

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590214

研究課題名(和文) 脳の性的二型形成におけるエストロゲン制御シグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Estrogen-induced signaling mechanisms involved in the establishment of the sexual dimorphism of the rat brain

研究代表者

木山 裕子 (KIYAMA, Yuko)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60234390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、脳内エストロゲン暴露によって誘引される、脳の形態的性分化に関与する因子の同定及びその機序を調べる目的で、出生直後の雌ラットにエストロゲン処理を行い、内側視索前野の性的二型核を示す部位を含む脳切片を採取し、DNAマイクロアレイ解析、ウエスタン・ブロッティング法、免疫組織化学法により、エストロゲンによって誘導されるシグナル伝達カスケードの同定を行った。その結果、細胞運動が脳の性分化に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the rat brain, the sexually dimorphic nucleus (SDN) of the medial preoptic area (POA) is a major site for controlling sexual dimorphic behavior and physiological functions. The dimorphism is formed by the exposure to 17 β -estradiol (E2) during the critical period, which begins around embryonic day 18. In order to explore key factors and mechanisms involved in the establishment of sex differences in response to E2, we prepared total RNA from brain slices containing SDN from female rats treated with E2 at birth, which was subjected to DNA microarray. The expression of the gene for protein kinase C-delta; (PKC-delta;) was significantly up-regulated by E2. We then examined the downstream effectors of PKC-delta; by Western blotting and immunohistochemistry, and found the involvement of the PKC-delta;/Rac1/LIMK1/cofilin pathway. This work demonstrated that cell migration enhanced by actin dynamics is a cue to create the sexual dimorphism in POA of the rat brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：シグナル伝達 エストロゲン マイクロアレイ 脳の性分化

1. 研究開始当初の背景

性差による脳の分化は、多くの哺乳類では出生前に完了するが、ラットでは周生期に進むという特徴から、脳の性分化と性ホルモンに関する多くの研究にラットが用いられてきた。しかし、そうした研究は、例えば、性ホルモンの一つであるエストロゲンの影響を電気生理学的あるいは行動学的に研究するか、または出現する現象をよく説明する仮説を提唱する程度にとどまっております。分子レベルでの作用機序の解明は進んでいなかった。また本研究開始に前後して、エストロゲンの作用を模倣し、しかも身近に存在する合成化学物質が、自然界にとって異常な性転換現象を誘引するという報告が出され、エストロゲンと脳の性分化に関する分子レベルでの研究が期待された。ラットの脳の性差に関する研究により、それまでに次の2点が明らかになっていた。

1. 脳の性分化は発生段階特異的である：アロマターゼ仮説では、胎生18日目と出生時の2回、睾丸から出るテストステロンが、脳内で仮想のアロマターゼによりエストロゲンに転換され、この脳内エストロゲン暴露が雄型脳を形成する。この過程は出生後7~10日で完了し不可逆的である。2. 脳の性分化は部位特異的である：内側視索前野の性的二型核部位は雄が約5~7倍大きく、前腹側脳室周囲核部位は雌が約2倍大きい。周生期に雄を去勢、あるいは、雌にテストステロンを投与すると、形態的な雌雄差を変えることができる。

我々は、発生段階特異的かつ造血部位特異的に遺伝子発現をスイッチングするグロビン遺伝子の解析の経験を有し、種々の遺伝子の発現をシス(塩基配列)、トランス(タンパク質結合)そしてクロマチン構造の制御から捉えて研究を行ってきた。ゲノム構築から捉えた遺伝子発現制御の研究からは、発現のスイッチングを起こす遺伝子のゲノ

ム領域ではヌクレオソームの配置に変化が起こること、遺伝子の発現が活性化する前にクロマチン構造に変化が起こること、ゲノム上に折れ曲がりDNA構造が周期的に存在することで遺伝子発現制御因子群の三次元的相互作用が容易になること、などの知見を得た。こうした研究成果を、不均一な細胞集団である脳組織で、かつ、その中でもエストロゲンが細胞集団の大きさを変えろという限られた脳領域の解析に展開し、そこで起こっているゲノム構築を踏まえた遺伝子発現制御とその結果生ずるタンパク質相互作用に基づくシグナル伝達経路の解明を行いたいと考えた。

