



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on nuclear receptors in reptiles with temperature-dependent sex determination [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	岡, 香織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11838号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58795
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kaori_Oka_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 岡 香織

学 位 論 文 題 名

Studies on nuclear receptors in reptiles with temperature-dependent sex determination (温度依存的性決定機構を持つ爬虫類の核内受容体に関する研究)

生物をとりまく環境は、その発生や成育にさまざまな影響を与えている。例えば変温動物の多くの種では、環境温度が個体の性を決定する。この過程においては性ホルモンシグナルが重要な働きを担っており、気候の変化だけでなく、環境中に存在する内分泌かく乱物質によっても発生異常を生じることが報告されている。しかし、温度依存的性決定のメカニズムは未解明な点が多く、これらの生物種における内分泌系自体の理解も進んでいないため、個体を取り巻く環境変化がどのように作用するのかその分子基盤は明らかとなっていない。そこで、内分泌かく乱及び温度依存的性決定に関わるホルモンシグナル伝達系の解明を目的として、ホルモンシグナルを介在する核内受容体に着目して実験が行われた。本研究では温度依存的性決定の代表的生物である二種の爬虫類（アメリカアリゲーター（ワニ、*Alligator mississippiensis*）、ミシシippアカミミガメ（カメ、*Trachemys scripta*））を研究対象とした。

第一章

アリル炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon receptor; AhR）は、ダイオキシン類などの外因性リガンドによって活性化しその毒性を誘引する因子としてよく知られている。さらに近年、内因性リガンドが相次いで同定され、外来物質への応答に限らず、生殖機能を含めた体内のさまざまな生理作用に関わることがわかってきた。AhR は生物種によって遺伝子の数やリガンドへの応答性が大きく異なる。爬虫類においては 2 種のカメから AhR の全長あるいは部分配列の単離が行われているが、その転写因子としての機能は明らかとされていない。そこで、本研究ではワニから AhR 及び AhR とヘテロ二量体を形成するパートナーである Arnt の単離を試み、培養細胞を用いたアッセイ系で機能解析を行った。

まず、degenerate PCR 法及び RACE 法により、3 種類の AhR 及び 2 種類の Arnt の cDNA を単離した。アミノ酸配列の系統解析及び相同性の比較から AhR はそれぞれ哺乳類が持つ AhR (aAhR1A)、魚類が持つ AhR1 (aAhR1B)、魚類や鳥類に見られる AhR2 (aAhR2) のオルソログと判断した。四肢動物からの AhR1B オルソログの同定はニワトリに続く二例目の報告である。また、Arnt はそれぞれ他種の Arnt1 及び Arnt2 と相同であった。胚の性腺・副腎中腎複合体から抽出した RNA を用いた RT-PCR を行い、雄化・雌化の温度条件に関わらず、性分化する前後どちらのステージでも発現を確認した。成体では、aAhR1B は生殖腺での発現が高かったのに対し、他の因子は幅広い組織で発現が認められた。AhR-Arnt 複合体による転写因子としての働きを明らかにするため、培養細胞に aAhR および aArnt を強制発現させ、Xenobiotic response elements (XREs) を介した転写活性を解析した。aAhR はいずれも aArnt1 存在下で外因性リガンド 3-Methylcholanthrene (3-MC) 及び内因性リガンド候補分子 indigo によって転写活性化した。aAhR1A, 2 は 3-MC に感受性が高かったのに対し、aAhR1B の感受性は indigo の方が高かった。一方、aArnt2 存在下では各リガンドに対する感受性が aArnt1 よりも低下し、とくに aAhR1A 及び aAhR2 は indigo に対する応答性をほとんど示さなかった。以上のことから、ワニにおいても AhR-Arnt シグナル伝達系が保存されており、また、オルソログ間で異なる機能を担っていることが示唆された。

第二章

副腎皮質ホルモンは、糖代謝や免疫、電解質バランス調節などさまざまな生理作用に関わる一群の生理活性物質である。近年、これまで知られていた機能の他、魚類や爬虫類の一部にみられる温度依存的性決定への関与も示唆されている。ワニやカメにおいても胚発生中の糖質コルチコイド量が雌雄の温度条件によって異なることが報告されている。これらの生物種において副腎皮質ホルモンがどのように機能しているかを明らかにするため、そのシグナ

