

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07138

研究課題名(和文)アンドロゲン応答形質の多様化と適応の分子生物学的基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of androgen dependent sex characteristics development and evolution

研究代表者

荻野 由紀子(Ogino, Yukiko)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00404343

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文): アンドロゲンは脊椎動物において、二次性徴を誘導し雄性形質を特徴付けている。本研究では真骨魚類アンドロゲン受容体(AR)遺伝子の進化過程およびAR遺伝子重複の生物学的意義について解析した。その結果、真骨魚類の系統特異的に起きたゲノム倍数化によるAR₁/AR₂への重複、AR₂の新機能の獲得と真骨魚類の多様な雄性形質発現との間に関連性を見出した。AR₁は闘争形質、AR₂は繁殖に必要な外部形態発現に必須の役割を示すなど、生体内における機能の相違が明らかとなった。AR₂は新真骨魚類の系統で高度に保存されており、多様な二次性徴を生み出す一つの重要な原動力(遺伝的背景)となった可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文): Steroid hormone receptor genes are thought to have arisen from gene duplication (WGD). However, the molecular events which produce new protein functions have not been fully understood. Teleosts present a good model to investigate the evolutionary history of protein function after WGD, because the teleost-specific WGD (TSGD) resulted in a variety of duplicated genes that exist in modern fishes. We focused on the androgen receptor (AR) gene, since AR₁ and AR₂ were generated in the TSGD. We identified the substitutions that led to changes in protein function between AR₁ and AR₂. One substitution located within ligand binding domain is sufficient for generating higher transactivation of AR₂, which modifies the hydrogen bonds between ligand and AR. Analyses using AR mutant medaka revealed the different contribution of two AR subtypes for masculine phenotypes. Our findings would provide an historical explanation for the retention of the duplicated AR copies in euteleost genome.

研究分野：分子生物学、内分泌学、進化発生学

キーワード：アンドロゲン 二次性徴 ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲンは、内外生殖器、性淘汰に関わる多様な二次性徴を誘導し、脊椎動物の雄としての形質を特徴付けている。すなわちアンドロゲンは、性決定、内性器の分化に続く、個体の性の確立の最終段階を担う実行因子である。雄性形質の多様性は多彩な繁殖戦略を可能とし、多様な生物種の確立を導いたと考えられる。

真骨魚類は有顎類の中で最も多様化した系統であり、鰭の交接器への変化、体色変化、筋分化、歯の構造変化など、多様な二次性徴を呈する。真骨魚類の系統で特異的に起きたゲノム倍数化による遺伝子数の増加、新機能の獲得が真骨魚類の繁栄を導いたと考えられている。よって分子進化と形質進化との関連性を解析する上で、真骨魚類は興味深い対象であるが、多様な二次性徴発現の遺伝的背景、雄性形質発現の分子機構の詳細は未だほとんど未解明である。

我々は、アンドロゲンシグナルの担い手であるアンドロゲン受容体(AR)の分子進化解析から、真骨魚類は、系統特異的に生じたゲノム倍数化により、2分子種のAR遺伝子を有しており、これら2分子種AR遺伝子は、進化速度が大きく異なり、進化速度の速いARは、リガンド非依存的な核移行、ARや四肢動物のARより極めて高い転写活性化能を示すなど、ユニークなARとして真骨魚類の系統で進化していることを見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、多様な二次性徴を呈する真骨魚類をモデルに1)AR遺伝子の重複、分子進化と多様な二次性徴との関連性、及び多様な雄性形質発現の遺伝的背景として、AR遺伝子重複の意義を解明することを目的とした。さらに、2)雄性形質発現の分子基盤となるアンドロゲン応答の分子機構の解明、3)二次性徴発現機構を、複数の非モデル真骨魚類と比較解析し、性ホルモンによる生物多様性の根源的理解を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)真骨魚類遺伝子ARの高い転写活性と核内局在を導いたアミノ酸置換をCos7細胞を用いたレポーターアッセイから明らかにするとともに、真骨魚類におけるAR遺伝子の進化過程・機能の保存性を解明する。