2. 研究の目的

哺乳類において、生殖をはじめ性に関わる行動や生理的機能を決定する要因は、性染色体による性の決定だけではなく、性ホルモンによって制御される脳の性分化の決定にもある。ラットの脳の性分化においてエストロゲンが鍵因子であることは周知の事実である。しかし、エストロゲンというインプットと脳の特定領域の示す形態的雌雄差というアウトプットが判明しているのみで、その間にどのような機序が動いているのかなど、分子レベルでの解明は十分にはなされていない。本研究では、エストロゲンが誘導する、ゲノム構築を踏まえた遺伝子発現制御と、遺伝子翻訳後のタンパク質相互作用ネットワークのクロストークを検証し、最終的にはエストロゲンによる脳の形態的性分化のメカニズムの解明を目的とした。具体的な達成目標として、(1)形態的雌雄差を示す脳領域におけるエストロゲン応答遺伝子の同定、(2)同定遺伝子のエストロゲンによるタンパク質発現制御と脳局在変動の解析、(3)同定タンパク質を起点とするエストロゲン・シグナル伝達カスケードの解析、(4)エストロゲン環境下

における同定遺伝子のエピジェネティック解析、(5)同定遺伝子の発現抑制による形態的雌雄差の解析、の5点を挙げた。また、本課題に関する分子生物学的実験を困難にしている理由の一つに、実験試料採取の問題(微量、部位認定の困難さ等)があるとし、試料の品質に過度に依存せずにターゲット遺伝子の絞り込みを効率よく行うために、第一段階としてDNAマイクロアレイ解析を導入した。それも一般的な網羅的DNAマイクロアレイ法ではなく、エストロゲン応答遺伝子に集約されたカスタムアレイを用い、少量の試料にて遺伝子の同定、機能分析を迅速に行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 脳の性分化の臨界期にある新生仔期におけるエストロゲン応答遺伝子の探索

1 検体は雌ラットで、出生直後(postnatal day 1: P1)に、 17β -estradiol (E_2)を皮下投与(10 μ g/頭)した群と未処理群に分けた。脳の性分化臨界期にある検体として、生後1日目(P1)、4日目(P5)に断頭し、解剖学的に雌雄差が顕著である視索前野(SDN)の前腹側脳室周囲核(AVPV)領域と視索前野性的二型核(SDN-POA)領域を含む脳切片を採取した。対照検体として脳の性分化が完了した部位を用いるため、10日齢の雌ラットを用い、 E_2 処理群、未処理群に分け、 E_2 暴露時間を同じにすべく、同量の E_2 の皮下投与後から24時間後(P11)と96時間後(P14)に断頭し、目的脳切片を採取した。

2 上述組織から総RNAを調製し、逆転写によりcDNAを作成した後、*in vitro*転写反応によりantisense RNA(aRNA)を作成し、同時に蛍光標識によりCy3-aRNAとCy5-aRNAを調製して、DNAマイクロアレイ解析に供した。DNAマイクロアレイは、ヒト遺伝子解析の結果から得た E_2 応答遺伝子172個をラット遺伝子に置き換えてス

ポットしたものを作成し用いた。

(2) DNAマイクロアレイ解析により選択された遺伝子の発現解析

1 E_2 応答遺伝子を用いた遺伝子発現プロファイリングの結果を確認する為、*real-time* RT-PCRを行った。実験は、独立に3回以上実施した。対照検体(P11, P14)と比較して性分化臨界期に E_2 に対して転写量の変動(活性化あるいは不活性化)を示す遺伝子を選択した。

2 上述1で選択した遺伝子について、 E_2 の有無によるタンパク質量の変化を、ウエスタン・ブロッティング(WB)法にて定量した。実験は独立に3回以上行った。

(3) エストロゲン・シグナル伝達カスケードの検証

上記(2)2の実験により、 E_2 にตอบสนองするタンパク質を特定し、文献等からそのタンパク質を中心としたエストロゲン・シグナル伝達経路を推測し、上・下流に位置するタンパク質について E_2 に対する応答をWB法にて解析した。それらのタンパク質の脳における局在については、Immunohistochemistry (IH)法にて調べた。

4. 研究成果

(1) 前腹側脳室周囲核(AVPV)及び視索前野性的二型核(SDN-POA)を含む領域の E_2 応答遺伝子の発現プロファイリング

E_2 応答遺伝子を迅速に解析するために、Inoue等によって開発された E_2 にตอบสนองするヒト遺伝子をスポットしたカスタムDNAマイクロアレイを、ラット遺伝子に置き換えたものを作成し、培養細胞やラット全脳を用いて再現性などの予備実験を行った後、実験に供した。本アレイには、合計172個の E_2 応答遺伝子がスポットされており、遺伝子発現解析を7つの機能に分けて検討を行った：1)細胞死、2)細胞運動、3)脳神経発達機構、4)3項以外の神経機構、5)細胞成長、周期、分裂、

6) 5項以外の機能、7) 代謝。これらの分類の中で、細胞死(12 遺伝子)と細胞運動(7 遺伝子)に関連する遺伝子群以外は、E₂ に対して明確な応答性を示さなかった。なお、AVPV 領域の遺伝子群は E₂ に対する応答性が顕著ではなく、以後の実験は SDN-POA 領域を対象とした。E₂ 応答性を示した細胞死及び細胞運動関に関連する 19 個の遺伝子について *real-time* RT-PCR 法にて発現定量を行ったところ、14 個の遺伝子が有意な発現変動を示した。

(2) 脳の性分化臨界期に SDN-POA において E₂ 制御を受けるタンパク質

Real-time RT-PCR 法にて同定された 14 個の遺伝子について、E₂ 有無によるタンパク質量の変動について、WB 法を用いて解析を行った。中でも、プロテインキナーゼ C-デルタの遺伝子 (*PKC-δ*) が有意な発現上昇を示した。その発現上昇は P2 に比べ P5 が顕著であったため、以後 P5 を対象とした。*PKC-δ* 遺伝子は、DNA マイクロアレイ法では、細胞死関連遺伝子に分類されていたが、実際は多数の細胞機能に関与している。例えば、神経形成、細胞分化、貪食や細胞運動のような機能である。脳の性分化臨界期に SDN-POA 形成において、*PKC-δ* がどのような機能で関与するのかを調べる為に、*PKC-δ* が関わる種々のシグナル伝達系の代表的タンパク質について E₂ 有無による発現を WB 法により解析した。例えば、*PKC-δ* を介した細胞死関連シグナル伝達系因子である Akt や ERK1/2 タンパク質の発現は E₂ 有無に関係は無かった。そこで、*PKC-δ* の細胞運動機能への関与を想定して、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーについて検討した。Rho ファミリーの主たるタンパク質は、RhoA、Rac1、Cdc42 であるが、Rac1 のみ E₂ の制御を受けており、RhoA は E₂ による遺伝子発現の影響は無く、また興味深いことに、Cdc42 は全く発現してい

なかった。次に、Rac1 の制御を受ける PAK1 について調べたところ、E₂ 存在下では 212 位のスレオニン残基のリン酸化が促進されていることが分かった。また、その部位のリン酸化に関わるサイクリン依存キナーゼ 5 (Cdk5) の発現も E₂ により有意に上昇していた。一方、PAK1 には 6 か所のリン酸化部位があるが、そのうちの 144 位のセリンのリン酸化は E₂ により低下する傾向があり、それとの関連性が、PAK1 による、LIMK1 の 508 位のスレオニン残基のリン酸化が有意に抑制されていた。LIMK2 については全脳では検出されたが、SDN-POA では全く検出されなかった。これより、SDN-POA では、RhoA/ROCK/LIMK2 経路は機能していないことが分かった。LIMK1 の作用をうける下流因子は、アクチン繊維を切断して G モノマーに分解するアクチン脱重合化因子であるコフィリン (cofilin) であることが知られている。LIMK1 におけるリン酸化部位は 1 か所で 3 位のセリンである。E₂ 存在下では LIMK1 のリン酸化が顕著に低下しており、同時に cofilin のリン酸化も低下していた。また、cofilin の脱リン酸化酵素である PDXP の発現は有意に上昇していた。以上の結果を統合すると、脳の性分化臨界期の SDN-POA では、E₂ は cofilin の活性化、つまりアクチンの脱重合化へと導いていることが分かった。

(3) cofilin 及びその関連制御タンパク質の SDN-POA 領域での局在

cofilin は、アクチン・ダイナミックスの制御因子として細胞運動や細胞の形態形成に関与している。E₂ 処理あるいは未処理の P5 雌ラットの SDN-POA を含む脳の切片を用いて、IH 法にてリン酸化 (非活性化) 及び非リン酸化 cofilin (活性化) の局在を観察した。非活性化及び活性化 cofilin は SDN-POA に共局在していることが分かり、SDN-POA では、E₂ の影響下で強力にアク

チン・ダイナミクスが進んでいることが示唆された。また、cofilin の発現に直接関わるタンパク質、LIMK1、PAK1、Cdk5 の発現も、IH 法にて SDN-POA に局在していることが確認された。

(結論) 本研究は、脳の性分化臨界期の SDN-POA において、E₂ によって誘導される E₂ シグナリング・カスケード、PKC-δ/Rac1/PAK1/LIMK1/cofilin カスケード(図 1)を立証した初めての報告であり、結論として、細胞運動が E₂ による性的二型核の形成要因であることが明らかになった。今後の展開としては、本 E₂ シグナリング・カスケードを阻害した場合、SDN-POA 形成細胞の動きはどうか、形態的雌雄差にどのような変化が生じるか、等が研究課題になると考えている。

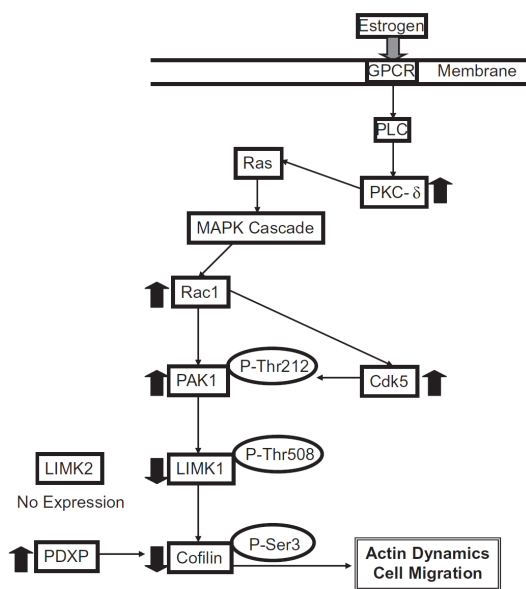


図 1 . E₂ シグナル伝達カスケード

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 3 件)

1 Wada-Kiyama Y., Suzuki C., Hamada T., Rai D., Kiyama R., Kaneda M., Sakuma Y.: Estrogen-induced cell signaling in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area: potential involvement of cofilin in actin dynamics for cell

migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 査読有, vol. 434, 2013, pp.287-292, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.117>

2 Rai D., Ishii T., Imada H., Wada-Kiyama Y., Kiyama R., Miyachi E., Kaneda M.: Distribution and development of P2Y₁-purinoceptors in the mouse retina. **J. Molecular Histology**, 査読有, vol. 44, 2013, pp.639-644, doi.10.1007/s10735-013-9525-4

3 Kiyama R. and Wada-Kiyama Y.: A conserved regulatory element in the mammalian β-globin promoters. **J. Molecular Evolution**, 査読有, vol. 73, 2011, pp.101-108. doi.10.1007/s00239-011-9459-y

[学会発表](計 6 件)

1 Wada-Kiyama Y., Suzuki C., Hamada T., Kiyama R., Sakuma Y.: Actin dynamics in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area during the critical periods. 第 89 回日本生理学学会大会、2012 年 3 月、長野県

2 Wada-Kiyama Y., Suzuki C., Hamada T., Kiyama R., Sakuma Y.: Signaling of estrogen to actin dynamics via cofilin controls sexually dimorphic formation of the rat preoptic area. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、神奈川県横浜

3 Wada-Kiyama Y., Suzuki C., Hamada T., Kiyama R., Sakuma Y.: Estradiol-induced phosphorylation status of cofilin cascade and the establishment of the male-phenotype of the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2011 年 11 月、USA.

4 Kawashima M., Kamijyo K., Suzuki C., Hamada T., Kiyama R., Wada-Kiyama Y., Sakuma Y.: Actin dynamics involved in sexual dimorphism of the preoptic area in the rat brain by estrogen. US-JAPAN Brain Research Cooperative Program Workshop on Prosocial Behavior at Emory University. 2011 年、10 月、USA

5 Suzuki C., Hamada T., Kiyama R., Sakuma Y., Wada-Kiyama Y.: Estradiol-induced signaling involved in the sexual differentiation of the rat preoptic area. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月、兵庫県神戸

6 Wada-Kiyama Y., Suzuki C., Hamada T., Kiyama R., Sakuma Y.: Estrogen-responsive genes in the preoptic area of the female rat during the critical period for sexual differentiation of the brain. 第 87 回日本生理学学会大会、2010 年 3 月、岩手県

〔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 0 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.h-ic.664u.ne.jp/~seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木山 裕子(キヤマ ユウコ)
研究者番号：60234390

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

木山 亮一(キヤマ リョウ
イチ)
研究者番号： 00240739