

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590190

研究課題名（和文） SOHLH 転写因子を中心とした生殖細胞分化における転写制御
ネットワークの解析

研究課題名（英文） Analysis of the transcriptional regulation of gametogenesis
involving SOHLH proteins

研究代表者

宮崎 純一 (MIYAZAKI JUNICHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10200156

研究成果の概要（和文）：bHLH 型転写因子 SOHLH1 と SOHLH2 は、生殖細胞特異的に発現し、それらの遺伝子のノックアウトマウスは、雌雄とも生殖組織に異常が見られ不妊となる。SOHLH1 と SOHLH2 は強制発現系においてホモダイマーおよびヘテロダイマーを形成することが示され、レポーターアッセイにおいて、*Sohlh1* プロモーターは、両者の共存下で顕著に活性化した。さらに詳細な解析により、SOHLH1/SOHLH2/SP1 コンプレックスが *Sohlh1* プロモーター上流の E-box 配列を介して転写を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：bHLH proteins, SOHLH2 and SOHLH1, are expressed specifically in spermatogonia and oocytes, and are required for the early spermatogonial and oocyte differentiation. We demonstrated that SOHLH2 and SOHLH1 could form a heterodimer and that the SOHLH2/SOHLH1 heterodimer could up-regulate the *Sohlh1* gene through its E-boxes. Subsequent studies suggested that SOHLH2/SOHLH1/SP1 ternary complex autonomously and cooperatively regulates the *Sohlh1* gene transcription during early spermatogenesis and oogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			,
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化・組織形成

1. 研究開始当初の背景

近年、様々なノックアウトマウスの解析により、哺乳類における生殖細胞の発生・分化のメカニズムが次第に明らかになってきた。中でも、生殖細胞特異的に発現し、bHLH

motif を有する遺伝子群（*Sohlh2*、*Sohlh1*）は注目されており、特に *Sohlh2* ノックアウトマウスの解析結果は、我々を含め、3つのグループより報告されている。

Sohlh2 遺伝子は、当研究室で、精巣、卵

巢、ES 細胞に特異的に発現する遺伝子として、*in silico screening* により新規に同定されたものである。SOHLH2 蛋白質は、未分化型～分化型精原細胞、原始～一次卵母細胞の核に発現し、精子形成、卵形成に関与する可能性が考えられた。そこで、Sohlh2 遺伝子の生体内における役割を明らかにするために、Sohlh2 ノックアウトマウスを作製し、解析したところ、Sohlh2 ノックアウトマウスは、正常に発育するものの、雄雌不妊となり、雄雌ともに特に KIT 陽性生殖細胞への分化が障害されていた。また、Sohlh2 ノックアウトマウスの精巣、および卵巣では、各々、精子形成に関与する遺伝子群 (Sohlh1、Kit、Sox3、Ngn3 等)、卵子形成に関与する遺伝子群 (Sohlh1、Kit、Figla、Nobox、Gdf9 等) の発現低下を認め、これらの多くが、そのプロモーター領域内に E-box を有していた。興味深いことに、これらの表現型は、もう一つの生殖細胞特異的 bHLH 型転写因子である Sohlh1 のノックアウトマウスの表現型と同様であった。bHLH 型転写因子は、ヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子を制御することが知られており、実際、SOHLH2 と SOHLH1 がヘテロダイマーを形成することを明らかにした (Toyoda et al, *Dev Biol* 325: 238-248, 2009)。

以上より、Sohlh2 遺伝子は、生殖細胞の分化に関わる遺伝子群の上位に位置し、Sohlh1 遺伝子とともに、それらの遺伝子を制御する転写因子ネットワークの中心的役割を担っていることが考えられた。

2. 研究の目的

転写因子、液性因子、あるいはエピジェネティックな遺伝子発現制御の解明は、組織・細胞の分化メカニズムを理解する上で重要である。しかしながら、生殖細胞分化 (精子

形成、卵形成) における転写制御のネットワークは、未だ不明の点が多い。

組織特異的に発現する bHLH 型転写因子は、しばしば、それが発現する組織・細胞の発生・分化に中心的な役割を果たす。生殖細胞特異的に発現する bHLH 型転写因子をコードする Sohlh2 遺伝子、Sohlh1 遺伝子の発現パターン、ノックアウトマウスの解析などから、これらが生殖細胞の分化、特に KIT 陽性細胞への分化における転写制御の Key factor として重要な役割を担っている可能性が高い。本研究では、Sohlh2、Sohlh1 遺伝子を中心とした、生殖細胞分化 (精子形成、卵形成) における転写制御のネットワークの解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SOHLH2、SOHLH1 のホモダイマー形成能の検討

bHLH 型転写因子は、ヘテロダイマーだけでなく、ホモダイマーを形成することも知られている。そこで、FLAG-tag と Myc-tag を用い FLAG-SOHLH2、Myc-SOHLH2、あるいは FLAG-SOHLH1、Myc-SOHLH1 を作製し、免疫沈降法を行うことで、SOHLH2 蛋白質、SOHLH1 蛋白質がホモダイマーを形成しうるか、検討する。

(2) SOHLH2、SOHLH1 の Sohlh1 プロモーター上流の E-box への結合の検討

bHLH 型転写因子は、E-box (CANNTG) という DNA 配列に結合することが知られている。また、Sohlh1 遺伝子の 5'側ゲノム領域には、種間で保存された E-box 配列 (CACGTG) が存在する。そこで、SOHLH1、SOHLH2 蛋白質が、Sohlh1 遺伝子領域に存在する E-box 配列に結合するか、ゲルシフトアッセイを用いて検討する。

(3) SOHLH2、SOHLH1 の Sohlh1 プロモーターに対する転写活性化能の検討

bHLH 型転写因子は、E-box を介して転写活性を有する。そこで、E-box を有するマウス *Sohlh1* 遺伝子の 5'側 1kb をクローニング後、pGL3-basic vector に挿入し、ルシフェラーゼレポーターベクターを作製する。その後、これと、*Sohlh2*、*Sohlh1* の発現ベクターを用いてプロモーターアッセイを行い、SOHLH2、SOHLH1 蛋白質が *Sohlh1* 遺伝子を直接的に制御するかを検討する。

4. 研究成果

bHLH 型転写因子はヘテロダイマーだけでなく、ホモダイマーを形成し、遺伝子の発現制御を行うことが知られているが、実際に精原細胞および卵母細胞において SOHLH1 と SOHLH2 は共局在し、強制発現系において 2 つのタンパク質はヘテロダイマーおよびホモダイマーを形成することが示された。2 つの転写因子は、密接に関連し、精子形成、卵形成に関与する遺伝子の発現制御を行っていると思われる。次に、SOHLH2 の発現が SOHLH1 の発現より少し先行し、*Sohlh2* ノックアウト精巣および卵巣において *Sohlh1* 遺伝子の発現が低下しているため (Dev Biol 325, 238-248, 2009)、SOHLH2 は *Sohlh1* プロモーターの活性を制御していると予測した。レポーターアッセイにおいて、*Sohlh1* プロモーターは、SOHLH2 単独存在下では活性化せず、SOHLH1 単独存在下では少し活性化し、SOHLH1 と SOHLH2 の共存下では顕著に活性化した。この結果は、SOHLH1/SOHLH2 ヘテロダイマーが *Sohlh1* 遺伝子の転写を強く促進する可能性を示唆している。

Sohlh1 プロモーターには bHLH 型転写因子が結合すると予測される 3 つの E-box が存在した。このシスエレメントを介して *Sohlh1* 遺伝子は転写活性化を受けると予測した。実際に、3 つの E-box 配列のそれぞれ、あるいは

は全てに変異を導入すると *Sohlh1* プロモーターの活性化は阻害されたことから、*Sohlh1* プロモーターは E-box を介して活性化していると考えられた。さらに、この 3 つの E-box の下流には、zinc-finger 転写因子 SP1 が結合し得る GC-box が存在する。これまでの報告によると、いくつかの bHLH 型転写因子は SP1 と結合し、共同でターゲット遺伝子の転写活性化を行う。実際に、SOHLH1 は SP1 と結合し、さらに SOHLH2、SOHLH1、SP1 共存下における *Sohlh1* プロモーターの活性化は、GC-box 配列の変異により抑制された。

以上の結果は、SOHLH2/SOHLH1/SP1 複合体が直接 *Sohlh1* 遺伝子の発現制御を行うという positive feedback 機構の存在を示している。さらに、精子形成に関与する遺伝子群 (*Sohlh1*、*Kit*、*Sox3*、*Ngn3* 等)、卵形成に関与する遺伝子群 (*Sohlh1*、*Kit*、*Figla*、*Nobox*、*Gdf9* 等) の多くが、そのプロモーター領域内に E-box を有していることから、SOHLH2/SOHLH1 ヘテロダイマーが中心となって、これら遺伝子群の発現の制御を行っていることが示唆される。

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 1 件)

Tashiro F, Kanai-Azuma M, Miyazaki S, Kato M, Tanaka T, Toyoda S, Yamato E, Kawakami H, Miyazaki T and Miyazaki J: Maternal-effect gene *Ces5/Ooep/Moep19/Floped* is essential for oocyte cytoplasmic lattice formation and embryonic development at the maternal-zygotic stage transition. Genes to Cells 15: 813-828, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. 能村卓慈、豊田秀一、水田順也、田代 文、倭 英司、宮崎純一：精子形成・卵形成初期における SOHLH2/SOHLH1/SP1 複合体による *Sohlh1* 遺伝子の発現制御機構。分子生物学会年会 2010.12.8. 神戸ポートアイランド

2. 能村卓慈、宮川 さとみ、宮崎純一：精巢におけるレトロトランスポゾン発現抑制に関与するマウス *Cue110* 遺伝子の機能解析. 分子生物学会年会 2011.12.13. パシフィコ横浜
3. 田代 文、宮崎竜志、宮崎早月、松浦 巧、倭 英司、宮崎純一：マウス ES 細胞の未分化状態維持に関与する *Ces1* 遺伝子の解析. 分子生物学会年会 2012.12.12. マリンメッセ福岡

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/nutri/www/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 純一 (MIYAZAKI JUNICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10200156