

岡崎国立共同研究機構
基礎生物学研究所，教授

諸橋 憲一郎

「性分化機構の解明」

研究期間：平成11年1月1日～平成15年12月31日

1. 研究実施の概要

【基本構想】

多くの生物種は二つの性—『雄と雌』—を獲得することで、有性生殖を確立した。この生殖のプロセスは、次世代に遺伝情報を受け継ぐことで種の存続を可能にしたばかりでなく、生殖細胞の形成過程における減数分裂は相同染色体間の組み換えを通じて、遺伝的多様性を生み出す原動力となった。加えて、この遺伝的多様性を種が多様性へと深化させるためには生殖の隔離が重要であったことを考えれば、生殖プロセスの構築に不可欠な雌雄両性の分化こそが地球上の多様な種の繁栄を可能にした基本原理であり、従って「性の分化」は極めて重要な研究対象と位置付けられる。

生殖活動は視床下部—脳下垂体—性腺から構築される巧妙な内分泌系によって支配されるが、この支配は単に生殖腺の分化と機能維持にとどまることなく脳の性分化や性行動まで、極めて広範囲に及ぶことで動物個体としての生殖活動を調節する。研究代表者は生殖腺や副腎皮質特異的なステロイドホルモン産生能に着目し、これら組織の形成機構を解析してきた。その過程で、ステロイドホルモンの産生に不可欠な遺伝子群の転写調節因子としてAd4BP/SF-1を同定することに成功した。その後の研究から、この因子は生殖腺の発生に不可欠な因子であることが示されたが、このような機能以外に視床下部—脳下垂体—性腺における発現を通じ、生殖活動全体を統括する因子としての機能をも担うことが分かった。そこで、本研究プロジェクトではAd4BP/SF-1を中心に生殖腺の分化および性分化を制御する転写因子に着目し、その制御メカニズムの解明を通じ、生殖腺の性分化機構の解析を目ざした。さらに、Ad4BP/SF-1が視床下部や脳下垂体にも発現することから、生殖腺レベルの解析だけでなく脳の性分化をも視野に入れた研究を展開することで、生殖活動を制御する基本メカニズムの解明と動物個体の性分化機構を総合的に検討することを目的として研究を進めた。

一方、自然界に放出された無数の化学物質のなかには生体内に吸収されるとホルモン様活性を示すことで、内分泌系に異常をもたらす物質の存在が指摘されてきた。特に生殖機能に対する影響は種の絶滅を招く危険性があり、極めて重大な社会問題として認知されている。しかしながら、内分泌かく乱物質の作用メカニズムに関する基礎研究は大きく立ち遅れており、これらの化学物質がいかなる機構のもとに生殖機能に影響を及ぼすのかという点を明らかにすることが、内分泌かく乱物質に関する問題の解決には不可欠であると思われた。そこで、内分泌かく乱物質問題の中心的役割を担うエストロジェンレセプターとダイオキシンレセプターの、生殖腺における機能を検討することで、内分泌かく乱物質が生殖活動

に及ぼす影響を多面的に解析することとした。これらの研究は生殖腺の分化を制御する分子メカニズムや、成熟した生殖腺での機能発揮の分子メカニズムなどの基礎研究の上に成り立つものであるが、本研究チームにおける基礎研究の成果を内分泌かく乱物質研究へと展開することが可能であると考えた。

【実施・研究成果】

以上の基本構想のもと、マウスおよびニワトリをモデル動物として生殖腺の分化及び性分化の分子メカニズムを解析した。特に、遺伝子の転写制御機構をもとにした分子メカニズムに焦点を当てることで、生殖腺の分化と性分化を制御する遺伝子カスケードの解明を目ざした。このような方向からの解析には注目する転写因子の種類と機能が重要であるが、本研究では核内受容体ファミリーに属し、生殖腺の形成には不可欠な因子であるAd4BP/SF-1とエストロゲンレセプター α 、さらにダイオキシンレセプターを取りあげ、これらの転写因子の機能調節メカニズムを生化学的、および細胞生物学的手法によって解析した。その結果、生殖腺や個体全体の性分化過程における、新たな分子メカニズムが明らかにされた。特に、Ad4BP/SF-1と相互作用する因子の解析からは、生殖腺の分化に関与する新たな因子が多数同定された。諸橋研究グループ（基礎生物学研究所）は、ホメオボックスを有するARXに関する研究を通じ、これまで未解明であったヒト性分化異常症の一つ、X染色体連鎖性滑脳症及び外性器異常を示す疾患の原因遺伝子を解明したことで、その診断を可能にするとともに、治療の可能性への道を開いた。また、生殖腺の性分化を制御する遺伝子カスケードの解明に向けた解析からは、雌化因子として機能するWNT4やDAX-1の関連が明らかとなった。川尻研究グループ（埼玉がんセンター研究所）はDAX-1による転写抑制が核移行の調節を通じて行われていることを明らかにした。これらの研究は、これまであまり注目されなかった生殖腺の雌化カスケードの一端を明らかにしたものとして、意義深いものであった。一方、生殖腺の分化や機能維持に不可欠な各種遺伝子の破壊マウスを用いることで、これらの遺伝子の生殖腺形成過程における機能を遺伝学的、かつ発生生物学的手法を用いて解析した。これらの研究からは、新たな因子の関与を明らかにするとともに、これまでに作製された遺伝子破壊マウスとを用いた遺伝的相互作用の解析を通じ、遺伝子間の関係を検討してきた。生殖腺の分化を制御する遺伝子カスケードの解明に向けた、新たな解析の可能性を示すものとして、今後の展開が期待される。

吉岡研究グループ（兵庫教育大）は、ニワトリ胚を用いた実験から、細胞増殖因子FGF9が生殖腺の発生を制御することを明らかにした。また、一般に鳥類では

右側卵巢は胚発生の時期に退縮し、左側のみが成熟卵巢として機能することが知られている。鳥類の雌に特徴的な生殖腺の左右非対称性は興味深い問題であったが、その分子メカニズムは不明であった。この問題に対し発生生物学的手法を用いることで、その分子メカニズムを明らかにした。この研究成果は、動物学や生殖生理学の分野で長い間、興味深い問題として議論されてきた問題に対する解答を与えた点において、高く評価されるものである。

ダイオキシンが内分泌かく乱物質として、女性ホルモン様作用を発揮することが指摘されていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、藤井研究チームとの共同研究でダイオキシンレセプターの遺伝子破壊マウスが不妊となることに着目し、その原因を解析した。この解析を通じ、ダイオキシンが女性ホルモン様作用を発揮する分子メカニズムを解明することに成功した。この成果は、ダイオキシンレセプターの生理的機能をはじめ明らかにしただけでなく、内分泌かく乱物質としてのダイオキシンの実体を明らかにしたものとして、極めて貴重な結果であった。川尻グループは、ダイオキシンレセプターの活性が細胞内局在のリン酸化による調節を受けることをあきらかにし、新たな調節システムの可能性を示した。

エストロゲンの様々な生理活性には、細胞増殖活性などのようにその作用メカニズムが不明のものが多い。井上研究グループ（東京大学医学研究科）では、新たに同定したエストロゲンレセプターの標的遺伝子産物が細胞分裂制御因子の分解を制御することで、細胞増殖に関与することを明らかにした。この成果は、エストロゲンの細胞増殖活性の分子メカニズムをはじめて解明したものである。

これらの成果は生殖腺の分化メカニズムや成熟した生殖腺の機能に関する基礎的研究から得られたものであった。本研究で進められた基礎研究の一部が、ダイオキシンの内分泌かく乱作用の分子メカニズムの解明へとつながったことは、内分泌かく乱物質研究における基礎研究の重要性を示すと同時に、このような基礎研究こそが内分泌かく乱物質の本質的な理解は不可欠であり、ひいてはその根本的解決のための基盤を提供するものであることを明確に示すものであった。

