

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790652  
 研究課題名(和文) Ad4BP 遺伝子エンハンサーの解析を通じた生殖腺発生期の遺伝子カスケードの解明  
 研究課題名(英文) Elucidation of gene cascade regulating gonadogenesis through analysis of tissue-specific enhancer of Ad4BP gene  
 研究代表者  
 馬場 崇 (BABA TAKASHI)  
 独立行政法人国立環境研究・環境健康研究領域・NIES 特別研究員  
 研究者番号：40435524

研究成果の概要：研究代表者はトランスジェニックマウスを用いた解析により、Ad4BP 遺伝子の上流領域に存在する約 1.8kb の領域に胎仔期の Leydig 細胞における Ad4BP 遺伝子の発現を制御する領域が含まれることを明らかにした。その後の詳細な解析により、この発現制御領域には bHLH 型の転写因子が結合することを明らかにし、胎仔型 Leydig 細胞の分化機構や細胞系譜を理解する上で非常に貴重な知見を得ることができた。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0       | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 480,000 | 3,780,000 |

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：Ad4BP/SF-1, エンハンサー, 転写制御, Leydig 細胞, 生殖腺

## 1. 研究開始当初の背景

生殖腺の性は脳を含む個体の性を支配することから、生殖腺の性決定は極めて重要なイベントであると考えられる。近年、Y染色体上の精巣決定因子(SRY)や核内受容体型転写因子 Ad4BP/SF-1 を含む種々の因子の発現と機能が時間的・空間的に厳密な制御を受けることで、生殖腺の発生・性分化を制御していることが明らかになってきた。Ad4BP/SF-1 は申請者が所属する研究室で発見された因子であり、ステロイドホルモン合成に関わる酵素遺伝子の転写活性化、および生殖腺・副腎の発生に必要不可欠であること

が知られている。このように重要な機能を有しているにも関わらず、その時・空間特異的な遺伝子発現機構に関しては不明な点が数多く残されている。雄生殖腺(精巣)における唯一のステロイド産生細胞である Leydig 細胞における、Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現制御機構も未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

Ad4BP/SF-1 は Leydig 細胞の分化および機能発現に必要不可欠な因子であるが、Leydig 細胞における Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現制御機構は未だ詳細に解析されていな

い。そこで本研究では、Ad4BP/SF-1 の Leydig 細胞における発現を誘導するエンハンサーを同定し、そのエンハンサーの解析を通じ Leydig cell の発生過程における Ad4BP/SF-1 を中心とした遺伝子発現カスケードを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) LacZ 遺伝子をレポーターとするトランスジェニックマウスアッセイにより、Ad4BP 遺伝子上流領域の胎仔 Leydig 細胞特異的エンハンサー活性を解析する。

(2) (1)により胎仔 Leydig 細胞特異的エンハンサー活性を持つことが示された領域に結合する因子を yeast-one-hybrid 法により同定する。

### 4. 研究成果

(1) まず、Ad4BP 遺伝子上流約 2kb の領域に胎仔型 Leydig 細胞特異的エンハンサー活性が存在することをトランスジェニックマウスアッセイにより明らかにした。

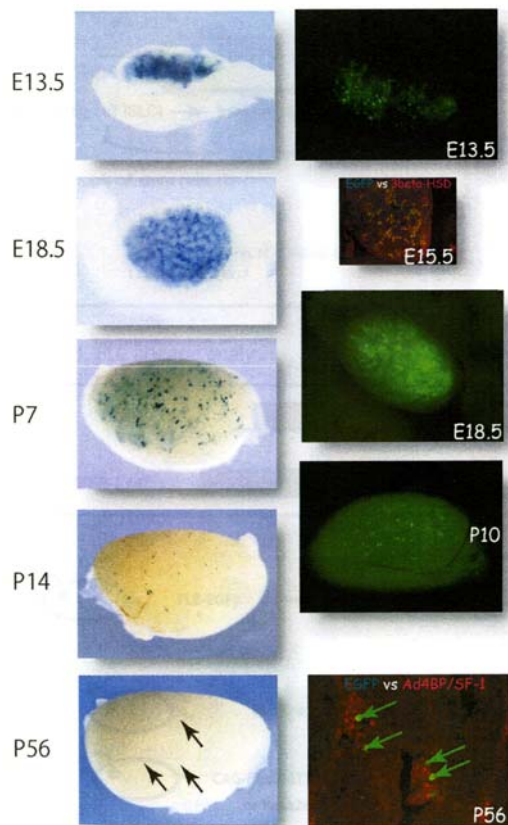


図 1

結果を図 1 に示す。本実験では、我々が比較遺伝学的視点から同定した胎仔型 Leydig 細胞特異的エンハンサー候補領域により LacZ または EGFP の発現を誘導する DNA コンストラクトをマウスの受精卵へインジェクションすることによりトランスジェニックマウス

スを作製し、胎生期および生後のいくつかの時期において精巣における LacZ、EGFP の発現を観察している。図 1 に示すように本領域により誘導される LacZ、EGFP の発現は胎仔期の Leydig 細胞に特異的に観察されることが分かった。本実験結果により、我々が着目した約 2kb の領域が確かに Ad4BP 遺伝子の胎仔型 Leydig 細胞特異的エンハンサーであることが明らかとなった。

その後、この約 2kb の領域に欠失・点変異を導入することにより、約 30bp の胎仔 Leydig 細胞特異的エンハンサーのコア配列を同定した。

(2) 胎仔型 Leydig 細胞の分化機構を明らかにするため、上記の胎仔型 Leydig 細胞特異的エンハンサーのコア配列に結合する因子を yeast-one-hybrid 法によりスクリーニングした。概要を図 2 に示す。

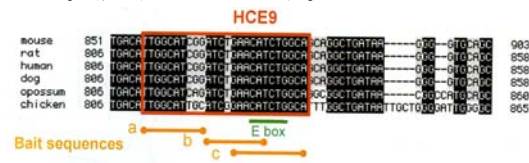


図 2

胎仔型 Leydig 細胞特異的エンハンサーのコア配列は動物種間で非常に良く保存されていた。特筆すべきはほ乳類間での保存に留まらず、鳥類に置いても保存されていたことである。この事実は本領域が重要な機能を包含していることを非常に強く示唆するものである。このコア配列の中でも我々は特に保存された E-box 配列を含む約 30bp の領域に着目し、この領域に 3 つの Bait を作製した。これらの Bait を用いて yeast-one-hybrid アッセイを行った結果、いくつかの bHLH 型転写因子が胎仔型 Leydig 細胞特異的エンハンサーのコア配列 (Bait C) に結合することが明らかとなった。現在、これらの因子の Ad4BP 遺伝子の発現、および Leydig 細胞の分化に対する影響を検討しているところである。

(3) 遺伝子の組織 (細胞) 特異的発現を規定するエンハンサー配列は 2 つの大きな特徴を持つ。ひとつは動物種間で進化的に保存されているということである。これまでは主にこの視点から組織特異的エンハンサー配列は同定されてきた。ところが近年、ふたつめの特徴が明らかにされつつある。すなわち組織特異的エンハンサー活性を有する領域は特殊なクロマチン修飾パターン (ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のモノメチル化、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のアセチル化など) を示すということである。さらに近年は特定の転写因子のコアクティベーター (P300) の結合が組織特異的エンハンサー領域のマーカールとなることが報告されている。

そこで、Ad4BP 遺伝子の胎仔型 Leydig 細胞特異エンハンサーもこのような特殊なクロマチン修飾パターンを示すのか、また、クロマチン修飾パターンを指標として Ad4BP 遺伝子の他の細胞における特異的エンハンサーを推定することができるのかということを確認するために、ChIP-Seq の実験系および ChIP-Seq により得られるデータの解析手法の確立を行った。ChIP-Seq 法の概要を図 3 に示す。

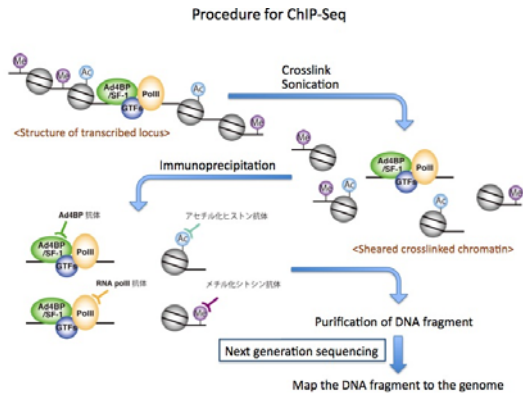


図 3

このように ChIP-Seq 法においては次世代シーケンサーの利用、および次世代シーケンサーにより得られるデータのゲノムへのマッピングが必要不可欠となる。ゲノムへのマッピングに関してはまだ商業的に量産されたアプリケーションというものが存在しないため、自分自身で開発し運用する必要がある。そこで我々はこのようなアプリケーションの開発を行い、実際に ChIP-Seq により得られたデータの処理を行い、ゲノムへのマッピングおよび視覚的な表示が正確に行われるかどうかの予備実験を行った。予備実験にはマウス副腎皮質由来の培養細胞(Y-1)から調製したクロマチンから RNA polymeraseII 抗体および Ad4BP 抗体を用いて ChIP アッセイを行い、ChIP アッセイによって得られた DNA フラグメントを次世代シーケンサーにより網羅的に配列決定を行った。その結果得られた配列データをゲノムにマッピングした結果を図 4 に示す。今回呼び実験に用いた Y-1 細胞において、Ad4BP 遺伝子は高レベルに発現している。そこで図 4 においては全ゲノムのなかから特に Ad4BP 遺伝子領域にフォーカスし、RNA polymeraseII 抗体を用いた ChIP-Seq の結果を示している。RNA polymeraseII のこの領域への結合様式は、他の転写されている遺伝子領域同様、転写開始点付近をピークとしてこの遺伝子領域全体に渡るものであり、ChIP-Seq の実験系が、クロマチン調製からデータマイニングにわたる全てのステップにおいて確立されたことが明らかとなった。

