ニワトリの性決定とアロマターゼ遺伝子

西森克彦

東北大学農学部

☐ 哺乳動物と鳥類の性決定機構 ☐

高等脊椎動物の性の決定方式は、一般には受精時の性染色体の組み合わせによって決まるとされる。しかし、これは哺乳類や鳥類などの高等脊椎動物に見られる現象であり、形態的には雌雄の異なった個体の表現形を示し、機能的に雌雄の分化が明確な種でも、下等な脊椎動物においては性染色体の分化の明確でないものが多数存在する。たとえば、爬虫類においては XX/XY, または ZZ/ZW 型の異形性染色体の分化の見られないものが多い。また一部のカメなどでは、発生期の温度により性の決定が行なわれることも知られている。

これに対し、異形性染色体の分化の進んだ高等脊椎動物では、その性決定は性染色体の組み合わせによって決まるが、哺乳類と鳥類では性染色体と性の表現系の関係が対照的である。哺乳類ではその性決定が XY の 2 種の性染色体の組み合わせで起こるが、この性染色体のうち精巣の分化発達を決定し、雄型 (XY) の性を決めるのは Y 染色体の上に発見された SRY (ヒト精巣決定遺伝子) または Sry (マウス精巣決定遺伝子) と呼ばれる遺伝子である⁽¹⁾。この遺伝子は DNA 結合蛋白質と考えられる蛋白質をコードしている。基本的には雌になるようにセットされている哺乳類の遺伝的な性決定機構が、Y 染色体を持つ雄においては SRY 蛋白質 (HMG box をもち転写制御因子と思われる) の作用により制御を受け、結果として生殖腺原基の精巣への分化が促される。

精巣への分化を決定づけられた個体では、さらにこの精巣中の精原細胞の支持細胞の一つであるセトリ細胞から分泌される MIS (mullerian inhibiting substance, TGF スーパーファミリーに属する増殖抑制因子) の働きにより、将来、輸卵管および子宮に発達する予定のミューラー管と呼ばれる原基の発育が抑えられ、ついには

痕跡化に至るという興味深い現象を見せる。さらに、精巣の間質細胞であるライディッヒ細胞から分泌される雄性ステロイドホルモン (テストステロン) の作用により、雄型生殖器の成熟と雄型個体への発育が完成に向かう⁽²⁾。

一方、鳥類においては、性染色体の組み合わせと性の決定との関係は哺乳類とは逆 (ZZ: ♂, ZW: ♀) であり、また SRY に相当する遺伝子も現在までのところ性染色体上からは発見されておらず、鳥類の性決定機構については哺乳動物以上に不明な点が多い。また、哺乳動物の SRY にしても、これ以外の性決定遺伝子の存在が示唆されるなど、動物の性決定機構についてはまだ未知の部分が多い。

鳥類においては、哺乳類以上にその初期胚における性決定機構に対して、性ステロイドホルモンの果たす役割の重いことが明らかにされてきた。これには遺伝的には雌 (染色体型: ZZ) のニワトリ 5 日目胚に対し、雌性ステロイドホルモンであるエストラジオールの合成酵素チトクローム P 450_{arom} (アロマターゼ) の阻害剤である 5-(*p*-cyanophenyl)-5, 6, 7, 8-tetrahydroimidazo[1, 5-*a*]-pyridine-hydrochloride を投与することで、この胚から成長したニワトリは精巣を持ち、精子まで産生する雄型個体 (ただし不稔) に生育するとの報告がある⁽³⁾。このように、ニワトリの性決定において重要な役割を果たしていることが示唆されるチトクローム P 450_{arom}、すなわちアロマターゼは、雄性ステロイドホルモンのテストステロンまたはアンドロステンシオンから 3 回の連続する反応を経て雌性ホルモンであるエストラジオール、またはエストロンを合成する性ステロイドホルモン合成の key enzyme である。図 1 に動物におけるステロイドホルモンの合成経路を示す。

