

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06741

研究課題名(和文) アンドロゲン受容体の機能分化からみる多様な雄性形質発現の基本原則

研究課題名(英文) Evolutionary differentiation of androgen receptor responsible for sexual characteristics development

研究代表者

荻野 由紀子(Ogino, Yukiko)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00404343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オスに特徴的な二次性徴形質の獲得進化は、多彩な繁殖戦略を可能とし、真骨魚類の爆発的な種分化と繁栄をもたらした重要な要因と考えられる。この進化には、真骨魚類の共通祖先で起きた全ゲノム重複(TSGD)が貢献したことが予想される。しかし、重複遺伝子の新たな役割の獲得や役割分担の道筋には謎が多く残されている。本研究ではTSGDにより重複したアンドロゲン受容体遺伝子(Ara, Arb)のメダカにおける役割とそれらのシグナル経路について変異体を用いて詳しく比較した。その結果、Arが精子形成の役割を別の遺伝子に任せて、オスに特徴的な“かたち、体色、繁殖行動”に役割分担を進めて特殊化したことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、重複遺伝子群は、祖先的な役割を保ちながら、役割を新たに獲得、あるいは分担することにより、より複雑な仕組みを作り上げると理解されてきた。本研究により、祖先遺伝子が担っていた役割を大胆に捨て、かつコピー数を増やして仕事の分担を進めて特殊化していったことにより、真骨魚類の多様化と繁栄をもたらした多様な二次性徴形質が獲得されたと考えられた。魚の美しさや行動の多様化と全ゲノム重複によるアンドロゲン受容体遺伝子の重複進化との関連性を詳細に示した最初の例であり、生物の性的特徴の多様化とゲノム進化の関係を探る上で大きな一歩を示した。

研究成果の概要(英文)：Teleost fishes exhibit complex sexual characteristics in response to androgens. However, the molecular mechanisms underlying their evolutionary acquisition remain largely unknown. To address this question, we analyzed medaka mutants deficient in teleost-specific androgen receptor ohnologs (ara and arb). We found that both ara and arb are required in males to achieve efficient reproductive success; ara and arb are functionally redundant in the regulation of courtship display but have divergent roles in other morphological and behavioral sexual characteristics. Unexpectedly, both ar ohnologs are not essential for spermatogenesis in medaka, which may have permitted the ar evolution in teleosts by reducing part of the functional constraints on the gene(s). We also demonstrated that differences in transcriptional regulation and intracellular localization could account for the divergent roles of ar ohnologs in the development of the sexual characteristics of teleosts.

研究分野：進化内分泌学

キーワード：アンドロゲン 遺伝子重複 多様化 二次性徴

1. 研究開始当初の背景

真骨魚類は爆発的に適応・多様化して繁栄を遂げており、その共通祖先で起きた全ゲノム重複 (TSGD (3R-WGD)) 後の遺伝子の再編成・新機能の獲得と、多様な形質発現との関連性が注目されている。ヒレの交接器への変化、体色、筋、歯などの雄性化、及びヒレや筋肉を用いた求愛行動、歯を用いた攻撃行動など神経機能にも二次性徴を示す。これらの表現型は、生殖隔離を介して生物多様性の創出や維持の重要な要因となり得るという観点から、進化生物学・生態学の分野を中心に注目されている。しかしながら、現存する生物がもつ二次性徴形質がどのようにして獲得され、進化を経て現在の状態に至ったのか、生態学的な理解が進む一方で二次性徴形質発現及び、その獲得進化の仕組みの多くが未解明であった。その理由として、顕著な二次性徴を示す生物の多くが非モデル動物であり公的なゲノム情報を利用できない、遺伝学的なアプローチが困難である、RNA-seq などの網羅的手法によって二次性徴形質発現を制御する因子の探索が様々な生物種で行われているが、大量に得られる候補因子の大部分がシグナリングカスケードの単純な中間構成員であるなどが挙げられる。これらの問題を解決するため、研究代表者は形態・神経機能に顕著な性差を示し、逆遺伝学的アプローチや行動解析が可能な真骨魚類に注目した。真骨魚類の Ar 遺伝子について厳密な系統解析とシンテニー解析および機能解析を行い、Ara、Arb を TSGD に由来する重複遺伝子として検出した。Arb は従来の転写活性を維持し、Ara はより高い転写活性、リガンド非依存的な核移行を獲得したことを明らかにした。さらにその原因となった突然変異の生じたタイミングについても同定した。これらの研究により、種特異的な倍数化などにより不明であった Ar 遺伝子の分子進化、機能分化の詳細を解明し、表現型進化と分子進化の関連性を紐解く基盤情報を整えてきた。さらに申請者は、Ara、Arb 変異体メダカを系統化し、変異体オスの繁殖成功率が野生型オスより低く、Arb 変異体オスの外部形態の脱雄性化や、Ara 変異体オスの行動異常など Ara、Arb の機能分担についての予備的な知見を得ていた。

