

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07137

研究課題名(和文)両生類におけるAR遺伝子の機能と転写因子の探索

研究課題名(英文)The study for the function of the AR gene and a candidate of its transcription factors in amphibians

研究代表者

中村 正久(NAKAMURA, MASAHIISA)

早稲田大学・理工学術院総合研究所(理工学研究所)・その他(招聘研究員)

研究者番号：40130025

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文): ツチガエルの性決定因子がアンドロゲンとその受容体であることを(1)-(4)の結果で示した。(1) I-SceI meganuclease法でAR遺伝子を導入した雌(ZW)胚は卵精巣を形成する。(2)アンドロゲン濃度が0.2ng/ml以上の含水中で雌(ZW)幼生を飼育すると性転換して雄になる。(3)AR遺伝子導入雌(ZW)胚を低濃度のアンドロゲン含水中(0.2ng/ml)で飼育すると精巣を形成する。(4)CRISPR/Cas9システムでAR遺伝子をノックアウトした雌(ZW)胚を高濃度(2ng/ml)のアンドロゲン含水中で飼育しても性転換しない。更に、(5)AR遺伝子の転写調節候補因子を見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに脊椎動物のヒト、ツメガエル、メダカなどで転写因子や分泌蛋白質が性決定因子として発見されている。我々は本研究で両生類(ツチガエル)の性決定因子がステロイドホルモンのアンドロゲンとその受容体であること示した。ステロイドとその受容体は脊椎動物の雌雄差形成や性転換に深く関わることはよく知られているが、脊椎動物の性決定因子になり得ることを世界で初めて示した。本研究によってアンドロゲンとその受容体が性決定因子であることを示すことによってステロイドホルモンの作用機序及び性転換のしくみの解明に大きく貢献することから、本研究の成果は学術的のみならず社会的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文): In this study we have shown for the first time by the following results that the sex of the Japanese pond frog *Glandirana rugosa* in amphibians is determined by androgen and its receptor. (1) When the AR gene was introduced into *G. rugosa* female (ZW) embryos by the method of the I-SceI meganuclease, the embryos grew to become adult frogs and developed the ovotestes. (2) When female tadpoles were reared in water containing androgen at a concentration of more than 0.2 ng/ml, all of them grew to be adult frogs and formed the testes. (3) The sex of the AR gene-introduced females were changed to males and they formed testes. (4) When the AR gene-knockdown female (ZW) embryos by the CRISPR/Cas9 system were reared in water containing androgen at a concentration of 2 ng/ml inducing the female to male sex reversal, the sex of the adult females was not reversed to males. The adult females formed the ovaries.

研究分野：分子生殖生物学、動物組織形態学

キーワード：性決定因子 ステロイドホルモン 受容体 遺伝子ノックイン 遺伝子ノックアウト 性転換 ツチガエル 両生類

## 1. 研究開始当初の背景

一般に脊椎動物の性は、性染色体の組み合わせ(雄ヘテロ XX/XY 型と雌ヘテロ ZZ/ZW 型)によって遺伝的に決まる。事実、雄決定遺伝子が哺乳類 (*SRY*, 1990) やメダカ (*DMY*, 2002; *GsdfY*, 2012) で発見されている。一方、爬虫類(カメやワニなど)では種によって卵の孵化温度によって性が決まる。ところが、遺伝的或いは温度依存的に性が決まる動物でもステロイドホルモンによって性が変わる。この事実は脊椎動物の性に可塑性があること、また、ステロイドホルモンとその受容体が性決定の主役になり得る可能性を示している。

遺伝的に性が決まる脊椎動物のそれぞれの種は雄ヘテロ型か雌ヘテロ型である。しかし、日本のツチガエル(両生類)は棲息地域によって XY 型か ZW 型)である。つまりこのカエルは同種に2つの性決定様式をもつ他に類がない動物で、脊椎動物の性決定のしくみ、また、性決定様式が XY 型から ZW 型或いはその逆に変わるしくみを解明するには優れた研究材料である。今までの研究によって我々は、アンドロゲン受容体遺伝子 (AR) は性 (X,Y,Z,W) 染色体上にあり (Uno et al., 2008)、W 染色体の AR (W-AR) 遺伝子は殆ど発現しない (Yokoyama et al., 2009)。従って、ZW 型ツチガエルでは、雄 (ZZ) と雌 (ZW) 胚における AR 遺伝子の発現比が 2:1 になる。更に、アンドロゲンによって雌ツチガエルも性転換して精巣を形成することを示した (Kato et al., 2004)。これらの結果から我々は、アンドロゲンと AR 遺伝子がツチガエルの性決定因子であると考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

最近、我々は雌ヘテロ (ZW) 型ツチガエルの受精卵に Z 染色体にあるアンドロゲン受容体 (Z-AR) 遺伝子を導入 (ノックイン) して発生させ、雌 (ZW) 個体が不完全性転換して卵精巣を形成することを示した。この不完全性転換は雌生殖腺のアンドロゲン量が低いためと考えた。これらの結果はツチガエルの性がアンドロゲンとその受容体によって決まる可能性を示している。本研究はツチガエルの性転換に必要なアンドロゲン濃度の決定、及び AR 遺伝子ノックアウト個体の生殖腺を組織及び分子学的手法で解析し、アンドロゲンと AR 遺伝子がツチガエルの性決定因子であることを実証すること、及び AR 遺伝子の転写調節候補因子を見つけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、(1)ツチガエルの性決定因子がアンドロゲンと AR 遺伝子であることを示し、(2) AR 遺伝子の転写調節候補因子を探索する。(1)と(2)の研究方法を以下に記す。(1)は、雌 (ZW) 胚に *I-Sec-meganuclease* 法によって Z-AR 遺伝子を導入 (gain-of-function) すると、性が転換して卵精巣を形成する (Fujii et al. 2014)。そこで、Z-AR 遺伝子をノックアウト (lost-of-function) してそれが性決定因子であることを示す。そのために、CRISPR/Cas9 システムで AR 遺伝子ノックアウト胚を作製して発生させ、性転換の有無を調べる。また、雌胚を高濃度アンドロゲン含水で飼育すると性転換して雄になるが、ツチガエルの性転換を引き起こすアンドロゲンの閾値濃度を見つけ、閾値濃度以下或いは以上のアンドロゲンを加えた水で AR 遺伝子ノックアウト胚を飼育して性転換が起きるかどうかを調べる。次に、(2) Z-AR 遺伝子の発現量が性決定の鍵と思われるので、AR 遺伝子の転写調節候補因子を探索する。(2)は、ツチガエルの Z-AR と W-AR 遺伝子の発現は元は同じだったと思われるが、W-AR 遺伝子が殆ど発現しなくなった理由は、W-AR 遺伝子の転写調節領域に変異が生じたためと考え、その領域を調べた。その結果、W-AR 遺伝子の転写調節領域には多くの変異があることが分かった (Yokoyama et al., 2009)。また、雌に Z-AR 遺伝子を導入すると正常に発現して性転換を引き起こす (Fujii et al. 2014)。このことは、AR 遺伝子の発現を調節する転写因子は雌生殖腺に用意されていること示している。そこで、AR 遺伝子の転写調節因子を探索するため、国内 20 箇所から採集したツチガエルの X-, Y-, Z-, W-AR 遺伝子の転写調節領域を調べ、遺伝子解析ソフトを用いて W-AR 遺伝子の転写調節に影響を及ぼす変異を見つけ、その部位に結合する転写候補因子を探索することにした。

## 4. 研究成果

従来の研究で成果(1)~(5)を得た。(1) AR 遺伝子は性 (X, Y, Z, W) 染色体にあり (Uno et al. 2008)、W 染色体の AR 遺伝子 (W-AR) は殆ど発現しない。(2) W-AR 遺伝子の転写調節領域には多くの変異がある (Yokoyama et al., 2009)。(3) Z-AR 遺伝子は雄未分化生殖腺で強く発現し、その発現比は雄(ZZ) : 雌(ZW)=2:1 である (Yokoyama et al., 2009)。(4) 雄の未分化生殖腺は雌のそれよりアンドロゲンを多く合成する (Sakurai et al., 2008)。これらの結果から我々は、アンドロゲンと AR 遺伝子が ZW 型ツチガエルの性決定因子と考え、受精卵に Z-AR 遺伝子を導入した Z-AR トランスジェニック (Tg) ツチガエルを作製した。その結果、(5) Z-AR Tg 雌は卵精巣を形成すること、また、Tg 雌幼生をテストステロン添加水で飼育すると性が転換し

