肝臓で強いシグナルが認められたが、孵化後 5 日後の生殖腺では XX と XY のいずれも全くシグナルは検出されなかった。以上のことから *Pank1a* による孵化後 5 日後では、パントテン酸は主として生殖腺以外 (肝臓など) で代謝されていることが示唆された。

fasn のシグナルも、孵化後 5 日目の XX と XY の両方のメダカ仔魚の肝臓で認められ、興味深いことに生殖腺でのシグナルには雌雄差が認められた。XX メダカ仔魚の生殖腺では、体細胞と全ての種類の生殖細胞でシグナルが観察され、XY メダカ仔魚の生殖腺ではシグナルが弱かったためにどの細胞で発現しているか明確にはできなかった。以上から、生殖腺全体としての *fasn* の発現量は、孵化後 5 日目のメダカ仔魚では XY の仔魚よりも XX の仔魚で高いと予想された。

次に脂質を介して遺伝子発現を制御する機構として分子 X に着目して研究を進めた。孵化後 6 日目における分子 X の発現を WISH で確認すると、遺伝的メス (XX) の生殖腺でシグナルが認められた。そこでメダカ *dmrt1* の開始 ATG から上下 $\pm 4\text{kb}$ のゲノム領域で分子 X の応答配列の探索をしたところ、上流 1kb 付近に認められた。これらの結果から、分子 X が *dmrt1* の発現制御に関連していることが示唆された。分子 X と *dmrt1* の発現との関連を調べるために、*dmrt1*-EGFP メダカを阻害剤で処理した。処理した *dmrt1*-EGFP メダカ仔魚 (XX) では、生殖腺が飢餓処理した XX メダカ仔魚に

似て小さくなり、また明らかな生殖細胞の減少が認められた。そして個体差はあるが観察した 7 個体の全ての個体で、通常の XX メダカ仔魚では認められない EGFP 陽性の *dmrt1* 発現細胞が観察された。この結果から、*dmrt1* の発現は分子 X の制御下にある可能性が見出されつつある。

考察

結果の総括

飢餓による性転換

本研究では、孵化直後から 5 日間の飢餓処理によって、遺伝的メス (XX) メダカが機能的なオスへと性転換することを見出した。これは性的に未分化な時期 (性分化時期) における栄養状態が個体の性に影響を与えることを示す、初めての知見である。

通常給餌条件下の XX メダカでは、受精後 5 日目 (ステージ 35) 頃から生殖細胞が盛んに体細胞分裂を開始して (II 型生殖細胞)、生殖腺内の生殖細胞の数が XY メダカより多くなる (Saito et al., 2007)。そして、孵化時期 (受精後およそ 7 日目) からメスの性分化に重要な *aromatase* や *foxl2* の発現が生殖腺の体細胞で認められ (Jawahar G. Patil, Rasanthi M. Gunasekera, 2008; Nakamoto et al., 2006)、体細胞分裂をしていた一部の生殖細胞が減数分裂に入り、卵母細胞が観察される。しかし生殖腺の構造自体にオスとの違いは認められず、およそ孵化後 30 日頃までには卵巣腔の形成が始まり、卵巣の構造が明らかとなる (Kanamori et al., 1985; Suzuki and Shibata, 2004)。最終的に全長が 14-15 mm 程度になった頃 (孵化後 30-50 日)、背ビレや尻ビレの形態などのメスの第二性徴が明確となる。一方で XY メダカでは、受精後 4 日目頃から性決定遺伝子 *DMY/dmrt1bY* が生殖腺体細胞で発現し、続いてオスの性分化に重要な *gsdf* と *dmrt 1* が発現する (Shibata et al., 2010)。メスとは異なり、この間生殖細胞の体細胞分裂による増殖はあまり認められず、減数分裂に入る生殖細胞もない。その後、孵化後 10 日目頃から精巣に特徴的な構造であるロビュールの形成が始まり、孵化後 30-50 日頃に精巣構造が完成する (Suzuki and Shibata, 2004)。このロビュール構造形成とともに生殖細胞の同調的な体細胞分裂が始まり (II 型生殖細胞の出現)、減数分裂へと移行して精子形成が始まる。そして、成熟したオスの背ビレや尻ビレにはオスの第二性徴が認められる。

飢餓処理で認められた性分化に関連する現象への影響を図 33 にまとめた。飢餓条件下で孵化後から 5 日間飼育した XX メダカでは、孵化直後から孵化後 5 日目までの生殖

腺内には通常給餌下のメス性分化と同様に II 型生殖細胞が観察される。卵母細胞も認められる典型的なメスの生殖腺の形態を示すにも関わらず、観察した全ての個体において生殖腺体細胞の一部でオスの性分化に重要な *dmrt1* の発現が認められた。一方で、メスの性分化に重要な *aromatase* や *foxl2* の発現が有意に減少していた。これらのことから、飢餓処理下の生殖腺では孵化後 5 日目にはメスからオスへの性転換が開始していると考えられる。しかしながら、最終的に完全なオスへと性転換するのは飢餓処理したメダカの 20% である。メカニズムは不明であるが、20% の個体が *dmrt1* の発現を維持し、受精可能な精子を産生する機能的なオスへと性転換したと示唆される。

脂質による性の制御システムの発見

本研究によって、遺伝的に性が決まるメダカが性分化中の飢餓処理や代謝変化によって性転換が引き起こされることが明らかとなった。飢餓処理下では、パントテン酸代謝経路の律速酵素遺伝子 (*pank1a*) の発現が減少し、パントテン酸代謝経路が部分的に抑制される。その結果、パントテン酸代謝経路の最終代謝物である CoA 量が有意ではないものの減少傾向が認められたことから、CoA を介して身体全体での脂質量の低下が起きたことが考えられる。このような代謝状態下では遺伝的メス (XX) であるにもかかわらず、生殖腺体細胞でオス化に重要な遺伝子である *dmrt1* が発現した。また、飢餓処理した *dmrt1* 変異体の XX メダカはオスへの性転換を示さなかったことから、*dmrt1* が飢餓処理における性転換に重要な役割を持つことが強く示唆された。

これらの結果から、通常給餌条件における XX メダカでは、パントテン酸の代謝を通じて CoA を合成して脂肪酸を産生し、最終的に生殖腺体細胞での *dmrt1* の異所的な発現を抑制することでオス化を抑制していることが予想される。実際に、通常の給餌をしていても Pank や FAS の阻害を介して脂質合成を抑制すると、XX メダカがオスへと性転換した。これらのことから脂質が性分化に関連することが強く示唆されており、これは脂質を介した新規の性制御システムと考えられる。しかし本研究では明らかにできていない点や本研究によって新たに浮かび上がった問題点があるため、以下で考察した。

飢餓による性転換への生殖細胞の関与

所属研究室では、メダカの性分化には生殖細胞数の適切な制御が重要であることを示してきた (Morinaga et al., 2004; Morinaga et al., 2007; Kurokawa et al., 2007; Nakamura et al., 2012)。これまでに報告された遺伝的メス (XX) メダカがオスへと性転換する場合、性転換する XX メダカは生殖腺原基に生殖細胞が到達しないため、性

分化時期の生殖腺には生殖細胞が全く存在しない (Kurokawa et al., 2007)。生殖細胞がない XX メダカ仔魚の生殖腺では、メス化に重要な *aromatase* や *foxl2* の発現が生殖腺体細胞で孵化後 10 日目までは認められるがその後消失する。一方で、オス化に重要な *dmrt1* の発現が孵化後 20 日目から認められる。これは生殖細胞がメス化（ここでは *aromatase* と *foxl2* の発現）の促進や維持に必要な能力を有していることを示している。

