

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 28日現在

機関番号：34315
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790258
研究課題名（和文） DMドメイン型転写因子を介した体細胞レベルで生じる性差の解析
研究課題名（英文） The analysis for sex difference of somatic cells via DM-domain related transcription factors
研究代表者 井上 英樹（INOUE HIDEKI） 立命館大学・生命科学部・助教 研究者番号：20550156

研究成果の概要（和文）：

DMドメイン型転写因子、DMRTは雄性生殖器発生に関与するなど、性差をもたらすことで知られているが、生殖器以外の体細胞でも発現し、その発現に性差がみられるか、またその役割について解析した。マウスを用いた研究により、DMRT遺伝子が生殖器以外の臓器・器官においても発現がみられ、心臓等ではその発現に性差が生じることを見出した。また、乳癌細胞株、MCF-7細胞を用いた研究により、DMRT2が細胞増殖に対し抑制的に働くことを見出し、生殖器官以外の体細胞におけるDMRT遺伝子の新たな機能を見出した。

研究成果の概要（英文）：

It has been reported that DM-domain transcription factor, DMRT, gives sex difference through regulating the development of male sex organ. We studied whether the DMRT express in other somatic cells and give sex difference. Expression of DMRT genes was observed several organs in mice, moreover, sex-specific expression of DMRT genes were observed in heart. In addition, we observed that DMRT2 suppresses cell proliferation of MCF-7, breast cancer cell line. These results suggest that DMRT genes have physiological function in somatic tissues except for sex organs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：性差、DMドメイン型転写因子

1. 研究開始当初の背景

性差は雌雄の性に分かれた動物にみられ、生殖能力の違いだけでなく形態、行動などそれぞれの性の中でみられる様々な差異と定

義され、その中には生理的な性差も含まれる。生理的な性差はストレス耐性、疾患への感受性なども含まれ、その分子レベルでの原因は明らかとなっていない。研究代表者はこれま

で線虫(*Caenorhabditis elegans*)をモデル動物として性差と酸化ストレス応答の違いについて研究を行ってきた。線虫は雌雄同体と雄、二つの性で構成されており、形態、行動などで大きな性差がみられる。研究代表者はこれまでに線虫の雄が酸化ストレスに対し強い感受性を示すことを初めて見出した。続いて雄の酸化ストレス感受性が性決定シグナルに依存することを見出し、解析を進めた。その結果性決定シグナルの標的遺伝子の一つで、雄の発生に重要な役割を果たす DM ドメイン型転写因子、MAB-3 が雄の酸化ストレス感受性に強く関与することを見出した。さらに研究代表者は MAB-3 が線虫の腸の発生に必須な GATA 型転写因子、ELT-2 のストレス応答遺伝子を含む複数の標的遺伝子の転写を抑制することを見出した。*elt-2* 遺伝子の RNAi によるノックダウンにより雌雄同体においても酸化ストレス感受性の上昇がみられた。以上の結果から、雄の腸における MAB-3 による ELT-2 機能の抑制が雄の酸化ストレス感受性に関与することが示唆された。DM ドメイン型転写因子は哺乳類に至るまでよく保存されており、脊椎動物では DMRT と呼ばれる。DMRT は脊椎動物においても雄性生殖器の発生に関与することが知られている。さらに、最近の研究により生殖器以外の組織・器官でも DMRT 遺伝子の転写が報告されている。しかしながら生殖器の発生以外の DMRT の役割はまだ十分に知られていない。また、GATA 転写因子も哺乳動物に至るまで保存されており、細胞の分化、成長、生存等を制御することが知られている。近年、哺乳動物において体細胞での遺伝子発現に性差がみられる報告がなされている

