

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 20 年度 ～ 平成 22 年度

課題番号：20570053

研究課題名 (和文) 有羊膜類の性分化における脳と生殖線の相互関係の解析

研究課題名 (英文) Analysis of interaction between the gonads and brain during sex differentiation of the amniotes

研究代表者

朴 民根 (PARK, MIN KYUN)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：00228694

研究成果の概要 (和文)：

有羊膜類の脳の性分化は生殖線のステロイドホルモンによって制御されていると考えられている。しかし最近、脳の自律的性分化の可能性が鳥類や爬虫類で報告されるようになった。私の今までの研究で、Ad4BP/SF-1 というステロイド産生酵素の制御因子が生殖線の性決定よりも早い孵卵 5.5 日目の胚の脳で強く発現していることを明らかにした。このことから本研究はこの時期の SF-1 の発現を詳しく調べると共に脳の自律的性分化への関与の可能性を探るために企画された。

先ず、RT-PCR による mRNA 発現を調べたが、孵卵 3.5 日には既に検出された。*In situ* hybridization も同じ時期から脳の間脳の腹側部で明らかな発現が検出された。しかし、その発現の第 3 脳室に接した神経上皮細胞では全く検出されず、その外側の細胞からのみ検出された。この SF-1 発現部位は間脳の成長と共に広くなり、SF-1 発現細胞の数も増えた。そして、BrdU 取込みにより SF-1 発現細胞は神経上皮細胞から移動してきた細胞が発現している可能性が示唆されたが、より詳細な実験が必要である。現在 SF-1 のタンパク質との発現を調べるためのタンクローなる抗体作成を行っており、さらに研究を深める予定である。

研究成果の概要 (英文)：

Sexual differentiation in the amniote brain is believed to be regulated by gonadal sex steroid hormones. Recently, however, the possibility of brain-autonomous sexual differentiation in avian and reptilian species has been reported. In our previous research, the mRNA of Ad4BP/SF-1, a transcription factor that regulates steroidogenic enzymes, showed significant expression level in the early-developing chick brain (around day 5.5 of incubation) before gonadal sexual differentiation. Therefore this research was designed to analyze more detail expressional character of this gene and to find out possible involvement of SF-1 in the brain-autonomous sexual differentiation.

First of all, the mRNA expression was examined by RT-PCR. The mRNA was already expressed in the ED3.5 embryonic brain. The *in situ* hybridization signal of SF-1 was strong and exclusively localized to the ventral area of the diencephalons from ED3.5. In the ventral diencephalons, the expression was detected only in lateral area, but not neuroepithelium, the surface of the ventricle. The area of lateral ventral diencephalon, which was SF-1 positive, rapidly increased until examined developmental stage (ED7.5). Depending on this expansion, the number of SF-1 positive cell was also increased. BrdU incorporation experiment suggests that the SF-1 positive cells came from the neuroepithelium. Now, I am trying to generate monoclonal antibodies against SF-1 for the more detail future study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学、形態・構造

キーワード： 性決定・性分化、外温性動物、内分泌、生殖腺、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

これまでの性分化機構の研究は主に哺乳類で多くの知見が蓄積されてきた。その結果、性染色体に存在する性決定遺伝子により生殖腺の性がまず決定され、性分化した生殖腺では性特異的なステロイドホルモンが作られ、このホルモンによって脳を始めとする生殖腺以外の組織での性差が生み出されると考えられてきた。

一方、温度によって性が決まるヒョウモントカゲモドキでは雄が多く生まれる温度（32℃）よりも低い温度（26℃）と高い温度（34℃）では雌が多く生まれる。そして、高い温度で生まれた雌は低い温度で生まれた雌より、雄で見られる攻撃的行動をより多く現すことが知られている（*J Comp Neurol* 380: 409-421, 1997）。このことからヒョウモントカゲモドキの脳では生殖腺の性分化とは独立した脳の性分化機構が存在することが示唆されている。また最近、体の左半身が ZZ で右半身が ZW である雌雄モザイクのゼブラフィンチで、左半球と右半球の脳で性行動に関連した領野に形態的な性差が現れることが報告されている（*PNAS* 100: 4873-4878, 2003）。このような有鱗目と鳥類での研究結果は、図 1 の(B)で示すような、生殖腺からのホルモンに影響を受けない独立した脳の性分化機構が存在することを強く示唆するものである。

