

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08223

研究課題名(和文) 性染色体依存的な脳の性分化機構は環境因子の影響をうけるか？

研究課題名(英文) Is sex chromosome-dependent brain sexual differentiation affected by environmental factors?

研究代表者

前川 文彦 (Maekawa, Fumihiko)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：40382866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：恒温動物では生殖腺のみならず脳も性分化することで内分泌・行動の性差が形成される。発達期の性ステロイドホルモンや染色体の性が性特異的な構造・機能の形成に寄与すると考えられてきたが詳細は明らかでない。本研究では鳥類を用い、性ホルモン依存的な脳の性差と染色体依存的な脳の性差を形成する分子基盤の解明を目指して、性特異的に発現する遺伝子の探索を行うことで雌雄で発現量が異なる遺伝子群を見出した。さらに、性染色体上に存在する遺伝子、存在しない遺伝子の双方で性ステロイドホルモンによって制御されるものを発見することができ、環境要因によって変化しやすい遺伝子の候補を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：The endocrinological and behavioral sex differences have been known to be predominantly dependent on brain sexual differentiation. Both the developmental exposure to sex steroids and brain chromosomal sex are thought to contribute to such brain sexual differentiation, but the precise mechanism how these factors are related to brain sexual differentiation has not fully understood. In this study, to clarify the interaction between these factors, we examined the expression of genes showing the difference between sexes in avian diencephalon. We could find specific genes that were controlled by the exposure to sex steroids and such genes were located both on the sex chromosomes and/or autosomes. From these results, we could establish the list of genes showing the variability of expressions to environmental factors.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：性分化 性ステロイドホルモン 脳 内分泌かく乱物質

### 1. 研究開始当初の背景

脳の性分化は生殖内分泌、性行動、社会性行動などの雌雄差を発達期に刻印づける現象であり、種の存続に重要であるのみならず、複雑な社会を形成する上でも必須の生理基盤である。近年、生殖をめぐる、出生率の低下、初婚年齢の高齢化、不妊に悩むカップルの増加、異性との交際に興味を持たない若年層の割合の上昇等、社会構造の崩壊を導きかねない様々な問題が発生している。生物学的に未知の環境因子がこれらの問題の原因となっている可能性が考えられるため、生命科学の立場から性分化機構をより深く解明するとともに、性分化に影響する未知の環境因子を探索することで、生殖異変の解決を目指す必要がある。ほ乳類では近年、性決定遺伝子 *Sry* の遺伝子欠損マウスや、*Sry* を当初の遺伝子座から別の遺伝子座に移動させることで人工的な性染色体の組み合わせを持つ遺伝子組換えマウスの研究から、性染色体が脳の性分化に影響を与える可能性が示唆されている

(Arnold et al. *Dev. Dyn.* 242:371-379, 2013)。鳥類では、申請者らの研究グループがニワトリ胚の雌雄の脳原基を入れ替える事で脳とそれ以外の身体間で染色体の性が異なるキメラ鶏を作製し、“性染色体による脳の性分化制御”仮説の直截的な証明を試みた。その結果、雄型の性染色体を持った脳が移植された雌鶏は性成熟が遅れ、産卵周期に異常が見られた。この研究結果は、雌鶏の脳には「雌型の性染色体」の支配下で発達し、産卵周期を制御する神経回路が存在することを示唆している。さらに、脳内の神経エストロゲン合成量に雄優位の雌雄差があり、その合成量は性染色体依存的に決定されることも明らかにした。これらの結果を総合して、“性染色体依存的に制御される神経エストロゲンが脳の性分化に影響する”という仮説を提唱している(Maekawa et al., *Front. Neurosci.*, 2014)。

### 2. 研究の目的

ほ乳類や鳥類等の恒温動物では生殖腺のみならず「脳」も性分化することで内分泌・行動の雌雄差が形成される。従来、これらの恒温動物では発達期に「性腺から分泌される性ホルモン」が脳に働くことで性特異的な構造・機能が形成されると考えられてきた。一方、近年我々が行った鳥類を用いた研究から「脳の性染色体」も脳の性差形成に重要な役割を果たすことが明らかになっている(Maekawa et al., *Nature Communications*, 2013)。本研究では、新規に見つかった「脳の性染色体」の影響に焦点を絞り、どのような仕組みで脳を性分化させるのか、分子基盤を

解明する。また、環境因子が「性染色体依存的な脳の性分化」に影響を与える可能性を検討し、環境が生殖に影響を及ぼす新たな経路の発見を目指す。

### 3. 研究の方法

【研究試料】ニワトリに関してはホワイトレグホン系統の胚を使用した。一方、ウズラに関しては、国立環境研究所にて維持しているウズラ系統である NIES-L 系と NIES-Br 系を使用した。すべてのウズラは性的に成熟する条件である長日条件(14L:10D)下で飼育し、餌水は自由に摂取できる環境にて飼育を行った。実験に使用したすべてのウズラは、ペアで飼育している親ウズラの NIES-L 系(オスウズラ 1 匹とメスウズラ 1 匹)と NIES-Br 系(オスウズラ 1 匹とメスウズラ 2 匹)から産卵された卵を、3 日間貯卵し、その後 37.8 の条件で 16 日間孵卵し孵化させた。孵化後は、6 週齢になるまで集団(5 匹前後)で飼育し、6 週齢以降は個別で飼育した。

【RNA 抽出と DNA マイクロアレイ解析】ニワトリ・ウズラの間脳から Total RNA の抽出を行った。Total RNA の抽出には RNA 抽出キット(RNeasy Mini Kit, QIAGEN, USA)を使用した。cRNA の合成には Low Input Quick Amp Labeling キット(Agilent technologies)を用い、Gene Expression Hybridization キット(Agilent Technologies)で Gallus (chicken)マイクロアレイ Ver. 2.0 とのハイブリダイゼーションを行った。

【cDNA 合成と Real time PCR 法】cDNA の合成には AMV Reverse Transcriptase XL(Takara)を用いた。Real time PCR は LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) を使い、ライトサイクラー(LightCycler®480 System, Roche Diagnostics)で蛍光を検出することで定量解析を行った。

【免疫染色】50 μm の薄切片を作製し、Rabbit polyclonal Anti-mesotocin antiserum (Immunostar, USA) を 1 次抗体、2 次抗体と発色に EnVision™ Detection System (Peroxidase/DAB+, K5007) を用いて染色を行った。

### 4. 研究成果

【視床下部から抽出した RNA を用いた雌雄で発現が異なる遺伝子の探索】

孵卵開始後 21 日齢のニワトリ胚の視床下部から抽出した RNA をサンプルとして、Agilent GeneSpring DNA マイクロアレイを用いて雌雄で 2 倍以上異なる発現量を示す遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、雌雄差を示す遺伝子 124 種類(内訳:雌優位 80、雄優位 44、図 1)を見いだした。雌優位の遺伝子の中には W 染色体上に存在するものが 15、Z 染色体上に存在するものが 6、含まれていた。一方、雄優位の遺伝子の中には Z 染色体上に存在するものが 28、含まれていた。

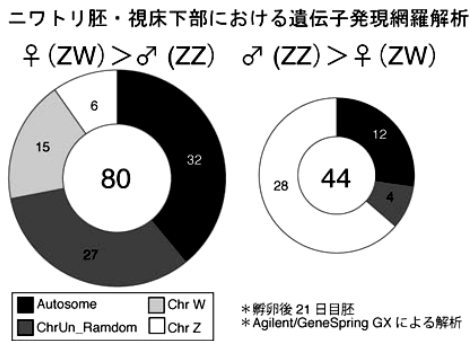


図 1: ニワトリ胚視床下部における遺伝子発現網羅解析のまとめ

【性染色体上に存在する遺伝子の環境因子による発現の変化】ニワトリ胚を用いた研究により、W 染色体上に存在しかつ雌優位で発現する HINT-W 遺伝子に着目し、ウズラ胚を用いて、エチニルエストラジオールに曝露された場合の発現量の変動を Real time RT-PCR 法によって検討した。その結果、60 ng/卵 および 300 ng/卵の用量で投与した場合、雌で用量依存的に HINT-W の発現量が増加していることが見いだされた (図 2)。

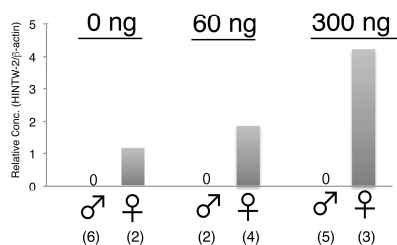
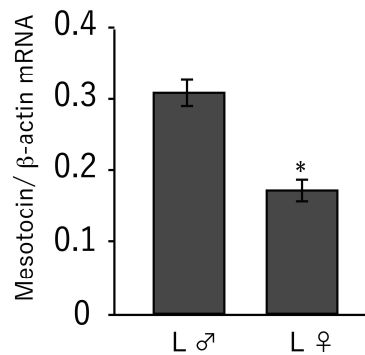


図 2: HINT-W 遺伝子発現の性差およびエチニルエストラジオールによる発現量の変動

【テストステロン依存的に発現が変化する遺伝子の探索】国立環境研究所で飼育している血中テストステロンレベルが異なる 2 系統の雄ウズラの間脳サンプルを用いて、2 系統間で発現量が変化する遺伝子を Agilent GeneSpring DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討した。その結果、血中テストステロン値が高い NIES-Br 系統より、血中テストステロン値が低い NIES-L 系統で発現量が 2 倍以上高かった遺伝子を 411、NIES-L 系統より NIES-Br 系統で発現が 2 倍以上高かった遺伝子を 421、発見した。その中で特に性ホルモンとの関係が知られているメソトシンに着目して、Real time RT-PCR 法により発現を再解析し、NIES-Br 系が NIES-L 系と比較して 2 倍以上の発現量があることを確認した。さらに、NIES-L 系の雄雌間でも発現量の違いが存在し、雄において発現量が高いことを明らかにした (図 3)。



T-test, \* $p < 0.05$ ,  $n = 5$

図 3: 間脳におけるメソトシン遺伝子発現の性差

【メソトシン免疫陽性細胞に関する検討】免疫染色によって雄 NIES-Br 系と NIES-L 系の視床下部におけるメソトシン免疫染色陽性細胞数と細胞サイズを調べた。その結果、全細胞数に関しては 2 系統間で違いはなかったものの、サイズの大きな細胞にのみ限定して解析すると、NIES-Br 系において細胞数の増加が認められた。この結果は、メソトシン遺伝子発現量の増加が、メソトシン発現細胞数の増加ではなく、1 細胞当たりの遺伝子発現量の増加に起因する可能性を示唆している。

【まとめ】本研究では、鳥類で誘導される性ホルモン依存的な脳の性差と染色体依存的な脳の性差をそれぞれ形成する分子基盤の解明を目指して、視床下部で性特異的に発現する遺伝子の探索を行い、その結果、雌雄で発現量が異なる遺伝子群を見出した。また、その中でも特に性染色体上に存在する遺伝子群を同定することができた。さらに、性ステロイドホルモンの中でもエストロゲン作用を示すエチニルエストラジオールを胚期に投与された鳥類脳において、エチニルエストラジオールを投与しない群と比較して性染色体上に存在する遺伝子の一部の発現量が変化することが明らかになった。加えて、鳥類の中でも性ステロイドホルモンの分泌量が異なる 2 系統の行動を解析し、性ステロイドホルモンの影響の下流で変化すると考えられる遺伝子を見つけ出すことができた。性染色体上に存在する遺伝子群、存在しない遺伝子群の双方で性ステロイドホルモンによって制御される遺伝子が発見ことができ、環境要因によって変化しやすい遺伝子候補のリストを確立することができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Maekawa F., Nagino K., Yang J., Htike N.T.T., Tsukahara S., Ubuka T.,

Tsutsui K., Kawashima T. (2018) Strain differences in intermale aggression and possible factors regulating increased aggression in Japanese quail. *General and Comparative Endocrinology*, 256:63-70. 査読有り doi: 10.1016/j.ygcen.2017.07.025.

Thomas A.L., Maekawa E., Kawashima T., Sakamoto H., Sakamoto T., Davis P., Doris R.M. (2018) Analyzing the effects of co-expression of chick (*Gallus gallus*) melanocortin receptors with either chick MRAP1 or MRAP2 in CHO cells on sensitivity to ACTH(1-24) or ACTH(1-13)NH<sub>2</sub>: Implications for the avian HPA axis and avian melanocortin circuits in the hypothalamus. *General and Comparative Endocrinology*, 256:50-56. 査読有り doi: 10.1016/j.ygcen.2017.09.002.

Moe Y., Tanaka T., Morishita M., Ohta R., Nakahara C., Kawashima T., Maekawa E., Sakata I., Sakai T., Tsukahara S. (2016) A comparative study of sex difference in calbindin neurons among mice, musk shrews, and Japanese quails. *Neuroscience Letters*, 631:63-69. 査読有り doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.018.

前川文彦 (2015) 環境化学物質が誘導する発達神経毒性の評価法開発 日仏生物学会誌, 54:16-22. 査読無し

〔学会発表〕(計 8 件)

Maekawa E., Nagano K., Yang J., Htike NTT, Tsukahara S., Ubuka T., Tsutsui K and Kawashima T. Investigation of gene expressions related to aggression in quail diencephalon. The 95rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, サポートホール高松 (香川) 2018年3月28日

Maekawa E. Experimental approaches toward understanding the association between early-life exposure to environmental chemicals and developmental disorders. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AUTISM 2017: CELEBRATING BRIMS 10TH YEAR ANNIVERSARY, Monash University Malaysia (Kuala Lumpur, Malaysia) 2017年10月14日

前川文彦 環境化学物質と心の発達: 動物実験による発達神経毒性評価 第87回日本衛生学会学術総会 フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎) 2017年3月28日

坪野航輝, 楊家欣, 産賀崇由, 筒井和義, 前川文彦, 川嶋貴治 ウズラ 2 系統間の攻撃性の違いとその違いが生じるメカニズムの解析. 第40回鳥類内分泌研究会, ホテルメルパルク松山(愛媛) 2016年11月4日

Maekawa E., Nagino K., Yang J., Ubuka T., Tsutsui K., Kawashima T. Analysis of aggressive behavior in two Japanese quail strains and their gene expressions possibly related to aggression in the hypothalamus. 11th International Symposium on Avian Endocrinology, White Oaks Resort & Conference Centre (Niagara, Canada) 2016年10月12日

Nagino K., Ubuka T., Tsutsui K., Maekawa E., Kawashima T. Male aggressive and reproductive behaviors in long-term breeding closed colony NIES-L of Japanese quail. Avian Model Systems 9: A New Integrative Platform. 中央研究院(台北、台湾) 2016年3月28日

Maekawa E., Sano K., Suzuki G., Nakayama S., Isobe T., Tin-Tin-Win-Shwe, Hashimoto S., Kawashima T. Evaluation of potentially developmentally neurotoxic chemicals using behavioral testing and neuroendocrinological analysis. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 札幌コンベンションセンター(北海道) 2016年3月23日

坪野航輝, 産賀崇由, 筒井和義, 前川文彦, 川嶋貴治, 高度近交化ウズラ(NIES-L系)の攻撃・繁殖行動の定量化, 日仏生物学会第183回例会, キャンパスプラザ京都(京都) 2015年12月19日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nies.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 文彦 (MAEKAWA, Fumihiko)

国立研究開発法人 環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号: 40382866

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

浜崎 浩子 (HAMAZAKI, Hiroko)

北里大学・一般教育部・教授

研究者番号: 00211483

佐野 一広 (SANO, Kazuhiro)  
国立研究開発法人 環境リスク・健康  
研究センター・特別研究員  
研究者番号：60736081

川嶋 貴治 (KAWASHIMA, Takaharu)  
国立研究開発法人 環境リスク・健康  
研究センター・主任研究員  
研究者番号：90360362