ニワトリアロマターゼは、初期胚に由来する mRNA

図 1 ■ 動物のステロイドホルモン合成経路

中の微量転写物を PCR 法を用いて検出する実験によっても、発生開始後 5～6 日目の雌胚で、雄を上回る発現が見いだされた⁽⁴⁾。ニワトリアロマターゼ遺伝子の発現は雌雄の決定に関して重要な機能を果たしていることが予想されるが、特にその性決定に影響の大きい初期胚での発現の制御に関して、性決定機構との関係に興味を持たれる。

☒ 哺乳動物のアロマターゼ遺伝子の発現制御 ☒

現在、動物のアロマターゼ遺伝子の発現制御の研究は、主にヒトおよびラットにおいて行なわれている。ヒトアロマターゼの発現制御については、ヒトの各組織、すなわち卵巣、前立腺、胎盤、肝臓、脂肪組織などにおいてそれぞれ異なる転写開始点からスタートした転写物が、異なるスプライシングを受け、最終的に同じオープンリーディングフレーム (ORF) を持つ転写物となることが報告されており⁽⁶⁾、またヒト胚の各組織においても成人組織での転写開始点とは異なる開始点からスタートしている⁽⁹⁾など、霊長類においてはきわめて複雑な転写制御を受けていることが示唆されている。

一方、生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現の制御については、ラットアロマターゼ遺伝子についての研究が

進みつつある⁽⁷⁾。アロマターゼ遺伝子やチトローム P 450_{sec}, 3 β -HSD (hydroxysteroid dehydrogenase) などの性ステロイドホルモン合成遺伝子の発現は、生殖腺組織特異的であるとともに、脳下垂体より分泌される濾胞刺激ホルモン FSH (follicle stimulating hormone),あるいは黄体刺激ホルモン LH (luteinizing hormone) といった生殖腺刺激ホルモンにより活性が誘導され上昇することが知られている。これらの誘導は G-プロテイン共役型レセプターへの生殖腺刺激ホルモンの結合と、それによる細胞内 cAMP の上昇、そしてさらにプロテインキナーゼ A の活性化を経て CREBP (cAMP response element binding protein) の活性化により転写の誘導にいたると説明されていた。

しかし、ラットアロマターゼ遺伝子についての研究では、細胞内 cAMP の上昇をもたらす folskolin により、アロマターゼ遺伝子は発現が上昇するものの、その発現の制御領域には cAMP の上昇により活性化するプロテインキナーゼ A のターゲット転写因子である CREBP の結合サイトである“CRE 配列”は見いだされていない。それにもかかわらず、ラットアロマターゼ遺伝子上流域を -82 まで削った組換え体においてもなお cAMP の上昇に反応し転写を活性化する機能のあることが確かめられており⁽⁷⁾、従来のアデニルシクラーゼ→プロテイン

キナーゼA→CREBP の経路では説明できないシグナル伝達の経路のあることが示唆されている。そして、このラットアロマトラーゼ遺伝子の培養細胞での恒常的発現、および卵胞顆粒膜細胞での cAMP の上昇による誘導的発現に対して、転写開始点より -75~-80 付近に存在する AGGTCA モチーフ (Ad 4 BP/SF-1) が密接な関与をしている可能性が高い⁽⁷⁾。

一方、鳥類アロマトラーゼ遺伝子の発現の制御については現在筆者らが研究を進めているが、いまだで明らかになったことについて以下に紹介したい。

☒ ニワトリのアロマトラーゼ遺伝子の発現制御 ☒

ニワトリアロマトラーゼ遺伝子の発現制御に関する実験をニワトリ初期胚で行なうことは困難であるため、まずアロマトラーゼ遺伝子のニワトリにおける主要な発現組織である産卵鶏の卵巣由来の初代培養細胞を用いてこの遺伝子の発現制御機構を明らかにしていくこととした。ニワトリ卵巣においては、卵胞を形成する莢膜、顆粒膜細胞のうち外側に位置する莢膜細胞において、エストラジオールの合成が盛んであるとの研究が発表されている。ニワトリ卵巣は、放卵直前の F1 卵胞から大きさの順に F2, F3, F4 と命名され、卵胞の構造中、中心部の卵黄 (yolk) を含む巨大な卵細胞の周りを取り囲む支持細胞の顆粒膜細胞と、基底膜を隔ててその外層を囲む莢膜細胞が主なステロイド合成の場であることがわかっている。哺乳類と鳥類の卵胞では、これら基本的な細胞の構成は同じだが、各ステロイドホルモンの合成の場は微妙に異なり、哺乳類では卵巣の顆粒膜細胞においてアロマトラーゼ発現が観察されるが、ニワトリではその外層の莢膜細胞で発現していることが報告されており、筆者らの研究でも莢膜細胞層、それも未成熟のより小さい卵胞のそれにおいてより強いアロマトラーゼの発現が認められた⁽⁸⁾。

筆者らは DNA 導入実験に必要な量の細胞を手に入れる都合上、分離莢膜細胞と同様の強いエストラジオールの合成が報告されている黄色小卵胞より取得した初代培養細胞 (莢膜細胞と顆粒膜細胞の混合系と考えられる) を対象として実験を行なった。この黄色小卵胞より得た初代培養細胞中で、ニワトリアロマトラーゼ遺伝子の細胞特異的な発現を規定しているエレメントと、先述の cAMP による誘導性を規定しているエレメントを中心

に制御配列の探索を行なった。

まず、ニワトリアロマトラーゼ遺伝子の転写開始点より上流約 2,000 bp の塩基配列を決定し、この DNA 断片を上流より削った幾つかの組換え体を CAT リポーター遺伝子につないで前述の細胞に導入し、その発現が活性化する領域を調べた。対照としてはニワトリ胚繊維芽細胞を用いた。その結果、繊維芽細胞、黄色小卵胞細胞ともにその転写を抑制する領域が転写開始点より -303~-146 の間にあることがわかった。さらに、アロマトラーゼ遺伝子上流域を削り込むと、-303 までは見られなかった活性が -146 まで削除すると、基底レベルの活性が約 3 倍に、また folskolin による誘導活性が 5 倍にも高まることが判明した。

この 0~-146 の領域について詳しく既存の *cis*-element と比較したところ、-145 と -88 に Ad 4 BP/SF 1 結合エレメント (Ad 4) にきわめて類似した 2 つの配列 (TCAAGGTCA, -133~-125) および (TCCAGGTCA, -43~-35) が見いだされた。この Ad 4 配列は九大の諸橋らがチトクローム P 450_{11β} 遺伝子の副腎における特異的な発現を明らかにするための実験から得られた発現制御モチーフである。また Ad 4 配列は、前節で紹介したラットアロマトラーゼ遺伝子上流域に見つかった AGGTCA モチーフと同様、幾つかのステロイドホルモン合成遺伝子の制御領域に共通に存在していることが示唆されており、このエレメントに結合する転写因子 Ad 4 BP がウシ⁽⁹⁾より、またそのホモログである SF-1 (steroidogenic factor 1) がラット⁽¹⁰⁾よりそれぞれクローニングされている。これらの転写因子は同じくステロイドホルモン合成を行なっている組織で広く発現していることが示唆されている⁽¹¹⁾ほか、embryonal carcinoma cell (胚性癌腫細胞) 由来の cDNA ライブラリーから、同一遺伝子に由来し異なったプロモーターを用いて異なったスプライシングを受けた転写物、ELP (embryonal long terminal-binding protein) としても見いだされている⁽¹²⁾。この配列に結合する Ad 4 BP/SF-1 はステロイドホルモンレセプタータイプの、リガンド不明型の転写因子と考えられている。

ウシ Ad 4 BP 発現ベクターとともにニワトリアロマトラーゼ遺伝子上流域の制御領域と思われる配列にリポーター遺伝子を連結したリポーター遺伝子をニワトリ繊維芽細胞に導入したところ、アロマトラーゼ遺伝子の発現が

促進されることが観察され⁽¹³⁾, また細胞において発現させたウシ Ad 4 BP がニワトリアロマターゼ遺伝子上流の配列 TCAAGGTCA に結合することが確認された。現在, 黄色小卵胞由来の細胞中に Ad 4 BP/SF-1 様の蛋白質が存在する可能性について検索を行なっている。

☒ ステロイドホルモン合成遺伝子共通の転写因子 Ad4BP/SF-1 ☒

一方, 最近 Ad 4 BP/SF-1 のマウスにおけるホモログである *Ftz-f 1*¹²⁾ 遺伝子を破壊したマウスにおいて, ステロイドホルモンの合成器官であり, また発生学的にも同じ中胚葉に由来し, きわめて近縁の組織である卵巣, 精巣および副腎のいずれもが欠失したマウスが生まれた(生後数日で死亡する)との報告があった⁽¹⁴⁾。このように, Ad 4 BP/SF-1 がステロイド合成遺伝子, および生殖に関係する遺伝子の発現制御に重要な関わりを持つ可能性は高い。また, そのニワトリホモログがアロマターゼ遺伝子の発現制御に関わっている可能性も否定できない。しかし, ニワトリ初期胚でのアロマターゼ遺伝子の発現制御や, あるいはその生殖腺の発達に関する本遺伝子の発現場所, 時期などについての情報は少なく, またこの factor だけでニワトリ初期胚でのアロマターゼ遺伝子の発現や生殖腺における組織特異的な発現, 生殖腺ホルモンによる誘導などを説明することも困難ではあ

るが, 今後の展開が期待されるところである。

文献

- 1) A. H. Sinclair, P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A.-M. Frischauf, R. Lovell-Badge & P. N. Goodfellow : *Nature*, 346, 240 (1990).
- 2) M. M. Lee & P. K. Donahoe : *Endocrine Rev.*, 14, 152 (1993).
- 3) A. Elbrecht & R. G. Smith : *Science*, 255, 467 (1992).
- 4) 野村 修, 西森克彦, 水野重樹: 1990 年度日本農芸化学会大会講演要旨, p. 214 (1991).
- 5) N. Harada, T. Utsumi & Y. Takagi : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11312 (1993).
- 6) K. Toda, E. R. Simpson, C. R. Mendelson, Y. Shizuta & M. W. Kilgore : *Mol. Endocrinol.*, 8, 210 (1994).
- 7) S. L. Fitzpatrick & J. S. Richards : *Mol. Endocrinol.*, 7, 341 (1993).
- 8) H. Hoshino, K. Nishimori & S. Mizuno : unpublished data.
- 9) S. Honda, K. Morohashi, M. Nomura, H. Takeya, M. Kitajima & T. Omura : *J. Biol. Chem.*, 268, 7494 (1993).
- 10) J. P. Lynch, D. S. Lala, J. J. Peluso, W. Luo, K. L. Parker & B. A. White : *Mol. Endocrinol.*, 7, 776 (1993).
- 11) K. Morohashi, S. Honda, Y. Inomata, H. Handa & T. Omura : *J. Biol. Chem.*, 267, 17913 (1992).
- 12) T. Tsukiyama, H. Ueda, S. Hirose & O. Niwa : *Mol. Cell. Biol.*, 12, 1286 (1992).
- 13) H. Ikushima, H. Hoshino, K. Morohashi, T. Omura, K. Nishimori & S. Mizuno : in preparation.
- 14) X. Luo, Y. Ikeda & K. L. Parker : *Cell*, 77, 481 (1994).

ヴィルヘルム・ペッフアー

分子生理学の先駆者——現代に生きる研究と洞察

E. ユンニング 著／田沢 仁・増田芳雄・松本友孝・橋本 明 訳

四六判／205頁／2060円(税込)

新生氣論, 観念論の形態学がいまだ残存し, さらにその反動として極端な還元主義が台頭する19世紀末に, 生命現象の複雑さを直視し首尾一貫して物理化学的法則で理解しようとした分子生理学の先駆者の足跡。実験生理学的手法を切り拓きながら, 植物学者から植物生理学者, さらに一般生理学者へと変身してゆく研究者像が, ザックス, ダーウィン等々, 当時の自然科学者との交流や激論を通して描かれる。260 人にも及ぶペッフアーの門下は世界に広がり, 我国の植物生理学, 微生物化学, 生化学の祖「柴田桂太」はその1人である。

学会出版センター