

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461389

研究課題名(和文) プロテオミクスを利用した脳特異的アロマターゼ遺伝子発現を制御するタンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of protein regulating brain-specific aromatase gene expression through proteomics

研究代表者

本田 伸一郎 (Honda, Shin-ichiro)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：40257639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳の性分化に関するアロマターゼの時期および領域特異的発現機構を明らかにするため、脳内アロマターゼの発現制御を担う転写因子、Deaf1の機能解析を行った。マウス胎仔より間脳部を摘出し、核抽出液を調製した。内因性Deaf1タンパク質を認識する抗体を用いて免疫沈降反応を行い、Deaf1と相互作用するタンパク質を含む試料を得た。得られた試料をSDS-PAGEに付し、タンパク質バンドを切り出して、LC-MS/MS解析を行った結果、Deaf1タンパク質と相互作用する分子としてTranscriptional intermediary factor-1 (TIF-1)が同定された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the spatiotemporal-specific expression mechanism of aromatase involved in sexual differentiation of the brain, I performed functional analysis of Deaf1, a transcription factor responsible for the regulation of the aromatase expression in the brain. The diencephalic region was excised from the fetal mouse brain, and a nuclear extract was prepared. To obtain a sample containing protein interacting with Deaf1, immunoprecipitation reaction was carried out using an antibody recognizing endogenous Deaf1 protein. The obtained sample was subjected to SDS-PAGE, and protein band was excised. LC-MS / MS analysis of the sample revealed that Transcriptional Intermediary Factor-1 (TIF-1) is as one of the molecule interacting with the Deaf1 protein.

研究分野：生化学

キーワード：ステロイドホルモン 神経細胞 性分化 転写制御

1. 研究開始当初の背景

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、それぞれ異なる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。本研究により、脳の発生過程で機能する転写因子群による脳特異的アロマターゼ遺伝子発現制御について、総合的な知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

遺伝子発現を制御するシスエレメントには、その配列に結合して転写の調節を行う特異的な転写因子が存在している。転写因子の機能が遺伝子の発現に直接結びつく事を考慮すると、その性質について解析を行う事は、目的の遺伝子の発現調節機構を明らかにする上で必要不可欠である。

現在までに申請者は、アロマターゼの脳特異的プロモーターに存在するシスエレメントに結合して転写を制御する転写因子として ARP1、Ear2、Lhx2、および Deaf1 等を酵母ワンハイブリッドアッセイやツーハイブリッドアッセイを用いて単離した。そのような複数の転写因子がアロマターゼ遺伝子の脳特異的プロモーター領域に結合することが明らかとなったが、本遺伝子の時期特異的な発現制御メカニズムを解明するためには、転写因子群の総合的理解が必要であるという考えに至った。そこで、これらの転写因子に関するエピジェネティックな遺伝子発現制御を、翻訳後修飾（アセチ

ル化・リン酸化）の影響と、DNA メチル化に注目して解析し、その後、プロテオミクスを利用した網羅的なタンパク質の解析を試みることで、転写因子群の相互作用を考慮した機能制御に関する情報を得る目的で研究を計画した。

3. 研究の方法

脳特異的アロマターゼプロモーター内のシスエレメントに結合する転写因子として ARP1 と Lhx2 を単離し、さらに Lhx2 と複合体を形成している因子として、Deaf1 を単離した。今回の計画では、これらの因子がアロマターゼ遺伝子プロモーター上でどのようなタンパク質と複合体を形成し、どのようなメカニズムで遺伝子発現を制御しているのか解析する。まず、Deaf1 や Lhx2 の翻訳後修飾に関わって、その機能制御に影響を及ぼすタンパク質を調べるため、外部環境からのシグナルを伝えていると考えられるアセチル化、SUMO 化、およびリン酸化を行うタンパク質について、阻害剤や発現ベクターなどを利用して調べる。さらに、DNA メチル化状態が、Deaf1 や Lhx2 によるアロマターゼ遺伝子の発現制御にどのような影響を及ぼすかを調べる。その後、マウス胎仔間脳部より調製したタンパク質サンプルより抗 Deaf1 抗体を用いて免疫沈降することで転写因子複合体を単離し、LC-MS/MS 解析により複合体に含まれるタンパク質を網羅的に同定する。

4. 研究成果

これまでの研究にて単離された転写調節因子による転写制御の解析を実施した。アロマターゼ脳特異的プロモーター活性は、アセチル化酵素阻害剤である TSA の添加により、Deaf1 の非存在下でも高い活性を示すことから Deaf1 による転写活性化は、アセチル化酵素が関係している可能性が考えられた。そこで Deaf1 による転写制御機構とアセチル化との関連性の解明を目的と

して、代表的なヒストンアセチル化酵素 (HAT)である p300 や PCAF がアロマターゼの脳特異的プロモーター活性に及ぼす影響について検討した。Lhx2 存在下で p300 や PCAF を共発現したところ、アロマターゼの脳特異的プロモーター活性は、Lhx2 のみを発現させた場合と比べて、殆ど変化が認められなかった。さらに、Lhx2 と Deaf1 の共存下で、p300 や PCAF を共発現した場合もプロモーター活性に殆ど変化を示さなかった。このように、p300 や PCAF は、Lhx2 や Deaf1 による転写能に影響を及ぼさなかった。アロマターゼ遺伝子のプロモーターに及ぼす TSA の効果は、二次的な作用であるかもしれない。また、今回用いた p300 や PCAF 以外にも、GCN5 や SRC-1 といった様々な HAT が存在しているので、Deaf1 による転写制御には、p300 や PCAF とは異なる種類の HAT が関与する可能性も考えられた。

次に、これらの転写因子、Deaf1 や ARP1 の翻訳後修飾、特にリン酸化による機能制御の可能性について検討した。脳におけるアロマターゼ遺伝子の発現は、 α 1 アドレナリン受容体アゴニストによって増加する。この受容体の細胞内情報伝達には、種々のタンパク質リン酸化が関与している。一方、申請者は Deaf1 などが細胞内でリン酸化されることを確認しており、これらの転写因子のリン酸化とアロマターゼ遺伝子発現の関連が推測された。そこで、キナーゼ阻害剤が脳内アロマターゼの発現にどのような影響を及ぼすか、マウス胎仔間脳部の初代培養神経細胞系を利用して調べた。その結果、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼを主として多くのキナーゼを阻害する K252a は、培養開始 3 日目までに認められるアロマターゼ mRNA の増加をほぼ完全に阻害した。また、プロテインキナーゼ C (PKC) の 阻 害 剤 である

Bisindolylmaleimide I も、アロマターゼ mRNA の増加を大きく阻害したが、PKC のアイソフォームのうち、主に PKC α 、 β 、および γ を特異的に阻害する Go6976 や Go6983 では、ほとんど阻害が認められなかった。これらの結果は、周生期の脳におけるアロマターゼの発現増加に PKC の特定のアイソフォームを含む複数のキナーゼが関与することを示唆する。

次の検討として、脳アロマターゼの発現制御の実験を行う上で、より生理的条件下に近いと考えられる視床下部由来の細胞株、N40 株化細胞を用いて、ARP1、Lhx2、および Deaf1 のアロマターゼ脳特異的プロモーター活性への影響を調べた。N40 細胞を用いた実験結果を、以前から実験に用いていた cos7 細胞でのそれと比較したところ、ほぼ同様の結果が得られ、細胞種の違いによる ARP1、Lhx2、および Deaf1 のプロモーター活性への影響には、大きな差異は無いことがわかった。一方、N40 細胞では、継代を繰り返すにつれて、アロマターゼ mRNA の量が低下し、アロマターゼ遺伝子の発現量が低くなることがわかった。遺伝子の発現の低下には様々な原因が考えられるが、今回は DNA のメチル化による遺伝発現抑制の可能性について検討した。アロマターゼ発現量の低下した N40 細胞をメチル化阻害剤存在下にて培養し、72 時間後にアロマターゼ mRNA の量を測定したところ、発現量の増加が認められた。しかしながら、その増加はわずかであり、胎仔脳において発現しているアロマターゼ mRNA の量に比べて、著しく低いままであった。このことより、N40 細胞の長期培養によるアロマターゼ mRNA 遺伝子発現低下の原因は、DNA のメチル化だけではないことが明らかとなった。

免疫沈降反応により、マウス胎仔間脳部の細胞の抽出液から Deaf1 タンパク質相互

作用因子を単離し、LC/MS/MS 解析を利用してタンパク質の同定を行うための実験を行った。Deaf1 タンパク質と相互作用する因子が、免疫沈降反応において効率よく共沈殿する反応条件の検討を詳細に行い、以後の解析の使用に十分に足る量の目的タンパク質が採取できるような条件を確立した。マウス胎子より間脳部を摘出し、核抽出液を調製した。前年度に行った反応条件の下で、内因性 Deaf1 タンパク質を認識する抗体を用いて免疫沈降反応を行い、Deaf1 と相互作用するタンパク質を含む試料を得た。得られた試料を SDS-PAGE に付し、4 つの異なるタンパク質バンドを切り出して、LC-MS/MS 解析を行った。解析の結果、4 つのバンドの複数に Transcriptional intermediary factor-1 (TIF-1) のペプチド断片が認められた。TIF-1 は、分子内に RING フィンガーやプロモドメインなどを有するアミノ酸 834 個からなる転写因子で、クロマチンリモデリングやヒストン修飾に影響を及ぼすことで染色体機能の調節に関わっていると報告されている。今回の LC-MS/MS 解析では、試料の調製過程でタンパク質の部分水解が生じ、SDS-PAGE 上で異なる分子量のバンドとして解析したペプチドが、いずれも TIF-1 であったものと考えられる。TIF-1 を用いた免疫沈降反応でも Deaf1 タンパク質との共沈殿が認められ、Deaf1 と TIF-1 との相互作用が *in vitro* でも確認された。このように Deaf1 のアロマターゼ遺伝子を含む様々な遺伝子の転写制御機能には TIF-1 が関与していると考えられる。また、TIF-1 は現在までにいろいろな機能が報告されており、そのひとつに SUMO 化の E3 リガーゼとしての機能がある。申請者はすでに Deaf1 タンパク質も SUMO 化されることを報告しており、Deaf1 の SUMO 化による機能制御に TIF-1 が関

わる可能性も示唆される。

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)

1. Aromatase knockout mice reveal an impact of estrogen on drug-induced alternation of murine electrocardiography parameters(査読有)

Kurokawa, J., Sasano, T., Kodama, M., Li, M., Ebana, Y., Harada, N., Honda, S., Nakaya, H., and Furukawa, T.

J. Toxicol. Sci., Vol.40, pp339-348 (2015)

[学会発表](計 7 件)

1. ARP1 と相互作用するタンパク質の解析
本田伸一郎、小迫知弘、相川晃慶、原田信広

2017 年度生命科学系学会合同年次大会

2017 年 12 月 6 日、神戸

2. アロマターゼの脳特異的プロモーターに結合するタンパク質の単離・解析

本田伸一郎

2017 年内外環応答・代謝酵素研究会

2017 年 9 月 9 日、福岡

3. アロマターゼ遺伝子の脳特異的プロモーター活性を制御するタンパク質の解析

本田伸一郎、原田信広、小迫知弘、坂田晃、相川晃慶、刀根菜七子、添田泰司

日本薬学会第 136 回年会 2016 年 3 月 27 日、横浜

4. 核内レセプターによるアロマターゼ遺伝子の発現制御

本田伸一郎、小迫知弘、相川晃慶、坂田晃、刀根菜七子、原田信広、添田泰司

日本薬学会第 135 回年会 2015 年 3 月 27 日、

神戸

5. アロマターゼの脳特異的プロモーターに存在するシスエレメント、A サイトに結合する転写因子の解析

山口貴広、本田伸一郎、小迫知弘、相川晃慶、坂田晃、原田信広、添田泰司

2014年日本薬学会九州支部会 2014年12月7日、福岡

6. 脳特異的アロマターゼプロモーターの活性に及ぼす Deaf1 の SUMO 化の影響

本田伸一郎、小迫知弘、相川晃慶、坂田晃、原田信広、添田泰司

第37回日本分子生物学会年会 2014年11月27日、横浜

7. 脳内アロマターゼの機能と発現制御

本田伸一郎

第3回福岡病理・代謝研究会 2014年9月24日、福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

〔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・教授

研究者番号：40257639

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者 無し