

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770197
 研究課題名（和文） 小型魚類をモデルとした脊椎動物における雄性ホルモン依存性の器官形成メカニズム解析
 研究課題名（英文） Molecular analysis of androgen dependent organogenesis in vertebrates: fish as a model system.
 研究代表者
 荻野 由紀子（OGINO YUKIKO）
 熊本大学・ 生命資源研究・支援センター ・特定事業研究員
 研究者番号：00404343

研究成果の概要：

Androgen 依存性の形態形成メカニズムについて、小型魚類カダヤシの交接器形成、卵黄 Androgen によるメダカ初期胚発生制御に注目した解析を展開し、Androgen が二次性徴としての器官形成のみならず、生命機能に必須の発生現象として、メダカ初期胚血球血管発生に貢献することを明らかにした。一方、脊椎動物における Androgen receptor (AR) 遺伝子の出現と多様化の過程を明らかにした。さらに、AR 遺伝子の発現を組織・発生段階特異的にコントロールし、発現した細胞を可視化することができるトランスジェニックメダカ系統を世界で初めて樹立した。これらの分子進化解析、およびメダカ系統を研究基盤とし、AR シグナリングの活性化された細胞の系譜解析を進めている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生命科学・発生生物学

キーワード：アンドロゲン、二次性徴、進化発生学、血球血管分化、分子進化

1. 研究開始当初の背景

雄性ホルモン (Androgen) は、内外生殖器や性淘汰に関わる二次性徴の発生分化を制御することで、繁殖に必須である多様な雄性形質を規定している。一方で、卵生生物である鳥

類や魚類の卵黄には多量の Androgen が含まれており、初期発生に及ぼす影響が注目されている。しかし、Androgen がどのような分子メカニズムで性徴発現を制御しているのか、

また初期発生期に如何なる役割を果たすのか、ほとんど未解明であった。

Androgen receptor (AR) 遺伝子の出現と分子進化は、Androgen をシグナル分子として遺伝情報に結びつけることを可能にしたと考えられる。さらに、真骨魚類の系統では AR 遺伝子は 2 分子種に重複している。しかし、機能的な AR 遺伝子がいつ現れたのか、真骨魚類の 2 分子種 AR 遺伝子を生んだ遺伝子重複がいつ生じたのか、重複後、新たな機能が獲得されたのか、AR 遺伝子の進化と機能多様化の過程は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

顕著な性徴として尻鰭が交接器へと分化する小型魚類カダヤシ、胚操作技術が適用できるメダカをモデル動物として用い、Androgen シグナリングによる形態形成メカニズムを、二次性徴および初期発生 の両側面から解析する。Androgen の多様な生理作用を理解する基盤として、AR 遺伝子の分子進化過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Androgen 依存性の二次性徴発現メカニズム

尻鰭から交接器への特化を規定する分子メカニズムを明らかにするために、Androgen 投与により、尻鰭で発現誘導される遺伝子群の解析を行った。AR、AR いずれのレセプターを介した経路が、交接器形成に関与しているのか明らかにするために、それぞれの AR に対する morpholino oligo (MO) をソノボレーション法、エレクトロポレーション法にて尻鰭に導入し、loss of function による症状解析を試みた。

(2) メダカ初期胚血球血管発生過程におけ

る Androgen シグナリングの果たす役割

AR 遺伝子が二次性徴期のみならず、初期発生期の形態形成に関与していることを示唆する先駆的知見として、AR MO 注入が、初期胚における赤血球分化異常、卵黄血管の走行異常を来すことを見出した。

さらに AR シグナリングが初期胚発生に果たす役割を分子レベルで理解するために、メダカ初期胚血球血管発生過程で発現する Androgen 依存性遺伝子群の探索を行うとともに、メダカ初期胚に含まれる Androgen 量の分析、Flk1-promoter-GFP トランスジェニックメダカを用いた、血管系症状解析を行った。研究の基盤として、野生型 AR、Dominant negative AR をヒートショックにより時期・組織特的に発現誘導することが出来るメダカ系統を世界に先駆けて作出した。さらに GAL4-UAS システムを利用し Androgen シグナリングが活性化された細胞を可視化するトランスジェニックメダカ系統の作出を試みた。

