

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24年 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249018

研究課題名（和文） エンハンサー選択とエンハンサー変換による副腎皮質の形成機構

研究課題名（英文） Mechanism of adrenocortical differentiation by exchange and conversion of enhancers

研究代表者

諸橋 憲一郎 (MOROHASHI KEN-ICHIROU)

九州大学・大学院医学研究院・主幹教授

研究者番号：30183114

研究成果の概要（和文）：

核内受容体型転写因子である Ad4BP/SF-1 は副腎皮質における各種遺伝子の転写を通じ、細胞の分化と機能維持に重要な機能を担っている。この因子の機能を通じ細胞が分化するにあたっては、クロマチン構造の制御を通じ、機能するエンハンサーが選択ならびに変換されるはずである。本研究では副腎皮質を対象として、Ad4BP/SF-1 ならびにヒストン修飾を認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法と大容量シーケンスをおこなった。その結果、Ad4BP/SF-1 が遺伝子近傍または内部に存在するエンハンサーに結合することで解糖系遺伝子を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Ad4BP/SF-1, a member of nuclear receptor superfamily, plays pivotal role in differentiation and function of the adrenal cortex through regulating various target genes. It has been hypothesized that active enhancers should be exchanged or selected through conversion of chromatin structure when Ad4BP/SF-1 functions during the tissue development. In the present study, we performed ChIP-sequence analyses of the DNA recovered with antibodies for Ad4BP/SF-1 and modified histones. As the consequence, it was found that Ad4BP/SF-1 regulates glycolytic gene expression through binding to enhancers localized in and around the genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2010年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2011年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
年度			
年度			
総計	36,500,000	10,950,000	47,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ゲノム医化学

キーワード：副腎皮質、エンハンサー、クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

副腎皮質はステロイドホルモン（糖質コルチコイドと電解質コルチコイド）を産生する。このような組織特異的な機能の獲得

はそれぞれの組織で発現する遺伝子のレパートリーに依存することから、組織特異的な遺伝子発現機構の解明が、細胞や組織の分化の理解には欠かせない。このような観

点から、組織形成メカニズムの理解に向けて、主に二つの方向から研究が推進されてきた。一つは組織特異的転写因子の機能解析を通じて、そして他の一つは組織特異的エンハンサーの解析を通じて、組織分化を支える遺伝子カスケードを解明するものであった。従来の研究では、組織特異的エンハンサーの同定が困難なこともあり、主に前者のアプローチによる研究が世界的に展開されてきた。これに対し、我々は過去7年以上の歳月を組織特異的エンハンサーの同定と解析に費やしてきた。その過程で Ad4BP/SF-1 遺伝子座に胎仔副腎皮質エンハンサーをはじめ、計5種類の組織特異的エンハンサーを同定した。更に、その後の解析結果の中で、我々が特に注目した点は、胎仔副腎皮質が成獣副腎皮質に分化するにあたり、胎仔副腎エンハンサーから成獣副腎エンハンサーへとエンハンサーの使用を換えること（エンハンサー変換）であり、また同一細胞を起源とする胎仔精巢ライディヒ細胞と胎仔副腎皮質細胞が、分化の過程でそれぞれのエンハンサーを選択すること（エンハンサー選択）であった。

2. 研究の目的

これらの結果をもとにエンハンサー選択やエンハンサー変換こそが、従来より指摘されてきたクロマチンの構造変換と遺伝子発現の係に構造的・機能的根拠を与えると推測するに至った。この新たな概念がゲノム中の全ての遺伝子発現の共通の基盤と成り得るならば、遺伝子発現の組織特異性は組織特異的エンハンサーの選択と変換を可能にするクロマチン構造の変化に由来することを容易に想起させるものであった。そこで、情報生物学者の協力のもと、エンハンサーの機能とクロマチン構造に関する研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では、副腎皮質細胞のモデル系としてマウス副腎皮質より樹立された Y-1 細胞を用いた。通常の培地で培養した Y-1 細胞より、固定ならびに物理的に細分化したクロマチンを調製し、Ad4BP/SF-1 抗体、ヒストン H3K4 モノメチル抗体、ヒストン H3K27 アセチル抗体を用い、免疫沈降を行うことで、それぞれ Ad4BP/SF-1 が結合している領域、ヒストン H3K4 がモノメチル化されている領域、ヒストン H3K27 がアセチル化されている領域を回収した。H3K27 がアセチル化は活性化されたエンハンサー領域の修飾と考えられており、Ad4BP/SF-1 の結合領域と合わせて、Y-1 細胞内でエンハンサーとして機能する領域を確定することができると考えた。これらの回収サンプルより DNA を調製し、次世代シー

