

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591360

研究課題名(和文)脳特異的なアロマターゼ遺伝子発現を制御する転写因子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of transcription factors regulating brain-specific expression of aromatase gene

研究代表者

本田 伸一郎(HONDA, Shin-ichiro)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：40257639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドホルモンは発生過程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する。その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。ステロイドホルモンは中枢神経系の機能発現にも重要な役割を担っている。げっ歯類において、脳の機能的な性差は周生期にエストロゲンが働くことにより行われる。一方、アロマターゼの発現も周生期に一過性に増加し、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。今回の研究では脳の性分化のメカニズム解明の一環として、アロマターゼ遺伝子の脳特異的発現制御に関与する転写因子の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Steroid hormones act reversibly or irreversibly in every developmental stage. With regard to the biological environmental adaptation of an organism, the action of the steroid is one of the most interesting phenomena. The steroid hormones take important role that is to function expression of central nervous system. In rodents, the substantial sex differences of the brain are performed by estrogen action in a perinatal period. Meanwhile, since the expression of aromatase gene increases transiently in a perinatal period, it is conceivable that the program of the transcriptional regulation of aromatase gene is deeply concerned with the sexual differentiation of the brain. In this study, to elucidate of the sex differentiation of the brain, I analyzed the transcription factors that take part in the control of the brain-specific expression of the aromatase gene.

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：転写因子 転写制御 性分化

1. 研究開始当初の背景

ステロイド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も重要な役割を担っている。その作用は、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。ステロイドホルモンの一種であるエストロゲンはアロマターゼにより生合成される。本酵素は脳や性腺に存在しており、特に脳内アロマタ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る。一方、アロマターゼの発現も周生期に視床下部、視索前野等で一過性に増加し、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推測される。脳の性分化のメカニズム解明のためには、アロマターゼ遺伝子の脳特異的発現制御に関与する転写因子の解析が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

齧歯類のアロマターゼ遺伝子には、脳と性腺で異なるエキソン1とプロモーター領域が存在し、それぞれのプロモーターによって組織特異的な転写制御を受けている。申請者は、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ため、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。これら一連の研究過程で得られた知見を利用し、脳内アロマターゼの発現制御を担うシスエレメントに相互作用する転写因子の機能解析を目的として実験を計画した。

本研究の目的は、脳の発生過程で機能する転写因子群によるアロマターゼ遺伝子の発

現制御を、総合的に理解することである。

3. 研究の方法

Deaf1によるアロマターゼ遺伝子の脳特異的転写制御メカニズムを解明するため、Lhx2およびDeaf1タンパク質の様々な変異体の特性を解析することにより、詳細な機能ドメインの同定を行った。Lhx2およびDeaf1タンパク質の変異体発現ベクターは、PCRなどの遺伝子工学的手法を用いて作成した。また、それらLhx2あるいはDeaf1変異体によるアロマターゼ脳特異的プロモーター活性への影響は、COS7細胞を用いたレポーターアッセイにより調べた。

これらのタンパク質が共同で働くためには、タンパク質間の結合が必要である。野生型のLhx2とDeaf1が相互作用することは、現在までの研究において確認されているので、この相互作用に必要な領域がタンパク質のどこに存在しているかを決定するために、免疫沈降を利用した実験を行った。すなわち、Lhx2あるいはDeaf1タンパク質の野生型あるいは変異体タンパク質のcDNAを培養細胞にて発現させて細胞抽出液を得た。この抽出液をサンプルとして免疫沈降反応し、共沈したタンパク質をウエスタンブロットにて検出することで、タンパク質間相互作用に関わる領域の解析を行った。

4. 研究成果

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、aroBサイトに結合する核内因子として単離したLhx2は、limドメインと、DNA結合活性を持つホメオドメインの2つの特徴的なドメインから成る転写因子である。まず、Lhx2の転写活性化機能を詳細に調べる目的で、Lhx2の欠損変異体を用いて実験を行った。Lhx2の発現プラスミドとして野生型(pCI-Lhx2)、アミノ酸234-380を欠失した変異体(pCI-Lhx2-lim)、お

よびホメオドメインを含むアミノ酸148-406の変異体(pCI-Lhx2-homeo)を作製した。アロマターゼ脳特異的プロモーターの上流を含むレポータープラスミド(pGL4-AR-N1-Luc)と発現プラスミドをCOS-7細胞にリポソーム法にてコトランスフェクトして、ルシフェラーゼアッセイを行った。pCI-Lhx2はpGL4-AR-N1-Lucからのルシフェラーゼ活性を用量依存的に増加させた。この活性はプロモーター内に存在するaroBサイトに変異を導入したレポーターでは認められないため、野生型Lhx2の転写活性化はaroBサイトを介して行われることが確認された。また、pGL4-AR-N1-LucをpCI-Lhx2-lim、またはpCI-Lhx2-homeoと共にコトランスフェクトした結果、pCI-Lhx2-limでは転写活性化は認められなかったが、pCI-Lhx2-homeoでは野生型と同様の転写活性化を認めた。この結果は、ホメオドメイン近くに転写活性化に関与するドメインも存在しており、limドメインは転写活性化には必ずしも必要でないことが明らかとなった。

aroBサイトに結合するLhx2の転写活性化能は、それ単独ではあまり効果的ではない。Lhx2は、そのコファクターと考えられるDeaf1と相互作用して高い転写活性化を示す。培養細胞におけるレポーターアッセイにおいて、Deaf1のみでは転写活性化はほとんど生じない。また、胎仔間脳部の初代神経細胞を用いたsiRNA実験において、Lhx2をノックダウンすると、内因性のアロマターゼの発現が抑えられることから、Deaf1による転写増強はLhx2を介して行われると考えられた。脳特異的なアロマターゼの転写制御にDeaf1が関与している事を考慮し、Deaf1タンパク質の様々な変異体を作成して転写活性化能の測定による機能ドメインの同定を行った。種々のDeaf1のミュータントをのなかで、Deaf1-mutBC(アミノ酸残基150-471)は野生型と同程度にLhx2の転写活性化を増強した。Deaf1-mutBCから、さらに

150-234のアミノ酸領域を欠損させると転写活性増強能が減少することから、この領域がLhx2を介した転写活性増強に関わっていると考えられた。

一方で、Deaf1-1の転写活性化領域を同定するために、GAL4/UASシステムを用いて様々なDeaf1断片の転写活性化能を調べた結果、アミノ酸残基1-149や374-450などの複数の領域に転写活性化能が存在することが明らかとなった。しかしながら、先の実験系にて、Lhx2を介した転写活性の増強を認めたDeaf1-mutBCフラグメント(GAL4DBD-mutBC)には、GAL4/UASシステムでは転写活性化が認められなかった。この系において、GAL4DBD-mutBCと同時にLhx2発現ベクターをコトランスフェクトすると転写活性化が認められるようになった。これらの結果は、Deaf1とLhx2のタンパク質間相互作用によって引き起こされるタンパク質高次構造上の変化が、転写活性化に必要である事を示唆する。

上記のごとく、Deaf1はaroBサイトへ結合したLhx2と相互作用することで、協同的に転写制御を行う。Deaf1の機能的領域は、Lhx2との相互作用に必要な領域や転写活性化能を有する複数の領域など、いくつかの機能的部分が存在すると考えられた。しかしながら、N末端あるいはC末端からの単純な欠損ミュータントでは、機能に必要なアミノ酸部分が欠失すると、それ以上の欠損変異体はもはや機能しないので、どのアミノ酸領域までが必要であるかを調べる事ができない。そこで、Deaf1タンパクの様々な内部の欠損変異体を、PCR法を用いて作成し、その特性を解析することにより、より詳細なDeaf1の機能ドメインの解析を行った。すると、アミノ酸148~234、189~234、および235~292番目の領域が欠損した内部欠損変異体において、転写活性化能の低下が見られることが明らかとなった。一方、Deaf1タンパク質の変異体において、N末150から234番目まで欠損すると、Deaf1とLhx2の

