

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

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

2020年2月

脊椎動物の性決定・性分化機構は多様かつ複雑であるため、不明な点が極めて多い。本博士論文では、実験動物としてツチガエル(*Glandirana rugosa*)を用い、性決定ならびに性転換・性分化の機構解明を試みた。性決定・性分化におけるツチガエルの大きな特徴は、同種内で雄ヘテロ型の性決定様式 XY 型 (XX/XY) と雌ヘテロ型の性決定様式 ZW 型 (ZZ/ZW) の両方が存在することである。ツチガエルはモデル動物ではなく野生種であるのだが、これまでに多くの性関連遺伝子がすでに同定されており、性染色体のユニークさと遺伝子との関係を用いて、性決定ならびに性転換・性分化機構の解明に挑戦することができる。なお、本論文では ZW 型ツチガエルを用いている。その理由は、ZW 型はツチガエルのユニークな性染色体のきっかけとなった性染色体逆位近傍の遺伝子が性決定遺伝子である可能性が高く、性決定遺伝子を同定するのに大きな手掛かりをつかめるからである。本論文では最初に、ZW 型ツチガエルの性決定遺伝子候補である **Androgen** 受容体遺伝子の遺伝子操作を行い、**Androgen** と **Androgen** 受容体が ZW 型ツチガエルの性決定因子であることを実証した。次に、ZW 型ツチガエルの雄化ステロイドホルモン **Testosterone** ならびに雌化ステロイドホルモン **Estradiol** による性転換の詳細を明らかにするため、性決定前から四肢が生える時期までの間、ZW 型ツチガエルのこれら性ステロイドホルモンの感受性を調べ、性転換時の性ステロイドホルモンによる生殖腺内部構造変化を明らかにした。さらに、**Testosterone** から **Estradiol** への変換酵素である **Aromatase** をコードする遺伝子 *Cyp19a* を遺伝子操作した結果、**Androgen** と **Androgen** 受容体が ZW 型ツチガエルの性決定因子であることをさらに裏付けることができた。これらをまとめた本論文は、次の 6 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景と目的が述べられている。脊椎動物の性決定一般について、生殖腺の性分化における **Androgen** (雄の性分化に関与) ならびに **Estrogen** (雌の性分化に関与) の一般的な作用について概説した。また、本研究で用いているツチガエルの日本ならびに近隣国である韓国における性決定様式を考慮した集団分布が示された。さらにはツチガエルの発生分期、発生段階における生殖腺の形態変化、遺伝的雌雄判別について説明がなされ、本研究全体の目的について述べられた。査読の結果、審査員は性決定と性分化の定義上の違いの明記や他の脊椎動物における性決定遺伝子探査の戦略とツチガエルにおける性決定遺伝子探査の戦略の違いの明記を求め、それらについて加筆がなされた。

第 2 章では、ZW 型ツチガエルにおける性決定因子を同定した。遺伝子操作で得られた個体の生殖腺の大きさ、生殖腺の内部構造の観察、そして遺伝子発現解析によって、**Androgen** と **Androgen** 受容体が性決定因子であることを示した。査読の結果、審査員は **Androgen** と **Androgen** 受容体を並列して性決定因子として良いか明記を求め、それについて **Androgen** 受容体は **Androgen** とのリガンド-レセプターの関係が形成されて初めて転写因子として働く点

で他の性決定遺伝子とは異なり、両方が性決定に重要である内容の加筆がなされた。

第3章では、雌雄生殖腺の性決定・性分化において、**Testosterone**の影響を明らかにした。ZW型ツチガエルを性決定前から四肢が生えるまでの間、飼育水に**Testosterone**を添加し、生殖腺の大きさ、内部構造、性関連遺伝子の発現を調べることで、ZW型ツチガエルは**Testosterone**で雄化性転換が起きることがわかった。ZW型ツチガエルは**Testosterone**に感受性が高い。特に、**Testosterone**は雌生殖腺を皮質から髄質方向に雄化がさせることがわかった。

第4章では、**Estradiol**によるZW型ツチガエルの雌化性転換機構について調べた。ZW型ツチガエルを性決定前から四肢が生えるまでの間、飼育水に**Estradiol**を添加し、生殖腺の大きさ、生殖腺内部構造、性関連遺伝子の発現を調べることで、ZW型ツチガエルは**Estradiol**で雌化性転換が起きることがわかった。ZW型ツチガエルは**Estradiol**に感受性が高い。特に、**Estradiol**による雌化は生殖腺の髄質から皮質方向に進行することがわかった。第3章及び第4章の査読の結果、審査員は性転換に用いた性ステロイドホルモンの種類に対する根拠の明示を求め、それらについて加筆がなされた。

第5章では、**Aromatase**をコードする *Cyp19a* を遺伝子操作することで、ZW型ツチガエルの性決定・性分化における**Aromatase**の影響を調べた。**Aromatase**は**Estrogen**合成酵素である。*Cyp19a*をノックダウンした場合、雌個体の生殖腺に影響が出なかった。すなわち、ZW型ツチガエルにおいて、**Aromatase**は決定に関与しないことが示唆された。一方で、**Estradiol**処理雄個体で *Cyp19a* をノックダウンした場合、生殖腺の大きさならびに内部構造がともに、**Estradiol**処理による生殖腺の雌化が抑制された。すなわち、*Cyp19a*変異個体においては、**Estrogen**に代謝されなかった**Androgen**の影響で**Estradiol**に対する抵抗性が高まっていた。これらは、第2章で示された、ZW型ツチガエルでは「**Androgen**と**Androgen**受容体が性決定因子である」ことをさらに裏付ける結果となった。

第6章では、本研究の総括が述べられ、さらなる考察が展開されている。なお、今後の展開として、生殖腺内の性ステロイドホルモンの測定や、**Androgen**受容体遺伝子の転写調節機構の解明、さらには**Androgen**受容体遺伝子の下流の研究などが示唆されており、本研究がさらなる広がりを見せるであろうことがわかる。査読の結果、審査員は**Testosterone**と**Estradiol**による性転換時における生殖腺内部構造の変化の方向が何に起因するのか、さらなる考察を求め、それについて加筆がなされた。

以上のように、本論文は脊椎動物における性ステロイドホルモンとその受容体が性決定因子であることを明確に示すことに成功し、性決定・性転換機構に重要な知見を与えた。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として相応しいものであると認める。

2020年2月5日

審査員

（主査） 早稲田大学教授 理学博士（早稲田大学） 伊藤悦朗

早稲田大学教授 博士（理学）（早稲田大学） 加藤尚志

早稲田大学准教授 博士（理学）（早稲田大学） 花嶋かりな

早稲田大学元教授 理学博士（早稲田大学） 中村正久

上智大学教授 理学博士（上智大学） 安増茂樹