

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：特定領域

研究期間：2007～2008

課題番号：19040025

研究課題名（和文） 脳の性差発現機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms underlying sexual dimorphism of the brain

研究代表者

金子 律子（大谷 律子）(Ohtani Kaneko Ritsuko)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：00160083

研究成果の概要：

生殖行動や生殖周期を調節する脳部位は、オス・メスで異なる神経回路網を発生中の特定の時期に形成する。本研究ではラットの脳を用いて、雌雄で異なる神経回路網がどのようなメカニズムで形成されるのかを、蛋白質のレベルで解明しようとした。その結果、オスとメスで違いがある脳部位で、雌雄差が作られている時期にだけ雌雄差を生じる蛋白質を複数個見つけることができた。この研究によって、脳の雌雄差形成メカニズムを解く手懸りが得られた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,400,000	0	3,400,000
2008 年度	3,500,000	0	3,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,900,000	0	6,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：特定領域・性分化

キーワード：雌雄差、視床下部、プロテオミクス解析、脳の性分化、

## 1. 研究開始当初の背景

発生過程の性ステロイドホルモン環境（主にエストロゲン）により、視床下部や嗅球など脳の特定部位が形態構造の雌雄差、いわゆる性的二型性を持つに至ることは、げっ歯類を用いた観察や実験から良く知られている。視床下部内の神経核では、神経核の大きさ、エストロゲン受容体発現細胞の数や分布、シナプス数およびシナプス存在パターンなどの雌雄差が観察されている。これらの雌雄差のうち SDN-POA と前腹側脳質周囲核（AVPV）の大きさについては、発達期のアポトーシスが

重要な役割を担っていることや、エストロゲンがアポトーシス制御に關与する Bcl-2 ファミリーの分子発現を調節することを研究分担者である塚原らは報告している。嗅球については、collapsin response mediator proteins (CRMP) などの軸索誘導タンパク質発現に雌雄差が存在し、これらの発現は性ステロイドホルモンの影響を受けることが報告されている。しかし、性ステロイドホルモンによる性的二型性決定機構の分子メカニズムについて殆ど未解明である。研究代表者の金子は視床下部培養細胞に対する女性ホ

ルモンの影響についてプロテオミクス解析を行ってきたが、この取り組みを更に発展させるべく、プロテオミクス解析の専門家である加藤、および研究代表者として2年間本領域に参加した小川、塚原を加え、共同で本課題に取り組むこととした。

## 2. 研究の目的

性差形成に關する蛋白質を明らかにするために、性分化臨界期に視床下部・性的二型核で発現に時期および部位特異的に雌雄差がある蛋白質を、プロテオミクス法により検出することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) - 1 AVP vでの蛋白解析

生後0日および生後6日の雌雄ラットより脳を摘出し、ピプラトームによりスライス脳切片を作製後、実体顕微鏡下で性的二型核である前腹側脳室周囲核(AVP v)と視索前野性的二型核(SDN -POA)をパンチアウトした。これらから蛋白質およびRNAを抽出した。

2D-DIGE および MU 1 DI -TOF/TOF MS を用いた雌雄差蛋白質の同定

抽出した蛋白質サンプルを用いて、Saturation CyDye を用いた二次元電気泳動(2D-DIGE)を行った。2D-DIGE は、24cm×20cmのゲルを12枚(PD1について6枚、PD6について6枚)行った(図1)。またサンプル中の蛋白質は、Cy3とCy5により標識し、解析ソフトを用いて定量的に計測し、雌雄差間で発現量を比較した。

発現に雌雄差のある蛋白スポットを定量的に検出した後、個々のスポットをゲル画像上で実際に確認して雌雄差が確かであるスポットをさらに選出した。次に約30個のそれらのスポットを質量分析用に二次元電気泳動を行ったゲルからピックし、MU 1 DI -TOF/TOF MS (ブルカー社)により蛋白質の同定を行った。

定性的・定量的ショットガン解析による雌雄差蛋白質の同定

抽出した蛋白質サンプルについて、定性的・定量的ショットガン解析(Waters社)による雌雄差蛋白質の同定も行った。PD1で雌雄差有りと同定されたスポットについては、PD6のゲル上でもスポット定量を行い、PD6での雌雄差の有無を調べた。

