

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02522

研究課題名(和文) エストロゲンによる性の可逆性の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for sex plasticity by estrogen

研究代表者

宮川 信一 (Miyagawa, Shinichi)

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・准教授

研究者番号：30404354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：メダカにおいて発生期にエストロゲンやエストロゲン作用を持つ化学物質が作用するとオスからメスへの性転換が起きる。また成魚においても、精巣中に卵が発生したり(精巣卵)、肝臓では卵黄・卵膜タンパク質(ビテロジェニンやコリオジェニン)を産生するようになる。本研究ではエストロゲンによる精巣卵形成や、肝臓におけるビテロジェニンやコリオジェニン遺伝子発現に寄与するエストロゲン受容体(ESR)サブタイプを同定した。また、タグ付きESRを発現するメダカを作成・利用し、ESRのクロマチンへの結合動態を解析する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体レベルでのエストロゲン作用の理解は、これまでERノックアウトマウスの知見が集積している哺乳類に限られてきた。本研究は申請者らが作出した遺伝子改変メダカを用いて、性を制御する主要なシグナル因子としてのエストロゲンの分子機構について検討した。その成果は、メダカだけでなく、他の真骨魚類におけるエストロゲン作用の理解と、脊椎動物全体における多様な性決定・性分化機構や生殖様式との関連性解明にも貢献するものである。また、エストロゲン作用をもつ環境化学物質による、生体への悪影響の発生メカニズムの理解にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Exposure to estrogens or estrogenic endocrine disrupting chemicals (EDCs) during early development can induce male-to-female sex reversal in medaka. In addition, estrogens and EDCs also induce testis ova and ectopic vitellogenin/choriogenin gene expression in the adult male liver. In this study, we identified the estrogen receptor (ESR) subtypes that contribute to estrogen-induced testis ova formation and hepatic vitellogenin/choriogenin gene expression. In addition, we established a method for analysing the kinetics of ESR binding to chromatin using genetically modified medaka expressing a 3xflag-tagged estrogen receptor.

研究分野：発生内分泌学

キーワード：性分化 メダカ エストロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

動物の性は、哺乳類の *Sry* やメダカの *Dmy* などの性決定遺伝子を頂点とする頑強なシステムによって成立していると理解されている。一方で、メダカでは発生期にエストロゲンやエストロゲン作用を持つ化学物質が作用するとオスからメスへの性転換が起きる。また成魚においても、精巢中に卵が発生し(精巢卵)、肝臓では卵黄・卵膜タンパク質(ピテロジェニンやコリオジェニン)を産生するようになる。すなわち、性には可逆性があり、さらにその程度は動物種間で異なり、例えばヒトを含む哺乳類では、魚類のそれと比べて相対的に低いと考えられる。

性決定・分化、生殖活動の適切な制御には、エストロゲンをはじめとする性ホルモンが大きく寄与する。多くの脊椎動物では、エストロゲン受容体 (*Esr*) には *Esr1* と *Esr2* の2つのサブタイプ(パラログ)が存在し、特にノックアウトマウスの解析から、*Esr1* が生殖活動において中心的な役割を担っていることが示唆されてきた。一方で、メダカを含む現生魚類の大部分を占める真骨魚類は、系統特異的な全ゲノム倍数化に伴い、3種類の *esr* サブタイプ(*esr1*, *esr2a*, *esr2b*) を有している。これにより、哺乳類とは異なる *Esr* の機能分化を促進され、真骨魚類における性の可逆性や生殖戦略の多様性をもたらした原動力の一つになっていると推測されるが、真骨魚類の各 *Esr* サブタイプの機能分化や生理作用の差異についての理解はほとんど進んでいない。また、メダカに対するエストロゲンのさまざまな内分泌かく乱作用が、それぞれどの *Esr* サブタイプによって介して生じるものかもわかっていない。そのため、どの *Esr* サブタイプを介して性転換やメス化に関わる遺伝子が発現制御されているか不明である。

