

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18380177
 研究課題名（和文） 新規ホメオティック因子群による性腺刺激ホルモン遺伝子の転写調節機構の解析
 研究課題名（英文） Studies for mechanisms of gonadotropin gene regulation with novel pituitary transcription factors
 研究代表者
 加藤 幸雄（KATO YUKIO）
 明治大学・農学部・教授
 研究者番号：30114177

研究成果の概要：

交付期間で、新規転写因子 PROP1 の特異抗体を作製し、下垂体の発生過程における発現変動を解析し、PROP1 が発生初期の下垂体の全細胞に存在し、その後ホルモン産生細胞の出現に伴いその数を減じることを初めて明らかにした。しかも、PROP1 陽性細胞は常に細胞分化に重要な因子 SOX2 と共存する事も初めて明らかにした。さらに、新規の転写因子 PRX2 の同様な解析を行い、PROP1-PRX2-下垂体の分化細胞と言う系譜の一端を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 9,400,000 | 2,820,000 | 12,220,000 |
| 2007年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 2008年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,600,000 | 4,680,000 | 20,280,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・基礎獣医学基礎畜産学

キーワード：転写調節因子、ホメオティック因子、性腺刺激ホルモン、転写因子ネットワーク、相互作用、クローニング

1. 研究開始当初の背景

性腺の成熟をはじめ、雌雄における配偶子形成に重要な役割を担っているものが、下垂体で合成・分泌される性腺刺激ホルモンである。このホルモンの機能の解明は、畜産動物にとどまらず、ヒトを初めとする全ての脊椎動物が営む繁殖・生殖にとって重要な課題の一つである。我々はこの性腺刺激ホルモンを構成するブタ FSHβ 鎖遺伝子の解析の過程で、下垂体特異的転写因子 PROP1 が FSHβ 鎖遺伝子の発現を制御することを、本研究の開始直前に、世界に先駆

けて報告した。

PROP1 以外の、現在解析中である複数の新規因子には神経、造血組織、そして下垂体の発生分化に重要な役割を持つホメオティック因子のホモログが存在しており、FSHβ 鎖遺伝子の発現調節機構の解明にとどまらず、下垂体機能の獲得過程において機能する転写因子についても重要な知見を提示することになる。

2. 研究の目的

(1) 性腺刺激ホルモンはサブユニット構

造を持つホルモンであり、FSH β 鎖の他に α 鎖と LH β 鎖遺伝子があるが、PROP1 を含め解析中の因子群が、それらサブユニット遺伝子の転写に関与するか否かは重要かつ興味ある点で、急務の課題として取り組む。既に、PROP1 が、 α 鎖の転写調節にかかわっている実験結果を得ており、他の因子も同様に解析を展開する。さらに、FSH β 鎖上の結合部位で、これらの因子が相互作用している可能性が考えられ、結合配列の詳細な分析、および転写因子間相互作用、転写因子と転写補助因子間相互作用、また、性腺刺激ホルモン合成にかかわる情報伝達因子との相互作用、を解析することで性腺刺激ホルモン合成を巡る転写因子間ネットワークの全容解明を目指す。

(2) クローン化した複数のホメオティック因子の中で、PROP1 は下垂体の発生・分化に深くかかわる事が報告されているが、他の因子の中には、我々によって下垂体での存在が初めて確認されたものがある。これらの因子が果たす、下垂体の発生・分化における時間的・空間的な役割を解明する目的で、発現レベルを個体発生的に解析するため、ブタ胎児期の下垂体全 RNA を用いて発現変動の分析、および免疫組織化学的分析を行う。

3. 研究の方法

- (1) 転写活性能の測定 : pSEAP2-Basic ベクターにゴナドトロピン転写開始点上流を連結したレポーター遺伝子を、動物細胞に導入してプロモーター活性を測定した。
- (2) 抗体作製 : ラット PROP1 C-末端部 126-223 残基を用いて、モルモットで抗体を作製した。
- (3) 相互作用因子の解析 : 酵母発現系を用いて相互作用因子をクローニングした。
- (4) 免疫組織化学 : 各種のホルモン、転写因子の抗体で蛍光標識免疫組織化学を行った。
- (5) 転写物の定量的測定 : 特異プライマーを用いてリアルタイム PCR により定量した。
- (6) 組換え体タンパク質の調製 : 各種因子の cDNA を pET32a に組み込んで発現させ、組換えタンパク質を精製した。
- (7) DNA-転写因子結合実験 : 組換えタンパク質と、蛍光標識した各種の合成オリゴヌクレオチドを使って結合特性を調べた。
- (8) DNA 結合特性の解析 : SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) により解析した。
- (9) 細胞内局在の解析 : クローン化したタンパク質の蛍光タンパク質融合ベクターにより、細胞内局在を観察した。
- (10) トランスジェニック (TG) ラットによる解析 : ブタ FSH β 鎖-852/+10 領域とレポーター遺伝子 (HSV1-TK) を連結したキメラ遺伝子を導入した TG ラットにより、プロモータ

ーの特性を解析した。

(11) 転写開始点の測定 : 5'-RLM RACE 法により、転写開始点の決定を行った。

4. 研究成果

(1) 下垂体転写因子ネットワークの解析

下垂体のホルモン遺伝子の発現は、転写因子のみではなく、相互作用する他の転写因子や多数の転写補助因子 (コファ

クター) が関わっているとの考えで、LIM ホメオドメイン型転写

因子を bait として相互作用因子のクローニングを行った。その結果、CLIM2 をクローニングし [15]、さらに CLIM2 の相互作用因子を探すと、SSBP2 [4] と 3 種の LIM-only protein (LMO1, LMO3, LMO4) [2] をクローニングした。前者は、特異な細胞内局在 (ミトコンドリア) を示し (図 1)、LMO は、細胞 (図 2)、組織特異な存在を示した。

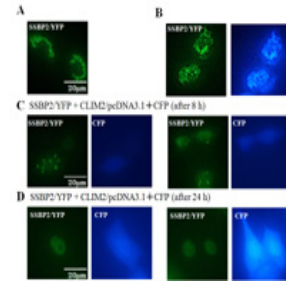


図 1. SSBP2 の細胞内局在。SSBP2 (緑) に存在し、CLIM2 が共存すると核に移行する (C, D)。

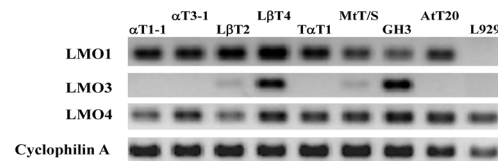


図 2. LMO の培養細胞特異な発現。LMO3 は細胞種でその発現量は大きく異なる。L929 以外は、下垂体由来の細胞。

以上のように、下垂体のホルモン遺伝子の発現制御にかかわる転写因子がコファクターを介して機能する機序の一端を明らかにすることができた。

(2) PROP1 の機能解析

PROP1 の結合特性を明らかにすることを目的に、ランダムな配列をもつ 15mer のオリゴヌクレオチドと PROP1 との結合選抜を繰り返す SELEX 解析を行った。5, 7, 9 回の選抜によって回収されたオリゴヌクレオチドの配列を決定した。その結果 (図 3)、コンセンサス配列として 11 塩基からなる TAATNNATTA が得られた [3]。また、下垂体の初期に発現して抑制的に遺伝子発現を制御する転写因子 HESX1 が PROP1 とヘテロダイマーを形成して、HESX1 の抑制的效果を解除する (図 4) ことを明らかにした [12]。さらに、HESX1 と PROP1 とのヘテロダイマーの機序を明らかにした (投稿中)。



図3. SELEX法による、PROP1のDNA結合特性の解析。ランダムな配列をもつ15merのオリゴヌクレオチドとPROP1との結合選抜を繰り返して得られたものの塩基配列を調べた。5, 7, 9回の選抜により、11塩基からなる配列に結合特性を示すことが分かった(コンセンサス配列: TAATNNATTA)。縦軸は、11塩基長における各位置の塩基の出現頻度(%)を対数値(2=100%)で示してある。

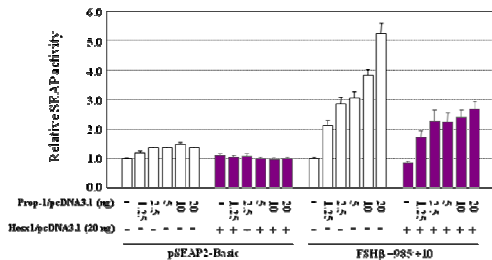


図4. PROP1とHEXS1の転写活性効果。FSHβ鎖プロモーター(-985/+10)をレポーターベクター(pSEAP2-Basic)に連結したキメラ遺伝子の発現を、PROP1とHEXS1の発現ベクターとともに、下垂体腫瘍由来の株化細胞LβT2に導入して調べた。

(3) 新規下垂体転写因子PRX2の発見

ブタ FSHβ鎖プロモーター-852/-746 を bait として、酵母 One-Hybrid System によるクローニングを行った。ブタ下垂体 cDNA ライブラリーより、下垂体では新規の転写因子となる、paired like homeodomain 型転写因子 PRX2 を発見した(投稿中)。

PRX2 は、以前に下顎や骨の形成に重要な因子として発見された因子である。我々は、下

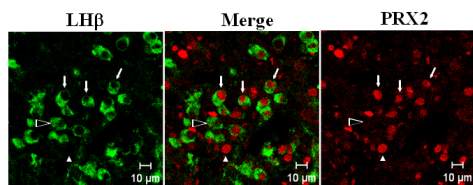
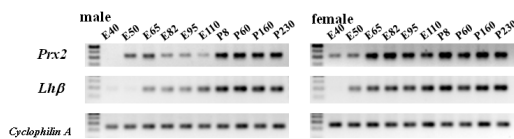


図5. PRX2のブタ下垂体発達期における発現変動と免疫組織化学。雌雄胎仔と生後(それぞれ、E30-E110とP8-P230:数字は日齢)の下垂体から調製したRNAを用いたRT-PCR(上)。比較のため、LHβ鎖とcyclophilin Aの発現を同様に調べた。下段は、PRX2(赤)とLHβ(緑)の免疫組織化学。

顎などでの発現よりも遅れて下垂体で発現が開始されることをすでに観察しているが

(発表準備中)、図5に示すように胎児期下垂体でLHβ鎖の発現とほぼ同じ頃より発現を開始し、生後にその発現量を増し、下垂体の形成と機能に一定の機能を果たすと予測された。また、免疫組織化学では、LHを合成しているゴナドトロフとそれ以外の細胞にも存在していることが観察された。現在、ラットを用いた実験を進めており、生後の下垂体では非ホルモン産生細胞に存在することが判明した(投稿準備中)。

(4) 転写因子Msx1の機能解析

上記PRX2のクローニングの過程で、転写因子MSX1をクローニングした[5]。この因子は、上皮-間葉相互作用の認められる組織に発現するホメオティック型因子であることから、下垂体での機能に興味を持たれた。そこで、FSHβ, αGSU, LHβ遺伝子のプロモーターをレポーターベクター(pSEAP2-Basic)に連結したキメラ遺伝子の発現を、MSX1の発現ベクターとともに、下垂体腫瘍由来の株化細胞LβT2に導入して調べた。MSX1はFSHβとαGSUのプロモーター活性を劇的に抑制し、一方、LHβプロモーター活性にはほとんど影響を与えなかった(図6)。また、下垂体発生過程におけるMSX1発現の推移を見ると、胎児期の発現が出生後には著しく減じており(図7)、発生過程で重要な働きをしていることが推測された。

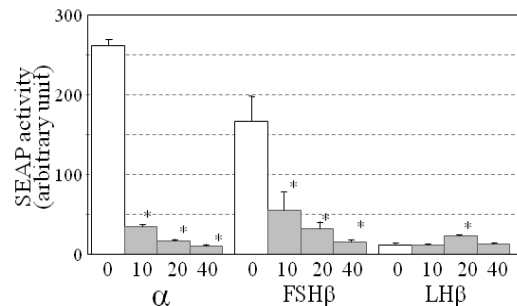


図6. 転写因子Msx1のゴナドトロピンサブユニット遺伝子(FSHβ, αGSU, LHβ)に対する発現制御。FSHβ, αGSU, LHβ遺伝子のプロモーターをレポーターベクター(pSEAP2-Basic)に連結したキメラ遺伝子の発現を、MSX1の発現ベクターとともに、下垂体腫瘍由来の株化細胞LβT2に導入して調べた。

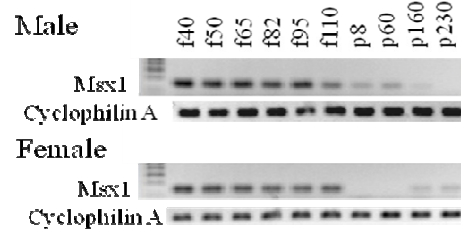


図7. MSX1のブタ下垂体発達期における発現変動と免疫組織化学。雌雄胎仔と生後(それぞれ、f40-f110とp8-p230:数字は日齢)の下垂体から調製したRNAを用いたRT-PCR。比較のため、ハウスキーピング遺伝子cyclophilin Aの発現を同様に調べた。

(5) ブタ α GSU 鎖のプロモーター解析

ゴナドトロピンサブユニット α GSU 遺伝子の発現調節機構は、転写開始点近傍の 300 塩基領域が各種のほ乳類でよく調べられている。一方、我々が約 1 kb 上流までのプロモーター活性を調べたところ、モルモット由来の CHO 細胞ではほとんど発現を示さない。しかし、 α 鎖上流域は、下垂体由来の L β T2 細胞で高いプロモーター活性を示した [18]。つまり、細胞 (組織) 特異的な発現にかかわる領域が -1053 までに存在することを示している。しかも、5' からの欠失体の発現変化を見ると (図 7A)、-798/-552 と -551/-240 の領域に、活性の著しい増加が確認された。特に前者の領域はいまだに解析されていない部分で、塩基配列上も種差の大きい領域であり、ブタ特異な調節にかかわっていると予想される。また、上流域は、下垂体のホルモン遺伝子に共通する転写因子 PTX1 は、抑制的に働くことも判明した。

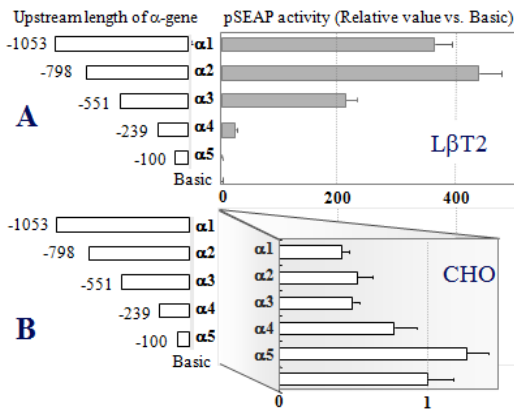


図 8. ブタ α GSU 鎖プロモーターの解析。 α GSU 鎖プロモーター (-1053/+12) をレポーターベクター (pSEAP2-Basic) に連結したキメラ遺伝子の発現を、下垂体腫瘍由来の株化細胞 L β T2 (A) とモルモット由来の Chinese hamster ovary cell (B) に導入して調べた。

(6) トランスジェニックラットの解析

ブタ FSH β 鎖の組織/細胞特異的な発現調節機構を解析するために、転写開始点上流域 -852/+10 を HSV-TK1 遺伝子に連結したキメラ遺伝子を用いて、トランスジェニックラット (TG-ラット) を作製した [13]。TG-ラットにおける、各臓器での遺伝子発現を RT-PCR により解析した。その結果、組み込んだ HSV-TK1 は、確かに下垂体で発現しており、初期の目的である -852 までの領域に組織特異的な発現調節領域が存在することが確認できた。この結果は、上述した -852/-746 領域を bait として酵母 One-Hybrid System による PROP1 と PRX2 のクローニングの結果がと相互補完的な意味を持ち、PROP1 および PRX2 が FSH β 鎖の発現機構成立にそれらの役割を果たしている可能性を示唆するものである。一方、RT-PCR の結果は、精巣で HSV-TK1 の異所性発

現を示していた (図 9)。本 TG-ラットは、雄性不妊を示していることから、HSV-TK1 の異所性発現が何らかの原因と考え、TG-ラットの精巣における実験を行う事となった。

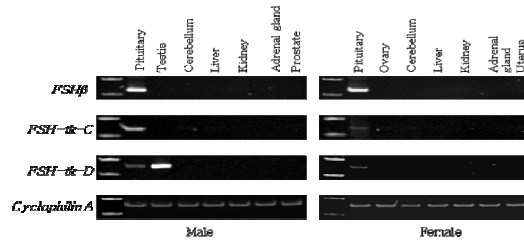


図 9. ブタ FSH β 鎖 -852/+10 を HSV-TK1 遺伝子に連結したキメラ遺伝子を用いて作製した Tg-ラットにおける、各臓器での遺伝子発現の RT-PCR 解析。組み込んだ HSV-TK1 の発現を見ると、確かに下垂体で発現している (FSH-tk-C) が、精巣で異所性の発現が認められた (FSH-tk-D)。

TG-ラットにおける導入遺伝子の発現を調べると、下垂体における転写開始点とは異なり、HSV-TK1 の第一イントロン内に精巣特異的な異所性転写開始点を持つことが分かつ

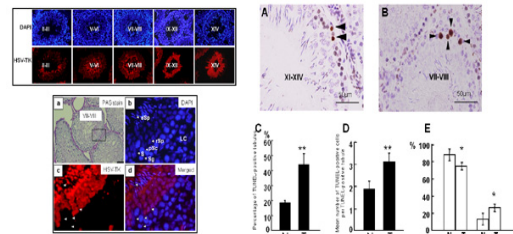


図 10. HSV-TK1 の免疫組織化学 (左) とアポトーシスの解析 (右)。HSV-TK1 (赤) の存在を精細管における精子形成のステージごとに調べた (左上)。青は核の染色像。左下の図は、精細管の一部を拡大したもの。右上の染色像はアポトーシス *Nakayama* スを示す細胞 (茶褐色) で、右下のグラフはアポトーシスを示す細胞数を、ステージ (XI-I と II-X) で比較したもの。N はノーマル、T は Tg-ラット。

た [6]。HSV-TK1 の免疫組織化学 (図 10 左) を行ったところ、HSV-TK1 生殖細胞の円形精子細胞のみで発現していることが判明した。また、アポトーシスを示す細胞は増えており、その数はステージ II-X で有意に増加していた (図 10 右)。この TG-ラットの解析結果は、最初の FSH β 鎖の特異的な発現制御と離れて、精巣における特異的な発現機構の解明、精子形成機構の解明、雄性不妊症の機序の解明、として独立した研究テーマへと発展している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件) 全て査読あり

- ① Susa T, Ishikawa A, Kato T, Nakayama M, Kitahara K, Kato Y. Regulation of porcine pituitary glycoprotein hormone alpha subunit gene with LIM-homeobox transcription factor Lhx3. J Reprod Dev 2009; doi:10.1262/jrd.20232.

- ② Susa T, Ishikawa A, Cai LY, Kato T, Matsumoto K, Kitahara K, Kurokawa R, Ono T, Kato Y. Highly related LIM factors, LM01, LM03 and LM04, play different roles in the regulation of pituitary glycoprotein hormone common α subunit gene. *Biosci Rep* 2009; doi:10.1042/BSR20090020
- ③ Nakayama M, Kato T, Susa T, Sano A, Kitahara K, Kato Y Dimeric PROP1 binding to diverse palindromic TAAT sequences promotes its transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* 2009; doi:10.1016/j.mce.2009.03.010
- ④ Kato Y Kato T, Ono T, Susa T, Kitahara K, Matsumoto K. Intracellular localization of porcine single-strand binding protein 2. *J Cell Biochem* 2009; 106: 912-919.
- ⑤ Ishikawa A, Susa T, Kato T, Sano A, Kato Y. Molecular cloning and characterization of porcine homeodomain transcription factor Msx1. *J Reprod Dev* 2009; doi:10.1262/jrd.20179.
- ⑥ Cai LY, Kato T, Nakayama M, Susa T, Izumi SI, Kato T HSV type 1 thymidine kinase protein accumulation in round spermatids induces male infertility by spermatogenesis disruption and apoptic loss of germ cells. *Reprod Toxicol* 2009; 27: 14-21.
- ⑦ Takahashi J, Ishikawa A, Susa T, Kato T, Kato Y Cloning and characterization of porcine CARG Binding factor A expressing in the anterior pituitary. *J Reprod Dev* 2008; 54: 424-430.
- ⑧ Susa T, Kato T, Kato Y Reproducible transfection in the presence of carrier DNA using FuGENE6 and Lipofectamine2000. *Mol Biol Rep* 2008; 35: 313-319.
- ⑨ 中山美智枝、加藤たか子、加藤幸雄. 転写因子のDNA結合特性の解析法: Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment (SELEX). 明治大学農学部研究報告 58: (2008) 19-23
- ⑩ 諏佐崇生、加藤たか子、加藤幸雄. 転写因子による下垂体前葉ホルモン産生細胞の分化とホルモン遺伝子の発現制御—生殖腺刺激ホルモン刺激ホルモン遺伝子の発現調節機構、明治大学農学部研究報告 57 (2008) 99-108
- ⑪ Takahashi J, Susa T, Sato T, Asano H, Kato T, Kato Y Analysis of genes expressing during porcine fetal pituitary development by suppressive subtraction hybridization. *J Reprod Dev* 2007; 53: 1087-1091.
- ⑫ Susa T, Nakayama M, Kitahara K, Kimoto F, Kato T, Kato Y Homeodomain transcription factor Hesx1/Rpx occupies Prop-1 activation sites in porcine follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 712-717.
- ⑬ Cai LY, Kato T, Ito K, Nakayama M, Susa T, Aikawa S, Maeda KI, Tsukamura H, Ohta A, Izumi SI, Kato Y Expression of porcine FSH β subunit promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase gene in transgenic rats. *J Reprod Dev* 2007; 53: 201-209.
- ⑭ Aramaki S, Sato F, Kato T, Soh T, Kato Y, Hattori MA. Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell Tissue Res* 2007; 330: 45-52.
- ⑮ Susa T, Sato T, Ono T, Kato T, Kato Y. Cofactor CLIM2 promotes the repressive action of LIM homeodomain transcription factor Lhx2 in the expression of porcine pituitary glycoprotein hormone alpha subunit gene. *Biochem Biophys Acta* 2006; 1759: 403-409.
- ⑯ Sato T, Kitahara K, Susa T, Kato T, Kato Y Pituitary transcription factor Prop-1 stimulates porcine pituitary glycoprotein hormone a gene expression. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 341-352.
- ⑰ Kitahara K, Sato T, Kato T, Kato Y Lhx2 activates porcine FSH β gene expression by sharing its binding sites with Lhx3. The 88th Endocrine Society Meeting 2006, Boston: 692.
- ⑱ Aikawa S, Sato T, Ono Kato T, Kato Y High level expression of prop-1 gene in gonadotropic cell lines. *J Reprod Dev* 2006; 52: 195-201.

[学会発表] (計 63 件): 詳細はホームページで閲覧可。演題数のみを記す

2008年 17件
2007年 30件
2006年 16件

[図書] (計 1 件)

- ① 加藤幸雄、加藤たか子. 下垂体腫瘍の実験モデル、(「下垂体腫瘍のすべて」寺本明・長村義之編、医学書院): 印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特許: FSH β 鎖高生産性細胞の作製方法: 2006年4月28日: 特願 2006-124700

発明者：加藤幸雄（明治大学）

その他

日本下垂体研究会第6回吉村賞（加藤幸雄）、第13回明治大学駿台会賞（加藤幸雄）、第21回日本下垂体研究会学術集会・優秀発賞受賞（佐藤 崇信）、第22 回日本下垂体研究会学術集会・優秀発賞受賞（佐野亜希子）、第23回日本下垂体研究会学術集会・優秀発賞受賞（吉田彩舟）。

○ 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~kasuitai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 幸雄 (KATO YUKIO)
明治大学・農学部・教授
研究者番号：30114177

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

連携研究者

加藤 たか子 (KATO TAKAKO)
明治大学・研究知財・戦略機構・研究員
研究者番号：90445859