

魚類における雄性ホルモンの産生ならびに受容機構

玄浩一郎^{*1}・奥 宏海^{*2}・松原孝博^{*3}

Molecular mechanism of androgen action in fish

Koichiro GEN^{*1}, Hiromi OKU^{*2}, Takahiro MATSUBARA^{*3}

Abstract Androgens are pleiotropic hormones for expression of the male phenotype. They play pivotal roles during male sex differentiation, but also during the development of secondary male characteristics and during initiation and maintenance of spermatogenesis. The biological action of androgens is mediated through the androgen receptors (AR), which are ligand-inducible transcription factors. In teleost fishes, an understanding of the molecular mechanism underlying androgen action is important not only for basic science but also for aquaculture. In this article, recent progress in several aspects of androgen action in teleosts is reviewed; namely, physiological roles, biosynthesis pathway, and structure and function of androgen receptor. Additionally, possible future directions of study are suggested.

Key words: 11-ketotestosterone, androgen biosynthesis, androgen receptor, gonad

近年、BSEや鳥インフルエンザによる食肉への不安を背景とした世界的な魚食ブームの高まりや、国内における消費者ニーズの多様化によって、様々な魚種で増養殖が行われるようになった。このため、生産者レベルでは安定的・効率的な種苗生産技術の開発が強く求められている。しかし、多くの増養殖重要魚で生殖腺の発達や卵や精子の形成過程に関する知見が集積されたものの、技術開発を合理的に進めていく上で必要な「配偶子の形成制御機構」はあまり明らかにされていない。生殖腺で合成される雄性ホルモン（アンドロゲン）は、ステロイド骨格を有する脂溶性低分子で、精巣に直接作用し、精子形成や生殖腺の発達を強く支配する主要な成熟誘導因子である。この作用を媒介するのがアンドロゲン受容体であり、それ自身は転写因子として標的遺伝子の発現調節に直接関わるという特徴を持つ。このため、アンドロゲン受容体は、雄性ホルモンの作用機構や調節機構を理解するうえで極めて重要な因子であると考えられる。しかしながら、魚類

ではアンドロゲン受容体の構造や作用機序についてはほとんど明らかにされていない。そこで本稿では、魚類の雄性ホルモンとその産生機構について概説した後、魚類で得られた知見を交えつつアンドロゲン受容体を介した雄性ホルモンの受容機構について紹介する。

魚類の雄性ホルモンとその産生機構

生殖腺でおもに合成される雄性ホルモン（アンドロゲン）は、脊椎動物全般で雄の配偶子形成、性分化、雄性生殖器の発達、第2次性徴等に深く関わっている。哺乳類では、精巣のライディヒ細胞で合成されたテストステロンが血流を介して標的細胞に到達し、細胞内で5 α 還元酵素によってジヒドロテストステロン（DHP）に変換されることで活性型の雄性ホルモンとして作用する。魚類でも、精巣でテストステロンや11-ケトテストステロン（11KT）等の雄性ホルモンが

2008年4月23日 受理 (Received on April 23, 2008)

^{*1} 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所玉城庁舎 〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田 224-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, JAPAN)

^{*2} 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 519-0193, JAPAN)

^{*3} 独立行政法人水産総合研究センター北海道水産研究所 〒085-0802 北海道釧路市桂恋 116 (Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 116, Katsurakoi, Kushiro, Hokkaido 085-0802, JAPAN)

合成されるが、このうち 11KT は、雄性ホルモン依存的な生物現象においてテストステロンより強い活性を示すことから魚類の主要な雄性ホルモンであると考えられている。特に、雄の配偶子形成においては、ニホンウナギを用いた *in vitro* 解析から、精原細胞から精子形成に至る全ての過程を制御していることがわかっている (Miura *et al.*, 1991)。また、ニホンウナギでは、雌でも卵黄形成に伴って血中 11KT 量が増加すること、*in vitro* で 11KT によって初期卵母細胞の油球の取り込みが促進されることが、ごく最近明らかとなっている (Endo *et al.*, 2007)。筆者らの雌クロマグロを用いた解析でも、性成熟過程で血中 11KT 量が高いことがわかっており、いくつかの魚類では 11KT が雌の配偶子形成、特に卵黄形成初期に重要な機能を担っている可能性が極めて高い。さらに、11KT は、生殖腺のみならず血流を介して脳下垂体に作用することで生殖腺刺激ホルモン (GTH) 遺伝子の発現調節にも関与している。これまでに、精巣除去した雄マダイを用いた解析で、11KT 投与によって FSH β mRNA の発現が抑えられることから、雄の GTH 遺伝子の主要な制御因子の一つであることが明らかとなっている (Yamaguchi *et al.*, 2005)。

