

アフリカツメガエルの脳特異的 p450 アロマトラーゼ遺伝子の
発現調節機構に関する研究

岩淵 順真

目次

第1章 序章

1-1 研究の背景	4
1-1-1 アフリカツメガエルの発生と性決定について	4
1-1-2 エストロゲンについて	4
1-1-3 エストロゲン受容体について	5
1-1-4 エストロゲンの役割について	6
1-1-5 アロマターゼ遺伝子とその分子進化について	6
1-1-6 アフリカツメガエルのアロマターゼについて	7
1-2 本研究について	11

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

2-1 序論	12
2-2 実験材料と方法	13
2-2-1 実験動物	13
2-2-2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法	13
2-2-3 <i>cyp19a1</i> ゲノム DNA のクローニング	15
2-3 結果	17
2-3-1 脳及び生殖腺特異的アロマターゼ cDNA の クローニングと構造解析	17
2-3-2 プロモーター I.f とエキソン PII-I.f 間の イントロンのクローニング	21
2-3-3 プロモーター I.f の配列解析	22
2-4 考察	25

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

3-1 序論	27
3-2 実験方法	27
3-2-1 DNase I フットプリント法	29
3-2-2 リアルタイム RT-PCR 法	30
3-2-3 ゲルシフト法	31
3-2-4 DNAP アッセイ法	32
3-2-5 統計解析	33
3-3 結果	34
3-3-1 脳及び各組織におけるアロマターゼ遺伝子の発現比較	34
3-3-2 DNaseI フットプリント法によるプロモーターI. f の解析	34
3-3-3 予想転写因子 mRNA の発現解析	36
3-3-4 <i>FoxD3</i> 予想転写因子結合配列への脳の核タンパク質の結合	39
3-3-5 保存配列への脳の核タンパク質の結合と結合タンパク質の同定	39
3-4 考察	44

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

4-1 序論	46
4-2 実験方法	47
4-2-1 リアルタイム RT-PCR 法	47
4-2-2 免疫組織化学のための脳のパラフィン切片の作製	47
4-2-3 ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色	48
4-2-4 酵素抗体法によるパラフィン切片の免疫組織化学	48
4-2-5 ウェスタンブロッティング法	49
4-2-6 Enzyme-linked immunoassay (EIA) 法	49
4-2-7 E2 及びその阻害剤の神経細胞軸索、アストログリアへの影響	50

4-2-8	脳の初代培養細胞の E2 処理による保護作用	51
4-2-9	統計解析	51
4-3	結果	52
4-3-1	アフリカツメガエル脳におけるアロマターゼ mRNA の発現変化 及び ZZ/ZW 個体の組織における発現の性差	52
4-3-2	アフリカツメガエル幼生期の脳の形成過程の形態学的観察	52
4-3-3	アフリカツメガエル脳における アロマターゼタンパク質の発現及び局在性	55
4-3-4	アフリカツメガエル脳及び全身における E2 の定量解析	56
4-3-5	エストロゲン受容体 (ER)mRNA 及びタンパク質の発現解析	57
4-3-6	E2 及びその阻害剤による 神経細胞軸索の伸長及びアストログリアの伸展に対する影響	59
4-3-7	脳の初代培養細胞を用いた 細胞障害に対する E2 処理による保護作用	60
4-4	考察	63
第 5 章 総論		65
参考文献		69
謝辞		77

第1章 序章

1-1 研究の背景

1-1-1 アフリカツメガエルの発生と性決定について

両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、発生初期の中腎の生殖隆起において未分化生殖腺の形成が行われた後、幼生期 (Fig. 1, Stage 50) に入ると性の分化が起こり、生殖腺の雌雄差が生じる。生殖腺の性分化時期には、雌ヘテロ型 (ZW 型) の核型を持つ個体にのみ雌性ホルモンを合成する事で知られているアロマターゼをコードする遺伝子の発現上昇が確認されている [1]。しかしながら、雄ホモ型 (ZZ 型) の核型を持つ個体でも未分化時期の生殖腺が雌性ホルモンのエストロゲンに暴露されると雌へと性の転換が起こる事が知られている [2, 3]。そのためアフリカツメガエル生殖腺においてアロマターゼ遺伝子が発現し、エストロゲンの合成が行われる事が生殖腺の雌化に重要であると考えられている [1, 4, 5]。また、エストロゲンは、その主要な標的器官である生殖器官において、脊椎動物の種によって重要性が異なっている。哺乳類では、エストロゲンが雌の生殖器官の発達及び性周期の調節にその作用を発揮するのみであるが、一部の魚類、両生類及び爬虫類では、雌の生殖腺の発達に加え、性の転換現象においても重要な役割を果たす事が示唆されている [6]。

1-1-2 エストロゲンについて

エストロゲンのようなステロイドホルモンは、ステロイド骨格をもつホルモンの総称で、副腎皮質ホルモンと性ホルモンに大別される。性ホルモンはさらに女性ホルモンと男性ホルモンに分けられ、性差の成熟に作用する。女性ホルモンのエストロゲンは、天然にはエストロン (E1)、エストラジオール (E2)、エストリオール (E3) の3種類が存在し、その中でも E2 は最も強い生理活性を持つとされている。また C18 ステロイドである E2 は、C27 のコレステロールを出発

物質に、男性ホルモンである C19 ステロイドのテストステロンから、末端酸化酵素であるアロマターゼの触媒により、芳香化される事で合成される (Fig. 2)。E2 の主要な生産組織としては、卵巣、胎盤における合成及び分泌が観察され、女性器の発達や月経周期の調節等に、その作用が見られる。しかしながら、近年ではヒトにおいて、脂肪組織、骨、大動脈、冠動脈内皮細胞、肝臓、皮膚、視床下部、脳下垂体前葉、リンパ球等の複数の器官においてもアロマターゼをコードする *CYP19a1* 遺伝子の発現が雌雄双方で観察され、これらの組織においても局所的にエストロゲン合成が行われていると考えられている。その中でも、特に脳では、脳内において新規に合成されるステロイドホルモンがニューロステロイドと呼ばれ、海馬の神経細胞（ニューロン）や星状膠細胞（アストロサイト）等、いずれの細胞においてもエストロゲンの合成が観察されている [7, 8]。

1-1-3 エストロゲン受容体について

エストロゲンの生理活性は、核内受容体のエストロゲン受容体 (ER) を介したゲノミックな作用経路及び G タンパク質共役型の膜上受容体である GPR30 を介したノンゲノミックな作用経路により起こる事が報告されている。ノンゲノミックな作用経路は近年報告が為された作用経路であり、遺伝子発現を介さずセカンドメッセンジャーからシグナルを伝達するため転写依存的な作用に比べ早い作用効果が報告されている。また、GPR30 の発現は子宮、卵巣、乳房、骨、神経組織において見られ、GPR30 からの刺激が核内受容体型の ER のリン酸化を引き起こす事も報告されている。しかしながら、GPR30 に代表されるような E2 の膜上受容体においては未だ不明な点も多く今後のさらなる解析が期待される [9, 10]。一方、古典的な核内受容体型のエストロゲン受容体 ($ER\alpha$ 及び $ER\beta$) は、エストロゲンをリガンドとする事で DNA と相互作用し転写因子として作用する。ER の標的分子は、抗アポトーシスあるいはアポトーシス促進因子として働く Bcl-2 ファミリーの制御を行う事が報告され、その結果神経細胞に対する保護作用を発揮する事が観察されている。さらに、ER のリン酸化は ERK/MAPK 及び

PI3K/Akt のような成長因子にシグナル伝達を行う事で、転写非依存的な細胞膜開始型の作用に関与している可能性も報告されている[11-14]。哺乳類の脳において、*ER α* 及び *ER β* は 扁桃体、辺縁系領域、視床下部、中脳、脳幹等の様々な脳領域のニューロン及びグリアいずれの細胞においても発現が観察されているものの、各脳領域における発現分布及び脳の発達における発現時期が異なっている。また、*ER α* 及び *ER β* それぞれにおいて、スプライシングの違いによる多数のアイソフォームも存在するため、これらのバリエーションにより、E2 の作用が複雑に制御されている事が予想されている[15, 16]。

1-1-4 エストロゲンの役割について

魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類いずれの種の脳においてもアロマターゼ遺伝子の発現が観察され、生殖腺と並び盛んに研究が為され、脳独自にエストロゲンの合成が起こっている事が報告されている[17-21]。魚類、鳥類、哺乳類において、形態及び行動的な性差に繋がる脳の性的二型核の形成は E2 の作用によるものと考えられており、脳へのエストロゲン処理により、雌あるいは雄特異的な生殖行動が誘起される事から、E2 が脳の性分化に重要な役割を果たす事が示唆されている[22-24]。一方、雌雄の脳において報告されている E2 の作用として、海馬や小脳プルキンエ細胞における神経細胞死に対し、E2 の前処理により細胞死の低下が観察される。そのため、脳のエストロゲンが神経発達及び神経病等を含む神経障害に対し、保護作用を有する可能性が示唆されている。この他、E2 は電気生理学的な作用も有する事が報告されており、海馬スライスに対し E2 処理を行う事により神経細胞のシナプス伝達の長期増強現象が見られる[25-27]。

1-1-5 アロマターゼ遺伝子とその分子進化について

アロマターゼは、シトクロム P450 スーパーファミリーに属し、その中の *CYP19* ファミリーに分類されている[28]。この P450 スーパーファミリー内の分子進化

を推定すると、アロマターゼの起源は「ミクロソーム型 P450」と「ミトコンドリア型 P450」が分岐する約 8~10 億年ほど前と推定されており、これ以降アロマターゼは P450 から分かれて独自のミクロソーム型として分子進化をたどったものと考えられている [29]。

アロマターゼ遺伝子をコードする *Cyp19* ゲノム DNA は動物種によって発現領域に相違がある。魚類のアロマターゼは脳と生殖腺において高発現が見られ、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おり、*Cyp19a* と *Cyp19b* の翻訳領域の相同性は約 60% となっている (Fig. 3A) [30-34]。また、その発現の特徴として、*Cyp19a* が生殖腺で優位に、*Cyp19b* が脳で優位に発現しているものの、*Cyp19b* は魚類において特異的な遺伝子になっており、鳥類及び哺乳類では発現が観察されていない。

一方、哺乳類における *Cyp19a1* はシングルコピー遺伝子であり、ヒトの *CYP19a1* は第 15 染色体の 15q21.1 に位置し全長約 123 kb の内、約 30 kb が翻訳領域のエキソンをコードする領域、約 93 kb が組織特異的プロモーターをコードする領域となっている [35]。また、そのアロマターゼ mRNA の発現は卵巣、脳、皮膚、胎盤、脂肪等の多岐の器官におよび 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 (プロモーター/エキソン P II、I. 3、I. 6、I. 2、I. f、I. 7、I. 5、I. 4、I. 8、I. 2a 及び I. 1)。卵巣特異的エキソン P II と脳特異的エキソン I. f の間には約 40 kb の隔たりがあり、エキソン I. 3、I. 6、I. 2a がその間に位置し、エキソン I. f の上流にエキソン I. 7、I. 5、I. 4、I. 8、I. 2 及び I. 1 が位置している (Fig. 3B)。

1-1-6 アフリカツメガエルのアロマターゼについて

アフリカツメガエルにおけるアロマターゼ遺伝子の発現の特徴として、脳と生殖腺における発現が全体の発現の大部分を占めている事があげられ、さらに脳では、性の分化にその作用を持つ生殖腺と比べても高いレベルでアロマターゼが発現している事が確認されている [17]。

また、ゼブラフィッシュ等の魚類における脳のアロマターゼの活性は、哺乳類よりも 100 倍以上高く、生殖腺よりも高いエストロゲン合成能力を有する事が報告されている。キンカチョウ等の鳥類でも同様に魚類、両生類ほど脳における活性は高くないものの、脳と卵巣において局所的にアロマターゼの活性が検出される[36, 37]。一方、哺乳類におけるアロマターゼの発現組織は多岐に亘り、脳のアロマターゼの発現は他組織と比較して必ずしも高いレベルになく、マウス、ヒト間における比較でも、ヒトではマウスよりも発現組織が多岐に亘っている[18, 38-40]。これらの知見は、魚類、両生類の脳における高いレベルのアロマターゼの発現は、哺乳類に比べ特異な役割を担っている可能性を強く示唆している。しかしながら、これまでに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転写調節機構及び、その役割は不明であった。

生殖腺のアロマターゼ研究に使用されている両生類としては、アフリカツメガエルに加え、アカガエル科のツチガエル(*Rana rugosa*)、アフリカツメガエルの近縁種のネッタイツメガエル(*Silurana (Xenopus) tropicalis*)等が挙げられる。ツチガエルでは同一種でありながら生息地域により性染色体の核型が異なり、西日本、東海、関東では XY 型及び北陸地方では ZW 型に分かれる[41]。また、ZW 集団のに見られる性ホルモン依存的な性分化機構は XY 集団の雌雄には見られないが、性ホルモンに対する感受性が地域集団による異なる事が報告されている。アフリカツメガエルではネッタイツメガエルに比べ先行研究による知見が豊富である点、及び胚発生から成体に至るまで、その全長が約 2~5 倍程度大きい点、幼生期の小サイズ時における薄切化の配向性の決定、複数の器官を多数切除する際のサイズメリット等の観点から、本研究ではアフリカツメガエルを実験動物として使用している。しかしながら、偽四倍体であるアフリカツメガエルに対し、ネッタイツメガエルでは二倍体である事、近年ではゲノム解読が終了した事等により可能となった新たな遺伝学的手法に立脚した研究が今後の展開として望まれる。

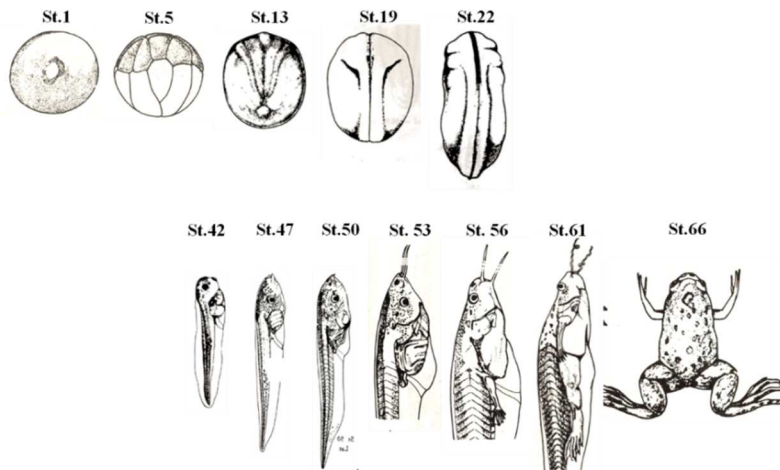


Fig. 1 アフリカツメガエルの発生段階表[42]

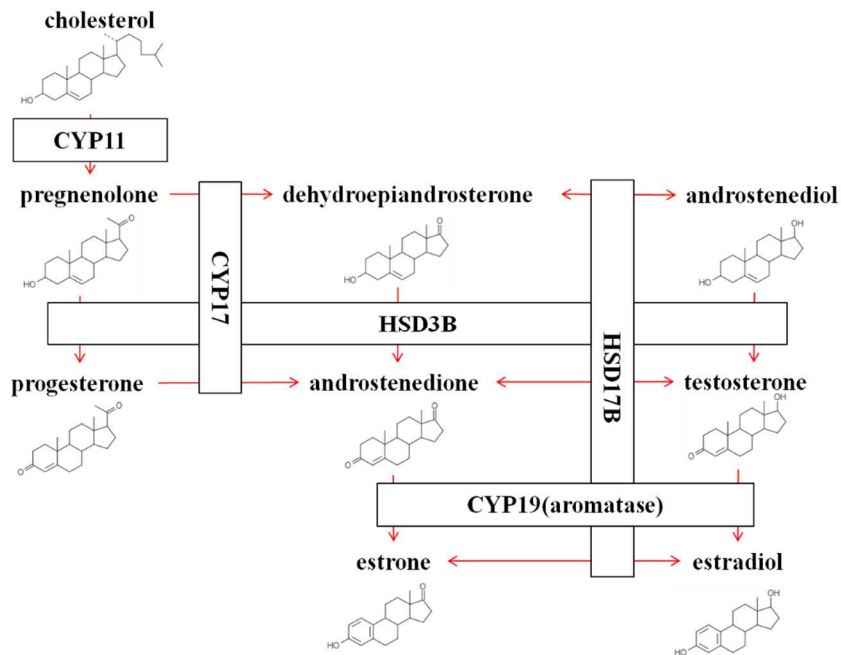


Fig. 2 エストラジオールの生合成経路

ステロイドホルモンの合成に関与する *Cytochromes P450* (CYP) 及び *hydroxysteroid dehydrogenase* (HSD) 酵素を示した。CYP11は副腎のミトコンドリアにおいて CYP11A1、CYP11B1、CYP11B2のサブタイプが存在し、CYP11A1は cholesterol の側鎖切断を行う。CYP17は副腎の小胞体において存在し、17位の水酸化及び17、20位のリアーゼ活性を有する。HSD3Bは副腎において C21 ステロイドホルモンの代謝を行い、HSD17Bは17位水酸化ステロイドの脱水素反応を行う。

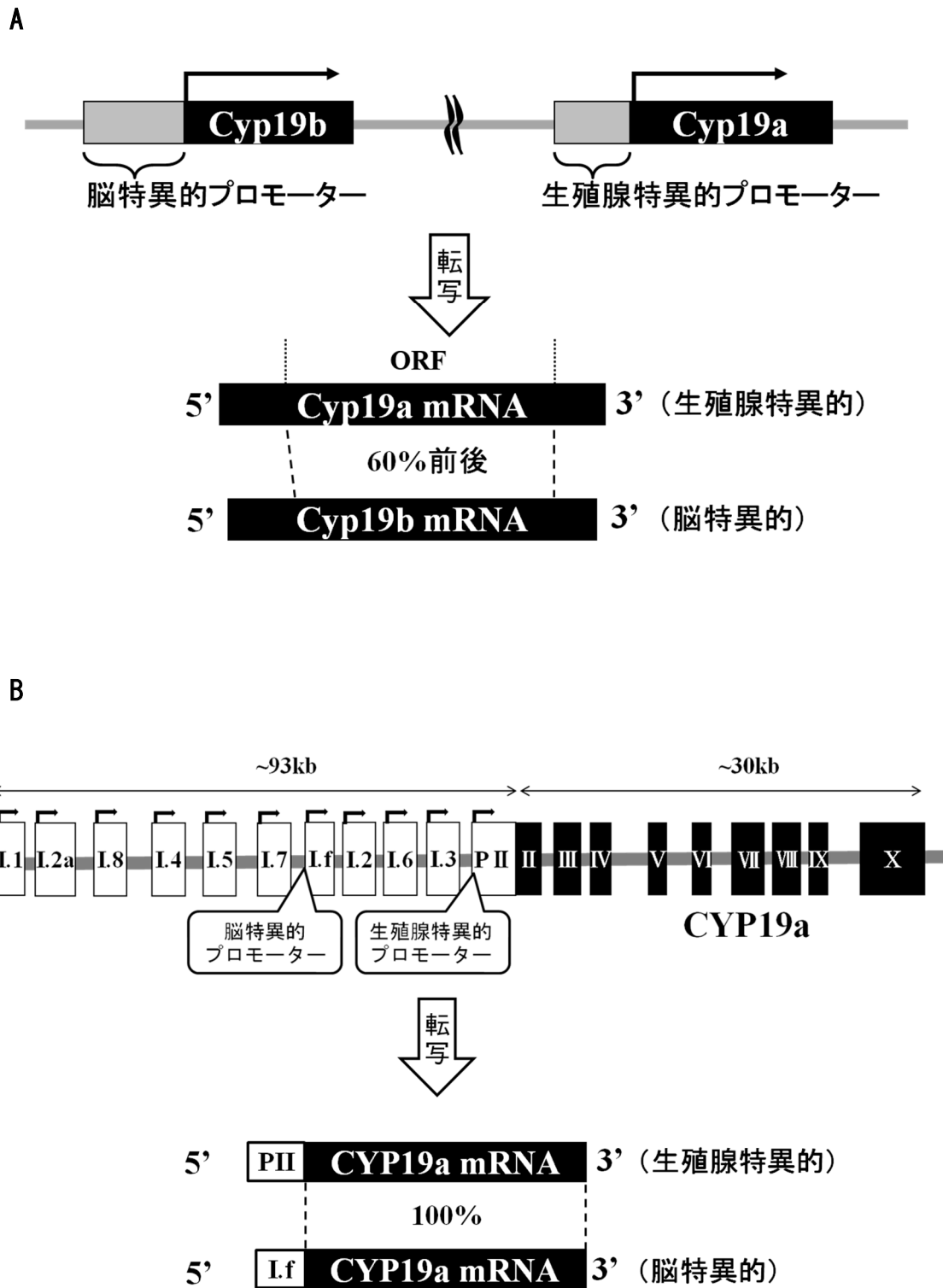


Fig. 3 (A) ゼブラフィッシュにおける *Cyp19* ゲノム DNA 及び mRNA

(B) ヒトにおける *CYP19* ゲノム DNA 及び mRNA

1-2 本研究について

背景の項で述べたように、E2 生合成の鍵酵素であるアロマターゼは、生殖腺においては雌化に重要な役割を担っており、脳においては脊椎動物の種により役割に多様性がある可能性が強く示唆されるものの、その詳細は不明である。

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高発現事由の解明を目的として研究を遂行し、そこから得られる新知見をまとめたものである。哺乳類では、これまでに生殖器官の性周期に関するアロマターゼ研究に加え、全ゲノム解読がなされているヒト、マウスでは脳の性分化、脳シナプスの長期増強現象(LTP)、神経細胞の保護、心筋細胞の保護等の関連研究がなされている。魚類、鳥類でも生殖腺の性転換に加え、脳の性分化、LTP、神経保護に関する脳のアロマターゼ研究がなされている。しかしながら、爬虫類、両生類においては、その種の特徴的な現象である温度依存性及び内部かく乱物質による性の転換現象へのアロマターゼの関連が報告されているものの、脳におけるアロマターゼの研究はほとんどなされていない。そのため、両生類のモデル生物として豊富な知見を有する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に関する研究は両生類全般における新規な知見になる事が期待される。

本論文は、第2章では、アフリカツメガエルの脳と生殖腺のアロマターゼ遺伝子のクローニングを行った後、脳特異的アロマターゼ遺伝子プロモーターを含むゲノム上の *cyp19a1* ゲノム DNA のクローニングし、ゲノム構造の解析を行った。次に、どのような機構によって脳アロマターゼが高発現しているのかを解明するために、第3章では、脳特異的プロモーターを含むゲノム構造の詳細な解析を行った。更に、第4章では、アロマターゼの時空間的発現変動パターンを調査した。また、生体内での E2 量とアロマターゼの発現との相関を見るために、各発生ステージにおける E2 の定量及び ER の発現解析を行った。これらの結果を総合し、総論において、魚類、哺乳類とは異なるアフリカツメガエルに特有のアロマターゼの発現機構について考察した。