性分化時期の遺伝的メス (XX) メダカの生殖腺には、体細胞分裂の様式で分類される I 型（幹細胞型）生殖細胞と II 型（シスト）生殖細胞の他に、減数分裂に入った生殖細胞や発達途中の卵胞が存在する。これらの生殖細胞のうちどの種類の生殖細胞がメス化促進もしくは維持する能力を有しているかを、複数の変異体を用いて所属研究室にて解析された (Nishimura et al., 2018)。その結果、I 型（幹細胞型）生殖細胞しか存在しない変異体でもメスの表現型の性を示す成魚が得られた。つまり、I 型（幹細胞型）生殖細胞ですでにメス化の促進や維持に必要な能力を有していると考えられる。しかし、メス化の促進や維持に必要な能力に関与する因子（メス化因子）は未だ同定されていない。

一方で本研究の飢餓処理で認められた程度の生殖細胞数の減少では性分化には影響を与えないことが、ブスルファンを用いた実験を通して示された。しかし飢餓処理では II 型（シスト型）生殖細胞のシストの数が減少したのみで、I 型（幹細胞型）生殖細胞の数に変化はなかった。前述の 2 つの知見を合わせて、性分化時期の適切な I 型（幹細胞型）生殖細胞の数によってメダカのメス化が制御されるならば、飢餓処理した XX メダカは性転換を示さないはずである。しかし実際にはメスからオスへの性転換が認められたことと、飢餓処理した XX メダカ仔魚で *aromatase* と *foxl2* の発現減少が認められたことから、飢餓処理による性転換は脂質の低下だけではなく、I 型（幹細胞型）生殖細胞が持つメス化の促進や維持に必要な能力が低下したことも原因の一つとなっている可能性も考えられる。

また、I 型（幹細胞型）生殖細胞しか持たない変異体に対して孵化直後から後 5 日間の給餌・飢餓処理・ブスルファン処理をしたそれぞれの XX メダカ仔魚から I 型（幹細胞型）生殖細胞を単離し、RNA-sequencing やプロテオーム解析を行えば、未だ同定に至っていない生殖細胞が持つメス化因子が同定可能だと考える。

***dmrt1* の発現制御に関わる脂質**

本研究から *dmrt1* の発現の制御に脂質が関与することが示唆された。直接的な示唆となる孵化後 5 日目の C75 処理した XX メダカ仔魚や *fasn* 変異体 (G0 世代) の XX

メダカ仔魚は、脂質合成の最初のステップである脂肪酸合成が阻害もしくは壊れているだけで、脂肪酸合成より後のパルミチン酸（16:0）より炭素数の多い長鎖脂肪酸の合成やトリアシルグリセロールの合成はパルミチン酸などを餌から摂取することで正常にできると考えられる。また Pank 阻害剤や C75 で処理した XX メダカ仔魚は、脂質を含む餌を通常通りに給餌していたことから、餌に含まれている脂質から長鎖脂肪酸を得られるだけでなく、より長い超長鎖脂肪酸の合成や不足した長鎖脂肪酸の合成が起きていると予想される。よって *dmrt1* の発現を制御する脂質の候補は、餌には含まれていない脂質か脂肪酸合成酵素（FAS）によって代謝される酪酸（4:0）からパルミチン酸（16:0）までの 7 種類の脂肪酸のどれかか、またはパルミチン酸の供給量が減少したという理由も考えられる。

生殖腺以外の臓器の関与

本研究では孵化後 5 日間の飢餓処理による性転換に、パントテン酸代謝や脂肪酸合成が関与することを、仔魚の身体全体の用いたメタボローム解析や RT-qPCR での解析を通じて示唆した。従って、実際にどの組織でのパントテン酸代謝や脂肪酸合成が *dmrt1* の発現や性転換に寄与するかは未だ不明である。

pank1a と *fasn* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析から、パントテン酸代謝と脂肪酸合成の両方が肝臓で働いており、脂肪酸合成は生殖腺でも働いていることが予想された。しかし、実際に *pank1a* と *fasn* が機能しているかはタンパク質の発現を確かめなければならない。給餌した XX メダカ仔魚と飢餓処理した XX メダカ仔魚から単離した肝臓や生殖腺などを用いたマルチオミクス解析（プロテオーム・メタボローム・リポドーム）を行うことで、飢餓によってどの組織でどのような代謝変化が起きているかが明らかになり、脂質による性の制御機構のより詳しい理解が得られると考える。