雄性ホルモンはコレステロールを前駆体として生成されるが、最終的に 11KT はテストステロンから 11 β -ヒドロキシテストステロンを介して合成されることがわかっている (図 1)。興味深いことに、11KT の合成に関わる酵素は、四肢動物の副腎でのグルココルチコイド産生やミネラルコルチコイド産生に必須の酵素として同定されたものである。すなわち、11 β -水酸化酵素 (P45011 β) は、テストステロンか

ら 11 β -ヒドロキシテストステロンへの合成、11 β -水酸化脱水素酵素 (11 β -HSD) は、11 β -ヒドロキシテストステロンから 11KT への合成に関与している。これら合成酵素の実態はこれまで不明であったが、マダイを含むいくつかの魚種でその cDNA が単離され、遺伝子の構造が明らかになってきた (図 2)。その結果、魚類の P45011 β ならびに 11 β -HSD は、魚類間で相同性が高いものの、四肢動物のものとは相同性が低いことから、両酵素が進化の過程で魚類独自の機能を持ったことが推測されている。また、ニジマスにおける 2 種類の合成酵素の詳細な解析より、両者は精巣のライディヒ細胞で発現していること、精子形成に伴ってこれら酵素遺伝子の発現が増加すること、さらに、それら mRNA の発現と血中雄性ホルモン量の動態に正の相関があることがわかっている (Kusakabe *et al.*, 2003)。精巣における雄性ホルモンの産生には、哺乳類同様、脳下垂体で合成される 2 種類の GTH (FSH ならびに LH) が深く関わっている。サケ科魚類では、精子形成初期の精巣片で FSH ならびに LH が同等の 11KT 産生能を持つが、この時期には FSH のみが血中に合成・分泌されているため、FSH が 11KT の産生制御に主に働いていると考えられている。他方、マダイでは、サケ科魚類同様、*in vitro* では、FSH ならびに LH が精巣における 11KT の産生を促進するが、精子形成初期では FSH β ならびに LH β mRNA の発現が高いことから、両者が 11KT の産生をコントロールしている可能性が示唆されている (Gen *et al.*, 2000)。このように、2 種類の GTH による雄性ホルモンの産生制御機構は魚種によって異なるようである。

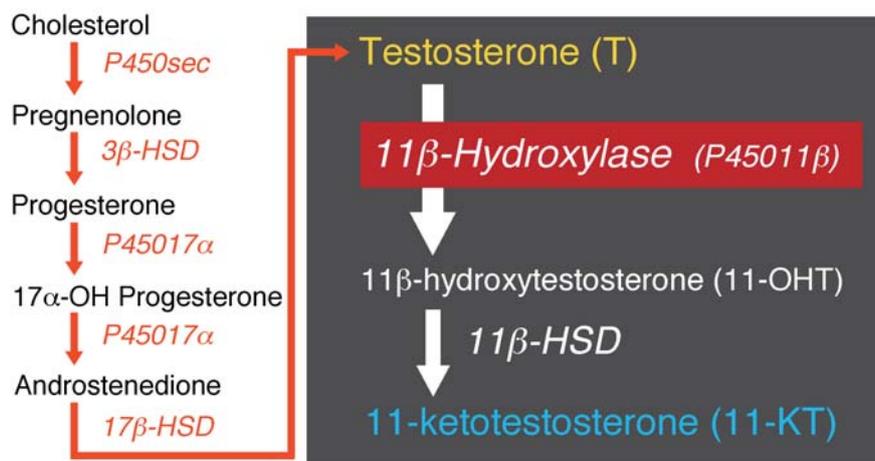


Figure 1. Schematic representation of testicular steroidogenic pathway. Abbreviations are as follows : P450sec, Cholesterol side chain cleavage enzyme; 3 β -HSD, 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase; P45017 α , 17 α -hydroxylase; 17 β -HSD, 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase; 11 β -HSD, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase.

性ホルモン自身がアンドロゲン受容体の発現に抑制的に作用することが知られている。しかし、これまでのところ、受容体遺伝子の発現領域には ARE は見いだされておらず間接的な関与の可能性が示唆されている。他方、筆者らのマダイ精巣片を用いた培養実験では、雄性ホルモンによって受容体の発現が増加することが観察されており、今後、両受容体遺伝子の発現領域等の解析が期待される。

アンドロゲン受容体を含む多くの核内受容体の立体構造の解析から、雄性ホルモンが結合するリガンド結合ドメインは 12 個の α -ヘリックスから構成され、それらがリガンドを捕らえるポケットを形成することがわかっている。さらに、この領域には遺伝子の発現を制御する転写活性化ドメインも重複して存在することが明らかとなっている。後述するように、アンドロゲン受容体を介した遺伝子の発現制御には、受容体と共役因子 (co-factor) の結合が不可欠であるが、両者の相互作用には転写活性化ドメインとリガンド結

合ドメインが深く関わっている。2つのドメイン内には、それぞれ AF-1 ならびに AF-2 と呼ばれる領域が存在し、雄性ホルモンのある / なしでその機能が異なる。すなわち、雄性ホルモンが結合していない状態では、リガンド結合ドメインは AF-1 活性を抑制しているが、雄性ホルモンの結合によって AF-2 活性が誘導されると同時に、アンドロゲン受容体の分子構造の変化によって AF-1 活性の抑制の解除が起こり、遺伝子発現の活性化が誘導されるようである。魚類では、一般に 2 種類のアンドロゲン受容体の転写活性ドメイン (A/B ドメイン) は相同性が低いことがわかっている (図 3a)。また、魚類 AR α の転写活性化ドメインは四肢動物のものと相同性が高い (約 80%) のに対して、AR β は極めて相同性が低い (約 20%) という特徴をもつ。このことから、両アンドロゲン受容体の遺伝子発現における作用機序の違い、特に AR β を介した遺伝子の発現調節機構には興味を持たれるところである。

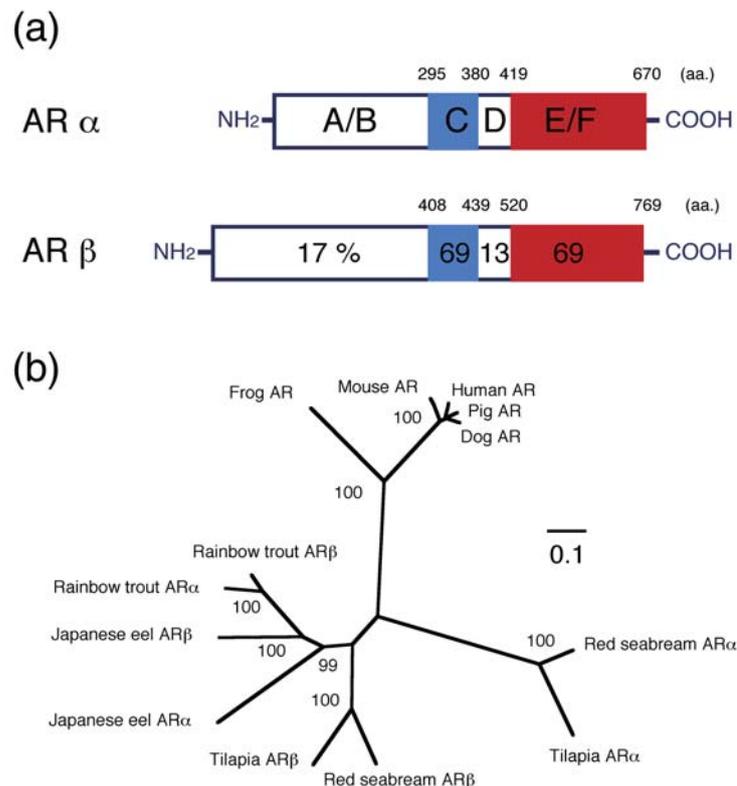


Figure 3. Functional domain structure of the red seabream androgen receptors.

a) Comparison of red seabream androgen receptor α (AR α) and β (AR β) predicted protein sequence. The protein consists of several distinct functional domains: transcription activation functions (A/B domain), a nuclear localization signal (D domain), the DNA-binding domain (C domain) and ligand binding domain (E/F domain).

b) Phylogenetic analysis of vertebrate androgen receptor proteins. Sequences were aligned by the CLUSTAL W software, whereas the phylogenetic tree was constructed with Neighbor-Joining method. The scale bar indicates an evolutionary distance of 0.1 amino acid substitution per position in the sequence.

(2) アンドロゲン受容体の作用機序

細胞質で雄性ホルモンと結合したアンドロゲン受容体は、それまで結合していたシャペロン分子 (Hsp 70 など) から遊離し 2 量体の形成を行う。この雄性ホルモン-アンドロゲン受容体複合体が核内に移行し、DNA 上の雄性ホルモン応答配列 (ARE) に結合する。ARE に結合したアンドロゲン受容体は共役因子群 (SRC1/NcoA1、N-CoR/SMART 等) を介することで最終的に標的遺伝子の発現を活性化したり抑制化したりする (図 4)。このため、共役因子の結合はアンドロゲン受容体の機能発現に重要な役割を果たすと考えられている (Heinlein and Chang, 2002)。近年、核内受容体のリガンド結合部位の X 線結晶構造解析から、その詳細なメカニズムが明らかにされている。すなわち、リガンド結合ドメインの中央に位置している疎水性のリガンド結合ポケットにホルモンが結合すると、12 個の α -ヘリックスのうち最も C 末側にあるヘリックス 12 が大きく移動することで、立体構造が変化し、それに引き続く分子内の構造変化によって、受容体表面にヘリックス 3~5 からなる疎水性の溝の形成なら

びに共役因子の結合がおり、最終的に遺伝子の発現が誘導される (Shiau *et al.*, 1998)。このように哺乳類では、アンドロゲン受容体の遺伝子発現における詳細なメカニズムが明らかにされているが、魚類におけるアンドロゲン受容体の作用機構はほとんど不明である。培養細胞を用いたレポーターアッセイによって、ウナギの 2 種類のアンドロゲン受容体は、テストステロンの転写活性は極めて低いものの、11KT ならびに哺乳類の活性型テストステロン (DHT) は同等の転写活性を持つことがわかっている (Ikeuchi *et al.*, 1999)。また、マダイ AR β ではテストステロンと 11KT の両者による転写の活性化が報告されている。他方、ニジマスから単離された 2 種類の受容体のうち 1 つが機能的な分子 (AR α) であり、11KT、テストステロンならびに DHT の主要な雄性ホルモンで転写の活性化が起こる。しかし、いずれの場合においても、雄性ホルモンの添加によるレポーター遺伝子の転写活性化の有無をみているので、転写活性化ドメインやリガンド結合ドメインの個々の機能特性については依然として不明である。

