

氏名	岩渕 順真		
学位の種類	博士 (理学)		
学位記番号	博乙第 48 号		
学位授与の日付	2014 年 9 月 8 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文の題目	アフリカツメガエルの脳特異的 p450 アロマターゼ遺伝子の発現調節機構に関する研究		
論文審査委員	主査	神奈川大学	教授 泉 進
	副査	神奈川大学	教授 井上 和仁
	副査	神奈川大学	准教授 大平 剛
	副査	神奈川大学	准教授 豊泉 龍児
	副査	日本大学	教授 澤田 博司

【論文内容の要旨】

女性ホルモンのエストラジオール(E2)は、酵素 p450 アロマターゼ (以後、アロマターゼ) により男性ホルモンのテストステロンから合成される。E2 は哺乳類では女性の性腺の発達に影響を及ぼす他、一部の魚類、両生類及び爬虫類では、生殖腺の性の転換においても重要な役割を果たすことが知られている。両生類であるアフリカツメガエルの生殖腺では、未分化時期に E2 に暴露されると雌へと性の転換が起こることが知られ、さらに性分化時期には、雌ヘテロ型(ZW型)の核型を持つ個体にのみアロマターゼ遺伝子の発現上昇が観察される。そのためアフリカツメガエル生殖腺の雌化決定ではアロマターゼ遺伝子の発現により、E2 が合成されることが重要であると考えられている。一方、脊椎動物全般において、脳でもアロマターゼ遺伝子の発現が観察され、脳独自にステロイド合成が為されていることが報告されている。アフリカツメガエルの脳では、これまでに、アロマターゼ遺伝子が性分化期の生殖腺よりも高発現していることが確認されているが、その転写調節機構及び役割は不明であった。本研究ではアフリカツメガエル脳におけるアロマターゼ遺伝子の高発現事由の解明を目的とした。

本論文は以下の 5 章より構成されている。

第 1 章 序章

第 2 章 脳と生殖腺におけるアロマターゼ遺伝子のクローニング及び *cyp19a1* ゲノム DNA のクローニングと解析

第 3 章 脳特異的アロマターゼ遺伝子プロモーター I.f の解析

第 4 章 アフリカツメガエル脳におけるアロマターゼの発現及びエストラジオールの役割

第 5 章 総論

第 1 章では本研究の背景を述べた上で論文全体の構成を述べている。

第 2 章ではアフリカツメガエルの生殖腺と脳、それぞれにおいてアロマターゼ cDNA 全長をクローニングし、その構造を詳細に解析した。更に、アフリカツメガエルの脳において高発現しているアロマターゼの制御機構を解析するため、プロモーター領域を含む *cyp19a1* のゲノム DNA をクローニングし、アロマターゼ脳特異的プロモーターの構造解析と他の脊椎動物種との詳細な比較を行った。アフリカツメガエルの生殖腺と脳のアロマターゼ cDNA は、同一配列の 500 アミノ酸の翻訳領域をコードするものの、転写開始点から約 80 bp は生殖腺あるいは脳特異的な配列となっていた。この由来を探る為、ゲノム DNA ライブラリーより、アロマターゼをコードする *cyp19a1* ゲノム DNA の単離を行った。生殖腺では転写開始後 Exon P II からすぐ下流の Exon II に直接つながり成熟 mRNA となるのに対し、脳では転写開始後 Exon I.f から下流の Exon P II の途中まで、約 6 kbp がスプライシングされ成熟 mRNA となることで、それぞれの cDNA の上流約 80 bp に配列の違いが生じていることを明らかにした。ゼブラフィッシュ等の魚類のアロマターゼは、生殖腺と脳において高発現し、それぞれのアロマターゼは *Cyp19a* と *Cyp19b* の異なる遺伝子座にコードされている。また、これらの遺伝子の翻訳領域の相同性は約 60% である。一方、哺乳類のヒトにおける *CYP19a1* はシングルコピー遺伝子であり、全長約 123 kb に亘り、卵巣、脳、皮膚、胎盤、脂肪等の多岐の器官において 11 の組織特異的プロモーターにより転写が調節されている。卵巣特異的 Exon P II と脳特異的 Exon I.f の間には約 40 kb の隔たりがあり、アフリカツメガエルには見られない Exon I.3、I.6、I.2 の挿入が見られる。アフリカツメガエルのアロマターゼは、ヒト型のシングルコピーの *cyp19a1* 遺伝子にコードされていると考えられるが、魚類と同様に、そのアロマターゼの発現は生殖腺と脳に限定的であることが明らかになった。

第 3 章は脳特異的な発現を調節するアロマターゼ遺伝子のシス領域の解析について述べたものである。リアルタイム RT-PCR 法によりアフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼ mRNA の発現の特徴を捉え、その後、アフリカツメガエルの脳より抽出した核蛋白質を用い、転写開始領域上流 300 bp における核蛋白質の結合領域を DNase I フットプリント法により同定した。また、プロモーター I.f への結合が予想される転写因子群に関しては mRNA の発現解析を行い、アロマターゼ mRNA との相関を観察した。その後、特に重要と考えられる *FoxD3* の結合が予想されるシス領域及び脊椎動物種間において高度に保存されている配列（以後、保存配列）について、脳の核蛋白質の結合の変化をゲルシフト法により解析を行い、さらに DNAP アッセイ法により、保存配列上に結合する核蛋白質の同定を試みた。脳特異的プロモーター I.f 上の *STATx*、*FoxD3* 及び *Smad* の予想転写因子結合配列に加え、保存配列及びイニシエーター配列に脳の核蛋白質が結合することが、DNase I フットプリント法により示された。また、予想転写因子の発現パターンの解析では、*foxd3*、*smad2* 及び *smad4.1/4.2* がアフリカツメガエルの脳において有意に発現した。また、*foxd3* の発現レベルはアロマターゼ mRNA の発現に反し減少し、*FoxD3* 配列上に結合する核蛋白質は発生段階の進行と共に減少を示した。さらに、保存配列には 45 kDa の脳特異的かつ定常的に発現している核蛋白質の結合が観察された。脳特異的プロモーター I.f の解析から、*smad* は MH2 ドメインを介し *foxd3* と複合体を形成する可能性を予測した。また、リプレッサーとして報告がなされている *foxd3* の発現が減少することで、保存配列上に結合する核蛋白質等の転写活性化因子がアロマターゼの発現の上昇に寄与する可能性についても考察されている。しかしながら、*FoxD3*、*Smad* 等の予想転写因子結合配列は、他の脊椎動物種の脳特異的アロマターゼプロモーター I.f 上では相同性が観察されたため、この転写調節機構はアフリカ

ツメガエルの脳におけるアロマターゼの高発現を制御する特徴的な制御機構である可能性を示唆している。

第 4 章は脳におけるアロマターゼ遺伝子の高発現がアフリカツメガエルにとって、どのような生理学的役割を担っているのかを解明することを目的とした。アフリカツメガエル各個体を ZZ 型の雄、ZW 型の雌に選別し、脳におけるアロマターゼ mRNA 発現の雌雄差を確認した。次に、脳の形態形成に伴うアロマターゼの詳細な発現時期及び発現領域の解析を行った後、脳のアロマターゼの発現変化に伴い、全身及び脳における E2 濃度がどのように変化するのかを解析した。その後、各組織の E2 含有量の妥当性を探るため、脳の各発生段階及び各組織における ER 遺伝子の mRNA 及び蛋白質の発現レベルの解析を行った。最後に、E2 の脳における役割の解明の一環として、E2 の神経細胞軸索やアストログリアへの影響及び脳細胞障害時における E2 による保護作用を検証した。脳におけるアロマターゼの時空間的発現解析から、その発現は生殖腺と脳以外ではほぼ検出されず、脳では生殖腺の 5 倍以上の発現が見られた。また、脳の発達と共にアロマターゼの発現上昇が見られるものの、雌雄差は観察されなかった。免疫組織化学的な解析からは、脳におけるアロマターゼの発現領域は前脳皮質及び脳室脈絡叢領域において特に強く確認された。E2 の定量及び ER の発現変化の解析からは、脳中の E2 濃度は生殖腺、肝臓と同レベルに検出され、心臓ではその約二倍の濃度が検出された。また、脳の発達に伴う E2 濃度の変化は見られなかった。ER の発現も E2 と同様に心臓において高発現し、脳における発現変化が観察されなかった。しかしながら、脳の発達に伴うアロマターゼの発現上昇時には全身における E2 濃度の上昇が検出された。脳の初代培養細胞を用いた解析からは、E2 処理によりニューロン及びアストロサイトの成長及び増殖に対する影響は観察されなかったものの、細胞死誘導以前の E2 処理は細胞障害に対する保護効果を示した。E2 濃度と ER の発現は、アロマターゼの発現がほとんど見られない組織（特に心臓）において高局在、高発現を示した。アロマターゼの発現が観察される脳室脈絡叢は脳脊髄液を生産する。哺乳動物において脳脊髄液はクモ膜下腔を経て静脈に吸収され、静脈血は心臓へと送られる。そのため、アフリカツメガエルの脳室脈絡叢において合成される E2 が脳脊髄液と共に心臓を経て全身に供給されている可能性が考えられる。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章において得られた結果について総合的に考察が為されている。本研究の結果から、*Cyp19a1* 遺伝子は脊椎動物の進化において、新たに挿入されたプロモーター領域を使うことで、より組織特異的に E2 の合成を行うように進化したことが考えられるが、アフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼの高発現の意義を考え合わせると、E2 がもつ役割も系統進化的に変化していると結論した。

【論文審査の結果の要旨】

アフリカツメガエルでは生殖腺の雌化においてアロマターゼ遺伝子の発現が重要であるが、脳でもアロマターゼ遺伝子の発現が観察され、脳独自に E2 合成が為されていることが報告されている。脳におけるアロマターゼ遺伝子の発現は生殖腺よりも高いことが確認されているものの、その転写調節機構及び役割は不明であった。本研究はアフリカツメガエル脳におけるアロマターゼ遺伝子の発現制御機構を分子レベルで解析したものである。まず、アフリカツメガエルの脳特異的アロマターゼ遺伝子の転写開始点ならびにエクソン-イントロン構造を明らかにした。次い

で、脳特異的プロモーターI.fにおいて、種間保存配列、イニシエーター配列、転写因子 FoxD3 及び Smad の予想結合配列に脳特異的核蛋白質が結合することを明らかにした。転写因子 FoxD3 及び Smad は脳で発現しており、アロマターゼ遺伝子の脳特異的転写を制御する可能性が強く示唆された。これらの転写因子が脳特異的なアロマターゼ遺伝子の転写に関わるということは本研究により初めて明らかにされたものであり極めて意義深い成果である。本研究ではさらに、アフリカツメガエルのアロマターゼが脳と生殖腺でのみ合成されていること、および脳でアロマターゼにより合成されたエストラジオールが脳脊髄液と共に心臓を経て全身に供給されている可能性が示唆された。このように本論文は、アフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼ遺伝子の発現調節機構について、魚類や哺乳類とは異なる両生類の脳に特有な発現調節機構が存在するという新知見を加えるとともに、アロマターゼにより合成されるエストラジオールに細胞保護作用があるということを示唆する重要な新規情報をも提供した。以上の事由により、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値のあるものと認定した。