

二次性徴発現を決定付けるクロマチン動態の解明

九州大学 農学研究院 国際農業教育・研究推進センター
荻野 由紀子

1. 目的

二次性徴は、性決定、生殖腺の分化に続く、個体の性のアイデンティティ確立の最終段階である。男性ホルモン（アンドロゲン）によって誘導される生物種特異的な雄の外部形態や繁殖行動は、種分化の機構である生殖隔離に貢献し、生物多様性の創出や維持に重要な役割を果たす。自然界ではその形質の強弱が個体群の中の順位付けなど、高度な社会性をも導く。しかし内分泌かく乱化学物質等の環境要因による攪乱も受けやすい。卵胎生魚では本来雄に発達する交接ヒレが雌に発達するなどの事象が世界的に報告されている(Huang et al., 2016)。二次性徴には、種・年齢・性を識別するサインとしての役割があり、二次性徴形質の異常が、不適切なペアリングや闘争を導き、異種間交配による雑種不念や亜種間交配による遺伝子流動から生物種が減少することが懸念されている。ヒトでは尿道下裂の発症頻度は1/200~1/300と極めて高く、新生児期の外性器異常は社会的な性の決定に関わることから大きな懸念となっており、従来のアンドロゲン受容体（AR）の標的因子を対象とした研究のみならず、その機能発現を制御するパイオニアファクター(Pihlajamaa et al., 2014)などの遺伝的要因の解明が急務である。しかし、二次性徴についての研究の多くは生態学的意義や表現型変化に焦点をあてたものであったため、その発現を制御している分子機構についての知見は未だ乏しい。我々は、AR変異体メダカの表現型解析、及び魚類を用いた外部形態における二次性徴発現の比較解析から、アンドロゲンによる予定形成領域の脱分化・未分化間葉組織の形成が二次性徴発現の重要な鍵として働くことを発見した。本研究では、特にこの組織の成立に必要なクロマチン動態や遺伝子発現の解明に焦点を当てることで、組織特異的な二次性徴発現を制御するアンドロゲン応答の分子機構を解明し、多様な二次性徴形質発現の基本メカニズムを理解することを目的とした。

2. 方法

1) 二次性徴発現を制御するアンドロゲン応答性エフェクター因子の同定

メダカの雌に合成アンドロゲン（メチルテストステロン（MT））を投与し、雄に特徴的な二次性徴（尻鰭後半部の乳頭状小突起（PP）：交尾の際にメスを保持するために必要とされる構造）の形成を雌に誘起した。予定PP形成領域で未分化な間葉組織が確認される投与2日目、尻鰭後半部のPP形成領域、前半部の二次性徴非形成領域、及び先端部の伸長領域を採取し（図1）、RNAseqにより、組織領域に特異的に発現する遺伝子、及びアンドロゲンにより発現誘導される遺伝子群についての網羅的な解析を進めた。1サンプルに2個体を使用し、それぞれの領域について4サンプルを解析に用いた。対照として、MT非投与（溶媒投与）のメダカを用い、同様の条件で解析した。

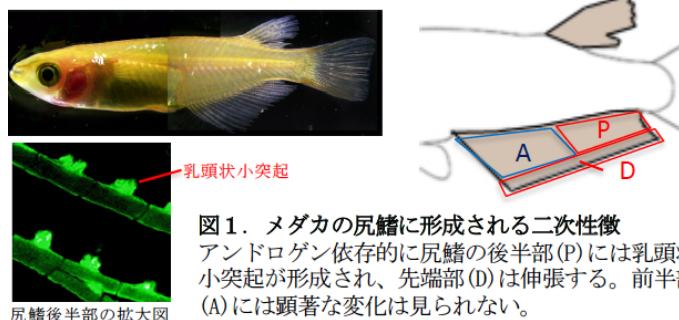


図1. メダカの尻鰭に形成される二次性徴
アンドロゲン依存的に尻鰭の後半部(P)には乳頭状小突起が形成され、先端部(D)は伸張する。前半部(A)には顕著な変化は見られない。

2) 二次性徴発現組織におけるクロマチン動態の解析

上記解析と同様に、アンドロゲン投与、非投与のメダカ尻鰭組織を3領域に分けて採取し、それぞれのオープンクロマチン領域をATAC-シーケンスにより比較解析した。RNAseqとの複合解析からARのパートナーとして機能発現を制御する候補因子（パイオニアファクター）の探索を試みた。さらにアンドロゲンに対する初期応答において、ハブとなるような重要なエフェクター因子の探索を行い、アンドロゲンに対する応答をレポーターアッセイによって解析した。

3. 結果

我々はこれまでにオスに特徴的な二次性徴が形成される際にWnt/ β -cateninシグナルが活性化されることを明らかとしてきた(Ogino et al., 2014)。今回のRNAseqにより、尻鰭3領域でそれぞれアンドロゲンにより発現変動する具体的な遺伝子群が明らかとなった(図2)。二次性徴発現領域である尻鰭後半部では、Rspo2などのWnt/ β -cateninシグナル活性化因子の遺伝子発現がアンドロゲンにより増加、Dkk2などの抑制化因子の遺伝子発現が抑制されるなど、Wnt/ β -cateninシグナルに関連する複数の因子

の遺伝子発現がアンドロゲン投与によって変動することで Wnt/ β -catenin シグナルが活性化されていることが明らかとなった。また、SoxCファミリーなどの未分化マーカー因子の遺伝子発現がアンドロゲンにより顕著に誘導されていた。これらの因子とアンドロゲンによる予定形成領域の脱分化・未分化間葉組織の形成との関連性について、時空間的な発現様式や Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤投与における SoxCファミリー因子の発現変動などから、解析を進めている。また軟骨魚類でアンドロゲンの標的遺伝子として報告されている Hand2 (O' Shaughnessy et al. 2015) の遺伝子発現が、メダカでは尻鰭後半部で顕著に高いことが明らかとなった。しかし、Hand2は軟骨魚類とは異なりメダカではアンドロゲン応答性は見られず、進化の過程でアンドロゲン応答性は系統特異的に獲得されてきたと考えられた。

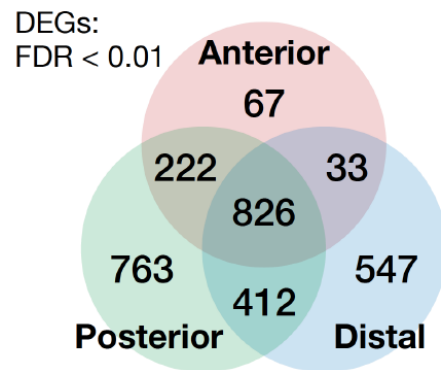


図2. 尻鰭3領域それぞれでアンドロゲンにより発現変動する遺伝子数

続いて、メダカの尻鰭をモデルに、アンドロゲン投与と非投与、および二次性徴発現組織と非発現組織におけるオープンクロマチン領域の相違を、ATACseqにより解析した。当初、リガンドの有無や組織間によって大きな違いが検出できると予想していたが、アンドロゲンの有無、組織間において、オープンクロマチン領域の顕著な相違は検出されなかった(図3)。そこで、尻鰭組織を用いたRNAseqで、顕著なアンドロゲン応答性を示した遺伝子

を選出し、すでに報告・登録のあるUCSC genome browserのChIPデータなどを参考に、脊椎動物で高度に保存されているエンハンサー領域を検出した。これらの結果を、ATACseqの結果と照らし合わせたところ、検出したエンハンサー領域においてATACseqのピークがオーバーラップしていることが確認できた。さらに顕著なアンドロゲン応答性を示したメダカの遺伝子について、ARの結合領域であるアンドロゲン応答配列(ARE)を検索したところ、脊椎動物

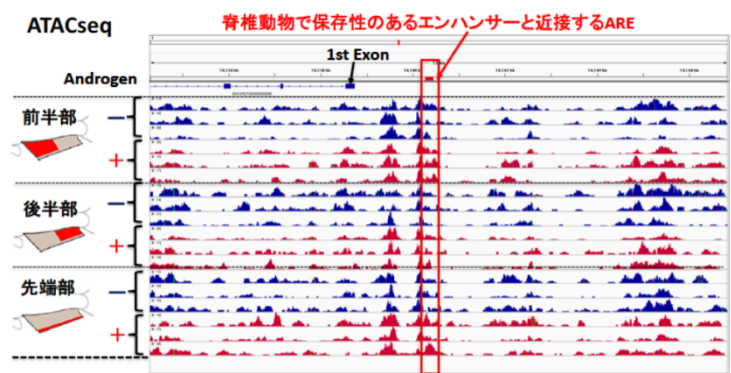


図3. アンドロゲン応答性を示した遺伝子Xの5'上流領域のオープンクロマチン領域脊椎動物で高度に保存されているエンハンサー領域と近接するアンドロゲン応答配列(ARE)が近接して存在しており、オープンクロマチン領域とオーバーラップしている。

で共通して保存されている既存のエンハンサー領域に近接してAREが存在しており、この領域もオープンクロマチン領域に含まれていることがわかった(図3)。この領域を含む遺伝子の5'上流領域 - 9.0 kbpはレポーターアッセイによって、アンドロゲン応答性を示したことから、この遺伝子はARの標的遺伝子である可能性が強く示唆された(図4)。一方、オープンクロマチン領域にAREを検出したアンドロゲン応答性遺伝子について、リアルタイムPCRにより遺伝子発現解析を行ったところ、アンドロゲンにより二次性徴の顕著な尻鰭後半部で発現誘導されるが、非投与個体でも構成的な発現が確認された。また二次性徴が形成されない尻鰭前半部においても構成的な発現が認められた。よって、アンドロゲン非投与あるいは二次性徴が形成されない尻鰭前半部でも遺伝子発現に必須のエンハンサー領域が機能しており、オープンクロマチン領域として検出されたと考えられた。

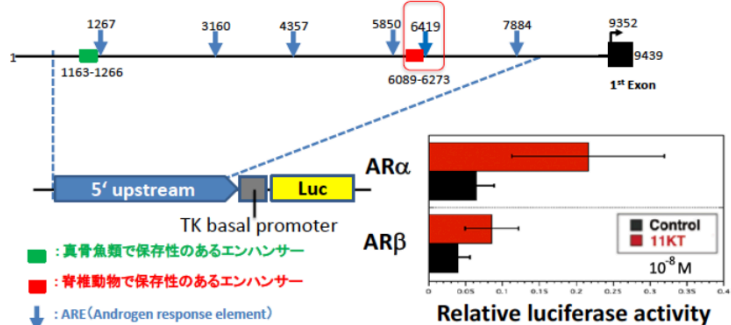


図4. アンドロゲン応答性を示した遺伝子Xの5'上流領域の転写活性 ARを発現させたCOS7細胞で、5'上流領域 -9.0 kbpの転写活性をレポーターアッセイにより確認した。アンドロゲン(11-ketotestosterone)を投与すると、5'上流領域 -9.0 kbpの転写活性が増大した。

3) 考察

以上の結果から、既存のエンハンサー領域に近接してAREが存在することが、アンドロゲン応答性遺伝子の特徴である可能性が考えられた。しかし、二次性徴に特徴的な組織特異性を説明するには不十分であり、ARの組織特異的な機能発現を制御するパイオニア因子の関与やARの組織特異的な発現の有無を調べて行く必要がある。現在ATACseqとRNAseqの結果を照らし合わせ、AREが含まれるオープンクロマチン領域に共通して結合し得るパイオニア因子の探索を進めている。加えて、これまでに検出したAREに対するARの結合の有無を確認する必要がある。現在、ARがFLAGとの融合遺伝子として発現するノックインメダカ系統を用いて、FLAG抗体を用いたChIPseqについて条件検討を進めている。メダカの成魚の鰭組織を用いたChIPseqについては前例がない新たな試みであり、当初の予定より条件検討に時間を要している。ChIPseqによりAR結合ゲノム領域の詳細が明らかになれば、本研究で推進したATACseq、RNAseqの結

果との複合連鎖解析から、ARの二次性徴発現制御の分子機構の詳細が明らかとなり、内分泌かく乱化学物質による二次性徴形質の分化異常などの性分化疾患発症メカニズムの理解と解明に貢献すると期待される。

4) 参考文献

Huang GY, Liu YS, Chen XW, Liang YQ, Liu SS, Yang YY, Hu LX, Shi WJ, Tian F, Zhao JL, Chen J, Ying GG. Feminization and masculinization of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) observed in rivers impacted by municipal wastewaters. *Sci Rep.* 6: 20884, 2016.

Pihlajamaa P, Sahu B, Lyly L, Aittomäki V, Hautaniemi S, Jänne OA. Tissue-specific pioneer factors associate with androgen receptor cistromes and transcription programs. *EMBO J.* 33(4): 312-326, 2014.

Ogino Y, Hirakawa I, Inohaya K, Sumiya E, Miyagawa S, Denslow N, Yamada G, Tatarazako N, Iguchi T. Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. *Endocrinology.* 155(2) 449-462, 2014.

O'Shaughnessy KL1, Dahn RD, Cohn MJ2. Molecular development of chondrichthyan claspers and the evolution of copulatory organs. *Nat Commun.* 14 (6) 6698, 2015.