

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06721

研究課題名(和文)皮膚付属器のホルモン応答性の部域差を創出する分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis for regional differences in hormone responsiveness of skin appendages

研究代表者

竹内 栄 (Takeuchi, Sakae)

岡山大学・自然科学学域・教授

研究者番号：20226989

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)：ニワトリの鞍羽は顕著な性差を示し、雌では褐色の丸型羽であるのに対し、雄では光沢のある赤褐色の飾り羽で小羽枝を欠くフリンジ構造がみられる。この雄に特徴的な形態は、ASIPとDI03の発現と相関しており、成鶏雄にE2を投与するとこれらの発現が低下し、雌型羽が形成される。本研究では、羽髄細胞にT3を作用させるとPOMC mRNAの発現が亢進すること、ニワトリASIPが糖タンパクとして分泌されること、羽包では既知の甲状腺ホルモン受容体に加え、新規の機能欠損型受容体を作られていることなどを明らかとした。また、プロラクチンによる羽伸長作用にも甲状腺ホルモン系が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚付属器は性選択を含む様々な淘汰圧を受ける重要な構造体である。その性差形成や伸長に関わるホルモンの作用機序の理解は、基礎生物学的に重要であるだけでなく、育毛や美容といった面からも強い要請がある。この意味で、得られた結果は、皮膚科学や育毛、美容といった関連分野への波及効果が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The saddle feathers of chickens show marked sex differences. Females have round brown feathers, while males have glossy reddish-brown ornamental feathers with a fringe structure lacking barbules. Male-specific morphology of saddle feathers is related to the expression of ASIP and the thyroid hormone (TH) inactivating enzyme DI03, and administration of E2 to males reduces the expression of these genes and forms female-type feathers. In this study, we found that POMC mRNA expression is enhanced by the action of T3 on feather pulp cells, and that ASIP is secreted as a glycoprotein. Furthermore, we identified a novel TH receptor subtype with loss-of-function expressed in feather follicles, in addition to the known subtypes. It was also suggested that the TH system may be involved in the feather elongation action of prolactin.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：羽形成 性差 遅羽 ホルモン制御メラノコルチン系 プロラクチン系 甲状腺ホルモン系

### 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。また、ニワトリでは主翼羽の伸長を遅延させる伴性遅羽遺伝子が知られており、THと同様に換羽ホルモンとして知られるプロラクチン(PRL)受容体(PRLR)をコードすることが知られていた。しかし、いずれにおいても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いた。

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 $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン( $\alpha$ -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。また、遅羽遺伝子については、機能的なPRL受容体ダイマー量を減少させることで羽伸長を抑制する可能性を示唆した。本研究では、これらの現象に注目し、ニワトリの羽形成におけるE2系、メラノコルチン系、TH系、PRL系の詳細を解析するとともに、これらのホルモン系間のクロストークについて検討を行った。

### 2. 研究の目的

- (1) 羽包におけるPOMC遺伝子発現に及ぼすTHの影響の解明
- (2) ニワトリASIPのタンパク質としての性質の解明
- (3) 羽包におけるPRLの作用機序の解明
- (4) 羽包に発現するTH受容体の同定と機能解析

### 3. 研究の方法

- (1) 羽髄細胞の初代培養系を用いて、T3投与によるPOMC mRNAの発現変化をRT-qPCRにより解析した。
- (2) ニワトリASIPの3種のmRNAクラスから翻訳されるタンパク質を培養細胞での強制発現系とウエスタンブロッティング法により解析した。
- (3) 遅羽と速羽(野生型)の主翼羽における遺伝子発現をRNA-seqとRT-qPCRにより比較解析した。
- (4) 羽包に発現するTH受容体を同定すると共に、その機能をTREとミニマルプロモーターを連結したルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 羽包におけるPOMC遺伝子発現に及ぼすTHの影響

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(図1, Male)。我々は従前の研究において、この特徴的な先端部の形態が、ASIPとDIO3の発現と相関することを見出した。実際、成鶏雄にE2を投与するとこれらの遺伝子発現が低下し、小羽枝をもったユーメラニン色のまだら模様のある雌型羽が形成される。また、DIO3による活性型THの局所的濃度低下を打ち消すためにT4を皮下投与すると、尖った雄型羽は小羽枝をもつ丸い羽に変わり、羽全体が濃いユーメラニン色となった(図1, T4 male)。

