

副腎皮質を介した骨格筋の性差構築機構の解明：アンドロゲンによるグローバルな遺伝子発現抑制

高橋，史也

<https://hdl.handle.net/2324/7182314>

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（システム生命科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



博士論文

副腎皮質を介した骨格筋の性差構築機構の解明
-アンドロゲンによるグローバルな遺伝子発現抑制-

九州大学大学院 システム生命科学府
生命医科学講座 性差生物学研究室

高橋史也

2023 年度

目次

1、要旨	1
2、序論	3
3、結果	5
(1) 性ホルモンによる副腎サイズと重量の調節	5
(2) アンドロゲンによるグローバルな転写の抑制	9
(3) アンドロゲンによって抑制される細胞内エネルギー代謝活性	17
(4) アンドロゲンによる Ad4BP の発現抑制	24
(5) Ad4BP によるグローバルな遺伝子発現制御	29
(6) <i>Ad4BP</i> ^{+/-} zF 細胞におけるエネルギー代謝活性の低下	42
(7) zF 細胞における Ad4BP の発現量によって調節され得る骨格筋サイズと重量	46
4、考察	52
(1) 副腎皮質が産生する糖質コルチコイドを介した新たな性差構築機構	52
(2) グローバルな遺伝子発現制御による副腎皮質の性差構築機構	53
5、実験方法	58
(1) マウス	58
(2) 性腺除去と性ホルモン補充	58
(3) フルタミド投与	59
(4) zF 細胞の調製	59
(5) 単位細胞当たりの total RNA と mRNA の定量	60
(6) 単位細胞当たりの total RNA と mRNA の調製	61
(7) 新生 RNA 鎖合成活性測定	61
(8) CNN RNA-seq	62
(9) ECAR と OCR の測定	62
(10) 血中ステロイドの測定	63

(11) CNN qRT-PCR	65
(12) CUT&RUN-seq	66
(13) 細胞内 ATP と NADPH 量の測定	67
(14) 筋繊維の断面積 (CSA) の測定	67
(15) 統計解析	68
6、謝辞	69
7、参考文献	70
8、論文目録	80

1、要旨

齧歯類の副腎皮質は球状層と束状層(zF)からなる。このうち束状層は多彩な生理作用を発揮する糖質コルチコイドを産生する。これまで、メスの zF はオスよりも大きく、細胞分裂もメスの方が早いことが知られていたが、このような性差の形成機構やその意義は不明であった。そこで本研究はこれらの点の解明を目的に行われた。

zF 細胞における遺伝子発現と性ホルモンの関係を明らかにするため、性腺除去（精巣もしくは卵巣の除去）と、それに続く性ホルモン投与実験を行った。その結果、zF 細胞内の mRNA の総量、および zF 細胞で発現するほぼ全ての遺伝子発現を男性ホルモン（アンドロゲン）が抑制することが明らかになった。Ad4BP (Sf-1/Nr5a1)は副腎の形成に必須の転写因子であるが、本因子の発現量はメスよりもオスで低く、zF の性差形成に関与する可能性があると思われた。実際に、*Ad4BP* 遺伝子のヘテロ欠損 (*Ad4BP*^{+/-}) マウスでは、野生型マウスに比べ zF におけるほぼ全ての遺伝子発現が減少した。そこで、全ゲノムレベルで Ad4BP の集積を調べたところ、zF で発現する半数以上の遺伝子の近傍にその集積が認められ、多数の遺伝子が本因子により直接制御される可能性が示された。zF 細胞のグローバルな遺伝子発現の性差は、細胞の機能に性差を及ぼすと予想される。実際に zF の細胞内エネルギー代謝活性と糖質コルチコイドの血中濃度を測定したところ、両者ともにメスと比較してオスで低値であった。zF は糖質コルチコイドの産生を通じ他の細胞の機能を調節する。そこで zF の性差が他の器官・細胞に及ぼす影響を検討するために *Ad4BP*^{+/-} マウスの骨格筋を調べた。*Ad4BP*^{+/-} マウスの副腎は矮小化しており、野生型に比べ糖質コルチコイドの血中濃度も低下している。*Ad4BP*^{+/-} マウスでは野生型マウスと比較して筋線維が肥大していた。以上の結果より、アンドロゲンが *Ad4BP* の遺伝子発現を抑制し、糖質コルチコイド量を低下させることで骨格筋の肥大を招くこと、そしてその結果、骨格筋の大きさに性差が生じることが示唆された。

血中糖質コルチコイド濃度が性差を示すこと、およびその受容体が全身のほぼ全て

の細胞で発現することを考慮すると、副腎皮質 zF 細胞が産生する糖質コルチコイドによって全身の性差が構築される可能性が示唆される。本研究は zF の性差を介する新たな性差形成機構の存在を示すとともに、これまで性ホルモンの直接作用によって全身の性差が形成されるという従来の性差形成機構に修正を迫る意義深い結果を残した。

2、序論

副腎皮質は、ヒトでは三つの、マウスでは二つの形態・機能的に異なる細胞層から成る¹⁻⁴。これらのうち、最大の細胞層である束状層（zF, zona fasciculata）は、糖質コルチコイドを産生する。糖質コルチコイドは血流を介し全身の細胞へと送達され、炭水化物、タンパク質、脂質などの代謝プロセスや、炎症反応などを調節する⁵。齧歯類ではオスの副腎がメスよりも小さいという性差を示し、性腺除去やアンドロゲン投与によりそのサイズが変化することが知られていた⁶。これまでの研究では、メスではオスよりもzF細胞の数が多く^{7,8}、zF細胞の核、ミトコンドリア、細胞質内小器官のサイズが大きいこと⁹、血中コルチコステロン（マウスにおける糖質コルチコイド）濃度が高いこと^{6,10}、zF細胞内の脂肪滴の量が多いこと⁸、そしてzF細胞の分裂速度が速いことが示されている¹¹⁻¹³。これらの副腎皮質の性差を遺伝子発現の観点から明らかにすることを目的とする研究が行われ、実際に発現に性差を示す遺伝子が同定されている¹⁴⁻¹⁶。

Ad4BP (NR5A1/SF-1) はステロイド産生遺伝子 *CYP11A1* と *CYP11B1* を発現調節する転写因子として同定された^{17,18}。その後、他のステロイド産生遺伝子も本転写因子の標的遺伝子であることが示された^{19,20}。また、Ad4BP のノックアウトマウスからはステロイド産生器官である副腎、精巣、卵巣が消失することから、本因子はステロイド産生細胞の分化に必須であることが示されている^{19,21,22}。しかし、ステロイド産生遺伝子の発現制御のみを通じて Ad4BP がステロイド産生器官の分化を制御しているとは考えづらいことから、Ad4BP の機能の全貌の解明、すなわち標的遺伝子の網羅的な同定が望まれた。ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation-sequencing) により、ゲノムワイドな研究が可能となり、所属研究室を含む多くの研究グループによる研究が行われた²³⁻³⁰。その結果、Ad4BP がヘム合成²⁴、脂質およびステロイド合成²⁵、解糖系²⁷、コレステロール合成³⁰、NADPH 合成²⁹ などの多様な代謝経路、ならびに血管新生プロセス²³、細胞骨格のリモデリング²⁸ の制御に関与することが明らかとなった。

最近、細胞が特定の条件下でゲノムワイドにほぼ全ての遺伝子の発現を活性化、または抑制するような制御機構が報告されている^{31,32}。このゲノムワイドな転写調節は、胚性幹細胞や胎仔期の生殖細胞の分化³³、腫瘍細胞の増殖³²、リンパ球の活性化³⁴、そして細胞分裂³⁵などのプロセスで認められている。このようなゲノムワイドな転写調節は、hypertranscription、hyperactive transcription、または transcriptional amplification と呼ばれ、細胞状態の変化を誘導する新規のメカニズムとして注目されている。その詳細なメカニズムは不明であるが、hypertranscription における *Myc*、*Yap*、そしてクロマチンリモデラー *Chd1* の関与が示されている^{31,32,34,36}。

本研究は、副腎皮質の性差、および性差構築メカニズムを明らかにすることを目的に行われた。その結果、そもそも雌雄の zF 細胞の mRNA 量に性差があるという zF 細胞の性差の基盤となる結果を見出した。さらにこの結果をもとに、zF 細胞における遺伝子発現のグローバルな制御、そして転写因子 Ad4BP が関与するグローバルな遺伝子発現制御の可能性を見出した。このような zF 細胞の性差は血中の糖質コルチコイド濃度に性差をもたらす。糖質コルチコイド受容体が多く細胞で発現することを考慮すると、zF の性差を起点とした新たな全身の細胞の性差形成機構の存在が示唆される。本研究は、性ホルモンの直接作用により説明されてきた従来の性差形成機構に修正を迫る意義深い結果を残した。

3、結果

(1) 性ホルモンによる副腎サイズと重量の調節

齧歯類の副腎はオスよりもメスの方が大きく、重量もオスよりもメスの方が大きいことが知られている。また、性ホルモンは多くの細胞の性差を形成する上で重要な役割を果たすと考えられている。そこでまず、性ホルモンが副腎の大きさや重量に変化をもたらすかを調べた。図 1A に示すように、3 週齢のマウスでは副腎の重量に有意な性差は認められない。しかし、4 週齢以降に顕著な性差が認められることから、3 週齢以降に分泌される性ホルモンが副腎の大きさに性差を誘導することが示唆された。この点を検証するため、偽手術（コントロール）、3 週齢での性腺除去（オスにおける精巣除去とメスにおける卵巣除去）、性腺除去とその後の 5α -ジヒドロテストステロン（DHT、最も強力なアンドロゲン）補充、性腺除去とその後の 17β -エストラジオール（E2、エストロゲン）補充の 4 種の処理を雌雄のマウスに対して行い、それらの副腎サイズと重量を比較した。内在性のアンドロゲンの恒常的な分泌を模倣するため、性腺除去の 2 週間後から、DHT を 3 週間、毎日投与した。また、性周期におけるエストロゲンの周期的な分泌を模倣するため、E2 は性腺除去の 2 週間後から 4 日毎に投与した（図 1B）。このように投与した DHT および E2 の投与が個体の性差を維持しているかを調べるため、性ホルモンに最も感受性の高い精嚢腺および子宮の重量を各実験群で比較した。その結果、性腺除去により精嚢腺および子宮重量は低下する一方、DHT または E2 の補充によってそれぞれの重量がコントロールレベルにまで回復した（図 1C-D）。そこで以上の実験条件のもと、上記の 8 実験群における副腎サイズおよび重量を比較した。図 1E-G に示すように、コントロールオスの副腎はコントロールメスよりも小さかった。精巣除去は副腎を大きくし、卵巣除去は副腎を小さくした。性腺除去後に DHT を投与すると、雌雄ともに小さくなり、性腺除去後に E2 を投与すると、雌雄ともに副腎は大きくなった。以上の結果は性ホルモンが副腎の大きさの性差を誘導することを示した。

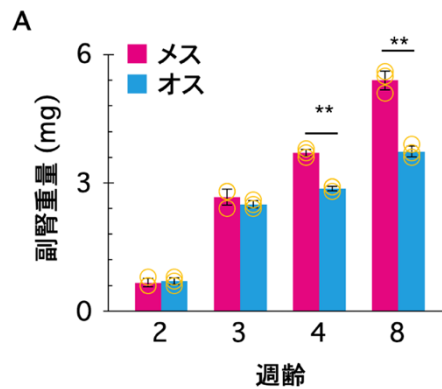


図 1A 各週齢における雌雄のマウスの副腎重量

生後 2 週齢、3 週齢、4 週齢、8 週齢の雌雄のマウスの副腎重量を測定した。各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した (**p < 0.01)。

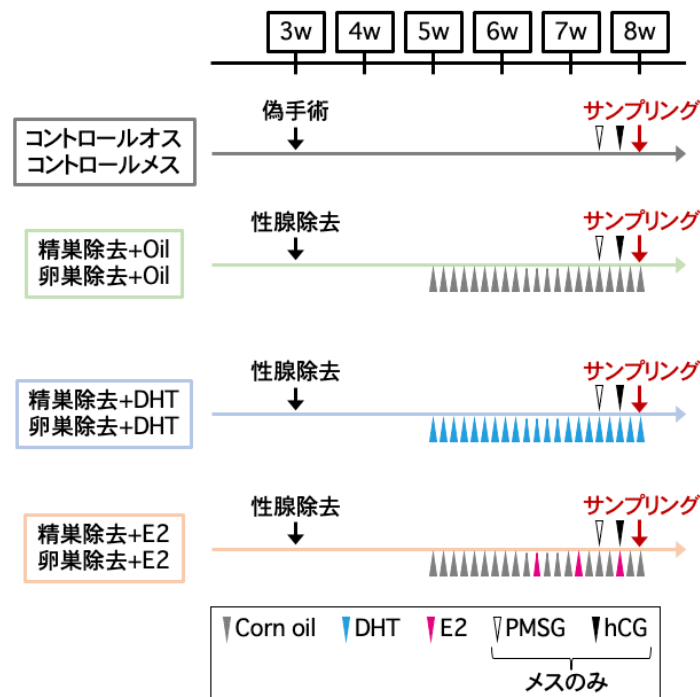


図 1B 性腺除去と性ホルモンの補充スケジュール

実験に用いた 8 群のマウスの処理を示す。通常、メスは性周期を示し、発情前期に最も高いエストロゲン濃度を示す。本研究では PMSG と hCG 投与によって排卵を誘発することで、エストロゲン濃度が最も低い間期のメスを作り出し、コントロールメスとして用いた。DHT; Dihydrotestosterone, E2; estradiol, PMSG; pregnant mare serum gonadotropin, hCG; human chorionic gonadotropin, Oil; corn oil。

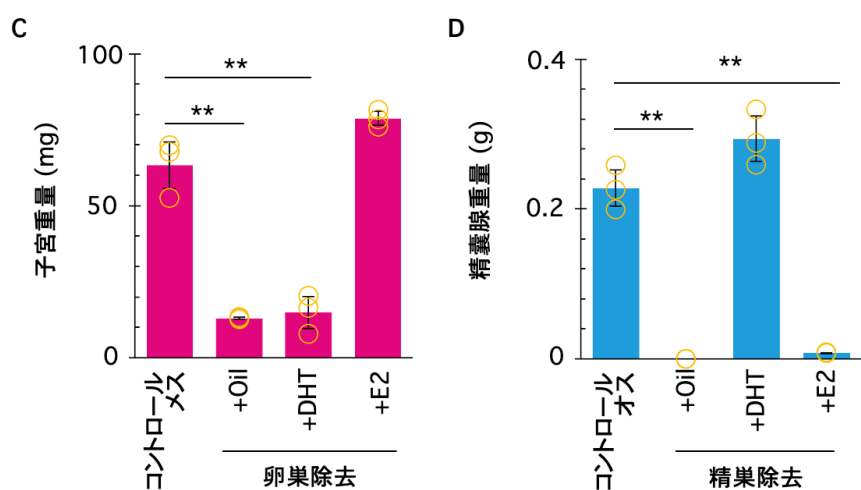


図 1C-D 性腺除去および性ホルモン補充による子宮および精囊腺重量の変化

図 1B に示す処理を行った後、子宮重量と精囊腺重量を測定した。各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(**p < 0.01)。

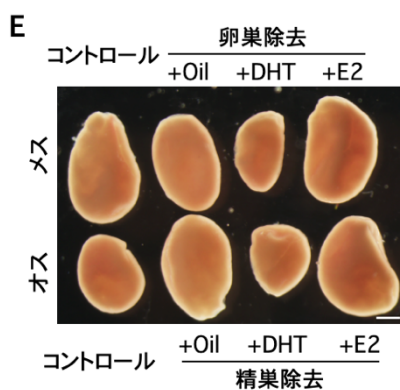


図 1E 8 実験群の副腎

図 1B に示す処理を行ったマウスの副腎を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。

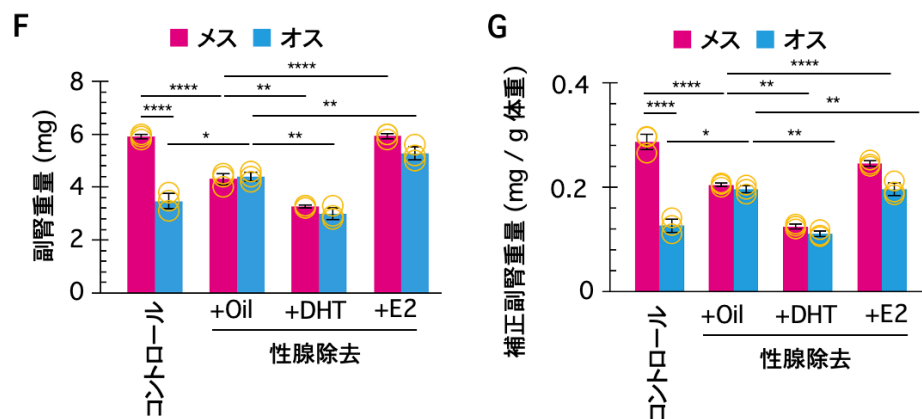


図 1F-G 8 実験群における副腎重量の比較

図 1B に示す処理を行ったマウスの副腎重量を示す。F は副腎の絶対重量を、G は体重補正した副腎重量を示す。各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$)。

(2) アンドロゲンによるグローバルな転写の抑制

マウスの副腎皮質は、鉱質コルチコイドを産生する球状層 (zG)、糖質コルチコイドを産生する束状層 (zF)、および出生後の限られた期間だけ存在する一時的な層 (X-zone) から成る^{37,38}。メスの方がオスよりも大きい副腎を持つのは、これらの細胞層のうち zF の細胞数が多いためであり、メスの zF 細胞の増殖はオスのそれよりも活発であることが示されている¹¹⁻¹³。

このような zF の性差構築機構を解明するため、雌雄間で zF 細胞の遺伝子発現を比較した。全ての副腎皮質細胞が EGFP で標識された Ad4BP-BAC-EGFP トランスジェニックマウスの副腎を用い、まず顕微鏡下で zF を分画し、次いで EGFP の蛍光を指標にセルソーターを用いて zF 細胞を単離した (図 2A)。得られた zF 細胞画分に他の細胞種の混入の有無を確認するため zG、zF、X-zone、ならびに副腎髄質のマーカー遺伝子の発現を調べた。その結果図 2B に示すように、調製した zF 細胞には zG、X-zone、および副腎髄質細胞の混入は認められなかった。血中 E2 濃度は発情周期に伴い変動するため、E2 濃度が最も低い発情間期 (diestrus) のマウスをメスのコントロールとして使用した。Diestrus のマウスは、メスマウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG, pregnant mare serum gonadotropin) とヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG, human chorionic gonadotropin) を投与することで準備した (hCG 投与後 48 時間のマウスの発情周期のステージは Diestrus である)。この PMSG/hCG 処理が zF 細胞の遺伝子発現に影響を与えないことは、PMSG/hCG 処理マウスと未処理マウスの zF 細胞の遺伝子発現の比較によって確認した (図 2C)。上記のマウスを用い、zF 細胞から total RNA と mRNA を調製し、雌雄比較を行ったところ、興味深いことに、zF 細胞数あたりの total RNA 量と mRNA 量は、それぞれ 1.85 倍と 1.82 倍メスの方が多かった (図 2D)。このような RNA 量の性差は副腎髄質細胞では認められなかった (図 2E)。

次に雌雄の zF 細胞における遺伝子発現を調べた。通常のトランスクリプトーム解析

では、雌雄で同量の RNA を使用するが、zF 細胞ではそもそも RNA 量が雌雄で異なるため、同量の RNA を使用した場合、遺伝子発現の正確な雌雄差反映していないと考えられた。そこで、雌雄それぞれ 10^4 個の zF 細胞から調製した mRNA を用い、単位細胞数あたりのトランスクリプトームを取得可能な CNN RNA-seq (Cell Number Normalized RNA-sequencing) ³³を行った。その結果、図 2F に示されるように、zF 細胞における多くの遺伝子の発現量はオスでメスよりも低いことが明らかになった。この結果は、ある一部分の遺伝子の発現が大幅にオスで抑制（またはメスで活性化）されているのではなく、遺伝子発現量が全体的（グローバル）にオスで抑制（またはメスで活性化）されているという、性差を解析する上で重要な知見であった。メスの遺伝子発現量の平均値はオスのそれより 1.86 倍高かった（図 2G）。精巣除去（+Oil）はコントロールオスと比較して遺伝子発現の平均値を 1.27 倍増加させたが、卵巣除去（+Oil）はコントロールメスと比較して有意な影響を示さなかった。性腺除去後の DHT 投与は雌雄ともに遺伝子発現レベルをコントロールオスと同等のレベルまで減少させた。精巣除去後の E2 処理は遺伝子発現を増加させたが、卵巣除去後の E2 処理は遺伝子発現を変化させなかった。

雌雄ともにアンドロゲンがグローバルな遺伝子発現の抑制作用を示したことから、アンドロゲンの役割に焦点を当てた解析を行った。まずオスマウスにアンドロゲンの拮抗薬であるフルタミドを投与し、zF 細胞における遺伝子発現を調べた（図 2H）。アンドロゲンシグナルの阻害は徐々にグローバルな遺伝子発現を増加させ、10 日間の投与後、グローバルな遺伝子発現はコントロールメスと同等のレベルに達した（図 2H-I）。この結果はアンドロゲンがグローバルな遺伝子発現を抑制するとの推測を支持した。

アンドロゲンによるグローバルな遺伝子発現の抑制が転写レベルで起こるか否かを調べるため、新生 RNA の合成活性を 5-ethynyl uridine (EU) の単位時間あたりの RNA への取り込み量を測定した ³³。図 2J に示すように、卵巣除去後の DHT 投与は、卵巣除

去マウスまたはコントロールメスに比べて RNA 産生量を減少させた。また、精巣除去マウスではコントロールオスに比べて RNA 産生量が増加し、その後の DHT 投与によりコントロールオスと同等のレベルにまで減少した (図 2K)。以上の結果から、アンドロゲンが zF 細胞のグローバルな遺伝子発現を転写レベルで抑制することが明らかとなった (図 2L)。