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

2-1 序論

序章で述べたようにアロマターゼ遺伝子をコードする脊椎動物の *Cyp19* ゲノム DNA の構造は、魚類型とヒト型に大きく分かれる [18, 30-34, 38-40]。魚類のアロマターゼは生殖腺と脳において *Cyp19a* と *Cyp19b* の異なる遺伝子座にコードされているが、哺乳類の *Cyp19a1* はシングルコピー遺伝子であり、11 の組織特異的プロモーターにより組織毎に異なるプロモーター領域により転写が調節されている。また、鳥類ではキンカチョウにおいて生殖腺と脳におけるアロマターゼの発現が観察され、*Cyp19a1* ゲノム DNA 全長は哺乳類と同様にシングルコピー遺伝子上に生殖腺及び脳特異的アロマターゼプロモーターが並ぶ構造を取っている [19]。しかしながら、ヒトの *Cyp19a1* ゲノム DNA のプロモーター領域全体が約 93 kbp に達するのに対し、キンカチョウでは約 20 kbp であり、脳及び生殖腺特異的プロモーター間の距離の比較においても、ヒトでは 40 kbp 離れているのに対し [18, 21]、キンカチョウでは 6 kbp と大きく異なっていた。一方、両生類においては、これまでネツタイツメガエルの全ゲノム解読以前には、*Cyp19* ゲノム DNA 全長のクローニングの報告はなされていなかった。

そこで、まず両生類アフリカツメガエルの脳と生殖腺のアロマターゼ遺伝子が魚類型あるいはヒト型のいずれの型に属するのか検討するため、脳と生殖腺それぞれからアロマターゼ cDNA の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。

2-2 実験材料と方法

2-2-1 実験動物

生殖可能な成熟した雌雄のアフリカツメガエルは業者から購入した。それぞれの個体は使うまで脱塩素した水を水槽に満たし、水温 23 °C で飼育した。実験に使用するオタマジャクシは、雄雌の成熟個体から受精卵を得て、これを飼養して用いた。受精卵は、ヒト絨毛膜性生殖腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）500 単位（興和テバ：ゲストロン筋注用 5000 単位）を雄雌共に背部皮下（リンパ嚢）に注射し、暗所下で一晩抱接及び産卵させて得た。翌日、pH 7.8 に調整した 4.5% L-システイン塩酸塩水和物（ナカライテスク社製）を含む水溶液により、脱ゼリーを行い正常発生している受精卵のみを再び播種した。オタマジャクシの各発生段階は Nieuwkoop と Faber の発生段階表に従い各発生段階を同定した (Fig. 1)。オタマジャクシの飼育は成体同様、脱塩素した水を水温 23 °C に保ち飼育した。2 日に一回の水替えを行い、餌を食べ始める Stage 45 からは人工飼料を与えた。実験におけるオタマジャクシの取扱いは日本大学動物実験運営内規に従い行った。

2-2-2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法

Stage 50 のオタマジャクシの脳及び生殖腺から、Total RNA を抽出後、逆転写反応を行い、RACE 法により脳及び生殖腺のアロマターゼ mRNA 全長をクローニングし、塩基配列の決定及び比較を行った。また、本実験では、脳のアロマターゼの 5' 末端において長さの異なる複数の転写産物が見られたため、脳の産物においては 22 クローンの 5' -RACE 法を行い、転写開始点の詳細な検討を行った。

Stage 50 の脳及び生殖腺から Total RNA の抽出法には TRIzol 試薬 (Invitrogen 社製) を用いて抽出した。Total RNA 濃度は、DNase I (Invitrogen 社製) 処理によりゲノム DNA を分解し、260 nm の波長の吸光度により算出した。5' -RACE Ready

cDNA 及び 3' -RACE Ready cDNA は、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い、逆転写反応と既知配列の付加を行い作製した。5' 及び 3' -RACE に用いたアロマターゼ遺伝子特異的プライマー (GSP1/2、NGSP1/2) は、先行研究により、アフリカツメガエル成体の卵巣よりクローニングされているアロマターゼ遺伝子 (Gen Bank ID : AB031278) を基に作成した。プライマーデザインを Table 1 に示した。RACE PCR (Primary PCR 及び Nested PCR) は Advantage 2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用い、Primary PCR は GSP1/2 及び UPM により、94 °C 5 秒 / 72 °C 3 分を 5 サイクル、94 °C 5 秒 / 70 °C 10 秒 / 72 °C 3 分を 5 サイクル、94 °C 5 秒 / 68 °C 10 秒 / 72 °C 3 分を 27 サイクル行なった。Nested PCR は NGSP1/2 及び NUP により 94 °C 5 秒 / 68 °C 10 秒 / 72 °C 3 分を 25 サイクル行なった。最終 RACE 産物は、pGEM-T Easy Vector Systems (Promega 社製) を用いてクローニング後、塩基配列の決定を行った。

Table 1 5' -&3' -RACE に使用した各種プライマー

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
5' -RACE	
GSP1	GTCATTCATCCTCCAGAGCCTTGCGCATAAC
NGSP1	TGCTCTCTACATCCCGGTTACCA
3' -RACE	
GSP2	AAGCAAGCTAGGGCTACAGTGCATTGGC
NGSP2	TGGTAACCGGGATGTAGAGAGCAATGAC
UPM	(long CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT short CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

脳のアロマターゼの 5' -RACE 産物においては、それぞれのクローンにおいて 5' 末端は最大で 65 塩基の差が見られたため、併せて RT-PCR 法により、定性的に転写産物の分布を解析した。F1 から F5 までの各フォワードプライマーと、アロマターゼ翻訳領域内のリバースプライマー (R) を用い 5' -RACE Ready cDNA

をサンプルとし PCR を行った。それぞれのプライマーの配列と増幅サイズは、Table 2 に示した。PCR 反応は Advantage 2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用い、94 °C 5 秒 / 68 °C 10 秒 / 72 °C 3 分を 28 サイクル行なった。

Table 2 Exon I. f 領域の PCR に使用したプライマー

Gene Symbol	Gen Bank ID	Orientation	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
cyp19a1	AB272088	F1	TCAGAATTTTTTTTCAAGTCTCAG	380
		F2	CAAGTCTCAGGAAGCATATTAAGG	366
		F3	GAAGCATATTAAGGGATTCAGG	356
		F4	GCGATCTCAGAATGAAGAAGTA	332
		F5	GTACCAAGGAGACATAGGCGA	313
		R	CGCCATTAATCCAGACTCTCAC	

2-2-3 *cyp19a1* ゲノム DNA のクローニング

cyp19a1 ゲノム DNA は複数回に分けて全体をクローニングした。先行研究において、生殖腺特異的プロモーター PII は既に解析済みであったため[43]、本実験では脳特異的プロモーター I. f のクローニングを行った。その後、プロモーター I. f 及びプロモーター PII の間のイントロン領域を埋めるため、二回に分けて PCR を行い、*cyp19a1* ゲノム DNA の塩基配列を決定した。

成体のアフリカツメガエル肝臓からゲノム DNA の抽出と精製後、Universal Genome Walker Kit (Clontech 社製) を用いて、制限酵素処理及びアダプター配列の付加を行った。脳特異的プロモーター I. f のクローニングのためのゲノム DNA Walking 法に使用したアロマターゼ遺伝子特異的プライマーを Table 3 に示した。Primary PCR 及び Nested PCR は Advantage 2 PCR Kit (Clontech 社製) を用いて行った。Primary PCR は、GSP3 と outer adaptor primer (AP1) のプライマーペアにより、94 °C 25 秒 / 72 °C 3 分を 7 サイクル、94 °C 25 秒 / 67 °C 3 分を 37 サイクル、67 °C 7 分の順に行った。Nested PCR は、nested adaptor primer (AP2) と GSP4 のプライマーペアにより、50 倍希釈した Primary PCR 産物をサンプルとして、94 °C 25 秒 / 72 °C 3 分を 5 サイクル、94 °C 25 秒

/ 67 °C 3 分を 20 サイクル、67 °C 3 分の順に行った。PCR 産物はクローニングと塩基配列の決定を行った。クローニングした脳特異的エクソン I. f の推定上の転写開始点及びプロモーター I. f 上に結合する可能性のある予想転写因子は、それぞれ Neural Promoter Predictions Program (http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl) 及び TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp>) のコンピュータープログラムにより決定した。

プロモーター II 及びプロモーター I. f のイントロン部分の内、約 3.5 kbp は Universal GenomeWalker Kit を用い、上述と同様の PCR 条件により、GSP2 と AP2 のプライマーペアに続き、GSP1 と AP1 のプライマーペアにより増幅した。残りの約 1 kbp のイントロン領域は Advantage 2 PCR Kit (Clontech 社製) を用い、ゲノム DNA より増幅した。PCR は GSP5 と GSP7 のプライマーペアにより、94 °C 25 秒 / 72 °C 3 分を 7 サイクル、94 °C 25 秒 / 67 °C 3 分を 32 サイクル、67 °C 7 分に続き、GSP6 と GSP8 のプライマーペアにより、94 °C 25 秒 / 72 °C 3 分を 5 サイクル、94 °C 25 秒 / 67 °C 3 分を 20 サイクル、67 °C 3 分の順に行った。PCR 産物はクローニング後、塩基配列の決定を行った。

Table 3 cyp19a1 ゲノム DNA のクローニングに使用したプライマー

Primer name	primer sequence(5' to 3')
genome walking PCR	
GSP1	GCGTCACCTGAAAGTCCACCTATCTGT
GSP2	AGCTTCAGCCCCTCACCCGATCTCTA
GSP3	TGGTACTTCTTCATTCTGAGATCGCCC
GSP4	GATCGCCCTGAAATCCCTTTAATATGC
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
genome PCR	
GSP5	TGGTTCAGGTGCAGGGTTAGTTACA
GSP6	TCCTGCTGCTTTGTAGTTATGGCTCTTATG
GSP7	TTCAACCGACACTATTCACCAACAAGG
GSP8	TTGACACTGGATAAAGGATGGCAGAAC

2-3 結果

2-3-1 脳及び生殖腺特異的アロマターゼ cDNA のクローニングと構造解析

RACE 法により Stage 50 の脳及び生殖腺のそれぞれからクローニングしたアロマターゼ cDNA の全長を Fig. 4 に示した。脳及び生殖腺のアロマターゼの比較から、両者の塩基配列の翻訳領域は完全に一致しており、その長さは 1503 塩基で推定 501 アミノ酸配列をコードしていると考えられる。しかしながら、両配列は 5' 非翻訳領域において塩基配列及びその長さの違いが見られ、脳のアロマターゼ cDNA では 79 塩基、生殖腺のアロマターゼ cDNA では 82 塩基が、それぞれ脳あるいは生殖腺特異的な配列となっていた。また、クローニングしたアフリカツメガエルの *cyp19a1* と各生物種における *Cyp19a* 及び *Cyp19b* (魚類のみ) を分子系統樹により比較した (Fig. 5)。

脳のアロマターゼの 5' -RACE 産物においては、クローニングした各産物の長さに違いが見られたため、22 クローンの産物をクローニングし、Fig. 6A に示した。また、それぞれのクローンにおいて 5' 末端は最大で 65 塩基の差が見られたため、併せて RT-PCR 法により、定性的に転写産物の分布を解析した。F5 プライマーを用いた PCR 産物は、RACE 法の結果と同様に高レベルに検出されたのに対し、F4 から F1 プライマーを用いた PCR 産物では 5' 側に移動するのに従い徐々に、その産物量の減少が認められた (Fig. 6B)。

A TCAGAATTTTTTCAAGTCTCAGGAAGCATATTAAGGGATTCAGGGCGATCTCAGAATGAAGAAGTACCAAGGAGACATAGGCGAGCAGGGCCT 97
 B CCTTAGAAGTGCACGCTCCTAACTTTACTGGGATTATATACTTTAAATTAAGTGTGGTGGCTTACTGTCTCTATTCTTGCATAGGCGAGCAGGGCCT 100

A TGACAAGCCGTGAATATGGAAGCCTTGAATCCAGTGCAGTAAACATCACAGAAGCTGTTCCCACTCTGGCACCTGCCACTACTCTTTCTCTGCTGCTCT 197
 B TGACAAGCCGTGAATATGGAAGCCTTGAATCCAGTGCAGTAAACATCACAGAAGCTGTTCCCACTCTGGCACCTGCCACTACTCTTTCTCTGCTGCTCT 200

M E A L N P V Q Y N I T E A V P T L A P A T T L S L L L L
 A TCATTTTTGTGCTCATCTATGGAATCAAGAGGAGACATCTCTGATACCAGGCCAGCTTATTGCATGGGACTCGGGCCCTCATTCTTATGGCCG 297
 B TCATTTTTGTGCTCATCTATGGAATCAAGAGGAGACATCTCTGATACCAGGCCAGCTTATTGCATGGGACTCGGGCCCTCATTCTTATGGCCG 300

F I F V L I I L W N Q E E T S L I P G P A Y C M G L G P L I S Y G R
 A TTTTCTACTGACAGAAATGGCAAAGCAGAAATTAACAACAACATGTATGGAGAATTTGTGAGAGCTGGATTAATGGCGAGGAAACACTGATTATC 397
 B TTTTCTACTGACAGAAATGGCAAAGCAGAAATTAACAACAACATGTATGGAGAATTTGTGAGAGCTGGATTAATGGCGAGGAAACACTGATTATC 400

F L L T G I G K A A N Y Y N N M Y G E F V R V W I N G E E T L I I
 A AGCAAATCTTCAGCAACATTTACATCATGAAACACAGCCATTTGTCTCAGCCTTTGGAAGCAAGCTAGGGCTACAGTGCATTGGCATGAATGAAATG 497
 B AGCAAATCTTCAGCAACATTTACATCATGAAACACAGCCATTTGTCTCAGCCTTTGGAAGCAAGCTAGGGCTACAGTGCATTGGCATGAATGAAATG 500

S K S A T F L I M K H S H Y V S R F G S K L G L Q C I G M N E
 A GCATCATATTCATAGCAACCCATCTCTATGGAAGGTTCATCGGCCATCTTCATCAGAGCTTTGTCTGGTCCAGGACTTATGCAAACAACAGAAAAC 597
 B GCATCATATTCATAGCAACCCATCTCTATGGAAGGTTCATCGGCCATCTTCATCAGAGCTTTGTCTGGTCCAGGACTTATGCAAACAACAGAAAAC 600

G I F I F V L I I L W N Q E E T S L I P G P A Y C M G L G P L I S Y G R
 A TATAAGTCTACAATCACTACCTGGATAACCTGAGTAAATGTACAAATGAACTGGGAAATGTAGATGTCCTTAAGCTAATGAGGCTTATTATGTTAG 697
 B TATAAGTCTACAATCACTACCTGGATAACCTGAGTAAATGTACAAATGAACTGGGAAATGTAGATGTCCTTAAGCTAATGAGGCTTATTATGTTAG 700

I R S V T N H Y L D N L S N Y N N M Y G E F V R V W I N G E E T L I I
 A ACATCAAAACATCTCTTCAAGGATACCCCTAGATGAAATGAAATGTCTTAAAGTCCAGAAATCTTTGACGCTGGCAGGCTGCTGCTGTAAC 797
 B ACATCAAAACATCTCTTCAAGGATACCCCTAGATGAAATGAAATGTCTTAAAGTCCAGAAATCTTTGACGCTGGCAGGCTGCTGCTGTAAC 800

T S N N L F L R I P L D E N E I V L K I Q K Y F D A W Q A L L L K
 A CAGACATCTCTTAAAAATTTCTGGCTGTACAAAAATGAAAAATCAGCAATGATCTGAAGGAAGCTATTGAACTTCTCATTGAACAGAAAAGACA 897
 B CAGACATCTCTTAAAAATTTCTGGCTGTACAAAAATGAAAAATCAGCAATGATCTGAAGGAAGCTATTGAACTTCTCATTGAACAGAAAAGACA 900

P D I F F K I S W L Y K K Y E K S A N D L K E A I E L L I E Q K R Q
 A GAACTCTCAAGTCTGAGAAGCTGGATGAGGATATGGATTTTTCATCAGAATCATATTTGCCAGAAATCATGGAGATCAACAGCTGAGAATGTCAT 997
 B GAACTCTCAAGTCTGAGAAGCTGGATGAGGATATGGATTTTTCATCAGAATCATATTTGCCAGAAATCATGGAGATCAACAGCTGAGAATGTCAT 1000

K L S S E K L D E D M D F S E L I F A Q N H G D L T A E N V
 A CAGTGTATTCTGGAATGCTAATAGTGTCTCCGATACCATGCTGTATCTCTTCTTCTCATGTTAGTCTGATTGCTCAACACCCAAAGATAGAAGAAG 1097
 B CAGTGTATTCTGGAATGCTAATAGTGTCTCCGATACCATGCTGTATCTCTTCTTCTCATGTTAGTCTGATTGCTCAACACCCAAAGATAGAAGAAG 1100

Q C I L E M L I A A P D T M S V S L F F M L V L I A Q H P K I E E
 A GAATAATGAATGAAATGGATAAAGTATTGGTGACCGGATGTAGAGAGCAATGACATTCCAAATCTTAAAAATCTGGAGAGCTTTATTTATGAAAGCAT 1197
 B GAATAATGAATGAAATGGATAAAGTATTGGTGACCGGATGTAGAGAGCAATGACATTCCAAATCTTAAAAATCTGGAGAGCTTTATTTATGAAAGCAT 1200

G I M N E M D K I E Y F P K P N E F T L E N F E K T V P Y R Y F Q P F
 A GAGGTACCAACAGTGGTAGACCTGGTATGCGCAAGGCTCTGGAGGATGATATCATTGATGGTACTATGTGAAGAAAGGCACTAACATCATTTTAAAC 1297
 B GAGGTACCAACAGTGGTAGACCTGGTATGCGCAAGGCTCTGGAGGATGATATCATTGATGGTACTATGTGAAGAAAGGCACTAACATCATTTTAAAC 1300

R Y Q P V V D L V M R K A L E D D I I D G P Y V K K G T N I P K I L N
 A TTGGGGCGCATGCACAAAATGAAACTTTCCAAAACCGAAGGTTACCTTGGAAAAATTTGAAAAGACGGTCCATATCGTACTTCCAGCCCTTTG 1397
 B TTGGGGCGCATGCACAAAATGAAACTTTCCAAAACCGAAGGTTACCTTGGAAAAATTTGAAAAGACGGTCCATATCGTACTTCCAGCCCTTTG 1400

L G R M H K I E Y F P K P N E F T L E N F E K T V P Y R Y F Q P F
 A GCTCTGGTCCAGTGCATGTCCGGGAAGTACATAGCCATGGTATGATGAAAGTCTTCTGGTACTCTTCTCAAGAGGTACAAAGTGCAGACATTTGAG 1497
 B GCTCTGGTCCAGTGCATGTCCGGGAAGTACATAGCCATGGTATGATGAAAGTCTTCTGGTACTCTTCTCAAGAGGTACAAAGTGCAGACATTTGAG 1500

G S G P R A C A G K Y I A M V M M K V I L V T L L K R Y K V Q T L R
 A AGGAAGATGCCTGGAGAATATCCAAAATAACAATGATTTGTCATGCACCTGATGAAAGTCAACCTTCTTAGAGATGATCTTCTTCAAAAACACA 1597
 B AGGAAGATGCCTGGAGAATATCCAAAATAACAATGATTTGTCATGCACCTGATGAAAGTCAACCTTCTTAGAGATGATCTTCTTCAAAAACACA 1600

G R C L E N I Q N N D L S M H P D E S Q P S L E M I F I P K I N T
 A GCAGAGTCAAAGTGAACAGTGAATATAATCCATATATGTCACCTCTGGAATTAACAATGTTATTAGCATAGAGTGGTGACAGTGTGGTCTGTGT 1697
 B GCAGAGTCAAAGTGAACAGTGAATATAATCCATATATGTCACCTCTGGAATTAACAATGTTATTAGCATAGAGTGGTGACAGTGTGGTCTGTGT 1700

A E F K L *
 A TAAACTTTGATTTAACCGCTGCTCTGTTGCTCTTTGTAATATCAGTCACTAAAAATAGTGAACAATCATAACTGTCAGGGTTTTGAGTTTTCTAC 1797
 B TAAACTTTGATTTAACCGCTGCTCTGTTGCTCTTTGTAATATCAGTCACTAAAAATAGTGAACAATCATAACTGTCAGGGTTTTGAGTTTTCTAC 1800

A TGTTAATGTTGGAATAATGACATTCAGCAGCTTTAAAGGATGAGTAAACCAACAATGAAATGTCCTAAAGGGTTTTTAAACAGAATTGCCATTCAAGCA 1897
 B TGTTAATGTTGGAATAATGACATTCAGCAGCTTTAAAGGATGAGTAAACCAACAATGAAATGTCCTAAAGGGTTTTTAAACAGAATTGCCATTCAAGCA 1900

A GTTTTAAAAAGCTGATATCTACATTTGAAAATCTTGTGTTCTGGTAAAGGCTTCGGGGAGCAGTTGTTAATATGATATTTCAAGGCCCTTAAA 1997
 B GTTTTAAAAAGCTGATATCTACATTTGAAAATCTTGTGTTCTGGTAAAGGCTTCGGGGAGCAGTTGTTAATATGATATTTCAAGGCCCTTAAA 2000

A TACAGTAGAGTGGCAGAACATTTAGACACAAACCAAGATGGTGTGCATGACAGGGCTTTGATAGAAGAAAACATTTAATGAAATTAAGAA 2097
 B TACAGTAGAGTGGCAGAACATTTAGACACAAACCAAGATGGTGTGCATGACAGGGCTTTGATAGAAGAAAACATTTAATGAAATTAAGAA 2099

A TAGATACAAATATGCCAGGTCAAACATAATTTA-TTTTTTTTGTGCTACTGTTTTTAAAGGCTGTGCTTTTACTCCTGTCCAGTACAGTGATATT 2196
 B TAGATACAAATATGCCAGGTCAAACATAATTTA-TTTTTTTTGTGCTACTGTTTTTAAAGGCTGTGCTTTTACTCCTGTCCAGTACAGTGATATT 2199

A TTTATTGTTTATTTTACAGTATTATTGATAATAAATATGCCTATATTCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2296
 B TTTATTGTTTATTTTACAGTATTATTGATAATAAATATGCCTATATT-TAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2275

Fig. 4 脳及び生殖腺よりクローニングしたアロマターゼ cDNA 全長の配列比較

A と B は、脳のアロマターゼ cDNA と生殖腺のアロマターゼ cDNA の塩基配列をそれぞれ示し、塩基配列の下に両者で共通の推定アミノ酸配列を示した。網掛けで両者の配列の違い、アンダーラインでポリ A シグナル、二重のアンダーラインでストップコドンを示した。また、それぞれ脳及び生殖腺特異的な塩基配列は斜体で示した。

