

ホルモンおよび遺伝的要因が雌雄の脳における遺伝子発現の違いに及ぼす影響
東北大学 伊藤裕一郎
派遣期間 2002年11月8日～現在
研究機関 Department of Physiological Science, University of California Los Angeles,
California, USA 90095-1606
研究指導者 Prof. Arthur P. Arnold

<研究課題1>

マウス脳細胞培養系における性差の研究 (申請書記載の研究課題・実験系)

研究の背景

前任者の研究結果 (Carruth LL, Reisert I, Arnold AP (2002) Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. *Nat Neurosci.* **5(10)**: 933-934.) より、マウスの脳における性差がホルモンではなく性染色体構成によって引き起こされる可能性が示唆された。そこでその研究を更に発展させ、Y染色体の関与、X染色体構成の違い、更に PAR (pseudo autosomal region) の関わりに関する解析を進める。

実験系

前任者の研究で使用された XY-Sry マウス (Sry 遺伝子が Y 染色体から欠落したマウスに Sry トランスジーンを組み込んだもの) 実験系に加え、XY*マウス (XO を始めとする様々な F1 マウスを産む) 実験系を用い、脳細胞培養系を用いて性ホルモンの影響を無くした上で解析を行う。

結果と考察

脳細胞培養系技術を習得することは出来たが、前任者の結果を再現する事は出来なかった。更に別の研究員が同様に再現を試みたが、失敗に終わった。前任者との違いは培養後の神経細胞数から始まり、400万個の細胞から培養を始めて、前任者が最終的に3000個となったのに比べ、本人と別の研究員の場合では20万個以上の神経細胞が生き残った。結論として、前任者が使用した血清のロットが何らかの影響をもたらしたのではないかと考える。従って同じ血清のロットが使えない限り再現は不可能であろうとの事から、この研究は凍結した。

<研究課題2>

ゼブラフィンチの細胞遺伝学的解析と脳の性差に関する解析

研究の背景

ゼブラフィンチは複雑な社会行動を見せ、特に性行動において顕著な性差を示す。神経科学の分野ではこの性行動が特に研究されており、雌雄における脳の構造にも違いが見出さ

れていた。過去数十年間において、この性差は性ホルモンによって引き起こされていると考えられていたが、近年の論文 (Agate RJ, Grisham W, Wade J, Mann S, John W, Schanen C, Palotie A, Arnold AP (2003) Neural, not gonadal, origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4873-4878.) によって性染色体上の遺伝子がこの性差に関与している可能性が浮上してきた。ところが、鳥類において最も研究されているニワトリに比べ、ゼブラフィンチに関する研究は神経科学分野に限られており、分子生物学的・細胞生化学的研究は十分に成されていない状態であった。そこで、本研究では、ゼブラフィンチに関する基礎的な細胞生化学的情報の蓄積を様々な観点から試みた。

結果と考察

(1) **Painting** 技術によるニワトリ-ゼブラフィンチ間の進化的距離の解析と染色体多型の検出

ニワトリの染色体を元にした **Painting** 技術によりゼブラフィンチの染色体を染める事により、同二種間における進化的距離の解析を行った。その結果、二種間においては幾つかの染色体の分裂・融合はあったものの、非常に高い保存性を保っていた。また、W染色体の検出はされなかった事から、この染色体の進化が非常に早いものと推測された。

また、ゼブラフィンチのコロニー内に6番染色体の染色体多型が存在している事が明らかになり、その検出はセントロメアの位置で容易に成されることが明らかになった。

(Reference)

Itoh Y and Arnold AP (2005) Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. *Chromosome Research* **13**(1): 47-56.

(2) ヒトX染色体上の遺伝子のゼブラフィンチにおける **mapping**

染色体の進化という観点から、鳥類とほ乳類の比較は興味深い。そこで、ヒトのX染色体上の遺伝子[androgen receptor (AR)、double cortex, X-linked (DCX)、Sex determining region Y-box3, (SOX3)]がゼブラフィンチの染色体上でどこに位置するかを調べた。ニワトリの知見ではこれらは4番染色体上に位置していたが、ゼブラフィンチにおいてはマイクロ染色体上に位置していた。また、それらが同一の染色体上であった事からこれらが強くグループを形成して進化の過程で動いている事が示唆された。

(Reference)

Itoh Y, Kampf K and Arnold AP (2006) Assignment of human X-linked genes to a zebra finch microchromosome by in situ hybridization of BAC clones. *Cytogenet Genome Res.* **112**(3-4): 342M.

(3) **ゼブラフィンチZ染色体の進化**

鳥類性染色体構成は雌ヘテロ型のZWであり、Z染色体は比較的大きく、その遺伝子数も多いものと予想される。キジ目においては、Z染色体の構造またその遺伝子配置は保

存性が非常に高いことが報告されている。(1)における **Painting** 技術による解析で、ニワトリ-ゼブラフィンチ間ではZ染色体の配列的保存性は高い事が予測された。そこで、更なる解析としてZ染色体上の遺伝子の位置関係を調べ、ニワトリとの進化上の相違を調べた。Z染色体上に位置する14遺伝子の位置関係を調べたところ、ニワトリ-ゼブラフィンチ間では数回にわたる転位が生じている事が明らかとなった。従って、キジ目以外の鳥類においては、Z染色体上の遺伝子配置に進化上での違いが生じている事が予測された。

(Reference)

Itoh Y, Kampf K, Arnold AP. Comparison of the Chicken and Zebra Finch Z Chromosomes Shows Evolutionary Rearrangements. *Chromosome Research*. In press.

(4) ゼブラフィンチW染色体上に存在する反復配列のクローニング

鳥類W染色体は、ダチョウなどの一部の例外を除いてZ染色体に比べて非常に小さくヘテロクロマチン化しており、反復配列の存在が示唆されている。ニワトリを始めとするキジ目においてはW染色体上の反復配列の解析は進められており、多くの配列が報告されているが、キジ目以外の鳥類では、その情報は欠けていた。本研究では、**random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR** 法によりゼブラフィンチW染色体特異的な反復配列をクローニングし、**FISH (fluorescent *in situ* hybridization)**により確認した。本研究において取得したゼブラフィンチW染色体特異的な反復配列は、W染色体全体に存在する事が明らかになったが、他鳥類における保存性は低い事から、鳥類W染色体上の反復配列は、それぞれの目あるいは科の単位で進化した事が予測された。

(5) 性染色体遺伝子における遺伝子量補正の解析

性染色体上の遺伝子は、その遺伝子量に違いが生じる。例えば哺乳類の場合、X染色体は雄に1本、雌に2本存在しているため、遺伝子量を補正するメカニズムが無いとしたらその遺伝子量は雄：雌で1：2となってしまう。ところが哺乳類では、雌のX染色体のうち1本が不活化されており、これにより雌雄間での遺伝子量が補正されている。一方で鳥類の場合、Z染色体は雄に2本、雌に1本存在しているが、遺伝子補正機構は働いていないであろうと長年信じられてきた。しかしながら、これは限られた研究からもたらされた結論であり、数多くの遺伝子に関する研究は成されていなかった。そこで、本研究ではマイクロアレイのシステムを用い、ゼブラフィンチとニワトリにおいてその雌雄間でのZ染色体遺伝子発現量を解析し、哺乳類(ヒト、マウス)との比較を行った。興味深い事に、哺乳類では常染色体上遺伝子とX染色体上遺伝子の雌雄における発現はほぼ同じラインを辿った一方で、鳥類Z染色体遺伝子のそれは、常染色体遺伝子からは大きくはずれ、雄側にシフトしたものであった。従って、鳥類における性染色体上遺伝子の遺伝子量補正は、存在しないかあるいは機能が低いかのいずれかであろうという結論に達した。