研究代表者はこれまでの線虫を用いた研究成果をもとに MAB-3 と ELT-2 の分子レベルの関係と、その標的遺伝子の発現の詳細な制御

機構を明らかにするとともに、哺乳動物で報告される体細胞レベルの性差と、それをもたらす機構に DMRT が関与するかどうか検証する。

2. 研究の目的

本研究課題はこれまでに線虫を用いて得られた知見に基づき、最初に線虫および哺乳動物培養細胞を用いて MAB-3 による ELT-2 の転写抑制機構の詳細を分子レベルで明らかにする。また、それとともに体細胞レベルの性差が酸化ストレス応答以外でもみられるかどうか探索を行う。次にマウスを用い、体細胞における DMRT の発現と、DMRT が体細胞レベルの性差、および標的遺伝子の発現量に性差をもたらしているかどうかを調べる。さらに、DMRT が GATA 転写因子を抑制的に制御するかどうかを明らかにするため、マウスおよび哺乳動物細胞を用いて研究を行う。最終的に生物間で保存された DM ドメイン型転写因子による GATA 転写因子の制御機構を明らかにし、体細胞レベルで性差が生じる普遍的な分子的な機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は最初に線虫を用いた研究代表者のこれまでの研究で得られた標的遺伝子を指標として線虫 DMRT である MAB-3、および GATA 転写因子 ELT-2 による転写抑制機構を分子レベルで解析する。次に、哺乳動物で保存された DMRT が体細胞レベルで性差をもたらすか検討するため、マウスを用いて DMRT、および線虫の研究で得られた標的遺伝子のマウスオルソログの発現部位と、その発現に性差が生じているかを調べる。続いて、標的遺伝子の転写等を指標として DMRT と GATA の分子レベルでの制御機構について生化学的解析を行う。また、これとともにマウスの初代培養細胞あるいは個体を用いて酸化ストレ

スに対する性差と DMRT 等の関係について解析を行う。以上の研究により哺乳動物における体細胞レベルで性差が生じる分子的な機構を明らかにする。

4. 研究成果

線虫においてDMドメイン型転写因子 MAB-3がGATA転写因子、ELT-2標的遺伝子の転写抑制を介して酸化ストレス耐性の性差に関与することをこれまでに見出した。MAB-3がELT-2の転写機能を抑制するかどうかを明らかにするため、最初にMAB-3とELT-2の間にタンパク質レベルの相互作用があるかどうかを検討した。HEK293T細胞にHA-MAB-3とFLAG-ELT-2を一過的に共発現させ、共免疫沈降とウェスタンブロッティングを行った結果、MAB-3とELT-2の相互作用は確認されなかった。このため、MAB-3によるELT-2抑制は標的遺伝子のプロモーター上での抑制によるものであると考えられた。次に、これまでで同定したMAB-3およびELT-2の標的遺伝子のプロモーターに着目し、MAB-3による抑制作用の検討を行った。これまでの研究でELT-2の標的およびMAB-3の予測される結合部位が発見された *mt1-1*, *mrp-5*, *F28A12.4* 各遺伝子のプロモーターを線虫ゲノムDNAより単離し、GFPをレポーター遺伝子とするレポータープラスミドを作成した。このレポータープラスミドを線虫に導入し、雄と雌雄同体それぞれの線虫内でのこれらのプロモーター活性を観察したが、有意な性差は見られなかった。さらに、MAB-3相互作用部位に変異を導入した各遺伝子のレポータープラスミドを作成したが、レポーター活性の上昇に有意な差がみられなかった。これらについては導入遺伝子のコピー数などの制御が課題であると考えられる。また、ストレス応答以外でのMAB-3の機能を調べた結果、*mab-3*変異体の雄は酸化ストレスに耐性を

示す一方短寿命になることを見出した(図1)。

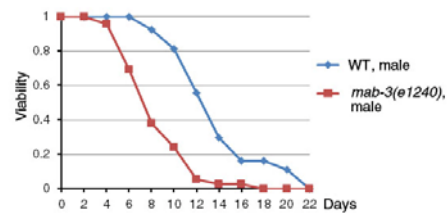


図1 : *mab-3*変異体雄は短寿命を示す

哺乳動物に保存されるDMRT遺伝子は7種類報告されている。これらの発現について体細胞レベルで性差がみられるかを、雌雄マウスの臓器における各DMRT遺伝子の発現をRT-PCRにより解析した。その結果、肝臓、脳等でDMRT遺伝子は雌雄ともに発現せず、あるいは雌雄での発現に差はみられなかった。いっぽう心臓においてDMRT1, DMRT2, DMRT3各遺伝子の発現が雄でのみ観察された。さらに、筋肉においてDMRT2は雄特異的に発現が増加していた(図2A)。また、リアルタイムPCRを用いた解析で、雌雄の心臓において線虫*mt1-1*ホモログの*Mt1*の発現が雄で低下することが示唆された(図2B) これらの結果から、DMRT遺伝子が生殖器官だけでなく他臓器でも発現し、その発現に性差がみられることが明らかとなった。

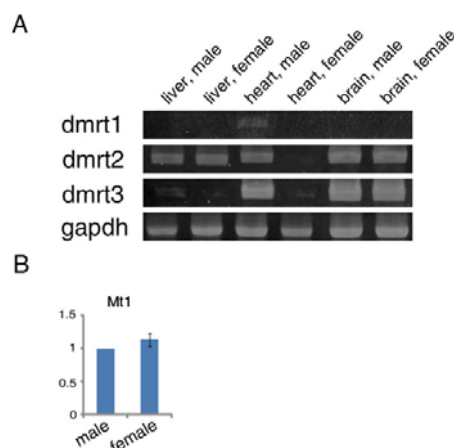


図2 : 体細胞におけるDMRT遺伝子の発現

また、DMRT遺伝子が哺乳動物培養細胞株等で

発現に差が生じているかを調べた。乳癌細胞株、MCF-7細胞はエストロゲン刺激を行うと細胞が増殖する。この時、エストロゲン刺激に伴いDMRT2の発現量が増加することをmRNAレベルおよびタンパク質レベルで見出した(図3A)。続く解析によりDMRT2遺伝子を一過的に発現させたMCF-7細胞は増殖能が低下した(図3B)。このとき、マウスおよびヒト、いずれのDMRT2遺伝子の発現でも増殖抑制を示した。一方、DMRT2遺伝子をノックダウンしたMCF-7細胞は増殖能が増大することを見出した(図3C)。以上の結果から、乳癌細胞株、MCF-7細胞はエストロゲン刺激時よって増殖するに伴いDMRT2が発現するが、DMRT2はMCF-7細胞の増殖抑制に関与することが示唆された。DMRT2は転写因子であるため、細胞増殖を調節する遺伝子群の転写制御をおこなうことが予想された。

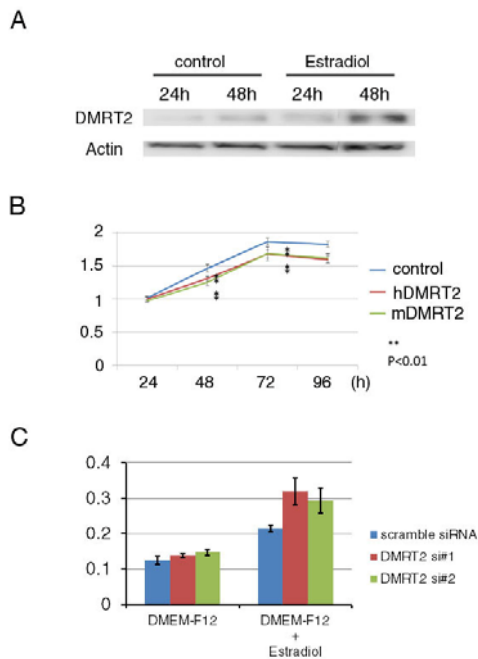


図3 : DMRT2によるMCF-7細胞の増殖制御

以上の研究から、DMドメイン型転写因子DMRTは生殖器官の発生だけでなく、体細胞においても発現が生じ、その発現に性差がみら

れることが明らかとなった。心臓で特にみられるDMRT遺伝子発現の性差の生理的な意義についてはマウス個体を用いての解析を進める。乳癌細胞株MCF-7細胞におけるDMRT2による増殖抑制は、細胞周期に関係する遺伝子の発現解析と合わせて論文投稿を進める。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 英樹 (INOUE HIDEKI)
立命館大学・生命科学部・助教
研究者番号 : 20550156