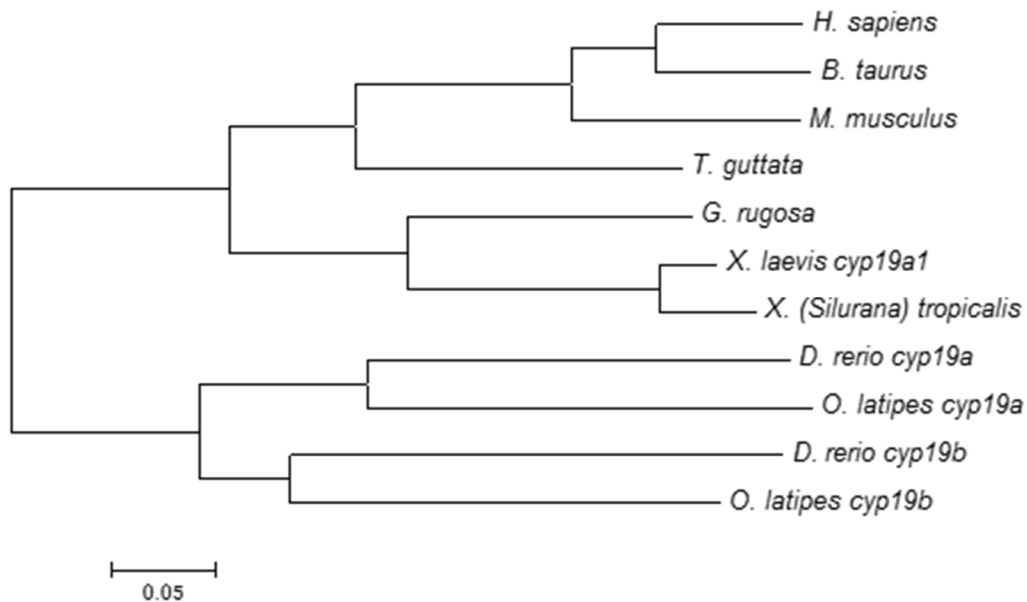


Fig. 5 *Cyp19a* 及び *Cyp19b* の分子系統樹

アフリカツメガエル及び各脊椎動物種の *Cyp19a* 及び *Cyp19b*(魚類のみ) の塩基配列において MEGA6 (<http://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/>) を使用し、分子系統樹を作成した。各脊椎動物種の GenBank ID は以下に示した。

Homo sapiens (J04127), *Bos taurus* (NM_174305), *Mus musculus* (NM_007810), *Taeniopygia guttata* (NM_001076691), *Glandirana rugosa* (AB178482), *Xenopus laevis* (NM_001085653), *Xenopus tropicalis* (NM_001097161), *Danio rerio* (*Cyp19a*: AF183906 / *Cyp19b*: AF183908), *Oryzias latipes* (*Cyp19a*: D82968 / *Cyp19b*: AB591736)。

2-3-2 プロモーター I.f とエクソン PII-I.f 間のイントロンのクローニング

cyp19a1 遺伝子の生殖腺特異的エクソン PII のプロモーター領域約 2.2 kbp は、先行研究において解析が行われている [43]。そこで引き続き、アフリカツメガエルのゲノム DNA ライブラリーからエクソン I.f のプロモーター領域約 1.5 kbp のクローニングを行った。*cyp19a1* ゲノム DNA のエクソン PII-I.f 間のイントロン領域は、2 回の PCR に分けて、それぞれ約 3.5 kbp と約 1 kbp の長さでクローニングした (Fig. 7)。生殖腺特異的エクソン PII は、脳及び生殖腺のアロマターゼに共通のエクソン II の直上流に位置しており、脳においてはエクソン I.f が選択的スプライシングにより、エクソン II のスプライスアクセプター部位に連結している事が予想される。*cyp19a1* のエクソン PII と I.f 間は約 6.7 kbp 離れていた。また、脳特異的エクソン I.f の推定の転写開始点から 25 bp 下流には、スプライスドナー部位の GT 配列が位置していた (Fig. 8)。

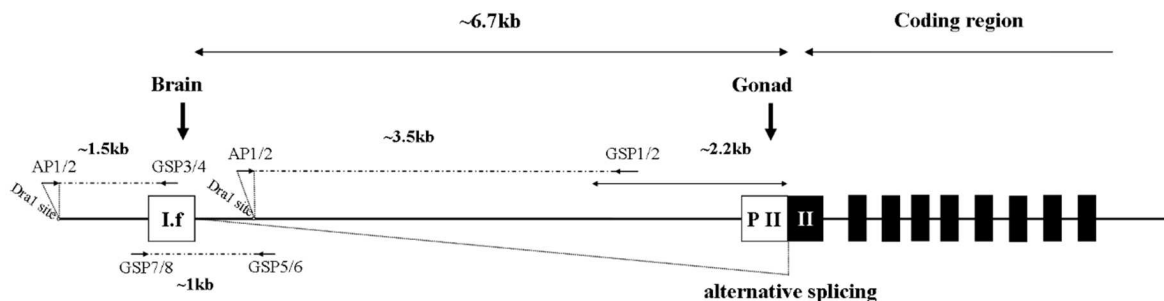


Fig. 7 アフリカツメガエルの *cyp19a1* ゲノム DNA の構造

生殖腺特異的エクソン PII 及び脳特異的エクソン I.f を含む *cyp19a1* ゲノム DNA の 5' -フランキンク領域約 8.2 kbp を模式的に示した。生殖腺特異的プロモーター PII (GenBank ID: AB179887) 約 2.2 kbp 及び脳特異的プロモーター I.f (GenBank ID: AB537167) 約 1.5 kbp とエクソン II-I.f 間のイントロン領域 (GenBank ID: AB682996) 約 6.7 kbp を示した。また、ゲノム配列特異的に作成した GSP1-8 と Genome walking kit の AP1/2 の位置を矢印で示した。

2-3-3 プロモーターI.fの配列解析

5'-末端の配列はRACE産物毎に長さが異なっていたため、便宜的に推定上の転写開始点をコンピュータープログラムのNeural Promoter Predictions Programにより設定した(Fig. 8)。引き続き、この位置を転写開始点(+1)とし、TFSEARCHプログラムによりエクソンI.fの5'-フランキング領域の配列解析を行った。TFSEARCHからは、*GATA-1/2*、*Oct-1*、*C/EBPalpha*、*Smad*、*HFH-2 (FOXD3)*、*STAT χ* 、*AP-1*、*XFD-1*、*p300*、*Sox-5*、*c-Myc*等の複数の推定上の転写因子結合配列が見られた。さらに、5'-RACEによってクローニングしたエクソンI.fの周辺の2ヶ所にイニシエーター配列が存在していた(-6/+1 bp及び-60/-54 bp)。

Fig. 9にヒト(*Homo sapiens*)、ウマ(*Equus caballus*)、マウス(*Mus musculus*)、キンカチョウ(*Taeniopygia guttata*)及びアフリカツメガエルのプロモーター/エクソンI.fの比較を示した。5脊椎動物種間では、38 bpの塩基配列における相同性が84.2%と非常に高度に保存されていた(アフリカツメガエルの-127/-90 bpの領域)。この保存配列のすぐ下流には、ウマ、マウスではTATA-boxが存在するものの、同じ位置にキンカチョウでは非典型的なTATA-boxを持つのみで、アフリカツメガエルではTATA-box配列が存在しなかった。

```

-1526                                     AAAG GAGTTGCTTG TAAATTTAGG
-1500 AGAGCAAGAA CTCTGTTGTT ATATCCATTT ATAAACACTG GGCAGTAACC AATAGTAACC AATCAGTAAT TAGTAGTGAT CGGCAAAAAA TTCAGATTTT
                                     Oct-1
-1400 TCGCAGGGCGA ATTTTCTCCC CAGTTTTGCG AATACATTGG CCAGTAGCAA CACGTGGAAA TTCACCACAA ATCCATGCCT GCTGAATTTA TTGCGCTATC
                                     c-Myc
-1300 ACTAGTGATT AGCTTTTTAC AGTCAGCTGC AGGTTGAACA CTGTAAGCAA TCATCTGATT GGTGTGTCATG GGTCCAGCC CAGGAGCAAT TTTGCCAGI
                                     GATA-1
-1200 GTTTATAAAA AAGCCCAAT GTTAGTACTT GTTTTACAC AACCAGAAAT GGGCATCAGT GCTATATGTA GTATAGAGTA TCCCTTGTA GAAGCTTCTT
                                     TATA C/EBPalpha
-1100 TGTTCCTG ACAAGCTTCT CAACCTACTG TTTCTCCAG TAGACGATAC GAAAACTAT AAATAATTAT AATTACATCA ATATTTCTAA TCTGACTTGC
                                     GATA-1 Oct-1
-1000 AATTTGAATA AAACAGGAGA AGTCTAAGCT ATAAATCAAC CATACTACAA GGCTGATGAT AAAAGAGGTT GTTCACCTTT GCGTTAACTT TTGGTATGAT
                                     GATA-1
-900 GTAGAGAGTG ATATTCTGAG ACAATTTGCA ATTGGTTTTT ATTTTTTATT GTTTGTTGTT TTTGAGTTAT TTAGCTTTTT ATTCAGCAGC TCTCCAGTGT
-800 GTGATTTT CAG CAGTCTGATT GCTAGGGTCC AAATTATCCT AGCAACCGGG CATTGATTTG AATAAGATAC TGGAAATATGA ATAGAAAGAT GAGTAATAAA
                                     GATA-1 GATA-1 Oct-1
-700 AAGTAGCAAT AACAATACAT TTGTAGCCTT ACAGAGCATT TGTTTTTTAG ATGGAGTCTG TGGCCTCCCA TTTGAAAGCT GGAAGAGTG AGAAGAAAAA
                                     Sox-5 p300
-600 GGCAATAAT TAAAAAATA TATAAAATA ATAATGAAGA CAAAATGAAA AGTTGCTTAA AATTGGCCAT TCTATAGCAT AATAAAAGTT GCTGGTCCAG
                                     Oct-1 XFD-1 C/EBPalpha
-500 TGGCTGGTAG GGATAATAGG TAGGGATAAT ATGAATGTGA GTGTTAAGA GAAACACTGT TCTCTTTTAT CATTTTTATG CAGAAATTAA TTTTTGGCT
                                     GATA-1
-400 GGAATGGTCA GGGTAAAAAT GACTCTTGT TAATTGAAA ATAGCAATTT ATTTGAATCA IGTTAATGCT TTCTGCTTCG ACGACAGCTT CAAATTACAA
                                     GATA-2 AP-1
-300 AGGTAAACAG CTGGACCCAT CTAATGCAAT TATTTTCGTA TATGAAGATA TTTTCTACAA TTTGTTTTTG AGACGCTGAT GGAAAACTG GTTCAGGTGC
                                     GATA-2 GATA-1
-200 AGGGTTAGGT TACACATTTG CCTGTAAGGT CCTGCTGCTT TGTAGTTATG GCTCTTATGA AATAAATCAT CTGTATCCAA GCAACTGATC TCATAGCAAC
-100 TTCAAGCACC TTTTCCAATA ATGTCACACA ACAGCGCTGG TCAGAAATTT TTTTCAAGTC TCAGGAAGCA TATTAAGGGG ATTCAGGGC GATCTCAGAA
                                     STATx Initiator HFH-2 (FOXO3) Smad Initiator
+1 TGAAGAAGTA CCAAGGAGAC ATAGttAGGA TTCTGTTTGA CTTTGTGTGC TTTTTTTTAA GGATTTACAT CTCATTCTGA ACAGACAAGC ACAGGATTCA
                                     Splice donor

```

Fig. 8 アフリカツメガエル脳特異的プロモーター I. f/5' -フランキンゲ領域の構造
推定上の転写開始点はNeural Promoter Predictions Programにより便宜的に設定した。
塩基配列は推定転写開始点を+1 として番号を付した。予想転写因子結合配列は下線で
示した。脳特異的エキソン I. f の配列は斜体で示し、スプライスドナー部位は小文字
で表記した。



Fig. 9 各脊椎動物種間のプロモーター/エキソン I. f 領域の比較

プロモーター/エキソン I. f 領域の比較は、a: *Homo sapiens* [44]、b: *Equus caballus* [45]、c: *Mus musculus* [46]、d: *Taeniopygia guttata* [19]、e: *Xenopus laevis* の 5 種間で行った。配列のアライメントは GENETYX コンピュータープログラムにより行い、推定転写開始点を+1 として番号を付した。脳特異的エキソン I. f の配列は斜体で示した。また、基本転写因子結合配列は太字で示し、スプライスドナー部位は小文字で表記した。5 脊椎動物種間において同一の塩基配列はアスタリスクで示した。転写開始領域がアフリカツメガエルでは他の生物種と異なり、アフリカツメガエルの転写開始領域付近の配列は他の生物種では保存されていなかった。

2-4 考察

アフリカツメガエルの脳と生殖腺のアロマターゼ遺伝子は、5' 末端にのみ配列の違いが観察された (Fig. 4)。そのため、魚類のアロマターゼ遺伝子が生殖腺では *Cyp19a* ゲノム DNA、脳では *Cyp19b* ゲノム DNA 上にコードされているのに対し、アフリカツメガエルにおけるアロマターゼ遺伝子は、哺乳類と同様に一つの *cyp19a1* ゲノム DNA から脳及び生殖腺特異的プロモーター領域により転写が行われている事が予想された。そして、続く *cyp19a1* ゲノム DNA のクローニングからも脳特異的エクソン I. f 及び生殖腺特異的エクソン PII が単一ゲノム DNA 上に並んでいる事が確認された (Fig. 7)。

このアフリカツメガエルにおける *cyp19a1* ゲノム DNA は、他の脊椎動物種の *Cyp19a1* ゲノム DNA と比較すると、マウス及びヒトの脳特異的プロモーター I. f はエクソン PII から上流 36 kbp 及び 40 kbp に位置しているのに対し [18, 21]、アフリカツメガエルのプロモーター I. f ではエクソン PII から上流 6.7 kbp に位置している。また、鳥類のキンカチョウでは、プロモーター I. f はエクソン PII から上流 6 kbp に位置し、アフリカツメガエルと同程度の距離で並列している [19]。マウス及びヒトの *Cyp19a1* ゲノム DNA では、プロモーター I. f-P II 間において、プロモーター I. 3、I. 6 及び I. 2 が存在しており、これらの下流のエクソンでは I. f、P II が脳、卵巣特異的な配列として、I. 3、I. 6 及び I. 2 が脂肪、骨及び胎盤特異的な配列として、様々な組織で発現が確認される。これらの知見は、哺乳類においては、脊椎動物の進化に伴い、新たに挿入されたプロモーターを使用する事で、組織特異的アロマターゼの発現を可能にしている事を示唆している。

本研究において、アフリカツメガエルの脳特異的エクソン I. f は少なくとも 2 ヶ所の選択的 5' 非翻訳領域が存在する事が強く示唆された。さらに、ヒト、マウス及びウマにおいて典型的な TATA box 配列が見られる位置に、アフリカツメガエルのプロモーター I. f には TATA box 配列が確認されなかった (Fig. 9)。

しかしながら、アフリカツメガエルのプロモーター I. f には 2 つのイニシエーター配列が観察される。近年の知見では転写開始点の直上流に TATA box 配列を含むプロモーターを持つ遺伝子では、組織特異的にシングルサイトによる転写開始の制御が成され、発生に関与する遺伝子に多く存在している事が示されている [47]。一方、イニシエーター配列はコンセンサス配列の相同性が比較的緩く、プロモーター上にイニシエーター配列を含む遺伝子の転写開始点はイニシエーター配列自身とオーバーラップした形となる事が多い事が示されている。また、TATA box 配列が存在しなくとも、イニシエーター配列上では TFIID が誘導されるものの、転写開始位置の散在が確認されている [48]。本研究では、脳におけるアロマターゼの 5' -RACE 産物が 2 ケ所のイニシエーター配列周辺においてクローニングされた。そのため、プロモーター/エキソン I. f 上のこれらのイニシエーター配列がアフリカツメガエル脳のアロマターゼにおける転写開始に関与している可能性が支持される。

これらの知見より、魚類から哺乳類への進化に沿ったアロマターゼ発現の組織特異性の獲得と厳密な転写開始点を規定する TATA box 型のプロモーターへの切り替わりとの間に相関性が見られ、アロマターゼ遺伝子の発現組織とプロモーター構造の変化が密接に関係している事が窺える。

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

3-1 序論

先行研究において、ヒト、マウス、キンカチョウにおける脳特異的アロマターゼプロモーター I. f 間では 55 bp の配列が保存されている事が、解析されている[19]。本研究では、新たにアフリカツメガエルを比較対象に加え、その内の -129/-91 bp 領域において 38 bp が 5 種の脊椎動物種間で高い相同性 (84.2%) を持つ事を示した。ヒトのアロマターゼプロモーター I. 7 はイニシエーター配列を有する TATA-less プロモーターとして同定されており、ルシフェラーゼアッセイ法による解析からプロモーター I. 7 中の -299/+81 bp を含むコンストラクトにおいて最大の転写活性化効率が確認されている[49-51]。また、マウスにおいてアロマターゼプロモーター I. f を使ったプロモーターアッセイでは転写開始点の上流 200 bp までに転写活性の上昇が観察され、この領域内では E2 のフィードバック作用による転写活性の上昇が見られる。これらの事から、脳特異的アロマターゼプロモーターの転写開始点上流 300 bp 以内に、脊椎動物種間で共通の転写活性化機構が存在している可能性が示唆される[20, 52]。

しかしながら、第2章より転写開始領域がアフリカツメガエルでは他の生物種と異なる事、及びアフリカツメガエルの転写開始領域付近の配列は他の生物種では保存されていない事から、哺乳類、鳥類とも異なるアフリカツメガエル独自の脳アロマターゼの転写制御機構の存在が予想される。

本章では、アフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼプロモーター上の転写に重要なシス領域の解析結果を中心に記述した。初めに、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、その後ルシフェラーゼアッセイ法により転写に関わるシス領域を同定した。次に、アフリカツメガエルの脳より抽出した核タンパク質を用い、転

写開始領域上流 300 bp における核タンパク質の結合領域を 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保存配列では、核タンパク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タンパク質の同定を試みた。

3-2 実験方法

3-2-1 DNase I フットプリント法

脳特異的プロモーター I.f の配列中で、他生物種と相同性が高かった転写開始点付近約 300 bp における脳の核タンパク質の結合領域を DNase I フットプリント法により解析した。ラダーの可視化のための DIG 標識 DNA は、脳特異的プロモーター I.f を含むプラスミド DNA を鋳型として、Advantage 2 PCR Kit (Clontech 社製) を用いて DIG 標識プライマー (DIG -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) 及びリバープライマー (AAT GCA ATT ATT TTC GTA T) により 94 °C 1 分、94 °C 30 秒 / 50 °C 30 秒 / 72 °C 3 分を 32 サイクル、72 °C 5 分のサイクルで PCR を行い作製した。この PCR 産物を DIG 標識 DNA として使用した。

Stage 52 の脳の核タンパク質の抽出は、Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents (PIERCE 社製) を用いて行った。脳を摘出後、組織重量の 5 倍の Cytoplasmic Extraction Reagent I (GER I) を加え、ホモジナイズし、15 秒間攪拌、氷上で 10 分間静置した。次に、組織重量の 0.275 倍の Cytoplasmic Extraction Reagent II (GER II) を加え、5 秒間攪拌、氷上で 1 分間静置した。5 秒間攪拌し、最大速度で 5 分間遠心分離した後、上清 (細胞質抽出物) を回収した。組織重量の 2.5 倍の Nuclear Extraction Reagent (NER) をペレットに加え、15 秒間攪拌し、氷上で 10 分間静置した。その後、15 秒間攪拌、氷上で 10 分間静置を 4 回繰り返した。最大速度、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清 (核抽出物) を回収した。抽出した核タンパク質の濃度はブラッド・フォード法により測定した。

DNase I により分解される DNA 配列の指標となるシーケンスラダーは脳特異的プロモーター I.f を含むプラスミド DNA を鋳型として、SILVER SEQUENCE DNA Sequencing Reagents (Promega 社製) を用い、DIG 標識プライマーを使用したシーケンス PCR により、95 °C 2 分、95 °C 30 秒 / 42 °C 30 秒 / 70 °C 1 分を 50 サイクルで作製した。

次に、DIG 標識 DNA と核タンパク質複合体を形成し、DNase I 処理を行った。DNase I 処理は、DNase I Amplification Grade Kit(Invitrogen 社製)を用いて行った。DIG 標識 DNA 3 μ g、10 \times DNase I Reaction buffer 10 μ l、核タンパク質を加え、ミリ Q 水で全量を 100 μ l とした。Stage 52 の核タンパク質は、無添加及び 50 ng、200 ng 添加を用意し、37 $^{\circ}$ C 30 分 / 25 $^{\circ}$ C 5 分静置した後、DNase I を 1 μ l 加え、60 秒間反応させた。フェノール/クロロホルム及び反応停止液 (25 mM EDTA[pH 8.0]) を加え完全に反応を停止し、上清を回収後、エタノール沈殿及び洗浄を行い、6% 変性ポリアクリルアミドゲル (尿素含有) による電気泳動を行った。その後、20 \times SSC (0.3 M クエン酸ナトリウム二水和物、3 M NaCl) を用いて一晩、キャピラリーブロットにより POSITIVELY CHGD. NYLON TRANSFER MEMBRANE (GE Healthcare 社製) に DNA の転写を行った。UV crosslinker により DNA をメンブレンに固定した後、メンブレンは DIG 標識 DNA に、AP 標識抗 DIG 抗体 (Roche 社製) を結合後、Disodium 3-(4-methoxyspiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl)phenyl phosphate (CSPD) (Roche 社製) を発光基質として X 線フィルムに現像を行い、可視化した。

3-2-2 リアルタイム RT-PCR 法

各 Stage の脳、生殖腺、肝臓において *foxd3*, *smad1*, *smad2*, *smad4. 1*, *smad4. 2*, *stat1*, *stat3*, *stat5*, *stat6* の各遺伝子の発現比較及び発現変化を測定するため、リアルタイム RT-PCR 法による発現解析を行った。各組織から Total RNA を抽出した後、DNase I 処理 (Invitrogen) を行った。一本鎖 cDNA の合成は、500 ng の Total RNA から PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa) を用いて行った。リアルタイム RT-PCR は reaction buffer、MgCl₂、dNTPs、DNA polymerase 及び SYBR Green I 含む KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems) を用いて反応容量 20 μ l で行った。それぞれの PCR 溶液には、cDNA 1 μ l、F 及び R プライマー 0.2 μ M を含むように行った。使用した遺伝子のプライマーペアは Table 4 に示した。

PCR 反応は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社製) を用い、95 °C で 2 分間の後、95 °C で 15 秒間、60 °C で 1 分間を 45 サイクル行った。PCR 反応は少なくとも三重測定で行った。

Table 4 リアルタイム RT-PCR 法に使用したプライマー

Gene Symbol	Gen Bank ID	Orientation	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
eef1a1	NM_001087442.1	F	CCAGATTGGTGCTGGATATG	318
		R	TTCTGAGCAGACTTTGTGAC	
foxd3	AJ298865	F	GTTCCCAACAATCTCATCTCC	94
		R	AGTGTGATTGCCCCAGAGA	
smad1	U77639	F	TGCGAGTATCCCTTTGGTTC	195
		R	TGGAAAAGTTGCGTTGTGAG	
smad2	NM_001091495	F	CAGTTGTGAAGCGCCTGTTA	231
		R	GTCCCAAAATTCAGAGCAA	
smad4.1	AB022721	F	ACGGACATCTTCAGCATCAC	133
		R	TCAAAGTAGGCAATGGAGCA	
smad4.2	AB022722	F	GCCGGTCAGTAAAAGAGGAG	121
		R	GTAGGAGGCATTGGTGGAAG	
stat1	NM_001088787	F	AAGCCACCAAAGAATCAACA	101
		R	GGATAAGGGATGCGATTTTG	
stat3	AB017701	F	CAACAATCAGTCGGTCACAA	169
		R	CCTTCTCTTCCAATCAGCAA	
stat5	NM_001091208	F	ATTGTTACGGCAGTCAGG	185
		R	AGGTTTTTCATCGCTCAGTCC	
stat6	NM_001095162	F	GGTTAATGGAGTGGGAGCAA	121
		R	TGGAGTGGAGTAGGGTGGAG	

3-2-3 ゲルシフト法

ゲルシフト法はの DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche 社製) を使用し行った。プローブとして、*FoxD3* (F: CGC TGG TCA GAA TTT TTT TTC AAG T / R: ACT TGA AAA AAA ATT CTG ACC AGC G) 及び保存配列 (F: AAG CAA CTG ATC TCA TAG CAA CTT CAA GCA CCT / R: AGG TGC TTG AAG TTG CTA TGA GAT CAG TTG CTT) の目的シスエレメントを含む配列を DIG 標識した。DIG 標識配列 0.8 ng

は、核タンパク質 0.25–3 μg 、Binding buffer 4 μl 、Poly-L-lysine 0.1 μg 、Poly-d(I-C) 1 μg 、Poly-d(A-T) 1 μg を全量 20 μl とし混合後、室温 15 分放置し、サンプルに Loading buffer 5 μl を加え、全量を 25 μl とした(非標識シスエレメント配列を添加時には 0.1 μg を上記に加えた)。サンプルは 0.5 \times TBE により、8%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った後、3 MM 濾紙 4 枚、PVDF メンブレン (GE healthcare 社製)、電気泳動ゲル、3 MM 濾紙 4 枚の順に重ね、セミドライ式ブロットング装置にて 4 mA/cm² で 30 分間メンブレンに転写した。転写終了後、メンブレンのヌクレオチドを UV クロスリンク (1200 \times 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) で固定し、Wash buffer で洗浄 5 分間及び 1% ブロッキング溶液中にて 30 分間振盪した。次に抗原抗体反応として、Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments を用いて、30 分間、室温で反応後、Wash buffer で洗浄を 15 分間、2 回行った。発色反応を行うために、Detection buffer (pH 9.5) に 5 分間浸し、CSPD 液に 5 分間反応後、10 分間 37 $^{\circ}\text{C}$ に放置した。その後、X 線フィルムへの現像を行った。

3-2-4 DNAP アッセイ法

DNAP アッセイ法は Dynabeads M-280 streptavidin (VERITAS 社製) を使用し行った。ビオチン化保存配列 (F: Biotin-AAG CAA CTG ATC TCA TAG CAA CTT CAA GCA CCT / R: AGG TGC TTG AAG TTG CTA TGA GAT CAG TTG CTT) は SIGMA 社に受注生産し、相補鎖のアニーリング後、DNA プローブとした。アフリカツメガエル Stage 50 の核タンパク質及び保存配列の結合反応は、核タンパク質 100 μg 、ビオチン化 DNA 1 μg 、Poly dI · dC 15 μg 、DNAP buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.9、80 mM KCl、1 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTT、10% (W/V) glycerol、0.1% tritonX-100) を全量 500 μl とし混合後、30 分間静置した。Dynabeads M-280 streptavidin 50 μl を磁石で沈降後、上清を取り除き各タンパク質-ビオチン化 DNA 反応液を加え、30 分間チューブを回転混和し Dynabeads に DNA プローブを固定した。次に磁性ビーズを沈降後、上清を取り除き、DNAP buffer 500

μ l で洗浄を 3 回行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の sample buffer を 20 μ l 加え、2 分間 100 °C 熱処理を行い、上清回収後、サンプルとした。サンプルは 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、CBB Stain One (ナカライテスク社製) により染色した。

3-2-5 統計解析

統計解析は Microsoft Excel により行い、発現量のグラフは平均値±標準誤差で示した。3 サンプル以上の発現量の比較は有意差検討として分散分析による検定の後、ポストホック検定として Tukey の検定を行った。ZW と ZZ の 2 サンプル間の mRNA の発現比較は Student の T 検定により行った。各検定の有意差水準は $P < 0.05$ とした。

3-3 結果

3-3-1 脳及び各組織におけるアロマターゼ遺伝子の発現比較

アフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼ mRNA の発現パターンをリアルタイム RT-PCR 法により解析した (Fig. 10)。Total RNA はアフリカツメガエル胚の Stage 42、46、50、54 の脳及び Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓から抽出した。各脳の Stage 及び組織において定常的に発現している *eef1a1* (*EF-1 α*) mRNA は内部標準として検出を行った (Fig. 10C 及び D)。脳において、アロマターゼ mRNA の発現は Stage 42 から 50 にかけて上昇し、Stage 54 まで維持された (Fig. 10A)。また、Stage 50 の組織別では脳の発現が肝臓及び性分化時期である生殖腺よりも高いレベルに発現していた (Fig. 10B)。

3-3-2 DNase I フットプリント法によるプロモーター I. f の解析

脳のアロマターゼの発現に関わる因子の特定のため、プロモーター I. f 上の重要なシス領域の検討を行った。Fig. 6Bの脳アロマターゼの転写産物の解析よりF4プライマーに比べF5プライマーにおけるPCRにおいて高レベルに増幅が見られた事から、F4プライマーを含む上流領域に転写に重要な因子がある事が予想された。また、アフリカツメガエルのプロモーター I. fの-127/-90 bpの領域は、5 脊椎動物種間において38 bpの保存配列となっているため、プロモーター/エクソン I. fのこれらの領域に焦点を当て、DNase Iフットプリント法を行った (Fig. 11)。基本転写因子の結合が予想されるイニシエーター配列に加え、*FoxD3*、*Smad*、*STATx*の予想転写因子結合配列において、DNase IによるDNA分解のラダーが、Stage 52の脳の核抽出物の添加により消失した。そのため、これらの領域への核タンパク質の結合が考えられる。さらに、予想転写因子は不明であるものの、38 bpの保存領域においてもDNase Iに対する保護効果が見られた。

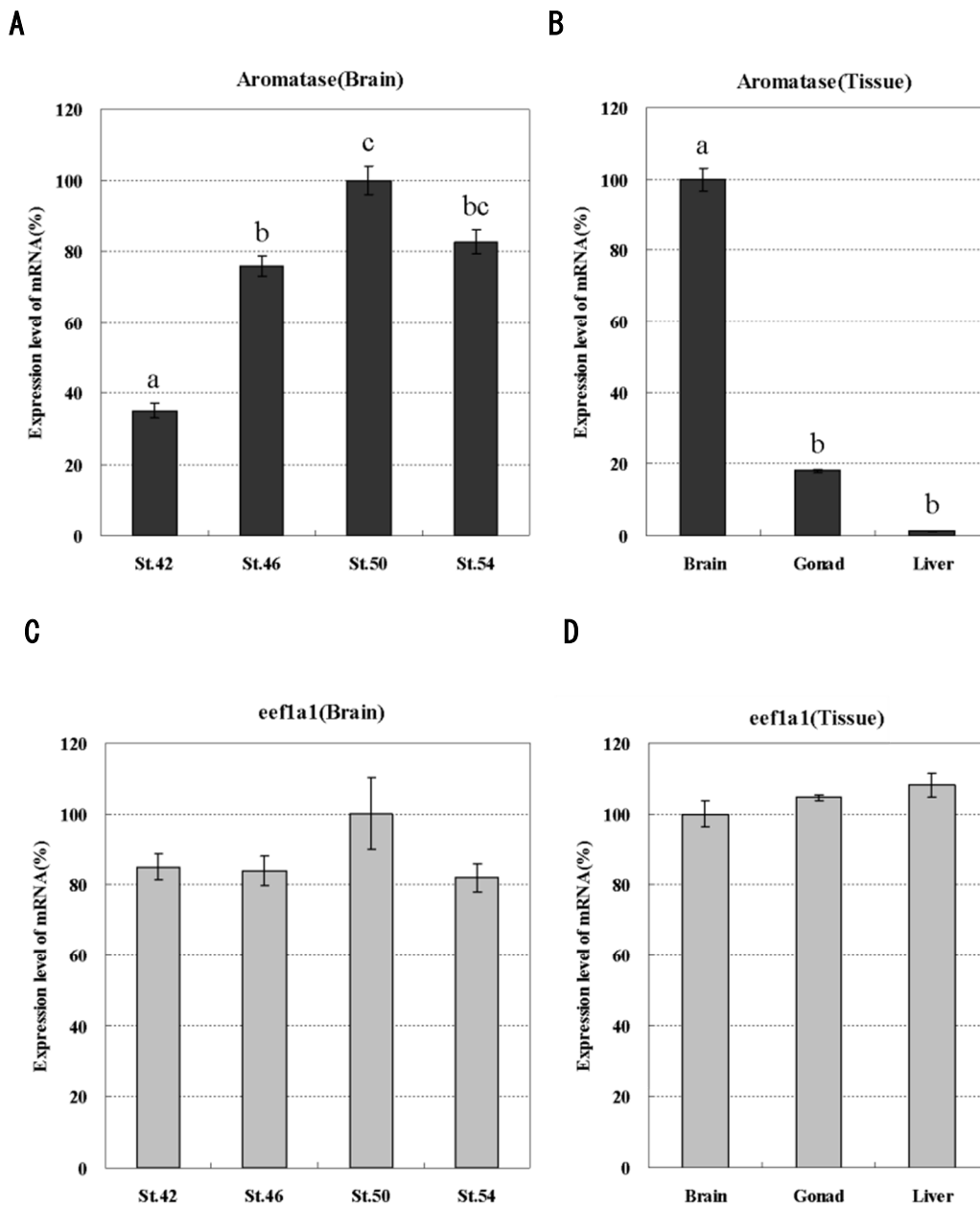


Fig. 10 脳の各 Stage (A, C) 及び Stage 50 の各組織 (B, D) における

アロマトラーゼ及び *EF-1 α* mRNA の発現

アロマトラーゼ mRNA の転写レベル (A, B) に対し、*eef1a1* (*EF-1 α*) の転写レベルを標準として (C, D) 示した。リアルタイム RT-PCR 解析は、Stage 50 の脳における発現レベルを 100%とし、少なくとも三重測定で行った。エラーバーは標準誤差を示し、異なる文字表記 (a, b, c) では、値が有意に異なっていた ($P < 0.05$)。

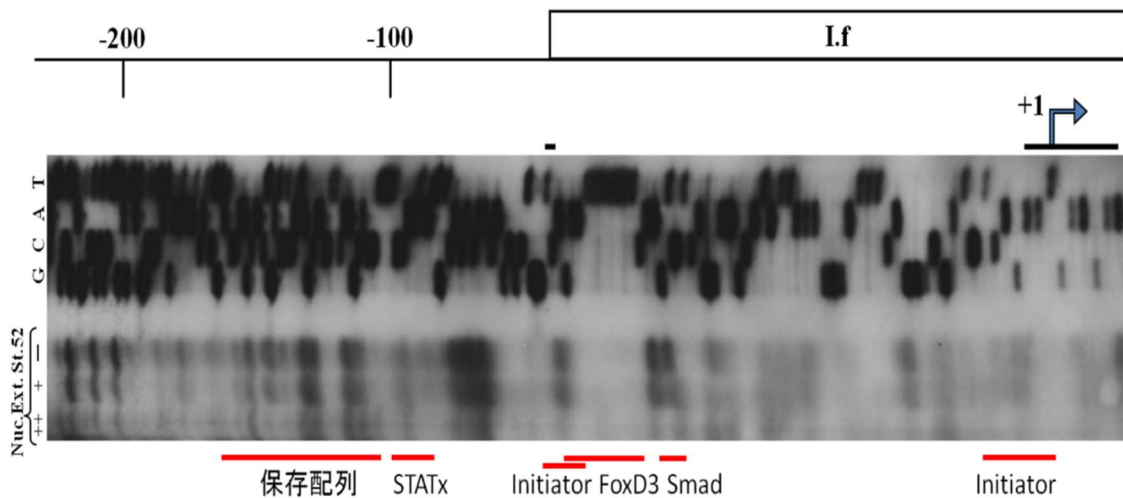


Fig. 11 アフリカツメガエル脳特異的プロモーター I.f の
DNase I フットプリント解析

上の図はプロモーター/エキソン I.f の概略図を示した。プロモーター/エキソン I.f の -278/-7 bp 領域を含む DNA フラグメントは、Stage 52 のアフリカツメガエル脳の核抽出物（-: 0 ng; +: 50 ng; ++: 200 ng）とインキュベーション後、DNase I による消化を行った。T、A、C 及び G は、それぞれの DNA シーケンスラダーを示した。予想シスエレメント、基本転写因子、5 脊椎動物種間（ヒト、ウマ、マウス、ゼブラフィッシュ及びアフリカツメガエル）での 38 bp 保存配列をそれぞれ赤線で示した。

3-3-3 予想転写因子 mRNA の発現解析

DNase I フットプリント法より核タンパク質の結合が見られる 3 つのシスエレメント領域との相互作用が予想される 9 つの予想転写因子の mRNA の発現レベルを、Stage 42、46、50、54 の脳及び Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓において、リアルタイム RT-PCR 法により検出した (Fig. 12)。

foxd3 は神経堤前駆細胞の分化において初期のマーカー遺伝子として同定され、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュでは、*foxd3* の発現が Wnt シグナリングにより活性化及び BMP シグナリングにより阻害される

事が報告されている。さらに、*foxd3*はリプレッサーとして、神経堤の分化に必須の因子である事が報告されている。本実験では、*foxd3*が生殖腺、肝臓に比べ脳において高発現しているものの、アロマターゼの発現とは対照的に Stage 42 から 50 かけて発現の減少が観察された。

さらに、これまでに機能解析のなされている *Smad* は 3 タイプに分類され、機能別に receptor-regulated *Smad* (R-*Smad*)、common-mediator *Smad* (Co-*Smad*) 及び inhibitory *Smad* (I-*Smad*) に分けられる。*Smad4* は Co-*Smad* に分類され、TGF-beta スーパーファミリーのシグナル伝達因子として必要とされる。R-*Smad* はさらに 2 タイプに分類され、一般的には *Smad1* は BMP シグナリングの仲介を行う BR-*Smad*、*Smad2* は TGF-beta、Activin のシグナリングを仲介する AR-*Smad* に分けられる。本実験では、*smad1*、*smad2*、*smad4. 1/4. 2* の発現において発生段階依存的な上昇は観察されなかったものの、*smad2*、*smad4. 1/4. 2* は脳において、生殖腺、肝臓よりも高いレベルの発現が観察された。

Janus kinase-signal transducer and activator of transcription families (JAK-STAT) シグナリング経路は、初期発生においてサイトカインによる刺激を細胞表面から核へと伝える重要な制御に役割をもつ。*STAT* タンパク質は、細胞表面の受容体へのポリペプチド結合に反応し、チロシンのリン酸化を通して活性化され、特定の DNA 配列に結合し遺伝子の転写を活性化する。アフリカツメガエルでは、これまでに *stat* ファミリーの内、4 つのメンバーが同定されている。*stat1* mRNA の発現は Stage 46 から Stage 50 にかけて上昇が見られたものの、*stat* ファミリーの mRNA は脳において有意な発現は見られなかった。

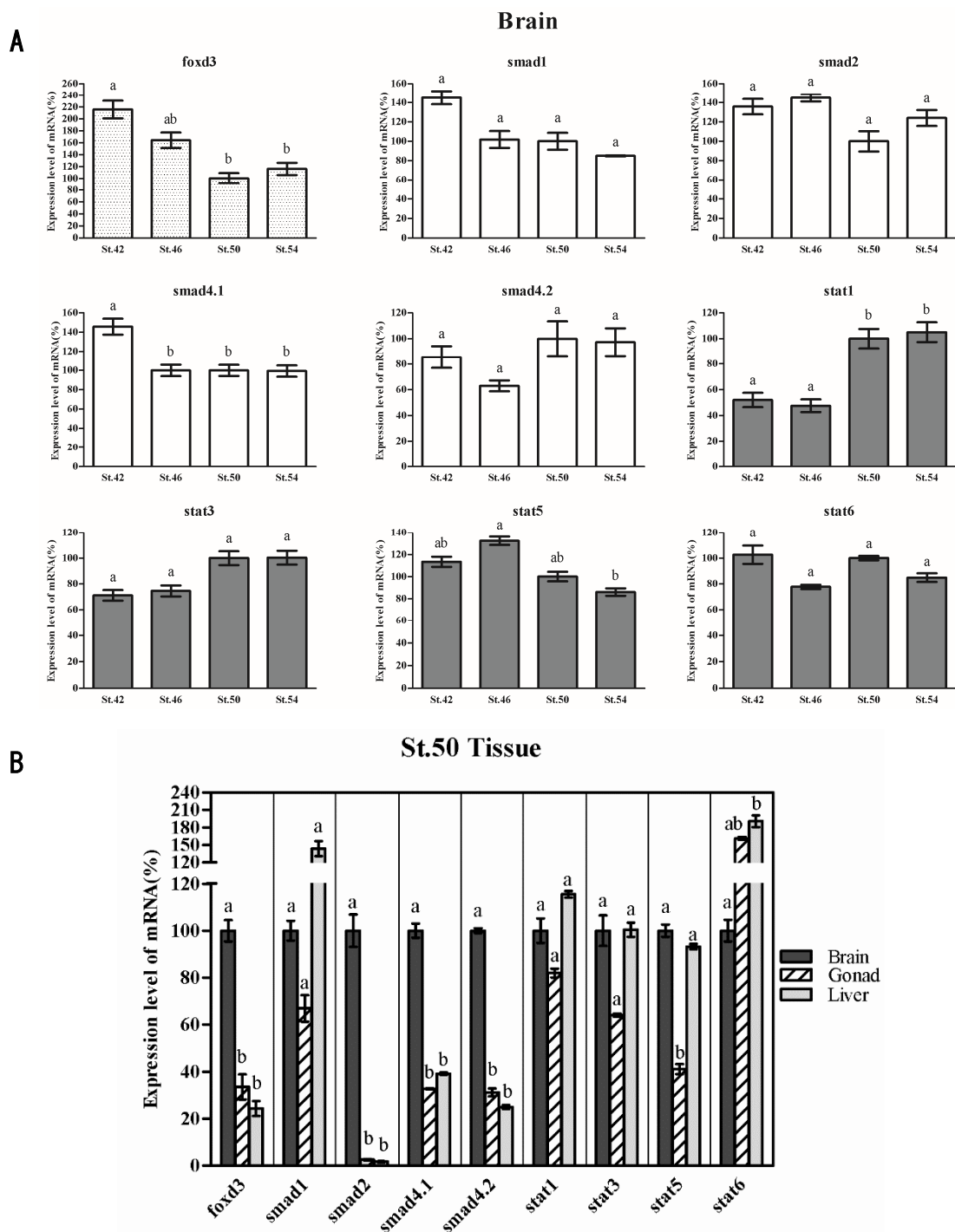


Fig. 12 脳の各 Stage (A) 及び Stage 50 の各組織 (B) における

予想転写因子 mRNA の発現パターン

予想転写因子 mRNA の転写レベルは *eef1a1* (*EF-1 α*) の転写レベルにより標準化した。リアルタイム RT-PCR 解析は、Stage 50 の脳における発現レベルを 100%とし、少なくとも三重測定で行った。エラーバーは標準誤差を示し、異なる文字表記 (a, b) では、値が有意に異なっていた ($P < 0.05$)。

3-3-4 *FoxD3* 予想転写因子結合配列への脳の核タンパク質の結合

リプレッサーとして報告されている *foxd3* の発現がアロマターゼと逆の発現変化を示した事から、次に *foxd3* の結合が予想されるシスエレメント配列に着目して、脳の核タンパク質の結合をゲルシフト法により解析した (Fig. 13)。Stage 42 の核タンパク質の添加により、DIG 標識 *FoxD3* 配列のシフトバンドが観察され、さらに DIG 非標識 *FoxD3* 配列の添加によりシフトバンドの消失が観察された (Fig. 13A)。そのため、*FoxD3* 配列特異的に何らかの核タンパク質の結合が起こっている事が考えられ、さらに、脳の核タンパク質の添加時に強くシフトバンドが観察される事から、その核タンパク質は脳において特異的に発現している事が予想される (Fig. 13B)。また Stage 42 から 54 にかけて結合する脳の核タンパク質の減少が観察される事から、*foxd3* mRNA の発現変化との相関を示していると考えられる (Fig. 13C)。

3-3-5 保存配列への脳の核タンパク質の結合と結合タンパク質の同定

保存配列においても *FoxD3* 配列同様に脳の核タンパク質の結合をゲルシフト法により解析した (Fig. 14)。Stage 50 の核タンパク質の添加により、脳の核タンパク質において保存配列特異的に結合が見られ (Fig. 14A 及び B)、*FoxD3* 配列とは異なり、その核タンパクは少なくとも Stage 42 から 52 にかけて定常的に結合が観察された (Fig. 14C)。

次に、保存配列に結合する脳の核タンパク質を DNAP アッセイ法により同定を行った。DNAP アッセイ法の実験模式図を Fig. 15 として示す。

アビジン化磁性ビーズ、脳の核タンパク質及びビオチン化保存配列の混合時にのみ、45 kDa の Stage 50 の脳の核タンパク質が保存配列特異的に結合している事が観察された (Fig. 16A)。また、その結合は生殖腺及び肝臓からの核タンパク質では見られないのに対し、脳からの核タンパク質にのみ観察された (Fig. 16B)。

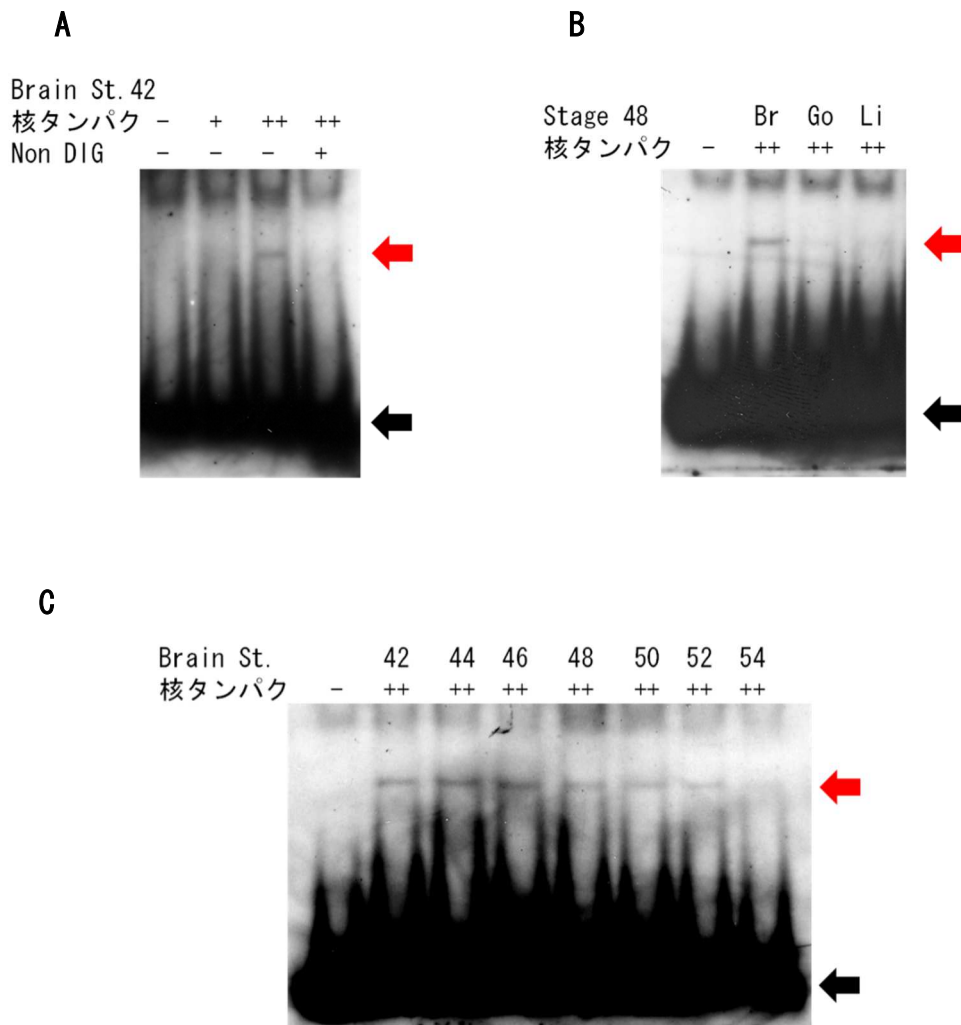


Fig. 13 ゲルシフト法による *FoxD3* 予想転写因子結合配列への核タンパク質の結合解析

Stage 42 の脳 (A)、Stage 48 における各組織 (B) 及び脳の各 Stage (C) における核タンパク質の *FoxD3* 配列への結合を示した。また、←で核タンパクの結合していないフリープローブ、←で核タンパクの結合によるシフトバンドの位置を示した。

+ : 0.25 μ g、++ : 1 μ g の核タンパク質を添加したレーンを示す。

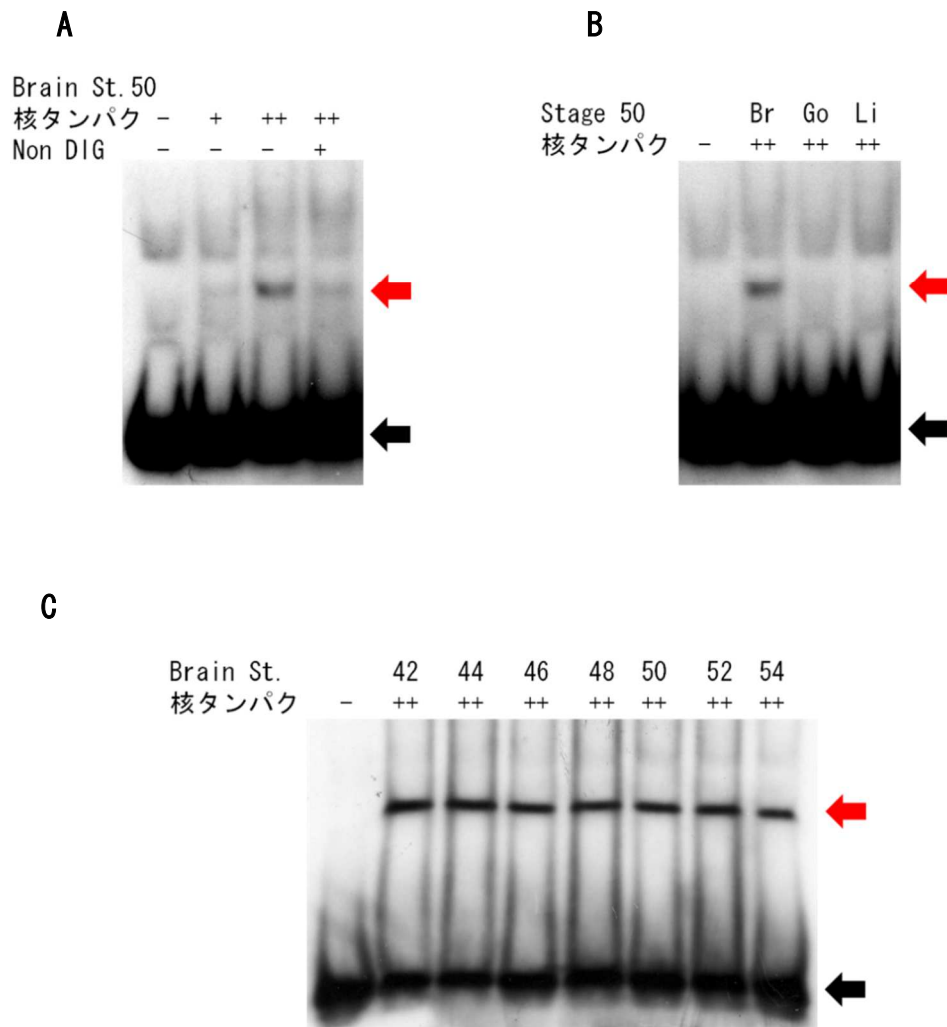


Fig. 14 ゲルシフト法による保存配列への核タンパク質の結合解析

Stage 50 の脳 (A)、Stage 50 における各組織 (B) 及び脳の各 Stage (C) における核タンパク質の保存配列への結合を示した。また、←で核タンパクの結合していないフリープローブ、←で核タンパクの結合によるシフトバンドの位置を示した。

+ : 0.5 μg 、++ : 3 μg の核タンパク質を添加したレーンを示す。

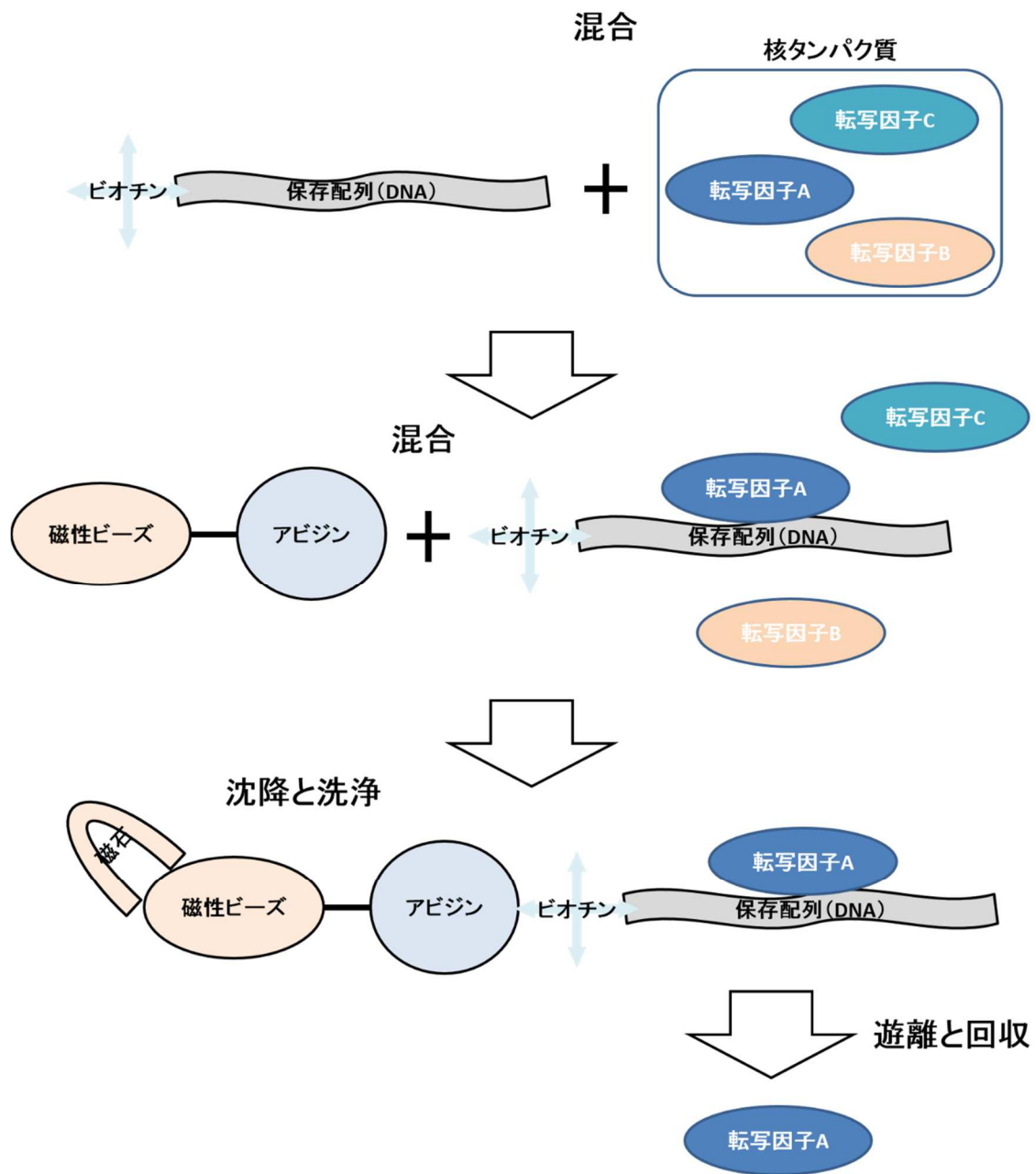


Fig. 15 DNAP アッセイ法の実験模式図

ビオチンを付加した保存配列と核タンパク質を混合後、さらにアビジン化磁性ビーズと混合する。磁性ビーズを磁石で沈降し、洗浄を行った後、sample buffer を加え熱処理を行う事で保存配列特異的に結合する核タンパク質のみ遊離を行う。

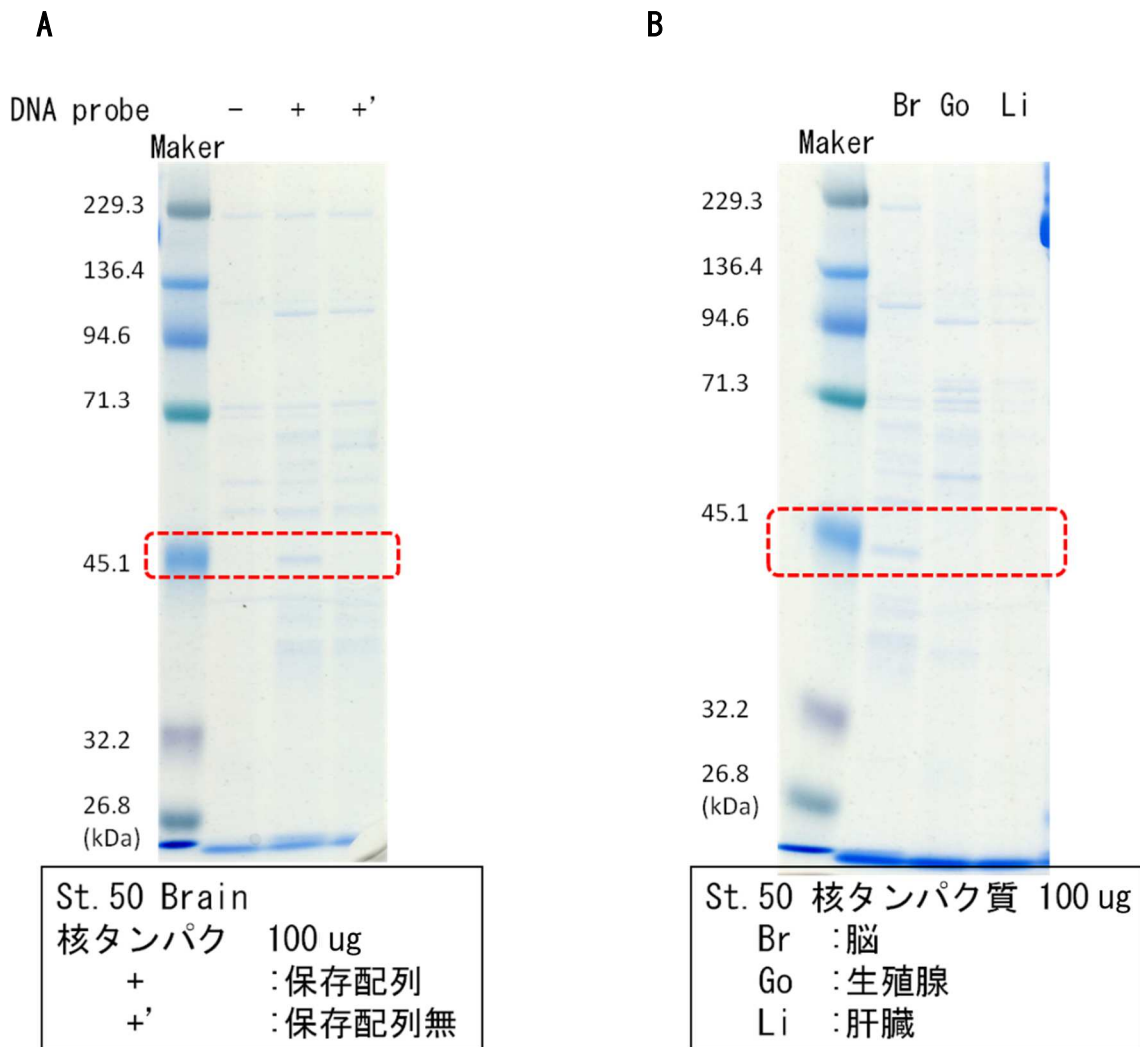


Fig. 16 保存配列に結合する核タンパク質の同定

アビジン化磁性ビーズに加え、脳の核タンパクのみ (-)、脳の核タンパク及びビオチン化保存配列 (+)、脳の核タンパク及びビオチン化非保存配列 (+') により DNAP アッセイを行った結果 (A)。アビジン化磁性ビーズ及びビオチン化保存配列に加え、脳 (Br)、生殖腺 (Go)、肝臓 (Li) の核タンパク質を添加し DNAP アッセイを行った結果 (B) を示した。各組織の核タンパク質は 100 μ g 添加し、DNAP アッセイを行った。

3-4 考察

DNase I フットプリント法により、プロモーター/エキソン I. f 上の *STATx* (-98/-90 bp)、*FoxD3* (-57/-46 bp) 及び *Smad* (-43/-40 bp) の予想転写因子結合配列に加え、保存配列 (-127/-90 bp) 及びイニシエーター配列 (-60/-54 bp 及び -6/+1 bp) にアフリカツメガエル脳の核タンパク質が結合する事が示された (Fig. 11)。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 はアフリカツメガエルの脳において有意に発現し、*foxd3* の発現レベルはアロマターゼ mRNA の発現に反し減少した (Fig. 12)。さらに、*FoxD3* 配列上に結合する核タンパク質が発生段階の進行と共に減少を示す事からも (Fig. 13)、この配列上に *foxd3* が実際に結合している可能性を強く示唆している。アフリカツメガエルにおいて、Activin による中胚葉誘導は *smad2/3* (AR-Smad) 及び *smad4* (Co-Smad) 複合体の仲介により行われる事が知られている。また、*smad2* は MH2 ドメインを介し *forkhead/winged helix transcription factor H1* (*foxh1*) へ結合し、複合体を形成する事が報告されている [53-56]。そのため、*foxd3* と *smads* はプロモーター/エキソン I. f 上において複合体を形成する可能性が予想され、リプレッサーである *foxd3* の発現が減少する事で、*smads* のような転写活性化因子がアロマターゼ発現の上昇に寄与する可能性が考えられる。また *FoxD3* 配列は一部、イニシエーター配列とオーバーラップする形になっている事からも *foxd3* の発現の減少により、イニシエーター配列上への TFIID 等の基本転写因子の結合が容易になる事が予想される。しかしながら、*foxd3*、*smad* 及びイニシエーター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において相同性が観察されない (Fig. 9)。この相違は、アフリカツメガエルのプロモーター I. f のような TATA-less プロモーターに対し、哺乳類のように TATA box を有するプロモーターでは組織特異的に発現が制御される遺伝子のプロモーター上に多く存在し、シングルサイトにより転写が制御されるという近年の知見とも相関していると考えられる [47]。これら上述

の因子がアロマターゼの転写活性に関与すると仮定した場合、このエキソン 1.f 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事が考えられる。

一方、各脊椎動物種において高度に相同性が維持されている保存配列には 45 kDa の脳特異的かつ定常的に発現している核タンパク質の結合が観察された (Fig. 16)。マウスの *Cyp19* 遺伝子においては、脳特異的プロモーター上の 38 bp 保存配列の内 11 bp を含む配列 (Arom-A α と名付けられている) への脳の核抽出物の結合が観察され、恒常的に発現する 42 KDa のタンパク質が同定されている [20, 46]。これらの核タンパク質の更なる解析により、結合する核タンパク質を同定する事は、脊椎動物種間において共通の脳アロマターゼ転写活性化機構の解明に役立つものと考えられ、今後のさらなる解析が期待される。

以上の知見から、基本的には、両生類から哺乳類まで共通の転写調節機構が存在し、脳のアロマターゼの発現が制御されていると考えられる。しかし、哺乳類に比べアフリカツメガエルの脳においてアロマターゼの発現が限定的かつ高レベルであるという本研究の結果は、アフリカツメガエルでは独自の転写調節機構が存在する事で脳において高レベルの転写活性を有している可能性を示唆していると考えられる。その一つとして、哺乳類とアフリカツメガエルの転写開始点の相違は、転写開始領域の直ぐ上流に存在する配列の相違に起因している事が示唆される。

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ロジオールの役割

4-1 序論

第2章では、アフリカツメガエルにおける *cyp19a1* 遺伝子全長をクローニングし、アロマターゼ遺伝子の発現が、哺乳類とは異なり、脳及び生殖腺に限定的で、脳において極めて高レベルに発現している事を示した。また、脳及び生殖腺特異的プロモーター領域間の距離は哺乳類に比べ短く、哺乳類ではその進化に伴い新たに挿入されたプロモーター領域を使用する事で、アフリカツメガエルよりも広域の組織でアロマターゼ遺伝子が発現する可能性を示唆した。これらの知見から、アフリカツメガエルの全身にとって脳におけるアロマターゼ遺伝子の発現は大きな比重を占めており、哺乳類に比べアフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼの発現は特別な役割を持っている可能性が考えられる。

本章では、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事を目的として実験を行い、その結果を中心に記述した。まず、性染色体のW染色体特異的遺伝子である *DM-W* 遺伝子を検出する事で、アフリカツメガエル各個体を ZZ 型の雄、ZW 型の雌に選別した後 [57]、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かを解析した。これらの結果、脳におけるアロマターゼの発現と E2 濃度の関係に相関が見られなかった。そのため、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エストロゲン受容体 (*ER*) 遺伝子の mRNA 及びタンパク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。

4-2 実験方法

4-2-1 リアルタイム RT-PCR 法

オタマジャクシ各個体の ZW 及び ZZ 性染色体の核型の決定は、オタマジャクシの尾から抽出したゲノム DNA を使用し、PCR により W 染色体特異的遺伝子である *DM-W* 遺伝子の増幅の有無により選定を行った [57]。実験方法として、尾を 50 mM NaOH 180 μ L 中にて 95 $^{\circ}$ C 10 分間溶解後、このライセートに 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ L を加え、攪拌及び 12,000 rpm にて 5 分間遠心した。次に上清 0.5 μ L を *DM-W* 遺伝子の増幅に使用し、PCR は KOD FX Neo (TOYOBO 社製) により行った。PCR に使用したプライマー対は F プライマー: 5' -CCA CAC CCA GCT CAT GTA AAG-3' 及び R プライマー: 5' -GGG CAG AGT CAC ATA TAC TG-3' を使用した。PCR 反応条件は鋳型 DNA を 94 $^{\circ}$ C 2 分、98 $^{\circ}$ C 10 秒 / 60 $^{\circ}$ C 30 秒 / 72 $^{\circ}$ C 1 分を 32 サイクル行った後、アガロース電気泳動を行い、W 染色体を持つ個体と持たない個体に分別した。

リアルタイム RT-PCR は第 3 章 3-2-3 と同様の方法で行い、各遺伝子の検出には、アロマターゼ (F プライマー: 5' -AAG CCT TGA ATC CAG TGC AG-3' 及び R プライマー: 5' -CGC CAT TAA TCC AGA CTC TCA C-3')、*ER α* (F プライマー: 5' -AAC AGA AGG CAG AGT GGA AG-3' 及び R プライマー: 5' -TGT TCT TGT CTA TAG TGC ACT GAT T-3')、*ER β* (F プライマー: 5' -TCT TAC TTG GAT AGC AGG CAT-3' 及び R プライマー: 5' -CTT CTG ATT TAG CTT CAA ACC AT-3') を使用した。また、内部標準遺伝子としては、*EF-1 α* 遺伝子 (F プライマー: 5' -CCA GAT TGG TGC TGG ATA TG-3' 及び R プライマー: 5' -TTC TGA GCA GAC TTT GTG AC-3') を用い対象遺伝子の発現の標準化を行った。

4-2-2 免疫組織化学のための脳のパラフィン切片の作製

Stage 42、46、50 及び 54 のオタマジャクシ全身を、4%パラホルムアルデヒドに浸し 4 $^{\circ}$ C にて 2 時間固定を行った。その後、PBS で洗浄を 3 回を行い、50、70、