クエンサーによって回収された DNA の塩基配列を決定した。それぞれのサンプルから 200 万の塩基配列を得、ゲノム中における集積領域の確定、遺伝子領域との関係、保存配列の検索、想定される標的遺伝子の検索などを行った。

一方、これらの結果から標的遺伝子の転写産物量が Ad4BP/SF-1 のノックダウンによって影響を受けるかについて検討した。

4. 研究成果

Ad4BP/SF-1 抗体による ChIP-sequence の結果、ゲノム中に 2 万カ所を越える結合領域を同定した。これらの領域は、遺伝子上流域や遺伝子間、ならびにイントロン領域に散在していたが、Ad4BP/SF-1 の結合サイトはほとんどの領域に存在した。これらの領域がどのような機能を持つ遺伝子に存在するかを調べたところ、興味深いことにほとんどの解糖系遺伝子内ならびに近傍に存在していた。このことは、Ad4BP/SF-1 が解糖系遺伝子の発現制御を通じ、細胞内のエネルギー産生を制御していることを示唆するものであった。そこで、Ad4BP/SF-1 の発現量を RNAi 法にて抑制することで、解糖系遺伝子の発現が抑制されるかについて調べた。その結果、全ての解糖系遺伝子の発現が抑制された。実際に、Ad4BP/SF-1 ノックダウンによって細胞内の ATP の量が ADP/AMP に比べて減少していることも明らかになっており、Ad4BP/SF-1 が細胞内のエネルギー状態を調製していることが示された。

これらの領域の多くは、活性化エンハンサーの指標となるヒストン H3K27 のアセチル化修飾を受けていた。このことはこれらの領域が実際に解糖系遺伝子の転写制御を行っていることを示唆するものであるが、現在、これらの領域が転写活性を制御するエンハンサーとして機能するかについて検討を進めているところである。

本研究では、Ad4BP/SF-1 の結合領域を同定することで、ゲノムに散在するエンハンサーの構造を明らかにした。また同時に、Ad4BP/SF-1 が解糖系遺伝子の制御を行っていることを明らかにした。最近になって、Y-1 細胞の培地中における糖濃度によって解糖系遺伝子における Ad4BP/SF-1 の集積が制御されているとの知見を得ることができた。また、低糖濃度による培養下では、Ad4BP/SF-1 の集積量が増加するとともに、Ad4BP/SF-1 が新たな複合体を形成していることも明らかになってきた。未だこれらの複合体タンパク質の同定には至っていないが、複合体タンパク質の解析を通じ、エンハンサーの構造変換が行われている可能性があり、複合体タンパク質の解析を急いでいるところである。

本研究によって得られた成果で興味深いと思われる点は

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 13 件)

- ① Steroid hormones and the development of reproductive organs. K. Morohashi, M. Tanaka Sexual Development. in press. Review. 査読有
- ② *WNT* family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbesterol exposure in mice. T. Nakamura, S. Miyagawa, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Mizutani, T. Sato, K. Morohashi, T. Takeuchi, T. Iguchi. *Toxicology* **296**, 13-19, 2012. 査読有
- ③ *Cbx2*, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. Y. Katoh-Fukui, K. Miyabayashi, T. Komatsu, A. Owaki, T. Baba, Y. Shima, T. Kidokoro, Y. Kanai, A. Schedl, D. Wilhelm, P. Koopman, Y. Okuno, K. Morohashi. *Endocrinology* **153**, 913-924, 2012. 査読有
- ④ Identification of enhancer specific for fetal Leydig cells in *Ad4BP/SF-1* gene. Y. Shima, K. Miyabayashi, T. Baba, H. Otake, S. Oka, M. Zubair, K. Morohashi. *Endocrinology* **153**, 417-425, 2012. 査読有
- ⑤ SF-1 expression during adrenal development and tumorigenesis. Gardiner JR, Y Shima, K. Morohashi, A. Swain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 12-18, 2012 Review. 査読有
- ⑥ DNA methylation of intronic enhancers directs tissue-specific expression of Steroidogenic Factor 1/Adrenal 4 Binding Protein (SF-1/Ad4BP). E. A. Hoivik, T. E. Bjaney, O. Mai, S. Okamoto, Y. Minokoshi, Y. Shima, K. Morohashi, U. Boehm, and M. Bakke. *Endocrinology* **152**, 2100-2112, 2011. 査読有
- ⑦ The fetal and adult adrenal cortex. K. Morohashi and M. Zubair. *Mol. Cell. Endocrinol.* **336**, 193-197, 2011, Review. 査読有
- ⑧ Abnormal epithelial cell polarity and migration of *Emx2* KO embryonic gonads induced by ectopic EGFR expression. M. Kusaka, Y. Katoh-Fukui, H. Ogawa, K. Miyabayashi, T. Baba, N. Sugiyama, Y. Sugimoto, Y. Okuno, R. Kodama, A. Iizuka-Kogo, T. Senda, S. Aizawa, K. Morohashi. *Endocrinol.* **151**, 5893-5904, 2010. 査読有
- ⑨ Production and characterization of monoclonal antibodies to germ cells. C. Yokoyama, Y. Katoh-Fukui, K. Morohashi, D. Konno, M. Azauma, and T. Tachibana. *Hybridoma* **29**, 53-57, 2010. 査読有
- ⑩ Transcriptional suppression by transient recruitment of ARIP4 to sumoylated nuclear