### (1) - 2 AVP vでのリアルタイムPCR

上記の および の解析により、PD1のAVP vで発現に雌雄差があると同定された蛋白質についてプローブを作製し、リアルタイムPCR(Takara社)によりmRNA発現を雌雄間で比較した。リアルタイムPCRは、PD1とPD6のAVP vについて行った。そして、各蛋白質のmRNA発現の雌雄差の有無および、雌雄差がある場合、雌雄差に時期特異性があるか検

討した。

### (2) - 1 SDN -POAでの蛋白解析

SDN -POA から抽出した蛋白質サンプルについても2D-DIGEを行った。2D-DIGEは、24cm×20cmのゲルを12枚(PD1について6枚、PD6について6枚)行った。またサンプル中の蛋白質は、Cy3とCy5により標識し、解析ソフトを用いて定量的に計測し、雌雄差間で発現量を比較した。解析ソフトを用いて、PD1のAVP vでの解析により発現に雌雄差が認められたスポットについて、SDN -POAでの発現を定量的に雌雄間で比較した。比較は、PD1およびPD6について行った。

### (2) - 2 SDN -POAでのリアルタイムPCR

PD1のAVP vで雌雄差が認められ質量分析により同定された蛋白質について、SDN -POAでのmRNA発現量をリアルタイムPCRにより雌雄間で比較した。比較は、PD1およびPD6のRNAサンプルについて行った。

### (3) 免疫染色

PD1に雌雄のラットを4%パラフォルム溶液によりかん流固定し、凍結切片を作製した。次に(1)の および により同定された蛋白質に対する抗体を第一抗体とし、FITC標識された抗ウサギIgG抗体を第二抗体として免疫染色を行い、免疫陽性反応の部位および雌雄差を観察した。

## 4. 研究成果

本研究では、脳の性分化メカニズムを性差回路形成期に時期・部位特異的に発現する蛋白質を見つけることにより明らかにしようと試みた。

ラット視床下部性的二型核である前腹側脳室周囲核(AVP v)と視索前野性的二型核(SDN -POA)を生後0日(PD1)および6日(PD6)に顕微鏡下で採取し、(1) Saturation Cy色素を用いた2D-DIGEとそれに続くMU 1 DI -TOF/TOF MS解析、および(2) 定性的・定量的ショットガン解析によりプロテオミクス解析を行い、発現量に雌雄差のある蛋白質を検出した。

(1)の方法から10種類、(2)の方法から50個の雌雄差蛋白質を同定した。さらにrealtime PCR法によりmRNA発現を調べた。その結果、AVP vでの性差形成期(PD1)にのみ蛋白質・mRNA発現ともに有意な雌雄差をもち、PD6では発現の雌雄差が消失した蛋白質として、4種類の蛋白質を見出すことができた。これらの4種類の蛋白質は、SDN -POAについての解析では、PD1、PD6ともに発現に雌雄差が見られなかった。このことから、これらの蛋白質は、AVP vに部位・時期特異的に雌雄差形成に伴い発現している蛋白質であることが分かった。さらに、同定蛋白質がAVP v付近の視床下部領域に、PD1の時期に発現していることを免疫染色により確認した。

これらのうち2つは、突起成長制御などに関係するとされるがまだ不明な点が多く、性差形成に関しては全く報告のない CRMP4 (図2) と *-internexin* であった。残り2つの蛋白質は、神経細胞での存在が本年1月に報告されたばかりで、神経系での作用は分かっていない蛋白質 A の2つの isoform であった。現在、CRMP4 については、ノックアウトマウスを用いて、CRMP4 欠損マウスでの AVPv の雌雄差形成について解析を始めた。また蛋白質 A については、視床下部培養細胞でも発現していることを確かめたので、現在、神経細胞における機能の解析をはじめた。(蛋白質 A については、具体的な蛋白名の公表は未だ控えない。)

本研究により、蛋白発現量の比較および同定を行うため、2つの異なる方法を用いて研究を実施した。そして、性的二型核である AVPv に時期および部位特異的に雌雄差がある蛋白質を見出すことができた。またそのうちの1つは、嗅球での雌雄差形成に時期に一過性に増加することがかつて報告された蛋白質である、CRMP ファミリーに属する CRMP4 であった。CRMP は軸索反発因子セマフォリンの情報を伝える蛋白質として発見されたが、まだ不明な点の多い蛋白質である。CRMP4 は GABA ニューロンに発現すると報告が脳皮質について近年出されたが、視床下部での発現や雌雄差との関係は全く分かっておらず、今後の課題である。また蛋白質 A に関しては、非常にポピュラーな蛋白質であるが、神経細胞での発現や機能に関する情報がこれまで殆どない蛋白質(2009年に神経細胞での発現が初めて明示された蛋白質)であった。このような蛋白質に時期・部位特異的な雌雄差を見出し、雌雄差形成への関わりを示唆するデータを得られたことは、大変意義深いと考えている。周生期のホルモン処理により脳の性分化が逆転する際、CRMP4 や蛋白質 A の発現を伴うか検討を始めている。今回、オスとメスで違いがある脳部位で、雌雄差が作られている時期にだけ雌雄差を生じる蛋白質を複数個見つけることができ、脳の雌雄差形成メカニズムを解く手懸りを得ることができた。

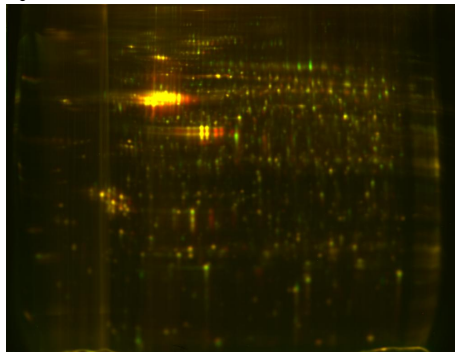


図1 二次元電気泳動像 (PD1, AVPv)

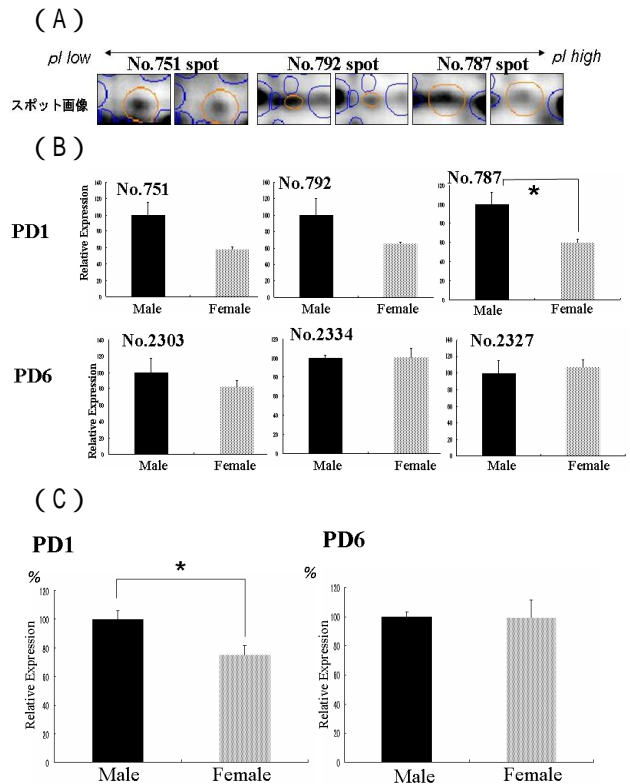


図2 AVPv で時期特異的に雌雄差が確認された蛋白質 A の代表的ゲルスポット画像と時期での発現量の比較。

(A) CRMP4 と同定された3つのスポット (No.751, No.792, 787) の生後0日 (PD1) での代表画像を等電点の低い側から順に並べたもの (各スポットについて、左がオス、右がメスである) (\*,  $p < 0.05$ )

(B) 上段: PD1でのスポットを定量化し、雌雄で比較したもの。オスでの値を100%としてある。各グラフの左がオス、右がメスである。No.787のスポットが統計的に有意な雌雄差が認められた。下段: PD1に対応するPD6での各スポットについて、定量化し雌雄の発現量を比べたもの。これら3つのスポットは、いずれも質量分析によりCRMP4と同定された。

(C) AVPvでのCRMP4のmRNA発現は、PD1では統計的に有意な雌雄差が見られた。オスの値を100%としてある。各グラフの左がオス、右がメスである。

## 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)

Tsukahara S: Sex differences and roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of preoptic area in postnatal rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 21 (2009): 370-376.

(査読有り)

Ogasawara K, Nogami H, Mumeko C, Tsuda, J Å, Gustafsson K, Korach S, Ogawa S, Harigaya T, and Hisano S. Hormonal regulation of prolactin cell development in the fetal pituitary gland of the mouse. *Endocrinology* 150 (2009):1061-8. (査読有り)

Fujisawa H, Ohtani Kaneko R, Naiki M, Okada T, Masuko K, Yudoh K, Suematsu N, Okamoto K, Nishioka K, Kato T. Involvement of post-translational modification of neuronal plasticity-related proteins in hyperalgesia revealed by a proteomic analysis. *Proteomics*, 8 (2008):1706-19. (査読有り)

Yokosuka M, Ohtani Kaneko R, Yamashita K, Muraoka D, Kuroda Y, Watanabe C. Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. *Toxicology In Vitro.*, 22 (2008):1-9. (査読有り)

Tsukahara S, Hojo R, Kuroda Y, & Fujimaki H: Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. *Neuroscience Letters*, 432 (2008): 58-63. (査読有り)

Hayashi Y, Kitaoka Y, Munemasa Y, Ohtani Kaneko R, Kikusui T, Uematsu A, Takeda H, Hirata K, Mori Y, Ueno S. Neuroprotective effect of 17 $\beta$ -estradiol against NMDA-induced retinal neurotoxicity via p-ERK induction. *Journal of Neuroscience Research*, 85 (2007): 386-494. (査読有り)

Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D.W., Mobbs, C.V., Yang, X.-J., Clegg, D.J., Kaplitt, M.G., and Ogawa, S. Silencing of estrogen receptor  $\alpha$  in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.*, 104 (2007): 2501-2507. (査読有り)

[学会発表](計 14 件)

T. Iwakura, T. Kato, S. Tsukahara, M. Tsuda, K. Watai, T. Uchimura, Y. Kuroda, T. Shiga, S. Ogawa, R. Ohtani Kaneko, Proteomics analysis of changes in protein profiles in rat AVPV and SDN-POA during the critical period., International Symposium on sexual differentiation.(2008年9月、福岡)

T. Iwakura, T. Kato, S. Tsukahara, T. Shiga, S. Ogawa, R. Ohtani Kaneko, Proteomics analysis of changes in protein profiles in rat sexual dimorphic nuclei

during the critical period. COE 5th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology (2008年11月、東京)

Tsukahara S: Sex difference in apoptosis and role of estrogen in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postnatal rats. US/Japan Neurosteroid Symposium 2008, September 8-11, 2008, Gifu.

塚原伸治、渡井浩太、黒田淑子、小澤貴明、福士碧沙、肖凱、津田夢芽子、戸田勝巳、藤巻秀和、小川園子: エストロゲン受容体ノックアウトマウスおよびアロマトーゼノックアウトマウスにおける分界条床核主核の形態学的性差の消失. 第30回日本神経科学大会、2007年9月10-12日(横浜).

岩倉聖、加藤智啓、塚原伸治、津田夢芽子、渡井浩太、内村太一、黒田淑子、小川園子、志賀隆、大谷-金子律子: ラット性的二型核での臨界期における蛋白質発現の雌雄差プロテオミクス法を用いた解析. 第31回日本神経科学大会 (2007年7月、東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 律子 (大谷 律子) (Ohtani Kaneko Ritsuko)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号: 00160083

### (2) 研究分担者

小川 園子 (Ogawa Sonoko)

筑波大学・人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 50396610

加藤 智啓 (Kato Tomohiro)

聖マリアンナ医大・生化学・教授

研究者番号: 80233807

塚原 伸治 (Tsukahara Shinji)

環境研・環境リスクセンター・研究員

研究者番号: 90318824