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で調べたところ、T4投与により小羽枝のマーカージェンBLSK1、およびユーメラニン産生に働くTyrP1の発現が誘導されていた(図2)。これらの結果は、E2による雌型羽形成では、E2がASIPとDIO3の発現を抑えるとともに、DIO3の発現抑制による局所的なT3濃度の上昇を介して、小羽枝形成を促進すると共にPOMC発現も促進し、ユーメラニン産生を誘導している可能性を示唆する。そこで、本研究ではこのモデルを検証するために、羽髄細胞の初代培養系(図3)を用いて、T3投与によるPOMC mRNAの発現変化をRT-qPCRにより解析した。その結果、投与24時間後に有意な発現亢進が観察された。



図1 T4処理の雄鞍羽

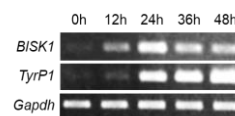


図2 T4処理による羽包の遺伝子発現変化

羽髄細胞では T3 受容体 THRB, POMC から  $\alpha$ -MSH を産生する酵素の PC1 と PC2 の mRNA 発現が確認されたことから, T3 は THRB を介して POMC の発現を亢進し,  $\alpha$ -MSH の局所産生を促進することで, 雌鞍羽にみられるユーメラニン色のまだら模様を形成するものと考えられた。T3 による POMC 遺伝子の発現制御については, 今後, プロモーター解析を進めていく予定であるが, 本研究の成果は,  $\alpha$ -MSH の主要内分泌腺である脳下垂体中葉を欠く鳥類では, 羽包において  $\alpha$ -MSH の産生が局所的に制御されることで複雑な色模様形成が為されている可能性を強く示唆する。

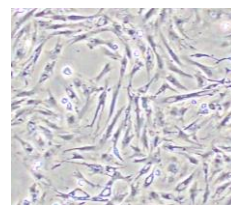


図3 初代培養羽髄細胞

### (2) ニワトリ ASIP のタンパク質としての性質の解明

Agouti signaling protein (ASIP) は皮膚や脂肪組織等で局所産生され,  $\alpha$ -MSH と競合するアンタゴニストとして, あるいはインバースアゴニストとしてメラノコルチン受容体に作用し, メラノサイトが産生するメラニンタイプのスイッチングや, 脂肪組織における脂肪蓄積に関与する傍分泌因子である。我々はこれまで, ニワトリの ASIP 遺伝子から選択的プロモーターにより転写される 3 つのクラスの ASIP mRNA (class 1~3) を同定し, その class 1 mRNA の発現が雛や成鶏メスの体色の逆影パターンや成鶏オスの性的提示パターン形成に関与すること, class 3 mRNA の発現が皮下および内臓脂肪の蓄積に関与することなどを明らかにしてきた。しかし, これらの ASIP mRNA の中には 5' UTR には複数の uORF を含むものがあり, ASIP タンパク質が確かに作られるのか否かについては不明であった。さらに, ニワトリを含む鳥類の ASIP mRNA には脊椎動物で保存された ORF の翻訳開始コドンに加え, フレームが一致する uAUG が存在するが, これが選択的な翻訳開始コドンとして使われた場合の成熟タンパクに違いがみられるのか否かも分かっていない。そこで本研究では, 鳥類におけるメラノコルチンシステムの更なる理解のために, 培養細胞系における強制発現系を用い, ニワトリ ASIP mRNA の翻訳および翻訳産物の解析を行った。その結果, いずれの ASIP mRNA から翻訳されたタンパク質も N 型糖鎖が付加され, 見かけ上の分子量に違いがないことが初めて明らかとなった。

### (3) 羽包における PRL の作用機序

ニワトリ初生雛の主翼羽の伸長には, 速羽 (野生型) と遅羽の遺伝形質がある。これは, Z 性染色体上の遺伝子座により支配されており, 遅羽遺伝子 (K) が速羽遺伝子 (k+) に対して優性を示す。速羽の雄 (k+/k+) と遅羽のメス (K/-) を交配させると雄はすべて遅羽に, メスはすべて速羽にすることができることから, 遅羽遺伝子は養鶏において雌雄鑑別に広く利用されている。この遅羽遺伝子では 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。我々は従前の研究において, dSPEF2 mRNA が dPRLR のすべてのコーディングエクソンを超えた転写により産生されること, 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することなどを見出し, 遅羽遺伝子が PRLR シグナルを抑制することで遅羽を引き起こすという分子作用メカニズムの新モデルを提案した (図4)。PRL と TH は共に換羽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。そこで本研究では, PRLR シグナルの下流因子を同定するため, 遅羽と速羽の主翼羽における遺伝子発現を RNA-seq と RT-qPCR により比較解析した。その結果, 遅羽の主翼羽では細胞成長因子や TH 関連遺伝子の発現が有意に低下していることが明らかとなった。羽包においては, E2 や PRL 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。

