



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on cHEMGN gene specifically involved in early gonadal differentiation in chicken [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中田, 智大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11408号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56277
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Nakata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学）氏 名 中田 智大

学 位 論 文 題 名

Studies on *cHEMGN* gene specifically involved in early gonadal differentiation in chicken
(ニワトリ特異的に初期生殖腺分化に機能する *cHEMGN* 遺伝子の研究)

鳥類は ZZ/ZW の性染色体構成をしており、遺伝的に性が決定される。しかし、鳥類における性決定の分子メカニズムは未解明な点が多く残されている。現在、最も有力な鳥類のオス化決定遺伝子として、Z 染色体上に存在する *DMRT1* (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) が報告されている (Smith CA, *et al.*, *Nature*, 461:267-271, 2009)。 *DMRT1* は精巣分化に主要な働きをもつ *SOX9* (SRY-box 9) の転写活性を上昇させる。しかし、その制御は間接的であり、 *DMRT1* と *SOX9* の間には制御に関わる複数の遺伝子が存在することが示唆されている。また、哺乳類の場合は、Y 染色体上の性決定遺伝子 *SRY* (sex determining region Y) が直接的に *SOX9* を制御しているため、鳥類における *DMRT1* と *SOX9* の間に存在する遺伝子は鳥類特異的なものであることが予想されるが、現在までに報告はない。

私が所属する研究室の先行研究において、鳥類特異的な性決定に関わる遺伝子の同定を目指し、High Coverage Expression Profiling 法 (Fukumura R, *et al.*) を用いて、ニワトリ初期生殖腺に発現する転写産物を網羅的に検出した。総計 33,962 の転写産物が検出され、性特異的な発現を示す遺伝子がいくつか同定された。同定された遺伝子のひとつである *cHEMGN* (chicken homolog of hemogen) 遺伝子は初期生殖腺においてオスで特に強い発現を示していたことから、鳥類特異的に初期生殖腺分化に関与する事が示唆された。哺乳類の *HEMGN* 遺伝子は、造血系細胞の分化と増殖に寄与する転写因子として知られており (Li CY, *et al.*, Yang LV, *et al.*), 哺乳類の性決定に関わる知見は得られていない。そこで本研究では *cHEMGN* がニワトリ初期生殖腺分化における機能を明らかにする事を目的とした。

初期生殖腺における *cHEMGN* の発現を確認したところ、 *cHEMGN* の mRNA はオスにおいて、8.5 日目において最大となり、孵化前には発現が消失した。孵卵開始 5.5 日目は *DMRT1* の発現が開始した直後の時期にあたる。一方、メスでは全発生ステージを通して発現レベルは低いままであった。さらに RT-PCR 法により *cHEMGN* の発現時期を *SOX9* の発現時期と比較したところ、 *cHEMGN* の発現は *SOX9* の発現に先行することが明らかとなった。

続いて、生殖腺中における *cHEMGN* の発現部位を確認した結果、 *cHEMGN* はオスの生殖腺髄質に発現している事が明らかとなった。また、発現細胞を同定するために、セルトリ細胞の発現マーカーである *SOX9*、始源生殖細胞の発現マーカーである *CVH* (chicken vasa homologue) との double-labeled *in situ*

hybridization 法を行った結果、*cHEMGN*はセルトリ細胞において発現していることが明らかとなった。さらに *cHEMGN* タンパク質は、核局在を示す事が明らかとなった。以上の結果から *cHEMGN*は、セルトリ細胞において機能する転写因子であることが示唆された。

造血系組織における発現量を qRT-PCR 法を用いて確認した結果、哺乳類の報告と同様にニワトリにおいても発現が確認された。しかし、ニワトリのオスではメスに比べ、発現レベルが 2-3 倍高いことが明らかとなった。鳥類では遺伝子量補償機構が存在せず、多くの Z 染色体上の遺伝子は、メス (ZW) に比べ、オス (ZZ) で発現が 2-3 倍高くなることが知られている (Itoh Y, *et al*, *J Biol*, 6:2, 2007)。*cHEMGN* は Z 染色体上に存在するため、造血系組織において見られた雌雄での発現量の差は Z 染色体の遺伝子量を反映したものであると考えられた。生殖腺における雌雄間の発現量の差は、発現ピーク時の 8.5 日目で、オスはメスの 10 倍以上の発現を示したことから、オス生殖腺において *cHEMGN* の転写活性を上昇させる、鳥類特異的な制御系の存在が示唆された。

先行研究の結果から、メスからオスへの性転換個体において *cHEMGN* の発現が誘導される事が明らかとされており、*cHEMGN* が精巣分化に機能する事が示唆されている。そこで *cHEMGN* が精巣分化に機能するのを確認するために、RCAS ベクターを用いて、遺伝的にメスである ZW 個体に *cHEMGN* を過剰発現させた。*cHEMGN* を過剰発現させた ZW 個体 (8.5 日胚) の生殖腺は、本来メスにみられる卵巢の腔胞が減少し精巣の形態に類似していることが明らかとなった。さらに *cHEMGN* を過剰発現させた ZW 個体 (8.5 日胚) において、精巣分化に重要な *DMRT1* と *SOX9* の発現が上昇し、卵巢分化に重要な *CYP19A1* (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1) と *FOXL2* (forkhead box L2) の発現が減少していることが確認された。次に *cHEMGN*、*SOX9* のタンパク質発現を確認ところ、*cHEMGN* を過剰発現させた ZW 個体 (8.5 日胚) では、過剰発現させた *cHEMGN* の発現が生殖腺全体で検出され、さらに遺伝的にメスでありながら *SOX9* の発現が確認された。さらに、生殖細胞の局在を確認したところ、*cHEMGN* を過剰発現させた ZW 個体 (8.5 日胚) では、生殖細胞の分布がオス (精巣) のパターンと類似した。よって、過剰発現 ZW 個体の生殖腺はメスからオスへの性転換を示すことが明らかとなった。

さらに miRNA を発現する RCAS ベクターを用いた RNAi により、遺伝的にオスである ZZ 個体において *cHEMGN* の発現抑制を試みた。しかしながら、*in vitro* での *cHEMGN* の抑制が確認された RCAS ベクターを使用した *in vivo* での発現抑制実験では、十分な抑制の効果が確認されなかった。このことから、RCAS ベクターの改良などを検討する事が必要である。

以上の結果から *cHEMGN* は鳥類特異的な生殖腺分化に関与する転写因子であり、セルトリ細胞において *DMRT1* と *SOX9* の間の分子カスケードで機能する遺伝子であることが明らかとなった。