

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07471

研究課題名(和文)皮膚付属器の性ホルモンによる性差形成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of hormonal regulation of feather formation in chickens

研究代表者

竹内 栄 (TAKEUCHI, Sakae)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20226989

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)：鳥類の羽は哺乳類の毛と同様に表皮細胞の死細胞で構成された皮膚付属器である。ニワトリでは、鞍部に生じる羽(鞍羽)に顕著な性差が見られる。本研究ではこの鞍羽をモデル系として用い、皮膚付属器の性差形成の分子機構を解析した。さらに、養鶏において雌雄鑑別に利用されている主翼羽の遅羽性の分子機構を解析した。その結果、性差形成では、性ホルモンをはじめとする様々なホルモン系が互いにクロストークすることで適材適所な羽形成がなされていることが明らかとなった。また、遅羽性については、プロラクチンシグナルの量的変化が原因であることが示唆され、プロラクチンの羽形成における重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛や羽のような皮膚付属器は、生える場所に依り多様な形態と生物学的機能をもつと共に、様々な淘汰圧を受ける極めて重要な構造体である。本研究において、その適材適所および適時な形成が様々なホルモン系のクロストーク、関わりによってなされていることが明らかになったことは、基礎生物学的に重要であると考えられる。さらに、本研究成果は、応用面として、脱毛や育毛といった医療・美容にも有用な知見となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The feathers of birds are skin appendages composed of dead epidermal cells like mammalian hair. In chickens, there is a marked sex difference in the saddle feathers. In this study, we used this saddle feather as a model system to analyze the molecular mechanism of the formation of sex difference in the skin appendage. In addition, we analyzed the molecular mechanism of the late feathering widely used for autosexing of day-old chicks in hatcheries. Our results suggest that various hormone systems such as sex hormones and melanocortins cross-talk with each other to form proper feathers, and that slow feathering is caused by quantitative changes in prolactin signaling.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：皮膚付属器 性差 遅羽性 羽形成 性ホルモン メラノコルチン 甲状腺ホルモン プロラクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鳥類の羽は哺乳類の毛と同様に、表皮細胞に由来する皮膚付属器である。ニワトリでは、鞍羽に顕著な性差が見られ、雌では褐色(ユーメラニン色)を呈する丸型羽であるのに対し、雄では光沢のある赤褐色(フェオメラニン色)の飾り羽で、尖った先端部には小羽枝を欠くフリンジ構造がみられる。羽の性差形成については、1930~1940年代に、内分泌腺除去手術やホルモン投与実験などが盛んに行われ、雄型の羽が雌雄に共通なデフォルトであり、雌型羽は卵巣由来のエストロゲン(E2)の作用によって形成れること、このE2作用には甲状腺ホルモン(TH)が不可欠であること、TH欠乏下では、性とは無関係に雄鞍羽に類似なフリンジ構造をもつ光沢のある赤褐色羽が形成されることなどが明らかにされてきた。しかし、羽形成におけるホルモン作用の分子機構については不明な点が多く残されてきた。

我々はこれまで、ニワトリの羽包において、メラノコルチン1受容体(MC1R)と、そのアゴニストの α -メラノサイト刺激ホルモン(α -MSH)、アンタゴニストのアグチシグナルタンパク(ASIP)からなる局所MC1Rシグナル系(メラノコルチン系)が存在すること、MC1Rの構成的活性化変異により羽色が黒色化すること、フェオメラニンを主につくる羽包ではASIPのmRNA発現が高いこと、雄の鞍の羽包ではASIPとDIO3(TH不活性化酵素)のmRNA発現が高いが、E2を投与するとこれらの発現が抑制されることを見出した。

本研究では、ニワトリの羽形成におけるE2系、メラノコルチン系、TH系のクロストークおよび、遅羽遺伝子の解析を通して、THと酷似した働きが報告されているプロラクチンの羽形成における作用機序の検討を行った。また、鳥類のメラノサイトと哺乳類のメラノサイトのメラニン産生調節の類似性についても検討した。

2. 研究の目的

- (1) ニワトリ鞍羽形成におけるE2系、メラノコルチン系、TH系のクロストークの解明
- (2) ニワトリメラノサイトと哺乳類メラノサイトの比較
- (3) 遅羽性遺伝子の作用機序の解明

3. 研究の方法

- (1) トサジドリ成鳥雄にチロキシシン(T4)を投与し、鞍部羽包における形態学的変化および遺伝子発現変化を検討した。
- (2) ニワトリメラノサイトを単離培養し、RNA-seqにより発現遺伝子群の網羅的解析を行い、データベースに報告されたヒトメラノサイトと比較した。
- (3) 遅羽性K遺伝子の転写産物を同定すると共に、この遺伝子のプロラクチンシグナルに及ぼす影響を考察した。

4. 研究成果

(1) 雄の鞍羽はフェオメラニン色で、尖った先端部には小羽枝を欠くフリンジ構造がみられる。我々は、これが哺乳類においてフェオメラニン産生を促進することが知られるASIPの発現が高いこと、およびTHを不活性化するDIO3の発現が高いことに起因するという仮説を提唱している。実際、E2を投与して雌型羽の形成を誘導すると、これらの発現が低下し、小羽枝をもったユーメラニン色の羽が形成される。しかし、E2が直接的にASIPの発現を抑制するのか、DIO3発現を抑制し活性化型TH濃度を上昇させることを介してASIP発現を抑制しているのかは明らかではない。また、フェオメラニン色からユーメラニン色への変化にASIPの発現低下だけでなく、 α -MSHの前駆体タンパクであるPOMCの発現上昇も関与している可能性も考えられる。そこで、これらを検証するため、DIO3による

活性化型THの局所的濃度低下を打ち消すために、T4

を皮下投与した。その結果、図1に示すように尖った雄型羽は小羽枝をもつ丸い羽に変わり、濃いユーメラニン色となった。このT4処理で生じた羽の羽包における遺伝子発現をRT-PCRおよびリアルタイムRT-PCRで調べたところ、図2に示すように、T4投与により小羽枝のマーカー遺伝子BLSK1、およびユーメラニン産生に働くTyrP1の発現が誘導されることがわかった。更に、T4投与はPOMCの発現を促進するが、ASIPの発現には余り影響を与えないことがわかった。これらの結果から、E2による雌型羽形成では、E2は直接的にASIPとDIO3の発現を抑えるとともに、DIO3の発現を抑制し局所的な活性化型THの濃度上昇を引き起こすことを介して、小羽枝形成を促進すると共に、POMCの発現も促進してユーメラニン産生を誘導する可能性が示唆された。鞍羽の性差形成に



図1 T4処理した雄の鞍羽

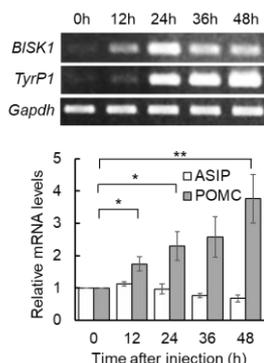


図2 T4処理による羽包における遺伝子発現変化

おける E2 系, メラノコルチン系, および TH 系のクロストークが明らかとなった。なお, 本実験で羽包基部の形態変化を注意深く観察したところ, フェオメラニン色の雄型羽からユーメラニン色の羽に変化する際, T4 投与前にフェオメラニンを産生していたメラノサイトはフェオメラニンを作り続け, 新たに分化したと考えられるメラノサイトはすべてユーメラニンを産生していることがわかった。哺乳類ではひとつの (同一の) メラノサイトが ASIP と α -MSH のどちらが作用するかによって, フェオメラニンとユーメラニンの産生をスイッチングすることが知られている。ニワトリのメラノサイトは哺乳類のそれとは異なり, ユーメラニンを産生するメラノサイトとフェオメラニンを産生するメラノサイトの 2 種類が存在する可能性が考えられた。

(2) メラノサイトが産生するメラニンによりケラチノサイトが着色されることで体色が表現されるのは哺乳類と鳥類の特徴である。また, フェオメラニンとユーメラニンの 2 種類のメラニンをつくるのもメラノサイトのみである。一方, 爬虫類以下の脊椎動物では様々な色素胞によって体色が直接的に表現される。このように, 鳥類と哺乳類は体色表現に関して酷似しているが, 進化的にみると, 鳥類は爬虫類から分岐した遠縁である。上述のように, ニワトリのメラノサイトと哺乳類のそれが似て異なるものである可能性が示唆されたことから, 両者の類似性を検討した。ニワトリ胚から神経堤細胞を採取し, 図 3 に示すようにメラノサイトを純粋培養して RNA-seq 解析を行ったところ, メラニン合成やメラノソーム輸送に関わる主要遺伝子として哺乳類で同定された遺伝子群がニワトリメラノサイトでも発現していることが分かった。データベースに報告のあるヒトメラノサイトと比較したところ, 両メラノサイトは遺伝子発現が酷似していることが明らかとなった。ユーメラニン産生メラノサイトとフェオメラニン産生メラノサイトの 2 種類が存在する可能性については, 更なる解析が必要である。

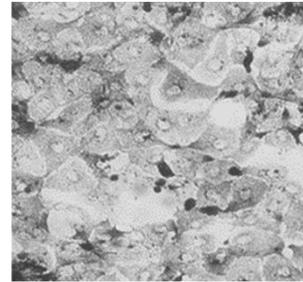


図 3 ニワトリのメラノサイト

(3) ニワトリ初生雛の主翼羽の伸長には, 速羽性 (野生型) と遅羽性の遺伝形質がある。これは, Z 性染色体上の遺伝子座により支配されており, 遅羽性 K 遺伝子が速羽性 k^+ 遺伝子に対して優性を示す。速羽性のオス (k^+/k^+) と遅羽性のメス ($K/-$) を交配させると, オスをすべて遅羽性に, メスをすべて速羽性に行うことができることから, 遅羽性 K 遺伝子は養鶏において雌雄鑑別に広く利用されている。近年, この遅羽性 K 遺伝子が部分的に遺伝子重複したプロラクチン受容体遺伝子を含むことが明らかとなった (図 4)。さらに, 最近, シチメンチョウの遅羽性遺伝子もプロラクチン受容体の変異遺伝子であることが判明した。このことは, プロラクチンが羽形成に重要な役割を果たしていることを強く示唆する。そこで, プロラクチンの羽形成における役割を解明するため, 遅羽性 K 遺伝子の羽形成遅延作用の分子メカニズムを解析した。

遅羽性 K 遺伝子ではプロラクチン受容体遺伝子 ($PRLR$) とそれに隣接する $SPEF2$ の間に, 遺伝子重複で生じた $SPEF2$ ($dSPEF2$) と $PRLR$ ($dPRLR$) の融合遺伝子が存在する。3' RACE および RT-PCR により $dSPEF2$ mRNA が $dPRLR$ のすべてのコーディングエキソンを超えた転写により産生されることを明らかとした。さらに, $dSPEF2$ の転写が $dPRLR$ の転写を物理的に抑制するとともに, $dPRLR$ や $PRLR$ の RNA プロセッシングを干渉して翻訳効率の高い 5' UTR スプライシングバリエーションを増加させることがわかった。また, $PRLR$ mRNA と $dSPEF2$ mRNA の発現は胚期に低く, 孵化後に高いことを見出した。遅羽個体の主翼羽形成遅延は胚期に起こり, 孵化後の羽伸長は速羽よりも早くなること, プロラクチン受容体はダイマーを形成してシグナル伝達することを勘案し, 図 5 のような遅羽性 K 遺伝子の分子作用メカニズムの新モデルを提案した。プロラクチンと TH は共に換羽の誘導や羽伸長の促進に働くことが報告されているが, 両者の関係は明らかでない。羽包においては, E2 やプロラクチンが TH 濃度を制御することで, 羽の伸長や形態を制御しているのかも知れない。

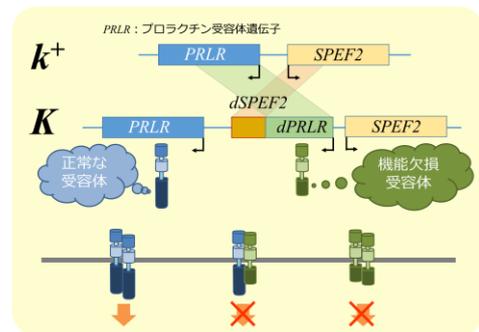


図 4 遅羽性 K 遺伝子の構造

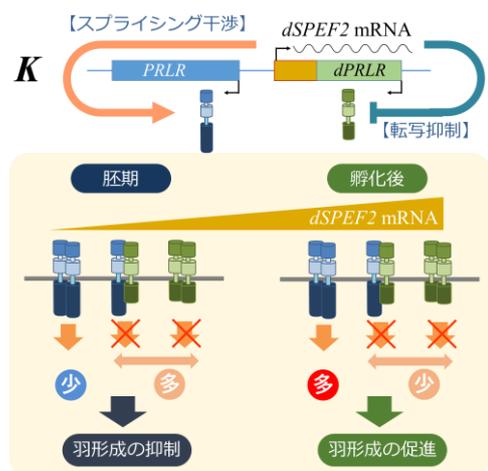


図 5 遅羽性 K 遺伝子の作用機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamura A, Masumoto A, Takenouchi A, Kudo T, Aizawa S, Ogoshi M, Takahashi S, Tsudzuki M, Takeuchi S	4. 巻 272
2. 論文標題 Changes in prolactin receptor homodimer availability may cause late feathering in chickens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ygcen.2018.12.011. Epub 2018 Dec 27.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村彩子・増本絢音・竹之内惇・相澤清香・御輿真穂・高橋純夫・都築政起・竹内栄
2. 発表標題 ニワトリにおける遅羽性の分子メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会中国四国支部広島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田凌平・游李・竹之内惇・相澤清香・高橋純夫・都築政起・竹内栄
2. 発表標題 ニワトリメラノサイトのトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会及びシンポジウム(埼玉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村彩子・増本絢音・竹之内 惇・相澤清香・御輿真穂・高橋純夫・都築政起・竹内 栄
2. 発表標題 ニワトリにおける遅羽性K遺伝子の作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第73回岡山実験動物研究会例会（岡山大学）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡村彩子・増本絢音・竹之内惇・相澤清香・御輿真穂・高橋純夫・都築政起・竹内 栄
2. 発表標題 ニワトリにおける遅羽性K遺伝子の羽形成遅延作用の分子メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会富山大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学理学部HP http://www.science.okayama-u.ac.jp/news/news_id8515.html http://www.science.okayama-u.ac.jp/news/news_id8212.html 岡山大学HP http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id602.html http://www.okayama-u.ac.jp/tp/news/news_id8216.html

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考