(3) 脊椎動物における AR 遺伝子の分子進化

これまでに単離したイヌザメ、祖先型条鰭類チョウザメ、ポリプテルス、真骨魚類メダカ、カダヤシに由来する AR 遺伝子に加え、祖先型の真骨魚類であるアロワナから AR 遺伝子を単離し、分子進化解析を行った。さらに、メダカ AR、AR がゲノム倍数化に伴い重複したのか明らかにするために、両遺伝子のメダカゲノム上の位置を明らかにし、哺乳類 AR が位置する X 染色体とゲノムシンテナーの比較を行った。

4. 研究成果

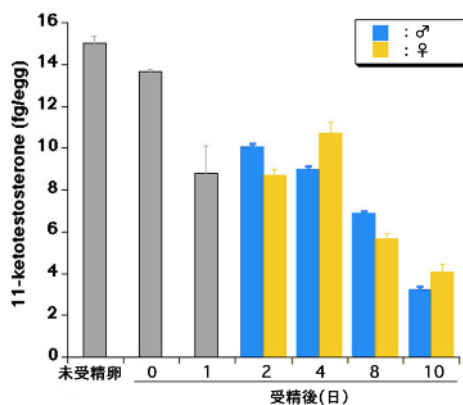
(1) 尻鰭から交接器への特化を規定する分子メカニズム

Androgen を飼育水に投与し、孵化直後の

カダヤシ稚魚に交接器の形成を誘導した。遺伝子発現解析の結果、Androgen 応答性因子として、これまでに示した Sonic hedgehog(Shh)遺伝子に加え、Bmp7 遺伝子が先端部上皮、FGF4 遺伝子が先端部間葉細胞で発現することが明らかとなった。Androgen 投与 2 日後から尻鰭先端部の肥厚が認められ、この変化に伴い、これらの因子が発現する。一方、AR および AR のいずれのレセプターを介したシグナリングが交接器形成においてドミナントに機能しているのか明らかにするために、両遺伝子に対する Morpholino oligo をカダヤシ尻鰭先端部へソノポレーション法およびエレクトロポレーション法により導入した。しかし、症状を呈するに十分のコピー数の導入ができず、遺伝子機能解析法に課題を残した。

(2) AR シグナリングが初期胚発生に果たす役割

メダカ受精卵に含まれる 11-ketotestosterone(11-KT)量を ELISA 法にて測定した結果、11-KT 量は未受精卵で最も多く、発生が進むにつれて減少し、少なくとも受精後 10 日まではその存在量に有意な性差は存在しないことが明らかとなった(図



1)。

図 1. ELISA 法によるメダカ初期胚 11-KT 量の測定

さらに、メダカ初期胚に生理的に意義のある濃度の Androgen が含まれているのか明らか

かにするために、Androgen response element(ARE)を含むレポーター (Luc) 遺伝子をメダカ受精卵に導入し、Luc assay を行った結果、未投与胚 (Control) においても Androgen 投与胚とほぼ同等の Luciferase 活性が認められ、その活性は Flutamide 投与によって抑制された(図 2)。よって、初期胚に含まれる Androgen が下流遺伝子を活性化し得ることが示唆された。

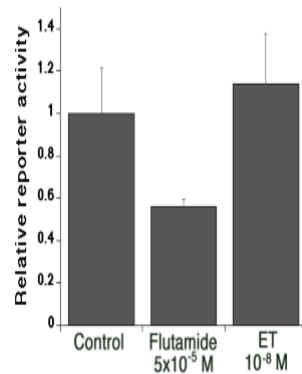


図 2. メダカ受精卵における ARE 応答性 Luciferase 遺伝子発現

メダカ胚では、anti-sense morpholino oligo(MO)を用いて、特定遺伝子の機能阻害を行い、表現型を解析することが可能である。AR に対するアンチセンスモルフォリゴオリゴ (MO) のメダカ受精卵への導入が、血球分化抑制、卵黄血管の走行異常を誘導し、この症状は、AR mRNA を同時に導入することで回復すること、同様の症状が、AR antagonist である Flutamide 投与によっても誘導され、Androgen を同時投与することで回復することを見出した(図 3)。

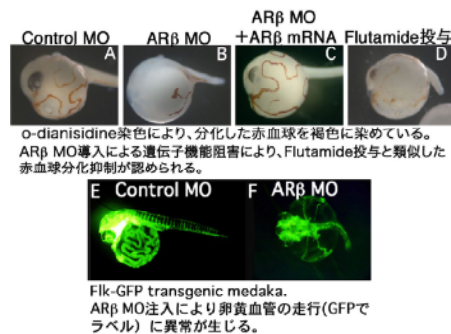


図 3. AR シグナリング阻害による血球血管形成異常

赤血球血管双方に症状が認められたことから、中胚葉性細胞から血液血管内皮共通の前駆細胞(ヘマンジオブラスト)が分化する段階に Androgen シグナリングの作用点があると予想された。マウス胚では、原腸胚から神経胚期にヘマンジオブラストが発生、増殖することが報告された。メダカ胚に Flutamide を投与し、原腸胚期から体節期に Androgen シグナリングを阻害したところ、赤血球血管発生双方に異常が生じたが、神経胚期以降に投与しても、顕著な異常は生じなかった(図4)。

