様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　１０　日現在

機関番号：　１７１０２
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2014～2015
課題番号：　２６６７０１４５

研究課題名（和文）性行動を司る視床下部腹内側核内転写ネットワークの解明

研究課題名（英文）Analyses of gene regulatory network in VMH underlying female sexual behavior

研究代表者
嶋　雄一（Shima, Yuichi）

九州大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：８０４２５４２０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：視床下部腹内側核（Ventromedial Hypothalamic Nucleus, VMH）は雌の性行動の中枢として知られている。一方、Ad4BP/SF-1はVMHに発現する転写因子である。VMHにおけるAd4BP/SF-1の発現抑制により、雌の性行動が消失することから、本因子はVMHにおいて遺伝子発現ネットワークを制御することにより、雌の性行動を制御していると予想される。そこで本研究では、VMHにおけるAd4BP/SF-1の標的遺伝子を同定することにより、雌の性行動を司る分子メカニズムの解明を試みた。

研究成果の概要（英文）：The ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH) is well known as a center for female sexual behavior, and Ad4BP/SF-1 is a transcription factor expressed in VMH. Ad4BP/SF-1 gene disruption in the VMH resulted in disappearance of lordosis, representative female sexual behavior, suggesting that gene regulatory networks regulated by Ad4BP/SF-1 in VMH is essential for female sexual behavior. In this project, we attempted to identify target genes of Ad4BP/SF-1 in VMH, and thereby clarify the molecular machinery underlying female sexual behavior.

研究分野：　分子生物学

キーワード：　視床下部　性行動　転写

１．研究開始当初の背景

生殖行動を含む性行動は、動物の種の保存にとって不可欠な重要な行動であり、雌雄で全く異なる行動をとる点が、他の行動とは異なる最大の特徴である。このような性行動の原理を神経細胞における分子の動きとして理解することは、生物学的に重要かつ興味深い課題であるが、未だ十分な解明にはいたっていないのが現状である。古典的な神経核破壊実験の結果、視床下部腹内側核（Ventromedial Hypothalamic Nucleus, VMH）を破壊すると、げっ歯類の雌の性行動の一つである lordosis が消失することから、**VMH** が雌の性行動の中枢であることが明らかにされている。また、VMH には核内受容体型の転写因子 Ad4BP/SF-1 が発現しており、VMH 特異的に Ad4BP/SF-1 遺伝子を破壊すると、雄の性行動には全く異常が認められない一方で、雌の性行動が消失する。この結果から、**VMH** において、**Ad4BP/SF-1** が遺伝子の転写調節を介して雌の性行動を制御すると考えられたが、**VMH** における **Ad4BP/SF-1** の標的遺伝子は全く明らかにされていない。

我々はこれまでに、Ad4BP/SF-1 遺伝子の VMH 特異的発現調節領域を同定した（Shima Y, *et al.*, Mol Endocrinol, 2005）ことから、このエンハンサーを用いることにより、メスの性行動を制御する遺伝子転写ネットワークの一端を明らかにできるとの着想に至った。

２．研究の目的

本研究計画では、メスの性行動を制御する遺伝子発現ネットワーク解明を目的とした。この研究目標達成のために、以下の二つの解析を計画した。

（1）　VMH ニューロンを EGFP で標識し、ソーティングによってニューロンを回収し、遺伝子発現解析を行うことにより、雌雄の VMH ニューロンの機能に雌雄差があるか否かを検討する。

（2）　Cre-loxP 系を用いた新規のクロマチン免疫沈降法を開発し、次世代シークエンサーを用いた解析を行うことにより、メスの性行動を制御する Ad4BP/SF-1 を中心とした遺伝子転写ネットワークを明らかにする。

３．研究の方法

本研究では、上記の目的達成のために、それぞれ下記のような実験を計画した。

（1）　我々は過去の研究により、核内受容体型転写因子をコードする Ad4BP/SF-1 遺伝子の VMH 特異的エンハンサーを同定していた（Shima Y, *et al.*, Mol Endocrinol, 2005）。さらに、このエンハンサーを用い、VMH 特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスの作出していた。そこで、このマウスを、我々が譲渡を受け維持していた CAG-CAT-EGFP マウス（Kawamoto S, *et al.*, FEBS Lett., 2000）と交配することによって VMH ニューロンを特異的に EGFP 標識し、視床下部組織から VMH ニューロンのみをソーティングによって分取することを計画した。分取した細胞から total RNA を抽出し、次世代シークエンサーを用いた mRNA-sequence により遺伝子発現プロファイルを明らかにする。雌雄の **VMH** ニューロンにおける遺伝子発現プロファイルを比較することにより、**VMH** ニューロンの機能に雌雄差があるか否かを検討する。

