

# 温度依存性性決定有鱗目ヒョウモントカゲモドキにおける性分化機構の分子生物学的解析

生体情報学研究室 遠藤大輔  
指導教員 朴民根

爬虫類は脊椎動物で唯一の外温性羊膜類である。体温が環境温度によって大きく変動することから、内温性の哺乳類、鳥類とは異なった機構で陸上環境に適応していると考えられる。爬虫類、特に有鱗目では近縁な種間でも環境に合わせて胎生と卵生、染色体、あるいは温度に依存した性決定など多様な生殖現象を使い分けていることから、脊椎動物の環境適応の進化を考える上で非常に興味深い動物群であるといえる。私はこのような爬虫類、有鱗目の環境適応と生殖現象の関心に興味を持ち、ヒョウモントカゲモドキを実験動物として研究を始めた。

ヒョウモントカゲモドキの環境と生殖との関係について、成体における光、温度条件の繁殖行動への影響と、胚の性決定に対する孵卵温度の影響の二つが考えられる。修士課程においては成体に対する光と温度の影響という観点から、低温短日処理したオスの精巣における遺伝子発現変化を調べた。その結果、様々な生殖関連遺伝子の発現が環境の変化に伴い変動していることが明らかとなり、成体の環境適応の分子機構に迫るうえで示唆に富む知見を得ることができた(1, 2)。また、その過程で性ステロイドホルモン情報伝達系を中心に、生殖関連のいくつかの遺伝子についてその遺伝子配列情報および感度の高い発現量の測定系も確立した。博士課程においてはこうした修士課程での成果を活かし、温度依存性性決定の分子機構に迫ることを目標とした。

温度依存性性決定とは、発生時の孵卵温度によって性が決定される性決定様式であり(図1)、一部の魚類と調べられたすべてのワニ目、殆どのカメ目、一部の有鱗目に見られる。先述のとおり、有鱗目では近縁な種間でも異なる性決定様式を持つことから、その研究は性決定様式の進化を考える上で重要であると考えられるが、確立された実験動物種が不在であることから殆ど行われてこなかった。また、孵卵温度が生殖腺の性だけではなく性行動にも直接影響を与えることも報告されており(図2)、近年鳥類でも示唆されている脳の自律的な性分化を考える上でよいモデルになることが期待される。

こうしたことから本研究においては以下の三点を目標とした。

1. 有鱗目の温度依存性性決定の分子機構に迫る基盤づくり
  - ・ヒョウモントカゲモドキにおける性決定関連遺伝子の同定
  - ・発生期における性ステロイドホルモン合成酵素の全身的な発現解析による孵卵温度の標的器官の候補のスクリーニング

2. 温度依存性性決定有鱗目における生殖腺の性分化機構の解析

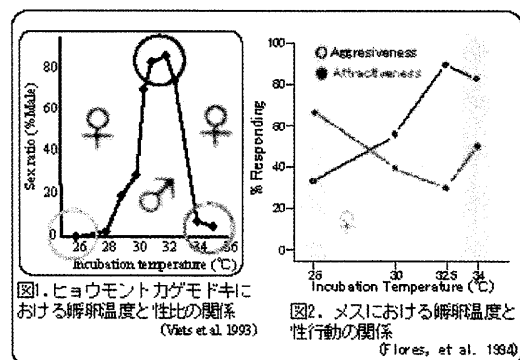


図1. ヒョウモントカゲモドキにおける孵卵温度と性比の関係 (Vats et al. 1993)

図2. メスにおける孵卵温度と性行動の関係 (Flores, et al. 1994)

### 3. 生殖腺外(脳)に性決定因子が直接影響する可能性の検証

#### 1. 有鱗目の温度依存性性決定の分子機構に迫る基盤づくり

これまでにヒョウモントカゲモドキにおいては脊椎動物で一般にオスの生殖原基特異的に発現することが知られている Sox9 と性ステロイドホルモン受容体としてアンドロゲン受容体、エストロゲン受容体  $\alpha$ 、プロゲステロン受容体が同定されていた。私はこれらに加え、性ステロイドホルモン合成酵素の転写因子であり性決定因子と性ステロイドホルモン情報系を中継すると考えられている Steroidogenic factor 1 (SF-1)、そしてステロイドホルモン合成の最初の段階を触媒する酵素、コレステロール即鎖切断酵素 (P450scc)、エストロゲン合成酵素である 芳香化酵素 (P450arom)(3)、エストロゲン受容体  $\beta$  の cDNA 配列を同定した。これにより、脊椎動物で広く性決定に関わると考えられる因子、ステロイド合成の重要な段階を触媒する二つの酵素、そして総ての性ステロイドホルモン受容体について発現解析が可能となった。