receptor Ad4BP/SF-1. H. Ogawa, T. Komatsu, Y. Hiraoka, and K. Morohashi. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4235-4245, 2009. 査読有

- ⑪ Transgenic expression of *Ad4BP/SF-1* in fetal adrenal progenitor cells leads to ectopic adrenal formation. M. Zubair, S. Oka, K. L. Parker, and K. Morohashi. *Mol Endocrinol* **23**, 1657-1667, 2009. 査読有
- ⑫ Generation of rat monoclonal antibodies specific for Ad4BP/SF-1. C. Yokoyama, T. Komatsu, H. Ogawa, K. Morohashi, M. Azuma, and T. Tachibana. *Hybridoma* **28**, 113-119, 2009
- ⑬ A critical time window of Sry action in gonadal sex determination. R. Hiramatsu, S. Matoba, M. Fujisawa, M. Kanai-Azuma, N. Tsunekawa, M. Kurohmaru, K. Morohashi, D. Wilhelm, P. Koopman, Y. Kanai. *Development* **136**, 129-138, 2009. 査読有

[学会発表] (計 32 件)

国際学会招待講演

- ① Gordon Research Conference, 2010 Reproductive Tract Biology. Aug 15-19, Andover, Andover, New Hampshire, USA. Keynote Lecture, Molecular and Cellular Mechanisms of Testis Differentiation. K. Morohashi
- ② 43 rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction July 28-Aug 3, 2010, Milwaukee, USA, Invited Speaker Lineage of Testicular Leydig cells and Adrenal Cortex. K. Morohashi, Z. Mohamad, T. Baba, K. Miyabayashi, H. Otake, Y. Shima
- ③ 14th Adrenal Cortex Conference. June 16-18, 2010, San Diego, USA, The Keith Parker Memorial Lecture. Ad4BP/SF-1 as the key factor for steroidogenic cell development. K. Morohashi
- ④ 14th International Congress of Endocrinology, ICE2010. March 26-30, 2010, Kyoto, Japan, Implication of Ad4BP/SF-1 into Adrenal Development. K. Morohashi, Y. Shima, K. Miyabayashi, H. Otake, T. Baba, M. Zubair
- ⑤ Official Satellite Symposia of ICE2010 March 30, 2010, Kyoto, Japan. Tissue-specific Enhancers of Ad4BP/SF-1 Gene. K. Morohashi
- ⑥ Fifth international Symposium on the biology of vertebrate sex determination. April 20-24, 2009, Kona, Hawaii, USA. Molecular mechanisms for the functions and structures of tissue specific enhancers. Y. Shima, T. Baba, K. Miyabayashi, M. Zubair, K. Morohashi

国内学会招待講演

2011年(平成23年)

⑦ 第6回日本生殖内分泌学会 東京 11月19日 生殖腺におけるステロイドホルモン産生 諸橋憲一郎

⑧ 第84回日本内分泌学会 神戸 4月21日-23日 胎仔型ライディッシュ細胞の生理学的機能の解明 嶋雄一、諸橋憲一郎

⑨ 第4回 日本性差医学・医療学会 下関 2月5日-6日 生殖腺の性差構築 諸橋憲一郎

2010年(平成22年)

⑩ 第33回 日本分子生物学会、第83回 日本生化学会 神戸 12月7日-10日 Transcriptomic analysis of fetal Leydig cells. Y. Shima, T. Baba, K. Miyabayashi, H. Otake, Y. Kurihara, K. Morohashi

⑪ 第28回内分泌代謝サマーセミナー(長崎) 7月8日-10日 ステロイド産生細胞の発生

諸橋憲一郎

2009年(平成21年)

⑫ 第54回日本生殖医学会(金沢) 11月22-23日 生殖腺の発生と性分化のメカニズム

諸橋憲一郎、馬場崇、宮林香奈子、大竹博之、嶋雄一

⑬ 第73回日本循環器学会(大阪) 3月20-22日 Genetic Program of Gonad Differentiation

諸橋憲一郎

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸橋 憲一郎 (MOROHASHI KEN-ICHIROU)

九州大学・大学院医学研究院・主幹教授

研究者番号: 30183114

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: