

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660211

研究課題名(和文)鳥類の脳の雌性化機構とアロマターゼ遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文)Study of feminization mechanism of avian brain and regulation mechanism of aromatase gene expression

研究代表者

斉藤 昇(Saito, Noboru)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：40211924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ受精卵の孵卵中に、脳と生殖腺、副腎のアロマターゼ遺伝子発現、および血漿と脳、生殖腺、副腎のエストラジオール濃度を測定した。生殖腺と副腎において、雌のアロマターゼ遺伝子発現が高いことが確認された。脳においては、アロマターゼ遺伝子発現において性差が観察されなかった。組織中のエストラジオール量はアロマターゼ遺伝子発現と同様な結果であった。血中エストラジオール濃度には性差がなかったために、生殖腺で産生されたエストラジオールが脳に作用している可能性は低いことが示唆され、脳が自立的に性分化している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During incubation of chicken fertilized eggs, aromatase gene expression of brain and gonads, adrenal glands and estradiol concentrations of plasma and brain, gonads, adrenal glands were measured. It was confirmed that female aromatase gene expression was high in gonads and adrenal glands. No gender difference was observed in aromatase gene expression in the brain. The amount of estradiol in the tissue was similar to that of aromatase gene expression. It was suggested that estradiol produced in gonads is unlikely to act on the brain because there was no sex difference in blood estradiol concentration suggesting that the brain may be sexually autonomous.

研究分野：農学

キーワード：ウズラ 生殖腺 脳 性分化 エストラジオール アロマターゼ 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

鳥類の脳の雌性化機構は、生殖腺(卵巣)からのエストラジオール依存であるとする考え方が基本である。その根拠となる結果は、主に2つある。発生初期の卵巣は、多量なエストラジオールを合成する。雄の受精卵に、多量のエストラジオールをウズラやニワトリに投与することにより、孵化後の雄の行動が雌性化することが報告されている。

しかしながら、そのような従来の考えと矛盾する実験結果もいくつか存在する。例えば、血中エストラジオール濃度は、ニワトリの雌性化に重要な時期(10-12日胚)において、血中レベルではそれほど雌雄差が無いことを表しており、このような血中レベルの差で本当に脳の雌性化に影響を与えるのか疑問である。最近、私たちは、特定の神経核(BSTn、分界条床核)において、雌のアロマターゼ発現が雄よりも高いことを明らかにした。以上のような結果を考えあわせると、脳が自立的に雌性化を起こしている可能性が高いと考えられるが、胚時期の脳と生殖腺を分けて実験することは難しく直接証明されていない。

2. 研究の目的

動物には、生殖腺のみではなく脳にも性差があり、そのために性行動などに性差がある。鳥類の性染色体はZW型であり、雌は雄から雌性化により生じると考えられている。脳の雌性化は、卵巣で合成されるエストラジオールにより、生殖腺依存的に雌に誘導されると考えられている。本申請では、鳥類の脳の雌性化は、脳自身が自立的に行なっているという仮説を立て、以下の項目を遂行する。

3. 研究の方法

(1) ニワトリの卵を16日間孵卵後に、脳、生殖腺、副腎、血液を採取した。脳、生殖腺、副腎からRNAを抽出し逆転写を行って、アロマターゼ遺伝子発現をリアルタイムPCRで測定した。また、血漿、脳、生殖腺、副腎をステロイドホルモン抽出し、エストラジオール濃度を測定した。

(2) ウズラの脳内のエストラジオールの局在性を質量分析イメージング装置により解析し、脳内におけるエストラジオール局在およびその定量解析。

(3) ウズラの胚発生に伴う生殖腺における性分化に関連する遺伝子発現の解析。

(4) ニワトリとウズラに胚時期にエストラジオールあるいはアロマターゼ阻害剤を投与し、生殖腺の形態の変化あるいはアロマターゼ遺伝子発現の変化を調べ、メス化あるいは脱メス化の程度を調べ、ニワトリとウズラの生殖腺の性分化機構に違いあるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 生殖腺と副腎のアロマターゼを雌雄で比較した結果、どちらも雌のアロマターゼ遺伝子発現が高いことが確認された。副腎の雌においてもアロマターゼ遺伝子発現が増加しているということは副腎でエストラジオールが発現していることが示唆された。しかしながら、脳においては、アロマターゼ遺伝子発現において雌雄差は観察されなかった。脳、生殖腺、副腎のアロマターゼ遺伝子の発現を比較した結果、生殖腺の雌の発現が最も強く、副腎の雌、雌雄の脳という順に強く発現していた。生殖腺と副腎の雄はアロマターゼ遺伝子発現が弱い結果となった。エストラジオール量を測定した結果、血中エストラジオールは雌雄差がなく、雄の血中にエストラジオールが存在していることが確認された。生殖腺は雄より雌のエストラジオール含有量が有意に増加している。しかし、脳のエストラジオール含有量は雌雄に差がない。このことから、血中エストラジオールは、生殖腺あるいは、副腎ではなく、脳において産生されたエストラジオールが血中に放出された可能性を示唆した。

(2) ウズラの脳の凍結切片を用いて、エストラジオールの局在性を質量分析イメージング装置により解析し、脳内におけるエストラジオール局在およびその定量解析を試みたところ、エストラジオールを測定できる可能性が確認した。

