

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007～2008

課題番号:19790225

研究課題名(和文) 性依存性精神神経疾患の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of Neuronal Diseases Caused by Sex Hormones

研究代表者

松本 高広(MATSUMOTO TAKAHIRO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・協力研究員

研究者番号:70447374

研究成果の概要:

本研究では性ステロイドホルモン作用と性染色体による性特異性の観点より、クロマチン修飾を介した転写とエピジェネティクスに着目した精神神経疾患の分子メカニズムの解明を試みた。そのアプローチとして脳神経特異的な conditional knockout 法による精神神経疾患モデルマウスの確立とタンパク精製による精神神経疾患関連タンパク複合体の同定を試みた。その結果、性ステロイドホルモン受容体の精神機能における重要性及びその標的遺伝子の遺伝子発現制御を介した精神神経疾患発症への寄与を個体レベルで明確にした。また、性特異的染色体より発現する性特異的因子のクロマチン修飾を介した転写制御とエピジェネティクスの分子機構を in vitro 系解析により解明しつつある。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・病態医化学

キーワード:分子病態学、転写

## 1. 研究開始当初の背景

近年、急速な高齢化社会を迎え、加齢に伴う更年期障害の一つとしてうつ病が注目を集めている。女性では閉経に伴うエストロゲンの急激な低下により、抑うつ、不安やうつ病のリスクが増加する。また、代表的な男性更年期障害としてうつ病が広く認知されつつあり、前立腺癌治療を目的とした抗アンドロゲン療法時の副作用としてうつ病が問題となる。このように性ステロイドホルモンは抗う

つ作用を有していることは明らかであるものの、その作用機序は不明な点が多い。性ステロイドホルモンは種々の核内ステロイド受容体を介した、標的遺伝子群の転写調節によりその生理作用が発揮されるが、特に中枢神経系における標的遺伝子群は殆ど知られていない。

一方、X連鎖性精神遅滞は166種類以上OMIMに登録されており、精神遅滞関連遺伝子の多くがX染色体に存在すると推測されるが、その

大半が未同定である。また、X染色体相同様遺伝子が多数存在するY染色体遺伝子群に至っては、2003年にヒトY染色体ゲノムが公開され、中枢神経系に強い発現を示す遺伝子群が報告されたが、その神経機能は依然不明である。

このように、一部の精神神経疾患には性差が存在し、その要因として性ステロイドホルモン作用に依存した性差と性染色体に依存した遺伝学的性差が強く寄与するものと考えられる。したがって、性ステロイドホルモン及び性染色体に依存した精神神経疾患関連分子の同定や細胞内情報伝達の解明、またモデル動物の確立と表現型解析が治療に大きく貢献できるものとする。

これまで申請者らは性ステロイド受容体転写制御を支える分子機構を理解する上でヒストン修飾や染色体構造調節因子に注目した生化学的機能解析、遺伝子改変動物を用いた生体内遺伝子機能解析を遂行してきた。これを踏まえて本研究は、性ステロイドホルモン作用と性染色体という性特異性という観点から、クロマチン修飾を介した転写とエピジェネティクスに着目して、精神神経疾患の分子メカニズムの一端を明らかにしたいと考える。アプローチとして、時期脳神経特異的な conditional knockout (KO)法による精神神経疾患モデルマウスの各地るとタンパク精製による精神神経疾患関連タンパク複合体の同定を柱とする。

## 2. 研究の目的

主要アンドロゲンであるテストステロンは神経細胞内で、アンドロゲン受容体 (AR) を介して直接作用する一方、芳香化酵素によりエストロゲンに転化された後、2種のエストロゲン受容体 (ER、ER) を介しても作用する。このことから、性ステロイドホルモンは複数のステロイド受容体群を介した複雑多岐にわたる情報伝達機構によりその生理作用が発揮されると予想される。核内受容体スーパーファミリーに属する性ステロイド受容体は転写制御因子であり、リガンド依存的にヒストン修飾因子を含む転写共役因子複合体群と相互作用することにより機能を発揮する。これまで申請者らは、Cre-loxPシステムによる遺伝子欠損 (KO) マウスの作出と組織解析、行動解析を中心とした神経機能表現型解析 (Yamamoto et al., Nature Medicine 12, 2006., Sato & Matsumoto et al., PNAS 101, 2004, Shiina & Matsumoto et al., PNAS 103, 2006)、さらに培養細胞を用いた生化学的解析系を構築してきた (Ohtake et al., Nature 423, 2003)。さらに、我々は最近になり神経幹細胞特異的なヒト核内受容体 (TLX) の相互作用因子としてX染色体遺伝子 (SMCX) 及びそのY染色体相同遺伝子 (SMCY) を同定

した (未発表データ)。SMCX及びSMCYのアミノ酸構造を in silico で調べたところ、2006年に同定された新規ヒストン脱メチル化酵素であるJmjCドメイン含有タンパク質ファミリーに属する可能性が示唆された。さらに興味深いことに2005年にX連鎖性精神遅滞の患者においてSMCY遺伝子の変異が報告されている。そこで本研究では大きく2つのプロジェクトを構成した。第一に、AR、ER、ERそれぞれの神経細胞特異的KOマウス、両者の2重KOマウスならびに3重KOマウスを作出し、性ホルモン依存性うつ病モデル動物の作出を行い、マイクロアレイ解析により新規標的遺伝子群の同定を試みる。第二に精神神経疾患に関連するSMCX及びSMCYのヒストン脱メチル化能を生化学的に検証し、神経培養細胞からのタンパク精製による新規精神神経疾患関連タンパク複合体の取得をめざす。SMCX及びSMCY、その複合体構成因子は神経培養細胞を用いて特に性特異的なヒストンコードに注目して解析を行うと同時に、KOマウスを作出し個体レベルの神経機能評価の礎とする。

## 3. 研究の方法

### 1. 脳神経特異的遺伝子欠損マウスの神経機能解析

性ステロイド受容体3重、2重、シングルKOマウス、性染色体遺伝子KOマウスにおける6種の行動解析 (明暗往来テスト、尾懸垂テスト、高架式十字迷路テスト、強制水泳テスト、オープンフィールドテスト、攻撃性テスト) を試行する。また、これら行動特性に対する選択的セロトニン再取り込み阻害剤投与によるレスキュー効果を検証する。さらに、神経細胞構築の組織学解析、血中副腎皮質ホルモン濃度測定、脳内モノアミン、カテコールアミンの測定を行う。表現型解析用のマウス確保にあたってはSPF動物舎における大規模な飼育が必要となるが、現有設備で十分に充足できる。また、すべての行動解析は系が立ち上がっており (Matsumoto et al., Neuroendocrinology 77, 2003, Sato & Matsumoto et al., PNAS 101, 2004)、装置一式は現有設備で充足される。

### 2. マイクロアレイ解析による精神神経疾患関連標的遺伝子群の探索

マイクロアレイを用いて発現量に差のみられる遺伝子を網羅的に解析することにより、性ステロイド受容体3重、2重、シングルKOマウス、性染色体遺伝子KOマウスにおける精神神経疾患様の行動異常に関与する遺伝子群を同定する。また、AR、ER、ER遺伝子それぞれにレポーター遺伝子を発現するBAC TgマウスからFluorescent protein陽性細胞を

セルソーターにより分離し、アンドロゲン、エストロゲン投与により発現変動のみられる遺伝子をマイクロアレイ解析により検索する。さらに、得られた候補遺伝子については Northern blot や in situ ハイブリダイゼーション法により発現部位の詳細な解析を行う。また、神経培養細胞を用いたプロモーター解析などの機能解析を in vitro 系で行う。当研究室にはマイクロアレイ解析の現有設備はないものの、かねてからの共同研究グループの施設利用により申請者らはマイクロアレイ解析を遂行してきた (Shiina & Matsumoto et al., PNAS 103, 2006)。