80、90、95 及び 100%のエタノール系列で順次脱水の後、4 °Cにて一晚無水エタノールに置いた。次に脱水した個体をパラフィン包埋後、10 µm の厚さにスライスし、薄切した。切片は温水を張ったスライドガラス上で伸展を行った後、乾燥した。

4-2-3 ヘマトキシリン-エオシン(HE)染色

作製したスライドガラス上のパラフィン切片をキシレンで脱パラフィン化した後、100、95、90、80、70 及び 50%のエタノール系列で順次親水化した。HE 染色は切片をマイヤーヘマトキシリンにて 1 分間染色後、蒸留水で洗浄し、エオシンにて 5 分間染色した。次に、100%エタノールで洗浄、キシレンに置換し、乾燥後、Entellan new® (Merck Chemicals 社製)で封入を行った。切片はカバーガラスで覆い顕微鏡下で観察した。

4-2-4 酵素抗体法によるパラフィン切片の免疫組織化学

作製したスライドガラス上のパラフィン切片をキシレンで脱パラフィン化した後、100、95、90、80、70 及び 50%のエタノール系列で順次親水化した。IHC 染色は切片を 0.03%トリプシン(Invitrogen 社製)で 20 分間の賦活化後、メタノールに溶解した 3%過酸化水素により 30 分間、内因性のペルオキシダーゼの失活を行った。その後 0.1% Tween 20 を含む PBS (PBST)に溶解した 5%ヤギ血清により非特異的 IgG 結合部位のブロッキングを 60 分間行い、マウス抗アロマトーゼ抗体 (ARK Resource 社製) を 1% BSA 及び 0.2% Triton X-100 を含む PBS に 1:100 で溶解し、湿潤箱内で 4 °C 一晚静置した。切片は PBST で洗浄後、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (GE Healthcare 社製) を 1% BSA 及び 0.2% Triton X-100 を含む PBS に 1:100 で溶解し、湿潤箱内で 4 °C 60 分間静置した。免疫反応は 0.015%過酸化水素及び 0.05% diaminobenzidine (DAB) chromogen により可視化した。対比染色としてマイヤーヘマトキシリンにより細胞核を染色した。切片は洗浄後に乾燥及び封入を行い、顕微鏡下で観察した。

4-2-5 ウェスタンブロッティング法

核及び細胞質抽出物は NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (PIERCE 社製) を使用し、各 Stage の胚の組織より調整した。細胞質及び核タンパク質は第 3 章 3-2-2 と同様の操作により抽出した。

ウェスタンブロッティングは、総タンパク質 30 μg を 10% SDS-PAGE で泳動し、セミドライ式ブロッティング装置により PVDF メンブレン (GE Healthcare 社製) に写し取った。メンブレンは PBST に溶解した 3% membrane blocking agent (GE Healthcare 社製) により 4 °C 一晩ブロッキングを行い、PBST で 1:500 に希釈したマウス抗アロマターゼ抗体 (ARK Resource 社製) あるいはウサギ抗 ER α 抗体 (Abcam, ab37438) で室温にて 2 時間インキュベートした。二次抗体として PBST で 1:10000 に希釈した HRP 標識抗マウスあるいは抗ウサギ IgG (GE Healthcare 社製) を室温にて 1 時間インキュベートを行い、メンブレン上の抗体結合タンパク質は ECL Plus™ kit (GE Healthcare 社製) を使用し化学発光を X 線フィルムに現像し、可視化した。

4-2-6 Enzyme-linked immunoassay (EIA) 法

ステロイド抽出は Bligh & Dyer [58] の方法により行った。組織は 50 個体以上から切除し、ホモジナイズ後、ガラスチューブ内で乾燥した。そこにクロロホルムを 1 ml、1:2.5 (v/v) の酢酸:メタノールを 2.8 ml 加え、室温で 10 分間インキュベートした。その後、クロロホルムを 1 ml、精製水を 1 ml 加え攪拌し 3000 rpm 10 分間遠心を行った。ステロイドを含む有機層は新たなガラスチューブに回収し、水層の含まれる組織物はさらにクロロホルムを 1 ml 加え、3000 rpm 10 分間遠心した。有機層を、再度上記のガラスチューブに回収後、乾燥した。

E2 濃度は Estradiol EIA Kit (Cayman Chemicals 社製) により測定を行った。ステロイド抽出物は kit に含まれる EIA buffer 0.2~0.5 ml に再溶解し、サンプルとした。再溶解したステロイドサンプル 50 μl 中の E2 濃度は、HRP 標識し

た E2 と既知濃度の E2 スタンダード (4000, 1600, 640, 256, 102, 41, 16 及び 7 pg/ml) との競合反応により作成した検量線を用い、少なくとも三重測定を行った。Estradiol EIA Kit による測定した Bligh & Dyer 法による組織に添加した E2 の回収率試験を Fig. 16 に示した。サンプル中の E2 の検出限界 (80% B/B₀) は 22 pg/ml だった (Fig. 17A)。オタマジヤクシ全身へ既知濃度の E2 (25、50、250、1250 及び 2500 pg) を添加後、再回収し、E2 濃度測定から算出した E2 回収率は 25、50、250、1250、2500 pg において、それぞれ 86.1、69.3、107.8、69.7、74.3% だった (Fig. 17B)。サンプルより測定した E2 濃度の範囲は 150~2352 pg/ml だった。

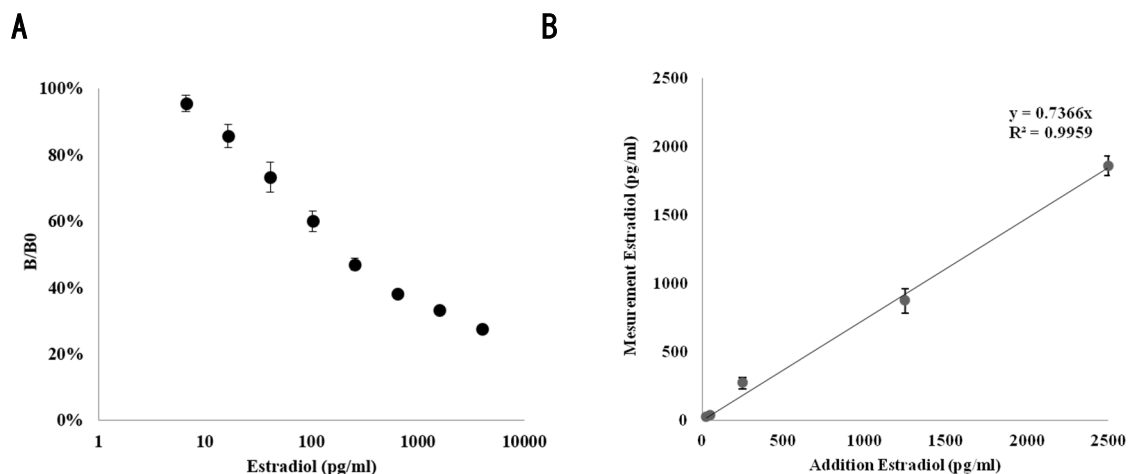


Fig. 17 E2 濃度測定のための EIA 法の検証

(A) E2 スタンダード濃度を B/B₀ (0 pg/ml スタンダード濃度における吸光度を B₀ として 'x' pg/ml の時のスタンダード濃度の吸光度 B を割った値) に対しプロットした。(B) 添加した E2 濃度に対する測定した E2 濃度の回帰直線の傾きを示した。25-2500 pg の測定を通して回収率は 73.7% ($R^2=0.996$) だった。

4-2-7 E2 及びその阻害剤の神経細胞軸索、アストログリアへの影響

アフリカツメガエルの Stage 50 の脳より初代培養細胞を調整した。脳は摘出後、0.25% trypsin-EDTA (SIGMA 社製) により 8 分間分散し、5% v/v fetal bovine

serum (AGC 社製) を含む L-15 medium (Gibco 社製) にて、50 $\mu\text{g/ml}$ の calf skin collagen type I (SIGMA 社製) をコーティングした 4-well dish (Nunc 社製) に播種し、25 $^{\circ}\text{C}$ 一晩培養を行った。その後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した E2 (SIGMA 社製) 及び ICI 182,780 (Tocris 社製) を最終濃度 1 μM になるように加え、2 日間培養を継続した。培養後の細胞は PBS で溶解した 4% パラホルムアルデヒドで固定後、0.1% v/v Triton X-100 により賦活化を行った。細胞は非特異結合を防ぐため、5% ヤギ血清 (SIGMA 社製) で 1 時間ブロッキングを行った後、一次抗体 (神経細胞 : 1/1000 希釈したマウス抗 *class II β -tubulin* 抗体 (SIGMA 社製)、アストログリア : 1/500 希釈したマウス抗 *Vimentin* 抗体 (SIGMA 社製)) を加え、2 時間静置した。次に、二次抗体 (1/500 希釈した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Beckman Coulter 社製)) で 1 時間静置後、核を DAPI で 5 分間染色した。染色後の細胞は蛍光顕微鏡下で観察を行った。

4-2-8 脳の初代培養細胞の E2 処理による保護作用

4-2-7 と同様に脳の細胞を分散後、50 $\mu\text{g/ml}$ の calf skin collagen type I をコーティングした 96-well プレートに播種し、25 $^{\circ}\text{C}$ 6 日間培養を行った。細胞障害を与えるにあたり、1-24 時間前に E2 を終濃度 100 nM になるように加えた後、培養液を交換し、タプシガルギン (Tg) を終濃度 10 μM になるように加え、一晩培養を行った。細胞障害性は LDH assay kit plus (Roche 社製) にて遊離 LDH の測定を行った。細胞培養液は LDH assay 溶液を加え、25 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間静置後、反応停止液を加え測定した。

4-2-9 統計解析

統計解析は Microsoft Excel により行い、データは平均値 \pm 標準誤差で示した。3 サンプル以上の有意差検定として分散分析による検定の後、ポストホック検定として Tukey の検定を行った。ZW と ZZ 核型間のサンプルの mRNA の発現比較は Student の T 検定により行った。各検定の有意差水準は $P < 0.05$ とした。

4-3 結果

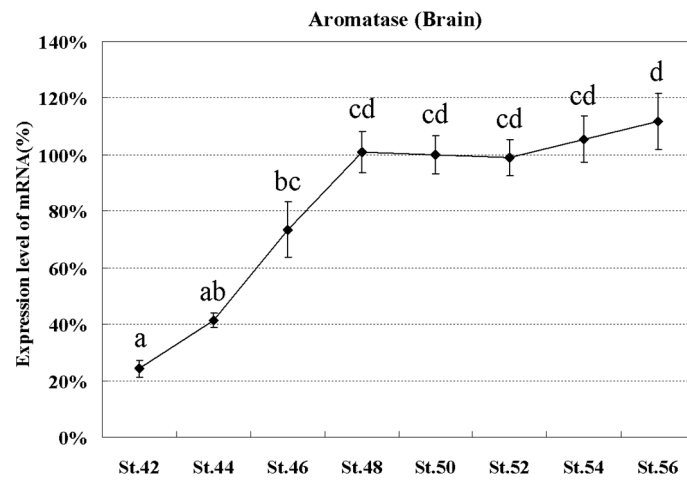
4-3-1 アフリカツメガエル脳におけるアロマターゼ mRNA の発現変化 及び ZZ/ZW 個体の組織における発現の性差

アフリカツメガエルにおけるアロマターゼ mRNA の発現パターンはリアルタイム RT-PCR 法により解析した。Total RNA の抽出は、雌雄を区別せず Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳及び Stage 50、56 の雌雄を選別した ZZ もしくは ZW 各個体の脳、生殖腺、肝臓、心臓から抽出した。アフリカツメガエルの脳においてアロマターゼ mRNA の発現は、Stage 42 から 48 にかけて上昇し、Stage 56 まで維持された (Fig. 18A)。一方、雌雄を選別した Stage 50 及び 56 における各組織では、生殖腺における発現は ZZ 個体に比べ ZW 個体において有意に高く発現していた。脳における発現は ZW 個体の生殖腺の発現に比べ ZZ 及び ZW 個体の脳で 3 倍以上高いレベルで検出されたものの、性差は観察されなかった。また、肝臓及び心臓における発現はほとんど検出されなかった (Fig. 18B)。

4-3-2 アフリカツメガエル幼生期の脳の形成過程の形態学的観察

アロマターゼ mRNA の上昇期における脳の形成過程を調べるため、脳の切片の HE 染色により解析した。アロマターゼ発現上昇以前の Stage 42 の脳においては、頭部から尾部の前後軸にそって前脳、間脳、中脳、後脳の領域が既に形成されていた。しかしながら、成体に見られる皮質及び側脳室領域の形成は観察されなかった (Fig. 19A 及び E)。Stage 46 の脳では、前脳領域において顕著に皮質及び側脳室の形成が始まり、前後軸にそって前脳、間脳、中脳、後脳が伸展した (Fig. 19B 及び F)。さらに、Stage 50 の脳においては、脳脊髄液 (CSF) を生成する脈絡叢が側脳室において見られるようになり、嗅葉及び視葉の形成が顕著に見られた (Fig. 19C 及び G の矢じり)。Stage 54 の脳では、それぞれの脳領域は大きく拡大し、細胞の核も広がりを見せたものの、更なる脳領域の分化は観察されなかった (Fig. 19D 及び H)。

A



B

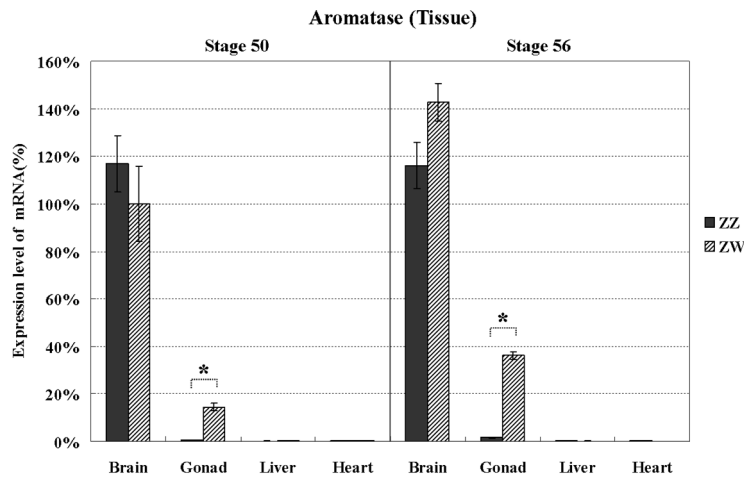


Fig. 18 アフリカツメガエルの幼生期におけるアロマトラーゼ mRNA の発現変動

(A) ZZ、ZW 未選別の Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳及び (B) ZZ、ZW を選別した Stage 50、56 の脳、生殖腺、肝臓、心臓 におけるアロマトラーゼ mRNA の発現を示した。アロマトラーゼ mRNA の転写レベルは、*eef1a1* (*EF-1 α*) の転写レベルにより標準化した。リアルタイム RT-PCR 解析は、Stage 50 の脳における発現レベルを 100% とし、少なくとも三重測定で行った。エラーバーは標準誤差を示し、脳の Stage 毎の異なる文字表記 (a, b, c, d) 及び ZZ、ZW 組織間のアスタリスク (*) では、値が有意に異なっていた ($P < 0.05$)。

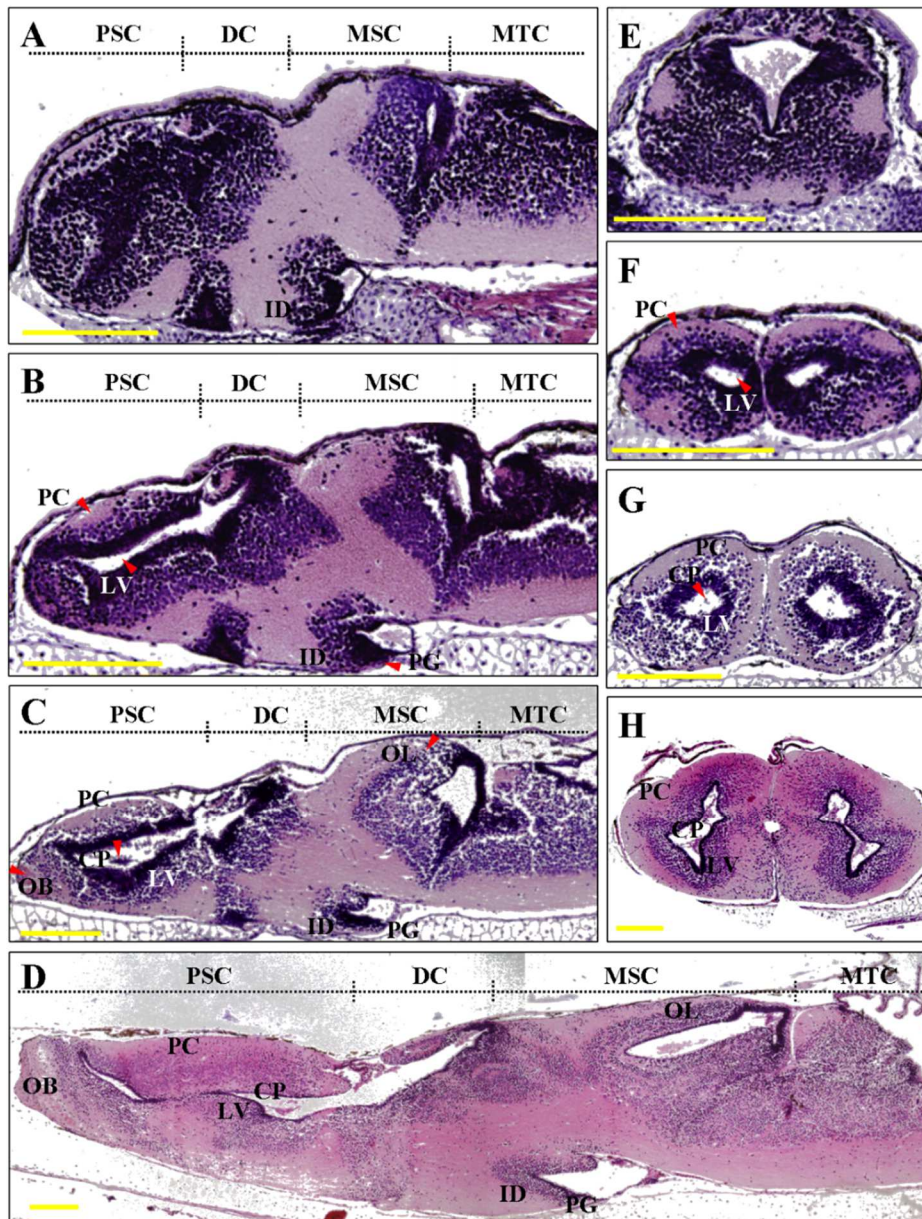


Fig. 19 Stage 42-54におけるアフリカツメガエル脳形成過程

(A-D) 半球の垂直切片及び (E-H) 前脳の横断切片は、(A 及び E) Stage 42、(B 及び F) Stage 46、(C 及び G) Stage 50、(D 及び H) Stage 54 においてヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行った。矢じりは各 Stage において形成された領域を示した。PSC は前脳、DC は間脳、MSC は中脳、MTC は後脳、ID は漏斗、PG は脳下垂体、LV は側脳室、PC は皮質、CP は脈絡叢、OB は嗅球、OL は視葉を示し、スケールバーは 200 μ m を示す。

4-3-3 アフリカツメガエル脳における

アロマターゼタンパク質の発現及び局在性

アフリカツメガエルの脳の形態形成は、アロマターゼ mRNA の発現上昇と共に各脳領域の分化及び発達が見られたため、アロマターゼのタンパク質レベルの発現及び局在性をアロマターゼ特異的抗体により検出した。ウェスタンブロッティング法による解析の結果、脳においてアロマターゼの発現は Stage 46 から検出され、Stage 54 まで徐々に上昇した (Fig. 20A)。組織ごとの比較では、脳において他の組織に比べ顕著にアロマターゼの高発現が観察され、Stage 50 においては、脳以外ではほとんどアロマターゼは検出されなかったものの、Stage 56 では、脳に加え、生殖腺、肝臓、心臓においてその発現が観察された (Fig. 20B)。

次に、脳において E2 がどの領域で生成されるのかを探るために、Stage 50 の脳について IHC 染色法により、アロマターゼの局在性を解析した。その結果、Stage 46 以降に顕著に形成が見られる側脳室の脈絡叢及び前脳の皮質、嗅葉において、その高発現が観察された (Fig. 21 の矢じり)。

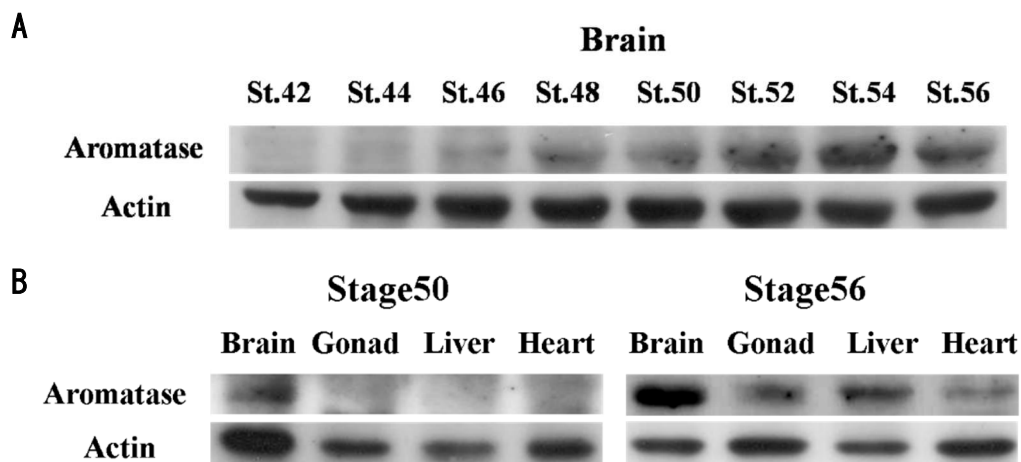


Fig. 20 ウェスタンブロッティング法によるアフリカツメガエル幼生期におけるアロマターゼの発現パターンの解析

(A) Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳、(B) Stage 50、56 の脳、生殖腺、肝臓、心臓からの細胞質抽出物内部標準は抗アクチン抗体を用いた。

