

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 2 5 年 5 月 2 0 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590273
 研究課題名（和文） エンハンセオソーム解析を通じたライディッヒ細胞の分化・機能発現機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism underlying differentiation and function of Leydig cells through identification of enhanceosome.
 研究代表者
 馬場 崇 (BABA TAKASHI)
 九州大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：40435524

研究成果の概要（和文）：ライディッヒ細胞における *Ad4BP/SF-1* 遺伝子の発現制御機構の解析を行った結果、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の発現は *Ad4BP/SF-1* 自身により制御されることが明らかとなった。さらに *Ad4BP/SF-1* の結合領域のゲノムワイドな同定を行った結果、*Ad4BP/SF-1* はこれまでに知られている標的遺伝子座に加え、解糖系に関与する遺伝子座に結合していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：I investigated the mechanism of the transcriptional regulation of *Ad4BP/SF-1* gene in Leydig cells. As a result, it was revealed that the expression of *Ad4BP/SF-1* gene is regulated by *Ad4BP/SF-1* itself. Further, I elucidated through a genome-wide analysis of target genes of *Ad4BP/SF-1* that genes involved in the glycolytic pathway were targets of *Ad4BP/SF-1*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：核内受容体、エネルギーホメオスタシス、レギュロン

1. 研究開始当初の背景

(1) ステロイドホルモンは副腎皮質および生殖腺（精巣・卵巣）で産生されるが、これら全ての組織のステロイド産生細胞の発生には *Ad4BP/SF-1* が必要であることが遺伝子破壊マウスを用いた研究から明らかにされている。また分化後の細胞においても、*Ad4BP/SF-1* は転写因子としてステロイド産

生に関与する遺伝子の発現を制御することにより、ステロイド産生細胞の機能発現に必須の役割を果たしている。

(2) このような *Ad4BP/SF-1* の機能の重要性から、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子発現制御領域の解析が行われてきた。研究代表者が所属する研究グループでは、比

較ゲノム解析の視点から、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子座の塩基配列を動物種間で比較し、高度に保存されている非翻訳配列こそがエンハンサーであると推測し、そのような領域の機能解析を行った。その結果、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の組織特異的エンハンサーを相次いで同定することに成功している。

(3) ステロイド産生細胞の分化および機能発現に *Ad4BP/SF-1* が必須であること、およびステロイド産生細胞における *Ad4BP/SF-1* 遺伝子の発現が、組織特異的エンハンサーによって制御されていることの2点を考え合わせると、ステロイド産生細胞に分化誘導や機能発現を指示するシグナルは、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子のエンハンサーを介して細胞に伝達されていると考えることができる。実際、ある種の細胞増殖因子のシグナルが細胞分化に、内分泌因子のシグナルがステロイドホルモン産生に関与していることが示されているが、おそらくこれらの因子からの刺激は、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子のエンハンサーを介して細胞に伝達されているはずである。そこで研究代表者たちは、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の組織特異的エンハンサーを介した発現制御機構の解析を通じ、ステロイド産生細胞の細胞分化および機能発現を制御する機構を明らかにすることが可能である、と考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、精子形成・脳の性分化・骨形成など重要な生命現象に必須である雄性ステロイドホルモン（テストステロン）の産生細胞であるという観点から、ステロイド産生細胞の中でも特に、ライディッヒ細胞に焦点を当てる。そして、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子のライディッヒ細胞特異的エンハンサーおよびエンハンセオソームの同定を通じ、ライディッヒ細胞の細胞分化および機能発現を制御する分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究の目的は、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の組織特異的エンハンサーの機能解析を通じて、ライディッヒ細胞の分化および機能発現機構を理解することである。組織特異的エンハンサーの候補領域の選定には、比較ゲノム解析とクロマチン構造という2つの視点からアプローチする。まず、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子座内の、種の進化の過程で高度に塩基配列が保存されている領域（約30カ所）に関して、そのすべての領域のクロマチン構造をクロマチン免疫沈降法（ChIP法）により明らかにする。このクロマチン免疫沈降の結果を受けて、トランスジェニックマウスの作製を通じて *in vivo* でエンハンサー候補領域の機能解析を

行い、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子のライディッヒ細胞特異的エンハンサーを明らかにする。その後、ライディッヒ細胞特異的エンハンサーに結合する蛋白質複合体（エンハンセオソーム）を同定することにより、エンハンサーが受容するシグナル、すなわちライディッヒ細胞の分化および機能発現機構の分子的な実体を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ライディッヒ細胞の単離

ライディッヒ細胞における *Ad4BP/SF-1* 遺伝子の発現制御機構を解明するために、まずライディッヒ細胞の単離を試みた。当初計画ではライディッヒ細胞において特異的な緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する遺伝子改変（Tg）マウスを作成し、セルソーティングによりライディッヒ細胞を単離することとしていた。ところが、ライディッヒ細胞に特異的な発現を示す *Star* (Steroidogenic acute regulatory protein), *Cyp11a1* (Cytochrome P450 11a1), *Cyp17a1* (Cytochrome P450 17a1), *Ddx25* (DEAD box helicase) 遺伝子の発現制御下にGFPを発現するTgマウスを作成したところ、Leydig細胞にGFPの発現を示すものの、その発現レベルはセルソーティングを行うには不足であった。