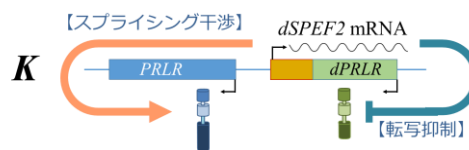


図4 遅羽遺伝子の作用機序

### (4) 羽包に発現する TH 受容体の同定と機能解析

TH (T3, T4) は発生, 成長, 代謝にはたらく極めて重要なホルモンであり, その作用は 2 つの異なる遺伝子に由来する核内受容体 THRA (thyroid hormone receptor  $\alpha$ ) と THRB (thyroid hormone receptor  $\beta$ ) を介して発現する。これらの受容体 (THR) はリガンド依存性の転写調節因子であり, レチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成し, 甲状腺ホルモン応答配列 (TRE) に結合することで, 下流の標的遺伝子の転写を調節する。本研究では羽包に発現する THR を同定すると共に, その転写活性化に関する特性を明らかにすることを目的とした。Ensembl データベースに登録されている 5 種類のニワトリ THR mRNA のうち, 発現が確認されたのは THRA202 と THRB201, 202 の 3 種類であった。また新たに, THRB202 の exon5 (147bp) を欠いたバリエーションが見つかり, この新規バリエーションを THRB202  $\Delta$  e5 と命名した。exon5 は THRB の LBD の一部をコードすることから, THRB202  $\Delta$  e5 は LBD の部分的欠損型 THR といえる。ニワトリ THR の系統だった機能解析はなされていない。そこで上記の各 mRNA がコードする THR の T3 依存的転写活性化能を, ルシフェラーゼレポーターアッセイにより調べた。実験は, 各 THR と RXR の ORF を pcDNA3 に組み込んだコンストラクトと, luciferase 遺伝子の 5' 上流に TRE 配列を組み込んだコンストラクトを作製し, HEK293T 細胞で共発現させてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, THRA202 と THRB202 は T3 添加により活性が大きく上昇したが, THRB202  $\Delta$  e5 は T3 添加による活性の大き

な上昇は見られなかった。また、THRB202  $\Delta$  e5 に他の THR のはたらきを阻害する活性は見られなかった。これらの結果から、THRB202  $\Delta$  e5 は T3 依存的な遺伝子発現制御において、積極的な抑制因子というよりは、機能的受容体量の転写後調節により生じた不活性産物である可能性が考えられた。今後は、THRB202  $\Delta$  e5 が生体内においてどのような条件下で機能を発揮しているのか、どのような機能をもつのかについて解明していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Takeuchi Sakae	4. 巻 1
2. 論文標題 Agouti family	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 " Handbook of Hormones(2nd Edition), Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research	6. 最初と最後の頁 111 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-820649-2.00028-0	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 -
1. 著者名 Takeuchi Sakae	4. 巻 1
2. 論文標題 Agouti-signaling protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 " Handbook of Hormones(2nd Edition), Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research	6. 最初と最後の頁 113 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-820649-2.00029-2	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 -
1. 著者名 Takeuchi Sakae	4. 巻 1
2. 論文標題 Agouti-related protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 " Handbook of Hormones(2nd Edition), Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research	6. 最初と最後の頁 115 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-820649-2.00030-9	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 -
1. 著者名 Kabir M. H., Takenouchi A., Haqani M. I., Nakamura Y., Takeuchi S., Tsudzuki M.	4. 巻 51
2. 論文標題 Discovery of a new nucleotide substitution in the MC1R gene and haplotype distribution in native and non Japanese chicken breeds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Genetics	6. 最初と最後の頁 235 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/age.12906	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 福地響紀・渡邊僚也・中野沙耶・相澤清香・竹之内惇・都築政起・竹内栄
2. 発表標題 ニワトリASIPタンパクの性格付け
3. 学会等名 第46回 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福地 響紀・渡邊 僚也・中野 沙耶・相澤 清香・竹之内 惇・都築 政起・竹内 栄
2. 発表標題 ニワトリASIP 遺伝子産物の性格付け
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福地 響紀・渡邊 僚也・中野 沙耶・相澤 清香・竹之内 惇・都築 政起・竹内 栄
2. 発表標題 メラノコルチン系インバースアゴニストの分泌性
3. 学会等名 生物系三学会（動物学会・植物学会・生態学会）合同中四国支部徳島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野沢 優里・岡村 彩子・福地 響紀・相澤 清香・竹内 栄
2. 発表標題 ニワトリの羽伸長におけるプロラクチンの作用機序
3. 学会等名 生物系三学会（動物学会・植物学会・生態学会）合同中四国支部徳島大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------