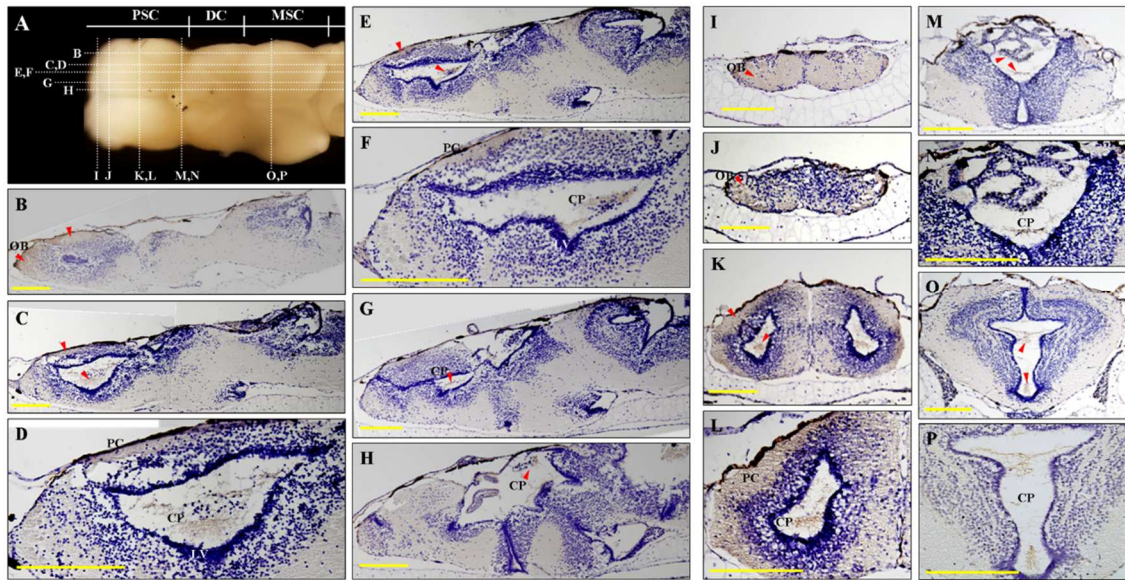


Fig. 21 Stage 50 のアフリカツメガエル脳におけるアロマトラーゼの局在性

(A) 背側からの Stage 50 の脳切片における B-P の図の配向性を示した。(B-H) 垂直切片及び、(I-P) 横断切片により解析を行った。IHC 染色は抗アロマトラーゼ抗体に続き、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて行った。対比染色として細胞核をヘマトキシリンで染色した。赤の矢じりは強く染色の見られる領域を示した。PSC は前脳、DC は間脳、MSC は中脳、PC は皮質、CP は脈絡叢、OB は嗅球を示し、スケールバーは 200 μm を示す。

4-3-4 アフリカツメガエル脳及び全身における E2 の定量解析

アロマトラーゼの発現と E2 の関連性を探るため、E2-EIA 法により ZZ 及び ZW を含む組織から E2 濃度を測定した。総脂質の抽出は Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳及び全身、Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓、心臓から行った。測定した E2 濃度は、1 個体もしくは 1 組あたりの濃度として標準化した。

Stage 42 から 46 において、全身の E2 濃度が 1.25 ± 0.84 pg (1 個体の組織あたり) から 5.40 ± 4.54 pg に変化したのに対し、脳における E2 濃度は 0.92 ± 0.21 pg (1 個体の脳あたり) から 3.11 ± 0.61 pg に変化した。Stage 48 から 56 においては、全身の E2 濃度が 25.5 ± 2.58 pg から 155.7 ± 23.2 pg まで急激に上昇す

るのに対し、脳の E2 濃度は 3.51 ± 0.22 pg から 24.3 ± 2.61 pg まで緩やかに変化した (Fig. 22A)。脳及び全身の E2 濃度は Stage 42 から 46 において同程度の濃度変化なのに対し、Stage 48 から 56 では濃度変化に差が生じた。Stage 50 の組織間での比較において脳の E2 濃度は生殖腺と肝臓と同程度の濃度を示し、心臓の約半量程度の濃度を示した (Fig. 22B)。

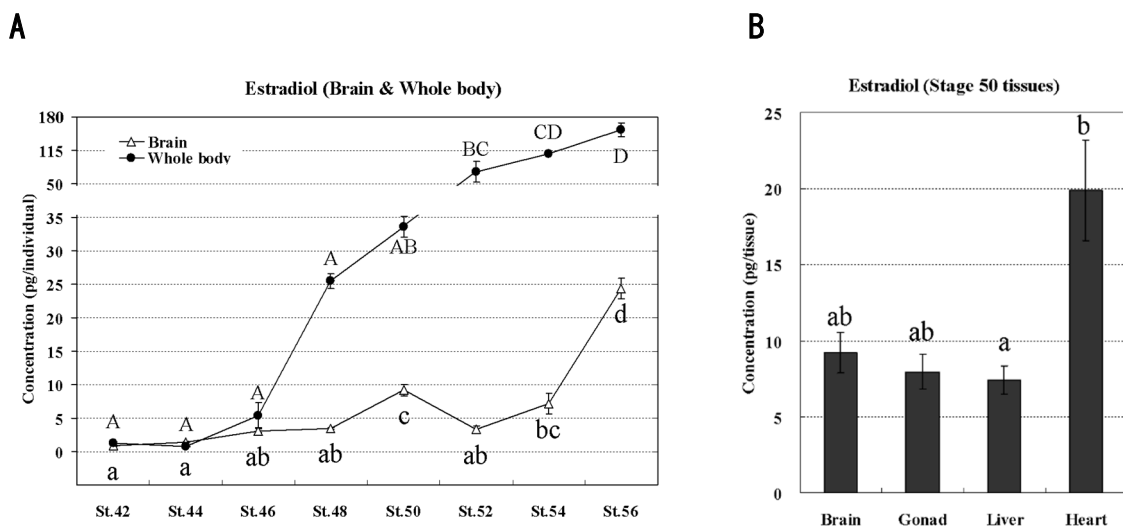


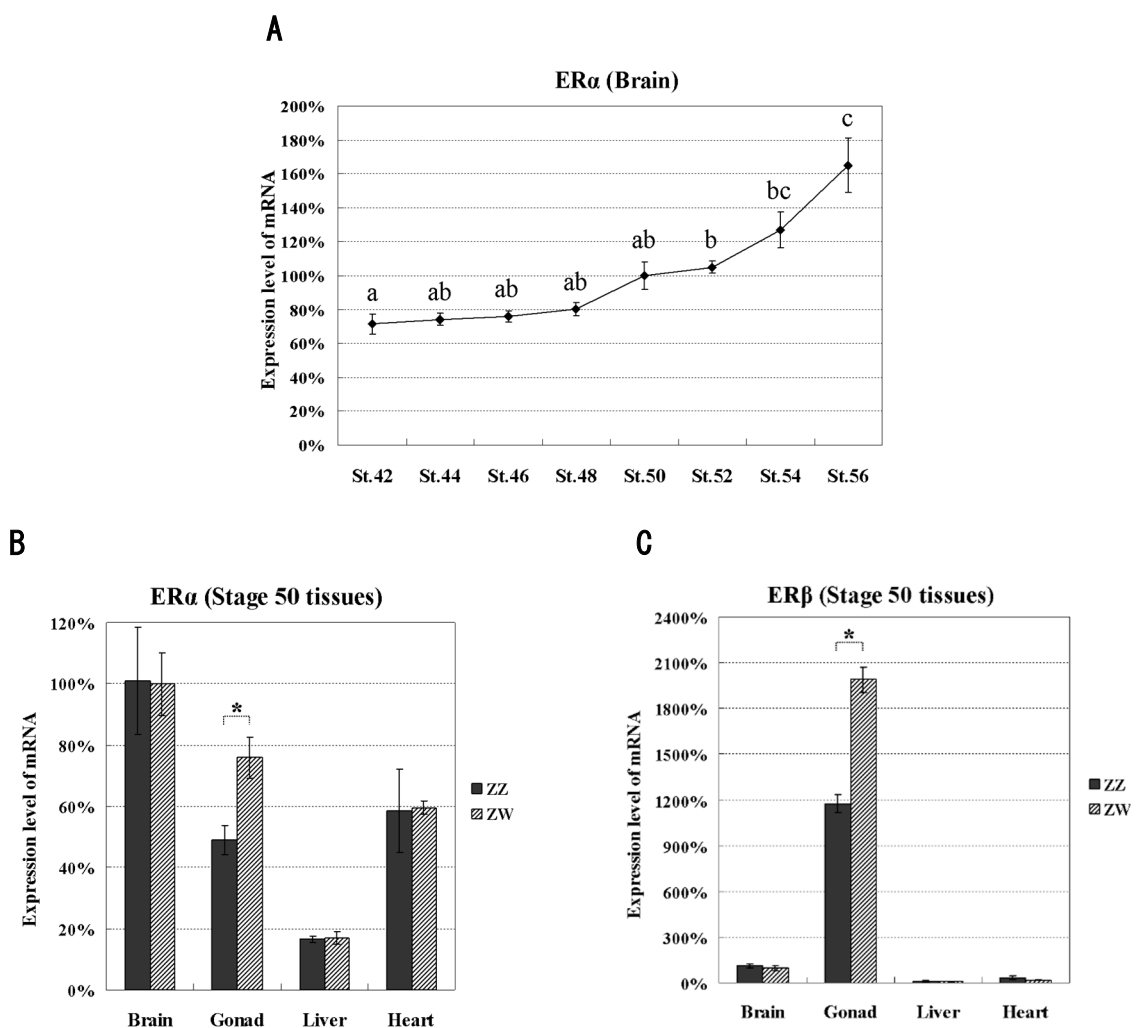
Fig. 22 アフリカツメガエルの幼生期における E2 濃度の組織分布とステージ変化
 (A) Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳及び全身 (B) Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓、心臓における E2 の含有量を定量した。各測定値は脳及び全身では一個体、各組織では一組織あたりの E2 濃度を、平均値±標準誤差 (n≥3) で示した。異なる文字表記 (a, b, c, d) では、値が有意に異なっていた (P < 0.05)

4-3-5 エストロゲン受容体 (ER) mRNA 及びタンパク質の発現解析

ERα、*β* mRNA 及び *ERα* タンパク質の発現をリアルタイム RT-PCR 法及びウェスタンブロッティング法により解析した。Stage 50 の各組織間の比較では、*ERβ* mRNA の発現は、脳、肝臓、心臓において、その発現はほとんど検出されな

かった。また、生殖腺特異的に ZW 核型の個体においては ZZ 核型個体に比べ有意に観察された (Fig. 23B)。

ERβ mRNA の発現は脳においてほとんど検出されなかったため (Fig. 23C)、脳の発生段階毎に *ERα* mRNA のみ測定を行った (Fig. 23A)。*ERα* mRNA の発現は Stage 42 から 56 にかけて緩やかに約 2 倍上昇した。また *ERα* タンパク質レベルの解析では、リアルタイム RT-PCR 法のデータと部分的に一致する結果を示したものの、脳の各発生段階における発現の変動は観察されなかった。そして、*ERα* タンパク質は心臓において最も高レベルに発現しており (Fig. 23E)、各組織及び各 Stage における *ERα* の発現は、アロマターゼの発現と相関性を示さなかったものの、組織における E2 含有量と相関が見られた。



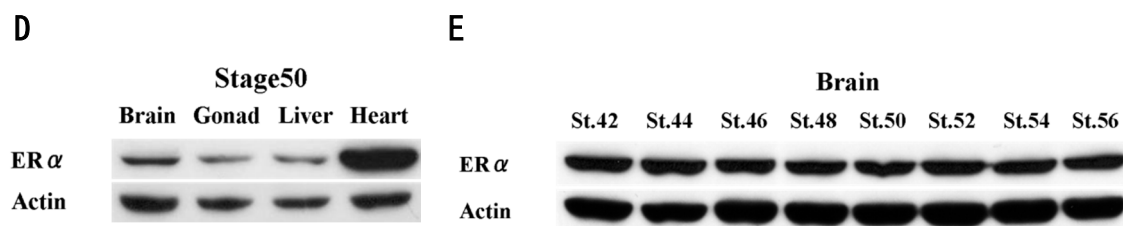


Fig. 23 アフリカツメガエル幼生期のエストロゲン受容体の発現特性

- (A) ZZ、ZW 未選別の Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳における *ERα* mRNA の発現変動
- (B) ZZ、ZW を選別した Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓、心臓における *ERα* mRNA の発現
- (C) ZZ、ZW を選別した Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓、心臓における *ERβ* mRNA の発現
- (D) ZZ、ZW 未選別の Stage 42、44、46、48、50、52、54、56 の脳の *ERα* タンパク質の発現変動
- (E) ZZ、ZW 未選別の Stage 50 の脳、生殖腺、肝臓、心臓の *ERα* タンパク質の発現

を示した。*ER* mRNA の転写レベルは、*eef1a1* (*EF-1α*) の転写レベルにより標準化した。リアルタイム RT-PCR 解析は、Stage 50 の脳における発現レベルを 100% とし、少なくとも三重測定で行った。エラーバーは標準誤差を示し、脳の Stage 毎の異なる文字表記 (a, b, c) 及び ZZ、ZW 組織間のアスタリスク (*) では、発現が有意に異なっていた ($P < 0.05$)。ウェスタンブローディング法による解析は、抗 *ERα* 抗体に対し内部標準として抗アクチン抗体を用いた。

4-3-6 E2 及びその阻害剤による

神経細胞軸索の伸長及びアストログリアの伸展に対する影響

アフリカツメガエルの脳の初代培養細胞において、神経細胞あるいはアストログリアへの E2 及び ICI182,780 (ICI) 処理による影響を免疫蛍光染色により解

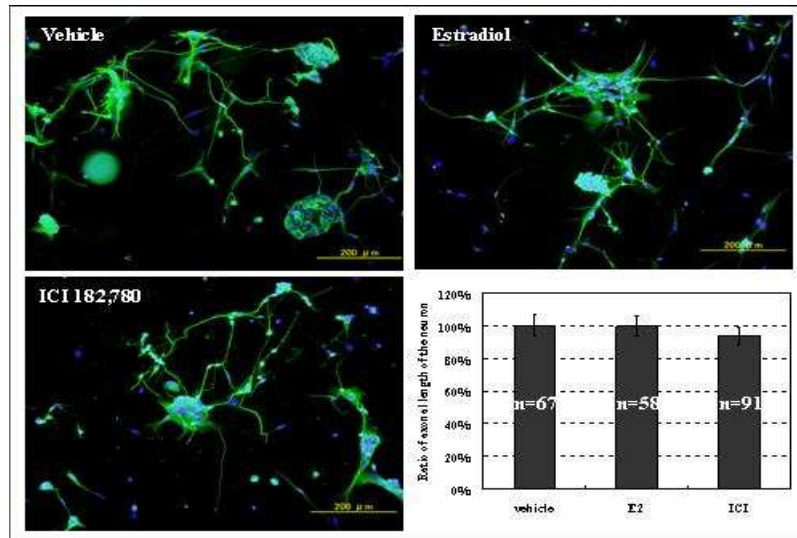
析した。ICI は抗エストロゲン活性を有する化合物であり、核内受容体型のエストロゲン受容体のアンタゴニストとして作用する。また G タンパク質共役型の膜型受容体である GPR30 に対してはアゴニストとしての作用も報告されている [59]。神経細胞においては、抗 *class II β -tubulin* 抗体により可視化を行い、化合物処理による軸索長の変化を測定した (Fig. 24A)。同様にアストロサイトにおいては抗 *Vimentin* 抗体で染色を行い伸展した面積比を測定した (Fig. 24B)。しかしながら、E2 及び ICI いずれの処理においても有意な影響は観察されなかった。

4-3-7 脳の初代培養細胞を用いた

細胞障害に対する E2 処理による保護作用

アフリカツメガエル脳の初代培養細胞を用い細胞障害時における E2 処理による保護作用の検討を LDH assay により行った (Fig. 25)。乳酸脱水素酵素 (LDH) は細胞質に存在し、通常は細胞膜を透過しないが、細胞膜が障害を受ける事で細胞外へと放出される。そのため、LDH の細胞外への放出は細胞障害性の指標とすることができる。細胞への障害剤として、小胞体膜上の Ca^{2+} -ATP を阻害及び小胞体ストレスから細胞死を引き起こす、タプシガルギン (Tg) による処理を行った。また、その際の E2 前処理による保護作用を観察した。Tg 処理により、溶媒 (DMSO) のみのコントロールに対し、約 2 倍の LDH 流出の上昇が観察された。また、事前の E2 処理により、Tg 処理による LDH の流出の減少する事が確認された。

A



B

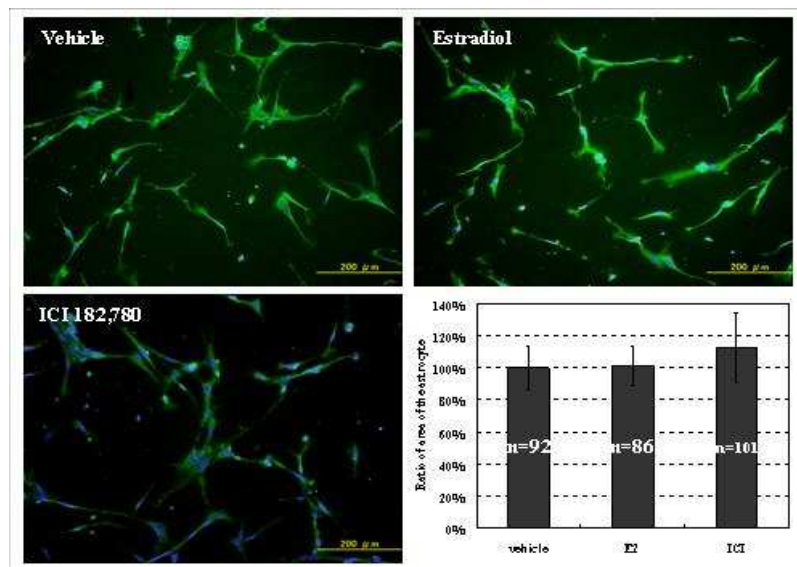


Fig. 24 E2 及びその阻害剤による神経細胞の軸索と
アストログリアの成長に対する影響

GCD カメラによってランダムに 4 視野を取得して解析を行った。神経細胞の軸索長及びアストログリアの面積比は ImageJ ソフトウェアにより計測した。計測した値は溶媒のみの値を 100%とし、計測数は棒グラフ中に示した (n=92, 86, 101)。エラーバーは標準誤差を示した。

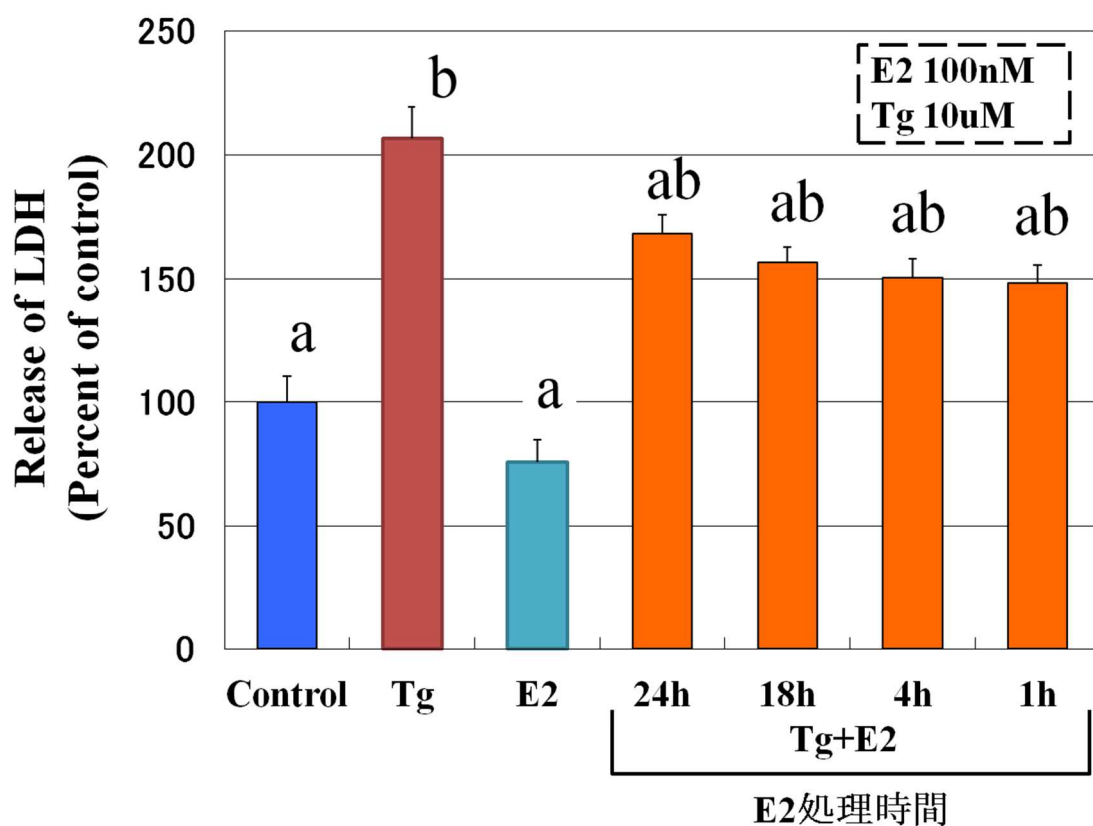


Fig. 25 アフリカツメガエル脳初代培養細胞におけるタブシガルギン (Tg) による細胞障害に対する E2 の保護効果

Stage 50 の脳の初代培養細胞における E2 の保護効果を示した。溶媒 (DMSO) でのみ処理を行った細胞の LDH の放出量を Control : 100% とし、各化合物処理における LDH 放出量を示した。培養は 7 日間行い、測定の前日に Tg 10 μ M 処理、その 1-24 時間前に E2 100 nM 処理を行った。エラーバーは標準誤差を示し、各処理の異なる文字表記 (a, b) では、値が有意に異なっていた ($P < 0.05$)。

4-4 考察

アフリカツメガエルの脳におけるアロマターゼ mRNA の発現は、他の組織に比べ高いレベルを示すものの性差は見られず、タンパク質レベルは脳の形態形成に伴う発現の上昇が観察された (Fig. 19 及び 20)。また、この知見は、先行研究におけるアフリカツメガエル成体における性差のない発現とも一致する [17]。免疫組織化学染色における解析からは、アロマターゼタンパク質は Stage 42 から 50 の間に形成される側脳室中の脈絡叢、前脳の皮質及び嗅葉において発現を始める事を明らかにした (Fig. 21)。

げっ歯類の脳において、海馬及び小脳等の神経細胞では E2 の作用により、神経前駆細胞の増殖、樹状突起上のスパインの発達、雌雄の性的二型核の形成等の神経発達及び神経新生等に対する影響が観察されている [60, 61]。しかしながら、本研究においてアフリカツメガエルの脳では、E2 含有量及び $ER\alpha$ はアロマターゼの発現と対照的に、脳の形態形成に伴う発現変化が観察されなかった (Fig. 23)。また、脳初代培養細胞の E2 処理あるいは、その阻害剤 ICI 処理からは、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 (Fig. 24)。