2. 研究構想

【研究開始時に目指した目標】

性分化機構の学術的重要性に加え、性分化を制御する分子メカニズムが内分泌かく乱物質問題の根本的解決には不可欠であるとの立場から、本研究を推進した。特に、核内受容体であるAd4BP/SF-1とエストロゲンレセプター、また内分泌かく乱活性を有するダイオキシンに対するレセプターなどの機能に着目し、分化途上

の生殖腺や成熟生殖腺の機能制御の分子メカニズムの解明，すなわち「性分化機構」の解明に焦点を当てた。

【立案した5年間の研究計画・進め方】

本研究の発足当初，以下の項目を中心に研究を開始した。

- (1) Ad4BP/SF-1と相互作用する因子を介した転写調節機構の解析
- (2) 生殖腺の分化過程で発現する遺伝子の破壊マウスの作製と解析
- (3) 生殖腺の分化過程における細胞増殖因子の機能解析
- (4) 視床下部腹内側核の機能解析
- (5) ダイオキシンレセプターの活性制御メカニズムの解析
- (6) エストロゲンレセプターの標的遺伝子を介したエストロゲンの作用機序の解析
- (7) 生殖腺の分化過程における内分泌かく乱物質の転写制御因子の発現に対する影響

【その後の新展開から生まれた目標】

本研究では，生殖腺の分化を制御する遺伝子カスケードの解明は重要な課題であった。当初は遺伝子間の1対1の対応関係を基本として，全体像を明らかにする方向で研究を開始した。しかしながら，このような手法のみでは全体像の把握に長い時間を要することから，本研究では遺伝学的検討を加えることとした。このため，新たに作製した遺伝子破壊マウスやトランスジェニックマウスを含め，既に作成され生殖腺の分化に異常を示す遺伝子破壊マウスやトランスジェニックマウスを収集した。収集したマウスの遺伝的背景を129J，C57BL/6，FVBの3種の系統に統一することで，各種遺伝子変異マウス間の交配実験の際に生じることが予想される，遺伝的背景の差による表現型のバリエーションをなくす工夫をしてきた。このようなマウスを既に十数種類維持しており，交配実験を開始している。これらのマウスの収集と遺伝的背景の統一作業には既に3年程を費やしてきたが，これほどのストックを維持している研究室は世界的に見ても例がなく，今後の展開が極めて独創性のあるものとなることを保証するものである。現在，これらのマウスを用いて遺伝的相互作用の解析を行なっているところであるが，このような解析が遺伝子カスケードの解明へつながることが証明されつつある。

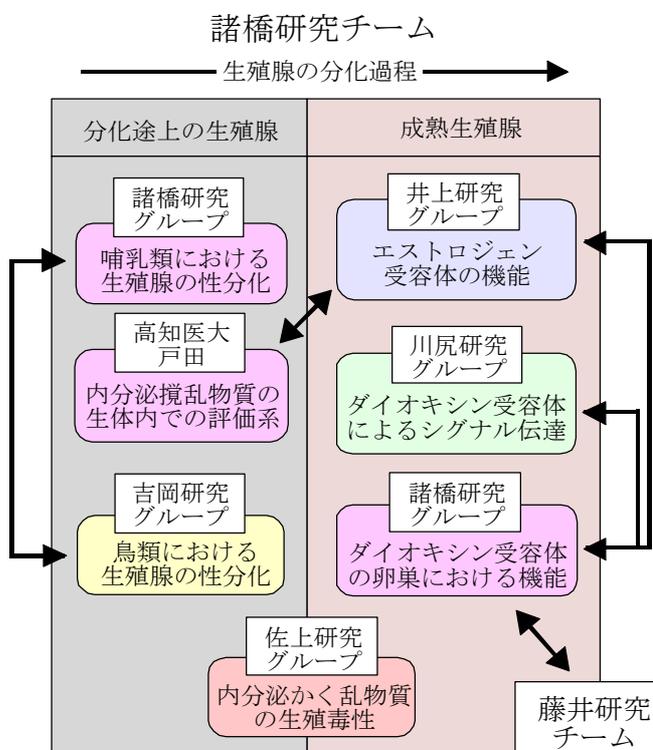
ダイオキシンが生殖腺に対し内分泌かく乱作用を有することは，種々の事例から指摘されてきたところであったが，ダイオキシンレセプターの生殖腺での生理的機能が明らかになっていないことから，ダイオキシンの生殖腺に対する影響や

そのメカニズムは不明であった。藤井チームで作製されたダイオキシンレセプター遺伝子破壊マウスの雌の妊性が著しく低下することから、その表現型の検討を通じてダイオキシンレセプターの卵巣における機能を検討することとした。

また、内分泌かく乱物質の影響を生体内で評価するシステムの構築について、高知医科大学の戸田勝己助教授より共同研究の提案があり、本研究の一部として遂行した。期待通りのマウスの作製に成功した。

【研究構想実現のために各サブグループが担った役割分担】

以上の研究を推進するにあたり、本研究チームでは研究代表者の諸橋研究グループと吉岡研究グループ、及び佐神研究グループ（エーザイ毒性研究所・佐神文郎）が分化途上の生殖腺を対象に、哺乳類と鳥類における性分化を制御する遺伝子カスケードの解析と内分泌かく乱物質の生殖腺形成期に与える影響を調べた。また、ダイオキシンレセプターの機能制御を川尻グループが中心となり進めた。その後、藤井研究チームとの共同研究により、ダイオキシンの卵巣機能に対する影響を分子レベルで解明した。エストロゲンレセプターの機能解析は井上研究グループが中心に進めた。



3. 研究成果

以下に各研究グループにおける（１）研究内容と成果，及び（２）研究成果の今後期待される効果に付いて述べる。

3-1 諸橋グループ

3-1-1 核内受容体マウスDax-1遺伝子の転写制御の解析

（１）研究内容及び成果

X染色体短腕に位置し量依存的に性分化に関与する遺伝子の存在が予想されていた。一方，先天性副腎低形成で下垂体性の性腺低形成を伴う疾患の原因遺伝子もほぼ同じ場所に存在することが知られていたが，1994年になってこの領域からDAX-1遺伝子が同定されている。

マウスにおけるDax-1の機能に関して，Dax-1を未分化生殖腺に発現させたトランスジェニックマウスの報告がある。このマウスでは，精巣への分化の遅延が認められ，さらにこのマウスを精巣決定機能が弱いマウスの系統と交配したところ，XY個体に卵巢が形成される。これらの結果およびヒトの遺伝性疾患の表現型から，DAX-1は卵巢への分化過程に重要な役割を担っていると推測された。また，生殖腺の性分化時期におけるDax-1の発現は雄よりも雌で高い。このことは，Dax-1が卵巢への分化過程に重要な役割を担っていることを支持するが，このような雌の胎仔生殖腺におけるDax-1の高い発現を維持する分子メカニズムの詳細は不明であった。そこで，Dax-1遺伝子のプロモーター解析を通してこの課題に取り組んだ。

Dax-1遺伝子の転写活性化は，Ad4BP/SF-1による制御が不可欠である。しかしながら，生殖腺の性分化時期におけるAd4BP/SF-1の発現が雄で高いことから，Ad4BP/SF-1に加えて他の転写調節因子が雌におけるDax-1の発現を制御すると推測された。一方，当研究室では酵母two-hybridスクリーニングを行ってきたが，その過程でAd4BP/SF-1との相互作用因子としてWntシグナルの伝達分子，βカテニンが単離された。一般に，Wntシグナルの活性は，βカテニンの安定化を介して制御される。Wntシグナルがない状態ではβカテニンはAxin，APC，GSK-3β，CKIなどからなる複合体によってリン酸化され，分解が促進される。Wntシグナル存在下では，Dvlを介してβカテニン