て精巣を形成することを示した (Fujii et al., 2014)。これらの結果は、アンドロゲンとその受容体 (AR) が ZW 型ツチガエルの性決定因子である可能性を示している。しかしそれを実証するには、AR 遺伝子ノックアウトツチガエルを作製し、そのカエルの生殖腺を組織学的及び分子学的解析をして性転換の有無を調べる必要がある。また、ツチガエル AR 遺伝子の発現を調節する転写候補因子を探索する必要がある。以上の状況を踏まえて研究を進め、以下の成果を得た。AR 遺伝子ノックアウト胚を作製して雌雄の生殖腺を調べた。正常雌幼生を 0.2 ng/ml (閾値) 以上のアンドロゲン含水で飼育すると精巣を形成し、それ閾値以下のアンドロゲン濃度で飼育すると雌は性転換せず卵巣を形成する (Oike et al., 2017)。ところが、AR 遺伝子ノックアウト雌胚を 0.2 ng/ml 以上のアンドロゲン含水で飼育すると性転換せず、卵巣を形成した (Oike et al., 2017)。これらの結果から我々は、アンドロゲンとその受容体がツチガエルの性決定因子であると結論した。次に、AR 遺伝子の転写候補因子を探索するため、全国 20 箇所ですチガエルを採集して X,Y,Z,W 染色体にある AR 遺伝子の転写調節領域の塩基配列を解析した。W-AR と Z-AR 遺伝子の塩基配列を比較すると W-AR 遺伝子の転写調節領域に多くの変異があり、変異によって結合が低下すると思われる転写因子を調べた。その結果、転写候補因子として CREB, CDXA, SRY, GATA1, GATA2, MZF1, TATA, HFH2, P300, E201, CEBPA, CAP などを見つけた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Kodama M, Yoshida M, Endo M, Kobayashi T, Oike A, Yasumasu S, Nakamura M. Nanos3 of the frog *Rana rugosa*: molecular cloning and characterization. *Develop Growth Differ* 60 (2018) 112-120.
- ② Oike A, Kodama M, Yasumasu S, Yamamoto T, Nakamura Y, Etsuro Ito, Nakamura M. Participation of androgen and its receptor in sex determination of an amphibian species. *PLoS ONE* 12 (2017) e0178067. doi: 10.1371/journal.pone.0178067.
- ③ Oike A, Watanabe K, Min M-S, Tojo K, Kumagai M, Kimoto Y, Yamashiro T, Matsuo T, Kodama M, Nakamura Y, Notsu M, Tochimoto T, Fujita H, Ota M, Ito E, Yasumasu S, Nakamura M. Origin of sex chromosomes in six groups of *Rana rugosa* frogs inferred from a sex-linked DNA marker. *J Exp Zool* 327A (2017) 444-452.
- ④ Oike A, Kodama M, Nakamura Y, Nakamura M. A threshold dosage of testosterone for female-to-male sex-reversal in *Rana rugosa* frogs. *J Exp Zool* 325A (2016) 532-538.
- ⑤ Sakamoto D, Cho A, Abe T, Nakamura Y, Oike A, Kodama M, Nakamura M. Structural changes in female-to-male sex-reversing gonads of *Rana rugosa*. *J Exp Zool* 325A (2016) 209-218.

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① Oike A, Watanabe K, Yasumasu S, Ito E, Nakamura M. Origin of sex chromosomes in six groups of *Rana rugosa* frogs inferred from a new sex-linked DNA marker. Eighth International Symposium on Vertebrate Sex Determination, Kona, Hawaii, April 16-20, 2018
- ② 大池輝、伊藤悦朗、安増茂樹、中村正久 ツチガエルにおける新しい ZW 集団の起源 日本動物学会関東支部大会 東京 2018 年
- ③ 大池輝、安増茂樹、中村依子、伊藤悦朗、中村正久 Galadirana 属に新種のカエル? 日本動物学会 89 大会 東京 2018 年
- ④ 大池輝、安増茂樹、中村正久 Androgen とその受容体 (AR) は ZW 型ツチガエルの雄決定因子である 日本動物学会第 88 回大会 富山 2017 年
- ⑤ 吉田麻友果、中間卓也、中村正久 ツチガエルにおける始原生殖細胞の移動経路の探索 日本動物学会関東支部大会 横浜 2016 年
- ⑥ 大池輝、中村正久 ツチガエルにおける雄化性転換に必要なテストステロン濃度の決定 日本動物学会関東支部大会 横浜 2016 年
- ⑦ 坂本大紀、趙亜悠美、阿部大志郎、中村正久 ツチガエルオス化性転換生殖腺の三次元解析 日本動物学会関東支部大会 横浜 2016 年
- ⑧ Nakamura M. Are androgens and its receptor involved in sex determination in amphibians? The 7th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 13-17, 2015
- ⑨ 河合理沙、中村正久 ツチガエルの脳下垂体における FSH $\beta$  の局在 日本動物学会関東支部大会 東京 2015 年
- ⑩ 太田麻葵、大池輝、中村正久 ステロイド合成酵素 CYP17 のプロモーター塩基配列の解析 日本動物学会関東支部大会 東京 2015 年
- ⑪ 大池輝、児玉万穂、中村正久 ツチガエルにおける雄化性転換に必要なテストステロン濃

度 日本動物学会関東支部大会 東京 2015 年

⑫吉田麻友果、中間卓也、中村正久 ツチガエル(*Rana rugosa*)における始原生殖細胞の移動経路の探索 日本動物学会関東支部大会 東京 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。