

# 環境コントロールによる性統御

北野 健

熊本大学大学院自然科学研究科

Sex-manipulation by control of environmental factors

TAKESHI KITANO

Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555, Japan

脊椎動物の性は、主に遺伝的要因により決定されるが、魚類においては、水温<sup>1)</sup>や pH<sup>2)</sup>などの生育環境に応じて性が決定されることが知られている。しかしながら、この分子機構は未だに明らかにされていない。

XX/XY 型の性決定システムを持つヒラメの遺伝的雌(XX)は、性分化時期に 18□で飼育すると雌へ、27□で飼育すると雄へとほぼ完全に分化誘導することが可能であるため、水温依存的な性決定の分子機構を解析するための大変優れた実験動物である。<sup>3,4)</sup>我々は、XX 個体を 18□で飼育するとアロマターゼ(アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素) mRNA の発現量が上昇するが、高水温(27□)で飼育することによりアロマターゼ mRNA の発現が抑制されて雄へと性分化する事を明らかにした。<sup>5,6)</sup>このことは、ヒラメの高水温による雄化にアロマターゼ遺伝子の転写調節が深く関与している事を示している。ここでは、まず、温度コントロールによる性統御を行う上で、キーとなる遺伝子であるアロマターゼ遺伝子の転写調節機構について紹介する。次に、高水温による雄化とコルチゾル(ストレスホルモン)との関連性に言及し、さらにこれらの機構が他の魚種でも保存されているかどうかについて議論したい。

まず、ヒラメアロマターゼ遺伝子の発現を調節する因子の候補を得るため、アロマターゼ遺伝子の 5' 上流域の塩基配列を調べたところ、Foxl2 binding site と cAMP response element (CRE)を確認した。<sup>7)</sup>このことから、転写因子 Foxl2 及び CRE を介するシグナル伝達経路を持つ生殖腺刺激ホルモンが、ア

ロマターゼの発現に性差を導き出す因子の候補として挙げられた。そこで、ヒラメ Foxl2 mRNA の発現パターンを RT-PCR 及び *in situ* hybridization により解析した結果、その発現パターンはアロマターゼ mRNA とよく一致していた。<sup>7)</sup>また、ゲルシフトアッセイ及びレポーターアッセイにより、Foxl2 はアロマターゼプロモーター領域内のサイトに直接結合し、アロマターゼの転写活性を上昇させることが明らかとなった。<sup>7)</sup>

次に、生殖腺刺激ホルモン(FSH, LH)及びその受容体(FSH 受容体、LH 受容体) mRNA の発現を RT-PCR で調べた結果、FSH、LH、LH 受容体 mRNA の発現は雌雄で検出されたが、FSH 受容体 mRNA の発現は、27□で飼育した個体でのみ抑制されていた。<sup>7)</sup>また、無血清培地を用いたヒラメ生殖腺培養系にリコンビナント FSH(rFSH)または rLH を投与して 18□または 27□で培養した結果、rFSH を投与した試験区でのみアロマターゼ mRNA の発現が維持されたことから、性分化時期におけるアロマターゼ遺伝子の発現制御に、FSH シグナリングが関与している事が示唆された。

一方、生殖腺培養実験の結果から、温度は生殖腺に直接、影響を与えているわけではなく、生殖腺以外の因子を介して影響している可能性が考えられた。そこで、高水温ストレスにより合成量が上昇する因子の一つであるコルチゾルに着目し、ヒラメ性分化におけるこの影響を解析した。その結果、コルチゾルを投与した XX 個体の性比を調べた結果、高濃度処理群において 50%の雄化率を示した。さらに、生殖腺の器官培養系にコルチゾルを添加した結

果、アロマターゼ及び Foxl2 mRNA の発現が抑制され、雄化マーカーである MIS mRNA の発現<sup>8,9)</sup>が誘導された(北野ら,投稿準備中)。これらのことから、コルチゾルは高水温によるヒラメの雄化に深く関与している可能性が示唆された。

最後に、これらの機構が他の魚種でも保存されているかどうかを確認するため、ヒラメと同様に、高水温処理により雄化することが分かっているメダカ<sup>10)</sup>を用いてコルチゾルの影響を調べた。その結果、XX 個体の中で約半数の個体が雄化する事が判明した(北野ら,投稿準備中)。これらの結果から、少なくとも数魚種においては、高水温による雄化にはコルチゾル量の増加が関与している可能性がある。したがって、「環境コントロールによる性統御」とは、実は「ストレスコントロールによる性統御」とも考えられるかもしれない。

#### 文 献

- 1) Conover DO, Kynard BE. Environmental sex determination: Interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 1981; **213**: 577-579.
- 2) Heiligenberg W. Color polymorphism in the males of an Africal cichlid fish. *J. Zool.* 1965; **146**: 95-97.
- 3) Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 1999; **173**: 235-246.
- 4) Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe S. Role of P450 aromatase in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Environ. Sci.* 2001; **8**: 1-11.
- 5) Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, Nagahama Y, Abe S. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 1999; **23**: 167-176.
- 6) Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe S. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 2000; **56**: 1-5.
- 7) Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, Kitano T. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; **359**: 935-940.
- 8) Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, Iguchi T, Abe S, Kitano T. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; **322**: 508-513.
- 9) Kitano T, Yoshinaga N, Shiraishi E, Koyanagi T, Abe S. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 2007; **74**: 1171-1177.
- 10) Sato T, Endo T, Yamahira K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Induction of female-to-male sex reversal by high temperature treatment in Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoolog. Sci.* 2005; **22**: 985-988.