

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591086
 研究課題名（和文） 脳特異的なアロマターゼ遺伝子発現による脳の性的二型決定機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the expression of the brain-specific aromatase gene for the sexual dimorphic nucleus in the brain
 研究代表者
 本田 伸一郎（HONDA SHINICHIRO）
 福岡大学・薬学部・准教授
 研究者番号：40257639

研究成果の概要（和文）：脳の性分化に関与するアロマターゼの神経細胞、性中枢領域、および時期特異的発現機構を明らかにする目的で、アロマターゼの脳特異的プロモーターの解析を行った。脳特異的なプロモーターに作用する複数の転写調節因子を単離・解析し、さらに遺伝子操作マウスを利用して、中枢神経系でのアロマターゼ発現神経細胞の詳細な解析を行った。本研究により、哺乳類における脳の性分化の形成メカニズムの解明のための重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：The aromatase has a critical role in sexual differentiation of the brain. To clarify neuronal-specific, sexual-specific, and spatiotemporal expression mechanisms of aromatase gene, I analyzed brain-specific promoter region of the gene. I identified several transcription factors that act on the *cis*-elements in the brain-specific promoter region. Furthermore, I also determined the aromatase-expressing neurons in central nervous system using transgenic mice. In this study, I have found that important information of resolution for the construction on the sexual differentiation of the brain in mammal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン、転写因子、中枢神経

1. 研究開始当初の背景

生殖行動は有性生殖を行うすべての生物

において、種の保存のために必要である。ほ乳類における有性生殖では、雄と雌は生物学的必然性を持って接近し、各々に特有の性行

動を示す。そのような生物学的性指向性の決定に重要なのは、発生段階における性ホルモンの作用であると考えられている。ホルモン作用は、個体の生物学的環境適応化を考える上で、興味深い現象のひとつである。特に性ホルモンは発生過程から成熟後のあらゆる段階において可逆的あるいは不可逆的に作用し、中枢神経系の機能発現に重要な役割を担っている。性ホルモンの一種であるエストロゲンはアロマトラーゼにより生合成される。本酵素は性腺や脳に存在しており、特に脳内アロマトラーゼの重要な機能のひとつは、周生期に精巣より分泌されたアンドロゲンを脳内でエストロゲンに変換することである。この時期にエストロゲンが働くことにより、脳の神経回路は不可逆的に雄型に構築され、成熟後に雄の性行動を誘起する。一方、脳内アロマトラーゼの発現も同時期に扁桃体、視床下部、視索前野等で増加し、その発現調節のプログラムは脳の性分化と深く関わっていると考えられる。申請者は脳の性分化に関与するアロマトラーゼの神経細胞、性中枢領域、および時期特異的発現機構を明らかにする目的で、マウス胎仔間脳部の神経細胞やトランスジェニックマウスを用いて、脳特異的プロモーターの解析を行ってきた。

2. 研究の目的

それまでの研究過程において確立した分子生物学的、発生工学的手法を利用し、脳内アロマトラーゼの発現制御を担うシスエレメントに相互作用する因子を単離、解析する目的で実験を計画した。本研究における当初の目的は以下の二点である。

(1) マウス・アロマトラーゼの脳特異的プロモーターに存在するシスエレメントへ結合するタンパク質因子を、胎生期のマウス脳より単離・解析する。

(2) 単離・同定した転写因子の生理的意義の解析に役立つ株化神経細胞やモデル動物を、発生工学的手法を利用して作出する。

3. 研究の方法

実験で行う細胞培養や、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティング、トランスジェニックマウスの作出などの一般的な実験方法は、すべて常法に従って行った。COS7細胞は10%FBSを含むDMEM

にて培養し、トランスフェクションはLipofectAMINEおよびplus 試薬を用いて行った。

同定した複数のシスエレメント、aro-B, aro-AIIについて酵母のワンハイブリッドシステムによりシスエレメントに結合する因子のcDNAの単離した。すなわち、マーカー遺伝子としてヒスチジン合成酵素を用いて、そのプロモーター領域に合成したシスエレメントを連結し、マーカー遺伝子の発現が目的のシスエレメントに制御されるようにデザインした。この遺伝子セットを酵母の染色体に組み込んでcDNAスクリーニングのための新たな酵母株を作成、この酵母株に、脳アロマトラーゼの発現が高くなる胎生17日のcDNAライブラリーを導入した。このライブラリーはcDNAにコードされたタンパク質と、転写因子であるGAL4タンパク質の転写活性化ドメインとのキメラタンパク質が合成されるように構築されている。したがって、目的とするシスエレメントに結合するタンパク質をコードするcDNAが、先の酵母株に導入された場合は、レポーター遺伝子の発現を指標として目的のタンパク質をコードするcDNAを単離することができる。単離された転写因子が実際に脳内アロマトラーゼの発現に関与しているか否かの確認はRNAiのシステムを利用して行った。胎生13日目に初代培養系に調製したマウス胎仔間脳部の神経細胞のアロマトラーゼmRNAは、生体内での場合と同様に増加し、約4日後に一過性のピークを生じる事が明らかとなっている。このような発現パターンが、転写因子の発現をsiRNAにより抑制した場合に、どのように変化するかを検討した。