(2)真骨魚類2分子種AR遺伝子の生体内における機能の相違をメダカARおよびAR変異体を用いて、二次性徴、性分化を中心とした外部二次性徴についての表現型解析、および繁殖行動解析から明らかにする。

(3)メダカおよび複数の非モデル真骨魚類であるカダヤシやソードテールフィッシュを用いた二次性徴発現メカニズムの比較解析から、アンドロゲン-AR遺伝子による多様

な雄性形質発現の分子基盤を明らかにする。

4. 研究成果

(1)メダカのAR₁、AR₂のドメイン交換、変異挿入による機能解析により、AR₁に特異的な核への局在および高い転写活性は、それぞれのARのヒンジ領域のアミノ酸置換(AR₁のグリシンから、AR₂ではリシンに置換)、リガンド結合領域のアミノ酸置換(AR₁のフェニルアラニンから、AR₂ではチロシンに置換)に起因することが明らかになった。ARへの11-ケトテストステロン(11KT)の結合を、コンピュータシミュレーションにより解析すると、AR側の11KTとの結合に重要なアミノ酸側鎖と、11KTとの水素結合の数が、リガンド結合ドメインのアミノ酸置換により変化することが予測された。このフェニルアラニンからチロシンへのアミノ酸置換は、ARが同定された真骨魚類の中で、ゲノム倍数化後早い段階で分岐したとされているウナギ目を除く、すべての系統で保存されていた。実際に、ニホンウナギではAR₁とAR₂の転写活性に大きな差はみられなかったが、リガンド結合領域のアミノ酸置換を人為的に導入すると、ニホンウナギのAR₁、AR₂ともに転写活性が増大した(図1)。

従って、AR₁のユニークな機能は、ゲノム倍数化後ただちに獲得されたものではなく、ウナギ目が分岐した後で、リガンド結合ドメインに生じたアミノ酸置換に起因して獲得されたと考えられました。

推定されるアミノ酸置換のタイミングには次の2つの仮説が想定された(図2)。

ウナギ目が分岐した後、ニシン・骨鰾類(注1)が分岐する前に起きたが、コイ目、ナマズ目、サケ目では選択されることなく喪失した。

サケ目が分岐した後の正真骨魚類(注2)の系統と、ニシン・骨鰾類の中でカラシ目目の系統で独立に起き、このアミノ酸置換の起きなかったコイ目、ナマズ目、サケ目のAR₁は二次的に失われた。

真骨魚類はゲノム倍数化後の多くの系統が現生している。系統間の比較・機能解析から、いつどのような変異が起きて新たな機能をもったARが生じたのか、具体的な進化の道のりが明らかとなった。

注1: 真骨魚類の系の中で、アロワナなどのオステオグロッサム類、ウナギなどのカラシ目類が分岐した後現れたグループ。メダカやフグなどの正真骨魚類のグループより前に分岐したニシン、ナマズ、コイ、ゼブラフィッシュなどを含む約8,000種からなるグループ。