相互作用も消失することから、2つの因子のタンパク質間相互作用に必要な部位は、アミノ酸領域150~234にあると考えられた。これらの結果を考慮すると、Lhx2との相互作用依存的な転写活性増強に必要なDeaf1の機能ドメインは、アミノ酸189~292番目の領域に集まって存在していることが示唆される。

最終年度はDeaf1の翻訳後修飾による機能制御についても検討した。申請者は、Deaf1がSUMO化修飾因子の1つであるUbc9と相互作用することを現在までの研究にて確認している。SUMO化は、細胞内局在の変化や転写制御など、様々な細胞内イベントに関与することが知られている。一次構造の解析により、Deaf1には、SUMO化される可能性のあるコンセンサス配列が3カ所存在していた。この3カ所に人為的な変異(Lys Arg)を導入し、SUMO化が生じない変異Deaf1の発現プラスミドを作成して、その転写活性化能の有無を解析した。しかしながら、これらの変異Deaf1のLhx2を介した転写活性化能は、野生型のそれに比べてほとんど変化しなかった。Deaf1の機能とSUMO化との関係性については今後更なる検討が必要になると考えられる。

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2件)

1. LIM-homeodomain transcription factor, Lhx2, is involved in transcriptional control of brain-specific promoter / exon 1f of the mouse aromatase gene. (査読有)
Journal of neuroendocrinology, Vol. 24, pp1367-1374 (2012)
doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02356.x
Honda, S., Kozako, T., Shimeno, H., Soeda, S., & Harada, N.

2. Behavioral analysis of genetically modified mice indicates essential roles of neuro-steroidal estrogen. (査読有)
Frontiers in Endocrinology, Vol. 2, article 40 (2011) doi: 10.3389/fendo.201100040
Honda, S-I., Wakatsuki, T., & Harada, N.

[学会発表](計5件)

1 Deaf1タンパク質の機能ドメインの解析
本田伸一郎、原田信広、小迫知弘、相川晃慶、坂田晃、添田泰司
第134回日本薬学会年会 2014年
3月30日、熊本

2 アロマターゼの脳特異的発現に関与する転写因子Deaf-1の機能ドメインの解析
本田伸一郎、大下遥子、民本愛、小迫知弘、蔵元佑嘉子、元流梨恵、原田信広、添田泰司
第85回日本生化学会大会 2012年
12月16日、福岡

3 アロマターゼの脳特異的プロモーター結合因子の解析
大下遥子、本田伸一郎、小迫知弘、蔵元佑嘉子、元流梨恵、原田信広、添田泰司、占野廣司
第39回薬物活性シンポジウム 2011年
11月21日、福岡

4 発生工学的手法を用いた脳内アロマターゼの機能解析
民本愛、本田伸一郎、小迫知弘、蔵元佑嘉子、元流梨恵、原田信広、添田泰司、占野廣司
第39回薬物活性シンポジウム 2011年
11月21日、福岡

5 脳特異的なアロマターゼ発現に関する Deaf-1 タンパク質の機能解析

原口美紀、古田展也、安田千穂、本田伸一郎、
小迫知弘、蔵元佑嘉子、元流梨恵、原田信広、
占野廣司、添田泰司

日本生化学会九州支部例会、2011年5月
22日、久留米

〔図書〕(計1件)

1 Molecular Mechanisms Controlling
Brain Aromatase Expression.
BRAIN AROMATASE ESTROGENS AND
BEHAVIOR (ISBN: 978-0-19-84119-6)
Chapter 8, OXFORD UNIVERSITY
PRESS (2012) Harada, N. and Honda, S.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 伸一郎 (HONDA, Shin-ichiro)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：40257639

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者 無し