

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名

性分化機構の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 諸橋 憲一郎 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 教授
主たる研究参加者 川尻 要 埼玉県立がんセンター 生化学部 主幹
" 井上 聡 東京大学医学部附属病院 老年病学教室 講師
" 岡本 覚 エーザイ（株） 薬理安全性研究所 部長
" 吉岡 秀文 兵庫教育大学 自然系生物 助教授

（平成12年4月～）

3. 研究内容及び成果：

多くの生物種は、二つの性（雄と雌）を獲得する事で有性生殖を確立した。この生殖プロセスは、生殖細胞の形成過程における減数分裂、相同組換えを通して、遺伝的多様性を生み出す原動力となった。生殖活動は視床下部－脳下垂体－性腺から構成される巧妙な内分泌系によって支配されているが、この支配は単に生殖腺の分化と機能維持に止まることなく、脳の性分化や性行動まで極めて広範囲に及んでいる。本研究代表者らは、生殖腺の発生に不可欠な因子であるAd4BP/SF-1を通して、生殖腺の性分化機構を解析してきた。近年、ある種の化学物質が、内分泌系をかく乱する事によって、生殖機能に影響を及ぼしている可能性が危惧されている。「内分泌かく乱物質問題」の根本的理解、解決には性分化機構を解明する事が不可欠であるが、未だ十分な理解がなされていないのが現状である。

これらの背景から、本研究では①生殖腺の性分化機構を解明すると共に、②エストロゲン受容体（ER）、ダイオキシン受容体（AhR）の生殖腺での機能を解明し、③内分泌かく乱物質（ED）が生殖活動に及ぼす影響を多面的に解析する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

（1）性分化機構の解明（諸橋グループ）

1）核内受容体Dax-1遺伝子の転写制御

生殖腺の雌化カスケードを分子レベルで明らかにした。性分化時の雄性生殖腺ではAd4BP/SF-1が、雌性生殖腺ではWntシグナルによって安定化したβカテニン、HMG型転写因子のLef/Tcf、Ad4BP/SF-1で構成される複合体が、卵巣分化に重要なDax-1遺伝子の転写を活性化する。

2）生殖腺におけるAd4BP/SF-1活性調節機構

生殖腺の発生に不可欠な因子であるAd4BP/SF-1の活性調節機構を解析し、以下を明らかにした。

①Dax-1のN末端側に存在する3箇所のLXXLLモチーフを選択的に認識、相互作用して、Dax-1を活性化する。相互作用には、モチーフを含む8アミノ酸残基程度の領域が重要な役割を果たしている。核内受容体の転写調節活性が、低分子リガンドだけでなく特異的共役因子によっても制御され得る例と言え、一部の核内受容体には対応するリガンドが存在しない、との考えを支持する有力な根拠となるものと思われる。

②SUMO化修飾を介して生じた高次構造変化を通して、転写活性調節を行っている。

③胎仔副腎と成体副腎では異なる制御機構の基で調節されている。胎仔では、副腎特異的エンハンサー機能発現開始には関与しないが、発現維持に必要であり、auto-regulation を受けている。

④発現調節領域から、性行動中枢を担う視床下部腹内側核に特異的なエンハンサー領域及び性腺刺激ホルモンを通して個体の生殖機能を司る脳下垂体に特異的なエンハンサー領域を同定した。

3) ヒト遺伝子疾患XLAGにおけるARX遺伝子の解析

Ad4BP/SF-1と相互作用する因子としてマウスから単離されたArxは、胎生期脳と生殖腺で発現している転写因子であり、精巣Leydig細胞の分化に必須の因子である事を明らかにした。Arx遺伝子は魚類からヒトまで非常に高く保存されていることから、脊椎動物を通じて生殖腺形成及び性分化に関与している事が予想される。外部雄性生殖器官の矮小化及び滑脳症を示し、X染色体連鎖である、ヒト遺伝性疾患XLAGは、ARX遺伝子の欠損・変異により発症する事を明らかにした。

4) ダイオキシン受容体 (AhR) の卵巣における機能解析

正常な排卵過程に必要な、P450aromatase遺伝子の高レベル転写活性化には、AhRとAd4BP/SF-1の相互作用による相乗的効果が必要不可欠である事を明らかにした。既に報告されているAhRとエストロゲン (E2) シグナルのクロストークも考え合わせると、AhRリガンドは少なくとも2つの独立した経路、即ちE2合成の増加とER活性化、を介して影響を及ぼしている可能性が示唆される。

5) 内分泌かく乱物質の評価系開発

E2合成能を欠失し、E2応答性に蛍光蛋白質 (EGFP) が発現する、EGFP-ArKOマウスを作成した。同一物質であっても、E2作用は組織毎に反応、強さが異なる事が観察され、EDのスクリーニング、評価系としての可能性が期待される。

(2) ダイオキシン受容体 (AhR) の機能解析 (川尻グループ)

AhRは、その分子内に核移行 (NLS) 及び核外移行 (NES) シグナルが存在し、リガンド及びシグナル依存的に細胞質・核間をシャトルする蛋白質であり、単にHsp90等の結合によって細胞質に係留されているのではなく、核からのNESによる積極的な排出やLXXLLモチーフを介したAhR分子間・分子内相互作用等の、複合的なメカニズムによる動的バランスの上で、細胞質に存在している事を明らかにした。

(3) エストロゲン受容体 (ER) 標的遺伝子の解析 (井上グループ)

E2応答配列を同定するゲノム結合部位クローニング法とDNAチップ法を用いて、多数のE2標的遺伝子を同定した。興奮性グルタミン酸受容体であるNMDA受容体のサブユニットNR2Dは、性行動や感情等の高次脳機能に対するE2作用を考える上で興味深い。細胞周期進行のブレーキ役である14-3-3 σ に対してユビキチン化酵素として働き、同蛋白の分解を介して細胞増殖を引起す事を明らかにしたEfpは、新規な細胞周期調節機構の発見として注目されると共に、乳癌治療の新しい分子標的として臨床応用が期待される。

(4) 内分泌かく乱物質の影響 (岡本グループ)

胎仔期の生殖腺分化に重要な役割を果たしている転写因子群 (Ad4BP/SF-1、Dax-1、WT-1等) 及び胎仔肝における薬物代謝酵素P450の発現に及ぼすEDの影響を検討した。ICRマウス胎仔期DES曝露でのWT-1発現量は、精巣では「逆U字型」用量反応性を示し、卵巣では「U字型」用量反応性を示す事を明らかにした。

(5) 生殖腺の形態形成機構の解明 (吉岡グループ)

1) 中間中胚葉から未分化性腺への分化

ニワトリ胚を用いて、細胞増殖因子FGF 9が生殖腺形成を誘導する事を明らかにした。中腎細管からのWnt 4シグナルにより副腎生殖原基細胞が形成され、ボーマン結節からのFgf9シグナルにより生殖原基細胞に分化する事が示唆された。

2) 生殖腺の形態形成におけるレチノイン酸の関与

生殖腺原基は未分化生殖腺から雌雄生殖腺の形成に至るが、未分化生殖腺の皮質から卵巣が、髄質から精巣が分化する。鳥類では右側の卵巣が分化の過程で萎縮するが、レチノイン酸 (RA) シグナルが右側皮質でのAd4BP/SF-1発現を抑制して皮質を退縮させ、髄質でのaromatase発現を誘導して髄質を空洞化し、結果的に卵巣萎縮を引き起こす事を明らかにした。RA作用を持つ物質は、生殖腺形成を乱し、EDとして作用する可能性が示唆される。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

自らが発見した生殖腺発生に不可欠な因子Ad4BP/SF-1を中心に据え、生殖腺分化を制御する新たな因子を多数同定し、性分化は性ホルモンのみではなく、多数の蛋白質(受容体、転写調節因子等)の複雑な相互作用によるものである事を明らかにした。従来カスケードと表現されていた転写調節因子の働きが、実際には一回限りのものではなく、ネットワークを形成して反復的に起こる複雑な機構である事、その中でのEDの作用の位置付けを明らかにした。性分化を導く遺伝子カスケード、当初視野に入れていた脳の性分化は余りにも複雑すぎて全容を示すまでには至っていないが、性分化機構の全容解明を目指して、着実に水準の高い成果を挙げている姿勢は高く評価される。

性分化異常症の原因遺伝子を明らかにしたほか、ダイオキシンの女性ホルモン様作用発現機構の解明、ダイオキシン受容体のリン酸化による制御の発見等、EDの作用機構解明の基礎となる重要な知見も数多く見出しており、領域全体の基盤研究としても高く評価されよう。

研究成果は、論文(国内1報、海外36報)、学会(国内107件、国際学会23件)発表されている。論文数は必ずしも多くはないが、Nature Genetics、Cancer Research、Journal of Molecular Endocrinology等々質の高い国際誌に掲載されている。今後、現在進展中の研究成果が次々に掲載される事を期待したい。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

EDの作用の中で、生殖に係るものが最も大きな社会的関心の的となって来たが、性分化の基本的メカニズムが正確に理解されていなければ、その「かく乱作用」も正しく評価する事は出来ないであろう。その基盤を提供する水準の高い成果として高く評価される。本チームの成果により、「生殖に係る内分泌かく乱作用」の正しい位置付けが可能になるものと期待される。これからが、個々のEDの性分化への影響を検討する段階となろう。セベソのダイオキシン曝露事故の追跡調査で、曝露した男児が成人後に儲けた子供には圧倒的に女兒が多い事が指摘されているが、その機構は未だ解明されていない。その解明にも、まず性分化機構の概要を明らかにする事が必須であり、本研究の今後の進展を期待したい。

AhRの機能に関する研究成果はダイオキシンの内分泌かく乱作用を説明するものとして社会的インパクトも高い。また、E2合成能欠損マウスを利用したエストロゲン様物質検定系は、興味深いスクリーニング、評価系として利用できよう。

性分化、生殖腺分化についての知見は科学的にもインパクトが高く、発生学・系統発生学にも大きく貢献するものと思われる。また、性分化異常を伴うヒト遺伝性疾患XLAGにおけるARX遺伝子の役割に関する研究成果は、滑脳症の診断等に応用可能であり（特許出願済み）、臨床医学的にも大きな貢献が期待される。

遺伝子破壊、導入、自然発症マウス等を多数収集し、遺伝的背景をC57BL/6及びFVBに統一して維持しており、交配実験の結果から、遺伝子の相互作用、カスケード解析手法としての有効性が示唆されている。今後の展開に期待したい。また、それらのマウスは今後のこの分野の研究にとって、貴重な財産となろう。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

本研究に参加した若手研究員で、他大学に助手として転出した者1名、学位取得者4名（1名は他大学の助手に就任予定、2名は海外の研究機関で博士研究員として採用予定）、学位取得予定者は6名であり、研究者育成の面でも貢献しているといえよう。

チーム主催国際シンポジウムを1回開催した。