

「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

本研究は生物個体の性分化機構を理解することを目的に行なわれている。特に本研究で着目している点は生殖腺と脳の性分化過程を支える分子メカニズムであり、転写因子の機能や性ステロイドによる調節をもとに、この問題を理解したいと考えている。これまで生殖腺で発現する数種の転写因子の機能をもとに、主に生殖腺における性差の誘導機構を解析してきた。その過程で転写の活性化や抑制機構が分子レベルで理解されつつある。また、これら転写因子の調節に関わる因子の単離も行っており、その中には生殖腺に異常をきたす疾患の原因遺伝子として新たに同定されたものもあった。以上の研究から生殖腺の性分化を支える分子メカニズムが徐々に解明されつつある。今後は、更に生殖腺の性分化機構を詳細に解析すると共に、個体全体の性分化の流れを理解したいと考えている。

### 2. 研究実施内容

本研究は個体の性分化の分子メカニズムを理解するために行われているものであるが、主に生殖腺と脳における性差の獲得過程と機能の差異を中心に解析している。以下に研究項目毎の内容をまとめる。

#### (1) 生殖腺に発現するDax-1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が生殖腺の分化を支えるものと考えられる。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。更に、細胞増殖因子の関与を考慮しながら解析を進めたところ、少なくともWnt4からの刺激が、 $\beta$ -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の発現を活性化しているものと考えられる。このことは、Wnt4遺伝子破壊マウスの雌胎仔生殖腺におけるDax-1

遺伝子の転写産物の発現低下によって支持された。また、一方でWnt4刺激を受けた後の転写の活性化には $\beta$ -cateninとAd4BP/SF-1の直接的な相互作用が関与することを示す結果を得ており、現在この相互作用の分子メカニズムを詳細に解析中である。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明らかにできるものと考えている。

(2) 生殖腺に発現するAd4BP/SF-1遺伝子の転写調節機構

Ad4BP/SF-1は我々の研究室で単離同定した因子であり、この因子の遺伝子破壊マウスから生殖腺と副腎が消失することで脚光を浴びた因子である。この因子が生殖腺の形成にとって不可欠であることから、本因子遺伝子の生殖腺原基での発現調節機構を解明することは生殖腺形成の分子メカニズムを明らかにするためには必須のことである。そこで、480kbからなるYACクローンをを用い、エンハンサー領域の同定をトランスジェニックマウスを作製しながら行っている。今だエンハンサーの同定には至っていないが、この過程でAd4BP/SF-1遺伝子上流に同じく核内受容体ファミリーに属する遺伝子が存在し、両遺伝子間にはインシュレーター様活性を示す領域が位置することが明らかになってきた。インシュレーターはエンハンサーと共に、クロマチンレベルで遺伝子発現を検討する場合には不可欠の要素であることは明らかである。ここで同定した領域がad4BP/SF-1遺伝子の生殖腺特異的な発現には重要な機能を有することが期待されるため、現在この領域の構造を解析中である。

(3) 転写因子間の相互作用

生殖腺分化の進行にはAd4BP/SF-1やDax-1等の転写因子の機能が不可欠である。これらの転写因子はそれぞれが単独で機能するものではなく、また未だ同定されていない因子との相互作用を通じて複雑な転写制御を可能にしているものと推測される。その詳細を明らかにするために、two hybrid法を用い、相互作用する新たな因子をスクリーニングしたところ、多くの因子が単離された。現在、その機能や発現様式を調べているところであるが、Factor Xについては雄胎仔生殖腺に発現し、極めて特徴的な構造を有する因子であったことから、既に遺伝子破壊マウスの作製を行いつつある。さらに、Factor Yについては、生殖腺に異常をきたす遺伝性の疾患遺伝子であることを見出した。本因子の遺伝破壊マウスの表現型と合わせて解析中である。

(4) Dax-1の抑制機能の解析

Dax-1はAd4BP/SF-1の転写活性に対し、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の抑制活性にとって必須であるばかりでなく、Dax-1蛋白質の核移行に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が明らかになりつつある。

(5) 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遺伝子が脳内では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、この神経核を構成する神経細胞の軸索がLacZによってラベルされたマウスの作製を行ってきた。最近になって、変異ES細胞が生殖系列細胞に入ったマウスが産まれてきている。今後このマウスを用い、視床下部腹内側核の発生過程と性差の構築過程を詳細に検討出来るものと考えている。また、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。

以上のように多面的な研究を行うことで性分化のメカニズムを個体レベルで理解することができるものと思われる。また、このような基礎的研究は内分泌攪乱物質の作用メカニズムの解明には不可欠であると考え。我々も生殖腺や脳以外の各種組織における性の分化を検討しているが、特に副腎皮質におけるDax-1遺伝子の発現が性ステロイドホルモンによって制御されることが分かってきた。内分泌攪乱物質の影響を合わせて検討中である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S

Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. J. Biol. Chem. 275( 28 ) 21372-21379( 2000 )

Ogawa S, Saito T, Matsuda Y, Seki N, Hayashi A, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M, Hori T, Inoue S

Chromosome mapping of human, mouse and rat genes for testis finger protein (terf), a member of the RING finger family. Cytogenet. Cell Genet. 89, 56-58, ( 2000 )

Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S

Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone

mineral density. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269( 2 ), 537-541, ( 2000 )

Rina Kimura, Hironori Yoshii, Masatoshi Nomura, Naoe Kotomura, Tokuo Mukai, Satoru Ishihara, Koichi Ohba, Toshihiko Yanase, Osamu Gotoh, Hajime Nawata, & Ken-ichirou Morohashi. Identification of Novel First Exons in Ad4 BP/SF-1 ( NR5A1 ) Gene, and Their Tissue- and Species-Specific Usage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 63-71, ( 2000 )

Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Inoue S Hideo Toyoshima, Yasuyoshi Ouchi, & Satoshi Inoue

Possible involvement of the p53 ( Kip2 ) gene in bone metabolism *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 422-426, ( 2000 )