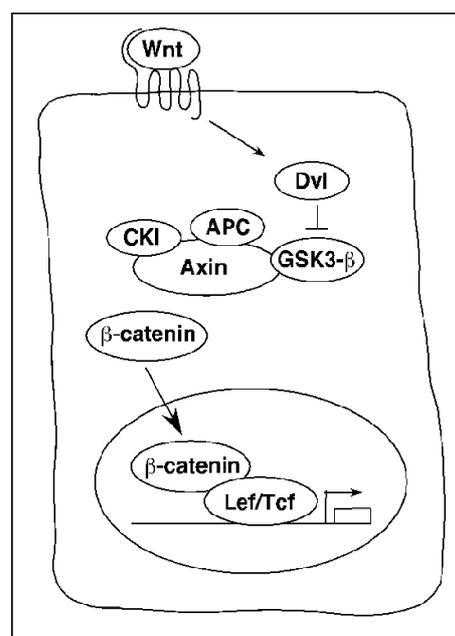


図1 Wnt/β-catenin伝達経路

のリン酸化が抑制され、分解は抑制される。その結果、安定化したβカテニンが核に移行し、HMG型転写因子 Lef/Tcf と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化するのである（図1）。以上のことから、*Dax-1* 遺伝子の転写は Wnt シグナルによるβカテニンの安定化、さらに Ad4BP/SF-1 との相互作用を通して活性化されると推測された。そこで、この可能性を調べるため培養細胞を用いたプロモーターアッセイを行った。その結果、βカテニンは、Ad4BP/SF-1 と協調的に働いて、*Dax-1* 遺伝子の転写を活性化することが明らかになった。次いで、Ad4BP/SF-1 とβカテニンの相互作用を解析した結果、Ad4BP/SF-1 のリガンド結合領域の helix1 に存在する酸性アミノ酸のクラスターとβカテニンのアルマジロリピートの後半が相互作用することが明らかとなった。さらに、βカテニンと相互作用できない Ad4BP/SF-1 の変異体はβカテニンとの協調的な活性化能を失う。これらの結果は、Wnt シグナルがβカテニンを通して、Ad4BP/SF-1 依存的に *Dax-1* 遺伝子の転写を活性化することを示している（図2）。

性分化異常を示す遺伝子欠損マウスとして、分泌性の因子 Wnt4 の遺伝子欠損マウスの生殖腺の解析結果が報告されている。胎仔期においては精巣特異的な発現を示す

遺伝子が、*Wnt4* 遺伝子欠損マウスの胎仔卵巣で検出されるというものである。これらの結果は、Wnt4 が未分化生殖腺の卵巣への分化に重要な役割を担うことを示唆するものであった。そこで、*Wnt4* 遺伝子欠損マウスの胎仔卵巣における *Dax-1* の発現を解析した。Wnt シグナルが *Dax-1* の上流に位置するならば、*Wnt4* 遺伝子欠損マウスの胎仔卵巣において

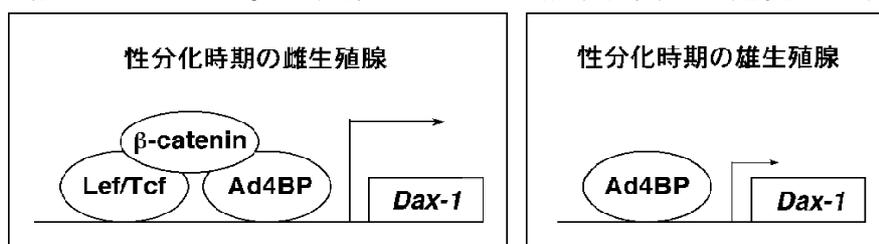


図2 胎仔生殖腺における *Dax-1* 遺伝子の転写活性化のモデル

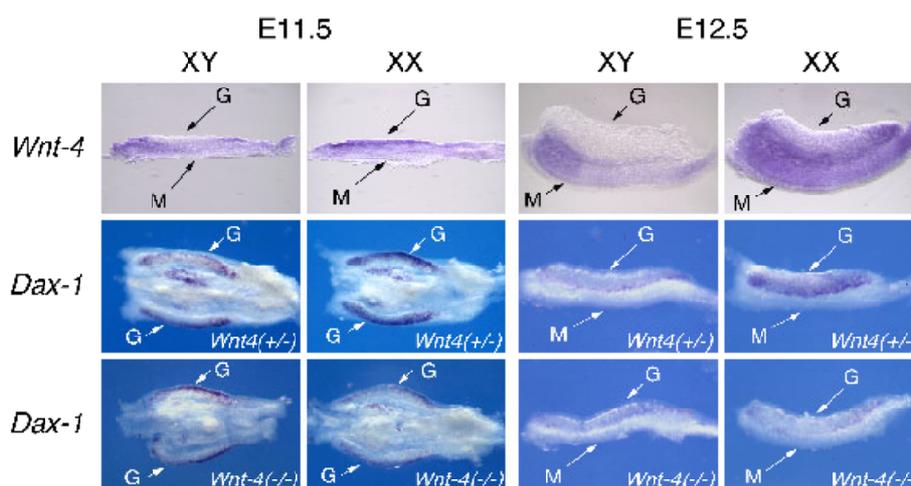


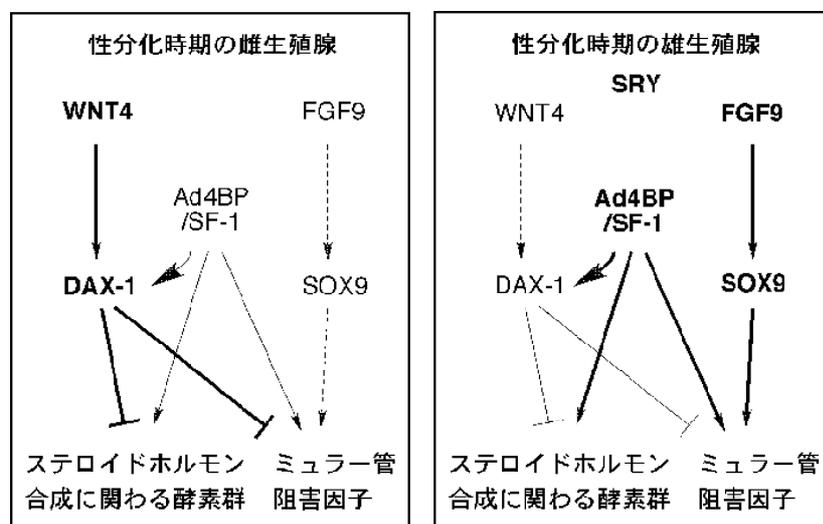
図3 マウス胎仔生殖腺における Wnt-4 および *Dax-1* の発現
G : 生殖腺、M : 中腎

て *Dax-1* の発現は低下していることが期待されるが、結果は期待通り著しく低下するものであった。一方、胎仔精巣における *Dax-1* の発現は、コントロールと比較して差は認められなかった。以上より、胎仔卵巣における *Dax-1* の発現が、Wnt4 シグナルに

より維持されることが、*in vivo* で示された (図 3)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

Wnt4 欠損マウスでは, XX 個体の胎仔生殖腺での *3β-HSD* や *Cyp17* 遺伝子の発現が上昇する。このことは, 野生型の XX 個体の胎仔生殖腺では, Wnt4 が *3β-HSD* や *Cyp17* の発現を抑制することを示している。しかしながら, 既に述べたように, 一般に「Wnt シグナルは標的遺伝子を活性化する」ことから, Wnt4 シグナルが直接的に *3β-HSD* や *Cyp17* を抑制することは考えにくい。Wnt4 シグナルはまず, 抑制性の転写因子 *Dax-1* の転写を活性化し, その結果として *3β-HSD* や *Cyp17* の発現が抑制されると考えられる。我々が得た結果は, 生殖腺の雌化のカスケードが分子レベルで初めて明らかにしたも



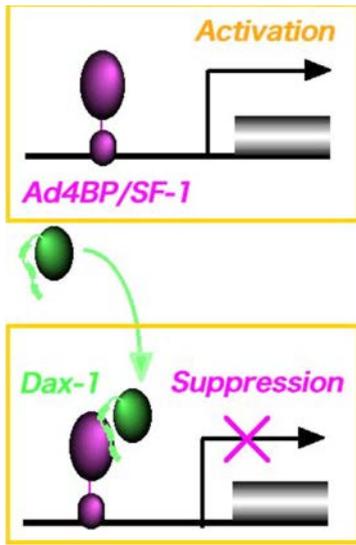
のであると同時に, *Wnt4* 欠損マウスの表現型を合理的に説明するものであった (図 4)。この研究をもとに, これまであまり注目されなかった生殖腺の雌化を制御する遺伝子カスケードが, 今後に明らかになると期待される。

図4 生殖腺の性分化に関与する転写因子および増殖因子

3—1—2 生殖腺における Ad4BP/SF-1 の活性調節機構

(1) 研究内容及び成果

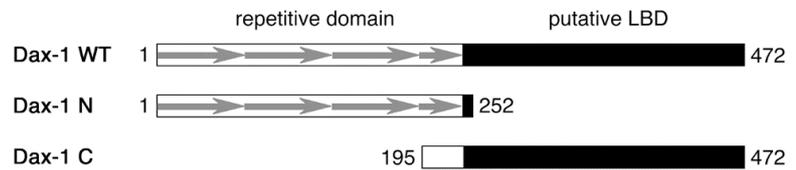
Ad4BP/SF-1 は核内受容体スーパーファミリーに分類される。核内受容体の活性調節は, 脂溶性低分子などのリガンドが結合・解離することによって行われるが, 近年, リン酸化などの翻訳後修飾や, 転写活性化共役因子 (コアクチベーター) などとのタンパク間相互作用が果たす役割に注目が集まっている。Ad4BP/SF-1 については, 対応するリガンドがいまだ特定されていないことから, リガンド以外の作用による活性調節の重要性がより強く示唆されていた。本研究では, Ad4BP/SF-1 の活性調節機構のを明らかにする目的で, 抑制性の転写調節因子 *Dax-1* と Ad4BP/SF-1 の相互作用について解析を行った。



Ad4BP/SF-1とDax-1による
転写調節 (模式図)

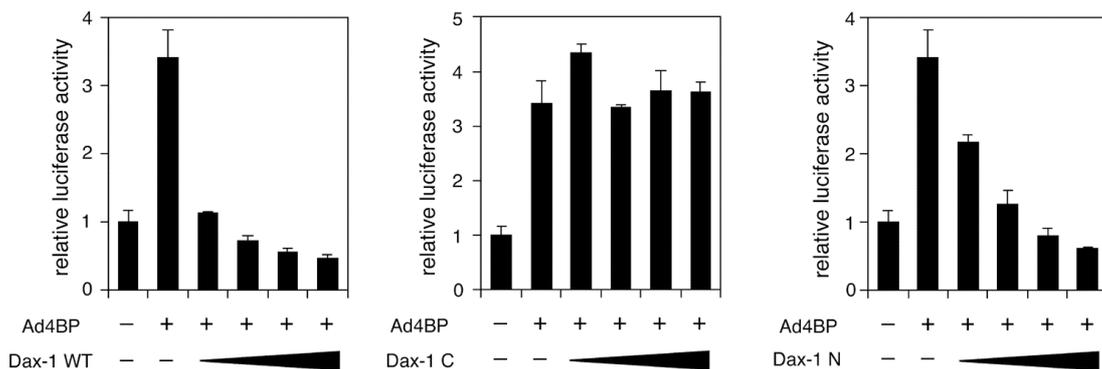
Dax-1 の転写抑制活性に必要な領域の同定

マウス Dax-1 について、全長 (Dax-1 WT), C 末欠損型 (Dax-1 N) と N 末欠損型 (Dax-1 C) の計 3 種類を作成した。培養細胞でこれらを発現させ、Ad4BP/SF-1 の標的であるヒト *CYP11A1* 遺伝子への転写抑制効果を検討した。野生型 Dax-1 (Dax-1 WT) は、Ad4BP/SF-1 によって活性化された *CYP11A1* 遺伝子プロモーターの活性を量依存的に抑制した。Dax-1 N は野生型とほぼ同様に、量依存的抑制をしめしたが、Dax-1 C は転写抑制能を示さなかった。これらの結果から、Dax-1 による転写抑制に必須の領域が N 末端側に存在することが明らかとなった。



Dax-1 N 末端の、Ad4BP/SF-1 との相互作用

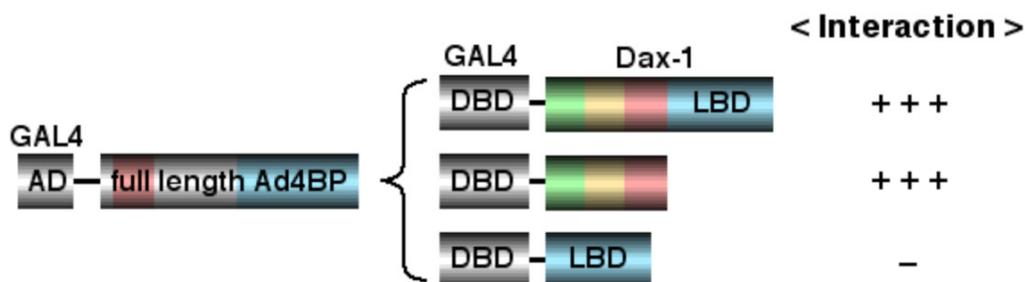
Dax-1 と Ad4BP/SF-1 は直接相互作用することが報告されていた。しかし相互作用にかかわる領域については、議論が分かれていた。抑制実験の結果から、相互作用領域は N 末端側に存在すると考えられた。酵母細胞を利用し相互作用実験系 (yeast two-hybrid assay) より以下のように仮説の検証を行った。



Dax-1 による *CYP11A1* 遺伝子プロモーターの転写抑制

GAL4 DNA 結合ドメインと融合させた Dax-1 WT/ Dax-1 C/ Dax-1 N を作成し、GAL4 転写活性化ドメインと融合させた全長 Ad4BP/SF-1 との相互作用を検討した。これらの遺伝子を酵母細胞に導入し、レポーター遺伝子の活性化を測定することで、相互作用を

定量化した。Dax-1 WT は Ad4BP/SF-1 との強い相互作用を示した。Dax-1 N は野生型とほぼ同様強い相互作用が観察されたが、Dax-1 C は、相互作用を示すシグナルは観察されなかった。これらの結果から、Ad4BP/SF-1 との相互作用領域は N 末端側に存在することが明らかとなった。

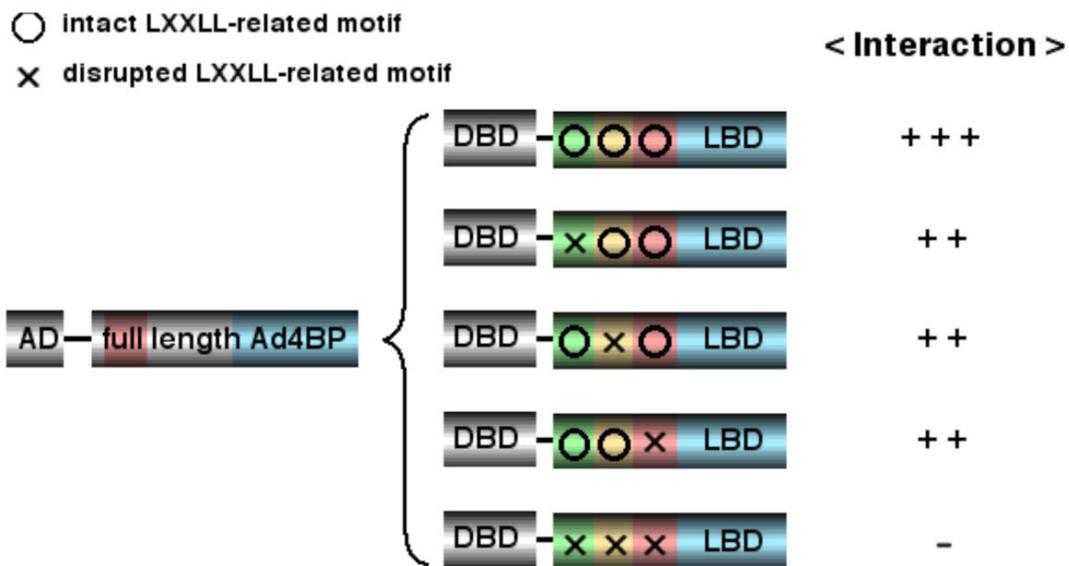


Yeast two-hybrid assay による Dax-1 の Ad4BP/SF-1 結合領域の同定

Dax-1 N 末端に存在する Ad4BP/SF-1 相互作用配列の同定

Dax-1 には 3 回反復する構造が見られ、その全体が Dax-1 N に含まれている。それぞれの反復には、核内受容体との相互作用配列として知られる LXXLL モチーフに類似した配列が 1 ヶ所ずつ見いだされた。これらの配列の Ad4BP/SF-1 との相互作用への関与について調べる目的で、点変異を導入したタンパクの相互作用能を酵母細胞を用いて検討した。

これらの LXXLL 様配列は、「ロイシン- (任意のアミノ酸×2) - ロイシンまたはメチオニン- ロイシン」の並びによって特徴づけられる。野生型の Dax-1 と比較し、1 ヶ所のみ LXXLL 様配列を改変し「ロイシンまたはメチオニン- ロイシン」の部分に「アラニン- アラニン」(これにより一般に核内受容体と弱い相互作用を示した。3 ヶ所すべてを同様に改変した Dax-1 では、相互作用を示すシグナルは検出されなかった。以上の結果から、N 末における Dax-1 と Ad4BP/SF-1 の相互作用は、各反復配列に存在する LXXLL 様配列を介していると考えられた。組換えタンパクおよび試験管内合成タンパクを用いた相互作用実験からも同様の結果が得られ、Dax-1 と Ad4BP/SF-1 が LXXLL 様配列を介して、直接相互作用していると結論づけられた。



LXXLL 様配列の Ad4BP/SF-1 との相互作用における重要性

Dax-1 LXXLL 様配列の相互作用特異性

通常, LXXLL モチーフは, リガンド結合型の核内受容体リガンド結合ドメイン (LBD) に結合する。Ad4BP/SF-1 はリガンド未同定の核内受容体である点で, 既知の例とは異なる。

	-2	-1	+1	+2	+3	
GAL4DBD	KEKHK	IL	HRLL	QDSS	SSP	TIF
GAL4DBD	PRQGS	IL	HRLL	TSSK	QT	Y147H/S148R
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	DAX
GAL4DBD	PRQGS	ILYSA	AATSSK	QT		mutDAX
GAL4DBD	KRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	P140K
GAL4DBD	PEQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	R141E
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	Q142K
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	G143H
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	S144K
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	T151Q
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	DSK	QT	S152D
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	K154S
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	ST	Q155S
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QP	T156P
GAL4DBD	PRQGS	ILYS	SLLT	TSSK	QT	S144K/T151Q

Mammalian two-hybrid assayに使用した LXXLL様配列

この特異性は, Ad4BP/SF-1 と構造的に最も近縁の核内受容体である LRH-1 においても同様に観察され, これらを含む核内受容体サブファミリーに共通の性質であると考えられた。そこで, これらの受容体が特異的に相互作用するために必要なアミノ酸を Dax-1 配列から見いだすために, 以下の実験を行った。

ロゲン受容体に対するそれとは質的に異なる生理的意義を内包する可能性を示唆している。実際、Ad4BP/SF-1 や LRH-1 に対する抑制能は、エストロゲン受容体に対するそれと比較して格段に強いものであることが判明している。Dax-1 は転写活性化共役因子と拮抗的に働いて Ad4BP/SF-1 の転写活性を抑制すると同時に、転写抑制性共役因子を積極的に引き寄せることで、さらに転写を抑制すると考えられる。このような Dax-1 と Ad4BP/SF-1 の特異的相互作用は、核内受容体の転写調節活性が、いわゆるホルモンやビタミンなどの低分子リガンドだけでなく、特異的共役因子によっても同様に制御されうることを示す端的な例であるといえよう。リガンド未同定受容体の多くについては、長年の網羅的な検索にもかかわらずその同定に至ることのできない過去の歴史が存在する。この事実は、少なくとも一部の核内受容体には対応するリガンドが存在しない、との考えを支持する有力な根拠となっている。LXXLL 様配列を含む共役因子の特異的相互作用が、仮に核内受容体の一般的な調節メカニズムの一つであるとするならば、対応するリガンドが存在せずとも、リガンド結合ドメイン様の構造が進化的に保存されうることを示す、ひとつの説明となるかもしれない。

また一方で、このような特異的相互作用を可能にするリガンドの存在も可能性から排除することはできない。これまでの受容体単体に結合するリガンドの探索だけでなく、特異的共役因子と受容体との結合を指標とした、あるいは、特異的共役因子存在下における結合分子の探索について、内分泌攪乱物質の潜在的標的としての意味合いも含めて、検討する必要がある。

3—1—3 Ad4BP/SF-1のSUMO化による協調的な転写活性化の制御

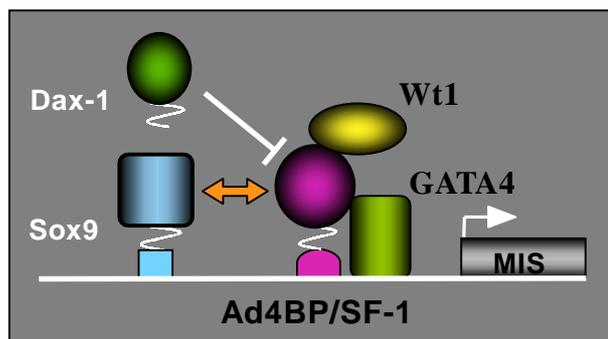
(1) 研究内容及び成果

多くの核内受容体は、リガンド分子との結合を通じ高次構造に変化が生じることで、転写活性の調節が行われる。一方、Ad4BP/SF-1 による転写活性化にはリガンド分子が不要であることから、高次構造の変化を導く何らかの翻訳後修飾の存在が示唆されている。当研究室で行なわれた Yeast two hybrid screening により、Ad4BP/SF-1 の相互作用因子として SUMO 化修飾に不可欠な 2 種類の因子、Ubc9 および PIAS が同定されたことから、Ad4BP/SF-1 の SUMO 化の可能性が示唆された。SUMO 化は、最近新たに同定されたタンパク質の翻訳後修飾である。SUMO (small ubiquitin-related modifier) と呼ばれるタンパク質が標的タンパク質のリジン残基に共有結合する修飾で、ユビキチン化と類似の酵素反応により行われる。SUMO 化修飾を受けるタンパク質として転写因子をはじめ多くの因子が報告されているが、SUMO 化の生理的意義は不明である。一方、ある種の転写因子には協調的な転写活性化を抑制する synergy control motif (SC motif) と呼ばれる領域が存在する。SC motif をもつ多くの転写因子でその領域内のリ