複数の転写因子が脳アロマトラーゼの発現に関与している事を考慮すると、転写因子間のタンパク質-タンパク質相互作用やコアクティベーターの作用が転写調節に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。転写因子間の相互作用は免疫沈降法や、培養細胞を利用したプロモーターアッセイにより解析した。転写因子のコアクティベーターの単離は、得られた転写因子の全長をベイトとして、酵母ツーハイブリットシステムにより行った。単離された種々の転写因子に関しては、タンパク質発現ベクターを用い、レポーターアッセイ系にて転写調節への影響を検討した。さらに転写因子の様々な変異体を作成し、タンパク質レベルの機能解析を行い、タンパク質内に存在する機能的なドメイン構造を探索した。

これらの実験に加え、中枢神経においてアロマトラーゼを発現する神経細胞の株細胞化の

ための実験を行った。アロマターゼ遺伝子の脳特異的プロモーターは上流 6.5Kb を含んでいれば内因性アロマターゼと同様の発現が認められることが今までの研究で明らかとなっている。このプロモーター領域に SV40 の T-antigen、および IRES 配列を挿んで GFP タンパク質を発現するようにデザインしたトランスジーンを構築した。これを用いて常法によりトランスジェニックマウスを作成し、腫瘍の増殖、あるいは GFP の発現を指標としてアロマターゼ発現神経細胞を分取、樹立を試みた。

4. 研究成果

エストロゲン合成酵素であるアロマターゼは性腺や脳で発現している。各組織における転写は、異なるプロモーター領域により組織特異的に発現制御されている。マウス・アロマターゼの脳特異的プロモーター内には -100 塩基付近に aro-AII、そして -190 塩基付近に aro-B と名付けたシスエレメントが存在する。本計画の目的①に関して、申請者は酵母ワンハイブリッド法を利用して、これらのシスエレメントのうち aro-B サイトに結合する核内因子、Lhx2 を単離した。Lhx2 は lim ドメイン、ホメオドメインを持つ転写因子である。*in vivo* クロマチン免疫沈降法により、Lhx2 は脳特異的アロマターゼプロモーターと相互作用していることが確認された。また、マウス胎仔間脳部の初代神経培養細胞系を利用し、siRNA を用いて Lhx2 の発現をノックダウンすると、アロマターゼの発現が低下する。これらのことより Lhx2 は脳アロマターゼの発現に関与していることが明らかとなった。さらに酵母ツーハイブリッド法を用いて、Lhx2 のコファクターとして DEAF1 を同定した。Lhx2 と DEAF1 とのタンパク質-タンパク質相互作用を解析するため、培養細胞で様々な変異体を発現させ、免疫沈降法によりそれらの結合を調べた。その結果、野生型の Lhx2 は DEAF1 と結合し、共沈することが確認された。Lhx2 のホメオドメインを欠損した変異体でも共沈するが、lim ドメインを欠損した変異体では DEAF1 と共沈しないことから、lim ドメインが DEAF1 との相互作用に必要であることが示唆された。株化培養細胞を利用したルシフェラーゼアッセイにて、これらの転写因子が脳特異的なアロマターゼプロモ

ーター活性にどのような影響を及ぼすのかを調べたところ、Lhx2 が持つプロモーター活性化能を DEAF1 が、さらに増強することが明らかとなり、DEAF1 が Lhx2 のコアクティベーターとして働くことが示唆された。さらに DEAF1 の様々な変異体を用いて行ったルシフェラーゼアッセイにより、DEAF1 の Lhx2 に対する転写活性化増強作用は、DEAF1 タンパク質の中心部に存在することが明らかとなった。

これらの転写因子がどのようなメカニズムで転写制御を行っているかをさらに詳細に調べるため、同様に酵母ツーハイブリッド法を用い、DEAF1 をベイトとして、スクリーニングを行ったところ、DEAF1 結合因子として Ubc9 が単離された。Ubc9 は SUMO 化反応の E2 酵素であることが知られている。Lhx2、DEAF1 および Ubc9 がアロマターゼの脳特異的プロモーター活性に、どのような影響を及ぼすのか調べるため、培養細胞を用いてアロマターゼ脳特異的プロモーターのレポーターアッセイを行った。その結果、Ubc9 は転写活性化に働き、aro-B サイトに直接結合していると考えられる Lhx2 をアッセイ系から除くと、Ubc9 の転写活性化能は認められなくなった。このように、脳特異的アロマターゼの転写制御と DEAF1 の SUMO 化の関連性は不明であるが、Lhx2、DEAF1 による本遺伝子の脳特異的発現制御には Ubc9 が関与している可能性が示唆された。

アロマターゼ遺伝子の脳特異的プロモーターに存在するシスエレメントのうち、aro-AII サイトには ARP1 が結合して転写制御を行っていることを示している。この転写因子がどのようなメカニズムで転写制御を行っているかさらに調べるため、ARP1 に相互作用するタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法を利用して単離した。その結果、ARP1 との相互作用がすでに報告されている転写因子、Ear2 の他に、機能未知のタンパク質をコードするクローンが得られ、この未知のクローンを仮に C11 と名付けた。Ear2 や C11 が ARP1 と相互作用することは、免疫沈降実験を用いて確認した。Ear2 は ARP1 とホモロジーの高いオーファン型の核内レセプターである。ARP1 はホモダイマーとして aro-AII に結合することができるが、Ear2 とヘテロダイマーを形成して作用することで転写活性の制御に関わる可能性も考えられる。このような複数

のシスエレメントが、異なる転写因子群を介して、どのようにプロモーター活性を制御しているのかについて解析した。COS7細胞を利用して、アロマターゼの脳特異的プロモーターをレポーターとしたプロモーターアッセイの系において、ARPI および aro-B に結合する Lhx2 などの転写因子と Ear2 や C11 を種々の組み合わせで共発現させ、プロモーター活性への影響を調べたが、少なくとも今回用いた系では Ear2 や C11 は活性に大きな影響を及ぼさなかった。

なお、当初計画していたトランスジェニックマウスを利用して脳特異的プロモーターよりアロマターゼ遺伝子を発現する神経細胞株の作出も実行したが、トランスジェニックマウス作製には成功したものの、神経細胞株の作出には至らなかった。

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6件)

①Regulation of progesterin receptors in medial amygdala: estradiol, phytoestrogens and sex. *Physiol. Behav.* 97 146-150 (2009)
Kudawa A. E., Harada N., Honda S-I., Rissman E. F. (査読有)

②Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell* 139 61-72 (2009)
Wu, M. V., Manoli, D. S., Fraser, E. J., Coats, J. K., Tollkuhn, J., Honda, S., Harada, N., Shah, N. M. (査読有)

③Functional analysis of neurosteroidal oestrogen using gene-disrupted and transgenic mice. *J. Neuroendocrinol* 21 365-369 (2009)
Harada N., Wakatsuki T., Aste N., Yoshimura N., Honda S. (査読有)

④Acute effects of estrogen on the guinea pig and human IKr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization
J. Physiol. Vol. 586 (12) 2961-2973(2008)

Kurokawa J., Tamagawa M., Harada N., Honda S. I., Bai C. X., Nakaya H. and Furukawa T. (査読有)

⑤ Loss of aromatase cytochrome P450 function as a risk factor for Parkinson's disease?
Brain Res. Rev. Vol. 57(2) 431-443(2008)
Morale M. C., L'Episcopo F., Tirolo C., Giaquinta G., Caniglia S., Testa N., Arcieri P., Serra P. A., Lupo G., Alberghina M., Harada N., Honda S., Panzica G. C., and Marchetti B. (査読有)

⑥Effects of organisational oestradiol on adult immunoreactive oestrogen receptors (alpha and beta) in the male mouse brain
J. Neuroendocrinol. Vol.19(10), 767-772 (2007)
Kudwa A. E., Harada N., Honda S., and Rissman E. F. (査読有)

[学会発表] (計3件)

①本田伸一郎
Analysis of functional domain of Deaf1 protein for the activation of the brain-specific aromatase gene expression
第32回日本分子生物学会年会
2009年12月12日、横浜

②本田伸一郎
Multiple transcription factors regulate the brain-specific promoter activity of the aromatase gene
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月10日、神戸

③本田伸一郎
アロマターゼ脳特異的プロモーターに作用する転写因子 DEAF-1、および Ubc9 の作用
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会
合同大会、2007年12月11日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 伸一郎 (HONDA SHINICHIRO)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：40257639

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：