シリーズ 新しい内分泌現象

アフリカツメガエルのZZ/ZW型性決定の分子機構 —脊椎動物初の♀決定遺伝子DM-Wの発見と性決定システム進化—

伊 藤 道 彦 (北里大・理)

E-mail: ito@sci.kitasato-u.ac.jp

1. はじめに

生物は、進化過程で性生殖システムを獲得し、環境変化に対する適応性を増大させてきた。性システムは、単細胞から多細胞への進化過程で、同形から異形配偶子型(配偶子の2型化)へ変化し、動物界では、無胚葉動物を経て二胚葉動物以降の真正後生動物で配偶子を生産する生殖巣が共進化したと考える事ができる。二者択一型の雌雄生殖巣を形成させる様式(性決定様式)には、環境によって決まる環境依存性決定(environmental sex determination, ESD)と遺伝的要因によって決まる遺伝的性決定(genetic or genotypic sex determination, GSD)とに大別される¹⁾。

脊椎動物では、ESDには変温動物の爬虫類(ワニ類の多く、カメ類・トカゲ類の一部)における温度依存性性決定(temperature-dependent sex determination, TSD)がよく知られている。一方GSDは性染色体に依存した様式で、♂ヘテロ型と♀ヘテロ型に大別され、例えば、哺乳類の多くの種では♂ヘテロ型のXX/XY型を、鳥類の多くの種では♀ヘテロ型のZZ/ZW型を採用している。現在、脊椎動物では、GSDにおいてのみ、3つの性決定遺伝子が同定されており(図1)、そのうち2つは、XX/XY型の哺乳類(真獣類/有胎盤類)のSRY^{2,3)}および魚類メダカのDMY⁴⁾(別名DMRT1bY⁵⁾)で、両遺伝子とも♂特異的性染色体であるY染色体に座位し、♂(精巣)形成遺伝子発現ヒエラルキーの最上位遺伝子として、DNA結合性転写因子をコードする性(♂)決定遺伝子である。重要な点は、両

図1 動物界における性決定遺伝子と性決定様式
Mab-3、dsx、DMY、DM-WはDMドメイン遺伝子ファミリーに、SRYはSOX遺伝子ファミリーに属する。

動物ともXX/XY型の性決定様式を採用しているが、両♂決定遺伝子に相同性が全くない事である。一方、♀ヘテロのZZ/ZW型種では、性決定遺伝子は長い間同定されていなかったが、最近、筆者らの研究室で、両生類アフリカツメガエルのDM-WというW染色体に座位する遺伝子が、♀(卵巣)を誘導する遺伝子として単離・解析され⁶⁾、ZZ/ZW型種初となる♀誘導性性決定遺伝子と考えられている。興味深いことに、このアフリカツメガエルDM-WおよびメダカDMYは、精巣形成遺伝子DMRT1というDMドメインを持つ遺伝子の重複によって誕生したパラログ遺伝子であり、この事は、XX/XY型とZZ/ZW型の様式の違いがありながら、性決定に関わるDMドメイン遺伝子下流の性決定システムは、魚類と両生類で保存性がある事を示唆する。本稿では、脊椎動物で第3番目(両生類初、ZZ/ZW型動物種初)に発見された性決定遺

伝子 *DM-W* に関して、発見の経緯および性(♀)決定遺伝子としての解析を概説し、更に、性決定遺伝子、性決定様式、種分化、性ホルモンなどを含め、脊椎動物の性決定システム進化について考察する。

2. 性決定遺伝子 *SRY* の進化的保存性

1990年代初頭に、遺伝的解析、遺伝子導入動物の作製・解析等から、Y染色体に存在する *SRY* がヒト・マウスの性(♂)決定遺伝子であると報告された^{2, 3)}。その後、*SRY* オルソログの探索が脊椎動物各種で行われたが、現在では、哺乳類(単孔類・有袋類・真獣類)各種のゲノム解析から、*SRY* は、哺乳類進化過程において単孔類以降で、(現在多くの哺乳類種でX染色体に座位する) *SOX3* という遺伝子を祖先として誕生したと考えられている¹⁾。筆者らも、当時、アフリカツメガエルで *SRY* オルソログの探索を行い徒労となったが、*SOX3* オルソログ(常染色体リンク)の存在を認めることはできた⁷⁾。興味深いことに、日本の地域によって性決定様式(*XX/XY* と *ZZ/ZW* 型)が異なるツチガエルでは、X、YあるいはZ、W両者に *SOX3* が座位していることが最近明らかになった⁸⁾。