2. 研究の目的

オスに特徴的な求愛・闘争行動や装飾的な雄性形質は、密接な関連性がある複合適応形質である。これらの形質の進化は多彩な繁殖戦略を可能とし、真骨魚類の繁栄をもたらした重要な要因と考えられる。本研究は、真骨魚類をモデルとし、アンドロゲン受容体(Ar)遺伝子のゲノム重複に伴う重複・新機能獲得と、形態・神経機能における二次性徴形質の多様化との関連性の解明を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

メダカ Ara、Arb 変異体 (*ara* KO, *arb* KO) 及び Ara/Arb 二重変異体 (*ar* DKO) を用いた表現型解析から、形態・神経機能における Ar オオノログの機能の相違を明らかにする。既に樹立した AR-3xFLAG-mClover3 ノックインメダカ (それぞれの AR オオノログが FLAG との融合遺伝子として発現、リボソームスキッピングにより mClover3 が別フレームで発現する) を用いて、Ar オオノログの二次性徴発現過程における発現動態を解析する。RNA-seq、ATAC-seq などのオミクス解析により AR オオノログ特異的なアンドロゲン応答ゲノム領域、下流標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

Ar 変異体の繁殖成功率についての評価

Ar 変異体オスを野生型メスと交配し 30 分のビデオレコーディングを行い、オスの繁殖行動を評価した。*ara* KO および *arb* KO オスはほとんどすべての交配試験において円舞行動を示したが、*ar* DKO オスはほとんど円舞行動をとらず、全く交尾が成立しなかった。一方 *ara* KO および *arb* KO でも 50~75% と野生型と比べて低い交尾成功率を示した。したがって、繁殖に必須の円舞行動は、Ar オオノログの機能的冗長性により維持されているものの、高い繁殖成功を得るには *ara*、*arb* 双方が必要であると思われた。さらに自然産卵の受精率も、*ara* KO および *arb* KO オスは 50% 前後と、野生型オスより低い値を示し、野生型メスが野生型オスあるいは Ar 変異体オスのどちらかを配偶相手として選ぶのかを調べると、Ar 変異体オスはほとんど配偶相手として選ばれなかった。これらの結果は、Ar オオノログが外部形態、繁殖行動、あるいは精子形成などに役割分担を遂げていることを示唆している。

Ar オオノログの二次性徴形質発現に対する役割分担：繁殖行動

性的モチベーションの指標とされる円舞行動の頻度を比較すると *ara* KO オスは野生型オスと同様の頻度で円舞行動をとるが、*arb* KO オスは野生型オスより少なく、性的モチベーションが低いと考えられた。ところが、どちらの Ar 変異体オスも野生型オスより産卵までに長い時間を要した。*arv* KO は性的モチベーションが低いことが原因と思われる。一方 *ara* KO はメス

にリジェクトされる頻度が高く、メスを魅了する繁殖行動に問題があるということがわかった。

Ar オーノログの二次性徴形質発現に対する役割分担：外部形態

arb KO、*ar* DKO では交尾の際に雌を保持するための構造として知られている臀鰭の後半部の乳頭状小突起を欠き、繁殖期に目から鼻にかけてみられる白色素胞もほとんど観察されなかった。アンドロゲンレベルの低下による影響が懸念されたが、精巢の LC/MS 解析からは特に低下傾向は認められず、魚類の主なアンドロゲンである 11 ケトテストステロン (11KT) レベルは、*ar* DKO でむしろより高い傾向を示した。従って、鰭や婚姻色の二次性徴には *arb* を介したシグナルが必須であると考えられる。

メダカは歯にも二次性徴を示す。歯の CT スキャン像をみてみると、*arb* KO では牙のような構造がしっかりと認められたが、*ara* KO では小さく、*ar* DKO では全く認められなかった。したがって *ara* は闘争形質と思われる歯の雄性化を担っていると思われた。このように *ara* と *arb* は外部二次性徴形質発現について役割分担を遂げていることが明らかとなった (図 1)。

精子形成に対する役割の消失

アンドロゲンの精子形成に対する重要性は *AR* KO マウスでは精子形成が減数分裂の途中で停止することからも哺乳類では広く認知されている。ところが、メダカにおいては *ar* DKO においても成熟精子が観察され、精子運動解析装置 CASA を用いた解析からも、運動精子率に顕著な異常はみられず、精子数は *ara* KO 及び、*ar* DKO では野生型オスよりむしろ多い傾向を示した。さらに、人工授精率も約 80 から 90% と高い値を示した。したがって、少なくともメダカでは *AR* が精子形成には必須ではないことが明らかとなった。

一方、精巢が精子で膨張している様子が特に *ara* KO 観察されたので、泌尿生殖洞の構造をみてみると、コラーゲンに富んだ膠原線維が輸精管を取り囲み、輸精管が狭窄傾向にあることがわかった。つまり *Ar* 変異体では受精可能な精子が生産されるものの、放精が不十分であることが受精率の低さの原因の一つと考えられる。精子形成にアンドロゲンが必要なことはニホンウナギやゼブラフィッシュにおいて報告されている。さらに複数の魚種を解析する必要があるが、精子形成の役割の消失は、*Ar* 遺伝子にかかっていた進化拘束を緩和することに繋がり、メダカ属に見られる婚姻色や鰭の伸長など多種多様な二次性徴と爆発的な種分化の起爆剤となった可能性が考えられる (図 1)。

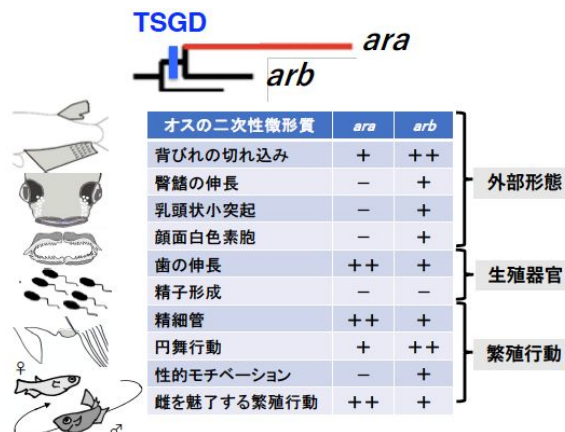


図1. 遺伝子重複による*ar*の機能分化(役割分担)

Ar 遺伝子発現と下流遺伝子群の比較

Ar 発現細胞を mClover3 の発現で可視化し、細胞内局在を FLAG の発現から調べることができ、*Ar*-3xFLAGmClover3 ノックインメダカ(図 2A)を用い、*Ara*/*Arb* 発現細胞、細胞内局在を解析するとともに、野生型、*ara* KO、*arb* KO、*ar* DKO オスの全脳及び脳下垂体における遺伝子発現を RNA-seq 法によって調べ、オスの生殖行動に關する遺伝子の網羅的な探索を行った。GO エンリッチメント解析からは明確な生物学的現象についての情報を得られなかったが、メスの性行動に關する神経ペプチド *neuropeptide B a (npba)* の発現が *arb* KO、*ar* DKO において著しく増加していた(図 2B)。この神経ペプチドは、性行動や下垂体の機能を制御する脳領域として知られる視索前野で発現することが知られている。上記ノックインメダカを用いた解析から、*Ara*/*Arb* は共に視索前野で明確な核移行を示すことを確認した(図 2C,D)。したがって、*Ar* が視索前野での神経ペプチドの発現抑制を介して、脳のメス化を抑制している可能性が示唆された。

さらに Estrone から Estradiol (E2) 合成に關する HSD17b12a の発現が *Ar* 変異体メダカの脳で増加していることが明らかとな

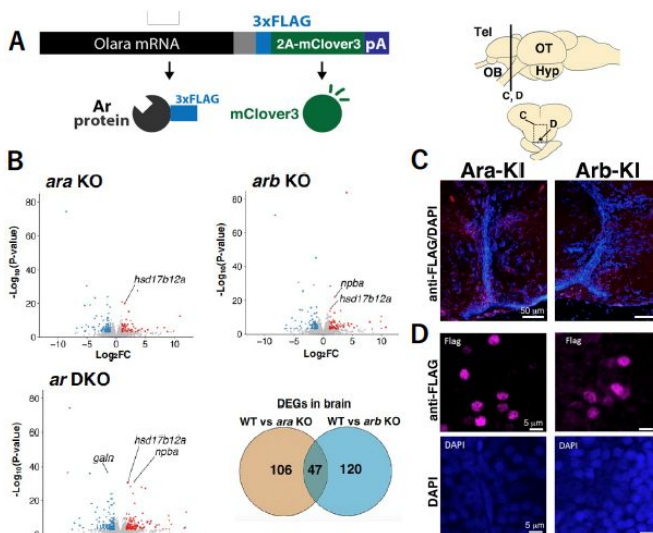


図2. Ar オオノログの全脳と脳下垂体における遺伝子発現比較

った。よって、Ar 変異体メダカにおける *npba* 遺伝子発現の活性化は、脳における E2 レベルの増加による可能性が考えられたため、LC/MS により脳内ステロイドホルモン量を測定した。予想と反し、Ar 変異体メダカでは E2 の増加は認められず、むしろ減少傾向を示し、11-KT や Testosterone が増加していることが明らかとなった。従って、Ar が ESR シグナル因子の発現を ESR/E2 を介さず直接的に抑制していると考えられた。

また、魚類の 2 分子種 AR 遺伝子の下流標的遺伝子の相違、雄性化プログラムの全容の解明を目指し、AR-3xFLAGmClover3 ノックインメダカを用いた ATAC-seq、CUT&RUN-seq についての綿密な条件策定を行い、Ar 標的シストロームについて予備的なデータを得るに至っている。構成組織のヘテロジェナイティの高いヒレでは、バックグラウンドノイズが高い傾向がみられたので、上記ノックインメダカを用いて Ar 陽性細胞を単離して解析に用いるなど、さらに検討を進めている。

まとめ

Ar を 1 コピーしか持たない哺乳類などの動物では、脳や外生殖器の性分化、精巣機能の維持、精子形成など多岐にわたる役割が 1 つの遺伝子で担われているため、遺伝子機能の変化は強く抑制されていると考えられます。真骨魚類ではコピー数が増えたことに加え、精子形成の役割を喪失したことが Ar 遺伝子にのしかかっていた進化拘束を緩和し、Ar の役割の急速な多様化を促した可能性が示唆された。これまで、重複した遺伝子群は、祖先的な役割を保ちながら、役割を新たに獲得、あるいは分担することにより、より複雑な仕組みを作り上げると理解されてきた。今回の発見により、祖先遺伝子が体の中で担っていた役割を大胆に捨てて、かつコピー数を増やして機能分担を進めて特殊化していったことにより、真骨魚類の多様化と繁栄をもたらした美しく長いヒレや華麗な交尾ダンスが獲得されたと考えられた。魚の美しさや行動の多様化と全ゲノム重複による性ホルモン受容体遺伝子の重複進化との関連性を詳細に示した最初の例であり、生物の性的特徴の多様化とゲノム進化の関係を探る上で大きな一歩となる研究である。本研究成果は 2023 年 3 月 14 日に Nature Communications 誌 (Nature Publishing Group、イギリス) に公開された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogino, Y., Ansai, S., Watanabe, E. et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 NO. 1428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-37026-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yukiko Ogino, Hiroataka Sakamoto, Eiji Watanabe, Satoshi Ansai, Kiyoshi Naruse, Taisen Iguchi
2. 発表標題 Functional analysis of two distinct paralogs of androgen receptor for the sex characteristics development in medaka,
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of JSDB cosponsored by APDBN (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野由紀子、坂本浩隆、渡辺英治、安齋 賢、井口泰泉
2. 発表標題 魚類の多彩な繁殖様式を導く二次性徴形質の多様化と進化の分子基盤
3. 学会等名 第90回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Ogino, Satoshi Ansai, Hiroataka Sakamoto, Eiji Watanabe, Kiyoshi Naruse and Taisen Iguchi
2. 発表標題 Molecular basis of androgen dependent sex characteristics development and evolution with teleost fishes as model species
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Ogino, Satoshi Ansai, Taisen Iguchi
2. 発表標題 Regulation of tissue-specific sex characteristics development in Medaka: Combinatorial analyses of RNAseq and ATACseq
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 (MBSJ2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Ogino, Satoshi Ansai, Taisen Iguchi
2. 発表標題 Regulation of androgen-dependent sexual character development in Japanese medaka: Combinatorial analyses of RNA-seq and ATAC-seq
3. 学会等名 54th Annual Meeting of Japan Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻野由紀子、岡本啓吾、安齋 賢、井口泰泉
2. 発表標題 アンドロゲン依存的な二次性徴形質の領域特異的な発現制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 インドネシアメダカの二次性徴発現の分子メカニズム
2. 発表標題 岡本啓吾、安齋 賢、荻野由紀子
3. 学会等名 第92回大会 日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻野由紀子
2. 発表標題 アンドロゲン受容体の重複と機能分化から見る魚類の性的二型形質の多様化
3. 学会等名 2022年度 日本魚類学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻野由紀子、安齋賢、岡本啓吾、井口泰泉
2. 発表標題 二次性徴形質の組織特異性を規定する遺伝的要因の探索
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻野由紀子
2. 発表標題 アンドロゲン受容体の重複進化による魚類の性的二型形質の多様化
3. 学会等名 NBRP主催シンポジウム「バイオリソースで解決する21世紀の社会課題」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keigo Okamoto, Satoshi Ansai, Hajime Ogino, Eiji Watanabe, Kiyoshi Naruse, Taisen Iguchi, Yukiko Ogino
2. 発表標題 The Interspecies Divergence of Sexual Characteristics in Teleost Fish Could Depend on Differences in sonic hedgehog Expression Induced by Androgen
3. 学会等名 EMBO COB Workshop “Trans-Scale Biology using exotic non-model organisms”（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩野由紀子
2. 発表標題 アンドロゲン受容体の重複進化による魚類の性的二型形質の多様化
3. 学会等名 第94回大会 日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩野由紀子
2. 発表標題 魚類の多彩な二次性徴形質の獲得進化の分子基盤
3. 学会等名 第47回日本比較内分泌学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩野由紀子
2. 発表標題 仮題：魚類の性的二型形質の多様化の遺伝基盤
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院 農学研究院 資源生物科学専攻 動物・海洋生物科学教育コース 水族分子発生学研究室
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/ogino-lab/>

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
研究協力者	安齋 賢 (Ansai Satoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California, San Diego		