

## 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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790229

研究課題名（和文） 神経系における核外エストロゲン受容体を介したエストロゲン急性作用機構の解明

研究課題名（英文） Characterization of extra-nuclear estrogen receptors in the central nervous system.

研究代表者

石井 寛高 (Ishii Hirotaka)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20445810

研究成果の概要（和文）：本研究は、神経系におけるエストロゲン急性効果の分子機構を明らかにすべく、エストロゲン急性効果を媒介すると予測される核外エストロゲン受容体様タンパク質の解析と同定を行うことを目的とした。ヒト・マウス・ラットエストロゲン受容体 $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )遺伝子構造の再解析を行ったところ、従来報告されていた以上に ER $\alpha$ 遺伝子構造は複雑であり、5'-非翻訳領域、イントロン領域、3'-非翻訳領域に多数の新規なプロモーター、中間エクソンや終末エクソンが存在していることを明らかにした。そして、選択的なプロモーター使用と選択的スプライシングにより多数の ER $\alpha$  mRNA バリエントが生成されることが判明した。さらに、それら ER $\alpha$ バリエントの細胞内局在や機能を解析したところ、野生型 ER $\alpha$ と異なる多様な機能を持つことが判明した。

研究成果の概要（英文）：This research was planned to characterize extra-nuclear estrogen receptors that mediate non-genomic effects of estrogens in the central nervous system. The genomic organization of human, mouse, and rat estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) genes was re-examined. The analysis revealed more complicated genomic structures of the ER $\alpha$  genes and localization of novel promoters and exons in the 5'-, intronic and 3'-regions of the genes. Furthermore, the analysis demonstrated that alternative promoter usage and alternative splicing generated numerous mRNA variants that encoded N-terminally- and C-terminally-truncated estrogen receptors. The variant proteins exhibited distinct functional properties and cellular localization compared with those of the wild-type ER $\alpha$  proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

科研費の分科・細目：生殖生理学

キーワード：生殖生理学、神経内分泌学、生物物理学、ホルモン、ステロイド、エストロゲン、エストロゲン受容体、脳ニューロステロイド

1. 研究開始当初の背景

| 記憶学習の中枢である脳海馬では、女性ホ

ルモンであるエストロゲンがコレステロールを基質として神経細胞で合成されている。そして、その合成されたエストロゲンが自己・傍分泌様に放出され神経細胞に作用する。海馬ではエストロゲンが急性的に神経細胞へ作用し、スパイン密度、樹状突起の形態や神経情報伝達の変化を引き起こす。

この急性的なエストロゲン作用は、薬理的解析や免疫組織化学染色法の結果から核外に存在するエストロゲン受容体様のタンパク質を介して引き起こされることが予測されていた。しかし、そのエストロゲン受容体様タンパク質の詳細な実体は解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

神経系においてエストロゲンは急性的に作用し神経細胞の活動性を調節することが判明しているが、エストロゲンの急性効果を媒介する受容体は解明されておらず、エストロゲン急性効果の分子機構を妨げる要因となっていた。これまでの研究から、核外に存在するエストロゲン受容体様のタンパク質が候補として挙がっていたが、その詳細な実体は未解明のままであった。

それゆえ、本研究では神経系におけるエストロゲン急性効果の分子機構を明らかにすべく、そのエストロゲン受容体様タンパク質の解析と同定を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

エストロゲン受容体は、多数のプロモーターによって発現が制御される多重プロモーターシステムを持ち、さらに、選択的スプライシングをうけ、多数のスプライスバリエントが生じることが報告されている。核外エストロゲン受容体様タンパク質が様々なエストロゲン受容体バリエントの1つである可能性を考慮し、エストロゲン受容体

（estrogen receptor, ER）のスプライスバリエントの解析を行った。その過程で多数の新規配列を保持するバリエントが同定され、それが ER 遺伝子の新規エクソンであったことから、本研究ではまず、ヒト・マウス・ラット ER 遺伝子構造の再解析を行うこととした。

ヒト・マウス・ラット ERα 遺伝子の転写産物の構造を解析するため 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End)、3'-RACE および RT-PCR 法を行った。そして、クローニングされた新規配列をヒト・マウス・ラットゲノムに対応させることでヒト・マウス・ラット ER 遺伝子構造を解析した。

同定された ER mRNA バリエントの細胞内局在や機能を明らかにするため、動物発現用

ベクターに ER バリエントを組み込み、トランスフェクション法により動物細胞に導入した。細胞内局在は免疫細胞化学染色法により、機能はレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した。