3. 実験動物アフリカツメガエル

無尾両生類アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*) (図2) は、後肢の指にツメがあるツメガエル(爪蛙)属の1種で、幼生だけでなく成

図2 アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の雌雄W染色体上の *DM-W* 遺伝子は、幼生期のオタマジャクシの未分化生殖巣で特異的に発現し、卵巣形成を誘導すると考えられる。変態完了後2~3ヶ月は、外見では雌雄の区別はつかないが、その後、ZW個体では、総排出孔に突起物(右端矢印)ができる。

体も水棲で飼育が容易なことや、季節を問わずホルモンで排卵を誘発できることなどから、古くから発生学の実験動物として汎用されている。1962年には、クローンカエルの作製が報告され⁹⁾、当時話題となった。現在、このカエル種は、初期発生の研究だけでなく、器官形成や両生類に特徴的な器官再構築(変態)の研究にも汎用されている。染色体数は雌雄共に36本で、ゲノムの倍数化によって種分化してきた偽4倍体種である。近縁のツメガエル種は多数存在するが、現在、実験動物として汎用されている種は、このアフリカツメガエルと、2倍体でゲノム解析が進行しているニシツメガエル(別名ネッタイツメガエル/学名 *Xenopus (Silulana) tropicalis*) である。

アフリカツメガエルの性に関しては、遺伝的な交配実験から♀ヘテロ(*ZZ/ZW*)型の性決定様式を持つと結論されていた¹⁰⁾(ニシツメガエルに関しては、性決定様式は現在もわかっていない)が、性決定に関わる遺伝子研究は皆無の状況にあった。実験動物として汎用されているにもかかわらず、性決定・性分化研究が進まなかった要因に、雌雄の染色体に形態的な差異が通常の染色法では全く認められず性染色体が同定できなかったことや、遺伝的♂♀を区別できる♀ゲノム特異的なDNA配列が見つかっていなかったことが挙げられる。

4. アフリカツメガエル♀ゲノム特異的(W染色体リンク)遺伝子 *DM-W*

哺乳類 *SRY*^{2, 3)} に次いで、脊椎動物で第二番目の性(♂)決定遺伝子が、21世紀になってまもなく、日本のグループによって、魚類メダカで報告された⁴⁾。その性決定遺伝子 *DMY* は *SRY* と進化的に全く保存性のない *DMRT1* という精巣形成に関わると考えられている遺伝子の重複によって生じた *DMRT1* のパラログ(ドイツのグループはこの遺伝子を *DMRT1* のコオルソログと考え、*DMRT1bY*⁵⁾ と呼称)である。*DMY* および *DMRT1* は、DMドメインというDNA結

合モチーフをコードする領域を持ち、DMドメインファミリー遺伝子に属している。無脊椎動物で性決定に直接関わる遺伝子 *dsx* (昆虫 *Drosophila melanogaster*) および *mab-3* (線虫 *Caenorhabditis elegans*) はこのファミリーに属し¹¹⁾ (両遺伝子の頭文字をとってDMドメインと名付けられた)、動物の性決定・性分化において保存されてきたドメイン遺伝子と考える事ができる (図1)。筆者らは、アフリカツメガエルを用いて性決定期生殖巣で発現するDMファミリーの単離を試み、2つの遺伝子を得た。1つは、*DMRT1* オルソログ¹²⁾ で、もう1つは、非常に興味深い事に、♀ゲノム特異的遺伝子 (W性染色体に存在すると考えられ、*DM-W*⁶⁾ と命名) であった。図3に両遺伝子から合成されるタンパク質の構造模式図を、図4Aに *DM-W* のゲノミックサザンブロット解析を示す。*DM-W* は、他のDMドメインファミリーとの構造比較から *DMRT1* に最も類似性が高く、メダカ *DMY* と同様に *DMRT1* の重複によって生じたパラログ遺伝子であると考えられた。興味深いことに、*DM-W* は、アミノ酸配列上 *DMRT1* とほぼ同じ構造を持つメダカ *DMY* とは違い、図3に示すように *DMRT1* のC末端部にある転写制御 (活性化) 領域¹²⁾ を欠失していた。この欠失は、ZZ/ZW様式と関係している可能性が考えられた (後述)。