また、哺乳類では新皮質の発達において、リーリタンパク質が新皮質層の神経細胞のインサイド-アウトのパターン形成の際の細胞移動に必須である事が報告されている [62]。マウスの歯状回及びプルキンエ細胞層でも、この辺縁層に位置するカハール-レチウス (CR) 細胞により分泌されるリーリタンパク質が神経細胞の移動に関与していると考えられている。この CR 細胞においては、 $ER\alpha$ の発現が観察されている他、E2 がリーリンの発現上昇を誘導する事、及びアロマターゼの活性阻害はリーリンの発現減少を引き起こす事が報告されている [63, 64]。しかしながら、両生類の脳外套では、哺乳類とは異なり、神経細胞は側脳室周囲に密集し、その周辺からほとんど移動を行わない [65]。そのため、リーリン mRNA の発現も Stage 42 から 54 のアフリカツメガエルの脳におい

て発生段階依存的な変化が観察されない[66]。

これらの知見より、アフリカツメガエルの脳における *ER α* の定常的な発現は、性的二形核の形成やニューロン新生のような形態形成に関する作用よりも、神経細胞の障害に対する保護に役立っている可能性が考えられる。本研究において、アフリカツメガエルの脳の初代培養細胞への E2 の前処理は、細胞障害に対する保護効果を示した (Fig. 25)。哺乳類の脳細胞における E2 処理の効果としても、虚血後に起こる神経細胞死に対する保護作用が報告されており、アポトーシス促進及び抗アポトーシス制御分子である *Bcl-2* ファミリーの発現の上昇あるいは減少させる事が報告されている[61, 67-69]。

本研究の特徴的な知見として、アフリカツメガエルの心臓において、E2 及び *ER α* が脳よりも高いレベルに発現している事が観察された (Fig. 22 及び 23)。アロマトラーゼの発現が、ほとんど検出されない心臓において E2 及び *ER α* が高レベルに局在している事に対する、一つの可能な解釈としては、側脳室の脈絡叢におけるアロマトラーゼによって生成される E2 が心臓に流入している可能性が考えられる。哺乳類の側脳室において、脈絡叢は側脳室及びクモ膜下腔を満たす脳脊髄液 (CSF) を分泌する。また、CSF の一部はクモ膜顆粒あるいは脳の毛細血管から吸収され、大静脈を経て心臓へと送られる[70]。また、このアフリカツメガエルの脳のアロマトラーゼにより合成される E2 が心臓を経て、全身へと循環している可能性は、脳のアロマトラーゼ上昇時に、脳中の E2 含有量の変化が乏しいのに対し、全身における E2 含有量が増加している事からも支持される (Fig. 22)。また、全身の E2 上昇時において、生殖腺はアロマトラーゼの発現上昇以前であり、その器官形成もまだ十分になされていない。そのため、この時期のアロマトラーゼの発現が検出されるのが脳のみである事からも、アフリカツメガエルにおいては、E2 の供給器官として脳が重要な役割を果たしている事が示唆される。

第5章 総論

本論文はアフリカツメガエルの脳において高発現するアロマターゼの発現制御機構及び役割を明らかにする事を目的として、解析を行った結果をまとめたものである。

第2章では、アフリカツメガエルの脳における *cyp19a1* ゲノム DNA のクローニングを行い、脳特異的アロマターゼプロモーター/エキソン 1. f の他脊椎動物種との共通点及び相違点を詳細に比較した。その結果、各脊椎動物種間におけるプロモーター領域の大きな変化は、系統進化的に法則性がある事を明らかにし、哺乳類の *Cyp19a1* ゲノム DNA 上には、アフリカツメガエルには見られない多数の新たなプロモーター領域の挿入が起こり、それに伴い脳特異的アロマターゼの発現から組織特異的なアロマターゼの発現へと進化した可能性を示唆した。

ヒト、マウス等の哺乳類の脳におけるアロマターゼの発現レベルは他の組織に比べ同程度のレベルに観察されるのに対し[18, 35]、魚類のゼブラフィッシュ、両生類アフリカツメガエルでは、脳のアロマターゼは高レベルに発現しており、脳以外のアロマターゼ発現組織も生殖腺に限られている[17]。また、鳥類のキンカチョウでは脳のアロマターゼの発現は高レベルにはないものの、魚類、両生類と同様に、脳と卵巣において局所的にアロマターゼが検出される[36, 37]。これらの知見は、主として生殖腺及び脳においてアロマターゼを発現している魚類、両生類、鳥類等の脊椎動物種から哺乳類への系統進化において、脳におけるアロマターゼの発現レベルが減少し、アロマターゼ遺伝子の発現が組織特異的になっている事は、後述の脳におけるアロマターゼの役割自体の変化とも関連しているものと予想される。

本研究を通して、魚類の脳において発現の見られる *Cyp19b* は、アフリカツメガエルよりクローニングする事ができなかった。また、アフリカツメガエルは偽四倍体あるのに対し[71]、二倍体である全ゲノム配列の解読がなされてい

るピパ科近縁種のネツタイツメガエル (*Silurana (Xenopus) tropicalis*) のゲノム配列上からも BLAST 検索において *Cyp19b* 遺伝子は検出されない。しかしながら、近年、新たに同定された四倍体の *Silurana* の種では二つの異なる *cyp19a1* 遺伝子の一部がクローニングされている (GenBank ID: EU446245 / EU446246) [71]。そのため、アフリカツメガエルにおいても偽遺伝子の *cyp19a1* 遺伝子が存在する可能性が考えられる。更なるゲノム上の *cyp19a1* の遺伝子座の解析は新たな知見になるものと期待される。また、アフリカツメガエルは、二倍体のツメガエル種 ($2n=20$) からゲノム倍数化後、偽四倍体 ($2n=36$) となり種分化してきた種の一つと考えられているため [72]、この脳におけるアロマターゼの高発現を制御する独特な制御機構の解明は、両生類間の分子進化は基より、生物の陸上進出の際の分子レベルでの進化を探る上でも意義ある研究だと考えられる。

第3章ではクローニングした脳特異的プロモーター I. f の解析を行い、転写に関わるシスエレメント領域及びその予想転写因子の発現特性を明らかにした。プロモーター I. f 上には脊椎動物の綱をまたいだ共通の転写活性化機構が存在する可能性が考えられるものの、アフリカツメガエル特有の転写活性化機構も存在し、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に関与している可能性が示唆された。

哺乳類のプロモーター I. f が TATA box 配列を有し、シングルサイトにより転写が制御されているのに対し、アフリカツメガエルのプロモーター I. f は TATA-less プロモーターであるため転写開始点が散在している事が推定される。イニシエーター配列付近はアフリカツメガエル特有のプロモーター配列になっており、その他の脊椎動物種では相同性が観察されない。そのため、アフリカツメガエルの脳においては、このイニシエーター配列近傍が、哺乳類には見られないような脳のアロマターゼの高発現に関与しているものと考えられる。

本研究において、アフリカツメガエルの神経堤決定に関するリプレッサーとして同定された *foxd3* 遺伝子の発現は、脳のアロマターゼ遺伝子発現上昇時に

対照的に減少する事が観察された。この *foxd3* の結合が予想される転写因子結合配列は、多くの転写産物が散在する付近のイニシエーター配列と一部オーバーラップしている。そのため、*foxd3* の発現減少により、TFIID 等の基本転写因子及び保存配列上への結合が予想される 45 kDa の核タンパク質、*smad*、*stat* 等の定常的に発現の見られる予想転写因子により、脳アロマターゼの転写活性化が起こる可能性を示した。

しかしながら、発現に関する分子メカニズムを明確にするためには、これらのシスエレメント及び予想転写因子の更なる解析を要するものと考えられる。また、上述のアフリカツメガエルのゲノム倍数化による進化的観点から、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独特な制御機構は、アフリカツメガエル、または非常に近縁な偽四倍体の先祖種で新しく分子進化した可能性が考えられる。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生理学的意義を更に考察するためには、二倍体のネッタイツメガエルをはじめとして、その他の両生類の幾つか種の脳におけるアロマターゼに関する系統進化的観点に立脚した研究が必要になると思われる。

第 4 章では、側脳室脈絡叢、前脳の皮質及び嗅葉においてアロマターゼの発現が確認されたものの、その発現は性差がなく、E2 及び *ER α* との相関も得られなかった。しかし、アロマターゼの発現がほとんど検出されない心臓において E2 及び *ER α* が高レベルに局在している事から、脳におけるアロマターゼの高発現は、生殖腺を除く、全身への E2 の供給に役立っている可能性が考えられ、この知見はアフリカツメガエルのアロマターゼ発現は哺乳類のような組織特異的発現ではなく脳特異的発現であるという事実からも支持される [17, 18, 35, 73]。また、幼生期における脳のアロマターゼの役割は、細胞増殖、脳の性分化あるいは形態形成等のいずれに関与するのかについては、本研究からは不明瞭であった。しかしながら、少なくともアフリカツメガエルの脳の細胞障害時において、その保護に E2 が重要な役割を担っている事が明らかとなった。

ラットでは、E2 が、全身の虚血において誘導される脳神経の細胞死のみならず、雌雄両性の心臓障害もまた減少させる事が報告されている[13, 74]。ヒトでは、E2 の心臓保護は主に $ER\alpha$ の仲介により作用し、 $ER\alpha$ は PI3K-Akt カスケードのような細胞膜開始型のシグナリング経路の活性化に関与し、転写に依存しない速い効果を発揮できる事が報告されている[75, 76]。さらに、哺乳類の心臓及び生殖腺では、in vivo、in vitro の両方の環境下でエストロゲン処理により $ER\alpha$ 及び $ER\beta$ の上方制御が観察されている[77-81]。これらの知見は、アフリカツメガエルでは脳の脈絡叢によって生成された E2 が、 $ER\alpha$ を通して心臓の保護にも作用している可能性を示しているのかもしれない。

本研究により示される結果から、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 がもつ役割も脊椎動物の進化に伴い変化している事が推測できる。

参考文献

1. Okada, E., et al., *Xenopus W-linked DM-W induces Foxl2 and Cyp19 expression during ovary formation*. Sex Dev, 2009. **3**(1): p. 38-42.
2. Pettersson, I. and C. Berg, *Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in Xenopus tropicalis and Rana temporaria*. Environ Toxicol Chem, 2007. **26**(5): p. 1005-9.
3. Lutz, I., et al., *Development, standardization and refinement of procedures for evaluating effects of endocrine active compounds on development and sexual differentiation of Xenopus laevis*. Anal Bioanal Chem, 2008. **390**(8): p. 2031-48.
4. Villalpando, I. and H. Merchant-Larios, *Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in Xenopus laevis tadpoles*. Int J Dev Biol, 1990. **34**(2): p. 281-5.
5. Miyata, S. and T. Kubo, *In vitro effects of estradiol and aromatase inhibitor treatment on sex differentiation in Xenopus laevis gonads*. Gen Comp Endocrinol, 2000. **119**(1): p. 105-10.
6. Nakamura, M., *The mechanism of sex determination in vertebrates-are sex steroids the key-factor?* J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2010. **313**(7): p. 381-98.
7. Vierk, R., N. Brandt, and G.M. Rune, *Hippocampal estradiol synthesis and its significance for hippocampal synaptic stability in male and female animals*. Neuroscience, 2014.
8. Garcia-Segura, L.M., J.A. Chowen, and F. Naftolin, *Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion*. Front Neuroendocrinol, 1996. **17**(2): p. 180-211.
9. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
10. Raz, L., et al., *Rapid estrogen signaling in the brain*. Neurosignals, 2008. **16**(2-3): p. 140-53.

11. Yao, M., T.V. Nguyen, and C.J. Pike, *Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death*. J Neurosci, 2007. **27**(6): p. 1422-33.
12. Micevych, P., G. Bondar, and J. Kuo, *Estrogen actions on neuroendocrine glia*. Neuroendocrinology, 2010. **91**(3): p. 211-22.
13. Lebesgue, D., et al., *Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection*. Steroids, 2009. **74**(7): p. 555-61.
14. Morkuniene, R., et al., *Estradiol-induced protection against ischemia-induced heart mitochondrial damage and caspase activation is mediated by protein kinase G*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1012-7.
15. Wilson, M.E., J.M. Westberry, and A.L. Trout, *Estrogen receptor-alpha gene expression in the cortex: sex differences during development and in adulthood*. Horm Behav, 2011. **59**(3): p. 353-7.
16. Azcoitia, I., J.G. Yague, and L.M. Garcia-Segura, *Estradiol synthesis within the human brain*. Neuroscience, 2011. **191**: p. 139-47.
17. Urbatzka, R., I. Lutz, and W. Kloas, *Aromatase, steroid-5-alpha-reductase type 1 and type 2 mRNA expression in gonads and in brain of Xenopus laevis during ontogeny*. Gen Comp Endocrinol, 2007. **153**(1-3): p. 280-8.
18. Chow, J.D., E.R. Simpson, and W.C. Boon, *Alternative 5'-untranslated first exons of the mouse Cyp19A1 (aromatase) gene*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **115**(3-5): p. 115-25.
19. Ramachandran, B., et al., *Zebra finch aromatase gene expression is regulated in the brain through an alternate promoter*. Gene, 1999. **240**(1): p. 209-16.
20. Harada, N. and S. Honda, *Analysis of spatiotemporal regulation of aromatase in the brain using transgenic mice*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **95**(1-5): p. 49-55.
21. Kamat, A., et al., *Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(3): p. 122-8.

22. Pellegrini, E., et al., *Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish*. Gen Comp Endocrinol, 2005. **142**(1-2): p. 60-6.
23. Ball, G.F. and J. Balthazart, *Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds*. Physiol Behav, 2004. **83**(2): p. 329-46.
24. McCarthy, M.M., *Estradiol and the developing brain*. Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 91-124.
25. Azcoitia, I., et al., *Neuroprotective actions of estradiol revisited*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(12): p. 467-73.
26. Duncan, K.A. and C.J. Saldanha, *Neuroinflammation induces glial aromatase expression in the uninjured songbird brain*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 81.
27. Melcangi, R.C., G. Panzica, and L.M. Garcia-Segura, *Neuroactive steroids: focus on human brain*. Neuroscience, 2011. **191**: p. 1-5.
28. Nebert, D.W., et al., *The P450 gene superfamily: recommended nomenclature*. DNA, 1987. **6**(1): p. 1-11.
29. 原田信宏, *P-450・アロマターゼ (エストロゲン合成酵素) の構造と機能*. 蛋白質核酸酵素, 1992. **37**(16): p. 3051-3059
30. Kishida, M. and G.V. Callard, *Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (Danio rerio) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development*. Endocrinology, 2001. **142**(2): p. 740-50.
31. Nocillado, J.N., et al., *Cytochrome P450 aromatase in grey mullet: cDNA and promoter isolation; brain, pituitary and ovarian expression during puberty*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **263**(1-2): p. 65-78.
32. Patil, J.G. and R.M. Gunasekera, *Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka (Oryzias latipes): implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development*. Gen Comp Endocrinol, 2008. **158**(1): p. 131-7.
33. Callard, G.V., et al., *Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish*. J

- Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **79**(1-5): p. 305-14.
34. Blazquez, M. and F. Piferrer, *Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (Dicentrarchus labrax)*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **219**(1-2): p. 83-94.
 35. Demura, M., et al., *Novel promoter I.8 and promoter usage in the CYP19 (aromatase) gene*. Reprod Sci, 2008. **15**(10): p. 1044-53.
 36. Callard, G., et al., *Aromatization and estrogen action in brain*. Prog Clin Biol Res, 1990. **342**: p. 105-11.
 37. Schlinger, B.A. and A.P. Arnold, *Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4191-4.
 38. Yamada-Mouri, N., et al., *Analysis of the expression and the first exon of aromatase mRNA in monkey brain*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **55**(1): p. 17-23.
 39. Furbass, R., C. Kalbe, and J. Vanselow, *Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons*. Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2813-9.
 40. Vanselow, J., et al., *Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle*. Eur J Biochem, 1999. **265**(1): p. 318-24.
 41. 中村正久, *爬虫類と両生類の性決定—温度依存性決定機構*. 蛋白質核酸酵素, 2004年. 2月号.
 42. Nieuwkoop, P.D.F., J., *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam: North Holland Publishing., 1956.
 43. Akatsuka, N., et al., *Expression of the gonadal p450 aromatase gene of Xenopus and characterization of the 5'-flanking region of the aromatase gene*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **96**(1): p. 45-50.
 44. Honda, S., N. Harada, and Y. Takagi, *Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(3): p. 1153-60.

45. Boerboom, D., A. Kerban, and J. Sirois, *Dual regulation of promoter II- and promoter I β -derived cytochrome P450 aromatase transcripts in equine granulosa cells during human chorionic gonadotropin-induced ovulation: a novel model for the study of aromatase promoter switching*. *Endocrinology*, 1999. **140**(9): p. 4133-41.
46. Honda, S., et al., *Identification of cis-acting elements in the proximal promoter region for brain-specific exon 1 of the mouse aromatase gene*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. **66**(1-2): p. 122-32.
47. Tora, L. and H.T. Timmers, *The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics in vivo*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(6): p. 309-14.
48. Muller, F., M.A. Demeny, and L. Tora, *New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(20): p. 14685-9.
49. Bulun, S.E., et al., *The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. **86**(3-5): p. 219-24.
50. Chen, D., et al., *Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters*. *Cancer Lett*, 2009. **273**(1): p. 15-27.
51. Sebastian, S., et al., *Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue*. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(10): p. 2243-54.
52. Yilmaz, M.B., et al., *Aromatase promoter I β is regulated by estrogen receptor alpha (ESR1) in mouse hypothalamic neuronal cell lines*. *Biol Reprod*, 2009. **81**(5): p. 956-65.
53. Saka, Y., et al., *Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in Xenopus*. *Development*, 2007. **134**(23): p. 4209-18.
54. Chen, X., et al., *Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor*. *Nature*, 1997. **389**(6646): p. 85-9.
55. Chang, C., A.H. Brivanlou, and R.M. Harland, *Function of the two Xenopus*

- smad4s in early frog development.* J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30794-803.
56. Howell, M., G.J. Inman, and C.S. Hill, *A novel Xenopus Smad-interacting forkhead transcription factor (XFast-3) cooperates with XFast-1 in regulating gastrulation movements.* Development, 2002. **129**(12): p. 2823-34.
 57. Yoshimoto, S., et al., *A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in Xenopus laevis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2469-74.
 58. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
 59. Thomas, P., et al., *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells.* Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 624-32.
 60. Tanapat, P., et al., *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat.* J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5792-801.
 61. Tsukahara, S., *Sex differences and the roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats.* J Neuroendocrinol, 2009. **21**(4): p. 370-6.
 62. Yoshida, M., et al., *Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order.* Development, 2006. **133**(3): p. 537-45.
 63. Bender, R.A., et al., *Roles of 17 β -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus.* Cereb Cortex, 2010. **20**(12): p. 2985-95.
 64. Biamonte, F., et al., *Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival.* Neurobiol Dis, 2009. **36**(1): p. 103-15.
 65. Perez-Garcia, C.G., et al., *Reelin-immunoreactive neurons in the adult vertebrate pallium.* J Chem Neuroanat, 2001. **21**(1): p. 41-51.
 66. Iwabuchi, J., K. Koshimizu, and T. Nakagawa, *Expression profile of the aromatase enzyme in the Xenopus brain and localization of estradiol and*

- estrogen receptors in each tissue*. Gen Comp Endocrinol, 2013. **194**: p. 286-94.
67. Wise, P.M., *Estrogens and neuroprotection*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(6): p. 229-30.
68. Chamniansawat, S. and S. Chongthammakun, *A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection*. Exp Mol Med, 2012. **44**(6): p. 403-11.
69. Maki, P.M. and E. Sundermann, *Hormone therapy and cognitive function*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(6): p. 667-81.
70. Greitz, D. and J. Hannerz, *A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography*. AJNR Am J Neuroradiol, 1996. **17**(3): p. 431-8.
71. Chain, F.J., D. Ilieva, and B.J. Evans, *Duplicate gene evolution and expression in the wake of vertebrate allopolyploidization*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 43.
72. Uno, Y., et al., *Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae*. Chromosome Res, 2008. **16**(7): p. 999-1011.
73. Nakagawa, T. and J. Iwabuchi, *Brain-specific promoter/exon 1 of the cyp19a1 (aromatase) gene in Xenopus laevis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **132**(3-5): p. 247-55.
74. Dai, X., L. Chen, and M. Sokabe, *Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons*. Neuropharmacology, 2007. **52**(4): p. 1124-38.
75. Novotny, J.L., et al., *Rapid estrogen receptor-alpha activation improves ischemic tolerance in aged female rats through a novel protein kinase C epsilon-dependent mechanism*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 889-96.
76. Deroo, B.J. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 561-70.
77. Lin, W., et al., *Molecular mechanisms of bladder outlet obstruction in transgenic male mice overexpressing aromatase (Cyp19a1)*. Am J Pathol, 2011.

178(3): p. 1233-44.

78. Bliedtner, A., et al., *Effects of genistein and estrogen receptor subtype-specific agonists in ArKO mice following different administration routes*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 41-52.
79. Nakamura, T., et al., *Estrogen receptor subtypes selectively mediate female mouse reproductive abnormalities induced by neonatal exposure to estrogenic chemicals*. Toxicology, 2008. **253**(1-3): p. 117-24.
80. Hsieh, Y.C., et al., *Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(3): p. 511-21.
81. Jankowski, M., et al., *Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11765-70.

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるに当たり、主査として審査を快くお引き受け頂いた神奈川大学理学部生物科学科 泉 進 教授に心より深謝の意を表します。同時に、本学位論文の執筆にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました日本大学文理学部生命システム科学科 澤田 博司 教授に心から深謝の意を表します。

学位審査において貴重な御指導、御助言を頂いた神奈川大学理学部生物科学科 井上 和仁 教授、神奈川大学理学部生物科学科 大平 剛 准教授、神奈川大学理学部生物科学科 豊泉 龍児 准教授に厚く御礼申し上げます。

また、論文執筆に際し御支援及び実験設備の提供をして下さった日本大学文理学部化学科 宮田 昇平 教授に御礼申し上げます。

本研究を共に遂行し、御協力を頂いた日本大学大学院総合基礎科学研究科 関連理化学専攻 平成 22 年度修了生 中川 忠彦さん、平成 23 年度修了生 越水 皓太さんに心より感謝の意を表します。

研究を進めるにあたり、多くの有益な御助言、御協力を頂きました日本大学大学院総合基礎科学研究科 関連理化学専攻 平成 19 年度修了生 若生 俊さん、平成 17 年度修了生 石川 梓さん、平成 16 年度修了生 吉田 裕輝さん、日本大学文理学部化学科 平成 16 年度卒業生 田中 龍也さんを始めとする分子生物化学研究室の皆様心より感謝致します。

最後に、常に温かく見守り、支えてくれた家族に深く感謝致します。

2014 年 9 月

岩渕 順真