## 4. 研究成果

エストロゲンの急性作用を担う核外エストロゲン受容体のさらなる探索のため、ヒト・マウス・ラット ER 遺伝子構造の再検討を行った。その結果、従来知られていた遺伝子構造よりも、それらの構造ははるかに複雑であることが判明した。ヒト・マウス・ラット ER 遺伝子の 5'-非翻訳領域、イントロン領域、3'-非翻訳領域には多数の新規エクソンが存在しており、それらエクソンを選択的に使用することで数多くの ER バリエントが産生されることを発見した。ER 遺伝子は多数のプロモーターによって転写が制御される多重プロモーターシステムを持つ。遺伝子の 5'-領域以外にもプロモーターが存在しており、特にイントロン領域に存在するプロモーターにより、N末端欠損型の ER バリエントが生成されることを明らかにした。このイントロニックプロモーターによって生じるバリエントは、免疫細胞化学染色法の結果、核外での局在が観察された。また、それらバリエントの中には下垂体特異的・脳特異的な発現を示すものもあり、組織特異的な制御を受けていることが示唆された。さらにイントロン領域に存在する新規中間エクソン・終末エクソンの選択的使用により、C末端欠損型 ER バリエントが生じ、バリエントの一部はリガンド非依存的に活性化することが判明した。C末端欠損型 ER バリエントは主に核内の局在を示したが、一部のバリエントでは弱いながら核外での局在も観察された。また、急性効果を担う受容体候補として従来からエクソン1が欠損することによって生じるN末端欠損型 ER バリエントが知られていたが、このバリエントをコードする多数の新規mRNAバリエントをヒトの中枢神経系を含む多数の組織で発見した。

記憶・学習の中枢である脳海馬では女性ホルモンであるエストロゲンといった性ステロイドホルモンを神経細胞が合成することを示していたが、さらにストレスステロイドホルモンであるグルココルチコイドも合成することを発見し、性ステロイドホルモン・ストレスステロイドホルモンが、自己・傍分泌様に分泌され急性的に神経細胞に作用し、神経情報伝達を調節することを示した。その際、エストロゲンの急性作用を媒介する受容体は、核外に存在する従来型の ER または ER 様の

タンパク質であることが示唆された。

#### 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 10 件)

(英語論文 9 件、和文論文 1 件)

英語論文

1. Ishii H, Kobayashi M, Munetomo A, Miyamoto T, Sakuma Y. (2013) Novel splicing events and post-transcriptional regulation of human estrogen receptor  $\alpha$  E isoforms. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 133: 120-128. (査読有)  
doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.027.

2. Koyama M, Yin C, Ishii H, Sakuma Y, Kato M. (2012) Somatostatin inhibition of GnRH neuronal activity and the morphological relationship between GnRH and somatostatin neurons in rats." *Endocrinology*, 153: 806-814. (査読有)  
doi: 10.1210/en.2011-1374.

3. Higo S, Hojo Y, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ooishi Y, Murakami G, Mukai H, Yamazaki T, Nakahara D, Barron A, Kimoto T, Kawato S. (2012) Endogenous synthesis of corticosteroids in the hippocampus." *PLoS One*, 6: e21631. (査読有)  
doi: 10.1371/journal.pone.0021631.

4. Ishii H, Sakuma Y. (2011) Complex organization of the 5'-untranslated region of the mouse estrogen receptor alpha gene: identification of numerous mRNA transcripts with distinct 5'-ends. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125: 211-218. (査読有)  
doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.004.

5. Ishii H, Shoda Y, Yomogida K, Hamada T, Sakuma Y. (2011) Identification of C-terminally and N-terminally truncated estrogen receptor alpha variants in the mouse. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 124: 38-46. (査読有)  
doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.01.003.

6. Hojo Y, Higo S, Kawato S, Hatanaka Y, Ooishi Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Kimoto T. (2011) Hippocampal synthesis of sex steroids and

corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity. *Frontiers in Endocrinology*, 2: 43. (査読有)  
doi: 10.3389/fendo.2011.00043.

7. Kobayashi M, Ishii H, Sakuma Y. (2011) Identification of novel splicing events and post-transcriptional regulation of human estrogen receptor alpha F isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 333: 55-61. (査読有)  
doi: 10.1016/j.mce.2010.12.003.

8. Kimoto T, Ishii H, Higo S, Hojo Y, Kawato S. (2010) Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology*, 151: 5795-5806. (査読有)  
doi: 10.1210/en.2010-0581.

9. Tanaka N, Ishii H, Yin C, Koyama M, Sakuma Y, Kato M. (2010) Voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel mRNAs and T-type  $Ca^{2+}$  currents in rat gonadotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Physiological Sciences*, 60: 195-204. (査読有)  
doi: 10.1007/s12576-010-0085-z.

和文論文

1. 濱田知宏、石井寛高、佐久間康夫

「中枢神経系における性差科学の現状」

*ファルマシア* (2011) 47(3):213-217 (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

(国際学会: シンポジウム 1 件、一般講演 3 件、国内学会: シンポジウム 2 件、一般講演 15 件)

国際学会

(シンポジウム)

1. ○石井寛高、小林桃子、棟朝亜理紗、梶尾円香、濱田知宏、佐久間康夫「Complex organization of the estrogen receptor alpha genes: identification of numerous estrogen receptor alpha variants in the human, mouse, and rat」The 7th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Congress、マレーシア、2012 年 3 月

(一般講演)

1. ○河東堤子、石井寛高、棟朝亜理紗、濱田知宏、佐久間康夫「Identification of truncated estrogen receptor alpha variants in the mouse」Japan-US Joint Workshop - Workshop on the Biology of Prosocial Behavior、アメリカ、2010年10月

2. ○庄田有里、石井寛高、小林桃子、蓬田健太郎、濱田知宏、佐久間康夫「Alternative promoter usage and alternative splicing of the mouse estrogen receptor alpha gene generate numerous mRNA variants.」The 7th International Congress of Neuroendocrinology、フランス、2010年7月

3. ○尹成珠、石井寛高、佐久間康夫、加藤昌克「GABA<sub>A</sub> receptors in rat GnRH neurons are composed of alpha2, beta3, gamma1-2, and epsilon subunits.」The 7th International Congress of Neuroendocrinology、フランス、2010年7月

国内学会  
(シンポジウム)

1. ○石井寛高、小林桃子、佐久間康夫「選択的プロモーターと選択的スプライシングにより生じる多様なエストロゲン受容体 alpha 変異体」第87回日本生理学会大会、2010年5月

2. ○尹成珠、石井寛高、田中伸幸、加藤昌克、佐久間康夫「ニューロステロイドは、ラット性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンのA型 gamma-アミノ酪酸受容体電流を増強する」第87回日本生理学会大会、2010年5月

(一般講演)

1. ○石井寛高、尹成珠、棟朝亜理紗、梶尾円香、加藤昌克、宮本武典、小澤一史、佐久間康夫「ラット GnRH ニューロンおよび GT1-7 細胞における GABA 受容体の発現・機能解析」第90回日本生理学会大会、東京、2013年3月

2. ○石井寛高、尹成珠、梶尾円香、棟朝亜理紗、加藤昌克、宮本武典、佐久間康夫「ラット GnRH ニューロン及び GT1-7 細胞株に発現する GABA 受容体の発現解析」第39回日本神経内分泌学会学術集会、北九州、2012年9月

3. ○尹成珠、石井寛高、佐久間康夫、加藤昌克「ラット GnRH ニューロンの緩徐後過分極は SK チャンネルと KCNQ チャンネルの活性化により惹起される」第39回日本神経内分泌学

会学術集会、北九州、2012年9月

4. ○石井寛高、尹成珠、加藤昌克、佐久間康夫「ラット GnRH ニューロンに発現する GABA 受容体の発現解析」日本下垂体研究会第27回学術集会、山形、2012年8月

5. ○棟朝亜理紗、梶尾円香、石井寛高、加藤昌克、宮本武典、佐久間康夫「GT1-7 細胞に発現する GABA 受容体の発現機能解析」日本下垂体研究会第27回学術集会、山形、2012年8月

6. ○家田菜穂子、上野山賀久、山本恵理、岡良隆、杉原稔、小野幸輝、諏訪牧子、石井寛高、加藤昌克、尹成珠、佐久間康夫、前多敬一郎、束村博子「ガラニン受容体を介したキスペプチン誘導性黄体形成ホルモン分泌の抑制的調節機構」第9回GPCR研究会、東京、2012年5月

7. ○石井寛高、棟朝亜理紗、濱田知宏、佐久間康夫「ヒト、マウス及びラットにおける C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha の同定」第89回日本生理学会大会、2012年3月

8. ○尹成珠、石井寛高、加藤昌克、佐久間康夫「ラット GnRH ニューロンの sAHP 電流は SK チャンネルと KCNQX チャンネルの活性化で起こる」第89回日本生理学会大会、2012年3月

9. ○石井寛高、濱田知宏、佐久間康夫「ヒト C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha の同定と機能解析」第38回日本神経内分泌学会学術集会、2011年11月

10. ○小山麻希子、尹成珠、石井寛高、加藤昌克、佐久間康夫「終板器官における性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンとソマトスタチンニューロンの形態学的関係と生理学的意義」第34回日本神経科学学会大会、2011年9月

11. ○石井寛高、濱田知宏、佐久間康夫「ラット N 末端欠損型・C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha の同定と機能解析」日本下垂体研究会第26回学術集会、2011年8月

12. ○河東堤子、石井寛高、棟朝亜理紗、濱田知宏、佐久間康夫「マウスにおける新規 C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha の同定と機能解析」日本下垂体研究会第26回学術集会、2011年8月

13. ○尹成珠、石井寛高、加藤昌克、佐久間康夫「ラット GnRH ニューロンに発現する A

型 GABA 受容体 (GABAAR) のサブユニット構成」第 37 回日本神経内分泌学会学術集会、2010 年 10 月

14. ○石井寛高、庄田有里、濱田知宏、佐久間康夫「イントロン領域で同定された新規エクソンにより、N 末端・C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha 変異体が形成される。」第 37 回日本神経内分泌学会学術集会、2010 年 10 月

15. ○石井寛高、庄田有里、濱田知宏、佐久間康夫「マウスエストロゲン受容体 alpha の新規 N 末端・C 末端欠損型変異体の同定」日本下垂体研究会第 25 回学術集会、2010 年 8 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.h-ic.bb4u.ne.jp/~seiri/>

<http://www.nms.ac.jp/nms/kaibou2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 寛高 (Ishii Hirotaka)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20446810

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし