

# 博士論文概要

## 両生類の性決定及び性転換における 性ステロイドホルモンの役割

Rolls of Sex Steroid Hormones in Sex Determination  
and Sex Reversal in Amphibians

申請者

大池	輝
Akira	OIKE

生命理工学専攻 物理生物学研究

2019年11月

## 第1章 研究背景

地球上の生物は環境汚染による環境ホルモンの影響によって、精巣ガンなどの生殖器異常や精子数の減少、生殖異常などによって生殖の危機に瀕している (*Cholborn et al, 1997*)。この問題を解決するためには環境ホルモンが生物の生殖に与える影響を評価することは大切なことであるが、その前に生物の性決定・性分化の詳細を知る必要がある。

脊椎動物の性決定には、性染色体の組み合わせ(遺伝子)によって性が決まるものと温度などの環境条件によって性が決まるもの、の二種類が存在する。また、前者の性決定様式には雄がヘテロに性染色体を持つ XY 型 (XX/XY) の性決定様式と雌がヘテロに性染色体を持つ ZW 型 (ZZ/ZW) の性決定様式がある。このように脊椎動物の性決定は種特異的で多様性に富んでいる。脊椎動物において生殖腺は最も早く性的二形が形成される器官である。未分化生殖腺に対して種が固有でもつ性決定期に様々な性関連遺伝子が働くことによって生殖腺の性分化が進行し、雄の生殖腺では精巣が、雌の生殖腺では卵巣が形成される。ここで、性関連遺伝子は脊椎動物種間で保存されているのに対して性決定遺伝子や遺伝子カスケードは種特異的である。つまり、どの遺伝子が主役となり、そしてどのように性分化が進行するのかを調べるのが性決定及び性分化の研究である。

このような性決定及び性分化の研究を行う上で本研究において使用するツチガエルには大変ユニークな特徴がある。それは同種において XY 型の性決定様式と ZW 型の性決定様式を持ち合わせているという特徴である (*Nishioka et al, 1993*)。また、性ステロイドホルモンに対して感受性を示し、アンドロゲンによって雌から雄 (*Sakamoto et al, 2016*)、エストロゲンによって雄から雌への性転換を引き起こすことができる (*Ohtani et al, 2000*)。性決定及び性分化の研究を行う上で、これらのような面白い特徴を持つツチガエルであるが、マウスやアフリカツメガエル、メダカといったいわゆる性決定のモデル動物ではなく野生種であるという問題点がある。よって確立された実験手法や利用できる情報が少ないという問題点がある。この問題を解決するためにこれまでに多くのツチガエルを用いた先行研究が行われてきた。これらの先行研究のおかげで現在では性決定・性分化の研究を行う上で必須である、多くの性関連遺伝子がツチガエルにおいて同定された。また、研究を進める上で欠かすことのできない抗体などのリソースも利用可能である。このように、性決定及び性分化の研究を進める上で必要となる情報やリソースのあるツチガエルを用いて性決定及び性分化の研究を行うことは、複雑を極める脊椎動物の性決定機構の解明に非常に大きな知見をもたらすことは間違いない。そこで本論文ではツチガエルにおける性決定及び性分化機構の詳細を明らかにすることを目的として、第2章、第3章にて ZW 型ツチガエルの性ステロイドホルモンに対する感受性について調べ、第4章、第5章にて ZW 型ツチガエルの性決定因子について調べた。そして第6章にてそれら全体の総括を行った。

## 第2章及び第3章 性ステロイドホルモンによる性転換

### (i)序論

性ステロイドホルモンは脊椎動物の性分化に様々な影響をもたらすことが知られている。特に、性ステロイドホルモンによる性転換の研究は魚類や本研究で使用するツチガエルが属する両生類によって行われてきた。メダカを用いた性ステロイドホルモンの研究では、メダカの性ステロイドホルモンに対する感受性が種間や系統間で異なることが報告されている(*Kobayashi et al, 2019*)。また、カエルをはじめとする両生類においても性ステロイドホルモンに対する感受性は種特異的であることが知られている(*Piprek et al, 2012*)。そこで本研究ではツチガエルの性ステロイドホルモンに対する感受性の詳細を調べることを目的として、以下の研究を行なった。

### (ii)実験方法

性決定期前から四肢が生えそろうまでの ZW 型ツチガエルの幼生の飼育水に様々な濃度の Testosterone(T)及び Estradiol(E2)を添加し、変態期にて生殖腺サイズの測定、解剖・サンプリングを行った。それらのサンプルを用いて組織学的解析や遺伝子発現解析を行なった。

### (iii)実験結果

性ステロイドホルモン処理を行なった個体の生殖腺サイズを測定した結果、T 処理した雌の個体群において生殖腺サイズの T 濃度依存的な縮小が確認され、E2 処理を行なった雄の個体群において生殖腺サイズの E2 濃度依存的な肥大化が確認できた。また、T、E2 ともに生殖腺の内部構造に大きなばらつきが生じる閾値濃度が存在することが明らかとなった。

この閾値濃度における生殖腺の内部構造を観察すると、生殖腺の性転換時の内部構造変化の詳細を見ることができた。特に、生殖細胞特異的タンパク質である抗 VASA 抗体を用いた染色図を確認すると、T による雄化性転換の場合、雌の生殖腺に特徴的な大きな卵細胞の消失が皮質から始まり、やがて髓質へと広がり、最後には完全に消失した。また、それに代わって雄の生殖腺に特徴的な小さな生殖細胞が皮質から出現し、その増殖が髓質へと広がり、最後には生殖腺全体が小さな生殖細胞となった。一方で E2 による雌化性転換の場合、雄の生殖腺に特徴的な小さな生殖細胞の消失は髓質から始まり、その消失が皮質へと広がり、やがては生殖腺から小さな生殖細胞が完全に消失した。それに代わって雌の生殖腺に特徴的な大きな卵細胞の出現が髓質から始まり、やがては生殖腺全体がこの大きな卵細胞となった。つまり、T による雄化性転換の進行は皮質→髓質の順に進行したのに対して E2 による雌化性転換は髓質→皮質に向かって進行した。それらの生殖腺における遺伝子発現解析を行うと、T によって雄化性転換が進行した生殖腺では雄化に関わる遺伝子の発現上昇が確認された。また、雌化に関わる遺伝子の発現量の減少が確認された。一方、E2 処理ではその逆が確認された。

## **第4章及び第5章 性ステロイドホルモンによる性決定**

### (i)序論

現在までに脊椎動物種において、8つの遺伝子が性決定遺伝子もしくは性決定遺伝子候補として報告されている。一方で、本研究で使用するツチガエルにおいては *Androgen Receptor (AR)* 遺伝子が性決定遺伝子候補として報告されている (*Yokoyama et al, 2009*)。そこで雌個体への *AR* 遺伝子の人為的導入を行うと、雌個体の生殖腺では不完全な生殖腺の雄化が観察された (*Fujii et al, 2014*)。ここで起きた不完全な生殖腺の雄化は雌個体における *Androgen* 量の不足に起因すると考えられる。そこで本章では *Androgen* 及び *AR* が *ZW* 型ツチガエルの性決定因子であるかを調べることを目的として以下の実験を行った。

### (ii)実験方法(各数字は以下の実験結果に対応する)

- (1) *AR* 遺伝子人為的導入個体への低濃度 T 処理
- (2) *AR* 遺伝子ノックダウン個体への高濃度 T 処理
- (3) エストロゲン合成酵素(アロマターゼ)ノックダウン個体への E2 処理

### (iii)実験結果

(1)*AR* 遺伝子を人為的に導入し、低濃度 T 処理を行った生殖腺サイズは *AR* 遺伝子を人為的に導入していない個体の生殖腺と比べて有為に縮小し、それらの個体の生殖腺の中には雄の生殖腺と同等のサイズまで縮小している個体も観察できた。またその個体の生殖腺内部構造を確認すると、生殖腺は精巣構造を形成した。さらに、雄化に関わる性関連遺伝子の発現上昇を確認した。(2)*AR* 遺伝子をノックダウンし、高濃度 T 処理を行った雌個体の生殖腺のサイズは *AR* 遺伝子をノックダウンしていない個体群に比べてその T による縮小が抑えられた。また、これらの生殖腺の内部構造は卵巣構造を呈した。さらに、T による雄化遺伝子の発現上昇や雌化遺伝子の発現量の減少が抑えられていた。(3)アロマターゼをノックダウンした雄個体の生殖腺では E2 による生殖腺の肥大化が抑えられた。また、それらの個体の生殖腺の内部構造の雌化も抑えられることがわかった。さらにそれらの生殖腺では E2 による雄化に関わる遺伝子の発現量の減少及び、雌化に関わる遺伝子の発現量の上昇が抑えられていた。これらの結果は、E2 に変換されなくなった T が雄個体内に蓄積し、E2 に対する抵抗性が高まった結果と考えられる。

## **第6章 総括**

第2章及び第3章では、Tによる雄化性転換とE2による雌化性転換では生殖腺内部構造の性転換の進行が真逆であるという結果を得た。この結果は、生殖腺における生殖細胞の配列に起因すると考えられる。

第4章及び第5章の結果から、*Androgen* 及び *Androgen Receptor* が *ZW* 型ツチガエルの性決定因子である可能性が示唆された。性ステロイドホルモン及びその受容体が脊椎動物の性決定因子となる報告は本研究が初めてであり、本論文の結果は複雑を極める脊椎動物の性決定・性分化に新しい理解をもたらした。

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 大池 輝 印

(2019 年 11 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文	<p>[1] <u>Oike A</u>, Mochizuki M, Tojo K, Matsyo T, Nakamura Y, Yasumasu S, Ito E, Arai T, Nakamura M., A phylogenetically distinct group of <i>Glandirana rugosa</i> found in Kyushu, Japan, <i>Zoological Science</i>, in press.</p> <p>[2] Kodama M, Yoshida M, Endo M, Kobayashi T, <u>Oike A</u>, Yasumasu S, Nakamura M., Nanos3 of the frog <i>Rana rugosa</i> : Molecular cloning and characterization, <i>Development, Growth and Differentiation</i>, vol. 60, No.2, pp. 112-120, Nov. 2018.</p> <p>[3] <u>Oike A</u>, Watanabe K, Mi-Sook Min, Toji K, Kumagai M, Kimoto Y, Yamashiro T, Matsuo T, Kodama M, Nakamura Y, Notsu M, Tochimoto T, Fujita H, Ota M, Ito E, Yasumasu S, Nakamura M., Origin of sex chromosomes in six groups of <i>Rana rugosa</i> frogs inferred from a sex-linked DNA marker, <i>J Exp Zool A Ecol Genet Physiol</i>, Vol.327, No.7, pp. 444-452, Oct. 2017.</p> <p>○ [4] <u>Oike A</u>, Kodama M, Yasumasu S, Yamamoto T, Nakamura Y, Ito E, Nakamura M., Participation of androgen and its receptor in sex determination of an amphibian species ., <i>PLOS ONE</i>, Vol.12, No6, p. e0178067, June 2017.</p> <p>○ [5] <u>Oike A</u>, Kodama M, Nakamura Y, Nakamura M., A Threshold Dosage of Testosterone for Female-to-Male Sex Reversal in <i>Rana rugosa</i> Frogs., <i>J Exp Zool A Ecol Genet Physiol</i>, Vol.325, No.8, pp. 532~538, June 2016.</p> <p>[6] Sakamoto D, Cho A, Abe T, Nakamura Y, <u>Oike A</u>, Kodama M, Nakamura M., Structural changes in female to male sex-reversing gonads of <i>Rana RUGOSA</i>., <i>J Exp Zool A Ecol Genet Physiol</i>, Vol.325, No.3, pp. 209~218, Feb. 2016.</p> <p>[7] Nakamura Y, Iwasaki T, Umei Y, Saotome K, Nakajima Y, Kitahara S, Uno Y, Matsuda Y, <u>Oike A</u>, Kodama M, Nakamura M., Molecular cloning and characterization of oocyte-specific Pat1a in <i>Rana rugosa</i> Frogs., <i>J Exp Zool A Ecol Genet Physiol</i>, Vol.323, No.8, pp. 516~526, Apr. 2015.</p> <p>[8] Fujii J, Kodama M, <u>Oike A</u>, Matsuo Y, Min MS, Hasebe T, Ishizuka-Oka A, Kawakami K, Nakamura M., Involvement of androgen receptor in sex determination in an amphibian species., <i>PLOS ONE</i>, Vol.9, No.5, p. e93655, May 2014.</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
総説	<p>[1] Totani Y, Aomura H, <u>Oike A</u>, Watanabe T, Hatakeyama D, Sakakibara M, Lukowiak K, Ito E., Monoamines, Insulin and the Roles They Play in Associative Learning in Pond Snails, <i>Frontiers in Behavioral Neuroscience</i>, Vol.13, No.65, Apr. 2019.</p> <p>[2] Etsuri Ito, Yuki Totani&amp;<u>Akira Oike</u>., Necessity knows no low in a snail., <i>The European Zoological Journal</i>, Vol. 84, No.1, pp. 457-464, July 2017.</p>
講演	<p>[1]○<u>Akira Oike</u>, Esturo Ito, Shigeki Yasumasu, Masahisa Nakamura, <i>Glandirana rugosa</i> : The frogs that carry dual sex determination systems within conspecifics, 9th World Congress of Herpetology, New Zealand Dunedin, January 2020.</p> <p>[2]○大池 輝, 安増 茂樹, 伊藤 悦朗, 中村 正久, ツチガエルの性決定・性分化に対するエストロゲン及びエストロゲン合成酵素の役割, 第 90 回日本動物学会, 大阪, 2019 年 9 月</p> <p>[3]○<u>Akira Oike</u>, Koichiro Watanabe, Etsuro Ito, Shigeki Yasumasu, Masahisa Nakamura., Origin of sex chromosomes in six groups of <i>Rana rugosa</i> frogs inferred from new sex-linked DNA marker, 8th International Symposium on Vertebrate Sex Determination, USA Hawaii Kona, Apr. 2018.</p> <p>[4]○大池 輝, 安増 茂樹, 中村 正久, Androgen とその受容体(AR)は ZW 型ツチガエルの雄決定因子である, 第 88 回日本動物学会, 富山, 2017 年 9 月</p> <p>[5]○<u>Akira Oike</u>, Maho Kodama, Jun Fujii, Masahisa Nakamura., Determination of Androgen Concentration That Induces Female to Male Sex-Reversal in The Frog <i>Rana rugosa</i>., 7th International Symposium on Vertebrate Sex Determination, USA Hawaii Kona, Apr. 2015.</p>