

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 16 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008~2011

課題番号：20247004

研究課題名 (和文) 性ホルモンによる卵巣分化誘導の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular Mechanisms of ovarian differentiation induced by sex hormones

研究代表者

長濱 嘉孝 (NAGAHAMA YOSHITAKA)

基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門・特任教授

研究者番号：50113428

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：分科 (基礎生物学)、細目 (形態・構造)

キーワード：卵巣分化、エストロゲン/エストロゲン受容体、R-spondin1、減数分裂開始、魚類、遺伝子ノックダウン (RNAi)、C21 ステロイド、17 α , 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン

1. 研究計画の概要

脊椎動物における卵巣分化の制御メカニズムに関する研究は、哺乳類ではまだ遅れており、魚類を対象とした研究が進んでいる。研究代表者の長濱らは、芳香化酵素阻害剤を用いてエストロゲン合成を抑制させたティラピアの生殖腺形成を詳しく解析することにより、魚類の卵巣分化にエストロゲン (エストラジオール-17 β) が不可欠であることを明らかにしてきた。また、C21 ステロイド、特に長濱らが卵成熟誘起ホルモンとして世界に先駆け魚類で同定した 17 α , 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) が生殖細胞の減数分裂開始にも重要な役割を果たしている可能性を示唆した。そこで本研究では、魚類 (メダカとティラピア) の卵巣分化時における性ホルモン、特にエストロゲンと DHP の作用機構を細胞・分子 (遺伝子) レベルで明らかにすることを目指す。

2. 研究の進捗状況

性ホルモンによる卵巣分化誘導の分子機構について、(1) エストロゲンの作用機構、

(2) C21 ステロイドの作用機構、について解析した。

(1) エストロゲンの作用機構：

メダカの卵巣から 3 種のエストロゲン受容体 (ER) と R-spondin1 の遺伝子をクローニングするとともに、ER β と R-spondin1 が卵巣分化時の XX 生殖腺で特異的に発現することを見出した。また、XY 胚をエストラジオール-17 β で処理することにより生殖腺における ER β と R-spondin1 の発現が著しく増加した。さらに、ER β 遺伝子と R-spondin1 遺伝子のノックダウンが遺伝的雌 (XX) メダカの生殖

腺を精巣に性転換させることを見出した。これらの結果から、エストロゲンは未分化生殖の卵巣への性分化に重要な役割を果たし、その作用に ER β や R-spondin1 が密接に関与していることが示唆される。

(2) C21 ステロイドの作用機構：

長濱らは先に、DHP を含む C21 ステロイドの生成に必要なステロイド代謝酵素である P450c17 遺伝子は魚類には 2 種 (P450c17-I と P450c17-II) 存在することを明らかにした。本研究では、このうち P450c17-I は雌雄生殖腺に関係なく孵化後 5 日以降に発現がみられたが、P450c17-II の発現は雌雄生殖腺ともに最初の発現時期が生殖細胞の減数分裂の開始時期とほぼ一致した。従って、P450c17-II は生殖細胞における減数分裂開始に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。次いで、DHP の減数分裂開始における役割を解析する目的で、受精直後の XY メダカを DHP を含む飼育水中で孵化後 20 日まで飼育して減数分裂開始のタイミングが早まるかを調べようとしたが、処理魚のほとんどが死滅した。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

(1) メダカを用いて、エストロゲンによって誘起される卵巣分化に ER β と R-spondin1 が重要な役割を果たすことをはじめ明らかにすることができた。

(2) さらに上記の研究の過程で、遺伝子破壊の影響を一生涯にわたって解析できる遺伝子ノックダウン (RNAi) 法を開発することに成功した。

4. 今後の研究の推進方策

(1) DHP の卵巣分化や減数分裂開始に果す機能をさらに詳細に解析するために、DHP の生成に不可欠なステロイド代謝酵素である 20 β -HSD の遺伝子をメダカ等の数種の魚類の卵巣から単離し、特定する。

(2) ER β 2 遺伝子や R-spondin1 遺伝子の破壊（ノックダウン）の影響についての新規データを論文として公表する。

5. 代表的な研究成果

(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)

- ① Paul-Prasanth, B., Shibata, Y., Horiguchi, R. and Nagahama, Y., Exposure to diethylstilbesterol during embryonic and larval stages of medaka fish (*Oryzias latipes*) leads to sex reversal in genetic males and reduced gonad weight in genetic females, *Endocrinology*, 152, 707-717 (2011), 査読有.
- ② Charkraborty, T., Shibata, Y., Zhou, L.Y., Katsu, Y., Iguchi, T. and Nagahama, Y., Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*, *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 47-54 (2011), 査読有.
- ③ Charkraborty, T., Katsu, Y., Zhou, L.Y., Miyagawa, S., Nagahama, Y. and Iguchi, T., Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: An in vitro-in vivo correlation, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 123, 115-121 (2011), 査読有.
- ④ Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yan, Z.W., Zhao, H.B. and Nagahama, Y., Homology-modeled ligand-binding domains of medaka estrogen receptors and androgen receptors: a model system for the study of reproduction, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 380, 115-121 (2009), 査読有.
- ⑤ Nakamoto, M., Muramatsu, S., Yoshida, S., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N., Gonadal sex differentiation and expression of *Sox9a2*, *Dmrt1*, and *Foxl2* in *Oryzias luzonensis*, *Genesis*, 47, 289-299 (2009), 査読有.
- ⑥ Kobayashi, T. and Nagahama, Y., Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia, *Sex. Dev.*, 3, 108-117 (2009), 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nagahama, Y., Sex determination and sexual plasticity in fish, Satellite International Symposium in Reproductive Biology of Aquatic Organisms – Researches from the Tropical to Temperate Zone, June 2010, Motobu, Okinawa, Japan.
- ② Nagahama, Y., Sex determination, Howard Bern Symposium: Recent Advances in Comparative Endocrinology, March 2010, Berkeley, California, USA.
- ③ Nagahama, Y., Sexual plasticity in fish, Fifth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination (Opening Lecture), April 2009, Kona, Hawaii, USA.
- ④ 長濱嘉孝, 魚類の性決定・性分化とステロイドホルモン, 日本動物学会第 79 回大会シンポジウム, 2008 年 9 月, 福岡.

[図書] (計 1 件)

- ① Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., and Nagahama, Y., Sex determination in fishes, in “Hormones and Reproduction of Vertebrates” Vol.1, pp. 1-14 (2011).