図3 アフリカツメガエル *DMRT1* と *DM-W* タンパク質の構造模式図

DMRT1 と *DM-W* は、DMドメインを含むN末端領域で相同性が高い。しかし、*DM-W* は、*DMRT1* の転写調節 (活性化) に関わる領域が欠失していることから、*DMRT1* のドミナントナガティブ型と考えられる。数字はアミノ酸 (a.a.) 番号。(文献6より改変)

4-1. WおよびZ性染色体

染色体上での Fluorescence in situ hybridization 解析 (北海道大学、現、名古屋大学 松田洋一教授グループとの共同研究) の結果、*DM-W* シグナルが♀個体由来の2本の3番染色体のうちの1つの染色体の長腕の先端部に観察され、この染色体がアフリカツメガエルのW染色体であることが明らかになった⁶⁾ (図4B)。形態的に区別がつかないもう一方の♀ (ZW個体) 由来の3番染色体がZ染色体と考えられる。哺乳類のSRY (Y染色体リンク) - SOX3 (X染色体リンク) とは異なり、*DM-W* の元遺伝子 *DMRT1* は常染色体 (1、2番染色体: *DMRT1* はアフリカツメガエルの場合、偽4倍体由来の2つの遺伝子が存在する) に座位することも明らかになった⁶⁾。

4-2. *DM-W* および *DMRT1* 遺伝子の発現解析

Whole mount in situ hybridization および RT-PCR によって、*DM-W* と *DMRT1* 遺伝子から転写される mRNA の発現をオタマジャクシ幼生で調べたところ、*DMRT1* mRNA は、性決定期とその後の性分化期のZZ、ZW生殖巣で同様に発現するのに対し、*DM-W* mRNA は、性決定期の生殖巣のみで発現が認められ

図4 *DM-W* 遺伝子の♀ゲノム特異性 (W染色体座位) (文献6より改変)

(A) 雌雄3個体の *EcoRI* 消化ゲノム断片を用いた *DM-W* のサザンブロット解析。♀ゲノムサンプルにのみシグナルが認められる。

(B) *DM-W* の FISH 解析の模式図。

た。更に、競合的RT-PCR法を利用して、性決定期ZW生殖巣でのこれら2種のmRNA量を直接比較解析したところ、興味深い事に、性決定期初期の生殖巣ではDM-WがDMRT1より多量に発現している事がわかった⁶⁾。これは、後述するDM-W/DMRT1による性決定モデル提唱の根拠の1つとなった。

5. アフリカツメガエルDM-Wの機能解析

—性決定遺伝子の検証—

DM-Wの特徴(①雌特異的W染色体に座位、②性決定期ZW生殖巣での特異的発現、③精巣形成上位遺伝子DMRT1とDNA結合領域で非常に高い相同性を持ち、かつ、その転写制御ドメインの欠失)から、筆者らは、〈ZZ/ZW型アフリカツメガエルの性(♀)決定遺伝子はDM-Wである〉という作業仮説を立てた。その検証のために、以下の2つのタイプのトランスジェニック個体を作製し解析を行った。

5-1. DM-Wによる♀化誘導

—Gain-of-Function—

DM-Wを持たないZZ個体の生殖巣でDM-Wが発現したら性転換(ZZ♂→ZZ♀)が起きるかを、精子核とDM-W発現ベクターを混合し、顕微鏡下で受精(顕微受精)させたトランスジェニック個体を作製し検討した。発現ベクターには、DM-W上流約3kbpあるいはCMVプロモーターをDM-W cDNAと連結したプラスミドを用いた。性決定期から約1ヶ月後の四肢発達中のステージ56¹³⁾の幼生のZZ生殖巣では、始原生殖細胞は皮質から髄質に移動し精原細胞へ分化するが、ZW生殖巣では髄質が発達せず卵巢腔が形成され、始原生殖細胞は卵原細胞へ、あるいは第一次卵母細胞へ分化する(図5左)。この時期にトランスジェニックZZ個体の生殖巣を観察したところ、両発現ベクター導入個体共に、精巣構造に加え卵巢の特徴である卵巢腔や卵母細胞(卵精巣)が観察された⁶⁾(図5右)。この事は、DM-Wたった1つの遺

伝子で本来精巣になる運命の生殖巣が卵巢化されたと考える事ができる。なぜ、完全な卵巢を形成しなかったかは今後の課題であるが、1つの可能性としては性決定期の生殖巣でのDM-Wの発現が不十分であった事が考えられる。

5-2. DM-Wノックダウンによる♂化誘導

—Loss-of-Function—

5-1とは逆に、DM-W発現抑制ZW個体の表現型を調べるために、ショートヘアピン型RNAが形成できるようにデザインしたDM-Wノックダウンベクターを構築し、トランスジェニック幼生および成体を作製した。前述(5-1)と同じステージ56のZW幼生の生殖巣では、いくつかの個体で卵精巣が観察された(未発表データ)。更に、成体においては、2匹のZW個体において精細管構造を持

図5 DM-W発現トランスジェニック幼生(ステージ56)の生殖巣(文献6より改変)

ステージ56の幼生期、通常のZW生殖巣は、ZZ生殖巣とは違い卵巢腔が形成され、卵原細胞に加え、卵母細胞に分化した生殖細胞も存在する(左)。一方、DM-W発現ベクターが導入されたZZ生殖巣では、右の2個体(ZZ #3、ZZ #8)の生殖巣のように、卵巢腔が部分的に形成され、卵母細胞が認められた。ZZ #3およびZZ #8は、それぞれDM-W上流約3kbpおよびCMVプロモーターをDM-W cDNAに連結した発現ベクター導入個体の生殖巣である。

OC: 卵巢腔; PO: 第一次卵母細胞; GC: 生殖細胞; Sg: 精原細胞; Og: 卵細胞

つ精巣が観察された(未発表データ)。これは、DM-Wたった1つの遺伝子の発現抑制が、本来卵巣になる運命だった生殖巣を精巣へと性転換させたことを示している。

以上の検証実験から、♀ゲノム特異的(W染色体リンク)遺伝子DM-Wは、アフリカツメガエルの性(♀)決定遺伝子と考えられる。DM-Wは、両生類で初めて発見された性決定遺伝子であると共に、ZZ/ZW型の性決定様式を持つ脊椎動物で初めて発見された♀誘導型の性決定遺伝子である。

6. 新規ZZ/ZW型性決定モデル

—アンチ精巣型の性(♀)決定遺伝子DM-W—

DM-WとDMRT1はDMドメインというDNA結合領域で相同性が非常に高い事、2つのタンパク質は性決定期のZW生殖巣で同じ細胞で発現する事(未発表)から、両者の標的遺伝子は同じである可能性が高い。一方、両者のC末端領域には、有意な保存性は無く、標的遺伝子の転写調節において機能差異が示唆される。この事から、筆者らは、図6に示すような性決定の分子モデルを考えた。このモデルでは、ZZ(遺伝的♂)個体では、DMRT1が精巣形成最上位遺伝子産物として精巣形成を誘導する。一方、ZW(遺伝的♀)個体では、DM-Wが性(♀)決定遺伝子産物としてDMRT1タンパク質の機能を抑制し結果的に卵巣形成を導く、というモデルである。すなわち、このモデルでは、DM-Wはアンチ精巣形成型の性(♀)決定遺伝子であると言い換える事ができる。このDMRT1/DM-Wを頂点とする性決定モデルを検証において、筆者らは、①DMRT1とDM-Wは同じ細胞で発現する事、②in vitroで同じDNA配列に結合する事、③培養細胞での発現系においてDM-WがDMRT1の転写活性化能を抑制する事、を見いだしている(未発表)。しかし、重要な点は個体レベルでの検証である。DM-WおよびDMRT1の性決定期生殖巣での標的遺伝子を同定・解析することができれば、この精巣形成抑制型性決

図6 アフリカツメガエルZZ/ZW型の性決定モデル：精巣形成阻害型♀決定モデル

性決定期初期ZZ生殖巣ではDMRT1によって精巣誘導されるのに対し、ZW生殖巣ではDM-WがDMRT1より多量に発現し⁶⁾ DMRT1の標的遺伝子を覆い、DMRT1を拮抗阻害し精巣形成を抑制する(本文6項参照)。このモデル図では、DMRT1はアクチベーターとしているが、リプレッサーとして機能する可能性もある。いずれにせよ、DM-WはDMRT1の転写因子としての機能を阻害するアンチ精巣型の性(♀)決定遺伝子として機能するというモデルである。この遺伝子発現制御は、性決定期生殖細胞周辺の体細胞内で行われると筆者らは考えている。

定モデルの最終的な検証になると共に、この種での性決定・性分化遺伝子発現ヒエラルキーの理解、および、脊椎動物の性決定システム進化の考察へ大きな一歩を踏み出す事になると思われる(後述)。

7. DM-W遺伝子の誕生・分子進化

ツメガエルDMRT1遺伝子は、6つのエクソンから構成されており、第2エクソンに開始コドンに相当するATGを含み、第2-3エクソン内にDNA結合領域であるDMドメインのコード領域が、第4エクソン以降に転写調節ドメインのコード領域が存在する¹²⁾。一方、DM-Wは、DMRT1の重複によって誕生した遺伝子であるが、4つのエクソンから構成され、第1～第3エクソンまではエクソン-イントロン連結部を含めDMRT1と極めて高度に保存されているが、第4エクソンは全く相同性が認められない⁶⁾。このことから、DM-Wは、DMRT1の重複過程において、新第4エクソンを誕生させて分子進化した遺伝子であると推察される。DM-Wの第4エクソンは、現在のDNAバンク登録上のDNA配列あるいは予想されるアミノ酸の配列との

相同性が検出されないことから、停止コドンとポリA付加のためのエクソンとも考えられる。この考えは、DM-Wが、アンチ精巣形成遺伝子としてDMRT1の転写因子機能を抑制するためのドミナントネガティブ型(転写制御C末端部欠失型)遺伝子として誕生したと考えれば妥当性があるが、もちろん第4エクソンが新たな機能ドメインを持って誕生した可能性も否定はできない。

現在までに、アフリカツメガエル近縁種でDM-Wオルソログは見つかっていない。アフリカツメガエルは、2倍体のツメガエル種からゲノム倍数化後、偽4倍体となり、その後、種分化してきた種の1つと考えられている。このことから、DM-Wは、アフリカツメガエルあるいは非常に近縁な偽4倍体の先祖種で、新しく性(♀)決定遺伝子として誕生(分子進化)した可能性が考えられる。更に、アフリカツメガエル、2倍体のニシ(ネッタイ)ツメガエル、ZZ/ZW型のツチガエルの性分化関連遺伝子の染色体分析¹⁴⁾から、アフリカツメガエルのW染色体は、DM-Wと共進化してきた、あるいはDM-Wが座位した染色体がW染色体となった可能性が考えられる。

8. アフリカツメガエル性決定・性分化遺伝子発現ヒエラルキー

従来、アフリカツメガエルにおいては、形態的区別ができない性決定期・初期性分化期の生殖巣で遺伝子レベルの雌雄差の解析が困難であった。♀ゲノム特異的DM-W遺伝子の発見によって、遺伝的♀♂(ZW、ZZ)の判定が可能となり⁶⁾、性決定前後期における遺伝子発現ヒエラルキーの解明への前段階が整ったと考えられる。実際、筆者らは、哺乳類(真獣類)以外で卵巣形成に重要な遺伝子の可能性が高いと考えられるエストロゲン合成酵素P450アロマトラーゼの遺伝子Cyp19、また種々の動物でCyp19遺伝子の発現を上方制御する可能性があるFoxl2に関して、性決定期・初期性分化期で発現を調

べたところ、ZW生殖巣特異的な発現が認められた¹⁵⁾。更に、これらの遺伝子のZW特異的な発現がDM-W依存性かを検証するために、本来DM-W遺伝子が存在しないZZ個体にDM-W発現ベクターを導入し解析した所、トランスジェニックZZ未分化生殖巣でCyp19、Foxl2 mRNAが上方制御され、ZW未分化生殖巣と同程度の発現レベルを示した¹⁵⁾。これらの結果は、卵巣形成遺伝子発現カスケードにおいて、Cyp19、Foxl2がDM-Wの下流に位置することを示す(図7)。更に、この種のエストロゲンによる性転換(後述)という現象¹⁶⁾とを考え合わせると、ZW個体では、〈DM-W→Foxl2→Cyp19→エストロゲン→エストロゲン受容体〉という卵巣形成カスケードが存在し、性転換ZZ個体では、このカスケード下流のエストロゲン受容体(実際、エストロゲン受容体の1つERαは、性決定期のZZ生殖巣でZW型と同程度の発現を示す¹⁵⁾)が外来性エストロゲンによって活性化され、卵巣形成したと考える事ができる。

図7 アフリカツメガエル性決定・性分化システムのモデル図

DMRT1あるいはDM-Wは、DMRT1/DM-Wの標的遺伝子の発現制御を介して精巣形成遺伝子(未同定)あるいは卵巣形成関連遺伝子(Foxl2、Cyp19など)の発現を制御すると考えられる(本文8項参照)。本モデルは、〈DMRT1/DM-W→標的遺伝子〉以外、同一細胞内でのヒエラルキーを表しているものではない。今後、各因子の発現細胞の特定、生殖細胞/ニッチを含めた細胞間シグナリング・ネットワークの解析が二者択一型生殖巣形成システム理解に必要である。

9. 脊椎動物における性決定システム進化

アフリカツメガエル *DM-W* は、性決定カスケードの頂点に位置する性決定遺伝子としては、脊椎動物では3番目に発見された遺伝子である。そこで、これまでの種々の脊椎動物種の性決定・性分化・性転換に関する知見とアフリカツメガエルでの知見を総合し、脊椎動物の性決定システム進化を以下に考察していきたいと思う。

9-1. 性決定遺伝子と性染色体

繰り返しとなるが、性決定遺伝子である *SRY* および *DMY* は *XX/XY* 型様式を持つ哺乳類(真獣類) および魚類メダカの *Y* 染色体に、*DM-W* は *ZZ/ZW* 型様式を持つアフリカツメガエルの *W* 染色体に座位する。1. で記述したように、変温動物の性決定様式には、環境依存型と性染色体依存型(*XX/XY* 型、*ZZ/ZW* 型など) とが認められるが、*DMRT1* パラログの *DM-W* の発見により、少なくとも *DMRT1* の重複遺伝子 *DMY* を持つ *XX/XY* 型のメダカと *DM-W* を持つ *ZZ/ZW* 型のアフリカツメガエルとは、性決定様式は逆であるが、その性決定直後の卵巣・精巣形成には根幹的保存システムがあると考えられる。環境による影響を被りやすい変温動物の種分化においては、性決定遺伝子は、根幹的保存性のある性決定システムの最上位遺伝子として、雌雄2つの方向に分岐させる役割を担えばよいので、卵巣あるいは精巣形成の鍵遺伝子、あるいはその遺伝子を制御する遺伝子の上位の遺伝子であれば進化的保存性を保つ必要はなく、種によって多様化したと考える事ができる(自説)。この多様化は、性染色体分化が不明瞭な種で顕著と思われ、実際、アフリカツメガエル近縁種で *DM-W* は見つかっていない事(前述7.)、魚類メダカ *DMY* はメダカ属のある系統で誕生した事¹⁷⁾、と合致する。

一方、性染色体の分化が明瞭な哺乳類、鳥類、ある系統の変温動物種では、安定した性決定システムの構築が性染色体分化と共に共進化し、性決定遺伝子が固定化された可能性

がある(自説)。現在、多くの種で *ZZ/ZW* 型と考えられている鳥類では、性決定遺伝子の同定は報告されていないので全くの筆者の想像であるが、*Z* あるいは *W* 染色体分化過程で固定化した性決定遺伝子が(勿論例外はあると考えられるが)、種を超えて保存している可能性が強いと思っている。ただし、鳥類進化過程で分岐年代が古い平胸類(ダチョウ目)では、性染色体分化がそれほど顕著でないので、性決定遺伝子にバリエーションがあるかもしれない。いずれにせよ、さまざまな鳥類種の性決定遺伝子の同定が今後望まれる。また、哺乳類では、有袋類と真獣類の祖先種で *SOX3* 遺伝子が座位する染色体の一方に *SOX3* 遺伝子変異によって *SRY* プロトタイプ遺伝子が誕生し、その染色体はプロト *Y* 染色体として、*SRY* プロトタイプ遺伝子と共に共進化してきた可能性が考えられる。その結果、精子形成に関わる他遺伝子の分子進化を含有した矮小化 *Y* 染色体と性決定遺伝子 *SRY* が、真獣類で系統進化的に固定されてきたと考えられる。遺伝子の重複進化という観点から考察すると、性決定遺伝子 *SRY* は性決定遺伝子 *DMY*、*DM-W* と同様に、パラログ遺伝子誕生後、性決定を司る新機能付加(neofunctionalization)された遺伝子と考える事ができる。興味深い事に、沖縄に生息するトゲネズミのある系統では、*Y* 染色体と共に *SRY* 遺伝子の消失した種が存在する^{18, 19)}。この系統は、地理的隔離に伴って種分化が起り、真獣類の生殖巣形成システムを保持しながら、*SRY* 以外の遺伝子が性決定遺伝子として機能進化したと考えられる。

9-2. 性ホルモンと性決定システム

脊椎動物において、性ホルモンは生殖巣・付属生殖器官の形成あるいは脳の性分化に深く関わっている。魚類・両生類では、発生過程、雌性ホルモン(エストロゲン)あるいは雄性ホルモン(アンドロゲン)処理によって、それぞれ遺伝的♂が♀へ、あるいは遺伝的♀が♂へと性転換する種が多く観察されてい

る(両生類では、どちらかの性ホルモンにのみ感受性があるものが何種か知られている)。ZZ/ZW型のアフリカツメガエルの場合は、前述したように、遺伝的♂(ZZ)個体がエストロゲンによって♀に性転換する¹⁶⁾。爬虫類も、性ホルモンによって♂化あるいは♀化が知られている。鳥類ニワトリでは、ZW胚の卵巣形成は性ホルモン処理の影響は受けないが、ZZ胚にエストロゲン処理すると卵精巢になり、アロマトーゼ阻害剤処理によって逆にZW個体に精巢が形成される²⁰⁾。また、多くがXX/XY型の性決定様式を持つと考えられている哺乳類(単孔類・有袋類・真獣類種)では、有袋類のワラビーで、誕生直後エストロゲンを含有したミルクの投与で♀への性転換が知られている²¹⁾。真獣類では、胎児期XY個体にエストロゲン処理すると、外部生殖器の♀化が認められ、ヒトではアンドロゲンあるいはエストロゲン過剰分泌によって外見上、男性化あるいは女性化が認められるが、性ホルモンによる性転換は報告されていない。

これらの知見から、性ホルモンは、哺乳類(特に真獣類)以外の脊椎動物種では性決定後の初期の卵巣あるいは精巢形成に重要な機能を果している事が推察される。これは、魚類・両生類・爬虫類の多くの動物種で、エストロゲン合成酵素アロマトーゼが初期卵巣形成に重要な機能を担っている知見と合致する。すなわち、哺乳類(特に真獣類)以外の脊椎動物種では、性ホルモン依存的性決定システムを根幹に内包していると考えられる。今後のこのシステムにおける重要課題は、同一細胞内あるいは細胞間でのDMRT1♂化シグナルとエストロゲン(アロマトーゼ)♀化シグナルのクロストークの分子的解明であろう。

哺乳類(真獣類)では、生殖巣形成初期のエストロゲン依存的パスウェイを含有する従来の性決定システムを、単孔類から有袋類を経て真獣類への進化の過程で、一部脱構築し、再構築(言い換えると、脱・再構築が行われた種系統が生き残り)され、性染色体との共

進化によってSRYが性(♂)決定遺伝子として系統進化上、固定されてきたのではないかと、筆者は考えている。最近、哺乳類マウスにおいて、Sryの直接の下流遺伝子としてSox9が報告された²²⁾。今後、環境依存型性決定様式を採用するさまざまな種および恒温動物である鳥類各種の性決定遺伝子、そして、その性決定遺伝子発現カスケード・細胞間シグナリングの分子機構の解析によって、性決定システム進化の理解が更に深まってくるものと期待される。

10. おわりに

筆者は、10数年前、〈ホルモンと生殖(日本比較内分泌学会編/学会出版センター)〉を読み感動した事を覚えている。種によってXX/XY型、ZZ/ZW型が存在し、また性ホルモン処理による性転換が可能な無尾両生類(カエル)の記述に、漠然と種と性決定システムの面白さを感じ、そして、その謎に挑戦したくカエルの性決定研究を始めた。それまで扱ったことのないカエルを用い、四苦八苦な状況であり、しかも、なかなか興味深い結果は得られず、他の研究と平行しながら時には途絶えながら、細々で行っていた。数年前、その性決定の面白さに共鳴してくれた所属講座の大学院生の吉本真くん(現在、がん研究所・博士研究員)が、そのセンスによってZZ/ZW型のアフリカツメガエルから♀ゲノム特異的遺伝子DM-Wの単離に成功した。その後、彼はトランスジェニック作製系の構築など難題をクリアし、性(♀)決定遺伝子としての機能の検証を精力的に行った。本稿は、その成果を基盤とし、終盤部に脊椎動物の性決定システム進化を考察させていただいた。

謝 辞

本比較内分泌学誌で、ツメガエル性決定研究に加え、比較内分泌学的性システムに関する10数年前の筆者の疑問を、少なからず考察として書かせていただいた事は、非常に光

栄であり、また感慨深く思われます。この執筆の機会を与えて下さいました高橋明義先生に厚く御礼致します。筆者は、現在、甲状腺ホルモンによる無尾両生類の変態に関する研究も行っており、本稿執筆の機会と共に、本学会に入会させていただきました。本学会で勉強させていただき、性決定・分化／リモデリング(変態)—内分泌—系統進化の研究を一步ずつ進めていけたらと考えております。

本稿執筆におきましては、〈おわりに〉で記したように性決定研究の成果の多くは吉本真博士に、卵巣形成遺伝子発現に関しては彼に加え岡田絵真さんによるものであり、二人に深く感謝申し上げます。また、アフリカツメガエルのW染色体を同定していただいた北海道大学の宇野好宣氏、西田千鶴子助手、松田洋一教授(現・名古屋大学)に感謝申し上げます。終始、研究を常に暖かく支援・助言していただきました北里大学理学部柴忠義前教授、現在も研究方針・方法など助言していただいている同学部高松信彦教授に、深く感謝申し上げます。最後に、研究の発想、方針、実行すべてにおいて、筆者の研究の原動力となった同学部生物情報科学講座に在籍した学生の方々に心から深く感謝致します。

なお本研究は、文部科学省の科学研究費(特定領域研究〈性分化〉／基盤研究)および北里大学理学部主題研究費の支援によって行われました。感謝申し上げます。

文 献

- 1) Marshall Graves JA, 2008. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet*, **42**, 565-586.
- 2) Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN, Nature. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**, 240-244.
- 3) Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R, 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, **351**, 117-121.
- 4) Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**, 559-563.
- 5) Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Schartl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**, 11778-11783.
- 6) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**, 2469-2474.
- 7) Koyano S, Ito M, Takamatsu N, Takiguchi S, Shiba T. 1997. The *Xenopus* Sox3 gene expressed in oocytes of early stages. *Gene*, **188**, 101-107.
- 8) Uno Y, Nishida C, Oshima Y, Yokoyama S, Miura I, Matsuda Y, Nakamura M. 2008. Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. *Chromosome Res*, **16**, 637-647.
- 9) Gurdon JB, 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Em*

- bryol Exp Morphol, **10**, 622-640.
- 10) Chang CY, Witschi EE, 1956. Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. Proc Soc Exp Biol Med, **93**, 140-144.
- 11) Hodgkin J, 2001. The remarkable ubiquity of DM domain factors as regulators of sexual phenotype: ancestry or aptitude? Genes Dev, **16**, 2322-2326.
- 12) Yoshimoto S, Okada E, Oishi T, Numagami R, Umemoto H, Tamura K, Kanda H, Shiba T, Takamatsu N, Ito M, 2006. Expression and promoter analysis of *Xenopus* DMRT1 and functional characterization of the transactivation property of its protein. Dev Growth Differ. **48**, 597-603.
- 13) Nieuwkoop P, Faber J, 1956. Normal Table of *Xenopus laevis*(Daudin), North-Holland Publishing, Amsterdam.
- 14) Uno Y, Nishida C, Yoshimoto S, Ito M, Oshima Y, Yokoyama S, Nakamura M, Matsuda Y. 2008. Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. Chromosome Res, **16**, 999-1011.
- 15) Okada E, Yoshimoto S, Ikeda N, Kanda H, Tamura K, Shiba T, Takamatsu N, Ito M. 2009. *Xenopus* W-linked DM-W induces *Foxl2* and *Cyp19* expression during ovary formation. Sex Dev, **3**, 38-42.
- 16) Villalpando I, Merchant-Larios H, 1990. Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. Int J Dev Biol, **34**, 281-285.
- 17) Kondo M, Nanda I, Hornung U, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Schmid M, Shima A, Schartl M, 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b* (Y) of medaka from other fish species. Curr Biol, **13**, 416-420.
- 18) Soullier S, Hanni C, Catzeflis F, Berta P, Laudet V, 1998. Male sex determination in the spiny rat *Tokudaia osimensis* (Rodentia: Muridae) is not Sry dependent. Mamm Genome, **9**, 590-592.
- 19) Sutou S, Mitsui Y, Tsuchiya K, 2001. Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis* spp. Mamm Genome, **12**, 17-21.
- 20) Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N, 2001. Sex reversal and aromatase in chicken. J Exp Zool, **290**, 727-740. Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, Nagahama Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M, 2003. *Oryzias latipes* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. Zoolog Sci. **20**, 159-161.
- 21) Coveney D, Shaw G, Renfree MB, 2001. Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tammar wallaby. Biol Reprod, **65**, 613-621.
- 22) Sekido R, Lovell-Badge R, 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. Nature. **453**, 930-934.