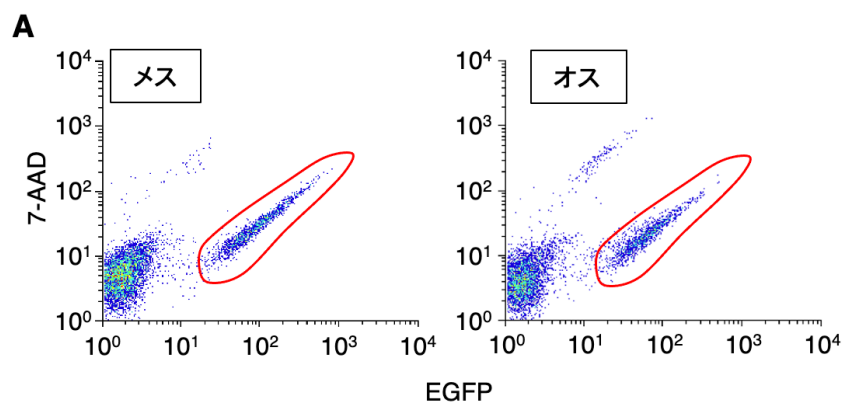


図 2A セルソーティングによる zF 細胞の単離

典型的なセルソーティングのパターンを示す。赤線を囲った細胞が zF 細胞集団。

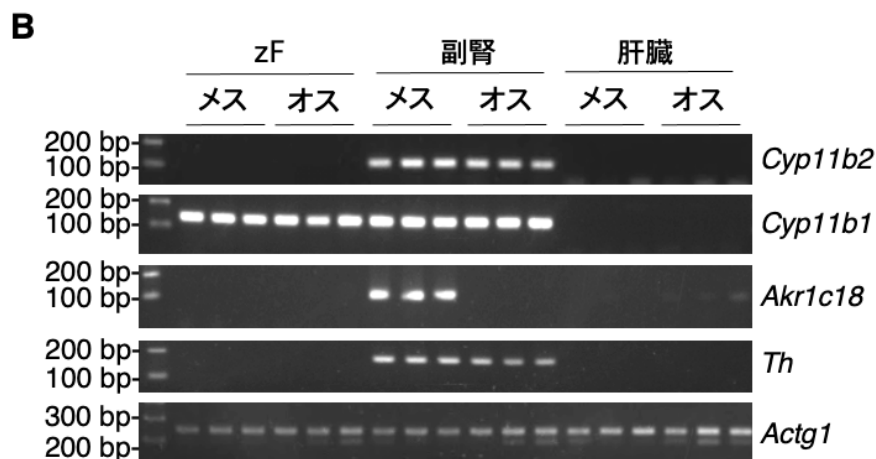


図 2B 単離した zF 細胞における副腎マーカー遺伝子の発現

Cyp11b2 は球状層、*Cyp11b1* は束状層、*Akrlc18* は皮質全層、*Th* は副腎髄質、*Actg1* は X-zone の細胞に発現するマーカー遺伝子である。

C

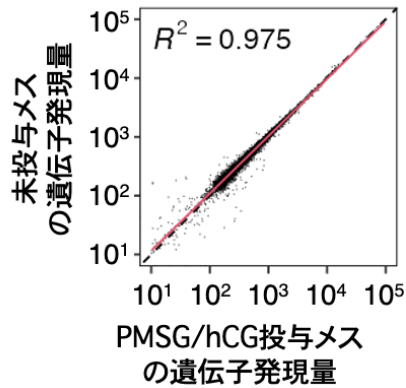


図 2C PMSGH/hCG 投与と未投与 zF 細胞間の遺伝子発現の比較

PMSG/hCG 処理マウスと未処理マウスより zF 細胞を調製しトランスクリプトームを得、比較した。R² 値は直線回帰における相関係数を示す。

D

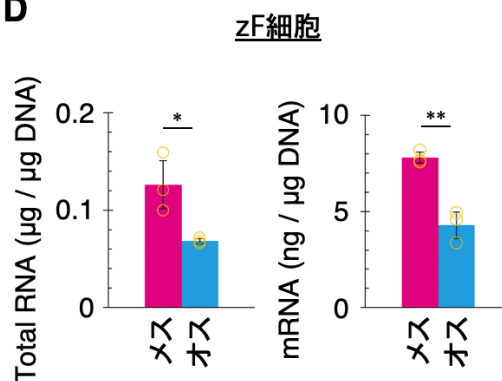


図 2D zF 細胞における単位細胞数あたりの total RNA および mRNA 量

雌雄の zF 細胞を調製し、total RNA (左) と total RNA (右) を調製した。同時に DNA を調製した。DNA による補正を行うことで同数の zF 細胞から調製した RNA 量を推定した。各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示し、Student's t test によって統計検定した(*p < 0.05, **p < 0.01)。

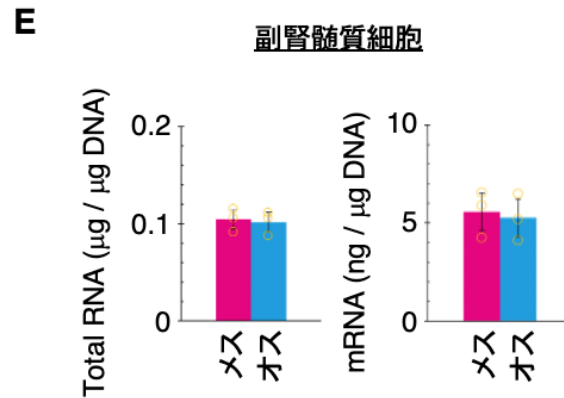


図 2E 副腎髄質細胞における単位細胞数あたりの total RNA および mRNA 量

図 2D で述べたように副腎髄質から total RNA (左) と total RNA (右) を調製した。同時に DNA を調製した。DNA による補正を行うことで同数の髄質細胞から調製した RNA 量を推定した。各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値 ± 標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値 ± 標準偏差を示し、Student's t test によって統計検定した。

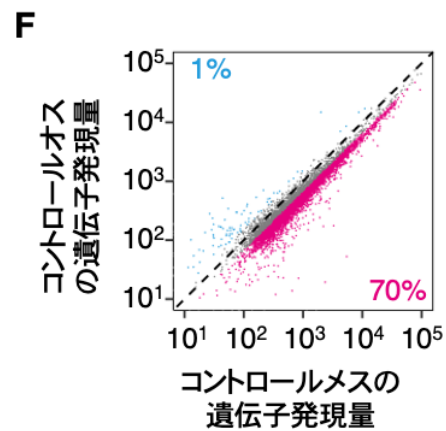


図 2F コントロール雌雄の単位細胞数あたり遺伝子発現比較

マゼンタのドットはメスでオスよりも 1.5 倍以上有意 ($p < 0.05$) に高発現する遺伝子を示し、シアン色のドットはオスでメスよりも 1.5 倍以上有意 ($p < 0.05$) に高発現する遺伝子を示す。マゼンタおよびシアンのパーセンテージは全発現遺伝子数に対する割合を示す。

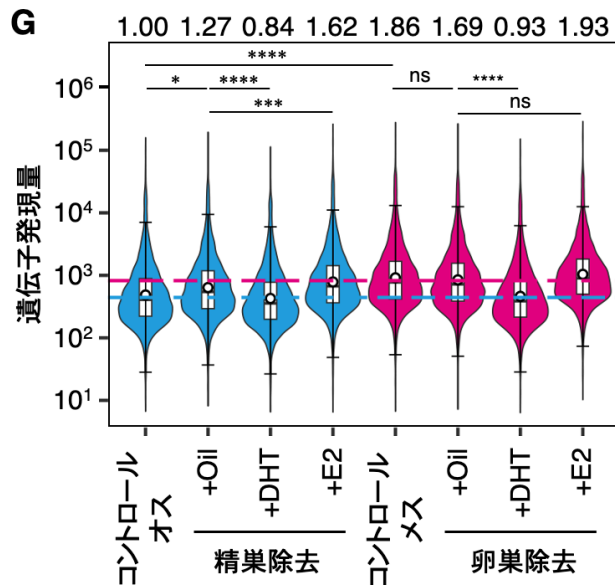


図 2G 8つの実験群における単位細胞数あたりの遺伝子発現の比較

白丸は各実験群における遺伝子発現の平均値を示し、マゼンタおよびシヤンの波線はコントロールメスとコントロールオスの遺伝子発現の平均値と示す。図上部の数字はコントロールオスの遺伝子発現に対する各群の各群の遺伝子発現の比を示す。各実験群はBonferroniの多重比較によって統計検定した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$, ns; 有意差なし)。

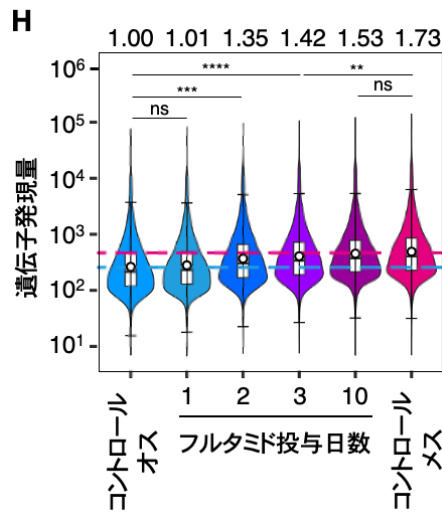


図 2H フルタミド投与実験群における単位細胞数あたりの遺伝子発現の変化

白丸は各実験群における遺伝子発現の平均値を示し、マゼンタおよびシアンの波線はコントロールメスとコントロールオスの遺伝子発現の平均値を示す。図上部の数字はコントロールオスの遺伝子発現に対する各群の遺伝子発現の比を示す。各実験群は Bonferroni の多重比較によって統計検定した(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$, ns; 有意差なし)。

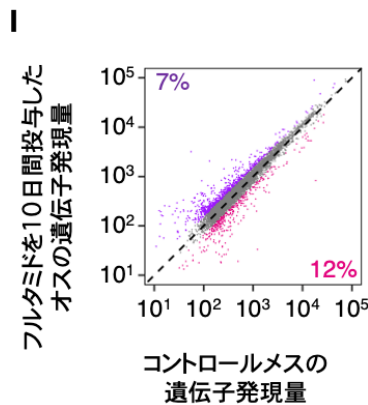


図 2I フルタミドを 10 日間投与したオスとコントロールメスの
単位細胞数あたりの遺伝子発現比較

マゼンタのドットはコントロールメスでフルタミドを 10 日間投与したオスよりも 1.5 倍以上有意 ($p < 0.05$) に高発現する遺伝子を、紫のドットはフルタミドを 10 日間投与したオスでコントロールメスよりも 1.5 倍以上有意 ($p < 0.05$) に高発現する遺伝子を示す。マゼンタおよび紫のパーセンテージはコントロールメス、フルタミドを 10 日間投与したオスでそれぞれ高発現する遺伝子数の全発現遺伝子数に対する割合を示している。

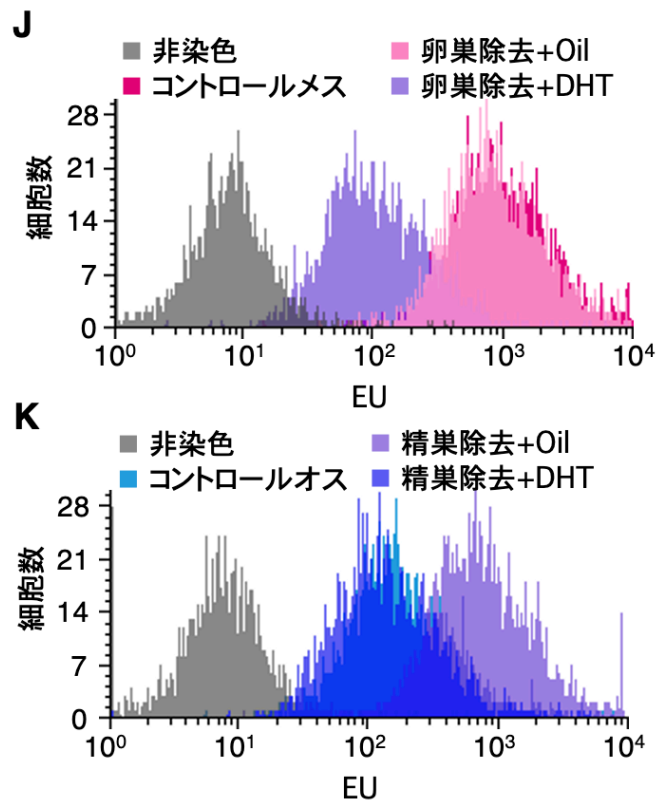


図 2J-K 8 実験群における新生 RNA の合成活性

8 実験群の zF 細胞を調製し、5-ethynyl-uridine (EU) 存在下で 1 時間培養した。培養後直ちに細胞の固定および EU の蛍光標識を行い、フローサイトメーターにより解析した。細胞毎の蛍光強度 (EU 取り込み量、新生 RNA 量) を示す。

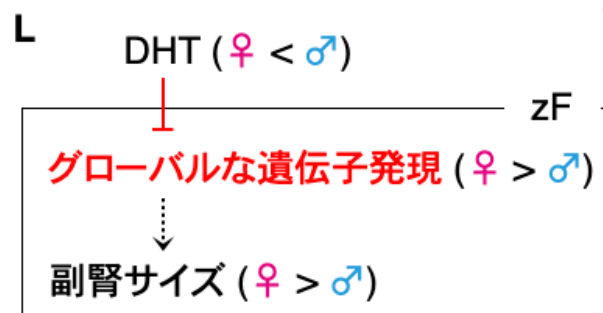


図 2L アンドロゲンによるグローバルな遺伝子発現の抑制

精巣で産生されるアンドロゲンが zF 細胞のグローバルな遺伝子発現を転写レベルで抑制することが明らかとなった。グローバルな遺伝子発現がオスで抑制されることにより、副腎サイズがオスよりもメスで大きくなる可能性が示唆された。

(3) アンドロゲンによって抑制される細胞内エネルギー代謝活性

先述のように、メスの zF 細胞に含まれる mRNA 量はオスのそれよりも 1.82 倍多い。そこでまず、メスにおける発現量がオスよりも 1.82 倍以上多い 2,451 個の遺伝子がどのような機能を持つ遺伝子なのかを KEGG パスウェイ解析を用いて調べた。その結果、図 3A に示されるように、「oxidative phosphorylation (OXPHOS)」、「valine, leucine, and isoleucine degradation」、「citrate (TCA) cycle」、「fatty acid degradation (fatty acid metabolism)」、「glycolysis/gluconeogenesis」などのエネルギー代謝を制御する遺伝子がメスで高発現していることがわかった。これらのエネルギー代謝経路に加えて、「cortisol synthesis and secretion」(糖質コルチコイドの合成と分泌)を制御する遺伝子もメスで高発現していた。これらの代謝経路の制御に関わる全ての遺伝子の発現を 8 実験群で比較した結果をヒートマップとして示す (図 3B)。これらの遺伝子の発現は、アンドロゲン存在下で雌雄ともに抑制されていた。

前項で示した通り、メスで遺伝子発現が全体的に上昇していることから、zF 細胞における全ての生物学的活性がオスよりもメスで活発である可能性が示唆された。この点を検証するため、メスで高発現しない遺伝子を、遺伝子発現量のメス/オス比が 1.25 倍以下の遺伝子(オスで高発現する遺伝子を含む)と定義し、この遺伝子を対象に KEGG パスウェイ解析を行った。その結果、「MAPK signaling pathway」、「C-type lectin receptor signaling pathway」などの制御に関与する遺伝子がメスで高発現しないことが見出された (図 3C)。これらの遺伝子の発現プロファイルは、上述のエネルギー代謝の制御に関与する遺伝子とは異なり、性ホルモンに依存した明確な遺伝子発現量の変化は認められなかった (図 3D)。すなわち、zF の全ての生物学的活性がアンドロゲン依存的に抑制されるわけではないと考えられる。

エネルギー代謝関連遺伝子の発現量がメスで優位であったことから、zF 細胞のエネルギー代謝活性が性差を示すか否かを検討した。図 3E と F に示されるように、解糖活

性 (ECAR: extracellular acidification rate: 細胞外酸性化速度) と酸化的リン酸化活性 (OCR: oxygen consumption rate: 酸素消費速度) はそれぞれオスに比べ約 2.83 倍と 3.51 倍メスで高値であった。オスでは両活性が精巣除去後に増加し、DHT 補充によってコントロールオスと同等レベルまで減少した。メスではコントロールメスと卵巣除去マウス間に両活性の差は認められなかったが、DHT 投与によって両活性はコントロールオスと同等レベルまで減少した。これらの結果から、解糖活性と酸化的リン酸化活性の性差はアンドロゲンによるエネルギー代謝遺伝子の抑制に起因することが示唆された。

先行研究によると、マウスの糖質コルチコイドであるコルチコステロンの血中濃度はオスよりもメスで高値である^{6,10}。先に示した通り、糖質コルチコイドの産生に関与する遺伝子の発現はアンドロゲンに抑制されることから、血中コルチコステロン濃度の性差はアンドロゲンによって誘導されると予想される。実際、精巣除去マウスではコントロールオスと比較して血中コルチコステロン濃度が有意に増加し、DHT 投与ではコントロールオスと同等のレベルまで減少した。

以上の結果をまとめると、精巣で産生されるアンドロゲンがオスの zF 細胞の遺伝子発現を全体的に抑制し、それによってエネルギー代謝活性やコルチコステロン合成などの zF 細胞の活性が抑制されることが示された。そして、副腎の大きさと重量の性差は、メスで低いアンドロゲンによって活性化されるエネルギー代謝活性に起因すると推測された(図 3H)。

A

Term	P-value
Metabolic pathways	5.84E-24
Huntington disease	3.78E-12
Parkinson disease	4.16E-12
Oxidative phosphorylation	9.70E-12
Amyotrophic lateral sclerosis	4.95E-11
Diabetic cardiomyopathy	3.88E-10
Carbon metabolism	6.24E-10
Thermogenesis	7.84E-10
Prion disease	1.41E-09
Pathways of neurodegeneration - multiple diseases	5.21E-09
Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	8.70E-09
Alzheimer disease	1.07E-08
Valine, leucine and isoleucine degradation	2.16E-07
Protein processing in endoplasmic reticulum	4.91E-07
Citrate cycle (TCA cycle)	9.90E-07
Proteasome	3.13E-06
Non-alcoholic fatty liver disease	4.00E-06
Spliceosome	4.33E-06
Autophagy - animal	1.72E-05
Peroxisome	4.29E-05
Fatty acid degradation	6.44E-05
Glycolysis / Gluconeogenesis	6.52E-05
Biosynthesis of amino acids	9.16E-05
Pyruvate metabolism	1.01E-04
Biosynthesis of cofactors	1.81E-04
Fatty acid metabolism	2.21E-04
RNA degradation	2.44E-04
Spinocerebellar ataxia	4.72E-04
Cortisol synthesis and secretion	5.71E-04
RNA polymerase	7.80E-04
Ribosome biogenesis in eukaryotes	8.40E-04

図 3A メスで高発現する遺伝子を対象とした KEGG パスウェイ解析結果

メスでオスよりも 1.82 倍以上有意 ($p<0.05$) に高発現する遺伝子 (2,451 遺伝子) を対象とした、KEGG パスウェイ解析の結果を示す。

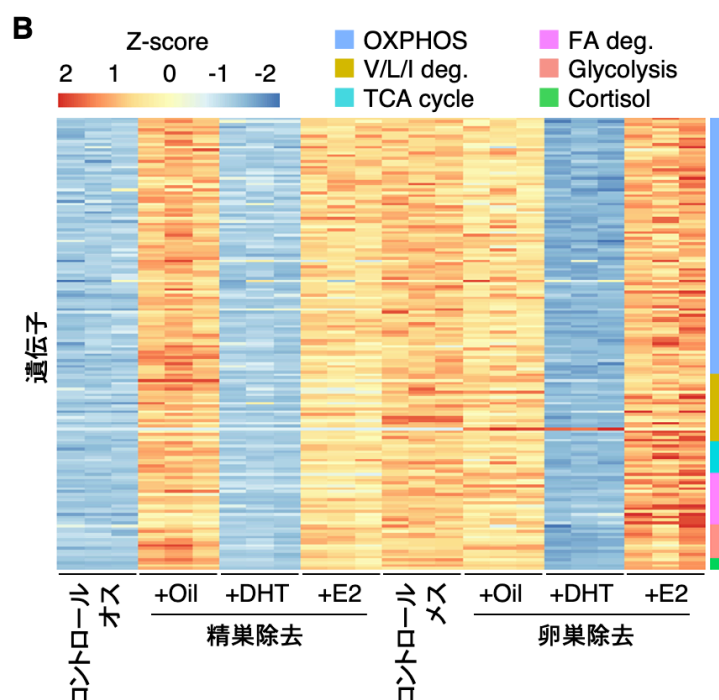


図 3B 8 実験群におけるエネルギー代謝関連遺伝子および糖質コルチコイド産生遺伝子の発現量の比較

メスで特に活性化するエネルギー代謝および糖質コルチコイド産生パスウェイ（図 3A 中紺色で表示）に含まれる遺伝子の 8 実験群における遺伝子発現量比較の結果を示す。各パスウェイに含まれる遺伝子数は、酸化的リン酸化(OXPHOS) ; 90、分岐鎖アミノ酸分解 (V/L/I deg.) ; 24、TCA 回路 (TCA cycle); 11、脂肪酸分解 (FA deg.); 18、解糖系(Glycolysis); 12、糖質コルチコイド産生(Cortisol); 4 であった。

C

Term	P-Value
MAPK signaling pathway	1.78E-06
C-type lectin receptor signaling pathway	8.96E-05
Pathways in cancer	2.95E-04
Proteoglycans in cancer	5.15E-04
Apoptosis	6.22E-04
p53 signaling pathway	6.30E-04

図 3C メスで高発現しない遺伝子を対象とした KEGG パスウェイ解析結果

メスで高発現しない（遺伝子発現量のメス/オス比が 1.25 倍以下の遺伝子(オスで高発現する遺伝子を含む)) 遺伝子（812 遺伝子）を対象とした KEGG パスウェイ解析の結果を示す。

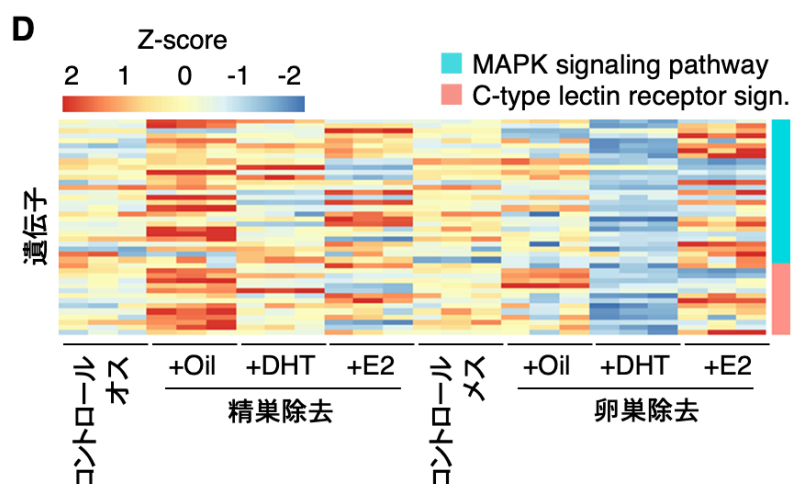


図 3D 8 実験群におけるメスで高発現しない遺伝子の発現量の比較

図 3C のパスウェイの内、上位 2 つのパスウェイに含まれる遺伝子の 8 実験群における遺伝子発現量比較の結果を示す。各パスウェイに含まれる遺伝子数は、MAPK signaling pathway; 28、C-type lectin receptor sign.; 14 であった。

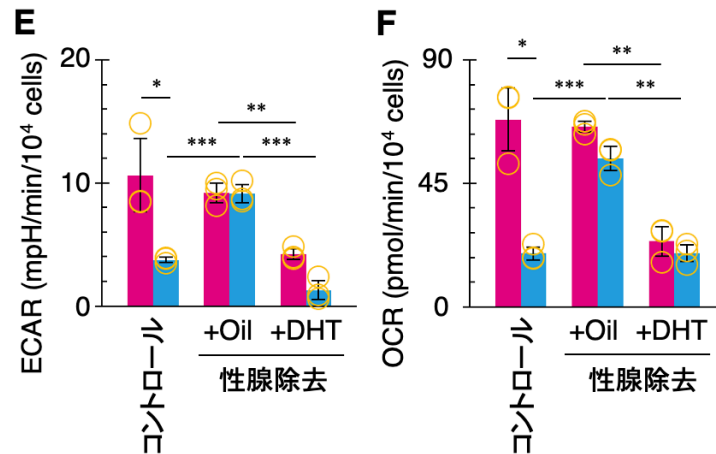


図 3E-F アンドロゲン存在下で抑制される解糖および酸化的リン酸化活性
各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。

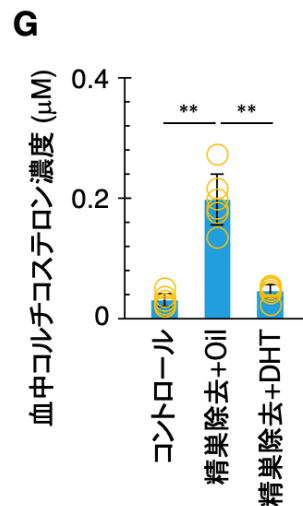


図 3G アンドロゲンによって抑制される血中コルチコステロン濃度
各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(**p < 0.01)。

(4) アンドロゲンによる *Ad4BP* の発現抑制

Ad4BP ヘテロ欠損マウス (*Ad4BP*^{+/-}) の副腎は野生型マウスに比べて矮小化することが報告されている³⁹。この報告から、*Ad4BP* の発現量が副腎のサイズに影響を与えることが示唆されている。この点を検証するため、まず CNN qRT-PCR および CNN RNA-seq により、雌雄の zF 細胞間で *Ad4BP* の発現量を比較した。その結果、いずれにおいても *Ad4BP* の発現量はオスでメスの約 50% であることが示された (図 4A)。この結果と一致して、雌雄ともに 10⁴ 個の zF 細胞から調製したタンパク質を用いたウェスタンブロッティングでも、*AD4BP* タンパク質量はオスでメスよりも低いことが示された (図 4B-C)。

次に、*Ad4BP* の発現量を 8 実験群間で比較した。*Ad4BP* の発現量は、雌雄それぞれのコントロールと比較して精巣除去により増加し、卵巣除去により減少した (図 4D)。さらに、性腺除去後の DHT 処理は、雌雄ともにコントロールオスと同等のレベルまで *Ad4BP* の発現量を有意に減少させた。興味深いことに、卵巣除去後の E2 補充で *Ad4BP* の発現量は増加したが、精巣除去後の E2 投与では増加しなかった。単位細胞数あたりの *AD4BP* タンパク質量は、コントロールオスに比べて精巣除去マウスでは増加したが、コントロールメスと卵巣除去マウス間で有意な差は認められなかった (図 4D-E)。性腺除去後の DHT 投与は、雌雄ともに *AD4BP* 量を減少させた。一方、E2 投与では雌雄ともに性腺除去と比較して有意な差は認められなかった。

所属研究室では *Ad4BP* 遺伝子座に EGFP を挿入した組み換え DNA を用い、*Ad4BP* の発現を EGFP によって可視化する *Ad4BP*-BAC-EGFP トランスジェニックマウス⁴⁰ を作出していた。図 4G に示すように、コントロールメスの EGFP 蛍光強度はコントロールオスよりも強く、精巣除去によりオスの EGFP 蛍光強度は増強されたが、卵巣除去によるメスの EGFP 蛍光強度はほとんど変かしなかった。また、DHT 投与によって EGFP 蛍光強度は抑制されたが、E2 投与による明確な EGFP 蛍光強度の変化は認めら

れなかった。

さらにアンドロゲンの影響を調べるために、フルタミドを最大 10 日間マウスに投与し、CNN RNA-seq により *Ad4BP* の発現量を確認した。その結果、投与日数の増加に従って、*Ad4BP* の発現量は徐々に増加した (図 4H)。以上の結果から、アンドロゲンが *Ad4BP* の発現量の性差を引き起こす可能性が強く示唆された。

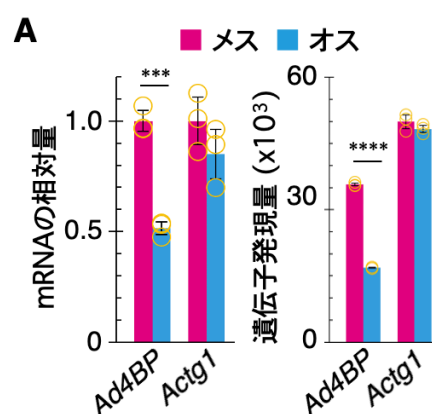


図 4A オスで低値を示す *Ad4BP* の発現量

雌雄の zF 細胞における *Ad4BP* と *Actg1* 遺伝子の発現を CNN qRT-PCR (左図) と CNN RNA-seq (右図) によって調べた。各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値 ± 標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001)。

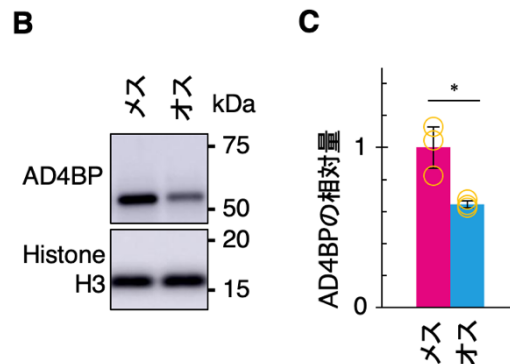


図 4B-C オスで低値を示す AD4BP タンパク質量

B, 雌雄の 10^4 個の zF 細胞から調製した全蛋白質を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。C, ウエスタンブロッティングのシグナルレベルを定量した。各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した (*p < 0.05)。

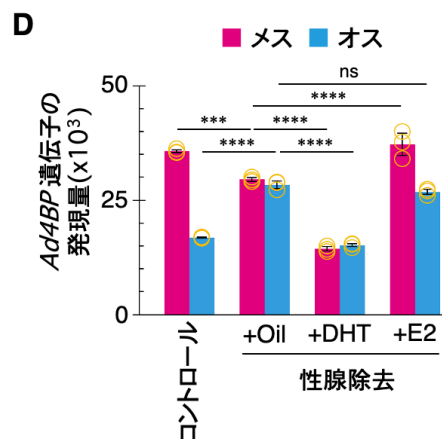


図 4D 8 実験群間における Ad4BP の発現量の比較

各カラムは生物学的反復データ (n=3) の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定された (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001, ns; 有意差なし)

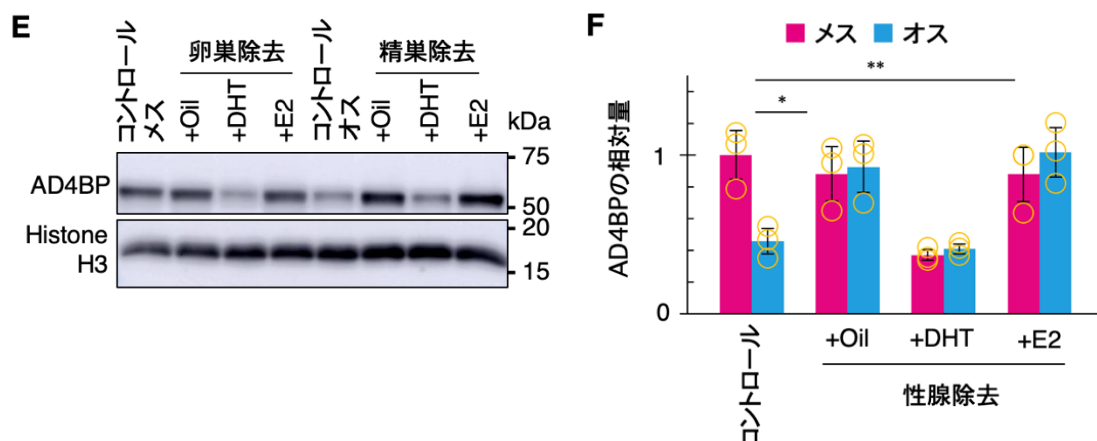


図 4E-F 8 実験群間における AD4BP タンパク質量の比較

E はウエスタンブロッティング、F はウエスタンブロッティングのシグナルレベルを定量したデータを示している。各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

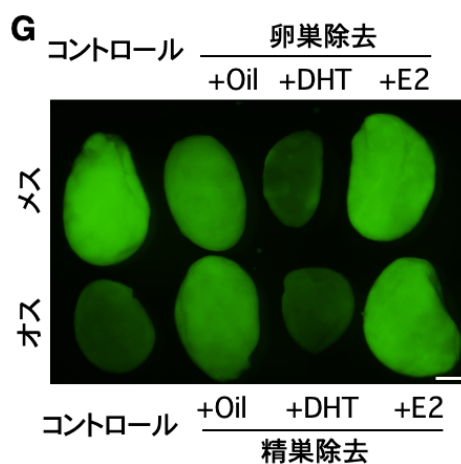


図 4G 8 実験群の Ad4BP-BAC-EGFP マウスの副腎が示す EGFP 蛍光

図 1B に示す処理を行ったマウスの副腎を示す。スケールバーは 500 μm を示す。

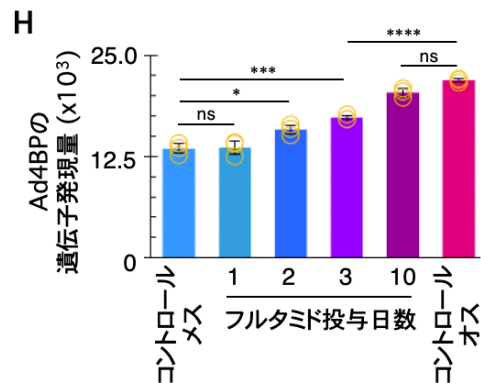


図 4H フルタミド投与実験群における *Ad4BP* の発現量の比較

各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$, ns; 有意差なし)。

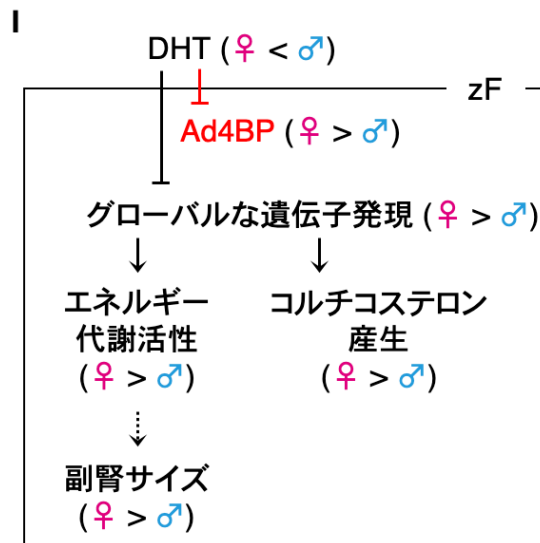


図 4I アンドロゲンによる *Ad4BP* の抑制

アンドロゲンはグローバルな遺伝子発現と *Ad4BP* の遺伝子発現を抑制する。

(5) Ad4BP によるグローバルな遺伝子発現制御

Ad4BP は副腎皮質の発生において必須の転写因子であることが知られているが^{19,21,22}、どのようなメカニズムで副腎皮質の発生を制御しているかは不明である。そこで本研究では、zF 細胞では Ad4BP がグローバルな遺伝子の発現の制御に関与する可能性について検討した。まず、*Ad4BP*^{+/-} マウスから zF 細胞を調製した。次いで、CNN RNA-seq および CNN qRT-PCR により *Ad4BP* の発現量を確認した。*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞における *Ad4BP* の発現量は雌雄ともに野生型 zF 細胞の 20% 未満であった (図 5A)。同様に、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞における Ad4BP タンパク質の量は大幅に減少していた (図 5B-C)。そこで、野生型マウスと *Ad4BP*^{+/-} マウスから調製した雌雄同数の zF 細胞を用いた CNN RNA-seq を行った。その結果、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞における遺伝子発現量が雌雄ともにグローバルかつ大幅に減少していることが明らかになった (図 5D)。*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞のメスおよびオスの遺伝子発現量の平均値は、それぞれ野生型 zF 細胞の 6.3% および 19.0% であった。興味深いことに、野生型 zF 細胞で認められたグローバルな遺伝子発現量の性差 (図 2F-G) は *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞において消失した (図 5E)。加えて、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞における RNA 合成活性は雌雄ともに野生型 zF 細胞に比べて減少しており、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞の雌雄の RNA 合成活性は同等レベルであった (図 5F)。Ad4BP は副腎皮質におけるステロイド産生だけでなく、精巣および卵巣における性ホルモンの産生においても重要な役割を果たしているため、*Ad4BP* 遺伝子のヘテロ欠損は性ホルモン産生に影響を与える可能性がある。そこで *Ad4BP*^{+/-} マウスの血中性ホルモン濃度を測定した。その結果、テストステロンおよび E2 の濃度は *Ad4BP*^{+/-} マウスと野生型マウス間で変化しなかった。(図 5G-H)。従って、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞におけるグローバルな遺伝子発現の性差の消失は、少なくとも *Ad4BP* 遺伝子のヘテロ欠損による性ホルモン産生の変化が原因ではないと考えられる。以上の結果は Ad4BP 量の減少がグローバルな遺伝子発現の減少を誘導することを示しており、Ad4BP がグローバルな遺伝子

発現の活性化に関与していることを強く示唆する。

次に、zF 細胞における Ad4BP の標的遺伝子を同定するため、雌雄それぞれ 5×10^4 個の zF 細胞を用い、CUT&RUN (Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease) - seq 解析⁷⁸を行った。その結果、雌で 24,051、雄で 15,033 の Ad4BP の集積領域（ピーク）が同定された（図 5I）。これらのうち、13,637 のピークが雌雄に共通に認められ、10,414 と 1,396 のピークがそれぞれメスとオスに特異的なピークとして同定された。Ad4BP のコンセンサス結合配列¹⁷は、メスとオスで検出された Ad4BP ピークの 99.0% と 98.9% に認められた（図 5J）。AD4BP タンパク質量がメスでオスよりも多いことから、Ad4BP の集積レベルはメスでオスよりも高いと推測されたが、実際にほぼ全てのピークで Ad4BP の集積レベルはメスでオスよりも高かった（図 5K）。

次に、Ad4BP の標的遺伝子の同定を試みた。メスで同定された Ad4BP のピークのうち 80.9% と、オスで同定されたピークの 81.5% は、遺伝子の近傍領域（遺伝子上流領域（転写開始点から 10kb 以内）、遺伝子内、そして遺伝子下流領域（転写終結点から 10kb 以内））に局在していた。マウスの全ゲノム領域に対するこの近傍領域の割合は 53.2% であることから、Ad4BP ピークは標的遺伝子の近傍領域に濃縮していると考えられる（図 5L）。エンハンサーなどの転写を活性化する領域から転写開始点までの距離は数百 bp から 100 kb など、様々であるが、本解析ではピークから 10 kb 以内に位置する遺伝子を Ad4BP の直接的な標的遺伝子であると仮定した。その結果、雌雄それぞれ 9,287 および 6,858 の遺伝子を Ad4BP の標的候補遺伝子として同定した。これらの遺伝子の内、zF 細胞で発現が認められたものは、メスで 4,541 遺伝子（発現遺伝子の 63.1%）、オスで 3,475 遺伝子（発現遺伝子の 49.6%）であった（図 5M—N）。これらの標的候補遺伝子の内、3,253 遺伝子が雌雄共通であった（図 5O）。以上の結果から、zF 細胞で発現する遺伝子の約半数の遺伝子が、Ad4BP によって直接制御される可能性が示唆された。

先に示した通り、オスの zF 細胞で抑制される遺伝子には、エネルギー代謝およびコルチコステロン産生に関与する遺伝子が含まれていた。そこで、これらの遺伝子の近傍に Ad4BP ピークが存在するかどうか調べた。図 5P に示すように、*Atp5d* (酸化リン酸化)、*Bcat2* (バリン、ロイシン、イソロイシン分解経路)、*Idh1* (TCA cycle)、*Cpt1a* (脂肪酸分解経路)、*Hk2* と *Pkm* (解糖系)、*Hsd3b1* と *Cyp21a1* と *Cyp11b1* (コルチゾール合成) 遺伝子の近傍に Ad4BP のピークが認められた。これらの遺伝子に加え、上述の代謝経路を構成する全ての他の遺伝子に Ad4BP のピークが見られた (補足図 1-4)。

以上の *Ad4BP*^{+/-}マウスを用いたトランスクリプトームおよび CUT&RUN-seq 解析の結果から、zF 細胞において、Ad4BP がアンドロゲンによるグローバルな遺伝子発現の抑制を仲介する可能性が示唆された (図 5Q)。

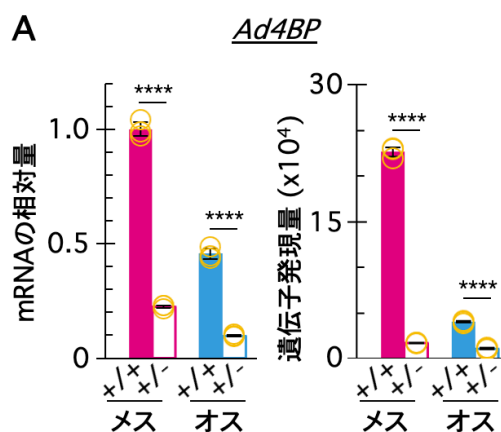


図 5A *Ad4BP*^{+/-}における *Ad4BP* の発現量

左図は CNN qRT-PCR、右図は CNN RNA-seq の結果を示す。各棒は生物学的反復データ (n=3) の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した (**p < 0.001, ****p < 0.0001)。+/+; 野生型 zF 細胞、+/-; *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞。

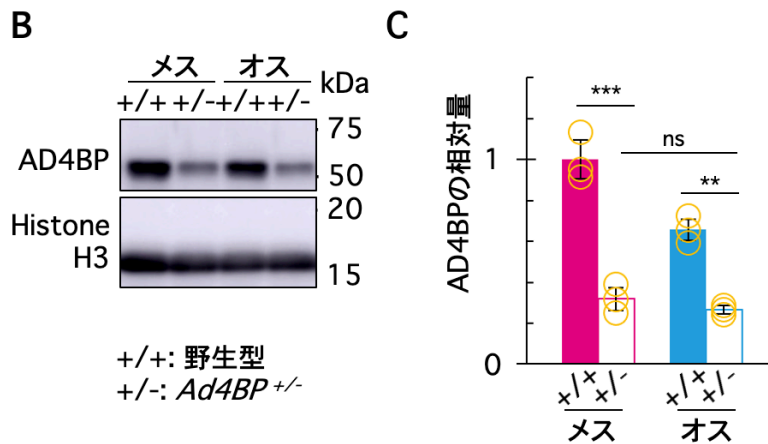


図 5B-C *Ad4BP*^{+/-}における AD4BP タンパク質量の比較

B はウエスタンブロッティング、C はウエスタンブロッティングのシグナルレベルを定量したデータを示す。各棒は生物学的反復データ (n=3) の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した (**p < 0.01, ***p < 0.001, ns; 有意差なし)。

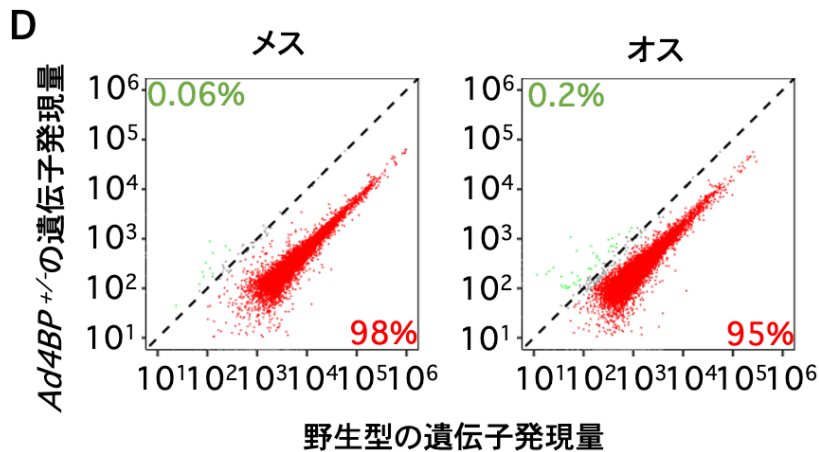


図 5D *Ad4BP*^{+/-}における単位細胞数あたり遺伝子発現量の雌雄比較

オレンジのドットは野生型 zF 細胞で *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞よりも 1.5 倍以上有意 (p < 0.05) に高発現する遺伝子を示し、緑のドットは *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞で野生型 zF 細胞よりも 1.5 倍以上有意 (p < 0.05) に高発現する遺伝子を示す。オレンジおよび緑のパーセンテージは野生型 zF 細胞、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞それぞれで高発現する遺伝子数の全発現遺伝子数に対する割合を示す。

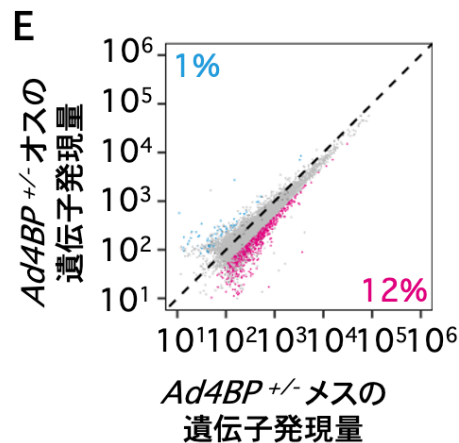


図 5E $Ad4BP^{+/-}$ における単位細胞数あたり遺伝子発現量の雌雄比較

マゼンタのドットは $Ad4BP^{+/-}$ メスで $Ad4BP^{+/-}$ オスよりも 1.5 倍以上有意 ($p < 0.05$) に高発現する遺伝子を示し、シアンのドットは $Ad4BP^{+/-}$ オスで $Ad4BP^{+/-}$ メスよりも 1.5 倍以上有意 ($p < 0.05$) に高発現する遺伝子を示す。マゼンタおよびシアンのパーセンテージは $Ad4BP^{+/-}$ メス、 $Ad4BP^{+/-}$ オスそれぞれで高発現する遺伝子数の全発現遺伝子数に対する割合を示している。

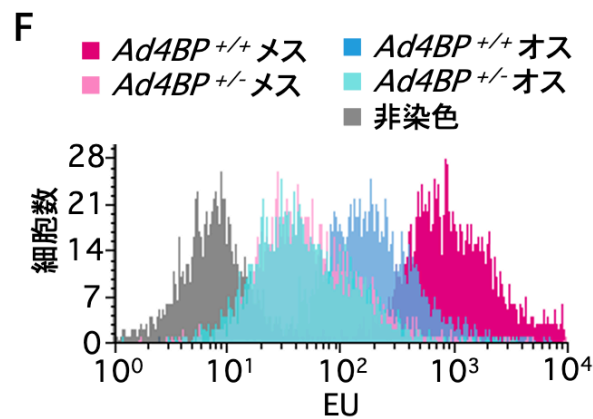


図 5F $Ad4BP^{+/-}$ zF 細胞における新生 RNA の合成活性

雌雄の野生型ならびに $Ad4BP^{+/-}$ マウスの zF 細胞を調製し、5-ethynyl-uridine (EU) 存在下で 1 時間培養した。培養後直ちに細胞の固定および EU の蛍光標識を行い、フローサイトメーターにより解析した。細胞毎の蛍光強度 (EU 取り込み量、新生 RNA 量) を示す。

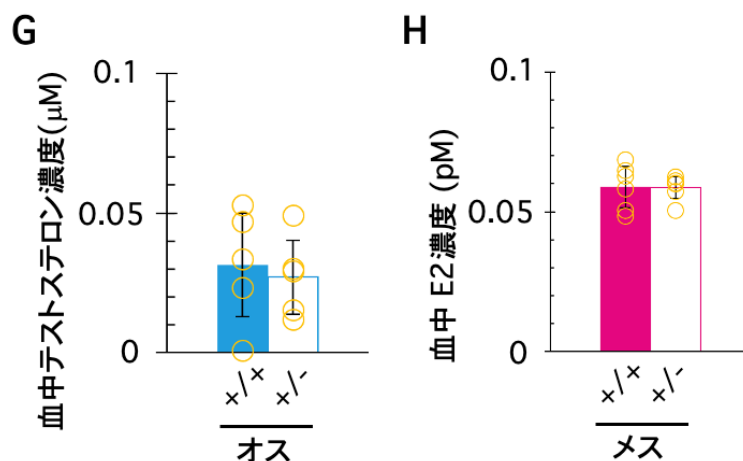


図 5 G-H *Ad4BP*^{+/-} マウスにおける性ステロイドの血中濃度

6 個体のオスとメスから血液を採取し、テストステロンと E2 濃度を測定した。G はテストステロン、H は E2 の血中濃度を示している。各カラムは生物学的反復データ (n=6) の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した。
+/+; 野生型マウス、+/-; *Ad4BP*^{+/-} マウス。

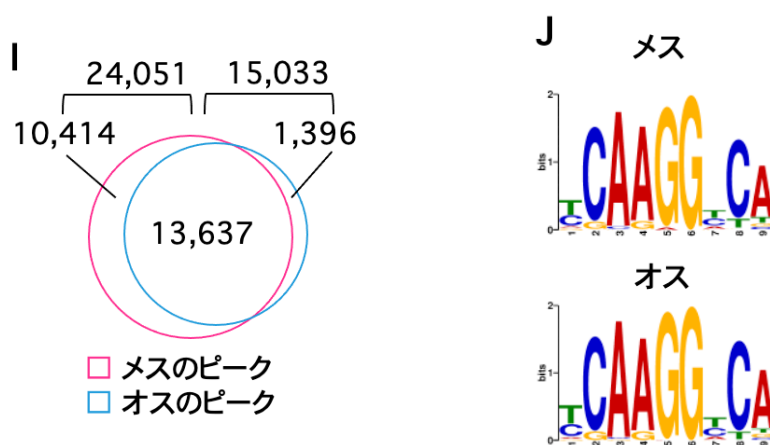


図 5 I-J 雌雄の *Ad4BP* CUT&RUN ピークの数とそのピーク中に認められる *Ad4BP* のコンセンサス結合配列

Normal IgG CUT&RUN-seq シグナルをバックグラウンドとして、*Ad4BP* CUT&RUN-seq シグナルが有意 ($q < 0.05$) に集積するゲノム上の領域をピークとした。雌雄それぞれのピークの数、また雌雄で共通ピーク (雌雄のピークが 1 bp 以上オーバーラップする領域) の数をベン図に示す (I)。また、雌雄それぞれのピーク中に高頻度に存在する配列 (9 bp) を探索した結果得られた配列を示す (J)。この配列はメスで 99.0、オスで 98.9% のピークに認められた。

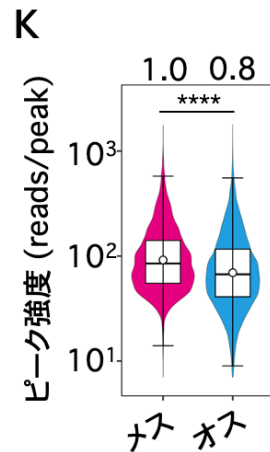


図 5 K Ad4BP CUT&RUN ピーク強度の雌雄間強度比較

白丸は雌雄におけるピーク強度の平均値を示す。図上部の数字はメスのピーク強度の平均値に対するオスの比を示す。各実験群は Mann-Whitney's non-parametric test によって統計検定した(**** $p < 0.0001$)。

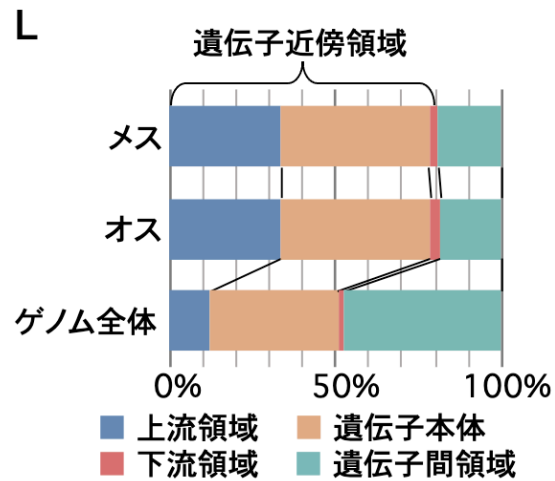


図 5 L Ad4BP CUT&RUN ピーク領域のゲノム上の分布

遺伝子上流領域（転写開始点から 10kb 以内）、遺伝子本体、遺伝子下流領域（転写終結点から 10kb 以内）、そして遺伝子間領域（上記以外）における Ad4BP CUT&RUN ピークの分布を示す。同時に上記領域のゲノム中における割合を示す。

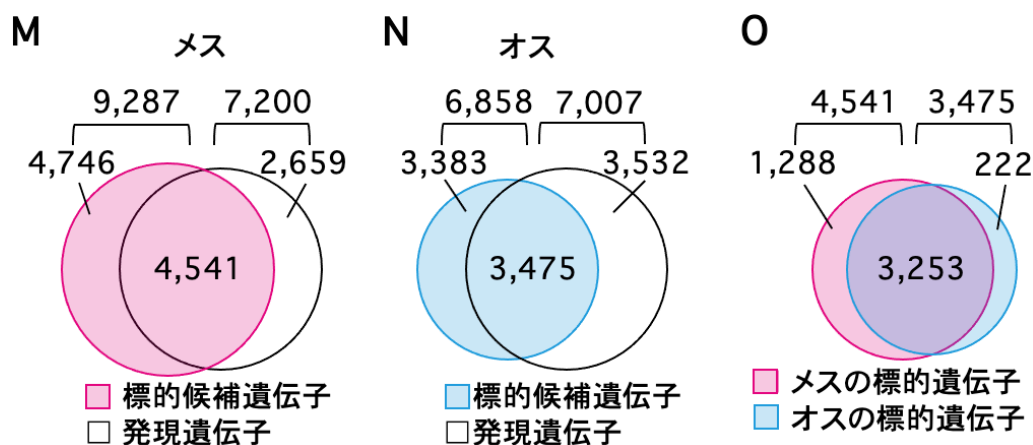


図 5 M-O Ad4BP の標的遺伝子数と zF 細胞における発現遺伝子数

Ad4BP CUT&RUN ピークが近傍(転写開始点から 10kb 上流から、遺伝子本体を含む転写終結点から 10 kb 下流までの領域内)に存在する遺伝子を Ad4BP の標的候補遺伝子と定義した。その標的候補遺伝子数、発現遺伝子数、ならびに標的遺伝子(標的候補遺伝子かつ発現遺伝子)の数をメス(M)、オス(N)それぞれ示す。メス特異的な標的遺伝子、雌雄共通の標的遺伝子、オス特異的な標的遺伝子の数を示す(O)。

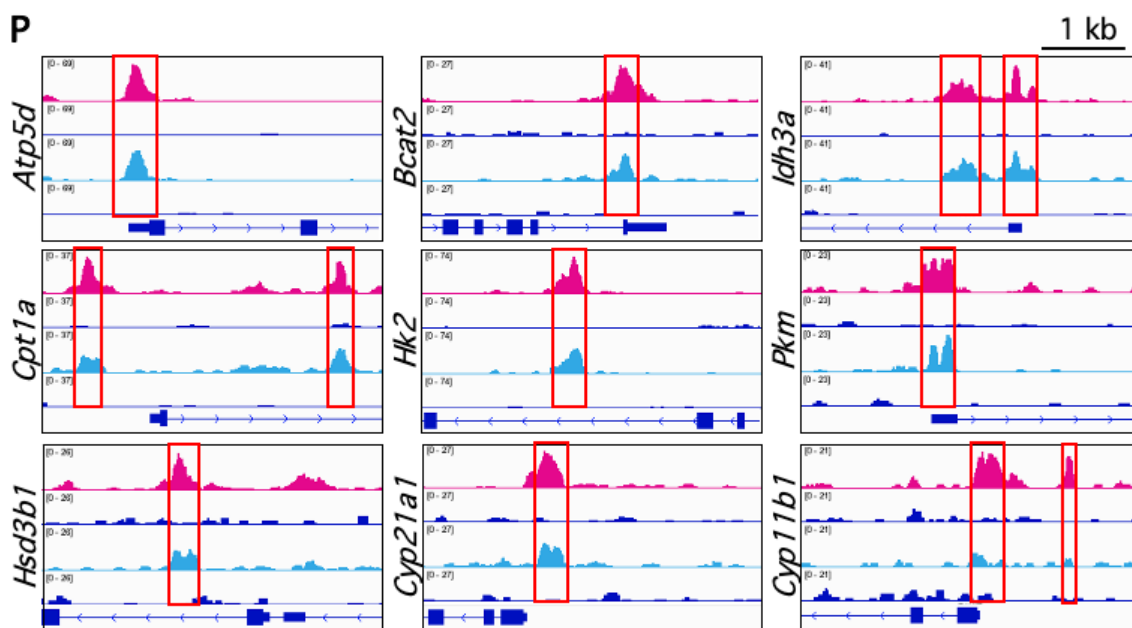


図 5 P エネルギー代謝関連遺伝子および糖質コルチコイド産生遺伝子近傍に認められる Ad4BP の集積

マゼンタおよびシアンのヒストグラムは、それぞれメスとオス zF 細胞における Ad4BP の集積を示し、青いヒストグラムは normal IgG (コントロール) を使用した場合の集積を示す。赤枠はピーク領域を示す。

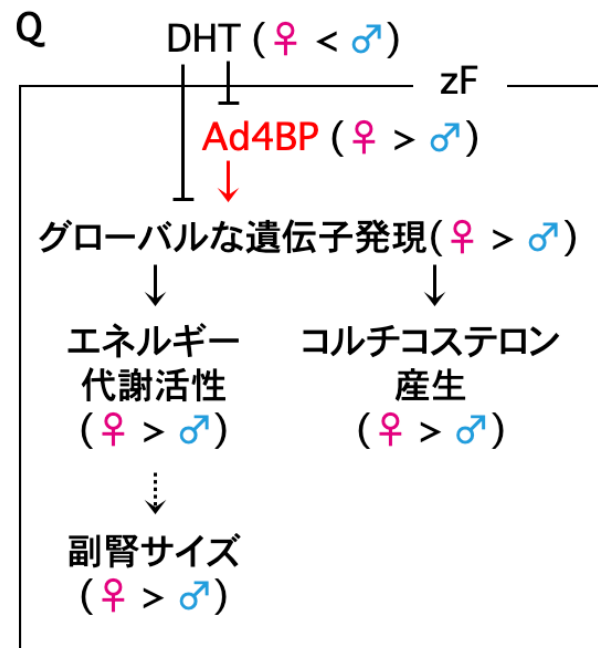
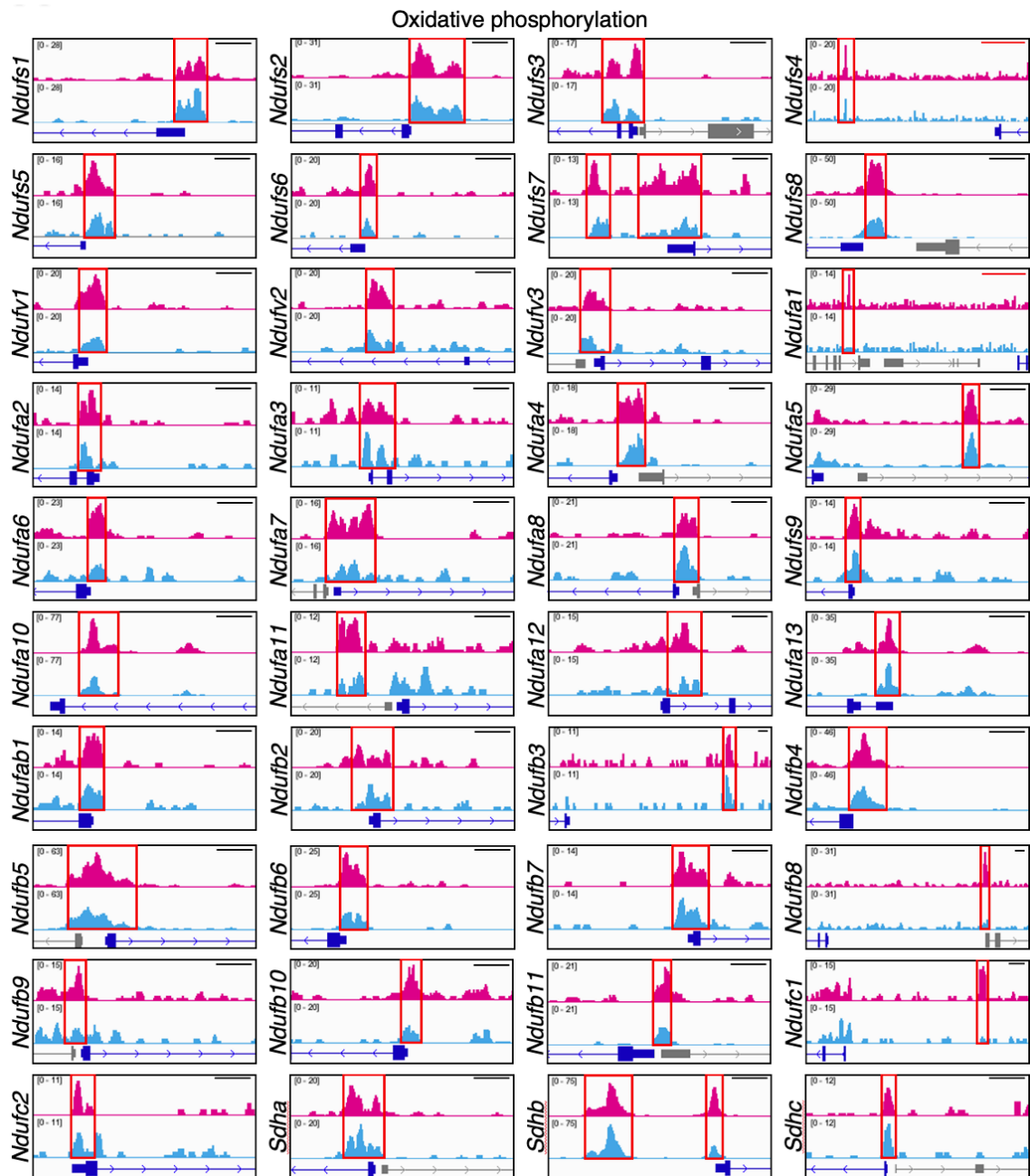


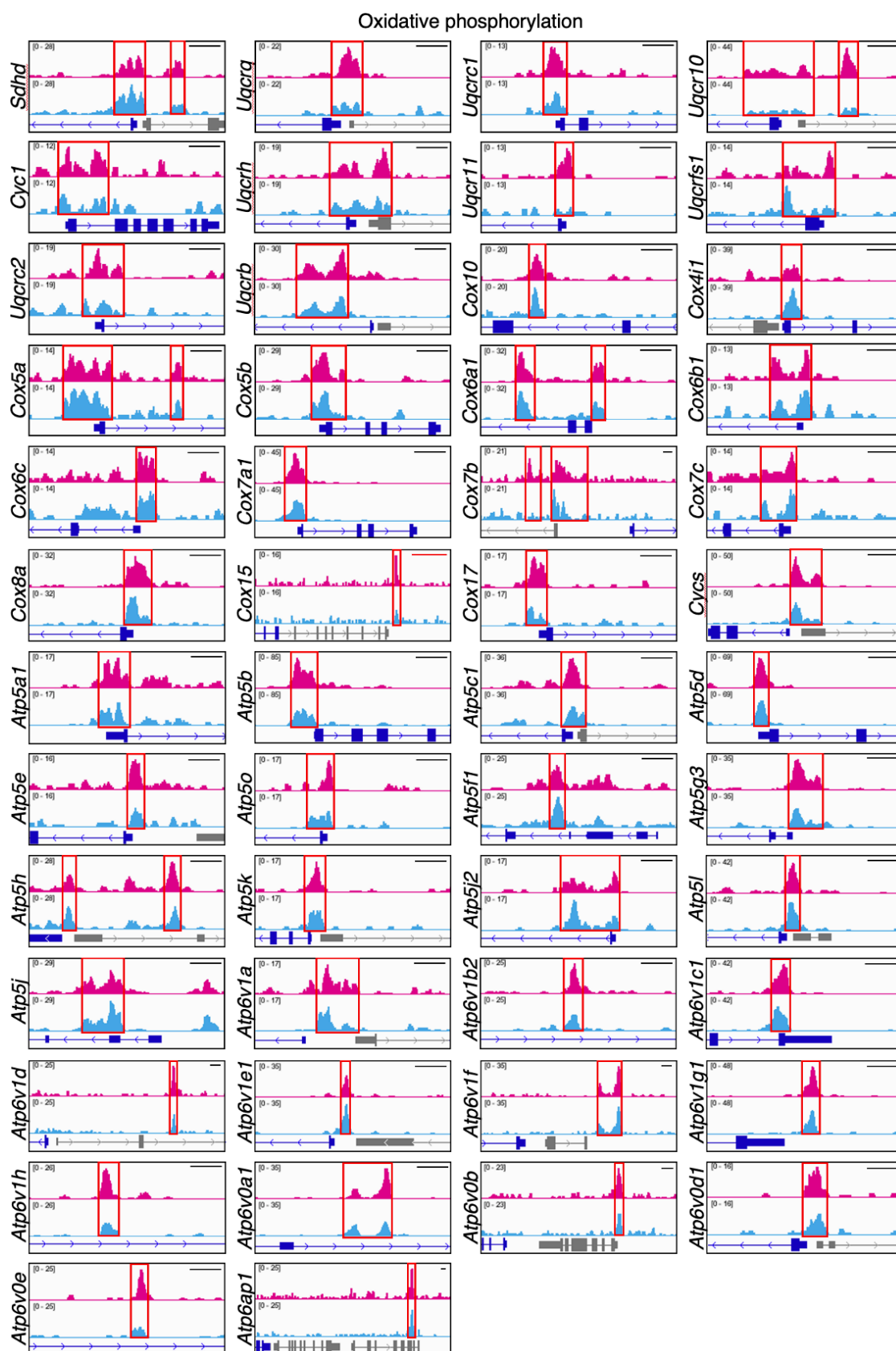
図 5 Q Ad4BP はアンドロゲンによるグローバルな遺伝子発現の抑制を仲介する

zF で発現する約半数の遺伝子は、Ad4BP によってその発現を直接制御され、アンドロゲン存在下で抑制される。一方残り半数の発現遺伝子もまた、アンドロゲン存在下でその発現を抑制されるものの、その抑制は Ad4BP によって間接的に制御される。

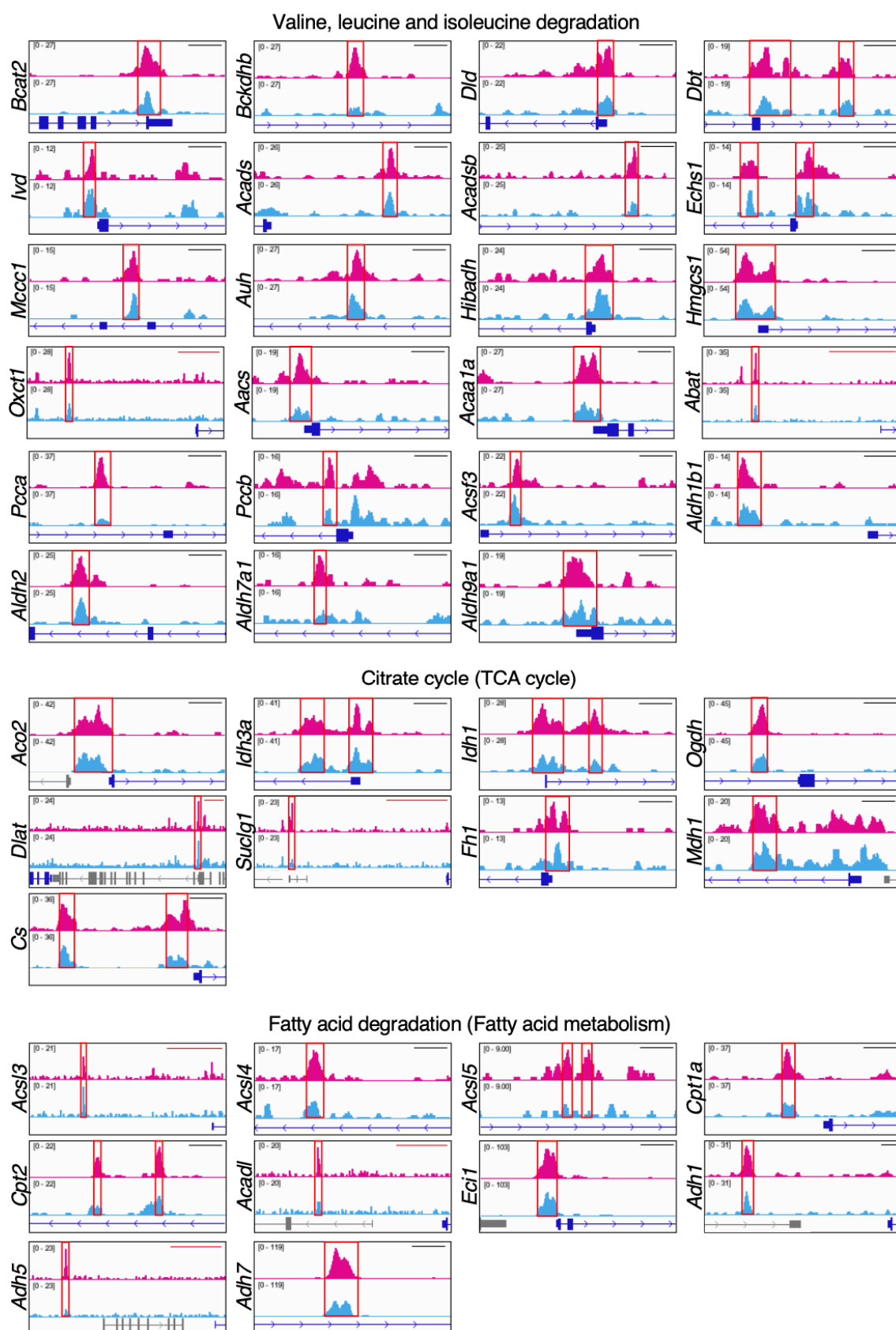


補足図1 エネルギー代謝関連遺伝子近傍の Ad4BP CUT&RUN ピーク 1

マゼンタおよびシアンのヒストグラムはそれぞれメスとオスの Ad4BP の集積を示す。黒および赤のスケールバーはそれぞれ 500 bp および 10 kb を示す。赤枠はピーク領域を示す。以降の補足図 2-4 も同様に示す。



補足図2 エネルギー代謝関連遺伝子近傍の Ad4BP CUT&RUN ピーク 2



補足図3 エネルギー代謝関連遺伝子近傍の Ad4BP CUT&RUN ピーク 3

(6) *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞におけるエネルギー代謝活性の低下

野生型マウスと *Ad4BP*^{+/-}マウス由来の zF 細胞から得られたトランスクリプトームデータを用いて、OXPHOS、TCA サイクル、解糖系、およびコルチコステロン産生遺伝子の発現を比較した。先に述べたように、これらの遺伝子の発現量は野生型 zF 細胞ではメスの方がオスよりも多い。また予想通り、これらの遺伝子の発現は *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞では雌雄ともに大幅に減少していた。一方、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞では遺伝子発現が大幅に低下し性差が消失していた。この結果と一致して、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞では代謝関連遺伝子の発現量に性差が認められなかった (図 6A)。

次に、野生型および *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞の解糖活性 (ECAR) および OXPHOS 活性 (OCR) を測定した。*Ad4BP*^{+/-}メスマウスから調製した zF 細胞の ECAR は野生型メスマウスの zF 細胞と比較して 39.5%まで低下した。また、*Ad4BP*^{+/-}オスマウスの zF 細胞の活性は *Ad4BP*^{+/-}メスと同等のレベルまで低下した (図 6B)。*Ad4BP*^{+/-}メスの OCR は野生型メスの 67.4%まで低下したが、*Ad4BP*^{+/-}オスの OCR は野生型オスと同等レベルであった (図 6C)。これらの代謝活性の変化に一致して、*Ad4BP*^{+/-} zF 細胞の細胞内 ATP 濃度はメスで野生型 zF 細胞の 56.2%まで低下し、オスでは 65.6%に低下した (図 6D)。さらに、*Ad4BP*^{+/-}マウスの血中コルチコステロン濃度は、メスでは野生型マウスの 25.6%まで低下し、オスでは 9.2%に低下した (図 6E)。

NADPH はステロイド産生を含む複数の代謝経路に必要であり、細胞内ではペントースリン酸経路、一炭素代謝経路、リンゴ酸酵素ならびに *Idh1* および *Idh2* などによる代謝が NADPH 産生に関与することが知られている。所属研究室では以前、Y-1 細胞 (マウス副腎皮質ガン由来の培養細胞株) において Ad4BP が NADPH 産生遺伝子の転写を活性化することで、細胞内 NADPH 産生を制御することを報告している²⁹。図 6F に示す通り、ペントースリン酸経路の制御に関与する *G6pdx* および *Pgd*、一炭素代謝の制御に関与する *Mthfd1*、また *Me2*、*Idh1*、*Idh2* 遺伝子の発現は雌雄ともに野生型 zF

細胞と比較して $Ad4BP^{+/-}$ zF 細胞で低下していた。これらの遺伝子の遺伝子近傍には $Ad4BP$ CUT&RUN ピークが認められ (補足図 1)、これらの遺伝子が全て $Ad4BP$ の標的遺伝子である可能性が示唆される。さらに、遺伝子発現の変化と一致して、zF 細胞内の NADPH 量は、メスの方がオスよりも多く、 $Ad4BP^{+/-}$ マウスから調製した zF 細胞では雌雄ともに野生型マウスと比較して減少していた (図 6G)。

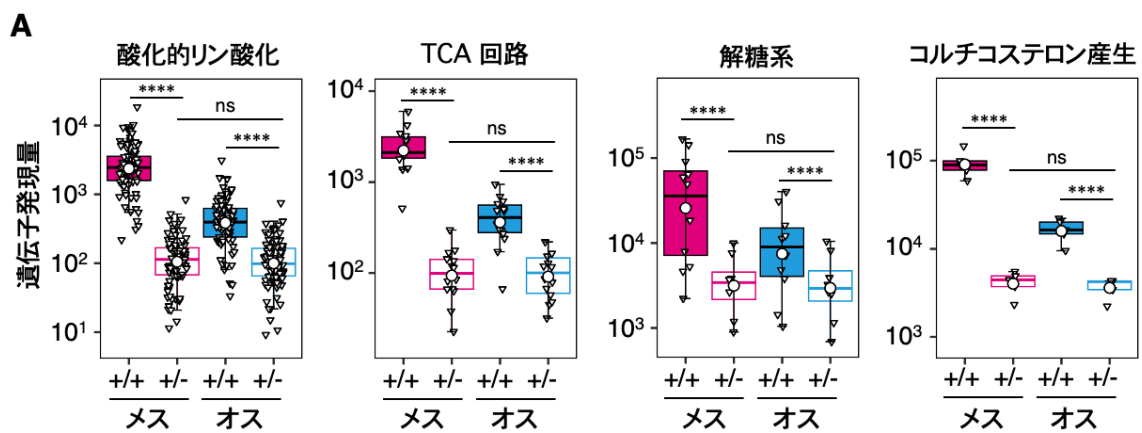


図 6A $Ad4BP^{+/-}$ zF 細胞と野生型 zF 細胞におけるエネルギー代謝関連遺伝子およびコルチコステロン産生遺伝子の発現量の比較

箱ひげ図中の白丸は各実験群における遺伝子発現の平均値を示す。各実験群は Wilcoxon signed rank tests によって統計検定した(**** $p < 0.0001$, ns; 有意差なし)。
+/+; 野生型 zF 細胞、+/-; $Ad4BP^{+/-}$ zF 細胞。

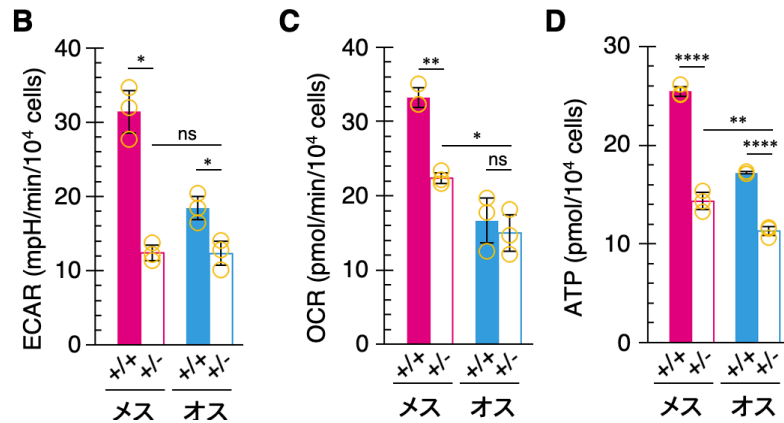


図 6B-D *Ad4BP*^{+/+}zF 細胞と野生型 zF 細胞におけるエネルギー代謝活性の比較
雌雄の *Ad4BP*^{+/+}マウスと野生型マウス由来の zF 細胞の解糖活性(B)、酸化的リン酸化
活性(C)、および細胞内 ATP 量 (D) を示す。各カラムは生物学的反復データ(n=3)
の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(*p < 0.05,
p < 0.01, *p < 0.001, ****p < 0.0001, ns; 有意差なし)。+/+; 野生型マウス、+/-;
Ad4BP^{+/+}マウス。

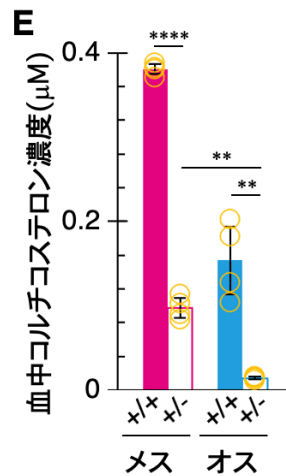


図 6E *Ad4BP*^{+/-} マウスと野生型マウスにおける血中コルチコステロン濃度
各カラムは生物学的反復データ(n=5)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(**p < 0.01, ****p < 0.0001)。+/+; 野生型マウス、+/-; *Ad4BP*^{+/-} マウス。

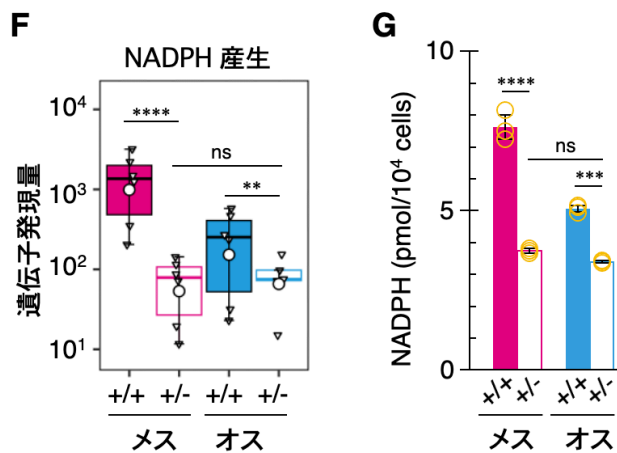


図 6F-G *Ad4BP*^{+/-} zF 細胞と野生型 zF 細胞における NADPH 産生遺伝子の発現量と細胞内 NADPH 量

NADPH 産生遺伝子の発現量(F)と細胞内 NADPH 量(G)を示す。箱ひげ図中の白丸は各実験群における遺伝子発現の平均値を示す。棒グラフの各カラムは生物学的反復データ(n=3)の平均値±標準偏差を示す。データは Wilcoxon signed rank tests (F)および Bonferroni の多重比較(G)によって統計検定した(**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, ns; 有意差なし)。+/+; 野生型マウス、+/-; *Ad4BP*^{+/-} マウス。

(7) zF 細胞における Ad4BP の発現量によって調節される骨格筋サイズと重量

近年の研究により、アンドロゲンの骨格筋に対する直接的な作用は、骨格筋の肥大化よりもむしろ、筋力の増強において重要であることが示されている⁴²⁻⁴⁵。すなわち、アンドロゲンによる骨格筋の肥大は、筋線維に対する間接的な作用により制御されている可能性が示唆されている⁴⁶。一方で、糖質コルチコイド受容体の骨格筋特異的なノックアウトが骨格筋の肥大を引き起こすこと⁴⁷、デキサメタゾン（糖質コルチコイドのアナログ）の投与が骨格筋の萎縮を誘発することが報告されている⁵。これらの報告を考えると、*Ad4BP*^{+/-}マウスの骨格筋は、血中コルチコステロンの低下によって肥大化すると推測された。

そこでこの点を検証するため、*Ad4BP*^{+/-}マウスの骨格筋を解析した。その結果予想通り、前肢と後肢の骨格筋は *Ad4BP*^{+/-}マウスで野生型マウスよりも明らかに増大していることが観察された（図 7A）。実際、*Ad4BP*^{+/-}マウスの腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋の重量は、雌雄ともに野生型マウスよりも有意に高値であった（図 7B）。マウスの骨格筋は主に四種類のタイプの筋線維から構成されており、速筋を構成する筋線維は大部分が IIB 型筋線維である。野生型マウスと *Ad4BP*^{+/-}マウスの腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋（いずれも速筋に分類される）について、IIB 型筋線維のマーカー（Myh4:Myosin heavy chain 4）の免疫染色を行った（図 7C-E）。染色画像をもとに IIB 型筋線維の横断面積（CSA: cross sectional area）を測定した。過去の報告と一致して、野生型マウスではオスの方がメスよりもこれらの骨格筋の IIB 型筋線維の CSA は大きかった（図 7C）。また予想通り、これらの骨格筋の IIB 型筋線維の CSA は *Ad4BP*^{+/-}マウスで野生型マウスよりも有意に高値を示した（図 7D-E）。以上の結果から、副腎皮質 zF 細胞は糖質コルチコイドの産生を通じ、骨格筋の大きさと重さの制御に関与する可能性が強く示唆された。本研究は精巣で合成されるアンドロゲンが、副腎皮質 zF 細胞の糖質コルチコイド産生の抑制を介して、間接的に骨格筋サイズの性差を誘導するとい

う、骨格筋の性差の構築と維持における新規のメカニズムを提唱した (図 7F)。

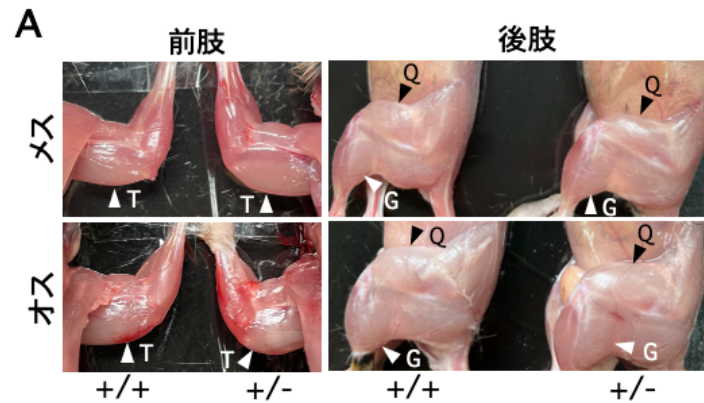


図 7A $Ad4BP^{+/-}$ マウスと野生型マウスの前肢と後肢

T; Triceps; 上腕三頭筋、Q; quadriceps; 大腿四頭筋、G; gastrocnemius; 腓腹筋、+/+; 野生型マウス、+/-; $Ad4BP^{+/-}$ マウス。

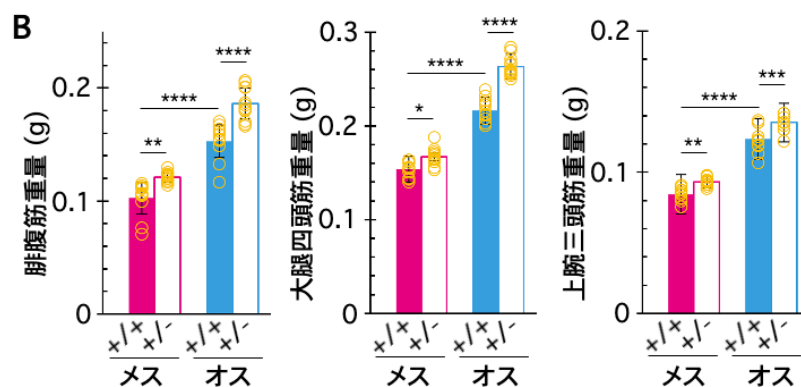


図 7B $Ad4BP^{+/-}$ マウスと野生型マウスにおける骨格筋重量

$Ad4BP^{+/-}$ マウスと野生型マウスの腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋を調製し、その重量を計測した。各カラムは生物学的反復データ(n=12)の平均値±標準偏差を示し、Bonferroni の多重比較によって統計検定した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。+/+; 野生型マウス、+/-; $Ad4BP^{+/-}$ マウス。

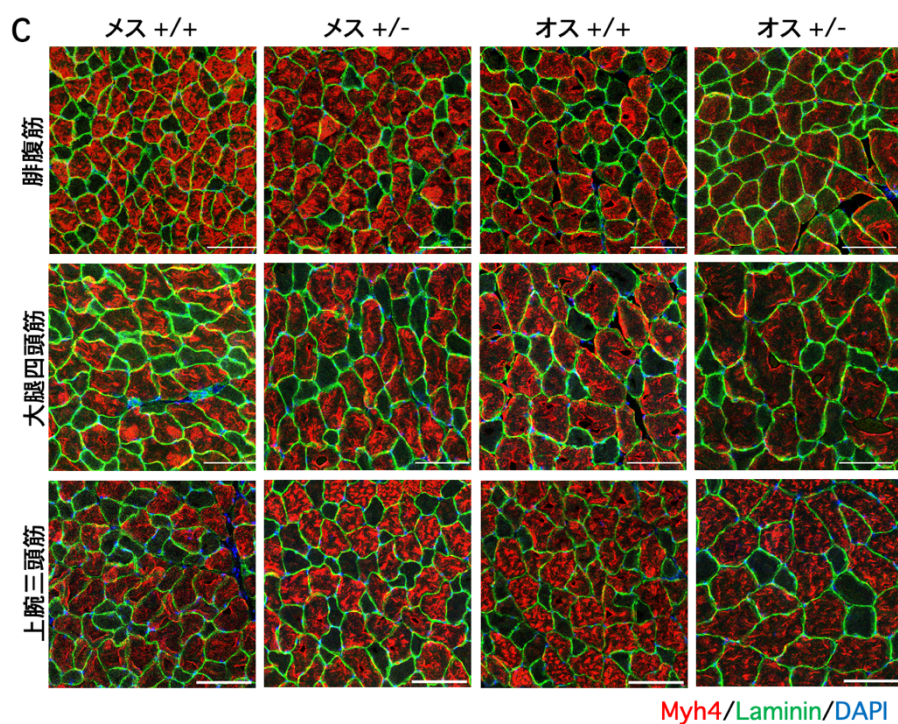


図 7C $Ad4BP^{+/-}$ マウスと野生型マウスにおける骨格筋の横断面図

$Ad4BP^{+/-}$ マウスと野生型マウスから腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋を採取し、横断面を IIB 型筋線維のマーカーである MYH4 (赤) と Laminin 抗体 (緑) によって蛍光免疫染色を行った。赤く染められた筋繊維は IIB 型筋線維。Laminin は筋繊維の周囲を染めている。白いバーは 100 μm を示す。+/+; 野生型マウス、+/-; $Ad4BP^{+/-}$ マウス。

D

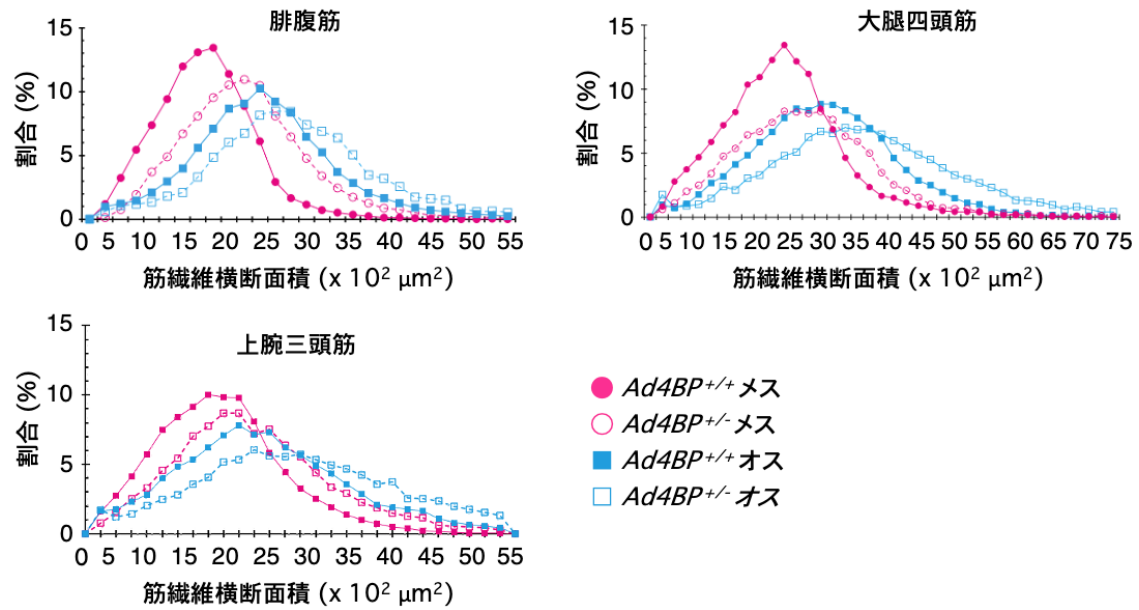


図 7D *Ad4BP*^{+/-} マウスと野生型マウスにおける骨格筋繊維の横断面積の分布

各骨格筋横断面図における IIB 型筋線維筋繊維(図 7C における緑のシグナルで囲まれた領域[筋線維]の内、その内部に赤のシグナルを示す筋線維)面積の分布を示す。野生型メス、*Ad4BP*^{+/-}メス、野生型オス、および *Ad4BP*^{+/-}オスマウスで解析された筋線維の平均数は、腓腹筋では、それぞれ約 6,200、5,000、6,000、および 5,000、大腿四頭筋では、それぞれ約 4,400、4,400、4,300、および 4,600、上腕三頭筋では、それぞれ約 2,900、3,400、3,400、および 4,600 であった。

E

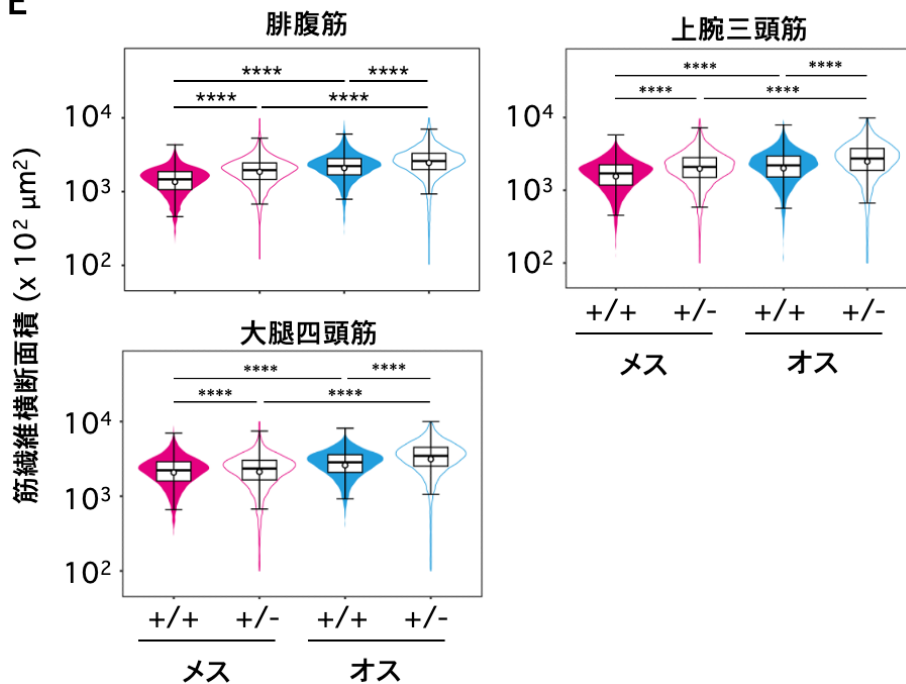


図 7E *Ad4BP*^{+/-} マウスと野生型マウスにおける骨格筋線維の横断面積の比較

各骨格筋横断面図における IIB 型筋線維筋繊維(図 7C における緑のシグナルで囲まれた領域[筋線維]の内、その内部に赤のシグナルを示す筋線維)面積の分布をヴァイオリンプロットおよび箱ひげ図で示す。野生型メス、*Ad4BP*^{+/-}メス、野生型オス、および *Ad4BP*^{+/-}オスマウスで解析された筋線維の平均数は、腓腹筋では、それぞれ約 6,200、5,000、6,000、および 5,000、大腿四頭筋では、それぞれ約 4,400、4,400、4,300、および 4,600、上腕三頭筋では、それぞれ約 2,900、3,400、3,400、および 4,600 であった。白丸は各実験群における筋線維横断面積の平均値を示す (n=3)。Bonferroni の多重比較によって統計検定した(*****p* < 0.0001)。+/+; 野生型マウス、+/-; *Ad4BP*^{+/-} マウス。

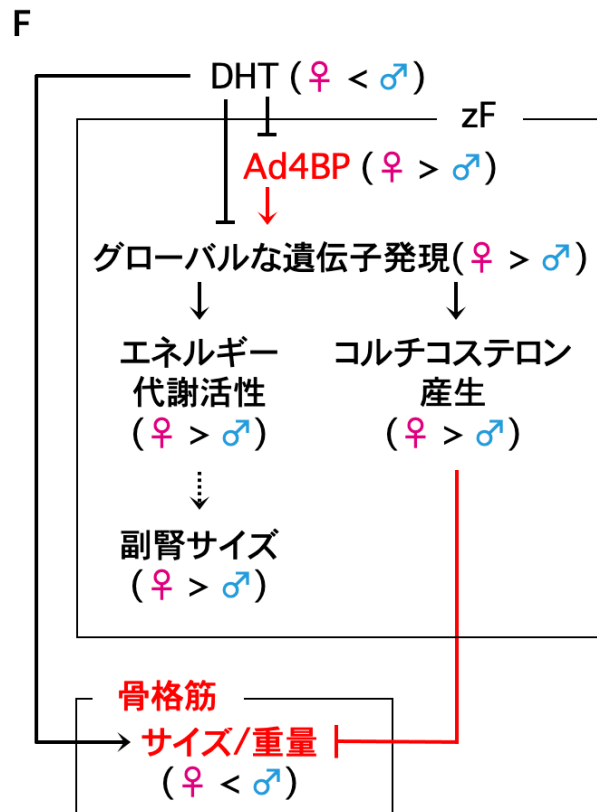


図 7F アンドロゲンによる副腎皮質 zF 細胞を介した骨格筋サイズの性差誘導機構
 アンドロゲンは zF 細胞における Ad4BP の発現を抑制する。その結果グローバルな遺伝子発現がオスで抑制され、細胞内エネルギー代謝およびコルチコステロン産生が抑制される。オスでコルチコステロン産生が抑制された結果、メスよりもオスで骨格筋が大きいという性差が誘導される。

考察

本研究は、副腎皮質の性差構築機構の解明と、その性差の生理学的な意義を明らかにすることを目的に行われた。その結果、私は二つの興味深い知見を得た。一点目は副腎皮質が産生する糖質コルチコイドを介した新たな性差構築機構であり、二点目はグローバルな遺伝子発現制御による副腎皮質の性差構築機構である。

(1) 副腎皮質が産生する糖質コルチコイドを介した新たな性差構築機構

ヒト副腎皮質は球状層、束状層 (zF)、網状層の三つの層から構成されている。一方、マウス・ラットなどの齧歯類では網状層が存在しないため、束状層 (zF)、網状層の二層で構成される。副腎皮質に性差があることは以前より知られており⁷⁻¹⁶、本研究では糖質コルチコイドを産生する zF の性差に焦点を当てた。雌雄マウスの副腎皮質から zF 細胞を高純度で単離した後、mRNA 量を定量した。驚くべきことに、同数の細胞から mRNA を調製したにもかかわらず、メスの mRNA 量はオスの 1.82 倍であった。また、アンドロゲンによって副腎のサイズが減少する⁴⁹のと同様に、mRNA 量もアンドロゲンによって減少した。

アンドロゲンは一般的に、その受容体(AR)への結合を介して遺伝子発現を活性化する⁵⁰と考えられている。一方で、AR による遺伝子発現の抑制作用についても報告されている^{31,32,61}。この抑制機構には二つの可能性が考えられる。一つ目の可能性は、副腎皮質におけるアンドロゲンによる遺伝子発現の直接的な抑制であり、これは副腎皮質特異的 AR ノックアウト (KO) マウスの副腎が肥大するという報告と矛盾しない⁵¹。もう一つの可能性は、他の器官・細胞を介した間接的な抑制である。これまでの研究で、アンドロゲンが視床下部-下垂体-副腎軸を抑制し、それによって ACTH (adrenocorticotrophic hormone)が減少することが示されている^{52,53}。ACTH が減少すると、副腎皮質細胞の増殖とコルチコステロン合成は低下する。したがって、アンドロゲンが下垂体における ACTH 合成の抑制を通じ、間接的に副腎皮質におけるコルチコ

テロン合成を低下させると考えるのは合理的である。

コルチコステロンはグルココルチコイド受容体を介して、全身の器官・細胞に様々な影響を与える。したがって、血中コルチコステロン濃度の性差が全身の器官・細胞に性差を誘導する可能性が考えられる。これまでに骨格筋や肝臓に性差が存在することが知られているが、これらの器官・細胞の性差の少なくとも一部はグルココルチコイドによって誘導される可能性がある。実際、骨格筋特異的グルココルチコイド受容体 (GR) KO マウスでは骨格筋サイズの性差が減少すること⁴⁷、および肝臓特異的 GR KO では炎症関連遺伝子の性差が減少すること⁵⁵が報告されている。しかしながら、グルココルチコイドが骨格筋や肝臓に性差を誘導するのであれば、グルココルチコイドの血中濃度や副腎皮質における産生量に性差がなければならない。前述のように、グルココルチコイドの血中濃度にはメスで多いという性差が知られていたため、この性差が骨格筋の性差の一部を誘導すると考えられた。そこで本研究では、血中コルチコステロン (グルココルチコイド) 濃度が有意に減少する *Ad4BP* ヘテロ KO マウスを用いて、生体内で実際にグルココルチコイドが性差を作り出していることの証明を試みた。その結果、血中コルチコステロン濃度が低下した *Ad4BP* ヘテロ KO マウスでは、骨格筋の重量、および Type IIB 筋線維の断面積が増大することが示された。GR は全身のほぼ全ての細胞で発現するため、グルココルチコイドは骨格筋線維や肝細胞だけでなく、他の器官・細胞における性差の確立にも関与していると考えられる。従来、全身の器官・細胞の性差は性ホルモンによる直接作用により誘導されると理解されてきたが、本研究によってグルココルチコイドおよび GR を介した新たな性差構築機構の存在が示された。

(2) グローバルな遺伝子発現制御による副腎皮質の性差構築機構

副腎皮質の性差を調べるため、過去に二つの研究グループによるマイクロアレイを用いた解析が行われた¹⁴⁻¹⁶。一つの研究では、アンドロゲンが脂質およびコレステロー

ル代謝に関連する遺伝子の発現を活性化することが示されたものの、彼らの結果は完全には本研究の結果と一致しない。この原因として、彼らの研究と本研究で使用された細胞の違いを挙げることができる。本研究では高純度に調製したマウスの zF 細胞の mRNA を使用したが、彼らの研究では球状層と束状層両方を含むラットの副腎皮質全体から調製した mRNA¹⁴、または髄質を含むラットの副腎全体から調製した mRNA を使用している¹⁵。zF 細胞以外の細胞種を含む細胞集団から調製した mRNA を用いた場合と、高純度に調製した zF 細胞から調製した mRNA を用いた場合では、後者からより正確な結果が得られるはずである。さらに、zF 細胞から得られる mRNA 量が雌雄間で異なるという、性差を考える上で極めて興味深い結果が得られた。この結果は高純度に調製した zF 細胞を使うことで初めて得ることができた結果であった。このような雌雄間での mRNA 量の性差を考慮して、本研究では同数の雄雌の zF 細胞から調製された mRNA を使用した。一方、彼らの研究では同量の雌雄の mRNA が使用された。mRNA 含有量が異なる細胞間で遺伝子発現を比較する際に、同量の mRNA を使用したトランスクリプトーム解析は対象とする細胞の遺伝子発現の差を正確に検出できない。よって、細胞ごとの mRNA 含有量を考慮せずに得られたトランスクリプトームデータをもとに差を議論する際には、細心の注意が必要であると考ええる。

雌雄間で zF 細胞の遺伝子発現を比較すると、ほぼ全ての遺伝子発現がメスで高いことが明らかになった。つまり、メスの zF 細胞ではグローバルに転写が活性化されていることを示唆した。このようなグローバルな転写調節は、癌の進行や細胞が分化する際に観察される^{32-35, 56}。また、グローバルな転写調節は、翻訳、代謝、および細胞増殖などの基本的な細胞活動の活性化と関連することが示されており、細胞の状態を劇的に変化させる新たなメカニズムとして注目されている。本研究は、グローバルな転写調節によって性差が誘導されることを示した初めての例であった。

メスの zF 細胞では遺伝子発現が全体的に上昇していたが、なかでもオスと比較して

高い発現を示す遺伝子が存在した。これらの遺伝子は、エネルギー代謝、リン脂質の産生、バリン・ロイシン・イソロイシン代謝、NADPH およびコルチゾールの産生など、基本的な生物活動に密接に関連する遺伝子であった。実際、これらの遺伝子が制御する代謝経路（解糖系、酸化的リン酸化、および NADPH 産生）の活性を測定したところ、メスにおける活性がオスよりも高いことが示された。解糖系および酸化的リン酸化で産生される ATP は、NADPH とともにコレステロール合成とステロイド合成に補酵素として利用される。したがって、これらの代謝活性がメスで高いことが、メスで高いコルチステロンの産生を可能としていると考えられる。同様に、ATP および NADPH は細胞増殖に伴う DNA、タンパク質、および生体膜の合成にも利用される。代謝活性の性差は、zF 細胞の増殖活性の性差にも寄与している可能性がある。

CUT&RUN-seq 解析により、zF 細胞において、Ad4BP の集積は全遺伝子の約 63.1%（メス）および 49.6%（オス）で観察され、約 4,500 および 3,500 個の遺伝子がメスおよびオスにおける Ad4BP の直接の標的遺伝子として同定された。また、ほぼ全ての遺伝子の発現は *Ad4BP* 遺伝子の発現レベルに応じて変化したため、Ad4BP は直接または間接的にグローバルな遺伝子調節を制御することが示された。これまでに、転写因子の標的遺伝子の探索がゲノムワイドに行われており、その結果、多くの転写因子が数千の標的遺伝子を有することが示されている^{58,59}。Ad4BP と同様に、これらの転写因子もグローバルな転写調節に関与している可能性が考えられる。

AR は転写活性化因子としてだけでなく、転写抑制因子としても作用することが報告されている⁵⁰。最近、AR が *Myc* 遺伝子の発現を抑制することによって前立腺がん細胞においてグローバルな遺伝子発現を抑制することが示された⁶⁰。同様に、本研究では、AR が *Ad4BP* 遺伝子の発現を抑制することによって zF 細胞でグローバルな遺伝子発現を抑制すること示した。所属研究室で行われた以前の研究によって、AR がアンドロゲンの存在下で Ad4BP と直接相互作用し、Ad4BP の転写活性を抑制することが示されて

いる⁶¹。*Ad4BP* 遺伝子は自身の転写翻訳産物により転写活性化される（自己制御）を受けることから、AR は *Ad4BP* の転写活性の抑制を通じ、*Ad4BP* 遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられる。

アンドロゲンとは対照的に、エストロゲン(E2)は副腎の重量とグローバルな遺伝子発現を増加させた。E2 は *Ad4BP* 遺伝子の発現を増加させることで、このような作用を発揮した可能性が考えられたが、E2 は *Ad4BP* タンパク質の発現に影響を与えない。したがって、上記の E2 による作用は、*Ad4BP* の発現調節を介さない、すなわちアンドロゲンの作用機序とは異なる機序で働く可能性が強く示唆された。

性ホルモンおよびその受容体は、標的遺伝子の発現調節を通じて我々の身体を構成する全身の細胞に性差を誘導すると考えられている。実際、これまでに多くの性ホルモン受容体の標的遺伝子が同定され、いくつかの表現型の性差については標的遺伝子の機能によって説明されている。この従来の考え方に加え、本研究は副腎皮質ならびに糖質コルチコイド量の性差を介して全身の器官・細胞に性差を誘導するという新たなメカニズムを提唱する(図 8)。今後は、性ホルモンの直接作用を通じた性差誘導に加え、副腎皮質を起点とする新たな性差誘導メカニズムを考慮しつつ、全身の性差の理解が進むことが期待される。

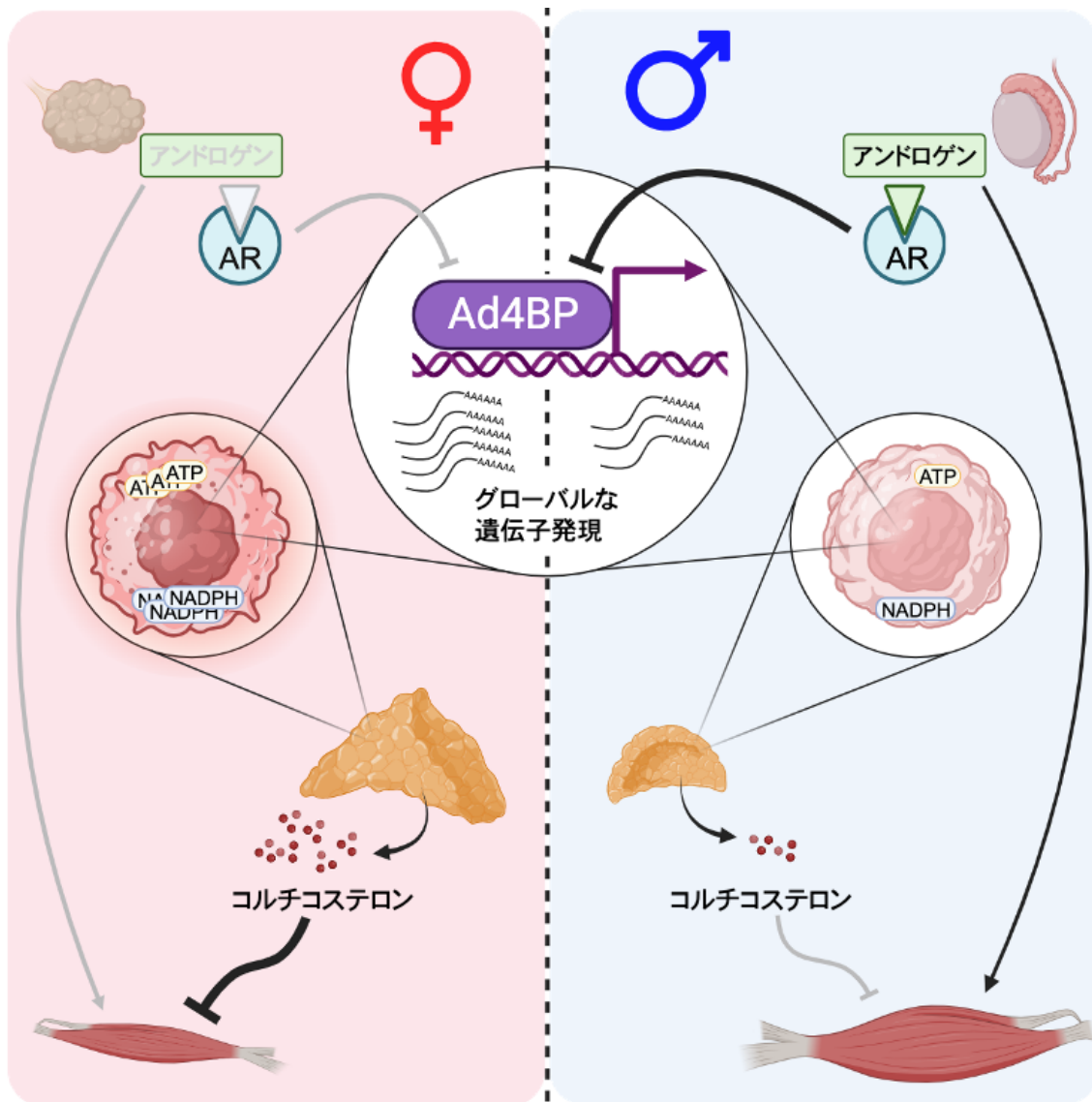


図8 副腎皮質 zF 細胞を介した性差の誘導機構

アンドロゲンは直接骨格筋に作用するというよりもむしろ、副腎皮質 zF 細胞を介して、間接的に作用することによって骨格筋サイズの性差（メスよりもオスで大きい）を誘導する。

実験方法

(1) マウス

副腎皮質細胞がEGFPで標識される2つのトランスジェニックマウス、Ad4BP-BAC-EGFP⁴⁰とStAR-EGFP⁶²ならびにAd4BPヘテロ欠損マウス(Ad4BP^{+/-})⁶³とC57BL/6Jを使用した。すべてのマウスはCRF-1 (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)を給餌され、12時間の明暗周期で管理された環境で飼育された。すべての動物実験は九州大学の動物実験委員会によって承認され、ガイドラインに従って実施された。

(2) 性腺除去と性ホルモン補充

雌雄のマウスそれぞれに、偽手術(コントロール)、性腺除去(性腺除去+Oil)、DHT投与(性腺除去+DHT)およびE2投与(性腺除去+E2)の4種の処理を行い、計8群の実験群を用意した。コントロール群では、3週齢のマウスに対し偽手術を行った。コントロール群以外は全て共通して、3週齢時点で性腺除去手術を行った。これに続けて、性腺除去群では5週齢時点から1日1回の5%のエタノールを含むCorn oilを皮下注射により3週間投与した。DHT投与群では5週齢時点から、5%のエタノールを含むCorn oilに溶解したDHT(5 α -ジヒドロテストステロン, 50 μ g/mL, Wako, Osaka, Japan) 100 μ Lを、1日1回の皮下注射により3週間投与した。E2投与群では、5%のエタノールを含むCorn oilに溶解したE2(β -エストラジオール, 5 μ g/mL, Sigma, St. Louis, MO) 100 μ Lを、出生後47、51、55日目(4日おきに一回、計3回)に皮下注射により投与した。E2の投与日以外は5週齢時点から1日に1回5%のエタノールを含むCorn oilを皮下注射により投与した。全群8週齢時点で実験に供した。メスの場合、それぞれ出生から53日目と55日目の5 p.m.にPMSG(牝馬血清ゴナドトロピン, 37.5 units/mL, ASKA Pharmaceutical, Japan) 0.2 mLとhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン, 37.5 units/mL, ASKA Pharmaceutical) 0.2 mL腹腔内に注射し、超排卵を誘導した。

hCG 投与後 4 時間と 48 時間のマウスを、それぞれ発情期のメスおよび発情間期のメスとして実験に供した。

(3) フルタミド投与

生後 74 日からオスマウスの皮下に corn oil に溶解した 100 μ L のフルタミド (400 μ g/mL、Sigma)、または同量の corn oil (コントロール) を一日一回、注射した。投与日数 0 日 (コントロールオス) のサンプルでは、生後 74 日から 10 日間 corn oil の投与を行った。投与日数 1 日のサンプルでは、生後 74 日から 9 日間 corn oil の投与を行ったのち、生後 83 日にフルタミドを投与した。投与日数 2 日のサンプルでは、生後 74 日から 8 日間 corn oil の投与を行ったのち、生後 82 日から 2 日間フルタミドを投与した。投与日数 3 日のサンプルでは、生後 74 日から 7 日間 corn oil の投与を行ったのち、生後 81 日から 3 日間フルタミドを投与した。投与日数 10 日のサンプルでは、生後 74 日から 10 日間フルタミドを投与した。コントロールメスではコントロールオスと同様の処理を行った後、膣垢検査を実施し、発情間期にあるマウスのみ実験に使用した。全群生後 84 日目に実験に供した。

(4) zF 細胞の調製

8 週齢の Ad4BP-BAC-EGFP または StAR-EGFP マウスの副腎を使用した。zF を顕微鏡観察下で他の層が混入しないように顕微手術用の器具を用いて分取した。分取した zF 組織は、1 mM $MgCl_2$ 、5 mg/ml BSA (bovine serum albumin)、1 mg/ml collagenase (Sigma)、0.25 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma)、および 0.5 mg/ml DNase I (Roche, Basel, Switzerland) を添加した HBSS (Hank's balanced salt solution) 中で 1 時間、37° C に加温した。加温後、35 μ m セルストレーナーを通過させ、その後、300 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、2% BSA および 1 mM EDTA を添加した DMEM/F12 培地に再懸濁した。

得られた細胞を 7-AAD (7-aminoactinomycin D、BD Bioscience、Franklin Lakes、NJ) で染色し、JSAN (Bay bioscience、Hyogo、Japan) を使用して 7-AAD および EGFP の蛍光に基づいてセルソーティングした。zF 細胞は 7-AAD-/EGFP+として分取した。細胞数は Countess II FL (Thermo Fisher Scientific) を使用して計測した。

(5) 単位細胞当たりの total RNA と mRNA の定量

8 週齢の Ad4BP-BAC-EGFP マウスの副腎から zF を分取した後、溶解バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、および 1% SDS) で溶解した。細胞溶解液を total RNA とゲノム DNA を抽出するために、2 つに等分した。一方の細胞溶解液から、RNeasy Micro キット (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して total RNA を抽出した。もう一方の細胞溶解液はリボヌクレアーゼ A (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した後 30 分間 37° C に関した。その後フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿法により gDNA を抽出した。1 μ g の total RNA から NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, Ipswich, MA) を用いて mRNA を分離した。Total RNA と mRNA の量は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で定量した。ゲノム DNA の量は Qubit (Life Technologies, Carlsbad, CA) で測定した。単位細胞数当たりの total RNA と mRNA の量は次のように計算した。まず、total RNA と DNA の測定値より、1 μ g のゲノム DNA あたりの total RNA 量 (total RNA 量/ μ g gDNA) を算出した。この値が単位細胞あたりの total RNA 量に相当する。次に、1 μ g の total RNA から精製された mRNA 量を定量した。この定量値が、1 μ g の total RNA 中に含まれる mRNA 量に相当する (mRNA/ μ g total RNA)。最後に、「1 μ g の gDNA あたりの total RNA 量」と「1 μ g の total RNA 中の mRNA 量」を掛け合わせることで、1 μ g の gDNA 中の mRNA 量 (単位細胞あたりの mRNA 量) を算出した。

(6) 単位細胞当たりの total RNA と mRNA の調製

雌雄の Ad4BP-BAC-EGFP マウスから調製した 10,000 個の zF 細胞から、RNeasy Micro Kit を使用して total RNA を抽出した。RNA の品質は、Agilent RNA 6000 Pico Kit と Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) を用いて計測し、RNA integrity number が 8 以上であることを確認した。10,000 倍希釈した ERCC (External RNA Controls Consortium) コントロールミックス (Invitrogen, Waltham, MA) 4 μ L を total RNA 溶液 46 μ L に添加した。その後、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module を使用して mRNA 溶液を精製した。

(7) 新生 RNA 鎖合成活性測定

8 週齢の Ad4BP-BAC-EGFP の副腎を使用し、上述の方法で zF 細胞を分取した。分取した zF 細胞は、培養バッファー (D-MEM (Nacalai Tesque) に 10% FBS-charcoal stripped (Serana Europe GmbH, Brandenburg, Germany) を添加したもの) で 2 回洗浄した後、1mM の 5-ethynyl-uridine (EU, BLD pharmatech, Shanghai, China) を含む培養バッファー中で 1 時間、37° C で加温した。加温後の細胞は 35 μ m のセルストレーナーを通した後、2 回 PBS 洗浄した。洗浄後の細胞は 0.03% Triton X-100 と 0.5% のホルマリンを添加した PBS 中で 30 分間、固定した。固定した細胞を、0.03% Triton X-100/PBS で 2 回洗浄した。洗浄後の細胞を 25 μ M の Azide-fluor 545 (red fluorescence, Sigma)、1 mM CuSO₄ と 100 mM アスコルビン酸を添加した 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) に中で 1 時間処理し、EU が組み込まれた RNA を蛍光標識した。PBS による 2 回の洗浄と再懸濁の後、フローサイトメーター(JSAN)を用いて、EGFP 陽性細胞 (zF 細胞) の数と赤色蛍光(EU 標識 RNA 量)の強度を定量した。

(8) CNN RNA-seq

上述の方法で 10^4 個の zF 細胞から mRNA をする際に ERCC を添加した。この mRNA をもとに、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) と NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Unique Dual Index Primer Pairs, New England Biolabs) を用いてライブラリーを調製した。ライブラリーは HiSeq 2500 (151-bp ペアエンド、Illumina) でシーケンスした。FastQC^{66, 67} および Trimmomatic⁶⁸ による品質管理の後、STAR (Spliced transcripts Alignment to a Reference)⁶⁹ を使用してリファレンスゲノム (mm10) にマッピングした。featureCounts⁷⁰ を使用してリードアノテーションとリードカウントを計算した (option "-M, -O, -p")。生物学的なレプリケート (n=3) の平均値を計算し、平均カウント値が 300 を超える遺伝子を発現遺伝子として定義した。ERCC spike-in のリード数を対象に、DESeq2⁷¹ を使ってスケールングを行った。これにより、ERCC spike-in の size factor を算出した。この size factor を用いて各遺伝子の発現値を補正することで、単位細胞あたりのトランスクリプトームデータを取得した。マウスゲノム (mm10) および遺伝子アノテーションファイルのリファレンスシーケンスは、UCSC Genome Browser⁷² からダウンロードされ、EGFP と ERCC の配列を追加して使用した。このようにして算出された Normalized read count を遺伝子発現量として扱った。発現変動遺伝子を、DAVID^{73,74} を使用して KEGG パスウェイ解析に供した。

(9) ECAR と OCR の測定

Cell-Tak コートされた XF96 細胞培養マイクロプレート (Agilent) に播種 (15,000 細胞/well) した zF 細胞を用い、Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent) を使用して ECAR (ExtraCellular Acidification Rate) 測定した。基礎値の測定後、10 mM のグルコース、0.5 μ M のロテノン/アンチマイシン A、および 50 mM の 2-デオキシ D-グルコース (2-

DG) を順次注入し、都度測定を行った。すべての試薬は Seahorse XF Glycolytic Stress Test Kit (Agilent) のものを使用した。OCR (Oxygen Consumption Rate) も ECAR 同様に測定した。基礎値の測定後、1.5 μ M のオリゴマイシン、0.5 μ M の FCCP (カルボニルシアニド 4-(トリフルオロメトキシ)フェニルヒドラゾン)、および 0.5 μ M の ロテノン/アンチマイシン A を順次注入し、都度測定を行った。すべての試薬は Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent) のものを使用した。

(10) 血中ステロイドの測定

8-12 週のマウスを用いた。コルチコステロンの測定では 6 p.m. に、テストステロンの測定では 8 p.m. に心臓穿刺により採血した。麻酔薬はコルチコステロン値を上昇させることが知られているため⁷⁵、麻酔は行わなかった。マウスの保定から採血終了まで約 15 秒以内に完了した。採取した血清は測定時まで -30°C で冷凍保存した。コルチコステロン-9,11,12,12-d₄ (Sigma) およびテストステロン (2,3,4-¹³C₃, 99%) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA) を内部標準として使用した。血清 20 μ l から脂質を Bligh and Dyer 法により抽出し、内部標準とともに有機相に移し、窒素流下で乾燥した。その後、100 μ l のジラルド試薬 T (0.1% トリフルオロ酢酸を含む MeOH 中、5 mg/mL) で脂質抽出物を 60 分間 37°C で誘導し、反応は 0.028% NH₄OH を含むメタノール 100 μ L で停止した。誘導された脂質 1 μ l を超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) -電子スプレーイオン化 (ESI) -タンデム質量分析 (MS/MS) システムに注入した。LC 分離は ACQUITY UPLC™ BEH C18 カラム (1.7 μ m、2.1 $\times$ 50 mm; Waters, Milford, MA, USA) を用いて行った。流動相 A は 0.1% (v/v) ホルム酸を含む H₂O で、流動相 B は 0.1% (v/v) ホルム酸を含むアセトニトリルであった。LC グラデーションは、12 分で 95% A から 100% B への線形グラデーション、5 分間 100% B、5 分間 95% A の均衡 (合計 22 分のランタイム) で構成した。流速は 0.3 ml/min で、カラム温度は 25°C

であった。多重反応モニタリング (MRM) は、ESI ソースを備えた Xevo™ TQ-S マイクロトリプル四重極質量分析システム (Waters) を使用して陽イオンモードで実施した。

E2 の測定には 12 週の雌マウス血清を使用した。雌マウスは上述の方法で過排卵誘導され、hCG 注入後 4 時間後 (発情期) に採血した。内部標準としてエストラジオール (2,4,16,16-d4) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA) を使用した。血清 50 μ l と内部標準を 1.5 ml のポリプロピレンチューブに移し、水で 100 μ l に希釈した。タンパク質を沈殿させるために、サンプルにアセトニトリル 200 μ l を加え 30–60 秒間振盪した。その後、メチル tert-ブチルエーテル 1 ml を加え、30–60 秒間振盪した。室温で 13,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離した後、有機 (上) 相をクリーンな 1.5 ml のポリプロピレンチューブに移し、50°C で窒素流下で乾燥した。乾燥残留物は重曹バッファ (0.1 mM、pH10.5) 50 μ l で溶解し、ダンシルクロライド (1 mg/ml in acetonitrile) 50 μ l で 60°C で 10 分間誘導した。不溶性残渣を除去するため、室温で 13,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、上清の 10 μ l を UHPLC-ESI-MS/MS システムに注入した。LC 分離は CORTECS™ UPLC™ C18 カラム (1.6 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm; Waters) を用いて行った。流動相 A は 0.1% (v/v) ホルム酸を含む H₂O で、流動相 B は 0.1% (v/v) ホルム酸を含むアセトニトリルであった。LC グラデーションは、6 分で 95% A から 70% B への線形グラデーション、9 分で 100% B への線形グラデーション、5 分間 100% B、5 分間 95% A の均衡 (合計 25 分のランタイム) であった。流速は 0.35 ml/min、カラム温度は 45°C であった。ESI ソースを備えた Xevo™ TQ-S マイクロトリプル四重極質量分析システム (Waters) を使用して、陽イオンモードで MRM が実行した。ESI キャップ電圧は 1.0 kV、サンプリングコーン電圧は 30 V に設定した。ソース温度は 150°C、脱溶液温度は 500°C、脱溶液ガス流は 1000 L/h で、コーンガス流は 50 L/h であった。

(11) CNN qRT-PCR

CNN RNA-seq と同様に、Ad4BP-BAC-EGFP マウスの雄雌それぞれの 10^4 個の zF 細胞を Buffer RLT 中で溶解した。RNeasy Micro Kit を用いて total RNA を抽出し、これを鋳型に M-MLV (Invitrogen) と Oligo dT primer を用いて cDNA を調製した。qPCR は SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) と CFX96 (Bio-Rad) を用いて行った。CNN qRT-PCR に使用されたプライマーを表 1 に示す。Total RNA の濃度、あるいは内在性コントロール遺伝子の発現レベルに基づくいずれの補正も行わなかった。これにより、CNN qRT-PCR データは 10^4 個の zF 細胞中のターゲット mRNA の量を示す。

表 1 プライマーリスト

Genes		Forward sequence		Reverse sequence		
<i>Nr5a1</i>	5'-	TCGACAAGACGCAGCGTAAG	-3'	5'-	CCAAACTTGTTCCGCCAC	-3'
<i>Cyp11b2</i>	5'-	CGTCGGATGCACCTGGAGCC	-3'	5'-	GCCGCAGTCGGTTGAGACGC	-3'
<i>Cyp11b1</i>	5'-	CAGGAGCCTGACCCGATGGACA	-3'	5'-	GACTGTGGACGACCCTCTGCCA	-3'
<i>Akr1c18</i>	5'-	TCGTCCAGAGTTGGTCAGAC	-3'	5'-	CTTTAGGCAAAAAGCTCATTCCCT	-3'
<i>Th</i>	5'-	CTGTCTCGGGCTTTGAAAGTG	-3'	5'-	GACGCACAGAACTGAGGAGG	-3'
<i>Actg1</i>	5'-	CCTGAACCCCAAAGCTAACA	-3'	5'-	ACATGGCTGGGGTATTGAAG	-3'

(12) Immunoblotting

10^4 個の zF 細胞を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、1% SDS、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque)) 中で、Bioruptor (Cosmo Bio、Tokyo、Japan) に懸濁し、超音波破碎した。細胞溶解液は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供され、その後免疫ブロッティングを行った。一次抗体として抗 Ad4BP ウサギ抗体 (1 : 1,000、Morohashi et al.⁷⁷) と抗 pan-Histone H3 ウサギ抗体 (1 : 3,000、Invitrogen) が使用し、二次抗体として HRP-linked 抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 5,000、GE Healthcare、Chicago、IL) を使用した。Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) および LAS500 (GE Healthcare) を用いて撮像した。

(13) CUT&RUN-seq

Ad4BP の CUT&RUN (Cleavage Under Target & Release Using Nuclease) ⁷⁸ およびその後のライブラリー作製は、生物学的レプリケートとして独立して 2 回実施した。StAR-EGFP 由来の 50,000 個の zF 細胞を Concanavalin A ビーズ (Polyscience, Warrington, PA) に結合し、室温で 0.02% のジジトニンで 10 分間透過処理し、抗 Ad4BP ウサギ抗体 (1 µg/µL) または normal rabbit IgG (1 µg/µL, ZYMED Laboratories, South San Francisco, CA) とともに回転攪拌器上で 4° C で一晩インキュベートした。次に、pAG/MNase (700 ng/mL) を 150 µL 添加し、4° C で 30 分間消化した。消化後、10 分間 37° C に加温し、CUT&RUN フラグメント DNA を溶液中に抽出した。抽出した DNA をフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿法で精製した。精製した CUT&RUN フラグメントから、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) および NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Unique Dual Index Primer Pairs, New England Biolabs) を用いてライブラリー調製し、その後、NextSeq (Illumina) を使用してシーケンスした (151-bp paired-end)。FastQC および Trimmomatic によるフィルタリングをパスしたリードを、Bowtie2⁷⁹ を使用してリファレンスマウスゲノム (mm10) にリードがマッピングした。リファレンスゲノムおよび遺伝子アノテーションファイル (mm10) は UCSC Genome Browser からダウンロードした。公平な比較のためにマッピングされたリードを SamTools⁸⁰ によって、2,000 万までダウンサンプリングした。ブラックリスト領域 ⁸¹ にマッピングされたリードは除外した。MACS2⁸² を使用して normal rabbit IgG の CUT&RUN データをバックグラウンドとして Ad4BP のピークコールを行った (q 値<0.05)。雌雄それぞれのピークを、bedtools⁸³ を使用して雌雄の間でオーバーラップ(>1 bp) しているピークと、オーバーラップしていない性別特異的なピークに分類した。Multiple Em for Motif Extraction Suite⁸⁴ を用いてモチーフ

抽出を行った。Ad4BP のコンセンサス結合配列を同定した先行研究¹⁷に基づいて、モチーフの最大幅を指定するオプション ‘-maxk’ は 9 に設定した。CUT&RUN-seq ピーク領域のセット内での最大中央濃度が予測と、領域の位置分布を CentriMo⁸⁵ を用いて可視化した。各ピーク上のリードカウントは featureCounts を使用して算出した。すべてのピークは、ChIPseeker^{86,87} を使用して上流 (transcription start site から 10 kb 上流まで)、遺伝子本体、下流 (transcription termination site から 10 kb 下流まで)、およびそれ以外の領域に分類した。ピークは igv genome browser⁸⁸ で可視化した。

(14) 細胞内 ATP と NADPH 量の測定

細胞内の ATP および NADPH 量を、それぞれ CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) および NADP/NADPH アッセイキット (DOJINDO, Tokyo, Japan) を用いて測定した。いずれの測定においても、まず 10^4 個の zF 細胞から各キット付属の溶解バッファを用いて、細胞溶解液を調製した。次に、細胞溶解液とそれぞれキット付属の反応バッファを混合・反応した。反応した溶液は、それぞれマルチモードプレートリーダー EnSight (PerkinElmer, Waltham, MA) およびマイクロプレートリーダー iMark (BioRad, Hercules, CA) によって蛍光および吸光度の測定に供された。

(15) 筋繊維の断面積 (CSA) の測定

4 つの実験グループ (野生型メス、Ad4BP^{+/-}メス、野生型オス、および Ad4BP^{+/-}オス) の 3 種の骨格筋 (腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋) の凍結切片を、先行研究⁴⁸に従って免疫組織蛍光染色した。抗 MYH4 (1:1,000、Sawano et al.⁸⁹) ラット抗体および抗 laminin (1:1,000、Sigma) ウサギ抗体を一次抗体とし、それぞれマウス抗ラット IgG2b-Alexa Fluor® 647 (1:500、SouthernBiotech, Birmingham, AL) および Alexa Fluor 488 で標識されたヤギ抗ウサギ IgG (1:500、Invitrogen) を二次抗体として使用した。

核は DAPI (Sigma) で染色した。染色した標本を LSM700 共焦点レーザースキャニング顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用して観察した。観察画像を Fiji⁹⁰ を使用して解析し、IIb 型筋線維の CSA を測定した。野生型メス、Ad4BP^{+/-}メス、野生型オス、および Ad4BP^{+/-}オスで解析された筋線維の平均数は、腓腹筋では、それぞれ約 6,200、5,000、6,000、および 5,000、大腿四頭筋では、それぞれ約 4,400、4,400、4,300、および 4,600、上腕三頭筋では、それぞれ約 2,900、3,400、3,400、および 4,600 であった。