(3) AROM、FOXL2の雌における遺伝子発現量は雄の10~100倍であった。E7から雌雄間で有意な差がみられ、発生が進むに伴って発現量の性差が大きくなった。雄のWNT4発現量はE5~E15通して有意差はみられず、ほぼ一定であり、雌ではE9から発現量が増加しはじめ雌雄間に有意差も確認され、E15で最大となった。E5では雌雄間でほとんど差がないことから、生殖腺発達後期に関与していると考えられる。WNT4(WNT/-カテニンシグナル伝達経路)の新規レギュレーターであるRSP01は雌雄全体を通して低い値を推移しE15雌のみ高値を示した。RSP01もWNT4同様に生殖腺発達後期に関与していると示唆された。DMRT1発現量は、雄においては発生が進むにつれ徐々に増加していく一方雌は低値のまま推移し、E15で雌雄差は最大となった。SOX9でもDMRT1同様の結果がみられた。AMHは、雌では常に低値を推移した。雄はE5時点で雌と同程度の発現量だったが、E7で一気に発現量が増加した。本研究結果から、ウズラでは遺伝子発現の雌雄差の大きさや発現量の推移など、報告されているニワトリの結果と異なる点も確認され、今後ほかの遺伝子発現を調べるなど実験を進める必要があることが示唆された。

(4) E2処理実験：(ウズラ胚)生殖腺の形態

の左右比およびアロマターゼ遺伝子発現量で0日胚の処理では生殖腺の雌性化の影響が見られたが、それ以降の胚に対するE2処理ではほとんど生殖腺への影響が見られなかった。AI処理実験：(ウズラ胚)生殖腺の左右比は3日胚以前の処理で対照群雌の約30%、6日胚での処理では約40%、9日胚での処理では約90%になっている。アロマターゼ遺伝子発現量は、3日胚以前で対照群雌の約50%まで低下した。(ニワトリ胚)生殖腺の左右比は6日胚以前の処理で対照群雌の約40%、9日胚での処理では約80%になっている。アロマターゼ遺伝子発現量は各胚齢での処理でほとんど生殖腺への影響が見られなかった。これまでのE2・AI処理実験全体の結果からウズラ胚とニワトリ胚の結果から、いくつかの点で違いが見られたので、その違いが何に起因するか検討する予定である。

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 6件)

Aste N, Yoshioka N, Sakamoto E, Saito N. Female-biased sex difference in vasotocin-immunoreactive neural structures in the developing quail brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 査読有、2016、77、41-54. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.05.002

Kotomura N, Harada N, Ishihara S, The Proportion of Chromatin Graded between Closed and Open States Determines the Level of Transcripts Derived from Distinct Promoters in the CYP19 Gene. *PLoS One*. 査読有、2015、28. doi: 10.1371/journal.pone.0128282.

Iwasa A, Arakaki R, Honma N, Ushio A, Yamada A, Kondo T, Kurosawa E, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Yoshimura N, Harada N, Hayashi Y, Ishimaru N, Aromatase controls Sjögren syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am. J*

Pathol. 査読有、2015、185、151-161. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.09.006.

Hayashi T, Harada N, Post-translational dual regulation of cytochrome P450 aromatase at the catalytic and protein levels by phosphorylation/dephosphorylation. *FEBS J.* 査読有、2014、281、4830-4840. doi: 10.1111/febs.13021.

Lai WA, Yeh YT, Fang WL, Wu LS, Harada N, Wang PH, Ke FC, Lee WL, Hwang JJ, Calcineurin and CRTC2 mediate FSH and TGF- β 1 upregulation of Cyp19a1 and Nr5a1 in ovary granulosa cells. *J Mol Endocrinol.* 査読有、2014、53、259-270. doi: 10.1530/JME-14-0048.

Ubuka T, Haraguchi S, Tobar Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, Tsutsui K, Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat Commun.* 査読有、2014、5、3061. doi: 10.1038/ncomms4061.

[学会発表](計 5件)

豊島花梨、齋藤昇、ウズラとニワトリの生殖腺性分化の違い、日本家禽学会春季大会、2017年3月30日、神戸大学、神戸

池田理佐、松井祥悟、齋藤昇、安藤元紀、New insights into the mechanism of microtubule shortening during rapid axopodial contraction in heliozoan *Polyplacocystis contractilis*, 第87回日本動物学会大会、2016年11月17日-19日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市、沖縄。

Saito N, Asai S, SGLT1 and Aquaporin

gene expression in chick intestine, The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, 2016年8月22日-25日, 九州産業大, 福岡.

井上理佐、村田和義、齋藤昇、安藤元紀、急速な軸足収縮を誘発させずに化学固定したハリタイヨウチュウにおける微小管動態の超微形態学的解析、第48回日本原生生物学会大会, 2015年11月6日-8日、国立感染症研究所戸山庁舎、東京、

井上理佐、齋藤昇、安藤元紀、Ultrastructural analysis using a novel fixation method for preventing the induction of axopodial contraction in *Raphidiophrys contractilis*, 第86回日本動物学会大会、2015年9月17日-19日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター、新潟。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 昇 (SAITO, Noboru)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：40211924

(3) 連携研究者

原田 信広 (HARADA, Nobuhiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00189705