（2）　VMH ニューロンから、Ad4BP/SF-1 の標的となる DNA 断片を効率良く回収するために、Ad4tag-ChIP-sequence 解析の開発を試みる。マウス Ad4BP/SF-1 遺伝子の最終エクソン（第 7 エクソン）を loxP 配列で挟み、その下流に HA タグ配列を付加した第 7 エクソンを挿入するようにターゲティングベクターをデザインし、コンベンショナルな相同組換えを利用したノックインにより Ad4tag マウスを作出する。Ad4tag マウスと VMH 特異的 Cre マウスを交配し、*Cre*(+);*Ad4BP/SF-1*$^{HA/HA}$ マウスを得る。このマウスにおいては、VMH 特異的に HA-Ad4BP/SF-1 が発現する。これらのマウスの視床下部を採取し、組織全体をホモジナイズすることにより核を調製する。調製した核は直ちにホルマリンを用いてクロスリンクする。クロスリンクした核をソニケーションまたは MNase 処理することによりクロマチンを断片化し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降に供する。溶出・精製した DNA からライブラリを作成し、HiSeq を用いたシークエンスに供する。雌雄それぞれの Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子（ピークの最も近傍の遺伝子）の GO 解析など、各ピークのアノーテーション付けを行う。この際、mRNA-sequence 解析によって得られた遺伝子発現の情報も参考とする。また、モチーフ解析により、雌雄それぞれのピークの近傍に、性特異的な特徴的なモチーフが存在しないかを検討する。以上の解析により、VMH における Ad4BP/SF-1 による転写制御の全体像を明らかにする。

４．研究成果

（1）　VMH 特異的 Cre マウスと CAG-CAT-EGFP マウスを交配することにより、VMH ニューロンが EGFP で標識されたマウスを作出することに成功した。そこで、このマウスを用いて、VMH ニューロンを回収することを

試みた。しかしながら、脳組織からニューロンを分散させるための酵素反応の条件検討に時間を要した。そこで、生理学研究所の箕越靖彦教授の研究室でニューロンの分散方法を習得し、EGFP 発現マウスに対して同じ方法で単一ニューロンの回収を試みた。その結果、少数ながら EGFP 陽性ニューロンの回収に成功した。これらのニューロンから RNA を調製し、遺伝子発現解析を行ったところ、雌雄間で発現差のある遺伝子の抽出に成功した。抽出された遺伝子群を用いて Gene Ontology 解析を行ったが、遺伝子群の機能に明らかな傾向は認められなかったことから、個々の遺伝子に着目した機能解析が必要になると考えられる。この点に関しては研究期間中に解析が及ばなかったため、今後の研究課題としたいと考えている。

(2) 当初はコンベンショナルなジーンターゲティング法を用いる予定であったが、実験遂行中に、ゲノム編集技術が広く利用可能となったため、Ad4tag マウスの作出にゲノム編集技術を用いることにした。Ad4tag マウスの作成準備に着手し、培養細胞を用いた予備実験を試みたが、この段階で目的の DNA 断片のゲノムへの組み換えが検出されなかった。このため、ガイド RNA 配列（ゲノム編集の標的配列）を変更し、再度検討を行っている段階である。残念ながら Ad4tag マウスの作出に至らなかったため、最終目的のクロマチン免疫沈降物の大規模シークエンスを行うこともできなかった。

遺伝子発現解析に関しては一定の成果が得られたため、詳細な解析を加えて今後発表する予定である。Ad4tag マウスの作出と、これを用いた標的配列の同定には至らなかったため、今後別の研究計画として研究経費を獲得し継続課題としたいと考えている。

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 4 件）

1. Inoue M, **Shima Y**, Miyabayashi, K, Tokunaga K, Sato T, Baba T, Ohkawa Y, Akiyama H, Suyama M, Morohasi K, Isolation and characterization of fetal Leydig progenitor cells of male mice. ***Endocrinology*** 157: 1222-33, 2016 doi: 10.1210/en.2015-1773

2. **Shima Y**, Matuzaki S, Miyabayashi K, Otake H, Baba T, Katoh S, Huhtaniemi I, Morohasi K, Fetal Leydig cells persist as an androgen-independent subpopulation in the postnatal testis. ***Mol Endocrinol.*** 29: 1581-93, 2015 doi: 10.1210/me.2015-1200

3. Miyabayashi K, Tokunaga K, Otake H, Baba T, **Shima Y**, Morohashi K*, Heterogeneity of ovarian theca and interstitial cells in mice ***PLoS ONE.*** 10:e0128352, 2015 doi: 10.1371/journal.pone.0128352.

4. **嶋雄一**、諸橋憲一郎「性分化を支配する遺伝子ネットワーク」**産婦人科の実際** 64 巻 10 号　1227-31、2015

〔学会発表〕（計 4 件）

1. **嶋雄一**、宮林香奈子、鈴木堅太郎、井上実紀、諸橋憲一郎　「胎仔ライディッヒ細胞の細胞運命と生理機能の解明」　第 121 回日本解剖学会全国学術集会　シンポジウム「革新技術が切り開く発生・再生医学研究の最前線」　2016 年 3 月 30 日　ビッグパレット福島（福島県郡山市）

2. **Shima Y,** Miyabayashi K, Baba T, Otake H, and Morohashi K “The fate and functions of fetal Leydig cells in postnatal testis” The 6th Gonad Biology Joint Meeting, Kyushu University, Japan, January 20-22, 2016

3. **Shima Y,** Miyabayashi K, Suzuki K, Inoue M, Baba T, and Morohashi K “Functional importance of fetal Leydig cells in postnatal testis development” Seventh international symposium on vertebrate sex determination,

Kona, Hawaii, USA, April 13-17, 2015

4. **嶋雄一**、宮林香奈子、松崎佐和子、井上実紀、諸橋憲一郎　「細胞特異的エンハンサーが明らかにするライディッヒ細胞の新たな機能」第 3 回湯島性分化勉強会　（東京医科歯科大学小児科・ファイザー株式会社共催）　2014 年 10 月 2 日　東京ガーデンパレス

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔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
嶋　雄一（SHIMA Yuichi）
九州大学大学院医学研究院　分子生命科学系部門　性差生物学講座・講師
研究者番号：80425420