

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840107

研究課題名(和文)メダカ成体卵巢におけるエストロゲンを介した性的可塑性の分子メカニズム

研究課題名(英文)The mechanism for sex reversal in ovarian aromatase loss-of-function mutant medaka

研究代表者

中本 正俊(Nakamoto, Masatoshi)

東京海洋大学・学術研究院・博士研究員

研究者番号：80447721

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)：硬骨魚類では女性ホルモンであるエストロゲンが雌化・卵巢の分化に重要であると考えられている。しかし、エストロゲンの卵巢分化における機能については不明な点が多い。本研究ではメダカを用いてエストロゲンの卵巢分化における機能を明らかにすることを目的とした。その結果、メダカでは生殖腺は性的な可塑性を有しており、エストロゲンによって生殖腺の卵巢への分化が維持されていること、生殖腺中のエストロゲン量の低下、またはエストロゲン量とアンドロゲン量のバランスの変化により卵巢組織が退化し精巢への性転換が起こることが示された。

研究成果の概要(英文)：Although estrogens have been generally considered to play a critical role in ovarian differentiation in non-mammalian vertebrates, the specific functions of estrogens during ovarian differentiation remain unclear. We isolated two mutants with premature stops in the ovarian aromatase (cyp19a1) gene from a mutagenesis library of the medaka, *Oryzias latipes*. In XX mutants, gonads first differentiated into normal ovaries containing many ovarian follicles that failed to accumulate yolk. Subsequently, ovarian tissues underwent extensive degeneration, followed by the appearance of testicular tissues. During the initial phase of degeneration of ovarian tissues, the genes involved in synthesis of non-aromatizable androgens were up-regulated. Our results suggest that the imbalance of estrogens and androgens, especially the potential for an increase in androgens could be part of the mechanism that induced degeneration of ovarian follicles in ovaries and sex reversal of cyp19a1 mutants.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：性分化 性転換 性的可塑性 メダカ エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

(1) 性的に未分化な生殖腺が精巣または卵巣に分化する過程を性分化という。この性分化プロセスの大きな特徴の一つは性的な可塑性を有する、すなわち性転換が起こることがあるという点である。研究開始当初、雌のメダカ成魚に対してエストロゲン合成に必須である芳香化酵素 (aromatase) の阻害剤を投与しエストロゲン合成を阻害すると、卵巣が退化して精巣が形成されることが報告された。このことから成体卵巣の性的可塑性の発現/性転換の誘導には女性ホルモンであるエストロゲンの量の低下が重要であることが示唆された (引用文献)。しかし、エストロゲンが初期卵巣分化や成体卵巣の維持・性的可塑性の発現においてどのような機能を果たしているかについてはまったく分かっていなかった。

(2) エストロゲンの卵巣分化における機能を明らかにすることを目的として、エストロゲンが合成できない変異メダカのスクリーニングとその表現型の解析を行った。エストロゲン合成に必須のステロイド代謝酵素である卵巣型芳香化酵素の機能欠損変異メダカをメダカ TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 変異体ライブラリーからスクリーニングした。その結果、卵巣型芳香化酵素の翻訳領域内に STOP コドンとなるような変異が挿入された変異体が 2 系統 (cyp19a1 (K164X) 系統、cyp19a1 (Q183X) 系統) 同定された。予備的な解析の結果、これらの 2 系統はまったく同一の表現型を示したため、以降の解析には cyp19a1 (K164X) 系統を用いた。ラジオイムノアッセイの結果、この変異体では卵巣内のエストロゲン量は検出限界以下のレベルまで大幅に減少していた。この芳香化酵素機能欠損変異メダカの遺伝的雌 (XX) 成魚 (孵化後 2~3 ヶ月) では、Eosin Y 好染の卵黄の蓄積が見られないことを除いてほぼ完全な卵巣を形成していた。その後、孵化後 3~4 ヶ月の個体では卵巣が崩壊し精子形成、すなわち卵巣から精巣への性転換が見られた。成体卵巣の精巣への性転換は卵巣内に存在する生殖幹細胞とそれを取り囲む性的に未分化な支持細胞が雄分化して起きることが示唆された。しかし、エストロゲンの制御下でどのような遺伝子 (群) が機能し卵巣の雌分化を維持しているのか、あるいはエストロゲン量が減少し生殖腺内のホルモン環境が変化した時にどのような遺伝子 (群) が働いて卵巣から精巣への性転換が誘導されるのかについてはまったく不明であった。

2. 研究の目的

これまでの魚類を用いた一連の研究からエストロゲンが成体卵巣における雌分化の維持に必須であり、エストロゲン量が低下すると卵巣から精巣への性転換が起こること

が示されているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究ではこの卵巣分化の維持・性転換の誘導に関わる遺伝子群を探索し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) トランスクリプトーム解析により芳香化酵素機能欠損変異メダカにおける成体卵巣の崩壊と卵巣から精巣への性転換過程において発現量が変化する遺伝子の探索を行った。発現量に変動がみられた遺伝子についてはその詳細な発現パターンや機能の解析を試みた。これにより成体卵巣における卵巣分化の維持機構に関わる遺伝子が同定されることが期待された。

(2) 卵巣型芳香化酵素機能欠損変異メダカの成体卵巣の精巣への性転換は、卵巣内の生殖幹細胞およびそれを取り囲む未分化な体細胞が一斉に雄分化するのではなく、一部の生殖幹細胞からは卵が形成されていた。このことは卵巣内の局所的なホルモン環境が、生殖幹細胞およびそれを取り囲む未分化な体細胞が雄分化するかあるいは雌分化するかを決定するうえで重要な要因であることを示唆している。そこで卵巣型芳香化酵素変異メダカにメダカ正常型芳香化酵素とレポーターとして GFP を発現するコンストラクトを導入し、変異のレスキューし、卵巣内の一部でエストロゲンを合成させる実験を試みた。

4. 研究成果

(1) 遺伝的雌 (XX) の芳香化酵素機能欠損変異メダカの生殖腺は遺伝的に従って卵巣に分化した (図 1A)。卵濾胞は卵黄形成期のサイズまで成長した。この時、濾胞の顆粒膜細胞は異常増殖し、野生型個体よりも厚い顆粒膜細胞層が観察された (図 1B、I)。

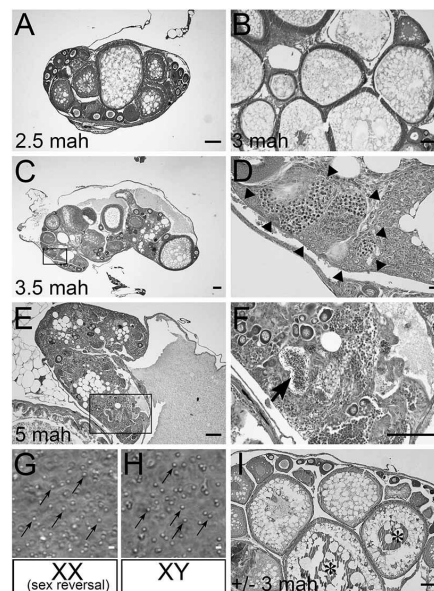


図 1, 芳香化酵素変異メダカ生殖腺の組織像

その後、卵黄組織は崩壊し、生殖腺背側に位置する生殖幹細胞とそれを取り囲む体細胞から新たな精巣組織が形成された(図 1C, D)。精巣組織は背側の一部から生殖腺全域へと広がった(図 1E)。また妊性がある機能的な精子が形成された(図 1F-H)。