注2: 真骨魚類の中で、サケ、フグ、メダカなどを含む最も多様なグループ。約17,000種からなる。

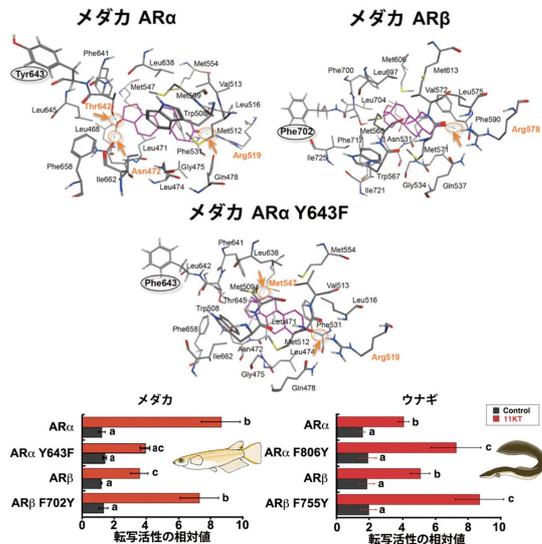


図1：真骨魚類の2種 AR の機能の相違をもたらしたアミノ酸置換

メダカ AR は3本、AR は1本の水素結合でアンドロゲンと結合しており、AR のアンドロゲン結合ドメイン上のアミノ酸をチロシン Tyr(Y)から AR とヒトやマウスなどの AR で保存されているフェニルアラニン Phe(F)に置き換えると、水素結合の数が減ることがコンピュータシミュレーションによって予測された。レポーターアッセイから、AR と AR の転写活性は、このアミノ酸置換によって切り替わることが明らかとなった。一方で、このアミノ酸置換がまだ起きていないニホンウナギ AR と AR に人為的にアミノ酸置換を挿入すると、メダカ AR と同様の高い転写活性が誘導された。

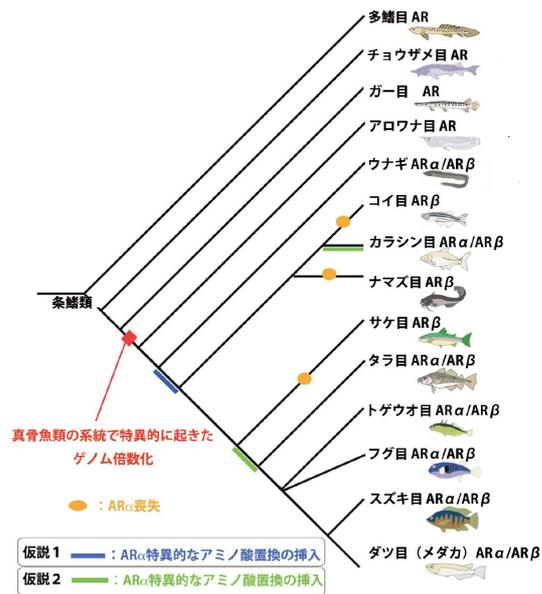


図2：真骨魚類 AR 遺伝子の進化過程

AR は真骨魚類の系統で起きたゲノム倍數化により2種に重複した。ウナギ目が分岐した後に生じたアミノ酸置換によって、AR 特異的な転写活性が獲得された。ゼブラフィッシュやナマズ、ニジマスでは AR が存在せず二次的に喪失したと考えられる。推定される

アミノ酸置換のタイミングには2つの仮説(本文中に示した)が想定される。

(2)メダカのアンドロゲン受容体(AR および AR)の遺伝子変異体は、メダカ TILLING library (杏林大学 谷口善仁教授作製、メダカ ナショナルバイオリソースプロジェクト(基礎生物学研究所 成瀬清教授提供)から単離した。AR , AR とともに LBD の大部分を欠損する変異体を得た。一塩基置換によるナンセンス変異によりリガンド結合ドメインのN末端部にストップコドンが現れる。野性型個体とのバッククロスで F6 世代まで行い、解析には F6 世代以降の雌雄の交配によって得られたホモ変異個体(4ヶ月から8ヶ月齢)を用いた。

雄の外部形態について詳細な解析を進めた結果、AR 変異体雄は闘争に必要な歯の雄性化が抑制され、AR 変異体雄は、抱接に必要な尻鰭の乳頭状小突起や背鰭のフォークが欠損していることが明らかとなった。

一方、雄に特徴的な円舞の回数は、AR , AR 変異体ともに野性型雄と同等であり、繁殖が可能であった。しかし、野性型雌と交配を開始後、産卵放精に至るまでの時間は、野性型雄よりも長く要した。雌に対する性的モチベーションを雌雄間距離として、ビデオトラッキングにより測定したところ、AR 変異体雄は、野性型雄と同等であったが、AR 変異体雄は雌との距離を長くとする傾向を示し、AR を介したシグナリングが雄の性的モチベーションの維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