ジン残基が SUMO 化されること、またこのリジン残基が協調的な転写活性化の抑制に重要であることが報告されている。以上の点を考慮しながら、Ad4BP/SF-1 の SUMO 化修飾が転写活性に与える影響を解析した。

Ad4BP/SF-1 の SUMO 化を検討したところ、培養細胞内および *in vitro* において Ad4BP/SF-1 は SUMO 化されることを確認した。Ad4BP/SF-1 には SUMO 化を受ける 2 つのリジン残基が存在し、1 つは SC motif 内に存在した。SC motif 内のリジン残基をアルギニン残基に置換した SUMO 化を受けない KR 変異体では協調的な転写活性が増加したことから、Ad4BP/SF-1 の協調的な転写活性化が SC motif 内の SUMO 化を介して抑制される可能性が示唆された。

一方、雄の生殖腺の分化に必須なミューラー管阻害因子(MIS)の発現は、複数の転写因子によって制御されており、Ad4BP/SF-1 は Sox-9, GATA-4 および WT-1 とそれぞれ協調的転写調節を行う。Sox-9, GATA-4 および WT-1 は培養細胞内で SUMO 化され、これらの転写因子も SC motif 内



MIS プロモーター領域の模式図

のリジン残基が主要な SUMO 化部位であった。Ad4BP/SF-1 と Sox-9 両者の KR 変異

体では協調的な転写活性の増加を認めたことから、異種の転写因子間での協調的な転写活性化にも SC motif 内の SUMO 化を介した抑制メカニズムの存在が示唆された。

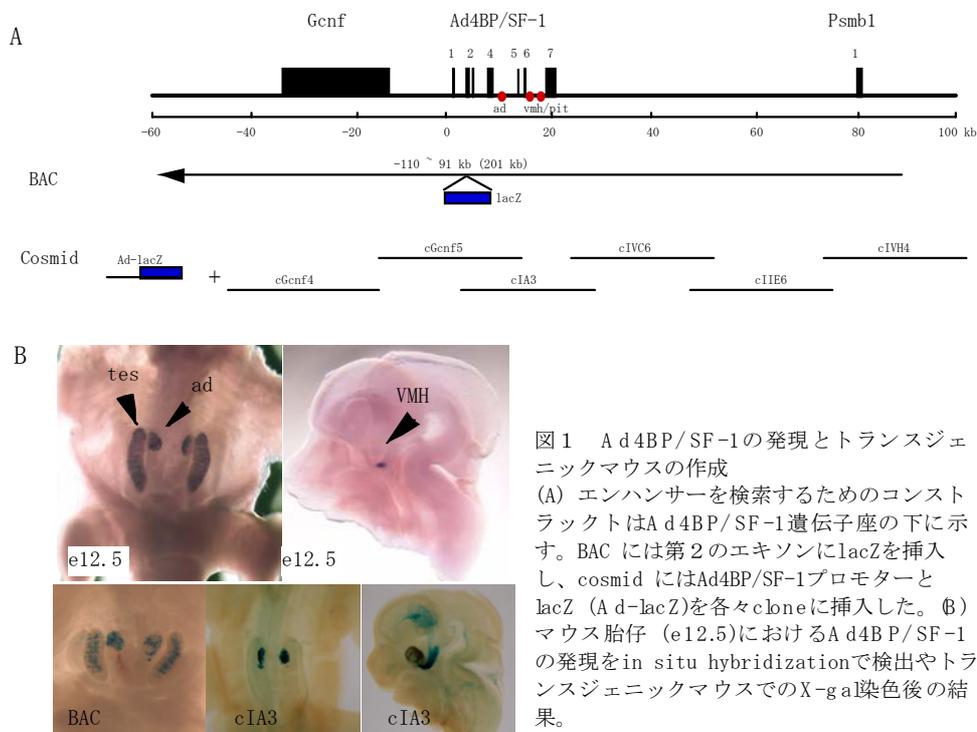
(2) 研究成果の今後期待される効果

SUMO 化は脱 SUMO 化酵素の作用により可逆的に調節可能な翻訳後修飾である。MIS 遺伝子の転写を正に制御することが知られている 4 つの転写因子が SUMO 化されることは、MIS タンパクの時期特異的な発現を協調的に誘導するための非常に迅速で可逆的な制御機構であると予想される。今後は、SUMO 化による転写調節のシグナル伝達系の解明および *in vivo* における証明が課題であると考えられる。SUMO 化に加え、本研究室では Ad4BP/SF-1 がリン酸化による修飾を受けることも明らかにしている。これらの修飾が生殖腺の性分化の過程でも認められることが期待されるが、その生理的意義は今後の重要な課題である。

3—1—4 マウス副腎形成における Ad4BP/SF-1 の転写調節のメカニズム

(1) 研究内容及び成果

副腎は生殖腺と同様にステロイドホルモン産生能を有する組織であり、初期発生を調べると生殖腺と極めて緊密な関係にあることが明らかとなった。我々が注目した Ad4BP/SF-1 遺伝子は発生初期から両組織に発現するのみならず、視床下部や脳下垂体などの生殖活動に重要な組織にも発現する。更に、この遺伝子の破壊マウスでは副腎と生殖腺が形成されないことから、本遺伝子がこれらの組織形成や生殖腺の性分化過程で重要な役割を担っていることが明らかになった。そこで、Ad4BP/SF-1 がいかなるメカニズムのもとに、それらの組織に発現するのかをトランスジェニックマウスの手法を通じて解析した。



本実験では、Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現を規定する組織特異的なエンハンサーと、その領域に結合する転写因子の同定を目的に解析を行っている。生殖腺や副腎の初期発生に関わる転写因子および調節機構の解明を通じ、これらの組織形成を支える遺伝子カスケードの全貌を明らかにすることができると考えている。

本研究では、マウスゲノムライブラリーより Ad4BP/SF-1 遺伝子を含むゲノム DNA 領域を BAC、またはコスミドクローンとして単離した。これらに lacZ をレポーターとして挿入し、トランスジェニックマウスを作成したところ、内在性の Ad4BP/SF-1 の発現を再現するトランスジェニックマウスが得られた (図1)。また、種々の欠失コンス

ラクトを用いて、副腎、視床下部や脳下垂体に特異的発現を誘導するエンハンサーを同定した。同定したエンハンサーのうちの副腎特異的なエンハンサーを最初に詳細に解析した。そのために、トランスジェニックマウスラインを作成し、発生にともなう lacZ の発現の変動を調べた。X-gal 染色による lacZ の活性は胎仔 9.5 日齢にはじめて観察された。この発現は生後まで続いたが、副腎皮質と髄質の間の層にしか見られなかった。さらに、雄では生後 35 日に発現消失することから、胎仔副腎 (X-zone) と呼ばれる層に特異的なエンハンサーであることが明らかになった (図 2)。

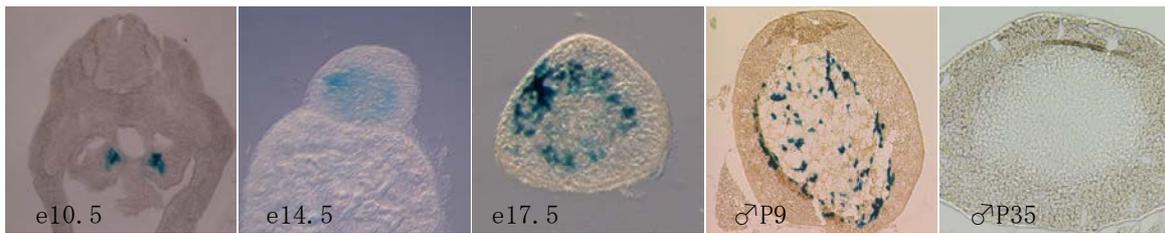


図2 副腎発生におけるトランスジーン発現
lacZ活性は初期発生の副腎から確認できる。この発色は胎仔副腎(将来X-zoneと呼ばれる)が成人副腎に置き換わる過程で消失する(P35)。