(2) エストロゲン合成の低下による成体卵巣の崩壊と卵巣から精巣への性転換の初期の過程に関わる遺伝子(群)を同定することを目的として、Phase 1: 卵巣の崩壊が始まる前の時期(n=8)、Phase 2: 卵巣崩壊の最初の指標である厚い顆粒膜細胞層は観察されるが外部形態(ヒレの形)は雌の時期(n=4)、Phase 3: 二次性徴の指標であるヒレの形態が雄に変化した時期(n=4)の3群、計16サンプルについてRNAseq法によるトランスクリプトーム解析を行った。それぞれの時期の卵巣からtotal RNAを抽出し、シークエンスライブラリーを作成した。Illumina社HiSeq2000によるシークエンスの結果、平均68,453,192 ± 6,124,041 (S.E.)のシークエンスリードが得られた。低クオリティーリードの除去後、公開されているメダカゲノム参照配列(Ensemble release 75)にRSEMソフトウェアを用いてマッピングを行った。平均64.4%のリードが参照ゲノム配列にマッピングされた。次にRパッケージTCCを用いて2群比較(Phase 1 vs 2、Phase 2 vs 3)を行い、発現量が変動している遺伝子の検出を試みた。発現変動の閾値はFDR < 0.01とした。

(3) Phase 1(卵巣の崩壊が始まる前の時期)とPhase 2(卵巣崩壊の最初の指標である厚い顆粒膜細胞層は観察されるが外部形態は雌の時期)の発現遺伝子の比較では2338個の発現変動遺伝子が検出された。このうち2055遺伝子は発現量が上昇しており、283遺伝子は減少していた(図2A)。発現量が上昇した遺伝子群にはHsd17b(17-beta hydroxysteroid dehydrogenase)ファミリーの遺伝子、srd5a1(steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide)、hsd11b(11beta hydroxysteroid dehydrogenase)といったdihydrotestosteroneや11-Ketotestosterone等の芳香化酵素に代謝されない(non-aromatizable)アンドロゲンの合成に関わるステロイド代謝酵素が含まれていた。2338個の発現変動遺伝子についてGene Ontologyエンリッチメント解析による遺伝子機能の推定を行った。translation, electron transport chain, metabolism, biosynthesis, extracellular matrix, constituent secretion and cell cycleカテゴリーに属する28個のGO termsが付与された遺伝子の発現が統計に有意に上昇していた(図2C)。特にtranslationに関わる遺伝子が多く変動していることが明らかとなった(図2D)。エストロゲン合成の低下による性転換の最初の過程、おそらく顆粒膜細胞層の異常増殖の過程でタンパク質合成が活性化することが示唆された。

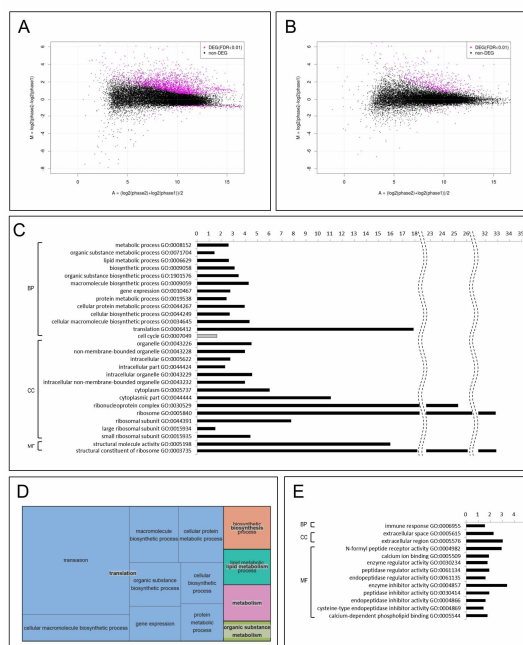


図2 芳香化酵素機能欠損変異メダカにおける成体卵巣の性転換過程のトランスクリプトーム解析

(4) Phase 2(卵巣崩壊の最初の指標である厚い顆粒膜細胞層は観察されるが外部形態は雌の時期)とPhase 3(二次性徴の指標であるヒレの形態が雄に変化した時期)の発現遺伝子の比較では597個の発現変動遺伝子が検出された。このうち555遺伝子は発現量が上昇しており、42遺伝子は減少していた(図2B)。GOエンリッチメント解析の結果、発現変動遺伝子には免疫機能に関わる遺伝子が多く含まれることが明らかとなった(図2E)。これらの遺伝子は閉鎖した濾胞の除去に関わるマクロファージ等の細胞で働いているものと考えられた。

