

「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解析も行っており、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同定されたものもあった。一方、生殖腺の分化に不可欠な Ad4BP/SF-1 や Dax-1 などの核内受容体型転写因子をコードする遺伝子の転写制御機構も明らかになってきた。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) Dax-1 による Ad4BP/SF-1 の転写調節機構の解析

Ad4BP/SF-1 は標的遺伝子の転写を活性化する因子として同定されたが、Dax-1 は Ad4BP/SF-1 による転写を抑制する因子であった。この Dax-1 による抑制活性を調べたところ、分子内に存在する LxxLL モチーフが Ad4BP/SF-1 との相互作用に不可欠であり、この相互作用を通じて抑制活性を発揮することが明らかになった。また、Dax-1 はこの配列を通じて他の核内受容体の転写活性を抑制することも明らかになった。(論文作成中)

#### (2) Ad4BP/SF-1 遺伝子内に存在する組織特異的エンハンサーの解析

Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現調節機構をトランスジェニックマウスの作製を通じた *in vivo* の実験系で調べたところ、Ad4BP/SF-1 遺伝子内に副腎皮質特異的な発現を担う領域を見出すことに成功した。この領域を用いてトランスジェニックマウスを作製すると、胎仔期の副腎にその発現が観察されることから、Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質における発現を忠実に反映しているものと推測さ

れる。このように副腎皮質特異的エンハンサーの同定は初めてのことであり、ステロイドホルモン産生細胞特異的な遺伝子発現を可能にするものと期待される。この領域を更に詳細に解析中である。

#### (3) Ad4BP/SF-1 遺伝子と前後の遺伝子との間に存在するインシュレーター解析

Ad4BP/SF-1 遺伝子を含むおよそ 280 kb の遺伝子断片を調べたところ、Ad4BP/SF-1 遺伝子の上流に一つの遺伝子を、下流に二つの遺伝子を同定した。これらの遺伝子は各々特異的な発現を示すものである。このことは、Ad4BP/SF-1 遺伝子のエンハンサーが両側の遺伝子にその影響を及ぼさないためのインシュレーター配列を有することを示唆するものである。これまでに、SV40 のエンハンサー活性を抑制する領域を Ad4BP/SF-1 遺伝子上流域に見出した。今後、副腎特異的なエンハンサーの活性を抑制するものかを検討する。

#### (4) Wnt シグナルによる Dax-1 遺伝子の転写制御機構の解析

これまでの実験結果は Ad4BP/SF-1 が Dax-1 の上位に位置する遺伝子であることを示すものであったが、Ad4BP/SF-1 と Dax-1 の発現様式を考えると、Ad4BP/SF-1 だけでは Dax-1 遺伝子の発現を説明出来ない場合がある。この矛盾を説明するものとして Wnt4 による Dax-1 遺伝子の転写活性化が予想された。そこで、レポーター遺伝子アッセイを行ったところ、確かにこのシグナルのもとに Dax-1 遺伝子が活性化され、しかも Ad4BP/SF-1 の共存下にその活性化は増強された。このことは Wnt4 遺伝子破壊マウスを用いて証明された。また、この活性化は Wnt シグナル因子の一つである  $\beta$ -catenin と Ad4BP/SF-1 が蛋白質レベルで相互作用することによって発揮されることも明らかにしてきた。

#### (5) 生殖腺の分化に不可欠な転写因子と相互作用する因子の検索とその機能解析

分化途中のマウス胎仔生殖腺から作製した two hybrid library を用いて、Ad4BP/SF-1、Dax-1、Wt-1、Emx-2、Sox-9、GATA-4 と相互作用する因子を検索してきた。未知の分子を含む多くの分子種が単離されたので、これらの発現を whole mount in situ hybridization 法で調べたところ、数種の興味深い分子種が単離された。現在、そのうちの数種類について現在遺伝子破壊マウスの作製を進めているところである。また、Ad4BP/SF-1 と相互作用する因子を検索する過程で Arx と名付けられた転写因子が単離された。この因子の解析を進めたところ脳の機能と生殖腺の機能に異常が認められる XLAG (X-linked lissencephaly and ambiguous genitalia) と呼ばれる疾患の原因遺伝子であることが明らかになった。これまで、9例の患者を調べたところ、一例を除き全ての患者 DNA にこの遺伝子に変異が認められた。遺伝子破壊マウス(三菱生命研の北村邦夫博士との共同研究)の表現型と極めて良い一致をみたことから、合わせて発表予定である(論文投稿中)。この他にも、two hybrid screening によって単離された因子について解析を進めているところである。

### 3. 研究実施体制

#### 諸橋グループ

- ① 諸橋 憲一郎(岡崎国立共同研究機構、基礎生物学研究所、発生生物学研究系、細胞分化研究部門、教授)

- ② 転写因子の発現調節機構の解析と胎仔生殖腺の分化機構の解析

川尻グループ

- ① 川尻 要(埼玉県立がんセンター、生化学部、がん基礎研究部門、主幹)  
② ダイオキシンレセプターの機能解析と核内受容体の細胞内存在状態の解析

井上グループ

- ① 井上 聡(東京大学、医学部附属病院、老年病学教室、助手)  
② エストロジェンレセプターの標的遺伝子の解析

本岡グループ

- ① 本岡 寛(エーザイ株式会社、薬理安全性研究所、開発安全性研究部、部長)  
② 代表的内分泌攪乱物質の影響の解析

吉岡グループ

- ① 吉岡 秀文(兵庫教育大学、自然系生物、助教授)  
② ニワトリ胚生殖腺における転写因子や増殖因子の機能解析

#### 4. 研究成果の発表

##### (1) 発表論文

- Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis implies their closely related and distinct functions. (2001)  
Yayoi Ikeda, Yoshie Takeda, Tatsuji Shikayama, Tokuo Mukai, Setsuji Hisano, and Ken-ichirou Morohashi  
Develop. Dynam. **220**, 363-376
- Expression profiles of COUP-TF, DAX-1 and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: Possible implications in steroidogenesis. (2001)  
Hiroataka Shibata, Yayoi Ikeda, Tokuo Mukai, Ken-ichirou Morohashi, Isao Kurihara, Takashi Ando, Toshihiko Suzuki, Sakiko Kobayashi, Masaru Murai, Ikuo Saito, and Takao Saruta.  
Mol. Genet. Metab. **74**, 206-216.
- Activation of cAMP-dependent Protein Kinase increases the protein level of Steroidogenic Factor-1. (2002)  
Reidun Asoy, Gunnar Mellgren, Ken-ichirou Morohashi, and Johan Lund  
Endocrinol. **143**, 295-303.
- Sex Differentiation of the Gonads - Factors Implicated in Testicular and Ovarian Developments  
Ken-ichirou Morohashi  
Environmental Sciences **9**, 13-22
- Concerned Regulation of Gonad Differentiation by Transcription Factors and Growth

Factors.(2002)

Taiga Suzuki, Hirofumi Mizusaki, Ken Kawabe, Hidefumi Yoshioka, and Ken-ichirou Morohashi

In “The genetics and biology of sex determination”

John Wiley & Sons Ltd, UK

(2) 特許出願

なし