次いで、副腎エンハンサーではどのような調節機構が働くのかを DNA 配列をもとに予測した。エンハンサー中に 4 つの Ad4BP/SF-1 の結合部位が確認された。Ad4BP/SF-1 は転写因子であるため、自己調節の可能性が有る。これを検討するために、これらの配列に変異を導入してトランスジェニックマウスを作成した。副腎形成の初期(胎仔 11.5 日齢)の副腎における lacZ の発現には影響がないが、胎仔 17.5 日齢の副腎ではその発現が消失した (図 3)。このことから、副腎エンハンサー機能の発現開始には Ad4BP/SF-1 は関与しないが、発現を維持するためには Ad4BP/SF-1 が必要であり、Ad4BP 遺伝子が auto-regulation を受けることが明らかになった。また、エンハンサーの機能発現の開始機構を調べるために、種々の欠失コンストラクトを用いてアッセイした

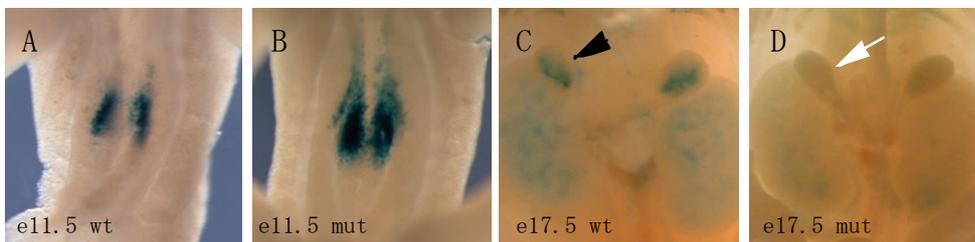


図3 副腎特異的なエンハンサー内のAd4BPサイトはエンハンサーの機能を維持するには必須である
Ad4BPサイトの野生型(A, C)や変異を導入した(B, D)エンハンサーで作成したトランスジェニックマウスでは副腎形成の初期(胎仔11.5日齢)の副腎における lacZ の発現には影響がない。しかし、E17.5の副腎では変異を導入したエンハンサーのトランスジェニックマウスではその発現が消失した(白矢印)。

ところ、最も重要な約 160 bp のコア配列が存在することが判った。また、コア配列中の保存された配列に変異を導入すると、エンハンサー機能が消失することから、

それらの配列がエンハンサーの機能発現の開始に重要な役割を担うことが示された。以上の結果より、このエンハンサーの機能発現は、イニシエーションとメンテナンスの2つのステップから構成されることが明らかになった（図4）。

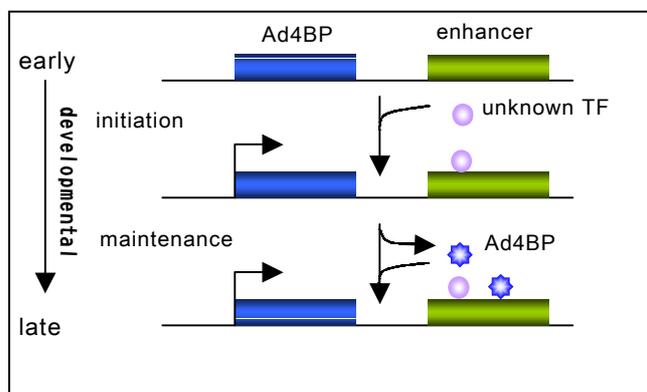


図4 エンハンサー機能発現のモデル

現在未同定の転写因子がエンハンサー配列中に結合する。その結果、エンハンサー機能を開始させ、Ad4BP/SF-1が発現する。その後、Ad4BP/SF-1タンパク質がエンハンサー中の結合サイトに結合することによりエンハンサーの機能が維持される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

従来から指摘されているように、胎仔副腎と成人副腎ではその構造や機能が異なることが知られている。しかしながら、両者を構成する細胞の起源は明らかではなかった。この研究では Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現が胎仔副腎と成人副腎では異なる領域によって制御されること、すなわち異なる制御機構のもとに調節されることを示した。このことは、胎仔副腎と成人副腎が異なる刺激のもとに構築されることを示唆するものであり、その異なる構築機構にはじめて分子基盤を与えるものであった。分子機構の詳細な解析は胎仔副腎と成人副腎の形成過程を理解する上で、今後の重要な課題である。

3—1—5 Ad4BP/SF-1 遺伝子の視床下部腹内側核及び脳下垂体前葉における発現調節機構の解明

(1) 研究内容及び成果

マウス *Ad4BP/SF-1* 遺伝子の発現調節領域のうち、視床下部腹内側核、および脳下垂体前葉の性腺刺激ホルモン分泌細胞に特異的なエンハンサーを探索し、その解析を通じて、それぞれの組織の発生・分化の分子機構を明らかにするために以下の研究を行なった。

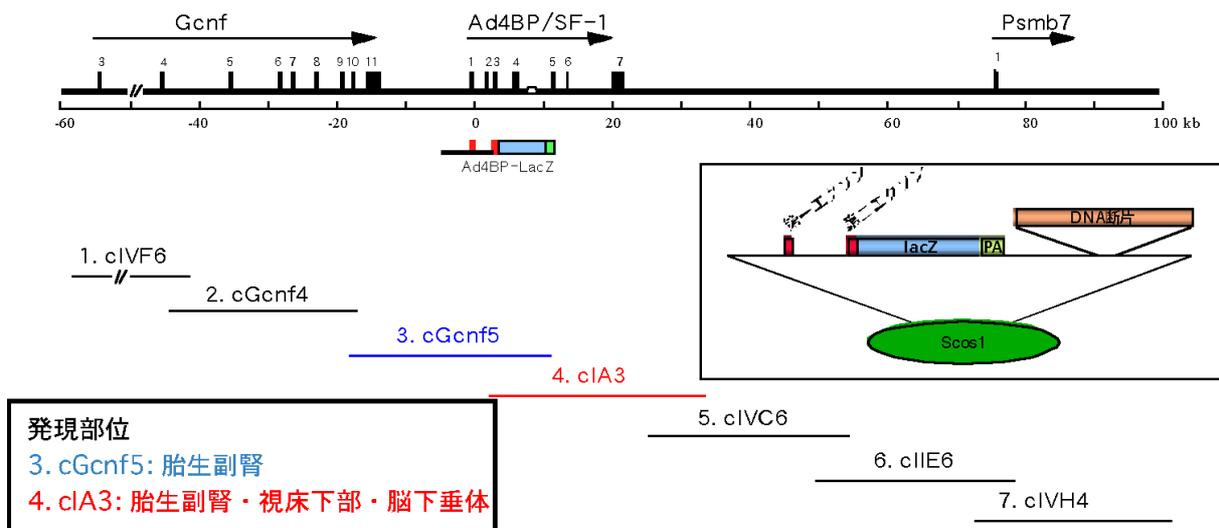


図1

マウス *Ad4BP/SF-1* 遺伝子のプロモーター領域に大腸菌由来の Lac Z 遺伝子と SV40 polyA 配列を連結して基本レポーターとし、その下流に *Ad4BP/SF-1* 遺伝子領域の様々な DNA 断片を挿入した後、マウスの受精卵に注入した。胎児期（胎生 10.5 日～18.5 日）、および成獣期のマウス頭部を用いて Lac Z 染色を行った。*Ad4BP/SF-1* 遺伝子領域を含むコスミドクローンを用いて遺伝子導入マウスを作成したところ、cIA3 クローンを用いた場合に、胎生副腎、視床下部、および脳下垂体前葉に Lac Z の発現が認められた（図 1）。この結果より cIA3 の領域にそれぞれの組織に特異的な発現を誘導するエンハンサーが存在することがわかった。さらに詳細にエンハンサー領域を特定するために、CIA3 クローンの一部を欠失させて解析したところ、第 6 イントロンに視床下部腹内側核、および脳下垂体前葉特異的なエンハンサーの存在が確認された。一方、マウスとヒトの *Ad4BP/SF-1* 遺伝子領域の塩基配列を比較したところ、第 6 イントロンに 2 か所、それぞれ約 500 塩基対にわたって高度に保存された配列が存在し、それらは 5' 側が視床下部腹内側核、3' 側が脳下垂体前葉のエンハンサー領域に一致していた（図 2）。

