

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370027

研究課題名(和文)ステロイドホルモンによる両生類の性決定機構の解明

研究課題名(英文)The study for the mechanism of steroid hormone-dependent sex determination in amphibians

研究代表者

中村 正久 (NAKAMURA, MASAHIKA)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：40130025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：両生類(ツチガエル)の性はステロイドホルモンによって転換する。アンドロゲン(雄化ステロイドホルモン)がはたらくにはその受容体(AR)に結合することが必要である。ツチガエルのAR遺伝子は性染色体にある。Z染色体のZ-ARは正常に発現するがW染色体のW-ARは殆ど発現しないため、Z-AR遺伝子はツチガエルの雄化に有利であると考えられる。そこで、Z-AR遺伝子を雌(ZW)胚に導入して性が転換するかどうかを調べた。その結果、Z-ARの導入により雌の性が不完全ではあるが転換し卵精巢を形成した。本研究は、脊椎動物でAR遺伝子が性決定に深く関わっていることを世界で初めて示した。

研究成果の概要(英文)：Sex of an amphibian species *Rana rugosa* can be changed from female to male or in the opposite direction by treatment of sex steroid hormones. To induce the sex-reversal, androgens must bind to its receptor. The androgen receptor (AR) gene is localized to the Z and W chromosome. The AR gene on the Z chromosome (Z-AR) is expressed normally, but W-AR is barely expressed, suggesting that this gene is probably involved in male sex determination in *R. rugosa* frogs. To prove this hypothesis, we produced transgenic frogs carrying an exogenous Z-AR. AR-transgenic female (ZW) frogs formed masculinized gonad or 'ovotestis'. Testosterone, supplied to the rearing water, completed the female-to-male sex-reversal in the AR-transgenic ZW frogs. This is the first report showing that the AR gene plays a very important role in male sex-determination in a vertebrate species.

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：組織構築 アンドロゲン アンドロゲン受容体 トランスゲニックカエル 性転換 ツチガエル

## 1. 研究開始当初の背景

ツチガエルは日本の殆どの地域で見られるカエルである。このカエルは脊椎動物では類を見ないユニークな特徴がある。その特徴とは、同種でありながら生息地域によってXY型或はZW型の性決定様式をもっているのである。現存する脊椎動物で2つの性決定様式をもつ動物は報告されていない。このカエルも他の多くの脊椎動物と同様、性染色体にある性決定遺伝子が性を決めると考えられているが、このカエルの性はステロイドホルモンによって簡単に変わる。つまり、ステロイドホルモンが性決定の主役になり得るのである。ツチガエルの祖先はアジア大陸(韓国・中国)で、大陸と日本が陸続きの頃に日本に移動したと思われる。日本では西日本、東海、関東集団がXY型で北陸・東北集団がZW型である。XY型性決定様式からZW型への移行は性染色体に起きた逆位とその後の集団間の交配によって性染色体が進化したことによると考えられている。当研究室はツチガエルの多くの遺伝子を単離して染色体マッピングを行ない、アンドロゲン受容体(AR)遺伝子、*Sox3*、*SFI*が性染色体にあることを見つけた。ARについては、Z染色体のZ-ARは発現するが、W-ARはW染色体の逆位域にあるため、性染色体進化の過程で転写調節領域の塩基配列が変異して退化し、殆ど発現しない。そのため、雄(ZZ)と雌(ZW)胚のARの発現比が2:1になることが当研究室の研究によって明らかになっている。また、ARは性決定前の雄未分化生殖腺で強く発現することも明らかにしている。これらの結果はARがツチガエルの雄決定に深く関わっていることを示唆する。

## 2. 研究の目的

研究開始当初の背景でステロイドホルモンとその受容体がツチガエルの雄決定に深く関わることが予想される。特に、哺乳類では性決定後、雄生殖腺の分化に重要な役割を果たすと考えられているARがツチガエルでは性を決める遺伝子であると考えられるため、脊椎動物の性は性決定遺伝子が決めるという通説とは別に、下等脊椎動物(ここではツチガエル)の性はステロイドホルモンとその受容体が性を決めることを実証することが本研究

の目的である。

## 3. 研究の方法

(1)研究材料:ZW型ツチガエル(北陸集団)を使用した。動物実験においては早稲田大学動物実験委員会の承認を得た。人工授精による受精卵を各発生段階まで飼育し、必要に応じて全RNAを調整後、逆転写酵素を用いてcDNAを得た。雌雄判定はAAT遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計してPCR法で行なった。

(2)分子系統樹の作成:ARの転写調節領域(1.5-kb)の塩基配列を決定し、その配列を基にUPGMA法で分子系統樹を作成した。

(3)AR発現ベクターの構築:Z-AR cDNA(2.3-kb)とZ-ARの転写調節領域(1.5-kb)或は*EF1 $\alpha$* 転写調節領域(1.7-kb)をp(*I-SceI*)DPCGベクターに組み込んだDNAコンストラクトを構築した。

(4)AR-トランスジェニックカエルの作製:  
(3)のDNAコンストラクトから*I-SceI*酵素で切断したDNA断片を得てツチガエル受精卵に注入後、変態直後までテストステロン添加或は非添加飼育水で飼育した。

(5)生殖腺における導入ARの発現解析:受精卵導入DNAコンストラクト(Z-AR/V5)の塩基配列を基にプライマーを作製し、PCR法で導入Z-ARがゲノムDNAに組み込まれているかどうかを解析した。更に、雄生殖腺で発現が上昇する*CYP17*、*Dmrt1*についても発現解析を行なった。

(6)CYP17、AR抗体の作製:CYP17及びAR蛋白質で抗原基20アミノ酸残基を選択してGST・ペプチド融合蛋白質を合成後、BALB/c雌マウスに2週間毎に3回免疫して抗血清を得た。

(7)ウエスタンブロット解析:(6)で得たCYP17及びAR抗体を通常の方法で特異性を評価した。

(8)細胞組織免疫染色法:ARトランスジェニックカエルの生殖腺とCYP17、AR抗体を用いて免疫染色を行なった。2次抗体にはAlexa Fluor 488抗ウサギ或は抗マウスIgG抗体を用いた。

## 4. 研究成果

(1)AR遺伝子の分子系統樹の作成:日本5集団と韓国1集団のツチガエルを採集してそれぞれの集団の雌雄からゲノムDNAを調整して特異的プライマーを用いて各集団のAR遺伝子の転写調節領域の塩基配列を決定した。その配列を基にUPGMA法で分子系統樹

を作成した。系統樹は AR 遺伝子を指標とすると性染色体の進化を次の様に示した。韓国の X 染色体が祖先型でそれから 2 群に分岐した。1 つのグループには、西日本集団の X 染色体、北陸（新潟と佐渡）集団の Z 染色体、東海集団の Y 染色体が含まれていた。もう 1 つのグループには、関東と東海集団の X 染色体及び北陸（新潟）集団の W 染色体が含まれていた。この結果から、韓国集団の性染色体は、北陸及び東海集団の Z, Y 染色体と W, X 染色体に進化したことを示している。性染色体の進化を分子レベルで示した世界で初めての成果である。この解析を更に進めるとツチガエルがアジア大陸からどのような経路で日本に移動・分散したかが解明できる可能性がある。

(2) AR 導入生殖腺の組織学的解析：AR 導入による生殖腺の組織学的解析を行なった。Z-AR プロモーターによる Z-AR を受精卵に導入して変態後の生殖腺を解析すると、3 つのタイプの雄化生殖腺が形成された。タイプ 1 は、1 対が共に正常卵巣の 50% の大きさをもつもの、タイプ 2 は、1 対が共に正常卵巣の 25% の大きさをもつもの、タイプ 3 は、1 対の片方が精巣の大きさ、もう片方が正常卵巣を形成した。タイプ 1 では、大部分が体細胞で卵細胞が僅かに残存していた。タイプ 2 では、卵細胞は殆ど消失し、体細胞も多くはなかった。タイプ 3 では、精巣タイプの生殖腺では卵細胞が殆ど消失していた。片方の生殖腺は表現型が正常卵巣と区別できなかった。3 つのタイプの生殖腺はどれも雄化していたが、正常精巣とは異なり卵精巣の様相を呈していた。しかし、AR トランスジェニック雌 (ZW) 胚をテストステロン添加水で飼育すると、変態後に ZZ 雄と区別ができない精巣を形成した。即ち、W 染色体の W-AR が機能不全に陥っている胚に Z-AR 遺伝子を導入して AR を過剰発現すると不完全ではあるが性転換し、飼育水にアンドロゲンを加えると完全に性転換することを見いだした。この事実は、両生類のツチガエルの雄決定にはアンドロゲンとその受容体が深く関わっていることを示している。アンドロゲン受容体 (AR) は、哺乳類では性決定に関与せず、この遺伝子をノックアウトすると雄では精子形成が停止し、雌では表現型に変化が表れないことが知られている。この研究成果は、AR が性決定に関わるこ

とを脊椎動物で初めて示したもので脊椎動物の性決定機構を明らかにする上で大いに役立つことは間違いない。

(3) AR 導入総個体数と性転換個体数：AR 導入個体の総数と性転換個体数を以下にまとめた。AR 導入受精卵数は 800 でその内、変態直後の幼若カエルまで成育した個体数は 126 個体であった。テストステロン不添加水で飼育した AR 導入及び非導入個体では、30 の雄 (ZZ) 個体は全て精巣を形成し、37 の雌 (ZW) 個体は全て卵巣を形成した。しかし、9 つの AR 導入雌 (ZW) 個体は 3 つのタイプ (前述) の卵精巣を形成した。AR 導入雌 (ZW) 9 個体は不完全ながら雌から雄に性が転換した。不完全な性転換を示す AR 導入個体をテストステロン添加水で飼育すると、12 の AR 導入雌 (ZW) 個体の全てが雄 (ZZ) 個体の精巣と区別できない完全な精巣を形成した。

(4) 導入 AR の PCR 法による発現解析：不完全ながら性転換した 3 タイプの個体は全てゲノム DNA に Z-AR/V5 遺伝子が導入され発現していた。面白いことに、片方が卵精巣でもう一方が正常卵巣を形成したタイプ 3 では、ゲノム中に Z-AR/V5 遺伝子が導入されていたが発現はしていなかった。また、生殖腺の精巣形成では、CYP17、Dmrt1 の発現が促進するが、卵精巣を呈する生殖腺でいずれも発現が高くなった。卵巣に分化する生殖腺ではこれらの遺伝子の有意な発現は見られなかった。タイプ 3 の卵巣でも CYP17 と Dmrt1 の発現は見られなかった。テストステロン添加水で飼育した AR 導入雌 (ZW) 個体が形成した精巣でも CYP17 と Dmrt1 の発現が促進した。

(5) AR、CYP17 抗体の作製：AR と CYP17 抗体を作製してウエスタンブロット法による抗体の特異性を検討した。その結果、それぞれ分子量に相当する 86kDa と 56kDa の位置に単一バンドが観察された。AR 抗体は、幼若及び成体精巣では体細胞と一部の生殖細胞の核に AR 蛋白質の局在を示した。また、CYP17 抗体は体細胞の細胞質に CYP17 蛋白質の局在を示していた。これらの結果は作製した抗体いずれも特異性が高く免疫染色を行なうには全く問題がない。

(6) AR 導入生殖腺の細胞組織免疫学的解析：AR、CYP17、laminin、Vasa 抗体を使用し、AR を導入した不完全及び完全性転換個体の生殖腺切片を用いて免疫染色を行なった。その結果、不完全ではあるが性転換した卵精巣では、AR と CYP17 蛋白質が発現

した。卵巣ではこれらの蛋白質は殆ど観察されなかった。また、Vasa 抗体を用いて生殖細胞の分布を調べると、卵精巣では卵巣に見られる多くの卵細胞が消失すること、また卵細胞の消失と共に精巣で見られる小型生殖細胞が存在することも判明した。

(7)AR と GFP 蛋白質の共発現：ツチガエル *EF1α*プロモーターを用いて Z-AR/GFP 発現ベクターを作製して受精卵に導入後、変態直後期まで胚を飼育して生殖腺を解析した。部分的性転換をした生殖腺では、AR 及び GFP を共発現している体細胞が見られた。このことは、Z-AR 導入卵精巣では確かに AR 蛋白質が発現していることを GFP をモニターとして確認した。以上、

これらの結果は、少なくとも両生類（ツチガエル）では、雄決定にアンドロゲンとその受容体（AR）が深く関わっていることを、脊椎動物で実証した世界で初めの研究である。

#### 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)

1. Jun Fujii, Maho Kodama, Akira Oike, Yasuki Matsuo, Mi-Sook Min, Takashi Hasebe, Yasuki Matsuo, Atsuko Ishizuya-Oka, Koichi Kawakami, Masahisa Nakamura. Involvement of androgen receptor in sex determination in an amphibian species. Plos ONE 2014, in press.

2. Mari Suda, Maho Kodama, Daiki Sakamoto, Takehiro Iwasaki, Yasuki Matsuo, Yoshinobu Uno, Yoichi Matsuda, Yoriko Nakamura, Shun Maekawa, Masahisa Nakamura. Molecular cloning and characterization of anti-Müllerian hormone (AMH) from *Rana rugosa* frogs. Endocrinology 2014, in press.

3. Masahisa Nakamura. Is a sex-determining gene necessary for sex determination in amphibians? —Steroid hormones may be the key factor (Review). Sex Dev 7 (2013) 104-114.

4. Thiparpa Aime Thamamongood, Ryo Furuya, Masahisa Nakamura, Nobuo Suzuki, Atsuhiko Hattori. Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and

autotransplantation of goldfish scale: a new tool to study intramembranous bone regeneration. Bone 50 (2012) 1240-1249.

5. Mari suda, Yoshinobu Uno, Yumiko Mori, Yoichi Matsuda, Masahisa Nakamura. Molecular cytogenetic characterization of telomere-specific repetitive DNA sequences in *Rana rugosa*. J Exp Zool 315A (2011) 222-231.

6. Mari Suda, Maho Kodama, Yuki Oshima, Kazutoshi Yamamoto, Yoriko Nakamura, Shigeyasu Tanaka, Masahisa Nakamura. Up-regulation of *FSHR* expression during gonadal sex determination in the frog *Rana rugosa*. Gen Com Endocrinol 172 (2011) 475-486.

7. Tomoko Isomura, Shogo Haraguchi, Kaoru Miyamoto, Kazuyoshi Tsutsui, Yoriko Nakamura, Masahisa Nakamura. Estrogen biosynthesis in the gonad of the frog *Rana rugosa*. Gen Com Endocrinol 170 (2011) 207-212.

8. N Suzuki, J.A. Danks, Y. Maruyama, M. Ikegame, Y. Sasayama, A. Hattori, M. Nakamura, M.J. Tabata, T. Yamamoto, R. Furuya, K. Saijoh, H. Mishima, A.K. Srivastav, Y. Furusawa, T. Kondo, Y. Tabuchi, I. Takasaki, V.S. Chowdhury, K. Hayakawa, T.J. Martin. Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. Bone 48 (2011) 1186-1193.

9. Mari Suda, Yoshinobu Uno, Jun Fujii, Yoichi Matsuda, Masahisa Nakamura. Isolation and characterization of the *CYP17* genes and its pseudogene in *Rana rugosa*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 160 (2011) 54-61.

10. Kazuhiro Saotome, Tomoko Isomura, Tatsunori Seki, Yoriko Nakamura, Masahisa Nakamura. Structural changes in gonadal basement membranes during sex differentiation in the frog *Rana rugosa*. J Exp Zool 313A (2010) 369-380.

11. Masahisa Nakamura. The mechanism of sex determination and differentiation in amphibians – Are sex steroids a key factor? – (Review). J Exp Zool 313A (2010) 381-398.

12. Kazuhiro Saotome, Kota Hayashi, Noritaka Adachi, Yoriko Nakamura, Masahisa Nakamura. Isolation and characterization of Vasa in the frog *Rana rugosa*. J Exp Zool 311A (2010) 452-459.

〔雑誌論文〕（計 12 件）

〔学会発表〕（計 9 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

中村正久 (67)

研究者番号：40130025

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

松田洋一 (59)

研究者番号：70165835

長谷部 孝 (41)

研究者番号：70329027