

## マイクロアレイによるニワトリ性的二色性の分子基盤の解析

Microarray analysis sheds light on the molecular basis of sexual dichromatism in chickens

深尾 彩加・中岡 実乃里・高橋 純夫・竹内 栄  
Ayaka Fukao, Minori Nakaoka, Sumio Takahashi, Sakae Takeuchi

岡山大学大学院自然科学研究科生体統御学グループ  
Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

はじめに

性成熟の過程で生じる性差, 即ち, 第 2 次性徴 (secondary sexual characteristics) のうち, 形態的な性差を性的二形 (sexual dimorphism) という。

ヒトの皮膚や皮膚付属器(毛や汗腺, 皮脂腺など) は性的二形を示し, 性ホルモンによる制御を受ける [1,2]。毛のタイプの決定や成長には女性ホルモンと男性ホルモンの両者が密接に関与するが [3], その作用は複雑であり, 体の部位によって異なる。たとえば, 男性ホルモンは男性毛と呼ばれる特定の部位の毛(ひげ, 胸毛, 上肢や下肢の毛, 脇の毛, 陰毛など) の成長を促進する一方で, 前頭部や頭頂部に生える毛の成長を抑制する。また, 後頭部の毛やまゆ毛などは男性ホルモンの影響を受けないとされる [4]。このことは, 女性におけるアンドロゲン過剰症 (hyperandrogenism) が男性型多毛症 (hirsutism) を示すこと, 50% 以上の男性が 50 歳までに男性型脱毛症 (androgenic alopecia; AGA) を発症することと密接に関連している [5]。

男性ホルモンに応答する毛包は, すべて同じアンドロゲン受容体 (AR) を持つにも拘らず [4], 上述のように異なる反応性を示す。その原因の一つとして, テストステロンをより強力なジヒドロテストステロン (DHT) に変換する II 型 5 $\alpha$ 還元酵素 (5 $\alpha$ -reductase type 2) の発現差が示唆されている [6]。実際, AGA 治療において II 型 5 $\alpha$ 還元酵素の阻害剤であるフィナステリド (finasteride) が有意な効果をもたらすことが報告されている [7,8]。しかし, DHT の前頭部や頭頂部の毛包に対する作用機序, 体の他の部位の毛包で逆の効果を示す仕組みなど, 性ホルモンの毛包に対する作用の詳細は今なお不明な点が多く残されている [5]。

鳥類の羽は哺乳類の毛と同様に, 表皮細胞に由来する皮膚付属器である。ニワトリの羽色は主に羽包メラノサイトが産生する黒~褐色のメラニン色素 (ユーメラニン) と黄~赤色のメラニン色素 (フェオメラニン), および羽の微細構造が創り出す光沢 (構造色) に起因する。ニワトリでは, 羽色に性的二形が見られ, 鞍に生じる羽は, 雌と成鶏雌ではくすんだ褐色を呈するのに対し, 成鶏雄では黄金色 (光沢のある黄色) を呈する。一方, 胸部に生じる羽では, 雌と成鶏雌がクリーム色を呈するのに対し, 成鶏雄は黒色の混ざった暗色を呈する。成鶏雄の羽色が雌雄に共通な発生におけるデフォルトであり, 成鶏雌の羽色

は卵巣由来のエストロゲンの作用により創出されることから [9], エストロゲンは鞍と胸の羽包ではメラニン産生に関して正反対の作用を示すことになる。従って, ニワトリの羽色性的二形 (性的二色性; sexual dichromatism) 創出のしくみを解析することは, ヒトの毛包に対する性ホルモンの作用機序を考える上でも重要な知見を与えてくれることが期待できる。

本研究では, 性的二色性の分子基盤を明らかにする目的で, おかやま地どりの雄鞍に生じた中雛型羽, 成鶏雄型羽, およびエストロゲン的一种であるエストラジオール 17 $\beta$ (E2) 存在下で生じた成鶏雌型羽様羽に発現する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。

