

「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

本研究チームでは生殖腺と脳の性分化メカニズムの解明をめざし、(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。平成11年度においては、特にDax-1遺伝子の転写調節への細胞増殖因子の影響に関する検討、更にAd4BP/SF-1とDax-1の相互作用のメカニズム解明と細胞内存在状態の検討を行ってきた。これらの研究から、Dax-1遺伝子が種々のシグナルを受けて性依存的転写調節を可能にしていることと、Dax-1自身の細胞内存在状態が転写抑制活性を調節していることなどが明らかになってきた。

2. 研究実施内容

(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、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。これら転写因子の性分化過程におけるmRNA発現量を定量したところ、各々の転写因子が雌雄で特徴的な発現パターンを示すことが明らかになった。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ろうと考えられる。我々はこれまでに、Dax-1遺伝子がAd4BP/SF-1の制御を受けていることを明らかにしてきた。しかしながら、Ad4BP/SF-1のみによって制御されているとすると、種々の矛盾が生じる。このことはDax-1 遺伝子の転写調節を行っている因子は単にAd4BP/SF-1のみではなく、他の因子の関与を示唆するものであった。そこで細胞増殖因子の関与を考慮しながら更に解析を進めたところ、少なくともWnt4からの刺激が、 β -catenin, LEF/TCFAを介してAd4BP/SF-1とともにDax-1遺伝子の転写を活性化することが示された。Wnt4が雌胎仔生殖腺に発現することから、この刺激が雌胎仔生殖腺におけるDax-1の強い発現を制御しているものと思われた。一方、Dax-1遺伝子は雌に比べとると弱い、雄胎仔生殖腺でも発現する。雄胎仔生殖腺ではSox9が発現することが知られているが、Sox9はLEF/TCF同様、HMG-boxを持つ転写因子である。そこで、Dax-1遺伝子の転写活性を有するかを検討したところ、や

はりAd4BP/SF-1とともに転写活性化因子として機能することが明らかになった。ただし、 β -catenin, LEF/TCFAによる活性化に比べると弱いものであった。

これらの結果より、生殖腺の性分化に依存したDax-1遺伝子の転写調節機構が明らかになりつつあるものと思われる。今後はこれら因子の相互作用を分子レベルで解析することで、Dax-1遺伝子の性依存的な転写調節機構を解明したいと考えている。

(2) 転写因子間の相互作用

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。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きた。これまでのところ、これらの転写因子と相互作用する因子を単離し、そ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、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きた。これまでに、Dax-1のアミノ末端側に存在する特殊な配列が相互作用に不可欠であることを明らかにした。この配列による相互作用はDax-1蛋白質の核移行に必須であり、しかもこの領域がDax-1の抑制活性にとっても必須であることが明らかになっている。一方、Dax-1は核から細胞質へ移行するための配列をもっており、この配列は細胞の酸化還元状態を認識し、その機能を変化させることなども明らかになってきおり、Dax-1による遺伝子転写の抑制活性が本因子の核と細胞質の分布の状態によって調節されていることを明らかにすることが出来た。

(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ったためであった。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。既に遺伝子破壊ES細胞を用い、キメラマウスしているところである。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

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)

Dax-1 as One of the Target Genes of Ad4BP/SF-1.

Ken Kawabe, Tatsuji Shikayama, Hisae Tsuboi, Sanae Oka, Koichi Oba, Toshihiko Yanase, Hajime Nawata, & Ken-ichirou Morohashi

Mol. Endocrinol. 13, 1267-1284 (1999)

Gonadal and Extragonadal Functions of Ad4BP/SF-1 -Developmental Aspects-. Ken-ichirou Morohashi

Trends in Endocrinol. Metab. 10, 169-173 (1999)

Molecular cloning of rat *efp* : expression and regulation in primary osteoblasts.

Satoshi Inoue , Tomohiko Urano, Sumito Ogawa, Akira Orimo, Takayuki Hosoi, Yasuyoshi Ouchi, & Masami Muramatsu

Biochem Biophys Res Commun, 261, 412-418 (1999)