## 2. 研究の目的

多くの研究者が、様々な動物で異なる多様な性決定遺伝子を同定し、さらにその下流で起きる生殖腺分化を詳細に解析している。また、その性決定遺伝子がどのように獲得されるに至ったかを進化学的に探る研究も行われている。その一方で、魚類などで見られる性転換を含むメス化現象は、性決定遺伝子による性決定後に、ホルモンバランス等の変化によって起きる特殊な現象として捉えられてきた。本研究ではまず、生体レベルで *Esr* の役割と機能を明らかにすることを目的とした。メダカがもつ3分子種の *esr* 遺伝子をそれぞれノックアウト (KO) したメダカを利用し、メス化現象に寄与する *Esr* サブタイプを決定する。さらに、*Esr* の転写制御メカニズムをクロマチンレベルで明らかにするため、肝臓におけるピテロジェニンやコリオジェニン遺伝子の発現制御についてゲノムワイドなヒストン修飾と、*Esr* のクロマチンへの結合動態解明を目指した。

## 3. 研究の方法

メダカ生体における *Esr* サブタイプのそれぞれの機能や役割を明らかにするために、メダカがもつ3分子種の *esr* 遺伝子をそれぞれ KO したメダカを作出している。*esr* KO メダカのオスにエストロゲンを曝露し、肝臓での遺伝子発現変動を RNA-seq 法によって解析し、各 *Esr* サブタイプの生体における機能や役割を検討した。さらにピテロジェニンやコリオジェニン遺伝子座をモデルとして、ヒストン H3 の27番目のリジン残基のアセチル化 (H3K27Ac) を転写促進、ヒストン H3 の27番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) を転写抑制の指標とし、Cleavage under target & release using nuclease (CUT&RUN) アッセイを用いて、エストロゲンを曝露したオスのメダカ肝臓でのエピゲノム状態を検討した。また、精巢卵形成は、オスの魚類に対するエストロゲン作用による悪影響として広く知られている現象である。そこで *esr* KO メダカにエストロゲンを曝露し、精巢卵形成効率を調べることで、精巢卵に関連する *Esr* サブタイプについて検討した。

## 4. 研究成果

(1) オスのメダカに、250 ng E2/L の条件下で6週間曝露し、実験的に精巢卵を誘導した。野生型では6個体中5個体に精巢卵がみられた(図1)。*esr2b* KO メダカの精巢では

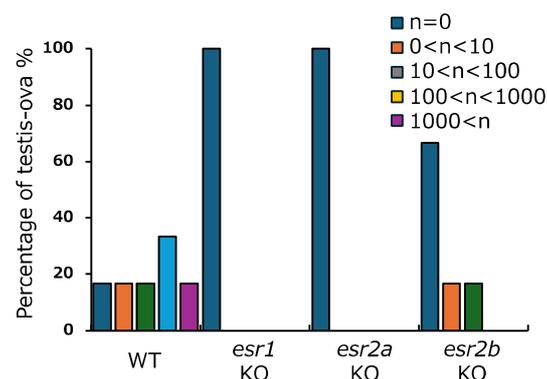


図1. 精巢卵の個数  
250 ng E2/L にばく露した野生型オス、*esr1* KO 系統オス、*esr2a* KO 系統オス、*esr2b* KO 系統オスの精巢で確認された精巢卵の数。精巢卵の数を *n* とし、*n* = 0、0 < *n* < 10、10 < *n* < 100、100 < *n* < 1000、1000 < *n* の5階級に分け、各階級に含まれる個体数を百分率で示した。

6 個体中 2 個体で精巣卵形成が認められたが、*esr1* KO メダカと *esr2a* KO メダカでは、本実験条件下では精巣卵は確認されなかった。E2 を曝露した個体の精巣を用いて、卵形成関連遺伝子であり、精巣卵形成の高感度マーカーである *42sp50*、*figa* および *zpc5* の遺伝子発現を調べた。その結果、*zpc5* 遺伝子は、野生型メダカでは E2 曝露によって発現が増加したが、*esr1* KO および *esr2a* KO メダカでは、野生型の DMSO 群に対して有意な発現の増加はみられなかった。*esr2b* KO メダカでは、野生型の DMSO 群に対して発現がやや増加する傾向がみられた。この結果は、*esr2b* KO メダカにのみ精巣卵形成が見られた個体がいたことを反映した結果であると考えられる。*42sp50* や *figa* においても同様の遺伝発現変動の傾向が見られた。