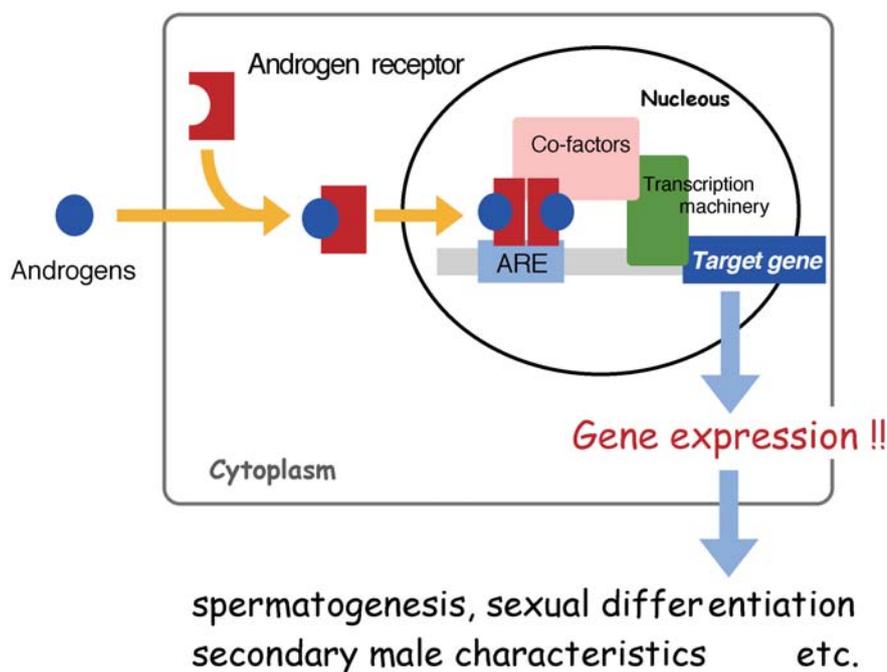


Figure 4. Molecular mechanisms of androgen-androgen receptor action. Androgens bind to androgen receptor (AR) and promote the association of co-factors. Then androgen-AR translocates to the nucleus and binds to androgen-responsive element (ARE) in the promoter region of target genes to induce transcription.

おわりに

雄性ホルモンは精子形成や雄性生殖器の発達のみならず、雄の性分化を強く支配するため、アユ等の養殖対象魚種の全雄化処理に用いられている。しかし、これまでの筆者らの解析等から投与した雄性ホルモンは生殖腺のみならず、他臓器における遺伝子発現にも影響を及ぼしていることが明らかとなっている (Yamaguchi *et al.*, 2005)。さらに、消費者の「安全・安心」への関心の高まりを考えあわせると、組織特異的な作用をもつ非ステロイド型誘導因子の開発が急務であると考えられる。近年、創薬分野では、アンドロゲン受容体を介した選択的アンドロゲン受容体作動薬 (Selective Androgen Receptor Modulators : SARMs) の探索が精力的に行われている (Negro-Vilar, 1999)。SARMs は、アンドロゲン受容体との結合によって通常とは異なる構造変化を誘導し、それによって生理条件下では結合しない共役因子との相互作用を引き起こすことで、受容体を介した生理作用のうち有用な機能だけを発現させるという薬理的な特徴をもつ。既に、哺乳類では S1 あるいは S4 といった組織によって雄性ホルモン作用が異なる SARMs が開発されており、臨床分野では新たな治療薬として脚光を浴びている。今後、水産の分野においても、SARMs が非常に有効な成熟誘導因子あるいは性転換誘導因子となりうるものが大いに期待されるが、その探索や開発を合理的に進めて行く上で、魚類のアンドロゲン受容体の構造と機能に関する更なる知見の集積は必要不可欠である。

文 献

- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y, 1991: Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **88**, 5774-5778.
- Endo T, Todo T, Lokman PM,, Ijiri S, Adachi S, Yamauchi K, 2007 : In vitro induction of oil droplet accumulation into previtellogenic oocytes of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Abstracts for 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, p256
- Yamaguchi S, Gen K, Okuzawa K, Kumakura N, Matsuyama M, Kagawa H, 2005: Effects of 11-ketotestosterone and gonadotropin-releasing hormone on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression in castrated and sham-operated male red seabream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.*, **71**, 1049-1058.
- Kusakabe M, Nakamura I, Young G, 2003: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression, and seasonal changes in gonads. *Endocrinology*. **144**, 2534-2545.
- Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, Kagawa H, 2000: Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol Reprod.*, 2000 : 63, 308-319.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM, 1995: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.
- Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y, 1999: cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. *J Biol Chem.*, **274**, 25205-25209.
- Heinlein CA, Chang C, 2002: Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.*, **23**, 175-200.
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, 1998: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Negro-Vilar A, 1999: Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium. *J Clin Endocrinol Metab.*, **84**, 3459-3462.