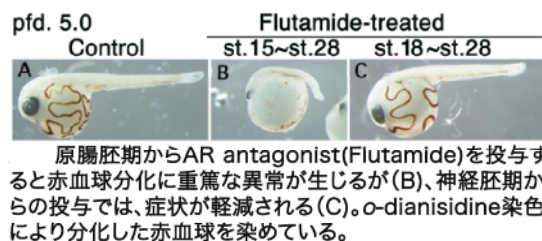


図4 .Flutamide 投与による AR シグナリング阻害実験
よって、中胚葉性細胞からヘマンジオブラストが分化すると予想される、原腸胚から神経胚期に AR シグナリングの作用点がある可能性が考えられた。

魚類胚では、頭部および尾部に血島が生じる。一次造血では頭部側血島からはマクロファージ、尾部側血島からは赤血球が分化する。中胚葉性細胞から血管血球系細胞が分化するには、秩序だった血球血管分化因子の発現、相互作用が不可欠である。遺伝子発現解析から、AR MO 注入胚では、ヘマンジオブラストマーカー Lmo2 の発現が尾部血島において顕著に抑制された。これに伴い、尾部側血島で発現する赤血球系分化マーカー GATA1 遺伝子の発現も抑制された(図5)。一方、マクロファージで発現する I-plastin の発現は、Control MO、AR MO 注入胚において顕著な違いは認められなかった。よって、尾部側血島領域における中胚葉からヘマンジオブラス

トの成立および、赤血球分化過程に Androgen シグナリングが貢献していると考えられた(投稿準備中)。

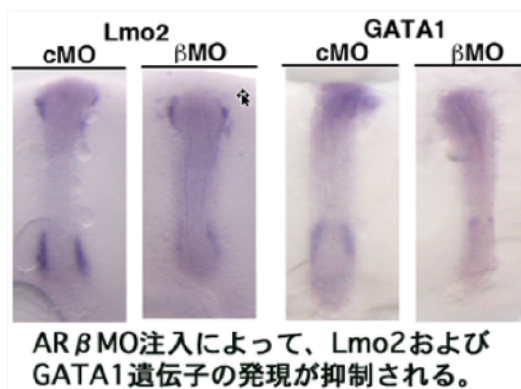


図5 . AR MO 注入胚における遺伝子発現解析

Androgen シグナリングが活性化された細胞が、血球血管系細胞分化に対し、細胞自立的あるいは非自立的に貢献しているのか明らかにするためには、Androgen シグナリングが活性化された細胞群をラベルする技術が必要である。MO 注入による AR 機能阻害実験では、すべての細胞で AR 機能が抑制される。AR シグナリングが機能する細胞群の特定、これらの細胞における AR シグナリングの活性化が血球血管系細胞系譜に及ぼす影響を解析するには、AR シグナリングの時空間的な制御システムが必要である。そこで、AR 遺伝子の発現を組織・発生段階特異的にコントロールし、発現した細胞を可視化することができるトランスジェニックメダカ系統(HSP-AR: 野生型 AR を発現、HSP-DNAR: ドミナントネガティブ AR を発現する)を世界で初めて樹立した(図6)。また、AR シグナリングが活性化された細胞を可視化することができる AR シグナリングインディケーターメダカ系統の作出を試みた。



図9. 熱処理によりARをGFPとの融合蛋白として発現する transgenic medaka

図6. ヒートショックによりAR遺伝子の発現を誘導する
トランスジェニックメダカ

(3) 分子進化解析から真骨魚類2分子種AR遺伝子は条鰭類の系統でチョウザメが分岐後、アロワナが出現するまでに重複し、2分子種となったことが明らかとなった。メダカAR遺伝子のゲノムシンテニー解析から、AR₁、AR₂はそれぞれ10番、13番染色体に位置しており、哺乳類AR遺伝子が存在するX染色体とシンテニーの保存性が確認できた。よって、真骨魚類で特異的に生じたゲノム倍数化によって、AR₁とAR₂の2分子種となったと考えられた(図7、投稿中)。

