

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791172
 研究課題名 (和文) 胎盤特異的転写因子 GCMa/1 の発現調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Regulation of placenta specific transcription factor GCMa/1 expression
 研究代表者
 安井 裕子 (YASUI YUKO)
 金城学院大学・薬学部・助教
 研究者番号：80434554

研究成果の概要 (和文)：

Glial cells missing a/1 (GCMa/1) は哺乳類において胎盤特異的に発現する転写因子で、胎盤の発達や機能発現に必須の因子であることが示唆されている。本研究ではどのように GCMa/1 の発現が調節されているか明らかにするため、シグナル伝達経路に注目し検討を行なった。GCMa/1 の発現調節には、これまでに報告のあった cAMP/PKA 依存的なシグナル経路の他に、PKC 依存的なシグナル経路が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Glial cells missing a/1 (GCMa/1) is a placenta specific transcription factor and essential for placental development and function. In this study, we investigated signal transduction mechanisms in regulation of GCMa/1 expression. We demonstrated that GCMa/1 expression is dependent upon PKC signaling pathway in addition to that of cAMP/PKA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：発現制御、胎盤、GCMa/1、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Glial cells missing a/1 (GCMa/1) はヒトやマウスにおいて胎盤特異的に発現する転写因子であり、胎盤の発達や機能発現に重要な役割を果たしていることが示唆され

ているが、その詳細な機序はほとんど明らかにされていなかった。我々のグループはヒトのアロマターゼ遺伝子の胎盤特異的発現に関わるタンパク質として hGCMa/1 を yeast

one-hybrid 法により同定し、従来、哺乳類での機能が不明であった GCMA/1 が、アロマターゼを始めとしたいくつかの遺伝子の胎盤特異的な発現に関与する可能性を示し、この転写因子の機能を初めて見出した。その後、GCMA/1 のノックアウトマウスが胎盤形成不全により全て胎性致死となることが報告され、胎盤の発達に必須の因子であることが明らかとなった。

胎盤は、哺乳類では受精卵から最初に分化してくる細胞系列で、胎児の発育にはまず胎盤の確立が必須である。特に栄養芽層系は母体と胎児の栄養分やガス交換に十分な表面積を与える分岐構造を形成しており、GCMA/1 はこの細胞系列の分化に関与すると考えられている。ヒトの前子癩では GCMA/1 の発現が下がるという報告があり、GCMA/1 の関与する分化カスケードに関する知見を深めることによって、原因の明らかになっていないヒト胎盤の異常や、それに伴う前子癩、子宮内発育遅延などの病態の発症メカニズムを分子的に解明する手がかりになる可能性がある。

GCM は GCM モチーフと呼ばれる特徴的な DNA 結合ドメインを持つ転写因子ファミリーを形成し、広く生物界に存在している。ショウジョウバエにおいて、GCM は神経肝細胞からグリア細胞への分化過程を決定することが明らかとなっていることを初めとし、GCM タンパク質は発現する細胞において細胞運命の決定に関わるなど、支配力の強い傾向が見られる。GCMA/1 も同様に正常な胎盤の発達や機能維持に発現時期や局在が重要であることが示唆されることから、その発現は厳密に調節されていると予想されるが、その詳細はほとんど明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では GCMA/1 の発現調節機構の解

明を目指し、それに関わる因子の同定と、GCMA/1 遺伝子の 5' 上流領域の機能的解析を行うことを目的とした。GCMA/1 の発現調節に関して、これまでにフォルスコリンの刺激により GCMA/1 の発現量が増加することを確認した。フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内の cAMP 濃度を増加させることが知られているが、cAMP により活性化されるシグナル伝達経路として、PKA (Proteinkinase A) を介する経路や G タンパク質を介する経路などがある。これらのどの因子がどのように関与しているか明らかに、フォルスコリンの他にも GCMA/1 の発現に影響を与える薬剤があるか調べ、新たな調節機序を明らかにしたい。

また、これまでに GCMA/1 遺伝子のプロモーター領域に関する報告は無いので、発現調節に関わる領域の検討と、それらに作用する因子の同定を目指す。

現在、胎盤において重要であると考えられている転写因子がいくつかあり GCMA/1 もそのひとつであるが、それらがどのように相互作用し、胎盤の生理機能に関与しているかはほとんど明らかとなっていない。また、胎盤異常の発症メカニズムを明らかにするには、胎盤の発達や機能に関わる分子カスケードを理解することが必須であり、その中で転写因子間の相互作用は重要な意味を持つと考えられる。本研究で明らかにしようとする GCMA/1 の発現調節はその一端を担うものであり、胎盤および胎盤に関する種々の疾患についての基礎的なデータとなる可能性がある。

3. 研究の方法

GCMA/1 を内在的に発現するヒト胎盤のがん化培養細胞株である JEG-3 細胞を用いて各種薬剤の刺激によって GCMA/1 の発現量に変

化があるかどうか、mRNA量をreal-time PCR法を用いて、蛋白質量をウェスタンブロット法を用いて検討する。

フォルスコリンによるGCMA/1の発現増加効果の詳細な機序を明らかにするため、JEG-3細胞を用いて各種阻害剤や遺伝子発現プラスミドを用いて発現量を検討する。また、セカンドメッセンジャーの定量を行い、シグナル伝達経路の詳細に検討する。

GCMA/1遺伝子の5'上流領域を含むレポータープラスミドを作製し、その機能解析を行う。

4. 研究成果

これまでにフォルスコリンによりGCMA/1の発現が増加することを蛋白質レベルで確認しており、この詳細なメカニズムについて検討した。

GCMA/1遺伝子の発現レベルを調べるためmRNA量を定量したところ、フォルスコリン刺激後2時間で6倍程度に増加し、転写レベルの活性化を確認した。

フォルスコリンは、アデニル酸シクラーゼを活性化し細胞内cAMP濃度を上げる作用があるので、cAMPのエフェクター分子であるPKAとEpac (Exchange proteins directly activated by cAMP) それぞれの阻害剤、特異的活性化剤を用いてGCMA/1の蛋白質発現量を調べたところ、Epac活性化剤では変化が無く、PKA阻害剤で減少したことから、GCMA/1の発現制御にPKAの関与が予想された。また、PKAの下流エフェクターの一つであるCREB (cAMP response element binding protein) のリン酸化を調べたところ、フォルスコリンによって増加し、PKA阻害剤によって増加が抑制されたことから、cAMP/PKA依存的な経路によってCREBが活性化されることにより、GCMA/1の遺伝子発現が増加することが示唆

された。

そこで、CREBを過剰発現させGCMA/1の蛋白質発現量を調べたところ、CREBの発現量が大幅に増加しているにもかかわらずGCMA/1の発現量はほとんど増加しなかった。またSchubertらは、GCMA/1遺伝子の5'上流プロモーター領域にCREB結合サイトがあり、その転写活性にはCREBが必須であることを示しているが、最大活性にはその他の因子が必要であることも報告しており、我々の研究結果と矛盾しない。よって、フォルスコリンによるGCMA/1の遺伝子発現増加効果にはCREBは必須であるが、他のエフェクターの働きが大きく寄与していることが示唆された。

またChangらはcAMP/PKA経路によってGCMA/1のアセチル化が促進され、GCMA/1蛋白質の安定化及び転写活性化能の増加をもたらすという報告をしており、cAMP/PKA経路はGCMA/1遺伝子レベルの発現量増加と蛋白質の安定化の2つの段階で関与すると考えられる。

GCMA/1の発現に関与する新規のシグナル伝達経路を同定するため、各種薬剤を網羅的に調べたところ、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によって、GCMA/1蛋白質の発現が増加する傾向が見られた。PMAはproteinkinase C (PKC) の活性化剤であるので、PKCが関与しているか調べるためPKC阻害剤を用いて検討を行ったところ、PMAとフォルスコリンによる発現増加を抑制した。また、カルシウムイオノフォアによる刺激によってPMAと同様の効果が見られたことから、GCMA/1の発現に関与するのはカルシウム依存的に活性化されるPKCであると予想される。そこでJEG-3細胞に発現するPKCのサブタイプをRT-PCR法によって調べたところ、カルシウム依存的に活性化されるPKCでは α 、 β 2、 γ タイプの発現が認められ、フォルスコリンの

刺激によりこれらの遺伝子発現量が増加する傾向にあることがわかった。

次に PMA の GCMA/1 遺伝子発現に対する影響を調べたところ、PMA のみの刺激では変化はなかったが、フォルスコリンと同時に刺激すると、6 時間後にフォルスコリン刺激のみで 2.5 倍程度だったものが、PMA と同時に刺激すると 3.5 倍と増加傾向が見られた。これは蛋白質量でも同様の傾向があった。また cAMP の量を測定したところ、フォルスコリンによって増加し、PMA では変化がなかった。PMA がフォルスコリンの GCMA/1 発現増加作用を増強したメカニズムとして、フォルスコリンにより PKC の遺伝子発現量が増加し、それが PMA で活性化された結果、PKC の活性が増加したことによるものではないかと考えているが、今後の更なる検討が必要である。

以上の結果から、GCMA/1 の発現制御にカルシウム依存的な PKC 経路が関与していることが明らかとなった。また、フォルスコリンによる GCMA/1 の発現増加作用には cAMP/PKA 依存的な経路だけでなく、カルシウム依存的な PKC 経路も寄与している可能性が考えられる。しかし、PKC 経路と cAMP/PKA 経路がどのように相互作用しているかは明らかに出来なかった。

これらのシグナルがどのような細胞外刺激により活性化されるのか調べるため、ホルモンやプロスタグランジンなどの生理活性物質を用いて網羅的に検討を行ったが、同定には到らなかった。

GCMA/1 は、アロマターゼや hCG などの遺伝子転写制御や細胞融合の促進などの機能を持つことが報告されている。これらの機能がどのような生理的条件下で活性化されるか、GCMA/1 の発現制御と密接な関係にあると予想される。細胞外シグナルと GCMA/1 の発現および生理機能との関係を総合的に理解す

ることは今後の重要課題であり、胎盤の発達、妊娠の成立や不妊症の発症メカニズムの解明および妊娠病態の治療法の開発に貢献できる可能性がある。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①安井裕子「胎盤特異的転写因子 GCMA/1 の発現制御機構の解析」第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 23 日) 神戸ポートアイランド

②宮澤大介「食餌脂肪酸の n-6/n-3 比がマウス脳における神経栄養因子産生及びプロテインキナーゼ活性に及ぼす影響」第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 22 日) 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 裕子 (YASUI YUKO)
金城学院大学・薬学部・助教
研究者番号：80434554