

論文の内容の要旨

論文題目

Photoperiod-regulated expression of sex differentiation-related genes and its association with AMH signaling system in the testis of the adult quail

(成体ウズラの精巣における光周期による性分化関連遺伝子の発現制御とその AMH 情報伝達系への関与)

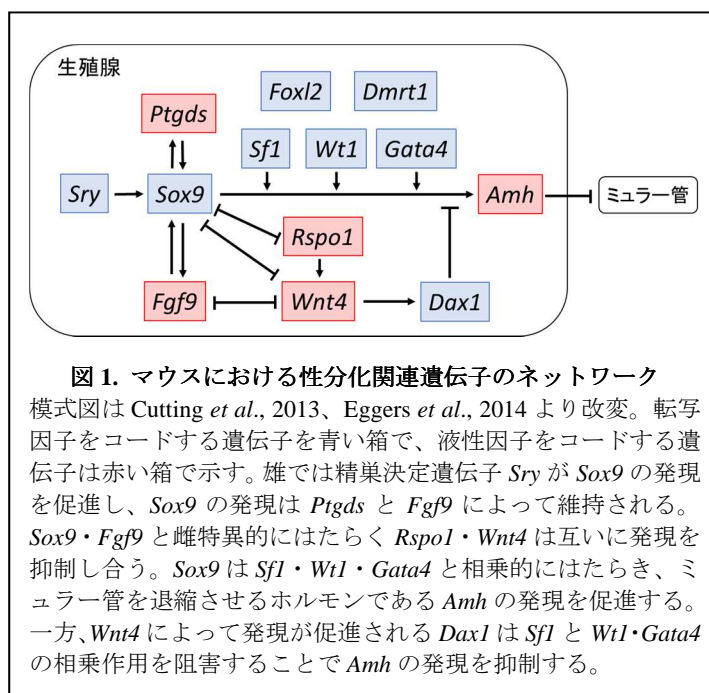
氏名 大嶽 茂雄

<研究の背景>

生殖腺は生殖に必須の器官であり、雄の精巣、雌の卵巣はそれぞれ性特異な配偶子とホルモンを産生する。このような差異は発生初期における生殖腺の性分化を通して形成される。これまでに、生殖腺の性分化に関わる遺伝子は多数同定され、それらは脊椎動物で共通して、性分化期に発現していることが報告されている。そして、主にマウスでの機能解析から、生殖腺の性分化はそれらの遺伝子のネットワーク的なはたらきによって進行することが明らかとなってきた (図 1)。

性分化関連遺伝子は発生初期のみならず、性成熟に達した成体の生殖腺においても発現していることが知られている。さらに、近年、それらの遺伝子の時期特異的ノックアウトマウスの解析から、性分化関連遺伝子の成体生殖腺機能への関与が示唆されてきてい

る。一方、これまでの成体生殖腺における研究は、単一遺伝子（特に転写因子）のみに着目したものであり、遺伝子ネットワークという観点からの研究はほとんど行われていない。こうした現状から、私は



様々な性分化関連遺伝子の発現動態を解析し、成体の生殖腺における遺伝子ネットワークを理解する必要があると考えた。

本研究では、実験動物として鳥類のウズラに着目した。ウズラは長日繁殖動物であり、日長条件の変化によって、精巣重量は数週間で100倍近い劇的な変化を示す(図2)。このようなウズラの精巣の変化は、他の季節性繁殖動物と比べて、はるかに速く、大きい。そして、精巣組織の退縮と再構築を伴う、可逆的な変化である。このような特徴は、生殖腺の変化と関連した性分化関連遺伝子の発現動態を明らかにする上で大きな利点となると考え、ウズラを実験動物として用いることにした。

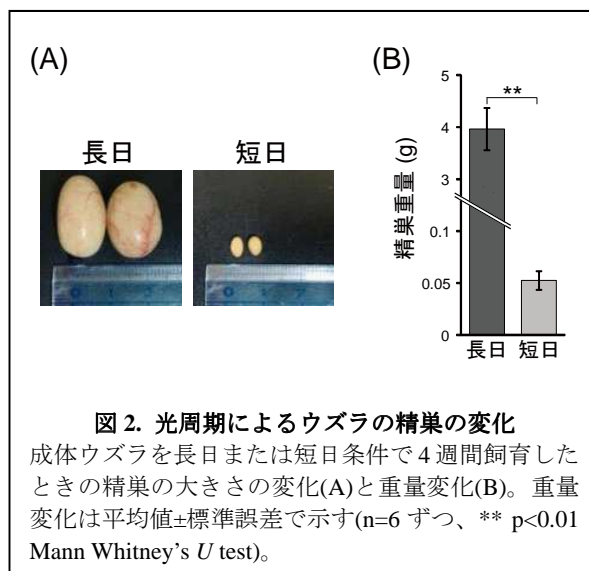


図2. 光周期によるウズラの精巣の変化
成体ウズラを長日または短日条件で4週間飼育したときの精巣の大きさの変化(A)と重量変化(B)。重量変化は平均値±標準誤差で示す(n=6ずつ、** p<0.01 Mann Whitney's U test)。

<1. 成体精巣における性分化関連遺伝子の発現解析>

まず、長日または短日条件で飼育したウズラの精巣における、転写因子・液性因子を含む様々な性分化関連遺伝子の発現を解析した。転写因子では *SF1*・*WT1*・*SOX9*・*GATA4*・*DAX1* の発現量が短日条件で退縮した精巣で増加していた。一方、*FOXL2* の発現量は退縮精巣で減少し、*DMRT1* の発現に変化はみられなかった。液性因子では *AMH*・*PTGDS*・*WNT4* の発現量が退縮精巣で増加し、*FGF9*・*RSPO1* の発現に変化はみられなかった。液性因子の中では *AMH* の発現量が多く、その変動は最も大きかった。*AMH* (anti-Müllerian hormone)は雄の性分化期に、卵管のもとになるミュラー管を退縮させるホルモンとして発見され、哺乳類では *SF1*・*SOX9*・*WT1*・*GATA4* が *AMH* の発現を促進することが知られている。そこで、プロモーター解析を行ったところ、ウズラの *AMH* プロモーターにも、これらの転写因子の推定結合配列が存在した。これらの結果から、性分化関連転写因子は成体の精巣においても *AMH* の発現制御に関与しており、性分化関連遺伝子は *AMH* を介して機能していることが強く示唆された(図3)。

AMH は特異的な受容体 (*AMH type II receptor*; *AMHR2*)に結合して機能する。しかし、鳥類では *AMH* 受容体は同定されていなかったため、その cDNA 配列を同定し、発現を調べた。*AMH* 受容体はリガンドと同様、生殖腺特異的に発現しており、また、退縮精巣で発現量が増加した。さらに、短日条件に保ったウズラを長日条件に移行し、精巣が発達していく段階での発現を調べ、形態に基づいた精巣のステージに分類して解析した。その結果、*AMH* と受容体の発現量は共に Stage II (精原細胞のみ)から Stage III (精母細胞が出現)で減少しており、*AMH* シグナルと精子形成との関連性が示唆された。

<2. TGF-β superfamily 情報伝達系の解析>

次に *AMH* が属する TGF-β (transforming growth factor beta) superfamily の情報伝達系について解析を行った。この superfamily には BMP (bone morphogenetic protein), TGF-β, activin/ inhibin が含まれ、これら

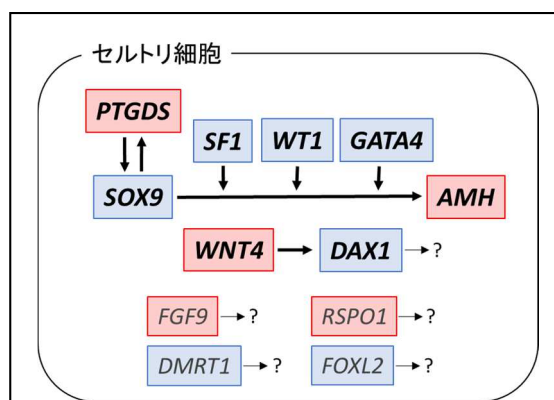


図3. 成体ウズラの精巣における性分化関連遺伝子ネットワークのモデル
遺伝子発現解析の結果から予想される各遺伝子の関係。短日条件で退縮した精巣で発現量が増加した遺伝子を太字で示す。転写因子をコードする遺伝子を青い箱で、液性因子をコードする遺伝子は赤い箱で示す。これらの性分化関連遺伝子はマウス (Wilhelm et al., 2007) やニワトリ (Oreal et al., 2002)においてセルトリ細胞で発現しており、遺伝子ネットワークはセルトリ細胞ではたらくと予想される。

は精子形成等の成体精巣の機能に寄与することが知られている。TGF- β superfamily のリガンドは type I、type II と呼ばれる2つの受容体を介し、細胞内情報伝達因子である SMAD をリン酸化する。そして、リン酸化 SMAD は核内に移行して標的遺伝子の発現を制御することで生理作用を示す。

TGF- β superfamily の情報伝達系において、異なるリガンド間で type I 受容体と SMAD が共有されており、シグナル伝達のクロストークが存在する (表 1)。

さらに二つのグループの SMAD (SMAD1/5/8 と SMAD2/3) は相反する関係にあることが報告されている。従って、AMH の役割を理解するためには、他のメンバーとの関係性を調べることが重要である。そこで、精巣機能の変化に伴う他の TGF- β superfamily のリガンドと受容体の発現動態を解析した。

BMP と AMH は3種類の type I 受容体 (ALK2, ALK3, ALK6) とその下流ではたらく SMAD1/5/8 を共有している。BMP type II 受容体と3種類の type I 受容体は、短日条件で退縮した精巣で発現量が増加していた。しかし、そのリガンドは発現量が少ないものが多く、変動もみられなかった。そのため、AMH と BMP の type I 受容体を介した協調作用はないことが示唆された。

TGF- β は ALK5-SMAD2/3 と ALK1-SMAD1/5/8 の二つの経路を活性化することが知られている。TGF- β のリガンドと受容体は共に退縮精巣で発現量が増加していた。Type I 受容体では ALK1 とその補助受容体である endoglin (ENG) の発現量が共に退縮精巣で増加していた。SMAD2/3 を活性化する ALK5 の発現量も増加していたが、ALK5 も ALK1 経路の活性化に必要であることが報告されている。そのため、退縮精巣においては ALK1-SMAD1/5/8 の経路がより活性化されていることが示唆される。精巣ステージでは、TGF β 2 \cdot ALK1 \cdot ENG の発現量が AMH \cdot AMHR2 と同様に Stage III (精母細胞が出現) で減少していた。これらの結果から、TGF- β と AMH は SMAD1/5/8 を介して協調

的にはたらく、精原細胞の増殖や分化の制御に関与していることが示唆される (図 4)。

Activin は ALK4 と ALK7 を介し、SMAD2/3 を活性化する。3種類の inhibin サブユニット (α , β A, β B) の発現量は全て退縮精巣で増加しており、inhibin (α + β) と activin (β + β) の両方の産生が増加していることが示唆される。一方、退縮精巣では activin シグナルに抑制的にはたらく follistatin (FST: activin 結合タンパク質) と BETAGLYCAN (inhibin 補助受容体) の発現量も増加していた。また、精巣ステージでは、FST と BETAGLYCAN は Stage III で発現量が減少していた。これらの結果は、activin と inhibin の作用のバランスにより、精原細胞の増殖や分化が制御されていることを示唆する。また、inhibin と AMH は相乗的

表 1. TGF- β superfamily の情報伝達系

それぞれのリガンドが用いる type II 受容体、type I 受容体と補助受容体、活性化する SMAD を示した (Miyazawa *et al.*, 2002、Shi and Massagué 2003 より改変)。

Ligands	AMH	BMPs	TGF β s	Activins (β + β)	Inhibins (α + β)
Type II receptors	AMHR2	BMPR2	TGFR2	ACVR2A, ACVR2B	
Type I & Co receptors	ALK2, ALK3, ALK6		ALK1 Endoglin	ALK5	ALK4, ALK7
SMADs	SMAD1/5/8		SMAD2/3		Not activate SMAD

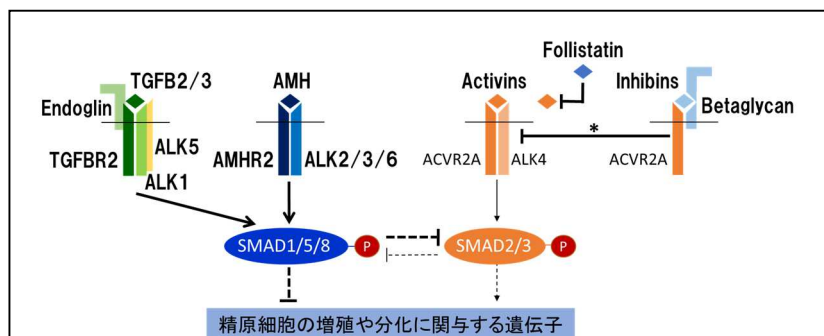


図 4. 短日条件の精巣における AMH と他の TGF- β superfamily メンバーの情報伝達系

短日条件で退縮した精巣では、AMH と TGF- β とそれぞれの受容体の発現量が増加していた。一方、activin 系では inhibin サブユニットに加え、activin シグナルに抑制的にはたらく follistatin と betaglycan の発現量も増加していた (*: Betaglycan 存在下では inhibin と activin type II receptor の結合が促進される。その結果、activin と type II receptor の結合が阻害される)。模式図では短日条件で発現量が増加した因子を太文字で示し、促進されていることが示唆される経路を太線で示している。予想される SMAD のはたらきは点線で示した。2つのグループの SMAD は相反関係にあることが報告されている (Matsumoto *et al.*, 2012 等)。ラットではこれらの受容体のセルトリ細胞・ライディッヒ細胞での発現が報告されており (Mendis-Handagama *et al.*, 2006 等)、それらの細胞におけるシグナル系のクロストークが予想される。

にはたらくことが報告されている。そのため、退縮精巣において AMH は inhibin や follistatin と共に activin シグナルを抑制していることが示唆される。SMAD1/5/8 と SMAD2/3 は相反関係にあることが報告されており、AMH と activin の相反作用は SMAD のレベルで起きていると考えられる (図 4)。

<学位論文のまとめ>

これまでの成体の生殖腺における性分化関連遺伝子の研究は、単一因子の解析がほとんどであり、遺伝子ネットワークという観点からの研究はなされてこなかった。本研究では、日長条件によって精巣機能が劇的に変化するウズラを用い、転写因子と液性因子を含めた、様々な性分化関連遺伝子の発現を解析した。その結果、精巣機能の変化に伴って、多くの転写因子と液性因子の発現が変動していることが初めて明らかとなった。特に AMH の発現変動が顕著であり、その発現を促進することが知られる転写因子も同様の変動を示したことから、性分化関連遺伝子の AMH を介した機能が示唆された。また、TGF- β superfamily のリガンドと受容体の発現動態を解析し、AMH は superfamily 内の他の因子と共に、精原細胞の増殖や分化の制御に関与していることが示唆された。これらの一連の研究は、成体ウズラの精巣にお

いて、性分化関連遺伝子は AMH の発現に至るネットワークとしてはたらき、精子形成の制御に関与していることを強く示唆する (図 5)。その機能を明らかにするには更なる研究が必要であるが、本研究結果は成体の生殖腺における性分化関連遺伝子の発現の意義を理解する上での重要な手がかりを提供するものである。

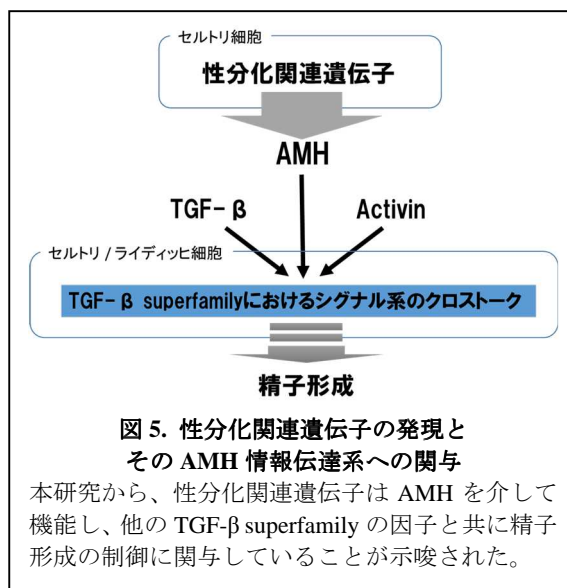


図 5. 性分化関連遺伝子の発現とその AMH 情報伝達系への関与

本研究から、性分化関連遺伝子は AMH を介して機能し、他の TGF- β superfamily の因子と共に精子形成の制御に関与していることが示唆された。