

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	真骨魚類2分子種 AR 遺伝子による雄性形質発現の分子機構
応募事業区分	事業枠③「女性研究者研究支援事業」
申請代表者氏名	荻野 由紀子

○ 研究状況報告

平成23年度にアンドロゲン受容体(AR α 、AR β)変異体をメダカ Tilling ライブラリーからスクリーニング、*in vitro* 機能解析から変異体を選出した。現在バッククロスを行っており、平成24年度に表現型解析を行い、真骨魚類2分子種 AR 遺伝子の二次性徴発現過程における役割を明らかにする予定である。また、アンドロゲン投与により、雌に雄の形質である尻鰭乳頭状突起の形成を誘導し、マイクロアレイ解析、定量 PCR、*In situ hybridization* により乳頭状突起を形成する尻鰭後方側でアンドロゲンによって特異的に発現する遺伝子群を同定した。平成24年度は、これらの因子群についての機能解析を行うとともに、AR 変異体と野生型とのマイクロアレイ解析、Androgen 応答細胞を可視化するトランスジェニックメダカを用いたアンドロゲン応答細胞の分化系譜解析を行うことで、アンドロゲンによる二次性徴発現の分子機構を明らかとする。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

アンドロゲン投与により、乳頭状突起を形成する尻鰭後方側でアンドロゲンによって Bmp7、Lef1、Dlx5 の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなり、Bmp および Wnt シグナリングがアンドロゲンにより活性化され、乳頭状突起形成を誘導している可能性が示された。また BrdU incorporation assay により、形成中の乳頭状突起周辺部で細胞増殖の頻度が高いことが明らかとなり、アンドロゲンにより活性化された Bmp 及び Wnt シグナリングが骨芽細胞の分化、増殖を制御し、雄の二次性徴としての乳頭状突起形成に貢献している可能性が考えられた。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	真骨魚類2分子種 AR 遺伝子による雄性形質発現の分子機構
応募事業区分	事業枠③「女性研究者研究支援」
申請代表者氏名	荻野 由紀子

○ 研究状況報告

平成 23 年度に真骨魚類 2 分子種 AR 遺伝子の二次性徴発現過程における役割を明らかにするために、アンドロゲン受容体(AR α 、AR β)変異体をメダカ Tilling ライブラリーからスクリーニング、*in vitro* 機能解析から変異体を選出した。H24 年度は、これらの個体の 5 世代のバッククロスに時間を要した。現在表現型解析に着手している。アンドロゲン投与により、雌に雄の形質である尻鰭乳頭状突起の形成を誘導し、マイクロアレイ解析、定量 PCR、In situ hybridization により、乳頭状突起を形成する尻鰭後方でアンドロゲンによって特異的に発現する遺伝子群を同定した。平成 24 年度は、これらの遺伝子群について、詳細な遺伝子発現解析、阻害剤を用いた機能解析を行い、アンドロゲンシグナリングの新規 effector 因子として、Bmp7, Lef1 を同定した。さらに、Androgen 応答細胞を可視化するトランスジェニックメダカを用い、二次性徴としての papillary processes 形成過程におけるアンドロゲン応答細胞を同定した。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

平成 23 年に選出したアンドロゲン依存性の新規 effector 候補因子について、アンドロゲン投与後の時空間的遺伝子発現解析、免疫染色を行い、以下の結果からアンドロゲン effector 因子として Bmp7, Lef1 を同定した。

結果 1) アンドロゲンによって尻鰭乳頭状突起形成領域で投与 48 時間以内に Bmp7、Lef1 遺伝子が特異的に発現誘導されることが明らかとなった。

結果 2) Bmp シグナル活性化の指標とされる phospho-smad 抗体を用いた免疫染色から、Bmp シグナルがアンドロゲンにより、乳頭状突起形成部において活性化されることが確認できた。

3) Lef1、 β -catenin 抗体を用いた免疫染色により、これらの因子が乳頭状突起の間葉細胞層で、共局在することが明らかとなり、Wnt シグナリングが、アンドロゲンによって活性化されていることが示された。

以上の結果から、Bmp7、Lef1 を新規アンドロゲン effector 因子として同定した。

組織学的解析から、乳頭状突起は尻鰭後方の鰭条から分岐した bone nodule として形成され、bone nodule を取り囲む肥厚した間葉では、細胞増殖の顕著な亢進がアンドロゲンによって誘導されることが明らかとなった。さらに骨芽細胞で特異的に DsRed を発現する osterix-DsRed トランスジェニックメダカを用いて、骨芽細胞の分化を可視化した結果、bone nodule に密着した細胞層で骨芽細胞がアンドロゲンによって分化する

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

ことが明らかとなった。

このようなプロセスのどの段階に **Bmp7**, **Lef1** が寄与しているのか明らかにするために、**Bmp** シグナルの阻害剤を投与した結果、**Lef1** の発現が減少し、乳頭状突起周辺部の間葉細胞の増殖が顕著に抑制され、骨芽細胞分化が抑制されることが明らかとなった。よって、アンドロゲンによる **Bmp** シグナリングの活性化が、**Lef1** 遺伝子の発現を介して、乳頭状突起周辺部の間葉細胞の増殖亢進、骨芽細胞分化を促進して、**bone nodule** の伸長を制御していると考えられた。

以上の研究から、アンドロゲン-**AR** 遺伝子による雄性形質発現の分子機構として、アンドロゲンが **Bmp7**, **Lef1** といった増殖因子経路の遺伝子発現制御を介して、二次性徴発現を制御していることが明らかとなった。今後さらに、**AR** 変異体を用い解析から、ゲノム倍数化に伴う **AR** 遺伝子重複と真骨魚類雄性形質多様化との関連性について、新たな知見を得ることのできる。

- 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)
現在投稿準備中