このことから私の研究室では、ヒョウモントカゲモドキのステロイドホルモン合成酵素とその受容体の発現解析を行ってきた。その結果、脳では生殖腺の性と一致した性分化と性行動の性と一致した性分化が独立して行われており、その時期が非常に早い時期であることがわかった。即ち、生殖腺の性分化が進んでいない温度感受期の脳では P450scc の発現は雄が多く生まれる温度

で高くなり、P450arom の発現は温度に比例した変化を示した。このことはヒョウモントカゲモドキの性決定因子である温度が脳に直接働いており、生殖腺の機能と性行動を制御する部位で脳の性分化が独立して行われることを強く示唆するものである。

一方、性染色体に依存して性が決定される鳥類であるニワトリでも研究を行った。その結果、steroidogenic factor-1 (SF-1) の脳での発現が発生の早い時期（孵卵 5.5~6 日）に雌より雄で一過的に高くなり、その場所が脳の VMH (ventromedial hypothalamus) であることを明らかにした（*Zool Sci* 24: 877-882, 2007）。この時期は生殖腺の性分化が始まる時期（孵卵 6.5 日）よりも早いことから、脳での SF-1 発現の性差は生殖腺の影響を受けずに独立して引き起こされたことを意味する。

このような今までの研究結果に基づき、ニワトリの初期胚での SF-1 の発現動態を精密に解析することを通じて、脳の性分化と生殖腺の性決定との相互関係を明らかにできると思い本研究を計画した。

2. 研究の目的

今まで哺乳類の脳の性分化は生殖腺の性分化に従属的に進行すると考えられてきた。しかし、我々のこれまでの研究から同じ有羊膜類に属する爬虫類と鳥類で脳が自律的に性分化することが明らかになってきた。爬虫類ヒョウモントカゲモドキ—この種では孵卵時の温度によって性が決定される—では、性分化初期の脳で、雄の多く生まれる温度では P450scc の発現が高くなり、P450arom の発現は温度に比例して高くなることが分かった。また、ニワトリ—性染色体によって性が決定される—では、脳での雄特異的な SF-1

の発現が生殖腺の性分化前の時期に現れることも発見している (Zool Sci 24: 877-882, 2007)。これらの結果は、脳の性決定・性分化は一樣ではなく、その部位ごとに生殖腺の性決定・性分化と同調する部位と同調しない部位があることを強く示唆するものである。本研究は、性決定機構が異なるヒョウモントカゲモドキとニワトリで見つけた現象の分子生物学的解析を更に進め、有羊膜類の性分化における脳と生殖腺の従属性と自律性のメカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

1) 実験動物：

実験に用いたニワトリ胚は全て白石実験動物飼育所 (日本 埼玉) から購入した White Leghorn の有精卵を孵卵させたものである。孵卵は、研究室内の孵卵器にて以下の条件で行った (孵卵条件：温度 37.6°C・1時間ごとに転卵)。解剖時の発生時期は、孵卵器に入れてからの孵卵日数を目安に、ハンバーガー・ハミルトンの胚発生ステージ表をもとに決定し、分類した。

2) RNA 抽出と cDNA 合成

ニワトリ胚から脳 (間脳) を摘出し、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から、オリゴ (dT) プライマー、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。

3) DIG 標識 RNA プロブの合成

in situ hybridization 用の RNA プロブは、cDNA を鋳型に Table. 1. で示した SF-1 のプライマー対により増幅した 689bp の配列に DIG RNA labeling Mix (Roche) を用いて digoxigenin (DIG) 標識を行い合成した。

3) 凍結切片の作製

ニワトリ胚の頭部を摘出した直後に 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / リン酸バッファ (PBS) 中に入れ一晩固定した。その後 20% スクロース / PBS で置換した頭部をティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co.) にて包埋し、クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。切片は前額断・矢状断それぞれ 20 μ m の厚さで作製し、MAS-GP コートスライドガラス (MATSUNAMI) へ貼り付けた後、一晩室温にて風乾し、-30°C で保存した。

4) *in situ* hybridization 法による発現解析

前述の通り作製した凍結切片に対して DIG 標識 RNA プロブを用いて SF-1 mRNA の発現部位の解析を行った。*in situ* hybridization は [7] に記されている方法を一部改変して行った。陰性対照としてはセンスプロブを

用いた。

5) DAPI を用いた核染色

SF-1 の *in situ* hybridization 後の切片を PBST (0.1% TritonX-100 / PBS) で洗浄し、1 μ g/ml の濃度の 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Roche) を 5 分間作用させて細胞核を蛍光標識した。封入は水溶性封入剤 (1% DABCO, 90% glycerol / PBS) を用いた。

6) RT-PCR 法による発現解析

BDNF、PACAP、Slit3、LBH の 4 遺伝子、それぞれ特異的なプライマーを設計した。25 ng/ μ l に希釈した間脳の cDNA を鋳型にプライマー対、および Ex Taq (TaKaRa) を用いて RT-PCR を行った。内部標準としては beta-actin のプライマーを用いた RT-PCR を行い、陰性対照としては逆転写前の total RNA を 25 ng/ μ l に希釈したものを鋳型として用いた。

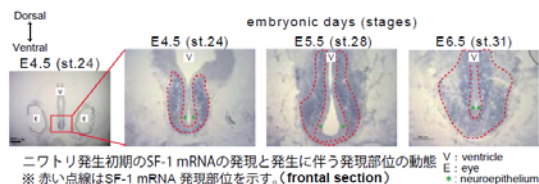
7) BrdU 取り込による増殖細胞の検出

発生中の胚の羊膜内に 50 μ l (50 μ g /ml) 投与し、4% PFA 溶液で固定し作成しパラピン切片を、2N HCl を 37°C で 1 時間処理してから、抗 BrdU 抗体 (BD) と Vectastain ABC Kit を用いて検出した。

4. 研究成果

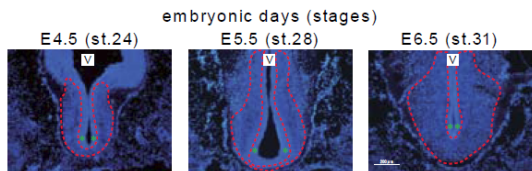
1) SF-1 の時空間的な発現解析

in situ hybridization の結果、解析を行った時期 E3.5~5.5 (st. 21~28) を通して、SF-1 mRNA の発現は明瞭に検出できた。前額断切片の結果から、SF-1 mRNA 発現細胞は、E3.5 (st. 21) で間脳の腹側に局在しており、E3.5 (st. 21)、E4.5 (st. 24)、E5.5 (st. 28) と発生の進行とともに、その発現領域が外側方向に広がっていく様子が観察された (Fig. 2. a-f)。また、矢状断切片の結果から、その発現部位は発生の進行と共に尾側方向にも広がっていくことがわかった。



2) SF-1 発現部位における細胞核の分布

そこで、SF-1 mRNA の発現部位をより詳細に解析するために、DAPI を用いた核染色法により発生初期の胚の間脳の細胞核分布を調べた。すると間脳の中でも、SF-1 mRNA 陽性細胞の存在する部位と、発現がみられない部位では明らかに細胞核の分布が異なっていることがわかった。

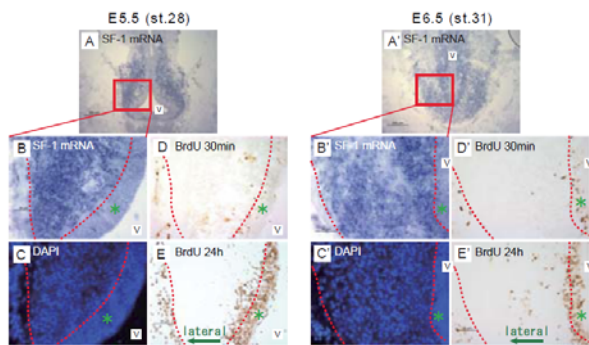


ニワトリ発生初期の間脳における細胞核の分布と発生に伴う動態
 ※ ① 青い色がDAPIのsignalで、細胞核をあらわす。V: ventricle
 ② 赤い点線はSF-1 mRNA発現部位を示す。*: neuroepithelium

SF-1 mRNA が発現していない領域は脳室周囲の神経上皮であり、その細胞核分布は規則正しく高い密度で存在しているのに対して、SF-1 mRNA 陽性細胞は脳室周囲の神経上皮の外側に存在し、その細胞核の分布はSF-1 mRNA が発現していない領域と比較して、不規則であり密度が低かった。このような不規則で低密度な細胞核の分布領域を *in situ* hybridization の像とあわせて観察したところ、解析を行った E3.5~5.5 (st.21~28) にかけて SF-1 mRNA の発現部位が拡大していた。