続いて、AR , AR 変異体雄と野性型雌を交配した際の受精率を測定した結果、ともに野性型雄と比べて低く、精巣機能に異常があることが予想された。野性型個体と比べ、AR 変異体雄では精子数が極めて多く、AR 変異体雄では少なかった。しかし、精子運動解析装置 CASA を用いた解析からは、精子運動能には大きな異常は認められなかった。また、AR , AR 二重変異体雄においても成熟した精子が観察された。しかし、雄性行動が欠損し、鰭や歯の形態も脱雄性化していた。

以上のことから、AR は雄の闘争形質の発現や性的モチベーションの維持に、AR は抱接に必要な外部形態の発現にドミナントに機能していると考えられた。繁殖に必須の雄性行動については、双方が補償的に働いており、精子分化には、AR は必須ではないことが明らかとなった。AR , AR 変異体に見られる表現型の相違が、双方の発現領域あるいは、転写活性の相違によるものであるのか、まだ明確ではなく、AR , AR の遺伝子発現量や発現局在の変化を慎重に解析していく必要がある。

(3)メダカおよびカダヤシの尻ヒレで二次性徴形質発現に必須のシグナルとして同定した Wnt- カテニンシグナリング、Shh につ

いてソードテールフィッシュのソード形成過程に果たす役割を比較解析した。これらの因子はソードの伸長に必須の役割を果たすのみならず、メラポフォアの分化・増殖に関わっているなど、生物種を超えた、アンドロゲンエフェクターの保存性と機能の相違を見出した。

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 11 件)すべて査読有

Ogino Y, Tohyama S, Kohno S, Toyota K, Yamada G, Yatsu R, Kobayashi T, Tatarazako N, Sato T, Matsubara H, Lange A, Tyler CR, Katsu Y, Iguchi T, Miyagawa S.: Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018 accepted.

Matsushita S, Suzuki K, Murashima A, Kajioka D, Acebedo A, Miyagawa S, Haraguchi R, Ogino Y, Yamada G
Frontiers in the regulation: androgen signaling in the developing external genitalia
Nat Rev Urol (2018) in press

Tohyama S, Ogino Y, Lange A, Myosho T, Hirano Y, Yamada G, Sato T, Tatarazako N, Tyler CR, Iguchi T, Miyagawa S
Estrogen receptor 1 is dispensable for sexual development and reproduction in Medaka, *Oryzias latipes*
Dev Growth Differ (2017) 59, 552-561
doi: 10.1111/dgd.12386

Tohyama S, Miyagawa S, Lange A, Ogino Y, Mizutani T, Ihara M, Tanaka H, Tatarazako N, Kobayashi T, Tyler CR, Iguchi T
Evolution of estrogen receptors in ray-finned fish and their comparative responses to estrogenic substances. J Steroid Biochem Mol Biol (2016) 158, 187-197
doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.12.009.

Matsushita S, Suzuki K, Ogino Y, Hino S, Sato T, Suyama M, Matsumoto T, Omori A, Inoue S, Yamada G
Androgen regulates Mafb expression through its 3' UTR during mouse urethral masculinization. Endocrinology (2016) 157, 844-857

doi: 10.1210/en.2015-1586.

Ogino Y, Kuraku S, Ishibashi H, Miyakawa H, Sumiya E, Miyagawa S, Matsubara H, Yamada G, Baker ME, Iguchi T
Neofunctionalization of androgen receptor by gain-of-function mutations in teleost fish lineage. Mol Biol Evol (2016) 33, 228-244
doi: 10.1093/molbev/msv218

Miyagawa S, Yatsu R, Kohno S, Doheny BM, Ogino Y, Ishibashi H, Katsu Y, Ohta Y, Guillette LJ Jr, Iguchi T
Identification and characterization of the androgen receptor from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. Endocrinology (2015) 156, 2795-2806
doi: 10.1210/en.2015-1037.