(2) オスのメダカに、100 ng/L の E2 を 24 時間曝露し、肝臓の遺伝子発現を RNA-sequence で調べた。溶媒として用いた DMSO 曝露群 (コントロール群) と E2 曝露群の発現変動遺伝子 (DEGs) の数は、野生型で 52 個 (増加) / 41 個 (減少)、*esr1* KO 系統で 129/48 個、*esr2a* KO 系統で 20/3 個、*esr2b* KO 系統で 7/4 個であった。GO 解析では、野生型、*esr1* KO、*esr2a* KO メダカでエストロゲン応答に関連する GO が検出された。一方で、*esr2b* KO 系統オスではエストロゲン応答に関連する GO は検出されなかった。したがって、E2 に対する応答性は *Esr* サブタイプによって異なり、特に *Esr2b* は DEGs の数および GO 解析の結果から、肝臓での E2 の応答に強く関与する可能性が考えられた。

表1. DMSO群対E2群の発現変動遺伝子数 (DEGs)

	Wild-type (Cab)	<i>esr1</i> KO	<i>esr2a</i> KO	<i>esr2b</i> KO
Up	52	129	20	7
Down	41	48	3	4
Total	93	177	23	11

魚類の肝臓における代表的なエストロゲン応答遺伝子であるピテロジェニン (*vtg*) およびコリオジェニン (*chg*) 遺伝子に注目して、*Esr* による転写応答メカニズムを調べた。野生型メダカでは、E2 曝露によって、*vtg* および *chg* の遺伝子発現が増加した。このとき、*esr1* 遺伝子も発現が増加した。*esr1* KO メダカでも野生型メダカで発現変動していた *vtg* や *chg* は有意に発現増加したが、野生型と比べるとその発現量 (fold change) は抑えられていた。一方、*esr2a* KO メダカの *vtg* や *chg* 発現は、野生型と同じように発現変動していた。*esr2b* KO メダカでは *vtg* の発現変動がみられず、一部の *chg* 発現に有意に発現増加していたが、野生型オスと比較すると発現量は顕著に抑えられていた。また、*esr2b* KO メダカでのみ、*esr1* 遺伝子の発現変動がみられなかった。以上のことから、*Esr1* が *vtg* 発現の増加に主に関わっており、*Esr2b* は *esr1* の転写を促進することで *vtg* 発現へ関与していると考えられる。ただし、*esr1* KO オスでも *vtg* 発現の上昇は見られたため、*Esr2b* のみでも *vtg* 遺伝子の転写活性を有している可能性が高く、*Esr* の持つ機能には冗長性があることも推察される (図 2)。

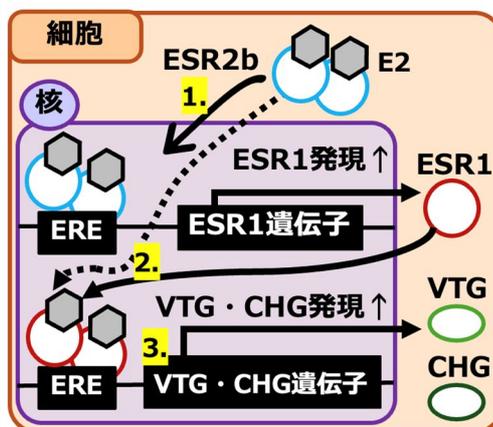


図2.肝臓で予想される *Esr* を介した *vtg/chg* 遺伝子発現経路

(3) 上記と同条件で、メダカ肝臓におけるヒストン修飾状態を調べた。本実験では H3K27Ac 抗体および H3K27me3 抗体を用いて CUT&RUN をおこない、得られた DNA を次世代シーケンサーで解析した (CUT&RUN-seq)。肝臓において雌雄やエストロゲンに関係なく発現している *apo1b*、および肝臓では発現しない *ddx4* および *dmy* をそれぞれポジティブコントロールとネガティブコントロールとし、これらの遺伝子座のピークを解析した。その結果、*apo1b* では H3K27Ac の顕著なピークが、一方 *ddx4* および *dmy* では H3K27me3 の顕著なピークが、E2 曝露あるいは雌雄に関係なく確認された。したがって、CUT&RUN-seq が正しくおこなわれていることが確認できた。*vtg/chg* 遺伝子座に H3K27Ac および H3K27me3 のピークを解析した。その結果、これらの遺伝子座では、エストロゲンを曝露していないオスの肝臓では H3K27me3 修飾が見られたが、H3K27Ac 修飾は見られなかった。一方、エストロゲンを曝露すると、広い範囲で H3K27Ac 修飾の増加が認められた。さらに、*Esr* のクロマチン結合を調べるため、Flag タグを付加した *Esr* を発現するノックインメダカを用いた。CUT&RUN 後に定量 PCR によって (CUT&RUN-PCR) *vtg/chg* 遺伝子座において *Esr1* のエンリッチが確認できた。

RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析に加え、CUT&RUN と CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を組み合わせて、メダカ肝臓におけるヒストン修飾のエピゲノム状態と、*Esr* のクロマチン結合動態を解析するための実験手法を確立した。今後、N 数を増やすこと、CUT&RUN プロトコルの改善 (クロスリンクの有無や、GFP を使ったセルソーティングをするかどうかなど)、複数の遺伝子座を解析すること、複数のタイムポイントをとって経時的な変化を明らかに

すること、さらにエストロゲン作用もつ化学物質に対してEsrがE2と同じように作用するのか、などを検討し、動物の性決定・性分化に作用するEsrのクロマチン動態の詳細な解明につなげたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Miyaoku Kaori, Ogino Yukiko, Lange Anke, Ono Ayaka, Kobayashi Tohru, Ihara Masaru, Tanaka Hiroaki, Toyota Kenji, Akashi Hiroshi, Yamagishi Genki, Sato Tomomi, Tyler Charles R., Iguchi Taisen, Miyagawa Shinichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Characterization of G protein coupled estrogen receptors in Japanese medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 1390 ~ 1399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.4130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Horie Yoshifumi, Nomura Miho, Okamoto Konori, Takahashi Chiho, Sato Tomomi, Miyagawa Shinichi, Okamura Hideo, Iguchi Taisen	4. 巻 42
2. 論文標題 Effect of thyroid hormone disrupting chemicals on swim bladder inflation and thyroid hormone related gene expression in Japanese medaka and zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.4302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Myosho Taijun, Ishibashi Ayaka, Fujimoto Shingo, Miyagawa Shinichi, Iguchi Taisen, Kobayashi Tohru	4. 巻 56
2. 論文標題 Preself-Feeding Medaka Fry Provides a Suitable Screening System for in Vivo Assessment of Thyroid Hormone-Disrupting Potential	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 6479 ~ 6490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.1c06729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie Yoshifumi, Yamagishi Takahiro, Yamamoto Jun, Suzuki Mayumi, Onishi Yuta, Chiba Takashi, Miyagawa Shinichi, Lange Anke, Tyler Charles R., Okamura Hideo, Iguchi Taisen	4. 巻 263
2. 論文標題 Adverse effects of thyroid-hormone-disrupting chemicals 6-propyl-2-thiouracil and tetrabromobisphenol A on Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology	6. 最初と最後の頁 109502 ~ 109502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpc.2022.109502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogino Yukiko, Ansai Satoshi, Watanabe Eiji, ... , Miyagawa Shinichi, Sato Tomomi, Yamada Gen, Baker Michael E., Iguchi Taisen	4. 巻 14
2. 論文標題 Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37026-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 宮川信一
2. 発表標題 メダカ生体に対するエストロゲン様環境化学物質の作用機構
3. 学会等名 日本薬学会第144年会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤貴和子、室田修平、中島啓、荻野由紀子、小林亨、井口泰泉、宮川信一
2. 発表標題 メダカの外因性エストロゲン作用に関連するエストロゲン受容体の同定
3. 学会等名 第2回環境化学物質3学会合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島啓、室田修平、藤井英里、宮奥香理、井口泰泉、豊田賢治、荻野由紀子、安齋賢、宮川信一
2. 発表標題 メダカ肝臓におけるヒストン修飾とエストロゲン受容体の結合動態
3. 学会等名 日本比較内分泌学会第46回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室田修平、佐藤貴和子、中島啓、宮奥香理、荻野由紀子、宮川信一
2. 発表標題 エストロゲン受容体ノックアウトメダカのエストロゲン応答性
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------