COS7を用いた各生物種AR遺伝子の機能解析から、サメはclassicalなAndrogenをリガンドとする最も祖先型のAR遺伝子を有しており、真骨魚類AR₁がリガンド応答性、細胞内局在とともに、サメAR₁、四肢動物ARと機能的に類似した性質を有していることが示唆された。一方、AR₂は、構成的な核局在、AR₁と比して高い転写活性化能を呈し、分子進化解析からも真骨魚類特異的な新規のARであることが明らかとなった(投稿中)。

メダカ初期胚における両AR遺伝子の機能解析から、四肢動物と類似したタイプであるAR₁を介したAndrogenシグナリングが、血球血管発生に貢献することがあきらかとなり、四肢動物においてもAR遺伝子が初期発生に貢献している可能性が考えられ

た。



図7. 脊椎動物におけるAR遺伝子の進化史

* (赤)はAR遺伝子重複、(青)は真骨魚類の系統で生じたゲノム倍数化のタイミングを示す。

以上、本研究からAndrogenシグナリングが、新たな生理作用として、初期胚血球血管発生へ貢献することを明らかとなった。また、真骨魚類2分子種AR遺伝子が*in vitro*および*in vivo*において、機能的相違を示すことが明らかとなり、真骨魚類AR遺伝子は遺伝子重複後、新機能を獲得(neofunctionalization)した可能性が示唆された。この研究は、Androgenシグナリングの多様な生理作用を理解する上で基盤となる分子進化的情報を提供するとともに、性分化以前の初期胚において、性ホルモンが生命機能に必須の発生プログラムに関与することを世界で初めて示した。さらにAndrogen応答性細胞系譜解析を行う上で必須のトランスジェニックメダカ系統を世界で初めて樹立し、Androgenシグナリングによる形態形成制御機構を細胞レベルで理解する基盤が整った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Ohta S, Suzuki K, Ogino Y, Miyagawa S, Murashima A, Matsumaru D, Yamada G
Gene trasduction by Sonoporation.

Dev Growth Differ. 50: 6, pp517-20, 2008. 査読有り

Nishida H, Miyagawa S, Vieux-Rochas M, Morini M, Ogino Y, Suzuki K, Nakagata N, Choi HS, Giovanni L, Yamada G

Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression through the interaction between Dlx and Gata-4 for testicular steroidogenesis.

Endocrinology 149: 5, pp2090-7, 2008. 査読有り

Nishida H., Miyagawa S, Matsumaru D, Wada Y, Satoh Y, Ogino Y, Fukuda S, Iguchi T, Yamada G

Gene expression analyses on the embryonic external genitalia: identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes

Congenital Anomalies 48: 2, pp63-7, 2008. 査読有り

[学会発表](計6件)

荻野由紀子、「性ホルモンに依存した形態形成：造血発生および生殖器官分化」、『第82回日本内分泌学会学術総会』、前橋、2009年4月24日。(口頭発表)

Ogino, Y., Katoh, H., Matsumoto, M., and Yamada, G.

「Molecular analysis of androgen dependent early embryonic development; novel functions of androgen signaling for hemato-vascular development.」

『International Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Molecular Basis and

Therapeutic Potentials"』、熊本、2009年4月9日。(ポスター発表)

荻野由紀子、加藤洋教、松本美穂、山田源「メダカ Androgen receptor 遺伝子の初期発生に果たす役割；血球、血管発生への関与」、『第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会』、神戸、2008年12月9日。(ポスター発表)

荻野由紀子、加藤洋教、松本美穂、山田源「Functional differences of two androgen receptor genes during the developmental process of teleost fishes; novel function of androgen signaling for hemato-vascular development.」、『GC0E サマートリートセミナー』、熊本、2008年8月28日。(ポスター発表)

荻野由紀子「卵黄アンドロゲンによる発生制御機構とアンドロゲンレセプター遺伝子の分子進化」、『第3回生殖ワークショップ』、三浦、2008年8月7日。(口頭発表)

荻野由紀子、加藤洋教、松本美穂、山田源「真骨魚類における2分子種 Androgen receptor 遺伝子の機能的相違、初期発生に果たす役割」、『第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会』、横浜、2007年12月13日。(ポスター発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荻野 由紀子 (OGINO YUKIKO)

熊本大学 生命資源研究・支援センター
特定事業研究員

研究者番号：00404343

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：