

鳥類の性決定とアロマターゼ遺伝子

Avian sex determination and aromatase gene

工藤 季之

Toshiyuki Kudo

就実大学 薬学部 薬学科

Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Shujitsu University

Summary

Sex is the most important exchange method of the genetic information in eukaryotes. Sex determination mechanism is varied depending on the species, however, sex differentiation mechanism in vertebrates are basically similar. Sex determination of birds is controlled by the sex chromosomes and their sexual differentiation are critically controlled by estrogen. Because estrogen is biosynthesized by aromatase, it is possible to find the sex-determining gene of birds by analyzing the transcriptional regulatory mechanism. While there have been conducting research on the basis of this concept, the mechanism has not yet been fully elucidated. On the other hand, DMRT1 gene has been cloned as a strong candidate in the sex-determining gene of birds. Analysis of cascade leading to the aromatase gene from DMRT1 gene is an important issue in the future.

はじめに

有性生殖は、進化の大きな原動力の一つである。有性生殖を通じた遺伝情報の交換は、多細胞生物から単細胞生物に至るまで広く認められている。脊椎動物では、精巣で精子を作り出すオスと、卵巣で卵を作り出すメスという二つの性による有性生殖が行われる。同じ種の生物は、基本的にはほぼ同様の遺伝情報を持ちながら、ある個体はオスへ、ある個体はメスへと性分化が進んでいく。性的に未分化な状態から分化した状態へ移行するきっかけを性決定と呼ぶが、性決定の機構は生物種により極めて多様である[1]。

哺乳類は、一部の例外を除き、XY型の性染色体による性決定様式をとっている。オスのみがもつY染色体上に存在するオス化マスター遺伝子が働くことにより、個体の性分化がメス型からオス型へとシフトする。現在、このオス化マスター遺伝子として知られているのが、SRY遺伝子である[2]。一方、鳥類は、哺乳類とはちょうど裏表のZW型の性染色体による性決定様式をとっている。性分化に関与する様々な遺伝子は見つかっているものの、現在のところ、性決定のマスター遺伝子と考えられるものは同定されていない。

脊椎動物の性分化に重要な役割をはたすものの一つに、性ホルモンがある。アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素で、性分化の際の発現が明瞭な性的二型性を示す。鳥類においては、個体発生時にエストロゲンの作用を阻害することで、メスからオスへの性転換が起こることが知られている[3]。また逆に、エストロゲンを作用させる、もしくはアロマターゼ遺伝子を強制発現させることで、オスからメスへの性転換が起こることが示されている[4]。このことから、鳥類における性決定のマスター遺伝子は、直接あるいは間接的にアロマターゼ遺伝子の発現を調節することにより、性分化を制

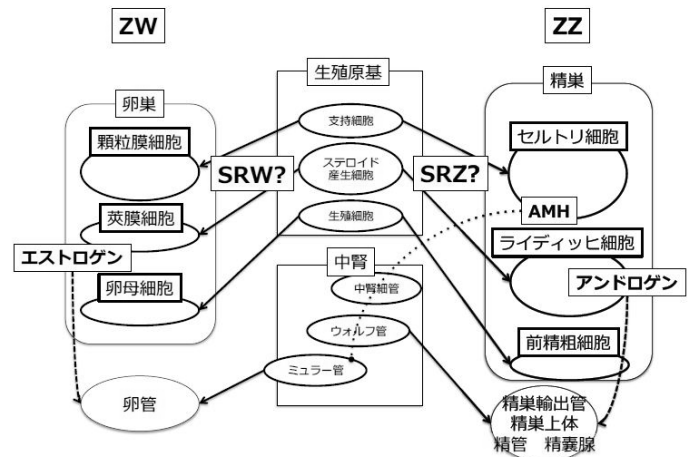


図1 鳥類の生殖腺の性分化

御していると考えられる(図1)。

これまで、このようなコンセプトのもとで、鳥類のアロマターゼ遺伝子の解析を行ってきた。しかしながら、鳥類を実験動物として使用する際に直面する問題のため、その進行は思うに任せないのが現状である。鳥類を使うと、何がどう難しいのか。本稿では、その苦闘の歩みを披露させていただくとともに、鳥類の性決定がどこまで解明されたのか、これからどのようなブレイクスルーが必要なのかを論述する。

鳥類のアロマターゼ遺伝子と転写因子

鳥類のアロマターゼは、1988年にニワトリからcDNA[5]が、1991年にそのゲノムDNA[6]の一部がクローニングされた。その後、1994年にはゼブラフィンチからcDNA[7]が、1999年にそのゲノムDNA[8]の一部がクローニングされている。私たちも1996年に、ニワトリおよびウズラのゲノムDNAの一部をクローニングし、その比較解析を行った[9]。

表1 ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子のプロモーター活性
(水野らによる学会発表)

Reporter	Length	Cell	Stimuli	Activity
CAT	10 kb	COS		+++++
		Chicken theca cell		+++++
		CEF		+
	0.14 kb	CEF		+++
	10 kb	CEF	Bovine Ad4BP	+++

CEF; chicken embryo fibroblast

哺乳類ではすでにヒトを含む数種においてプロモーター解析が行われており、複数の第1エクソンと多重プロモーターによる転写調節が行われていることが知られていた[10]。また、アロマトラーゼを含む複数のステロイドホルモン合成酵素の転写を制御する因子としてNR5A1 (SF-1, Ad4BP) の遺伝子がクローニングされていた[11,12]。ニワトリおよびウズラのプロモーター領域にもこの転写因子の認識配列が認められたため、そのニワトリ・ホモログのクローニングを試みた。デジェネレートプライマーによるRT-PCRにより、いくつかの核内レセプターのcDNAの一部を得たが、その中で特に哺乳類のNR5A1と同一性が高い2断片について、その全長のクローニングを行った。結果的には、そのうちの1つがNR5A1のオルソログであり、もう1つがパラログのNR5A2 (LRH-1, FTF) であることが判明した[13]。それらのニワトリ6日胚での発現を確認したところ、前者は副腎、精巣、卵巢で、後者は肝臓、膀胱、副腎、精巣、卵巢で特異的な発現が認められた。後者は当初、肝臓特異的な転写因子として知られていたが、その後、生殖腺などでも重要な働きをもつことが注目されるようになった[14]。

転写因子とその応答配列を含むプロモーター領域があれば、転写の活性化を確認するのが常套手段である。ところが、現時点でもNR5A1によるニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子のプロモーターの活性化を示したデータは得られていない。水野らが示したデ

表2 ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子のプロモーター活性
(工藤、未発表)

Reporter	Length	Cell	Stimuli	Activity
Luciferase	2.5 kb	NIH3T3	forskolin	-
			+NR5A1	-
			+NR5A2	-
		COV	forskolin	-
			+NR5A1	-
			+NR5A2	-
	8.6 kb	NIH3T3	forskolin	-
COV		forskolin	-	

COV; chicken ovary-derived cell

ータ (学会発表のみ) は、ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子のプロモーターをウシのNR5A1で活性化したものだだったが、正式にパブリッシュされることはなかった (表1)。また、私たちも同様の解析を試みたが、プロモーターの活性化を示すデータは得られなかった (表2)。

また、卵巢における重要な転写因子として、FOXL2が知られている[15]。哺乳類では、直接アロマトラーゼ遺伝子の転写を活性化することが知られているが、鳥類では活性化は確認できなかった (未発表)。現在に至るまで、ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子のプロモーターを人為的に活性化できたという報告はない。

ニワトリゲノム解読

2004年、ニワトリの全ゲノム配列の解読が発表された[16]。発表された時点では不完全な部分も多く、ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子の周辺領域でも多くのデータの欠落が認められた。データベースに登録されていた塩基配列をもとに、周辺領域のクローニングを重ね、前後に隣接する遺伝子までの全領域を入手した。

ヒト・アロマトラーゼ遺伝子では、卵巢で使用されるプロモーターの約100kb上流に、胎盤特異的なプロモーターの存在が知られており、5'上流に隣接する遺伝子 (GLDN, gliomedin) はさらに離れた領域に位置している。鳥類では、当然のことながら胎盤特異的なプロモーターに対応する第1エクソンは知られておらず、卵巢で使用されるプロモーターの約35kb上流にGLDN遺伝子が存在していた。そこで、この領域を複数の断片に分割して、そのエンハンサー活性を検討した (図2)。ニワトリ10日胚の卵巢および精巣由来の初代培養細胞では、20~25kb上流域でわずかながら転写の活性化が認められた (未発表)。

鳥類の卵巢における性ステロイド合成

鳥類のアロマトラーゼ遺伝子で、そのプロモーター活性が確認できない理由の一つとして、鳥類の卵巢におけるエストロゲン合成の特殊性が上げられる

(図3)。哺乳類においては、莖膜の間質細胞でコレステロールからアンドロゲンまでの変換が行われ、顆粒膜の顆粒膜細胞でアンドロゲンからエストロゲンへの変換が行われる (2細胞説)。これに対して鳥類においては、顆粒膜や莖膜に存在する複数の細胞種でコレステロールからアンドロゲンまでの変換が

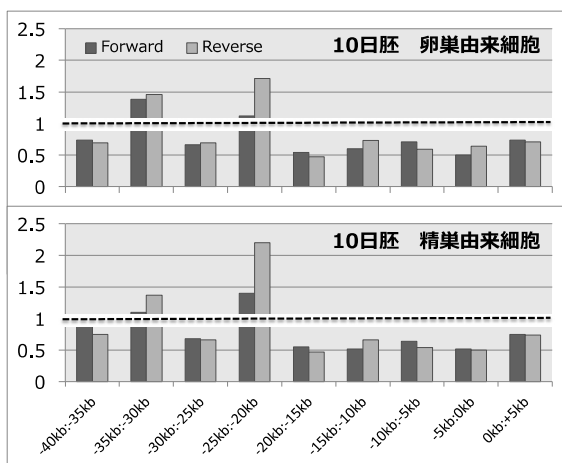


図2 ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子5'上流域のエンハンサー活性

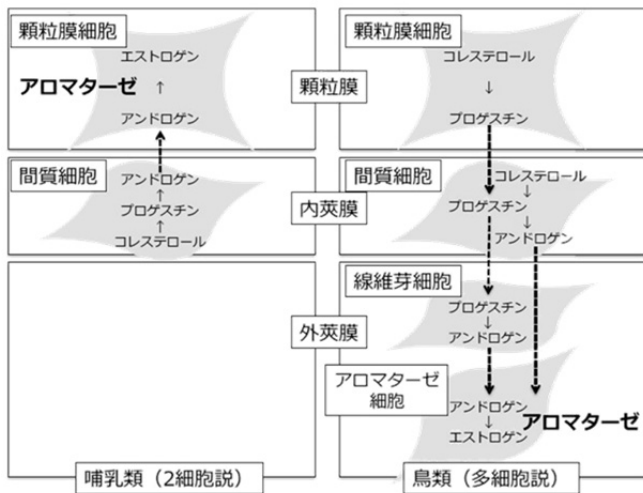


図3 卵巣でのエストロゲンの生合成

行われ、外茨膜に点在するアロマターゼ細胞でアンドロゲンからエストロゲンへの変換が行われると考えられている（多細胞説）。このアロマターゼを発現する細胞の希少性が、その制御機構の解析を困難にしているものと推測される。

現在、研究材料として使用可能な鳥類の細胞株は、わずか10数種類であり、アロマターゼ遺伝子の転写機構の解析に適した細胞は存在しない（表3）。私たちがテロメラーゼ遺伝子の過剰発現などにより、生殖腺由来細胞の株化を試みたが、株化には至らなかった。現在、哺乳類の卵巣において細胞の増殖に関するWnt4タンパク質やRSPO1タンパク質などを用いて、細胞の株化を検討中である。

アロマターゼ遺伝子のエピジェネティクス

遺伝子のプロモーター領域に存在するCpGアイランド（転写開始点を含む約1kbの領域）のメチル化が、遺伝子の発現に重要な役割を果たすことが知られている。ニワトリ・アロマターゼ遺伝子のプロモーター領域には、典型的なCpGアイランドが認められず、そのDNAメチル化の影響については不明であった。2012年にエストロゲンによる性転換において、アロマターゼ遺伝子のプロモーター領域で、DNAメチル化に変化が認められる配列があることが報告された[17]。そこで、同配列とアロマターゼ遺伝子の近傍に存在するCpGアイランドのメチル化状態をバイサイルフアイト法により解析した（表4）。5'上流域

表4 成体肝臓および10日胚生殖腺におけるメチル化状態（工藤、未発表）

	5'		Aromatase			3'
	GLDN-d	GLDN-p	-955	-869	-789	
Female liver	51.1	11.0	73.9	78.3	69.6	2.1
Male liver	39.1	13.9	82.6	65.2	47.8	1.7
Female gonads	36.4	1.3	62.5	58.3	66.7	1.4
Male gonads	39.9	5.6	60.9	73.9	69.7	1.0

% Methylation

表3 鳥類の細胞株

Year	Name	Animal	Tissue	Induction
1977	QT6	Quail	Fibrosarcoma	Methylcholanthrene
1982	CEC-32	Quail?	CEF?	Spontaneously
1985	DT40	Chicken	Lymphoma	RAV-1 (ALV)
1987	LMH-1	Chicken	Adult liver	Diethylnitrosamine
1991	QM7	Quail	Myoblast	QT6
1995	QCE-6	Quail	Mesoderm cell	Methylcholanthrene
1998	DF-1	Chicken	CEF	Spontaneously
2005	SC-1	Chicken	CEF	Spontaneously
2006	SC-2	Chicken	CEF	Spontaneously
2011	CLEC213	Chicken	Lung	
2013	CEL-im	Chicken	Embryo liver	Spontaneously

に存在するCpGアイランドは、GLDN遺伝子のプロモーター領域に、3'下流域に存在するCpGアイランドは、TNFAIP8L3 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3) 遺伝子のプロモーター領域に対応している。成体の肝臓および10日胚の生殖腺でメチル化状態を解析したところ、報告されているように、生殖腺でのみアロマターゼ遺伝子の転写開始点から869bp上流のCpG配列で雌雄差が認められた。しかしながら、これが転写に大きな影響を与えうるものであるかどうかは疑問である。

鳥類の性決定関連遺伝子

鳥類の性決定遺伝子のクローニングは、複数のグループで試みられている。その中で、現在、ほぼ性決定遺伝子であろうと目されているのが、DMRT1遺伝子である。この遺伝子は、DMドメインと呼ばれる保存されたDNA結合ドメインをもつ転写因子をコードしている。もともとは、ショウジョウバエの性分化に関する変異体から単離された遺伝子で、その後、そのホモログが脊椎動物に広く保存されており、オスの生殖腺の分化に関与していることが判明した。また、メダカやアフリカツメガエルでは、この遺伝子が性染色体上に存在しており、性決定遺伝子として機能していることが示唆されている。

鳥類でも1999年にDMRT1遺伝子のホモログがクローニングされ、性染色体であるZ染色体上に存在することが明らかにされた[18]。性染色体がZZであるオスにおいて、ZWであるメスの2倍量発現することにより、未分化生殖腺を精巣へと分化誘導するものと考えられている[19]。

ある遺伝子が性決定遺伝子であるか否かは、その生物種が性染色体による性決定様式をとっている場合、当該遺伝子が性染色体上に存在することと、当該遺伝子のみで性転換が可能であるかどうかで判断される。ニワトリにおいて、DMRT1遺伝子を過剰発現させることで遺伝的メスをオス化させることが可能であることが、2014年に報告された[20]。これにより、DMRT1遺伝子が鳥類の性決定遺伝子であることがほぼ確定的となった。

おわりに

ニワトリのアロマターゼ遺伝子がクローニングされてから、すでに四半世紀が過ぎた。この間の遺伝子解析技術の進歩は著しく、その転写調節に関して

相当な知見が得られていてもおかしくない。ところが現状は、未だにそのプロモーター活性すら明確に解析されていない。エストロゲンが鳥類の性決定に極めて重要な働きをもつことに議論の余地はないが、肝心のアロマターゼ遺伝子の解析が進まず、性分化機構の解明には大きな穴が空いたままである。2010年にニワトリの見事なギナンドモルフが報告された[21]。これにより、性ホルモンによる性分化機構に大きな修正を加える必要が生じた。少なくとも鳥類では、性染色体に依存した細胞自律的な性が存在するらしい。解明すべき残された謎はまだ多い。

参考文献

- [1] Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, Ashman TL, Hahn MW, Kitano J, Mayrose I, Ming R, Perrin N, Ross L, Valenzuela N, Vamosi JC; Tree of Sex Consortium. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol.* 2014 Jul 1; 12(7): e1001899.
- [2] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990 Jul 19; 346(6281): 240-244.
- [3] Elbrecht A, Smith RG. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science.* 1992 Jan 24; 255(5043): 467-470.
- [4] Lambeth LS, Cummins DM, Doran TJ, Sinclair AH, Smith CA. Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoS One.* 2013 Jun 28; 8(6): e68362.
- [5] McPhaul MJ, Noble JF, Matsumine H, Wilson JD. Cloning and expression of the chicken ovary aromatase P-450: expression of mRNA in tissues of the Sebright and Leghorn chicken. *Trans Assoc Am Physicians.* 1988; 101: 219-225.
- [6] Matsumine H, Herbst MA, Ou SH, Wilson JD, McPhaul MJ. Aromatase mRNA in the extragonadal tissues of chickens with the henly-feathering trait is derived from a distinctive promoter structure that contains a segment of a retroviral long terminal repeat. Functional organization of the Sebright, Leghorn, and Campine aromatase genes. *J Biol Chem.* 1991 Oct 25; 266(30): 19900-19907.
- [7] Shen P, Campagnoni CW, Kampf K, Schlinger BA, Arnold AP, Campagnoni AT. Isolation and characterization of a zebra finch aromatase cDNA: in situ hybridization reveals high aromatase expression in brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994 Jul; 24(1-4): 227-237.
- [8] Ramachandran B, Schlinger BA, Arnold AP, Campagnoni AT. Zebra finch aromatase gene expression is regulated in the brain through an alternate promoter. *Gene.* 1999 Nov 15; 240(1): 209-216.
- [9] Kudo T, Yamamoto H, Sato S, Sutou S. Comparison of 5' Upstream Regions of Chicken and Quail Aromatase Genes. *J Reprod & Dev.* 1996 May; 42(2): 101-107.
- [10] Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1; 90(23): 11312-11316.
- [11] Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1993 Apr 5; 268(10): 7494-7502.
- [12] Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol.* 1993 Jun; 7(6): 776-786.
- [13] Kudo T, Sutou S. Molecular cloning of chicken FTZ-F1-related orphan receptors. *Gene.* 1997 Sep 15; 197(1-2): 261-268.
- [14] Liu DL, Liu WZ, Li QL, Wang HM, Qian D, Treuter E, Zhu C. Expression and functional analysis of liver receptor homologue 1 as a potential steroidogenic factor in rat ovary. *Biol Reprod.* 2003 Aug; 69(2): 508-517.
- [15] Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhous E. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol.* 2006 Jun; 36(3): 399-413.
- [16] International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature.* 2004 Dec 9; 432(7018): 695-716.
- [17] Ellis HL, Shioda K, Rosenthal NF, Coser KR, Shioda T. Masculine epigenetic sex marks of the CYP19A1/aromatase promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion. *Biol Reprod.* 2012 Jul 26; 87(1): 23, 1-12.
- [18] Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol.* 1999 Nov 15; 215(2): 208-220.
- [19] Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature.* 2009 Sep 10; 461(7261): 267-271.
- [20] Lambeth LS, Raymond CS, Roeszler KN, Kuroiwa A, Nakata T, Zarkower D, Smith CA. Over-expression of *DMRT1* induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Dev Biol.* 2014 May 15; 389(2): 160-172.
- [21] Zhao D, McBride D, Nandi S, McQueen HA, McGrew MJ, Hocking PM, Lewis PD, Sang HM, Clinton M. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature.* 2010 Mar 11; 464(7286): 237-242.