(16) 統計解析

パラメトリック検定は 2 つのグループ間の場合は unpaired two-tailed t-test、また 2 つ以上のグループの場合は one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni multiple comparison test で実施した。正規分布していない 2 つのグループ間では Mann-Whitney の U 検定、2 つ以上のグループでは Kruskal-Wallis の Dunn の多重比較検定を使用した。いずれの統計検定も R^2 を用いて実施した。統計情報は図の凡例に記載した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました諸橋憲一郎教授、ならびに馬場崇准教授に深く感謝いたします。お二方には実験操作や研究発表方法のご教授だけでなく、研究者としての心構えを教わり大変お世話になりました。また、研究室の皆さんには日々の実験やディスカッションにおいて有益なアドバイスをいただき、厚く御礼申し上げます。

共同研究者の皆様にも厚くお礼申し上げます。国立成育医療研究センター周産期病態研究部の秦健一郎先生、中林一彦先生ならびに石渡啓介先生には次世代シーケンスを行なって頂きました。順天堂大学大学院医学研究科生化学第一講座の横溝岳彦先生、李賢哲先生ならびに Korea Institute of Science and Technology の Man Ho Choi 先生には血中ステロイドを定量して頂きました。慶應義塾大学医学部小児科学の長谷川奉延先生、石井智宏先生には StAR-EGFP トランスジェニックマウスをご提供いただきました。

研究の遂行にあたり、実験方法のご教授、有益なアドバイス賜った先生方にも厚くお礼申し上げます。麻布大学獣医学部介在動物研究室の菊水健史先生にはマウスの取り扱いについてご教授いただきました。愛媛大学大学院医学系研究科病態生理学講座の今井祐記先生には骨格筋の性差を考える上で有益なアドバイスを賜りました。

参考文献

1. Xing, Y., Lerario, A.M., Rainey, W., and Hammer, G.D. (2015). Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *44*, 243–274. 10.1016/j.ecl.2015.02.001.
2. Pihlajoki, M., Dörner, J., Cochran, R.S., Heikinheimo, M., and Wilson, D.B. (2015). Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front. Endocrinol.* *6*, 27. 10.3389/fendo.2015.00027.
3. Vinson, G.P. (2016). Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. *Front. Neurosci.* *10*, 238. 10.3389/fnins.2016.00238.
4. Lyraki, R., and Schedl, A. (2021). Adrenal cortex renewal in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* *17*, 421–434. 10.1038/s41574-021-00491-4.
5. Munck, A., Guyre, P.M., and Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* *5*, 25–44. 10.1210/edrv-5-1-25.
6. Kitay, J.I. (1963). PITUITARY-ADRENAL FUNCTION IN THE RAT AFTER GONADECTOMY AND GONADAL HORMONE REPLACEMENT. *Endocrinology* *73*, 253–260. 10.1210/endo-73-2-253.
7. Malendowicz, L.K., Robba, C., and Nussdorfer, G.G. (1986). Sex differences in adrenocortical structure and function. XXII. Light- and electron-microscopic morphometric studies on the effects of gonadectomy and gonadal hormone replacement on the rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* *244*, 141–145. 10.1007/BF00218391.
8. Bielohuby, M., Herbach, N., Wanke, R., Maser-Gluth, C., Beuschlein, F., Wolf, E., and Hoeflich, A. (2007). Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *293*, E139–46. 10.1152/ajpendo.00705.2006.
9. Malendowicz, L.K. (1974). Sex differences in adrenocortical structure and function. I. The effects of postpubertal gonadectomy and gonadal hormone replacement on nuclear volume of adrenocortical cells in the rat. *Cell Tissue Res.* *151*, 525–536. 10.1007/BF00222997.

10. Feillet, C., Guérin, S., Lonchamp, M., Dacquet, C., Gustafsson, J.-Å., Delaunay, F., and Teboul, M. (2016). Sexual Dimorphism in Circadian Physiology Is Altered in LXR α Deficient Mice. *PLoS One* *11*, e0150665. 10.1371/journal.pone.0150665.
11. Dumontet, T., Sahut-Barnola, I., Septier, A., Montanier, N., Plotton, I., Roucher-Boulez, F., Ducros, V., Lefrançois-Martinez, A.-M., Pointud, J.-C., Zubair, M., et al. (2018). PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal. *JCI Insight* *3*. 10.1172/jci.insight.98394.
12. Grabek, A., Dolfi, B., Klein, B., Jian-Motamedi, F., Chaboissier, M.-C., and Schedl, A. (2019). The Adult Adrenal Cortex Undergoes Rapid Tissue Renewal in a Sex-Specific Manner. *Cell Stem Cell* *25*, 290-296.e2. 10.1016/j.stem.2019.04.012.
13. Lyraki, R., and Schedl, A. (2021). The Sexually Dimorphic Adrenal Cortex: Implications for Adrenal Disease. *Int. J. Mol. Sci.* *22*. 10.3390/ijms22094889.
14. Trejter, M., Hochol, A., Tyczewska, M., Ziolkowska, A., Jopek, K., Szyszka, M., Malendowicz, L.K., and Rucinski, M. (2015). Sex-related gene expression profiles in the adrenal cortex in the mature rat: microarray analysis with emphasis on genes involved in steroidogenesis. *Int. J. Mol. Med.* *35*, 702–714. 10.3892/ijmm.2015.2064.
15. Jopek, K., Celichowski, P., Szyszka, M., Tyczewska, M., Milecka, P., Malendowicz, L.K., and Rucinski, M. (2017). Transcriptome Profile of Rat Adrenal Evoked by Gonadectomy and Testosterone or Estradiol Replacement. *Front. Endocrinol.* *8*, 26. 10.3389/fendo.2017.00026.
16. El Wakil, A., Mari, B., Barhanin, J., and Lalli, E. (2013). Genomic analysis of sexual dimorphism of gene expression in the mouse adrenal gland. *Horm. Metab. Res.* *45*, 870–873. 10.1055/s-0033-1349881.
17. Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., and Omura, T. (1992). A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J. Biol. Chem.* *267*, 17913–17919. 10.1016/S0021-9258(19)37129-7.
18. Lala, D.S., Rice, D.A., and Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol. Endocrinol.* *6*, 1249–1258. 10.1210/mend.6.8.1406703.
19. Morohashi, K.I., and Omura, T. (1996). Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for

- the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J.* *10*, 1569–1577. 10.1096/fasebj.10.14.9002548.
20. Parker, K.L., and Schimmer, B.P. (1997). Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* *18*, 361–377. 10.1210/edrv.18.3.0301.
 21. Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* *77*, 481–490. 10.1016/0092-8674(94)90211-9.
 22. Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10939–10943. 10.1073/pnas.92.24.10939.
 23. Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., Shah, S., Jina, N., Hubank, M., Dattani, M.T., and Achermann, J.C. (2011). ChIP-on-chip analysis reveals angiopoietin 2 (Ang2, ANGPT2) as a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in the human adrenal gland. *FASEB J.* *25*, 1166–1175. 10.1096/fj.10-170522.
 24. Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K., and Miyamoto, K. (2012). Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* *153*, 5522–5534. 10.1210/en.2012-1334.
 25. Doghman, M., Figueiredo, B.C., Volante, M., Papotti, M., and Lalli, E. (2013). Integrative analysis of SF-1 transcription factor dosage impact on genome-wide binding and gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* *41*, 8896–8907. 10.1093/nar/gkt658.
 26. Yamauchi, K., Ikeda, T., Hosokawa, M., Nakatsuji, N., Kawase, E., Chuma, S., Hasegawa, K., and Suemori, H. (2020). Overexpression of Nuclear Receptor 5A1 Induces and Maintains an Intermediate State of Conversion between Primed and Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports* *14*, 506–519. 10.1016/j.stemcr.2020.01.012.
 27. Baba, T., Otake, H., Sato, T., Miyabayashi, K., Shishido, Y., Wang, C.-Y., Shima, Y., Kimura, H., Yagi, M., Ishihara, Y., et al. (2014). Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat. Commun.* *5*, 3634. 10.1038/ncomms4634.

28. Ruggiero, C., Doghman-Bouguerra, M., Sbiera, S., Sbiera, I., Parsons, M., Ragazzon, B., Morin, A., Robidel, E., Favier, J., Bertherat, J., et al. (2017). Dosage-dependent regulation of *VAV2* expression by steroidogenic factor-1 drives adrenocortical carcinoma cell invasion. *Sci. Signal.* *10*. 10.1126/scisignal.aal2464.
29. Li, B., Baba, T., Miyabayashi, K., Sato, T., Shima, Y., Ichinose, T., Miura, D., Ohkawa, Y., Suyama, M., and Morohashi, K.-I. (2017). Role of Ad4-binding protein/steroidogenic factor 1 in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells. *Endocr. J.* *64*, 315–324. 10.1507/endocrj.EJ16-0467.
30. Baba, T., Otake, H., Inoue, M., Sato, T., Ishihara, Y., Moon, J.-Y., Tsuchiya, M., Miyabayashi, K., Ogawa, H., Shima, Y., et al. (2018). Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids. *Commun Biol* *1*, 18. 10.1038/s42003-018-0020-z.
31. Efroni, S., Duttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoepfner, D.J., Dash, C., Bazett-Jones, D.P., Le Grice, S., McKay, R.D.G., Buetow, K.H., et al. (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *2*, 437–447. 10.1016/j.stem.2008.03.021.
32. Lin, C.Y., Lovén, J., Rahl, P.B., Paranal, R.M., Burge, C.B., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* *151*, 56–67. 10.1016/j.cell.2012.08.026.
33. Percharde, M., Wong, P., and Ramalho-Santos, M. (2017). Global Hypertranscription in the Mouse Embryonic Germline. *Cell Rep.* *19*, 1987–1996. 10.1016/j.celrep.2017.05.036.
34. Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., et al. (2012). c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* *151*, 68–79. 10.1016/j.cell.2012.08.033.
35. Kim, Y.-K., Cho, B., Cook, D.P., Trcka, D., Wrana, J.L., and Ramalho-Santos, M. (2023). Absolute scaling of single-cell transcriptomes identifies pervasive hypertranscription in adult stem and progenitor cells. *Cell Rep.* *42*, 111978. 10.1016/j.celrep.2022.111978.
36. Bulut-Karslioglu, A., Jin, H., Kim, Y.-K., Cho, B., Guzman-Ayala, M., Williamson, A.J.K., Hejna, M., Stötzl, M., Whetton, A.D., Song, J.S., et al. (2021). Chd1 protects genome integrity at promoters to sustain hypertranscription in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* *12*, 4859. 10.1038/s41467-021-25088-3.

37. Zubair, M., Ishihara, S., Oka, S., Okumura, K., and Morohashi, K.-I. (2006). Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 4111–4121. 10.1128/MCB.00222-06.
38. Morohashi, K.-I., and Zubair, M. (2011). The fetal and adult adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* *336*, 193–197. 10.1016/j.mce.2010.11.026.
39. Bland, M.L., Jamieson, C.A., Akana, S.F., Bornstein, S.R., Eisenhofer, G., Dallman, M.F., and Ingraham, H.A. (2000). Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14488–14493. 10.1073/pnas.97.26.14488.
40. Miyabayashi, K., Tokunaga, K., Otake, H., Baba, T., Shima, Y., and Morohashi, K.-I. (2015). Heterogeneity of ovarian theca and interstitial gland cells in mice. *PLoS One* *10*, e0128352. 10.1371/journal.pone.0128352.
41. Hanukoglu, I., and Rapoport, R. (1995). Routes and regulation of NADPH production in steroidogenic mitochondria. *Endocr. Res.* *21*, 231–241. 10.3109/07435809509030439.
42. Chambon, C., Duteil, D., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Malivindi, R., Kato, S., Chambon, P., and Metzger, D. (2010). Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 14327–14332. 10.1073/pnas.1009536107.
43. Rana, K., Chiu, M.W.S., Russell, P.K., Skinner, J.P., Lee, N.K.L., Fam, B.C., Zajac, J.D., and MacLean, H.E. (2016). Muscle-specific androgen receptor deletion shows limited actions in myoblasts but not in myofibers in different muscles in vivo. *J. Mol. Endocrinol.* *57*, 125–138. 10.1530/JME-15-0320.
44. Dubois, V., Laurent, M.R., Sinnesael, M., Cielen, N., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Gayan-Ramirez, G., Deldicque, L., Hespel, P., et al. (2014). A satellite cell-specific knockout of the androgen receptor reveals myostatin as a direct androgen target in skeletal muscle. *FASEB J.* *28*, 2979–2994. 10.1096/fj.14-249748.
45. Hosoi, T., Yakabe, M., Sasakawa, H., Sasako, T., Ueki, K., Kato, S., Tokuoka, S.M., Oda, Y., Abe, M., Matsumoto, T., et al. (2023). Sarcopenia phenotype and impaired muscle function in male mice with fast-twitch muscle-specific knockout of the androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *120*, e2218032120. 10.1073/pnas.2218032120.

46. Sakakibara, I., Yanagihara, Y., Himori, K., Yamada, T., Sakai, H., Sawada, Y., Takahashi, H., Saeki, N., Hirakawa, H., Yokoyama, A., et al. (2021). Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4. *iScience* 24, 102303. 10.1016/j.isci.2021.102303.
47. Shimizu, N., Maruyama, T., Yoshikawa, N., Matsumiya, R., Ma, Y., Ito, N., Tasaka, Y., Kuribara-Souta, A., Miyata, K., Oike, Y., et al. (2015). A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat. Commun.* 6, 6693. 10.1038/ncomms7693.
48. Christianto, A., Baba, T., Takahashi, F., Inui, K., Inoue, M., Suyama, M., Ono, Y., Ohkawa, Y., and Morohashi, K.-I. (2021). Sex differences in metabolic pathways are regulated by Pfkfb3 and Pdk4 expression in rodent muscle. *Commun Biol* 4, 1264. 10.1038/s42003-021-02790-y.
49. Malendowicz, L.K. (1974). Sex differences in adrenocortical structure and function. II. The effects of postpubertal gonadectomy and gonadal hormone replacement on the rat adrenal cortex evaluated by stereology at the light microscope level. *Cell Tissue Res.* 151, 537–547. 10.1007/BF00222998.
50. Gritsina, G., Gao, W.-Q., and Yu, J. (2019). Transcriptional repression by androgen receptor: roles in castration-resistant prostate cancer. *Asian J. Androl.* 21, 215–223. 10.4103/aja.aja_19_19.
51. Gannon, A.-L., O'Hara, L., Mason, J.I., Jørgensen, A., Frederiksen, H., Milne, L., Smith, S., Mitchell, R.T., and Smith, L.B. (2019). Androgen receptor signalling in the male adrenal facilitates X-zone regression, cell turnover and protects against adrenal degeneration during ageing. *Sci. Rep.* 9, 10457. 10.1038/s41598-019-46049-3.
52. Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Bate, E., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Jessop, D.S., and Harbuz, M.S. (2004). Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 16, 516–524. 10.1111/j.1365-2826.2004.01195.x.
53. Raff, H., Sharma, S.T., and Nieman, L.K. (2014). Physiological basis for the etiology, diagnosis, and treatment of adrenal disorders: Cushing's syndrome, adrenal insufficiency, and congenital adrenal hyperplasia. *Compr. Physiol.* 4, 739–769. 10.1002/cphy.c130035.
54. Gallo-Payet, N. (2016). 60 YEARS OF POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of

- ACTH. *J. Mol. Endocrinol.* *56*, T135-56. 10.1530/JME-15-0257.
55. Quinn, M.A., and Cidlowski, J.A. (2016). Endogenous hepatic glucocorticoid receptor signaling coordinates sex-biased inflammatory gene expression. *FASEB J.* *30*, 971–982. 10.1096/fj.15-278309.
 56. Percharde, M., Bulut-Karslioglu, A., and Ramalho-Santos, M. (2017). Hypertranscription in Development, Stem Cells, and Regeneration. *Dev. Cell* *40*, 9–21. 10.1016/j.devcel.2016.11.010.
 57. Morohashi, K.-I., Inoue, M., and Baba, T. (2020). Coordination of Multiple Cellular Processes by NR5A1/Nr5a1. *Endocrinol Metab (Seoul)* *35*, 756–764. 10.3803/EnM.2020.402.
 58. Zhang, Q., Liu, W., Zhang, H.-M., Xie, G.-Y., Miao, Y.-R., Xia, M., and Guo, A.-Y. (2020). hTFtarget: A Comprehensive Database for Regulations of Human Transcription Factors and Their Targets. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *18*, 120–128. 10.1016/j.gpb.2019.09.006.
 59. Liska, O., Bohár, B., Hidas, A., Korcsmáros, T., Papp, B., Fazekas, D., and Ari, E. (2022). TFLink: an integrated gateway to access transcription factor-target gene interactions for multiple species. *Database* *2022*. 10.1093/database/baac083.
 60. Guo, H., Wu, Y., Nouri, M., Spisak, S., Russo, J.W., Sowalsky, A.G., Pomerantz, M.M., Wei, Z., Korthauer, K., Seo, J.-H., et al. (2021). Androgen receptor and MYC equilibration centralizes on developmental super-enhancer. *Nat. Commun.* *12*, 7308. 10.1038/s41467-021-27077-y.
 61. Mukai, T., Kusaka, M., Kawabe, K., Goto, K., Nawata, H., Fujieda, K., and Morohashi, K.-I. (2002). Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex. *Genes Cells* *7*, 717–729. 10.1046/j.1365-2443.2002.00556.x.
 62. Sasaki, G., Ishii, T., Jeyasuria, P., Jo, Y., Bahat, A., Orly, J., Hasegawa, T., and Parker, K.L. (2008). Complex role of the mitochondrial targeting signal in the function of steroidogenic acute regulatory protein revealed by bacterial artificial chromosome transgenesis in vivo. *Mol. Endocrinol.* *22*, 951–964. 10.1210/me.2007-0493.
 63. Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y., Niwa, O., et al. (1995). Developmental defects of the ventromedial

- hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dyn.* *204*, 22–29. 10.1002/aja.1002040104.
64. Jao, C.Y., and Salic, A. (2008). Exploring RNA transcription and turnover *in vivo* by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15779–15784. 10.1073/pnas.0808480105.
 65. External RNA Controls Consortium (2005). Proposed methods for testing and selecting the ERCC external RNA controls. *BMC Genomics* *6*, 150. 10.1186/1471-2164-6-150.
 66. Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
 67. “FastQC,” <https://qubeshub.org/resources/fastqc> (2015).
 68. Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* *30*, 2114–2120. 10.1093/bioinformatics/btu170.
 69. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21. 10.1093/bioinformatics/bts635.
 70. Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* *30*, 923–930. 10.1093/bioinformatics/btt656.
 71. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550. 10.1186/s13059-014-0550-8.
 72. Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., and Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* *12*, 996–1006. 10.1101/gr.229102.
 73. Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* *4*, 44–57. 10.1038/nprot.2008.211.
 74. Sherman, B.T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M.W., Lane, H.C., Imamichi, T., and Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional

- annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* *50*, W216-21. 10.1093/nar/gkac194.
75. Larsson, C.A., Gullberg, B., Råstam, L., and Lindblad, U. (2009). Salivary cortisol differs with age and sex and shows inverse associations with WHR in Swedish women: a cross-sectional study. *BMC Endocr. Disord.* *9*, 16. 10.1186/1472-6823-9-16.
 76. Park, S.S., Kim, Y.H., Kang, H., Ahn, C.H., Byun, D.J., Choi, M.H., and Kim, J.H. (2023). Serum and hair steroid profiles in patients with nonfunctioning pituitary adenoma undergoing surgery: A prospective observational study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *230*, 106276. 10.1016/j.jsbmb.2023.106276.
 77. Morohashi, K., Zanger, U.M., Honda, S., Hara, M., Waterman, M.R., and Omura, T. (1993). Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol. Endocrinol.* *7*, 1196–1204. 10.1210/mend.7.9.8247022.
 78. Skene, P.J., and Henikoff, S. (2017). An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife* *6*. 10.7554/eLife.21856.
 79. Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* *9*, 357–359. 10.1038/nmeth.1923.
 80. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078–2079. 10.1093/bioinformatics/btp352.
 81. Amemiya, H.M., Kundaje, A., and Boyle, A.P. (2019). The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci. Rep.* *9*, 9354. 10.1038/s41598-019-45839-z.
 82. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* *9*, R137. 10.1186/gb-2008-9-9-r137.
 83. Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* *26*, 841–842. 10.1093/bioinformatics/btq033.

84. Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E., and Noble, W.S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* *43*, W39-49. 10.1093/nar/gkv416.
85. Bailey, T.L., and Machanick, P. (2012). Inferring direct DNA binding from ChIP-seq. *Nucleic Acids Res.* *40*, e128. 10.1093/nar/gks433.
86. Yu, G., Wang, L.-G., and He, Q.-Y. (2015). ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* *31*, 2382–2383. 10.1093/bioinformatics/btv145.
87. Wang, Q., Li, M., Wu, T., Zhan, L., Li, L., Chen, M., Xie, W., Xie, Z., Hu, E., Xu, S., et al. (2022). Exploring Epigenomic Datasets by ChIPseeker. *Curr Protoc* *2*, e585. 10.1002/cpz1.585.
88. Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* *29*, 24–26. 10.1038/nbt.1754.
89. Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ohkawa, Y., Nakamura, M., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., and Mizunoya, W. (2016). A One-Step Immunostaining Method to Visualize Rodent Muscle Fiber Type within a Single Specimen. *PLoS One* *11*, e0166080. 10.1371/journal.pone.0166080.
90. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682. 10.1038/nmeth.2019.
91. Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
92. Ihaka, R., and R. Gentleman. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.* *5*:299-314. <http://www.R-project.org>.

論文目録

Takahashi, F., Baba, T., Christianto, A., Yanai, S., Lee-Okada H. C., Ishiwata, K., Nakabayashi, K., Hata, K., Ishii, T., Hasegawa, T., Yokomizo, T., Choi, M.H., Morohashi, K.-i. (2024). Development of sexual dimorphism of skeletal muscles through the adrenal cortex, caused by androgen-induced global gene suppression. *Cell Reports*. (In press)