そこで、セルソーティングによる細胞分取の代替法として、パーコール密度勾配遠心法によるライディッヒ細胞の分離を行った。その結果、90%以上の純度でライディッヒ細胞を単離することに成功した（図1）。

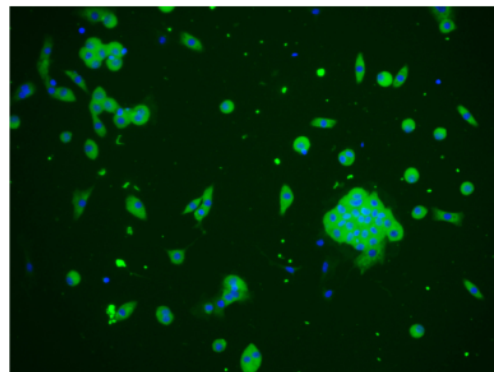


図1. 成獣マウスより単離したライディッヒ細胞

青：DAPI（核）

緑：Luteinizing hormone receptor

(2) エンハンサーの同定

上記で単離したライディッヒ細胞を用いて、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子のライディッヒ細胞特異的エンハンサーの同定を試みた。エンハンサーの同定は、近年同定されたエンハ

ンサーマークとなるヒストン修飾 (H3K27Ac, ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のアセチル化) を指標として行った。H3K27Ac を特異的に認識する抗体を用いて ChIP-seq を行うことにより、ゲノムワイドにエンハンサー候補領域の同定を行った。これらの中で特に *Ad4BP/SF-1* 遺伝子の発現制御に関与している可能性のあるものに着目したところ、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の上流領域に、エンハンサー候補領域を同定することが出来た。そのエンハンサー候補領域の塩基配列を他の生物種と比較したところ、非常に興味深いことに、*Ad4BP/SF-1* 自身の結合配列が生物の進化の過程で保存されていることが分かった。このことから、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子は、*Ad4BP/SF-1* 自身により制御されている可能性が示唆された。そこで、この可能性を検証するために、*Ad4BP/SF-1* を特異的に認識する抗体を用いた ChIP-seq を行った。その結果、期待どおり、ライディッシュ細胞において、*Ad4BP/SF-1* は *Ad4BP/SF-1* 遺伝子の上流領域に結合していることが明らかとなった。

(3) *Ad4BP/SF-1* の標的遺伝子群 (レギュロン) の同定

上記の *Ad4BP/SF-1* 抗体を用いた ChIP-seq により、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子以外の *Ad4BP/SF-1* の標的遺伝子が同定された。意外なことに、*Ad4BP/SF-1* は解糖系に関する多くの遺伝子座に結合していることが分かった。*Ad4BP/SF-1* は生殖腺や副腎皮質のステロイド産生細胞に特異的な発現を示す転写因子である。このような組織特異的な転写因子が、ハウスキーピングな解糖系遺伝子群の発現制御に関わっているという可能性は非常に興味深いものであった。そこで、実際に *Ad4BP/SF-1* が解糖系遺伝子群の発現制御に関与していることを明らかにするために、*Ad4BP/SF-1* のノックダウンを行った。その結果、一連の解糖系遺伝子群の発現が一様に低下することが分かった。以上の結果より、解糖系を構築する遺伝子群は *Ad4BP/SF-1* によって統括的に制御されている、すなわち *Ad4BP/SF-1* の「レギュロン」であることが明らかとなった (図 2)。

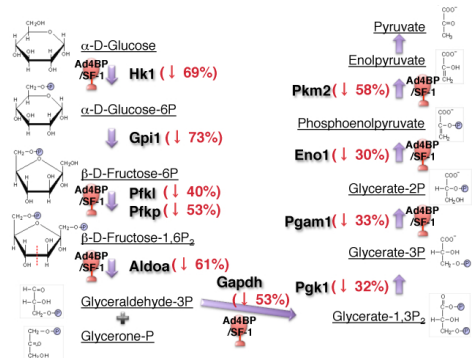


図 2. 解糖系遺伝子群は *Ad4BP/SF-1* レギュロンである

さらに、*Ad4BP/SF-1* が解糖系遺伝子群の発現制御を通じて解糖系の活性を制御していることを示すため、*Ad4BP/SF-1* ノックダウンの 1) グルコース取り込み、2) 解糖系中間代謝産物産生、および 3) 細胞外への乳酸分泌への影響を検討した。その結果、上記 1)-3) はいずれも *Ad4BP/SF-1* ノックダウンによって顕著な抑制を受けた。以上より、*Ad4BP/SF-1* は解糖系遺伝子群の発現制御を通じて解糖系の活性を制御していることが明らかとなった。