(5) 卵巣型芳香化酵素変異メダカにメダカ正常型芳香化酵素を発現させる変異レスキュー実験を試みた。卵巣型芳香化酵素のプロモーター領域とORFが存在するゲノム領域とレポーターとしてb-actinプロモーターにEGFPを連結したDNA断片を組み込んだコンストラクトを構築し、メダカ受精卵に顕微注射で導入した。しかし、コンストラクトがモザイクに組み込まれたG0世代では部分的な変異レスキューの影響は見られなかった。

(6) 本研究によりエストロゲンによる成体卵巣の雌分化維持メカニズムの一端が明らかとなった(図3)。正常な卵巣形成過程では生殖幹細胞は卵母細胞に、生殖幹細胞を取り囲む体細胞は顆粒膜細胞に分化する。卵黄形成期まで卵濾胞が発達すると顆粒膜細胞および莢膜細胞においてエストロゲンが合成される。エストロゲンの刺激で肝臓において卵黄タンパク質が合成され、卵に卵黄が蓄積し

正常な卵が形成される(図.3A)。一方、メダカではエストロゲンが合成されない場合でも生殖腺は遺伝的性に従ってまずは卵巣に分化する。メダカが成熟を迎えるサイズまで成長し、卵黄形成期のサイズまで卵濾胞が発達すると、顆粒膜細胞が異常増殖し、卵濾胞は崩壊する。その後、卵巣内に存在する生殖幹細胞と、それを取り囲む性的に未分化な支持細胞が雄分化し、精巣組織が構築される。また性的に未分化な体細胞の雄分化の過程では、すでに雄分化に必須であることが報告されている *gsdf* の発現が重要であることが示唆された。(図. 3B)。この卵巣組織の崩壊と精巣への性転換の最も初期の段階では *hsd17b* や *srd5a1* といった芳香化酵素に代謝されない(non-aromatizable)アンドロゲンの合成に関わるステロイド代謝酵素の発現が大きく上昇することが明らかとなった。

これらの結果から、メダカではエストロゲンによって生殖腺の卵巣への分化が維持されていること、生殖腺中のエストロゲン量の低下、またはエストロゲン量とアンドロゲン量のバランスの変化により卵巣組織が崩壊し、幹細胞から新たに精巣が形成されることが示された。

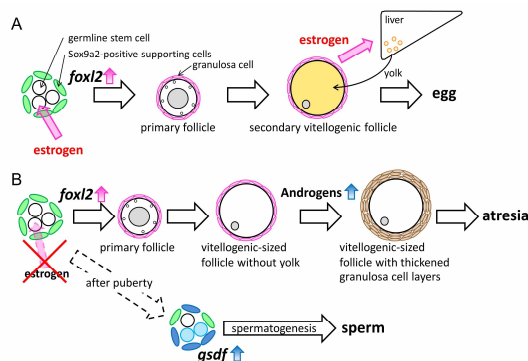


図.3 エストロゲン合成の欠損による成体卵巣の性転換過程の模式図

<引用文献>

① Paul-Prasanth, B. *et al.*, Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. *Scientific Reports*. 3:2862-72. (2013).

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1件)

(1) Masatoshi Nakamoto, Yasushi Shibata, Kaoru Ohno, Takeshi Usami, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Takeshi Todo, Takashi Sakamoto, Graham Young, Penny Swanson, Kiyoshi Naruse, Yoshitaka Nagahama . Ovarian aromatase loss-of-function mutant medaka undergo ovary degeneration and partial female-to-male sex reversal after puberty . *Molecular and Cellular Endocrinology* . 査読有 . 460 巻、2018 年、104 - 122 . DOI: 10.1016/j.mce.2017.07.013

6. 研究組織

(1)研究代表者

中本 正俊 (NAKAMOTO, Masatoshi)  
東京海洋大学・学術研究院・博士研究員  
研究者番号：80447721

(2)研究協力者

長濱 嘉孝 (NAGAHAMA, Yoshitaka)  
愛媛大学・社会連携機構・教授

Young, Graham  
University of Washington・School of Aquatic and Fishery Sciences・教授