### 3. 生化学的アプローチによるヒト SMCX/SMCY 脱メチル化複合体構成因子の性状解析

平成 19 年度の延長として、SMCX/SMCY のタンパク精製を試行する。取得した複合体構成候補因子は、ヒストン脱アセチル化活性に関与するか否か、また、クロマチン superciling assay や disruption assay によるクロマチン構造変換能に関しても in vitro 系にて解析する。これに必須材料となるヒストン八量体及び DNA とのクロマチン再構築は HeLa 細胞核抽出液及び recombinant 系の両者を備えている。これら in vitro 解析系に係る消耗品 (試薬、器具、細胞培養培地、血清) を経費申請する。研究内容は一部、東京大学大学院博士課程 1 年の横山敦の分担にて行う。

#### 4. 研究成果

1. 脳神経特異的性染色体遺伝子 K0 マウスにおける行動解析の結果、三種の性ステロイド受容体が欠損したオスマウスで重度な行動異常を呈することが判明した。さらに、この三重遺伝子欠損マウスにおいてセロトニン合成酵素の低下が観察され、個々の性ステロイド受容体が脳組織において神経機能を司る可能性を強く示唆された。

2. 性ステロイド受容体 K0 マウスにおける遺伝子発現変動の見られる遺伝子をマイクロアレイ法により探索した結果、3重、2重、シングル K0 マウス各々で顕著に遺伝子発現変動が観察される遺伝子を同定することに成功した。レポーターアッセイによりこれら遺伝子のいくつかを性ステロイドホルモン受容体の標的遺伝子であることが判明した。

3. SMCX/SMCY タンパク複合体機能の評価系である in vitro 系の構築及びマテリアルの準備は進行中である。

#### 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)

[雑誌論文](計 8 件)

Imai, Y., Nakamura, T., Matsumoto, T., Takaoka, K. and Kato, S. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. **J. Bone. Miner. Metab.** 2009 (in press). 査読有

Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Matsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Coactivation of estrogen receptor  $\beta$  by a gonadotropin-induced cofactor G1OT. **Mol. Cell. Biol.** 29, 83-92, 2009. 査読有

Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T. and Kato, S.

Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. **Genes to Cells** 13, 623-633, 2008. 査読有

Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female physiology. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 109, 236-241, 2008. 査読無

Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T. J., Chambon, P. and Kato, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor  $\alpha$  and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell** 130, 811-823, 2007. 査読有

Miyamoto, J., Matsumoto, T., Shiina, H., Inoue, K., Takada, I., Ito, S., Itoh, J., Minematsu, T., Sato, T., Yanase, T., Nawata, H., Osamura, R. Y. and Kato, S. Pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. **Mol. Cell. Biol.** 27, 4807-4814, 2007. 査読有

Matsumoto, T., Kawano, H., Shiina, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female reproduction. **Reproductive Med. Biol.** 6, 11-17, 2007. 査読無

Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T.,

Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S. and Matsumoto, T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II deficient mice. *J. Clin. Invest.* 117, 1514-1526, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村貴、松本高広、加藤茂明：骨芽細胞におけるエストロゲンの作用の解明 骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスを用いて。第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会合同大会。(2008.12.9-12、神戸)

Inoue, K., T. Matsumoto, T., Yamagata, K., Akimoto, C., Yonezawa, M., Kato, S.: DEAD box RNA helicase is required for Drosha-mediated processing of a subset of microRNAs. 2008 Keystone Symposia Conference (RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA). (Whistler, Canada, 2008. 3.25-4.1)

秋本千央、上田崇、山岡育子、井上和樹、松本高広、盛真友、北川浩史、加藤茂明：Y染色体遺伝子 TSPY と男性ホルモン受容体の機能的相互作用の解析。第30回日本分子生物学会、第80回日本生化学会合同大会。(2007.12.11-15、横浜)

今井祐記、中村貴、竹田秀、福田亨、山本陽子、高岡邦夫、松本高広、加藤茂明：エストロゲンの骨量維持機構は Fas Ligand シグナルを介した破骨細胞寿命の調節である。第25回日本骨代謝学会。(2007.7.19-21、大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 高広 (MATSUMOTO TAKAHIRO)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・  
協力研究員

研究者番号：70447374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし