

ふりがな	おおたけ ひろゆき
氏名	大竹博之
学位	博士（理学）
学位記番号	新大院博（理）第289号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Evolution of <i>DMY</i> , the sex-determining gene in the Medaka (メダカ性決定遺伝子 <i>DMY</i> の進化)

論文審査委員	主査	教授	酒泉 満
	副査	教授	濱口 哲
	副査	教授	高橋 正道
	副査	准教授	林 八寿子
	副査	准教授	上井 進也
	副査	准教授	山平 寿智

博士論文の要旨

哺乳類以外の脊椎動物で唯一性決定遺伝子が明らかにされているメダカ (*Oryzias latipes*) の性決定遺伝子(*DMY*)の進化過程に興味をもち、野生由来の突然変異解析、分子生物学的手法による遺伝子機能解析、比較ゲノム解析を用いて *DMY* の出現と進化に関する研究を行った。要旨は以下の通りである。

1. 野生集団由来 XY 雌の遺伝解析

野生メダカ集団中には約 1%の割合で *DMY* をもつ雌 (XY 雌) が存在する。全国各地から探し出した XY 雌の遺伝解析から、XY 雌の出現原因は Y 染色体の変異であることが判明した。これらの変異は子孫の XY 個体に雄が生じるものと生じないものの 2 群に大別された。*DMY* の塩基配列を調べた結果、後者の大部分は第 3 エキソン内のフレームシフト突然変異による機能欠損であること、前者のすべてと後者の一部はアミノ酸コード領域に変異がないことから発現制御領域の変異と推定した。実際、これらの変異では、性分化時の mRNA の発現が顕著に低下していることが判明した。この結果、雄の出現にはあるレベル以上の *DMY* の発現が必要であることが明らかになった。

2. 遺伝子導入法を用いた *DMY* の出現機構の解析

DMY は同族の *DMRT1* から遺伝子重複によって進化したと考えられている。どのような仕組みで重複した *DMRT1* が性決定機能を獲得したのかを明らかにするために 2 種類の組み換え遺伝子を作成し、遺伝子導入実験を行った。*DMY* の cDNA に CMV プロモーターを連結したコンストラクトと *DMRT1* の cDNA に CMV プロモーターを連結したコンストラクトは共に XX 雄を生じさせたことから *DMY* と *DMRT1* のタンパク分子には機能的差異はないと結論した。また、近縁種間で *DMRT1* の発現を比較した結果、*DMY* の出現前後で *DMRT1* の発現パターンには顕著な変化がないことを明らかにした。これらの結果から、*DMY* の性決定遺伝子機能の獲得は、発現制御領域に変異が生じ、発現時期が早まったことによるものであると結論した。

3. *DMRT1* 領域の比較ゲノム解析による発現制御領域の探索

マウス、ゼブラフィッシュ、メダカの *DMRT1* の塩基配列比較から、進化的に保存された DNA 領域をイントロン内に 2 箇所、遺伝子間領域に 1 箇所発見した。イントロン内の 1 つは *DMY* に認められないことから、この領域の欠失により重複した *DMRT1* が新しい発現パターンを獲得したものと推定した。

審査結果の要旨

申請者は、前期課程で修得した分子生物学の研究手法を基礎に後期課程における研究テーマを決定した。即ち、メダカで初めて報告された哺乳類以外の性決定遺伝子 *DMY* がメダカ属に共通のものではないことが明らかになり、その起源が極めて新しいことが推測されていた。そこで申請者は、*DMY* の起源や性決定の分子機構を解明するには突然変異解析や組み換え DNA を用いた遺伝子導入実験が必須であると考えた。本申請論文は「*DMY* 遺伝子の起源」に着目し、その進化メカニズムを明らかにしようという意欲的なテーマである。

第一部では、網羅的な塩基配列解析と発現解析から、XY 雌の出現機構を明らかにした。この結果により *DMY* がメダカの「性決定遺伝子」であることが明確に証明された。非常に重要な業績である。

第二部では、遺伝子導入メダカを作成し、強制発現により *DMRT1* と *DMY* は共に XX 個体を雌にする機能をもつことを明らかにした。CMV プロモーターで強制発現させたことが厳密には正常な発生を再現したものとは言えないことなど、今後より説得力のある証明が必要と考えられるが、重要な発見である。

第三部では、公開されている DNA 塩基配列データを用いて、*DMRT1* 遺伝子周辺の保存領域探索に取り組んだ。その結果、*DMY* の第 5 イントロン内に 2 箇所、*DMRT1* 遺伝子下流のスペーサー内に 1 箇所のマウス、ゼブラフィッシュ、メダカの 3 種で保存された領域を発見した。このうち第 5 イントロン内の 1 箇所が *DMY* にはないことからこの領域の欠失が発現の変化と関係する可能性がある結論した。この仮説の証明には組み換え DNA を用いたさらなる遺伝子導入実験が必要である。

以上の結果は、*DMY* の起源を実験的に証明するための道筋を具体的に示したものであり画期的な成果である。椰子メダカから発見した突然変異体がどのような発現パターンと制御配列をもつのか興味を持たれる。

第一部については米国遺伝学会の英文誌「GENETICS」に掲載済みである。第二部については現在投稿原稿を執筆中である。

以上のように本申請論文は、意欲的なテーマに取り組み、脊椎動物で 2 番目となるメダカの性決定遺伝子の進化機構の解明に貢献しうる重要なものである。研究成果の公表も順調であり、今後の研究の発展が期待できる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として妥当であると認定した。