Bain PA, Kumar A, Ogino Y, Iguchi T
Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray-Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta
Aquat Toxicol (2015) 163, 97-101
doi: 10.1016/j.aquatox.2015.03.021.

Tohyama S, Miyagawa S, Lange A, Ogino Y, Mizutani T, Tatarazako N, Katsu Y, Ihara M, Tanaka H, Ishibashi H, Kobayashi T, Tyler CR, Iguchi T
Understanding the molecular basis for differences in responses of fish estrogen receptor subtypes to environmental estrogens. Environ Sci Technol (2015) 49, 7439-7447
doi: 10.1021/acs.est.5b00704.

Miyagawa S, Lange A, Tohyama S, Ogino Y, Mizutani T, Kobayashi T, Tatarazako N, Tyler CR, Iguchi T
Characterization of *Oryzias latipes* glucocorticoid receptors and their unique response to progestins. J Appl Toxicol (2015) 35, 302-309
doi: 10.1002/jat.3020.

Bain PA, Ogino Y, Miyagawa S, Iguchi T, Kumar A
Differential ligand selectivity of androgen receptors and from Murray-Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*)
Gen Comp Endocrinol (2015) 212, 84-96

〔学会発表〕(計 14 件)

Yukiko Ogino (Plenary lecture), Hiroataka Sakamoto, Eiji Watanabe and Taisen Iguchi: Diversification of androgen receptor function underlies secondary sex characteristics development of teleost fishes. 4th Strategic Meeting for Medaka Research, 3rd Regional Fish Meeting (2018, 4月16日から4月18) Heidelberg University (Heidelberg, Germany)

荻野由紀子(招待講演) 坂本浩隆、井口泰泉:真骨魚類をモデルとしたアンドロゲンによる雄性形質発現・生理作用の分子機構解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)(2017年12月6日~12月9日) 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

荻野由紀子(招待講演) 井口泰泉:魚類の多様な雄性形質発現の分子機構. 第27回日本行動神経内分泌研究会(2017年4月28日~4月30日) 牛窓研究センターカリヨンハウス(岡山県瀬戸市)

Ogino Y, Kuraku S, Ishibashi H, Miyakawa H, Yasugi M, Watanabe E, Kamei Y, Iguchi T: Functional and evolutionary analyses of androgen receptor gene in teleost fishes: Molecular basis of diversified sex characteristics development. 22nd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting(2016年8月20日~8月21日)、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

荻野由紀子、井口泰泉:真骨魚類の多彩な二次性徴形質発現の分子機構“メダカ、卵胎生魚類カダヤシ、ソードテールフィッシュを用いた比較解析”. 第二回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会(2016年8月21日~8月22日) 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Ogino Y (招待講演), Iguchi T: Evolutionary diversification of androgen dependent sex characteristics development in teleost fishes. 22nd International Congress of Zoology 及び日本動物学会第75回大会合同大会(2016年11月4日~11月9日) 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Yukiko Ogino, Shigehiro Kuraku, Hiroshi Ishibashi, Masaki Yasugi, Eiji Watanabe, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Taisen Iguchi: Functional analysis of androgen receptor gene in medaka: Insights into the diversified sex characteristics development in teleost fishes. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research (2016年3月18、19日)、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Yukiko Ogino, Shigehiro Kuraku, Hiroshi Ishibashi, Masaki Yasugi, Eiji Watanabe, Yasuhiro Kamei, Shinichi Miyagawa, Taisen Iguchi: Structural and functional differences of two distinct paralogs of androgen receptor in medaka. 第40回日本比較内分泌学会大会/日本比較生理生化学会第37回大会合同大会(2016年12月11日~12月13日)、JMS アステールプラザ(広島県広島市)