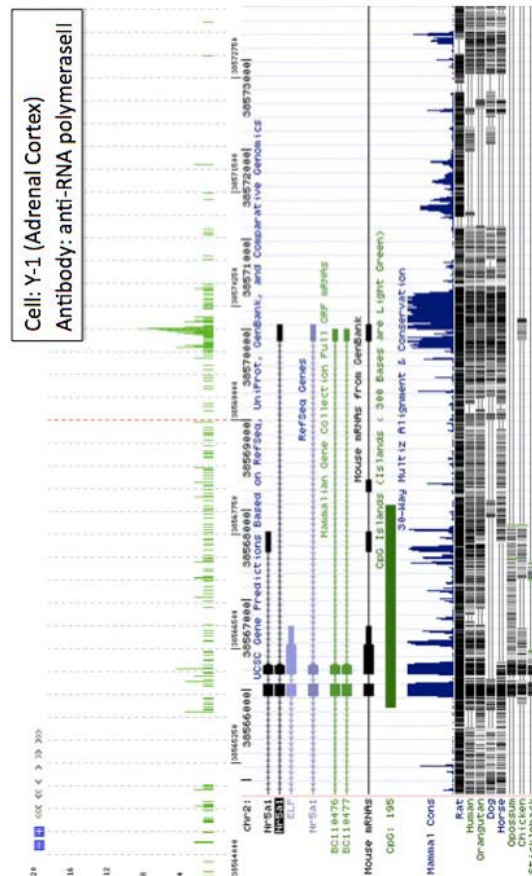


図 4

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kurokawa, H., Saito, D., Nakamura, S., Katoh-Fukui, Y., Ohta, K., Baba, T., Morohashi, KI., Tanaka, M. Germ cells are essential for sexually dimorphic gonadogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16958-63, 2007. 査読有
- ② Fukami, M. Wada, Y., Okada, M., Kato, F., Katsumata, N., Baba, T., Morohashi, KI., Laporte, J., Kitagawa, M., Ogata, T. Mastermind-like domain containing 1 (MAML1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. *J. Biol. Chem.* **283**, 5525-32, 2007. 査読有
- ③ T. Baba., Y. Shima., A. Owaki., J. Mimura., M. Oshima., Y. Fujii-Kuriyama., K-I. Morohashi. Disruption of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Induces Regression of the Seminal Vesicle in Aged Male Mice. *Sex. Dev.* **2**, 1-11, 2008. 査読有
- ④ Yuko Sato, Takashi Baba, Mohamad

Zubair, Kanako Miyabayashi, Yoshiro Toyama, Mamiko Maekawa, Akiko Owaki, Hirofumi Mizusaki, Tatsuya Sawamura, Kiyotaka Toshimori, Ken-ichirou Morohashi, Yuko Katoh-Fukui. Forkhead transcription factor Fkhl18 required for development of testicular vascular system. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 1361-1371. 2008. 査読有

(3) 連携研究者  
該当なし

〔学会発表〕(計5件)

- ① 馬場崇、三村純正、嶋雄一、中村直仁、大脇亜希子、原田信宏、山本雅之、藤井義明、諸橋憲一郎 「ステロイドホルモン産生におけるAhRの役割」 第10回P450研究会 2007年7月21日
- ② 馬場崇、嶋雄一、大脇亜希子、三村純正、大島基彦、藤井義明、諸橋憲一郎 「AhR遺伝子破壊マウスにおける加齢に伴う精嚢腺の消失」 第30回日本分子生物学会年会 BMB2007 2007年12月11-15日
- ③ T. Baba., J. Mimura., Y. Shima., N. Nakamura., A. Owaki., M. Oshima., N. Harada., M. Yamamoto., Y. Fujii-Kuriyama., K-I. Morohashi. Novel function of Ah (dioxin) receptor in steroidogenesis. International Symposium for Gonad nad Brain Sex Differentiation. 2008.09.14
- ④ 宮林香奈子、杉山紀之、馬場崇、福井由宇子、小川英知、杉本幸彦、諸橋憲一郎 マウス胎生ライディッヒ細胞の分化過程におけるArx遺伝子の機能 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
- ⑤ 立石幸代、馬場崇、野原恵子 DNAメチル化阻害剤による脱メチル化作用の解析 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12日

〔図書〕(計1件)

- ① 馬場崇、諸橋憲一郎 内分泌攪乱物質による性分化攪乱作用 細胞工学 2007年12月号

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 崇 (BABA TAKASHI)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・NIES 特別研究員

研究者番号：40435524

### (2) 研究分担者

該当なし