

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

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)

## 「性分化機構の解明」

### 1. 研究実施の概要

生殖活動は全ての生物種に普遍的な生命活動であり、連綿と続く種の存続を支えてきた。その活動は視床下部 - 脳下垂体 - 性腺から構築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とどまることなく脳の性分化や性行動まで、極めて広範囲に及ぶことで動物個体としての生殖活動を調節する。我々は視床下部 - 脳下垂体 - 性腺に発現する転写因子「Ad4BP」の機能を解析した結果、本因子が生殖活動を理解する上で最も重要な因子の一つであるとの結論に達した。従って、本研究プロジェクトでは「Ad4BP」を中心に生殖腺レベルの解析のみならず、脳の性分化をも視野に入れることで、生殖活動の本質に迫る研究の展開を目指す。「内分泌攪乱物質」に関する諸問題を解決する上で最も重要な点は、その作用メカニズムの解明であり、それは本研究プロジェクトのような基礎研究による成果を基盤として達成されるものであると確信する。

### 2. 研究実施内容

生殖腺と脳の性分化メカニズムの解明のため、(1) 生殖腺に発現する転写因子をコードする遺伝子の転写調節機構、(2) 転写因子間の相互作用、(3) 視床下部腹内側核の性差、(4) 内分泌攪乱物質の作用メカニズムに関する研究を行っている。

#### (1) 生殖腺に発現する転写因子をコードする遺伝子の転写調節機構

生殖腺の正常な分化には Ad4BP/SF-1 以外に Dax-1、Sox9、Wt-1、Emx-2、GATA-4 等の転写因子の時間的・空間的に制御された発現が不可欠である。従って、このような発現を可能にするメカニズムは生殖腺の分化を支えるものであらうと考えられる。Dax-1 遺伝子の転写調節機構を解析した結果、この遺伝子の転写調節領域には複数の Ad4 配列が存在し、Ad4BP/SF-1 の制御を受けていることが *in vitro* の実験から明らかになった。この制御は Ad4BP/SF-1 の遺伝子破壊マウスで Dax-1 の発現が消失することから、*in vivo* でも機能していることが確かめられた。

一方、Ad4BP/SF-1 の遺伝子破壊マウスで Wt-1 の発現は野生型と同様に検出で

きることから、Wt-1 遺伝子の発現は Ad4BP/SF-1 によって制御されていないことが推測された。この点を明らかにするために Wt-1 の遺伝子破壊マウスの解析を行いつつあるところである。また、Ad4BP/SF-1 遺伝子プロモーター領域には、これまで我々が見い出した E-box 以外に、Wt-1 の結合配列の存在が認められる。この配列は動物種を越えて広く保存されており、その重要性が示唆される場所であるが、今のところ Wt-1 が Ad4BP/SF-1 遺伝子の転写活性化因子として機能するという結果は得られておらず、むしろ抑制因子としての機能が確認されている。今後他の転写因子の関与を考慮しながら、この点を明らかにして行きたいと考えている。

## (2) 転写因子間の相互作用

既に述べたように、生殖腺の正常な分化には Ad4BP/SF-1、Dax-1、Sox9、Wt-1、Emx-2、GATA-4 等の転写因子が必要である。これらの転写因子はそれぞれが個別に機能するものではなく、互いに相互作用しながら複雑な転写制御を可能にしている様子が明らかにされつつある。我々はこれらの転写因子を中心とする制御系の詳細を明らかにするために、これらの転写因子と相互作用する新たな転写因子を two hybrid 法を用い、スクリーニングしている。これまでのところ、Ad4BP/SF-1 と Dax-1 に相互作用する転写因子を単離することに成功した。これら因子の機能や発現を調べているところである。

一方、Dax-1 は Ad4BP/SF-1 の転写活性化に対し、抑制的に働くことが明らかになっているが、この相互作用に必要な領域を決定することができた。Dax-1 と Ad4BP/SF-1 の細胞内及び、核内存在状態を考慮しつつ、相互作用と抑制活性の関係を検討しているところである。

## (3) 視床下部腹内側核の性差

視床下部腹内側核は雌の性行動を規定する神経核として知られているが、その生化学的、分子生物学的検討は今だなされていない。これは視床下部腹内側核を他の神経核の混入なく単離できなかつたためであった。そこで、我々は Ad4BP/SF-1 遺伝子が視床下部腹内側核に特異的に発現することを利用して、この神経核が光るマウスの作製を行っている。現在、DNA コンストラクトを ES 細胞にトランスフェクトしているところであり、近い将来にこのようなマウスが得られることが期待される。このマウスは生化学や分子生物学的検討だけでなく、生理学、解剖学、細胞生物学的解析手法にも適応可能であり、視床下部腹内側核の機能解析が飛躍的に進むことが期待される。

(4) 内分泌攪乱物質の作用メカニズムの解明には以上のような基礎的研究が不可欠であることはいうまでもない。これまでに、我々が対象とする転写因子の微量定量系を確立することができた。現在、代表的な内分泌攪乱物質をもちい、マウス胎仔

生殖腺における転写因子の発現量に対する影響を調べているところである。

以上のような多面的な研究を通じ、生殖活動の本質を理解することが可能になるものと考えられる。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

なし