材料と方法

実験動物と羽包の採取

本実験では, 畜産研究所 (岡山県久米郡美咲町北 2272) から譲り受けた雄のおかやま地どりをを用いた。おかやま地どりは遺伝的に不均一なため, 羽包サンプル (5 週齢鞍の中雛型羽包, 8 週齢鞍の成鶏雄型羽包, E2 処理した 11 週齢鞍の成鶏雌型羽包) はすべて同一個体から採取した。すべての実験は岡山大学動物実験ガイドラインに従って行われた。

E2 処理

8 週齢のおかやま地どりの鞍に生えた羽包をエーテル麻酔下で抜いた後, estradiol 17- $\beta$  (E2; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を詰めた 2.5 cm の silastic tube (0.062 in. ID  $\times$  0.125 in. OD; Dowcorning, Midland, MI, USA) を皮下移植した。

RNA 抽出

羽包サンプルから TRIzol Reagent (Invitrogen) を使用して全 RNA を抽出した。抽出した RNA に含まれるメラニン色素を除去するため, チオシアン酸ゲアニジン/塩化セシウム勾配超遠心法 [10,11] により全 RNA を更に精製した。得られた全 RNA は DEPC 処理した蒸留水に溶かして -80 $^{\circ}$ C で保存した。

マイクロアレイ解析

タカラバイオ (株) ドラゴンジェノミクスセンター (三重県四日市市桜町 7870 番地 15) の Chicken (V2) を用いた Agilent array 発現解析受託サービスを利

用した。また、データの解析には GeneSpringGX11 (アジレント・テクノロジー株式会社)を用いた。

## RT-PCR 解析

全 RNA 1.5 $\mu$ g を Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen)で処理した後, ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行った。PCR 反応は, Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen)を用いて GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems)で行った。PCR のサイクル数は, *ASIP*, *OCA2*, *OCA3*, *Gapdh* がそれぞれ, 24, 24, 20, 18 サイクルであった。*ASIP*と *Gapdh*のプライマー対は報告されているもの[12]を用い, *OCA2*と *OCA3*のプライマー対は以下の通りであった。*OCA2* (FP: 5'-AGA TGC TCC TGA GGA AGA AGC-3', RP: 5'-TGT CAA TCA CAG ACG AGG CCA-3'), *OCA3* (FP: 5'-CTG GAA ATG TTG CAC GGC CTA-3', RP: 5'-GCT GTA TCC CAG GTT TTC TGG TGC-3')。

## 結果と考察

### 雄鞍羽の成長に伴う変化と E2 の効果

おかやま地どりは, ロードアイランドレッドと横斑プリマスロックとのかけあわせで生じた雌(ゴールドネック)と, 白色プリマスロックとの交配で作出される(三元交配鶏)。遺伝的に不均一な品種であり, 黒色拡張遺伝子座に関しても優性対立遺伝子 *E*をもつ個体ともたない個体があり, その結果, 黒色羽装と野生型様羽装が混在する。野生型様羽装も多様性に富んでおり, 羽色の個体間比較は難しい。おかやま地どりでは羽包を引き抜くと 2~3 週間で羽包が再生される。本研究ではこの再生羽形成能を利用し, 中雛型羽と成鶏型羽との比較, および E2 処理の羽形質に及ぼす影響については同一個体で行った。

図 1 に示すように, 中雛型羽は先端が丸い形状で, 白色横斑以外の部分は黒や茶のユーメラニンが優位であった。これに対し, 成鶏雄型羽は先端が尖った飾羽であり, 白色横斑以外の部位は光沢のある黄金色を呈した。一方, E2 存在下で誘導した再生羽は中雛型羽と同様に先端が丸く, 白色横斑以外の部分は黒や茶のユーメラニンが優位であった。成鶏雄型羽の光沢は構造色によるもので, 羽枝軸に小羽枝を欠く構造に起因する。E2 処理により生じた成鶏の羽は光沢を失い, くすんだ色を呈するが, その羽では小羽枝が観察された。この特徴は成鶏雌型羽の特徴と一致する。

白色横斑は Z 染色体に位置する伴性横斑遺伝子座 (sex-linked barring)の優性対立遺伝子に起因する。性染色体に関して雄ホモ雌ヘテロであるため, 白色横斑の度合いに雌雄差が生じる。本研究では雄を用いているため, 図 1 の羽の横斑は鮮明で雄型を示している。しかし, 白色横斑を除く形質においては, E2 処理により生じた成鶏の羽は, 成鶏雌型羽に酷似していた。このことは, 成鶏雄型羽が成鶏型羽のデ

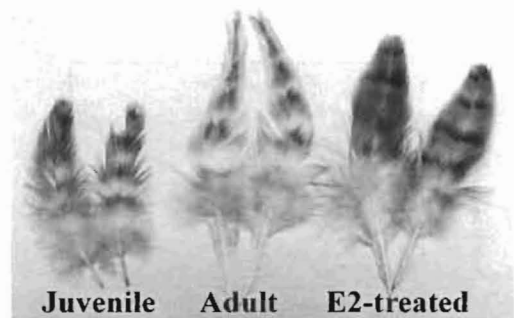


図 1 雄鞍羽の成長変化と羽形成に及ぼす E2 の効果

おかやま地どり雄鞍部に生じた中雛型羽(juvenile), 成鶏雄型羽(adult), および E2 処理により生じた成鶏雌型羽様羽(E2-treated)を示す。すべて同一個体に由来する。

フォルトであり, E2 が成鶏雄型羽形成を成鶏雌型羽形成に変更するという説[9]を強く支持する。以降, E2 処理により生じた成鶏羽を E2 処理成鶏雌型羽様羽と呼ぶ。

### 中雛型羽, 成鶏雄型羽, および E2 処理成鶏雌型羽様羽の遺伝子発現プロフィール

マイクロアレイ解析により得られた羽における遺伝子発現プロフィールを図 2 に示した。成鶏雄型羽における発現と比較し, 中雛型羽もしくは E2 処理成鶏雌型羽様羽で 30 倍以上の発現変化が観察された遺伝子は 38 遺伝子あり, 中雛型羽で特異的に高発現している遺伝子が 9 つ(図 2A-a), E2 処理成鶏雌型羽様羽で特異的に高発現している遺伝子が 5 つ(図 2A-b)同定された。興味深いことに, 中雛型羽と E2 処理成鶏雌型羽様羽で, 共に 5 倍以上の発現変化を示した遺伝子を調べたところ 284 遺伝子が同定されたが, そのすべてが中雛型羽と E2 処理成鶏雌型羽様羽で同じ発現動態を示した(図 2B)。このことは, 羽の形態観察の結果(図 1)と符合し, 中雛型羽と E2 処理成鶏雌型羽様羽が遺伝子発現のレベルでもよく似ていることを強く示唆する。

### 羽色遺伝子の発現比較

成鶏雄型羽における発現と中雛型羽, E2 処理成鶏雌型羽様羽における羽色遺伝子発現レベルの比較を図 3 に示した。ヒトの眼皮膚白皮症 1(OCA1)の原因遺伝子であり, メラニン産生の鍵酵素チロシナーゼをコードする *TYR* は大きな発現差を示さなかったが, ユーメラニン産生に働く遺伝子群(*OCA2*, *OCA3*, *OCA4*, *DCT*, *PMEL*)が中雛型羽と E2 処理成鶏雌型羽様羽で高発現し, 成鶏雄型羽で発現レベルが低いことがわかった。この結果は, 中雛型羽と E2 処理成鶏雌型羽様羽では黒や茶のユーメラニンが優位であり, 成鶏雄型羽はフェオメラニンの黄金色を呈していたこと(図 1)と符合する。フェオメラニン産生はアグーチシグナルタンパク(*ASIP*)がメラノサイト膜表面のメラノコレチン 1 受容体(MC1R)

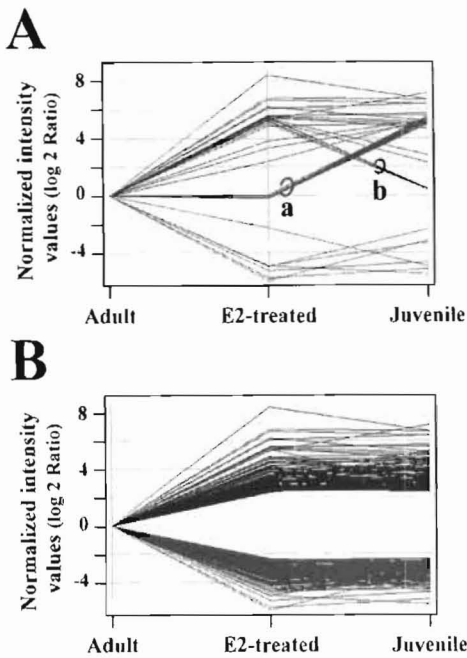


図2 中雛型羽, 成鶏雄型羽, および E2 処理成鶏雌型羽様羽の遺伝子発現プロフィール

成鶏雄型羽(adult)における発現と中雛型羽(juvenile), E2 処理成鶏雌型羽様羽(E2-treated)における発現の比較。縦軸は  $\log_2$  比を表わす。A は成鶏雄型羽における発現と比して, 中雛型羽または E2 処理成鶏雌型羽様羽で 30 倍以上の発現差がみられる遺伝子をプロットしたもので, a, b は中雛型羽または E2 処理成鶏雌型羽様羽に特異的に発現レベルが高い遺伝子を示す。B は成鶏雄型羽における発現と比して, 中雛型羽と E2 処理成鶏雌型羽様羽で 5 倍以上の発現差がみられる遺伝子をプロットしたものである。

Genes	Juvenile (log <sub>2</sub> ratio)	E2-treated (log <sub>2</sub> ratio)
<i>OCA1: TYR</i>	0.68	0.81
<i>OCA2: P-protein</i>	5.17	6.05
<i>OCA3: TYRP1</i>	5.04	5.43
<i>OCA4: SLC45A2</i>	1.03	1.14
<i>DCT: TYRP2</i>	3.95	3.43
<i>PMEL</i>	1.19	1.04
<i>SLC24A5</i>	2.92	3.32
<i>ASIP</i>	-1.77	-1.56

図3 羽色遺伝子の発現比較

成鶏雄型羽(adult)における発現と中雛型羽(juvenile), E2 処理成鶏雌型羽様羽(E2-treated)における発現の比較。数値は  $\log_2$  比を表わす。

に作用することで誘導される[10]。ASIPの発現が中雛型羽や E2 処理成鶏雌型羽様羽と比して成鶏雄型羽で高いこと, ASIPを過剰発現する黄色ウズラにおいて発現低下が報告されている SLC24A5 の発現

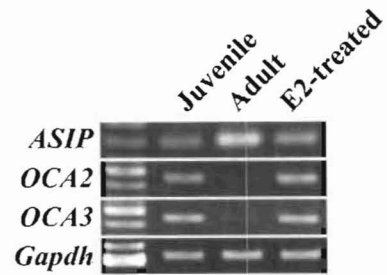


図4 中雛型羽, 成鶏雄型羽, および E2 処理成鶏雌型羽様羽における羽色遺伝子の発現

おかやま地どり雄鞍部に生じた中雛型羽(juvenile), 成鶏雄型羽(adult), および E2 処理成鶏雌型羽様羽(E2-treated)における ASIP, OCA2 および OCA3 の mRNA 発現の RT-PCR 解析。それぞれの RT-PCR 反応産物の電気泳動像を示す。左のレーンは分子量マーカーとして用いた 100bp ラダーである。

[13]が成鶏雄型羽で低いことから, 中雛型羽, E2 処理成鶏雌型羽様羽と成鶏雄型羽の羽色の違いは, ASIP の発現レベルの違いに起因する可能性が強く示唆された。

#### マイクロアレイデータの評価

上述のマイクロアレイデータの妥当性を検証するため, 各羽における ASIP, OCA2, OCA3 の発現を RT-PCR により調べた。図4に示すように, それぞれの発現はマイクロアレイデータに符合した。この結果は, 本研究での考察の信憑性を保証するものと考えられる。

#### 最後に

本研究により, 中雛型羽と成鶏雌型羽(正確には E2 投与下で生じる成鶏雄の羽)は, 表現形質においても, 遺伝子発現においても類似していることが明らかとなった。このことから, 中雛型羽形成に卵巣以外の組織に由来する E2, あるいは羽包内で局所産生される E2 が関与している可能性が初めて示唆された。また, E2 により直接的に, あるいは間接的に発現制御される遺伝子群を同定することができた。これらの遺伝子群の詳細な発現解析は, ニワトリにおける性的二色性の分子基盤を解明するだけでなく, 皮膚付属器の性ホルモン制御機構の基本原理解明する手掛かりとなるものと期待される。

本研究は, 学術研究助成基金助成金(基盤研究(C))「羽色の性差と加齢変化を創出する分子機構の解明」(課題番号 23570078)を受けて行われた。

#### 引用文献

1. Dao Jr H, Kazin RA (2007) Gender differences in skin: A review of the literature. *Gender Medicine* 4: 308-328.
2. Giacomoni PU, Mammone T, Teri M (2010) Gender-linked differences in human skin. *Journal of dermatological science*.
3. Randall VA (1994) Androgens and human hair

- growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 439-457.
4. Randall VA, Hibberts NA, Thornton MJ, Hamada K, Merrick AE, et al. (2000) The hair follicle: a paradoxical androgen target organ. *Horm Res* 54: 243-250.
  5. Mayer JA, Chuong C-M, Widelitz R (2004) Rooster feathering, androgenic alopecia, and hormone-dependent tumor growth: What is in common? *Differentiation* 72: 474-488.
  6. Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, et al. (1993) Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 92: 903-910.
  7. Whiting DA (2001) Advances in the treatment of male androgenetic alopecia: a brief review of finasteride studies. *Eur J Dermatol* 11: 332-334.
  8. Shapiro J, Kaufman KD (2003) Use of finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia (male pattern hair loss). *J Investig Dermatol Symp Proc* 8: 20-23.
  9. Owens IP, Short RV (1995) Hormonal basis of sexual dimorphism in birds: implications for new theories of sexual selection. *Trends Ecol Evol* 10: 44-47.
  10. Yoshihara C, Fukao A, Ando K, Tashiro Y, Taniuchi S, et al. (2012) Elaborate color patterns of individual chicken feathers may be formed by the agouti signaling protein. *Gen Comp Endocrinol* 175: 495-499.
  11. Yoshihara C, Tashiro Y, Taniuchi S, Katayama H, Takahashi S, et al. (2011) Feather follicles express two classes of pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA using alternative promoters in chickens. *Gen Comp Endocrinol* 171: 46-51.
  12. Yabuuchi M, Bando K, Hiramatsu M, Takahashi S, Takeuchi S (2010) Local Agouti Signaling Protein/Melanocortin Signaling System that Possibly Regulates Lipid Metabolism in Adipose Tissues of Chickens. *The Journal of Poultry Science* 47: 176-182.
  13. Nadeau N, Minvielle F, Ito S, Inoue-Murayama M, Gourichon D, et al. (2008) Characterization of Japanese quail yellow as a genomic deletion upstream of the avian homolog of the mammalian ASIP (agouti) gene. *Genetics* 178: 777-786.