3) BrdU 取込みによる細胞増殖の検出

SF-1 発現細胞は発生の早い時期(孵卵 3.5 日)から間脳の腹側部で強く発現し、その発現部位は発生と共に急に増大した。そして、DAPI による核染色の結果から細胞の数も大きく増えていることから、増えた細胞が外部からの流入したものなのか、または間脳の中で増えたものなのかを BrdU 取込みで調べた。その結果、1 日間 BrdU を取込ませると、SF-1 発現細胞には BrdU が検出されず、神経上皮にのみ強く検出された。このことから、SF-1 発現細胞は神経上皮で増えた細胞が間脳に移動して、その後に SF-1 を発現するようになることが強く示唆された。

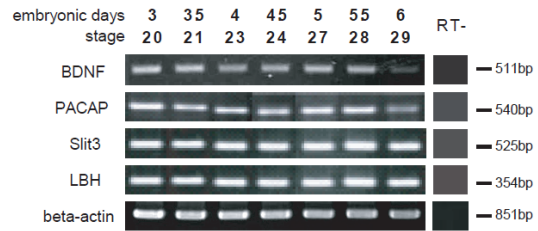


ニワトリ発生初期の間脳におけるBrdU取り込みによる細胞増殖の検出 (赤い点線はSF-1発現部位)
 A.A': SF-1 mRNA *in situ* hybridization B.B': Magnification of A (red square) V: ventricle
 C.C': DAPI stain D.D': BrdU 30min treatment E.E': BrdU 24h treatment * : neuroepithelium

4) SF-1 関連因子の発現解析

SF-1 との関連性が示唆されている因子を選択し、発現解析を続けた。その結果、神経栄養因子である BDNF をはじめ、複数の因子が発生の初期から VMH を含む間脳で強く発現しており、神経の分化や細胞増殖などに関与することが知られる PACAP や、神経回路の形成に関わるとされる Slit3、機能未知である

LBH の発現量には性差があることが示唆された。



SF-1 関連因子の RT-PCR 法による発現解析
 beta-actin ; 内部標準。

RT- ; 逆転写前の RNA を鋳型に用いた陰性対照。

また、性染色体上に存在する遺伝子も脳の性分化に関与している可能性も考え、同様の解析を行ったところ、W染色体上にコードされている ASW(生体内での機能は未知)が、メスのみで発生の初期(孵卵後 3.5 日)から強く発現していた。このように、生殖腺が性分化する前の時期に、生殖関連因子や脳の発生に重要とされる複数の因子の発現していることが明らかとなった。

5) 今後の研究展望

ニワトリの間脳では生殖腺の性決定の時期より早い時期(孵卵 3.5 日)から SF-1 の発現がみられ、その発現は間脳の発生とともに急激に拡大される。DAPI による細胞核の分布と BrdU 取り込みによる細胞増殖の分布を調べた結果、SF-1 を発現する部位の拡大部位には BrdU 陽性細胞が極めて少なく殆どが上皮細胞層にあった。さらに BrdU の取り込み時間を変えることで BrdU 陽性細胞の分布の変化を調べたが、細胞の移動を明確に示すことはできなかった。今後 *in vitro* での実験法を用いて解析する予定である。また、SF-1 の発現をタンパク質として検出し細胞増殖との関連を解析するために鳥類 SF-1 特異的なモノクローナル抗体の作成も現在行っている。

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 5 件)

- ① Kato K, Oka Y, & Park MK. (2008) Identification and expression analysis of peroxisome proliferators-activated receptors cDNA in a reptile, the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Zool Sci* 25: 492-502.

- ② Endo, D, Kanaho, Y-I, & Park MK. (2008) Expression of sex steroid hormone-related genes in the embryo of the leopard gecko. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 70-78.
- ③ Kanaho, Y-I, Enomoto, M, Endo, D, Maehiro, S, Park MK, & Murakami, S. (2009) . Neurotrophic effect of GnRH on neurite extension and neuronal migration of embryonic GnRH neurons in chick olfactory nerve bundle culture. *J Neurosci Res*, 87: 2237-2244.
- ④ Maehiro, S., and Park, M.K. (2010) The localization of Ad4BP/SF-1 mRNA expression in the chick brain during early embryonic development
- ⑤ Park, M.K., and K. Kato, K. (2010) Molecular evolution of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) in amniotes

[学会発表] (計 17 件)

- ① 金保洋一郎・朴民根・村上志津子 (2008) 発生過程の GnRH ニューロンに対する GnRH の自己分泌・傍分泌作用. 第 33 回日本比較内分泌学会. 広島 (2008 年 12 月 5-6).
- ② 前廣清香・遠藤大輔・朴民根 (2008) ニワトリ初期胚の脳における Ad4BP/SF-1 の時空間的な発現解析. 第 33 回日本比較内分泌学会. 広島 (2008 年 12 月 5-6).
- ③ 加藤恵介・朴民根 (2006) 有羊膜類の UCP 分子進化. 第 33 回鳥類内分泌研究会. 草津 (2008 年 11 月 13-14 日).
- ④ Park, MK, Endo, D, Kanaho, Y-I, Kurakata, E, (2008) Expression of steroid hormone related genes in the brain and gonad before and after the sex-determining period of the lizard and chicken. (Symposium: Roles of steroid hormones in sex determination and differentiation of vertebrates. The 78th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Fukuoka, September 5-7, 2008)
- ⑤ Kanaho, Y-I, Park, MK (2008) Identification of genes regulated by GnRH using RAP-PCR method. *Zool. Sci.*, 25: (The 78th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Fukuoka, September 5-7, 2008)
- ⑥ 金保洋一郎・朴民根・村上志津子 (2008) GnRH による GnRH ニューロンの突起伸長および移動の制御. 第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体研究会合同学術集会. 東京 (2008 年 8 月 28-30 日). 講演要旨 P. 62 ※日本下垂体研究会最優秀発表賞.
- ⑦ 加藤恵介・朴民根 (2009) 有羊膜類におけるミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP) の分子進化. 第 34 回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会 (CompBio12009). 千里ライフサイエンスセンター (2009 年 10 月 22-24 日).
- ⑧ 朴民根 (2009) GnRH による細胞増殖と細胞移動の制御とその生理学的意義. 日本下垂体研究会第 24 回学術大会シンポジウム「ゴナドトロピン分泌刺激を超えて新たな局面に向かう GnRH の機能研究」. 青森県三沢市 (2009 年 8 月 27 - 29 日)
- ⑨ 前廣清香、遠藤大輔、朴民根 (2009) ニワトリ初期胚の脳における Ad4BP/SF-1 発現部位の経時的観察. 日本動物学会第 80 回大会. 静岡市 (2009 年 9 月 17-20 日). 要旨集 pp109.
- ⑩ Maehiro, S., and Park, M.K. (2010) The localization of Ad4BP/SF-1 mRNA expression in the chick brain during early embryonic development (The Sixth Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Palmerston North, New Zealand: January 19-22, 2010)
- ⑪ Park, M.K., and K. Kato, K. (2010) Molecular evolution of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) in amniotes (The Sixth Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Palmerston North, New Zealand: January 19-22, 2010)
- ⑫ 大嶽茂雄、遠藤大輔、朴民根 (2010) 有羊膜類の精巣で環境因子により発現変動する遺伝子 *Tex27* の同定. 日本動物学会第 81 回大会. 東京 (2010 年 9 月 23 日-25 日).
- ⑬ 朴民根 (2010) トカゲの仲間の面白い生命現象. 日本動物学会第 81 回大会動物学ひろば「見てみよう触ってみようー多様な動物の世界」. 東京 (2010 年 9 月 25 日).
- ⑭ 大嶽茂雄、遠藤大輔、朴民根 (2010) 有羊膜類における *Tex27* mRNA variant の存在と卵巣での役割. 第 35 回日本比較内分泌学会大会. 静岡市 (2010 年 11 月 18 日-20 日).
- ⑮ 小林彩、吉田彩夏、朴民根 (2010) ヤモリの膵臓のホルモンとトリプシンノーゲンの cDNA 同定とグルカゴンの遺伝子構造の解析. 第 35 回日本比較内分泌学会大会. 静岡市 (2010 年 11 月 18 日-20 日).
- ⑯ 大嶽茂雄、遠藤大輔、朴民根 (2010) 脊椎動物の *Tex27* の高保存性領域の同定と解析. 動物学会関東支部大会. 東京 (2011 年 3

月 12 日).

[図書] (計 1 件)

- ①遠藤大輔、朴民根 (2010) 性の決定、(近藤保彦・小川園子・菊水健史・山田一夫・富原一哉編、脳とホルモンの行動学—行動神経内分泌学への招待、西村書店)、pp26-36.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 民根 (PARK, MIN KYUN)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：00228694

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：