ル伝達を担う糖質コルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor; GR) 及び鉱質コルチコイド受容体 (Mineralocorticoid receptor; MR) に着目した。

はじめに degenerate PCR 法及び RACE 法により、GR 及び MR の cDNA を単離した。アミノ酸配列の系統解析を行った結果、それぞれ鳥類の GR あるいは MR と近縁であった。胚の性腺・副腎中腎複合体から抽出した RNA を用いた RT-PCR を行い、雄化・雌化の温度条件に関わらず、性分化する前後どちらのステージでも発現を確認できた。また、成体でも幅広い組織で mRNA レベルでの発現が認められた。培養細胞にワニ GR あるいは MR を強制発現させ、MMTV LTR (Mouse mammary tumor virus long terminal repeat) を介した転写活性を解析した。進化段階の異なる各生物種の受容体についても同様の解析を行い、リガンドに対する反応性を比較した。MR は生物種間で副腎皮質ホルモンに対する応答性が似通っていたが、GR はそれぞれの種で差が見られた。また、ワニ GR はヒト GR に比べリガンドに対する感受性が高かった。さらに、リガンド結合ドメインと GAL4 DNA 結合ドメインの融合タンパク質を用いた解析から、ワニとヒトの GR は同じリガンドに対して異なる活性化状態にあることが示唆された。爬虫類の副腎皮質ホルモンシグナルは哺乳類よりもわずかな状況変化を感受し、また異なる遺伝子カスケードを動かしている可能性がある。

第三章

脊椎動物において、性決定や性分化に関わる遺伝子群は高度に保存されている。しかし、その発現の順序や性差は種によって異なり、その発現がどのようにコントロールされているかは十分に理解されていない。抗ミュラー管ホルモン (Anti-Müllerian hormone; AMH) は哺乳類などで雄化に関わる因子であり、ワニ・カメでも哺乳類と同様に、性分化時期における雄での発現上昇、また、SOX9 による転写活性化が確認されている。AMH 遺伝子の発現制御機構を解析するため、2 種類の培養細胞にワニ SOX9 及び GR または MR を共発現させ、ワニ AMH 遺伝子の転写制御領域を介した転写活性を調べた。MR はいずれの細胞でも AMH の転写活性に影響を与えなかった。一方、GR は SOX9 による転写活性化を COS-7 細胞では副腎皮質ホルモン依存的に活性化、HepG2 細胞では抑制した。細胞種による転写制御の違いは何に起因するのか、それぞれのメカニズムについて解析を進めた。COS-7 細胞において GR と SOX9 の共発現による転写活性化は AMH 転写制御領域を含まないコントロールベクターでも観察された。また、DNA 非結合型の変異型 GR でも転写活性化が生じたことから、GR と SOX9 の相互作用による配列非依存的な転写活性化の経路が考えられた。それに対し HepG2 細胞では、DNA 非結合型の GR を SOX9 と共発現させた場合、AMH レポーターに対する転写抑制効果は有意に低減した。よって、GR は AMH 転写制御領域に直接結合し、その発現制御を行っている可能性が高い。結合領域の同定のため、転写制御領域を部分的に欠失させたレポーターを用いて、GR による転写抑制を調べた。興味深いことに、推定された結合領域は COS-7 細胞でも転写抑制性の領域として機能していることが示唆された。以上のことから、副腎皮質ホルモンシグナル応答により、細胞の状態に応じて AMH の転写制御が双方向に行われている可能性が示された。

副腎皮質ホルモンの *in ovo* での作用を検証するため、卵への曝露実験を実施した。ワニでは致死性が高く解析できなかったため、カメを用いて実験を行った。温度感受期に高濃度の糖質コルチコイドを処理したところ、2013 年度には約半数の個体で雌化温度での雄への性転換が生じた。しかし 2014 年度ではカメにおいても高い致死性がみられ、また、性転換もほとんど起きなかった。副腎皮質ホルモンシグナルは温度依存的な性分化過程に関与する可能性があるが、その主因ではないことがうかがわれた。

本研究で行われたアリル炭化水素受容体及びコルチコイド受容体の単離と機能解析は、爬虫類における生理作用・内分泌かく乱研究の基盤となるものである。また、副腎皮質ホルモンシグナルが爬虫類においても性分化関連遺伝子を直接制御している可能性を初めて示し、温度依存的性決定の分子メカニズムの理解に貢献した。