(4) *Ad4BP/SF-1* レギュロンによる効率的なバイオマス利用を介した代謝制御

これまでに、コレステロールからステロイドホルモンまでの代謝過程に関与する遺伝子群が *Ad4BP/SF-1* のレギュロンとして同定されていた。今回新たに、グルコースからアセチル CoA までの代謝過程 (解糖系) に関する遺伝子群が *Ad4BP/SF-1* のレギュロンであることが明らかとなった。*Ad4BP/SF-1* が組織特異的な細胞機能であるステロイドホルモン産生とハウスキーピングな解糖系を同時に制御することの意味はなんだろうか? ステロイドホルモン産生の第 1 ステップ (コレステロールからプレグネノロンへの代謝) には電子供与体である NADPH が必要である。NADPH は細胞内では主にグルコース代謝 (ペントースリン酸回路) で産生されることが分かっている。また、ステロイドホルモン産生のスタート材料となるコレステロールの合成には ATP が必要であるが、解糖系は ATP の産生に密接に関連している。

以上のように *Ad4BP/SF-1* はその発現細胞における高エネルギーバイオマス (ATP や NADPH) の供給系と同時に産生系を制御することにより、効率的なバイオマスの利用を加納にしていると考えられる (図 3)。

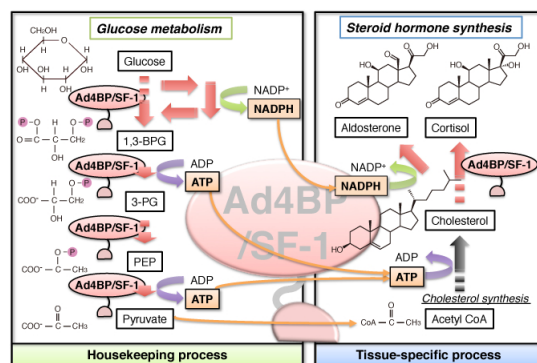


図 3. *Ad4BP/SF-1* によるバイオマスの供給・消費系の統括的な制御

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 6 件)

- ① Steroid hormone and the development of reproductive organs
K. Morohashi, T. Baba, M. Tanaka
Sex. Dev. **7**, 61-79, 2013
査読無
- ② Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes
Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K, Morohashi K.
Mol. Endocrinol. **27**, 63-73, 2013
査読有
- ③ Identification of an enhancer in the Ad4BP/SF-1 gene specific for fetal Leydig cells.
Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Oka S, Zubair M, Morohashi K.
Endocrinology **153**, 417-425, 2012
査読有
- ④ Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice
Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T, Shima Y, Kidokoro T, Kanai Y, Schedl A, Wilhelm D, Koopman P, Okuno Y, Morohashi K.
Endocrinology **153**, 913-924, 2012
査読有
- ⑤ Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner.
Nohara K, Baba T, Murai H, Kobayashi Y, Suzuki T, Tateichi Y, Matsumoto M, Nishimura N, Sano T.
Arch. Toxicol. **85**, 653-661, 2011
査読有
- ⑥ Abnormal epithelial cell polarity and migration of Emx2 KO embryonic gonads induced by ectopic EGFR expression.
Masatomo Kusaka, Yuko

Katoh-Fukui, Hidesato Ogawa, Kanako Miyabayashi, Takashi Baba, Yuichi Shima, Noriyuki Sugiyama, Yukihiko Sugimoto, Yasushi Okuno, Ryuji Kodama, Akiko Iizuka-Kogo, Takeo Senda, Toshikuni Sasaoka, Kunio Kitamura, Shinichi Aizawa, Ken-ichirou Morohashi.
Endocrinology **151**, 5893-5904, 2010
査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Deep sequencing から見えてきた Ad4BP/SF-1 の多才性: グルコース代謝の組織特異的制御
馬場崇
第 5 回核内受容体・ホルモン研究会
霞が関コモンゲート西館
2013 年 3 月 15 日
- ② 組織特異的転写因子 Ad4BP/SF-1 による解糖系遺伝子群の転写を介したグルコース代謝制御
馬場崇
第 35 回日本分子生物学会年会
福岡国際会議場
2013 年 12 月 11 日-14 日
- ③ Identification of Ad4BP/SF-1 target genes by mRNA-seq and CHIP-seq in Y-1 adrenocortical cells
Takashi Baba
6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination
King Kamehameha's Kona Beach Hotel, KONA, HAWAII
2012 年 4 月 23 日-27 日
- ④ 核内受容体 Ad4BP/SF-1 の副腎皮質における新たな機能
馬場崇
第 85 回日本内分泌学会学術総会
名古屋国際会議場
2012 年 4 月 19 日-21 日
- ⑤ Identification of Ad4BP/SF-1 target genes by CHIP-seq in Y-1 adrenocortical cells
馬場崇
第 34 回日本分子生物学会年会
パシフィコ横浜
2011 年 12 月 16 日

- ⑥ RNA-seq および ChIP-seq 法による
Ad4BP/SF-1 標的遺伝子の同定
馬場崇
第4回性差生物医学研究会
山口大学医学部霜仁会館
2011年11月21日

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 崇 (TAKASHI BABA)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：40435524