得られた配列を用いて発生期の性ステロイドホルモン合成器官を調べるために、胚において 2 種の合成酵素、P450scc と P450arom の全身的な発現解析を行ったところ、調べた総てのステージを通じて脳と生殖腺 (adrenal-kidney-gonadal complex として単離) においてそれらの mRNA の発現が観察された。発生期においてはこの二つの器官が中心的な性ステロイドホルモン合成器官であることが示唆され、今後はこれらに絞って孵卵温度の影響を解析することにした。また、性ステロイドホルモン受容体に関しては脳と生殖腺を含む多くの器官で、調べたもっとも早いステージから発現が確認されたため、各器官において合成されたホルモンはこれらの受容体を通じて作用しうると考えられる。

#### 2. 温度依存性性決定有鱗目における生殖腺の性分化機構の解析

生殖腺の性分化と孵卵温度の関係については形態組織学的な変化と Sox9、SF-1、P450scc、そして P450arom mRNA 発現量を指標に調べた。これらの指標について、どのステージで影響が観察されるか、それは温度感受期中かその後か、それぞれの指標における差はどの順番で観察されるか、性決定遺伝子の性特異性は他の種で調べられた結果と比較してヒョウモントカゲモドキに特異的かという点について重点を置いて考察した。

ヒョウモントカゲモドキはステージ 30 において産卵され、ステージ 33~37 に温度を感受し性が決定され、ステージ 40 において孵化する。生殖腺の形態はステージ 39 にいたっても卵巣様、精巣様の形態を示さず、孵化直後においてようやく皮質層の肥大、精索の形成など性特異的な形態を示した。同様に遺伝子発現量の差も孵化後においてのみ観察され、SF-1 はオスにおいてメスより強い発現を、P450arom はメスにおいて強い発現を示した。Sox9 および P450scc 発現量においては温度による影響、または性差は観察されなかった。これらのことから、生殖腺の性分化は性決定後に非常にゆっくりと進行すること、SF-1、P450arom は性決定ではなく性分化に何らかの役割を果たしていることが示唆された。また、多くの種でオスの生殖腺において強い発現が報告されている Sox9 がヒョウモントカゲモドキでは性差を示さなかったこと、SF-1 の発現量がマウス、ニワトリと異なりステロイドホルモン合成酵素の発現の弱い性で高かったことは性分化の分子機構の進化を考える上で非常に興味深い結果である。

### 3. 生殖腺外(脳)に性決定因子が直接影響を及ぼす可能性の検証

これまで脳の性分化は生殖腺からの性特異的な性ステロイドホルモンの影響によって制御されていると考えられていたが、近年ヒョウモントカゲモドキとゼブラフィンチという羊膜類の異なった動物群に属する種において脳が自律的に性分化する可能性が示唆されている。しかしその分子機構についての研究は行われていない。そこでヒョウモントカゲモドキ胚の脳において、生殖腺が性分化する時期より前における性決定関連遺伝子の発現を調べた。

その結果、胚の時期には生殖腺での発現量には孵卵温度の影響が観察されなかったステロイドホルモン合成酵素 (P450scc、P450arom) の mRNA 発現量が脳では強い影響を受けていることがわかった。脳の P450scc mRNA 発現量は温度感受期においてオスが多くなる温度(32°C)で一過的に高かった。このことは、P450scc 発現が性周期の制御に関わる脳の性分化に重要な働きをしていることを示唆するものである。一方、P450arom 発現量はヒョウモントカゲモドキの温度・性比の関係とは一致した傾向を示さず(図 1)、孵卵温度が高くなるほど高くなった。前述のとおり、ヒョウモントカゲモドキでは温度が同じ性の中でも性行動に直接影響を与えることから、P450arom の発現は脳の性行動に関わる領域の形成に関わると考えられる(図 3)。

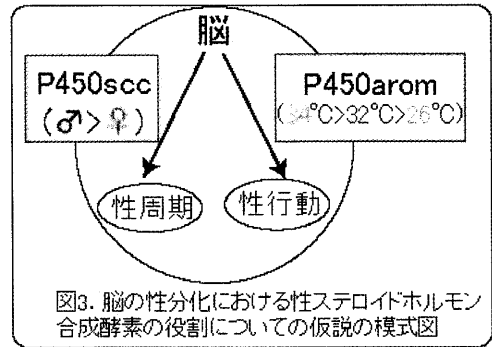


図3. 脳の性分化における性ステロイドホルモン合成酵素の役割についての仮説の模式図

ゼブラフィンチと同じく鳥類に属するニワトリにおいても同様の解析を行った。その結果、P450scc、P450arom そして SF-1 mRNA が生殖腺の性分化以前の早い時期から脳で発現していることを発見した。その中でも特に SF-1 は孵卵 5.5 日においてオスでメスより強い発現が観察されたので、さらに *in situ hybridization* 法により脳における発現部位を調べたところ *ventromedial hypothalamic nucleus (VMH)* に発現が局在していた。この部位は成体において生殖の制御に重要な役割を果たすことが知られている部位であり、またマウスで発生初期のこの部位での SF-1 発現が VMH の形成に重要な役割を果たすことも報告されている。このことからニワトリでみられた SF-1 発現量の性差はこの種における脳の自律的性分化に重要な働きをしていることが示唆される。また、温度依存性性決定羊膜類と染色体性決定羊膜類で共に生殖腺の性を決定する因子が脳へ直接影響することが本研究で明らかとなったことから、羊膜類一般に脳の自律した性分化機構が存在する可能性が考えられる。

本研究により、脊椎動物に環境適応の機構あるいは性決定様式の進化を考える上で非常に重要な動物群である有鱗目においてその性決定・分化の分子機構に迫る研究を行う基盤を形成することができた。そしてこれらの分子情報の基盤を用いてヒョウモントカゲモドキの性分化に伴う遺伝子発現のパターンを脳と生殖腺において解明した。

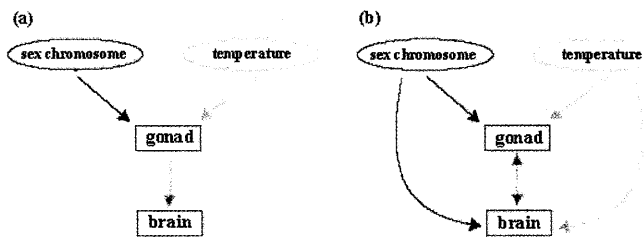


図4 脳の性分化のモデル  
脳の性分化はこれまで生殖腺の性が脳の性を変配する(a)のようなモデルで考えられてきた。しかし本研究で観察されたような性染色体や孵卵温度といった性決定因子からの脳への直接的な影響から(b)に示す新しいモデルが考えられる。脳は生殖腺によって支配されるだけでなく、自律的にも性分化を行う。また、脳が自律的に獲得した性差が生殖腺の性決定・分化に影響を及ぼすかについては今のところ何も研究が行われていないが、興味深い可能性である。

この結果は温度依存性性決定動物で初めてのものであり、特に脳の自律的性分化についての知見は羊膜類の性分化について新しいモデルを提示するものである(図 4)。

また、近年染色体による性決定を行うヘビにおいても孵卵温度が成体の行動に影響を与えることが報告されている。このことから孵卵温度がどちらかの性の適応度を上げるような形質へ影響を与えることが温度依存性性決定が進化・維持されてきた要因であるという説も提唱されている。従って脳に対する孵卵温度の直接の影響についての分子生物学的解析は温度依存性性決定の進化について考察する上でも重要な鍵になることが期待される。

- (1) Endo D., and Park M.K. (2003) *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*. 136(4): 957-66.
- (2) Endo D., and Park M.K. (2004) *General and Comparative Endocrinology*. 138(1): 70-7.
- (3) Endo D., and Park M.K. (2005) *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 96(2): 131-40.