Yukiko Ogino(招待講演), Shigehiro Kuraku, Hiroshi Ishibashi, Masaki Yasugi, Eiji Watanabe, Yasuhiro Kamei, Hiroataka Sakamoto, Tatsuya Sakamoto, Gen Yamada, Taisen Iguchi: Diversified sex characteristics development in teleost fishes: Implication for evolution of androgen receptor (AR) gene function. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会(2015年12月01日~12月04日) 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Yukiko Ogino, Shigehiro Kuraku, Hiroshi Ishibashi, Hitoshi Miyakawa, Shinichi Miyagawa, Gen Yamada, Michael E. Baker, Taisen Iguchi: Neofunctionalization of androgen receptor by gain-of-function mutations in teleost fish lineage. The 63rd NIBB Conference “Environment to Bioresponse”(2015年11月30日~12月2日)、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

荻野由紀子:真骨魚類の多彩な性的二型“アンドロゲンによるオスの二次性徴”. 萌える生物学(小型魚類研究会サテライトシンポジウム)(2015年09月21日~09月21日) 大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)

荻野由紀子、工樂樹洋、宮川一志、八杉公基、渡辺英治、亀井保博、坂本浩隆、坂本竜哉、宮川信一、井口泰泉：真骨魚類 AR 遺伝子の分子進化と雄性形質発現に果たす役割。第 86 回日本動物学会 (2015 年 09 月 17 日～2015 年 09 月 19 日)、新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

荻野由紀子、井口泰泉：真骨魚類の多彩な繁殖戦略をもたらした内分泌応答形質の多様化と適応 “卵胎生魚類カダヤシ、ソードテイルフィッシュを用いた解析”。ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会 (2015 年 08 月 18 日～08 月 19 日)、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Yukiko Ogino, Shigehiro Kuraku, Hiroshi Ishibashi, Hitoshi Miyakawa, Shinichi Miyagawa, Gen Yamada, Michael E. Baker, Taisen Iguchi: Gain of function mutations in two paralogous Androgen receptor (AR) genes of teleosts: Implications for evolution of AR gene function. 48th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (2015 年 6 月 2 日～6 月 5 日)つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

〔図書〕(計 5 件)

村嶋亜紀、荻野由紀子：泌尿生殖系器官の形成。日本動物学会〔編〕『動物学の百科事典』丸善出版(株)2019 8 月刊行予定

Ogino, Y, Gen Yamada, Taisen Iguchi: Diversified sex characteristics developments in teleost fishes: Implication for evolution of androgen receptor (AR) gene function. Springer Special Book "Zebrafish, Medaka, and Other Small Fishes - New Model Animals in Biology, Medicine, and Beyond", in press. 2018 8 月刊行予定(分担執筆)

Ogino Y, Sebillot A, Miyagawa S, Tatarazako N, Iguchi T: Detection of androgenic and anti-androgenic chemicals using medaka. Medaka. Book, in press. (分担執筆)

Iguchi T, Ogino Y, Miyagawa S, Yatsu R, Tatarazako N.: Applied Toxicity Tests for Endocrine Disruptors. Medaka Book, in press. (分担執筆)

Ogino Y, Sato T, Iguchi T: Gonadal

Steroids. In: Handbook of Hormones-Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research-, pp.504-506, 509-519, 583-584 Takei Y, Ando H, Tsutsui K (Eds), Elsevier Academic Press, 2015. (分担執筆)

〔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
荻野 由紀子 (OGINO, YUKIKO)
九州大学農学研究院・准教授
研究者番号：00404343

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
山田 限 (YAMADA, GEN)
和歌山県立医科大学 先端医学研究所
・教授
研究者番号：80174712

渡辺 英治 (WATANABE, EIJI)
研究者番号：30250252
基礎生物学研究所 神経生理学研究室
・准教授

猪早 敬二 (INOHAYA, KEIJI)
研究者番号：70302958
東京工業大学 生命理工学研究所・助教

(4) 研究協力者
なし