マウス-ヒト *Ad4BP/SF-1* 遺伝子塩基配列



図2

視床下部腹内側核特異的エンハンサーを基本レポーターに連結して遺伝子導入マウスを作成すると、胎生 10.5 日から成獣期にいたるまで、内在的な *Ad4BP/SF-1* の発現とほぼ

一致する Lac Z の発現が認められた (図 3-1)。免疫組織染色でも、同一の細胞の核に存在する内在的な Ad4BP/SF-1 と、細胞質に存在する beta-galactosidase が明瞭に認められた。また脳下垂体特異的エンハンサーでも同様の結果で、胎生 14.5 日から成獣期にいたるまで Lac Z の発現が認められ、免疫組織染色でも内在的な発現と一致していた (図 3-2)。視床下部腹内側核特異的エンハンサーの内部には、ホメオドメインの結合配列が 2 つ並列に存在する領域が 2 か所認められ、これらの配列の全てに変異を導入した場合、Lac Z の発現が完全に消失した。この結果より、これらが視床下部腹内側核特異的エンハンサーのコア領域であることがわかった。現在、酵母ワンハイブリッドシステムを用いて、これらの領域に結合する因子の探索を行っている。一方、脳下垂体特異的エンハンサーの内部には、Pitx1/2 と GATA2 の結合配列が認められた。

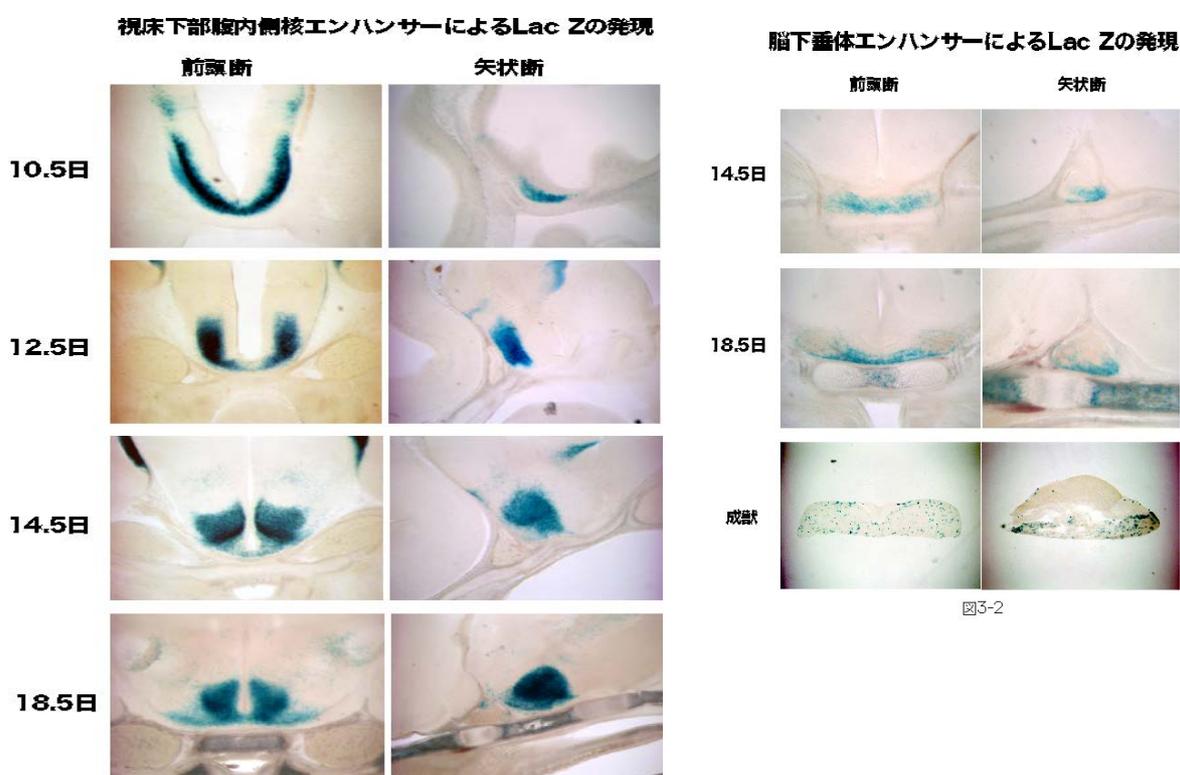


図3-1

図3-2

これらの因子は、すでに脳下垂体前葉の性腺刺激ホルモン分泌細胞の分化に重要であることが報告されている。それぞれの配列に変異を導入したところ、どちらの配列もこのエンハンサーの機能発現に必須であることが証明された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

視床下部腹内側核は性行動の中核として知られており、脳下垂体は性腺刺激ホルモンを通じて個体の生殖機能を司っている。両者における Ad4BP/SF-1 の発現調節機構を解明することで、生殖機能や性行動に必須なそれぞれの組織・器官の発生・分化の

分子機構を理解できると考えられる。特にこの研究で同定された視床下部腹内側核特異的発現を誘導する DNA 断片はいかなる遺伝子でも視床下部腹内側核で発現させることを可能にする。この断片を利用することで、性行動に關与する候補遺伝子のドミナントネガティブ体などの人工的発現が可能になることから、視床下部腹内側核の性行動との關連の詳細な検討を計画している。

3—1—6 マウスポリコーム遺伝子 M33 の発生過程における遺伝学的機能解析

(1) 研究内容及び成果

ショウジョウバエポリコーム遺伝子のオ-ソログの一つであるマウスポリコーム M33 は胎生期性腺形成および性分化に必須である。性腺形成に不可欠な遺伝子 *Ad4BP/SF1*, *Emx2*, *Wt1* 等と M33 間の遺伝学的相互作用を明らかにするために、これらの遺伝子の KO マウスと M33KO マウスとの交配を行ない性腺を解析した。M33KO マウスでは、性腺の矮小化以外にも副腎および脾臓の形成不全が認められる。これらの表現型は、*Ad4BP/SF1* KO マウスの表現型に類似していることから、*Ad4BP/SF1* 遺伝子座が M33 の標的の一つであることを示唆するものであった。この作業仮説を確認する目的で、*Ad4BP/SF1* と M33 間の遺伝学的相互作用解析を行なった。

複合ヘテロ型卵巣および精巣において、より重篤な矮小化が認められた。さらに、免疫組織学的解析により、M33KO 性腺体細胞において Ad4BP/SF1 の発現強度の低下を認めた。これらの結果は、性腺形成過程において、M33 と Ad4BP/SF1 が協調して機能し、M33 が Ad4BP/SF1 発現量を遺伝子量依存的に正に制御していることを示唆する。

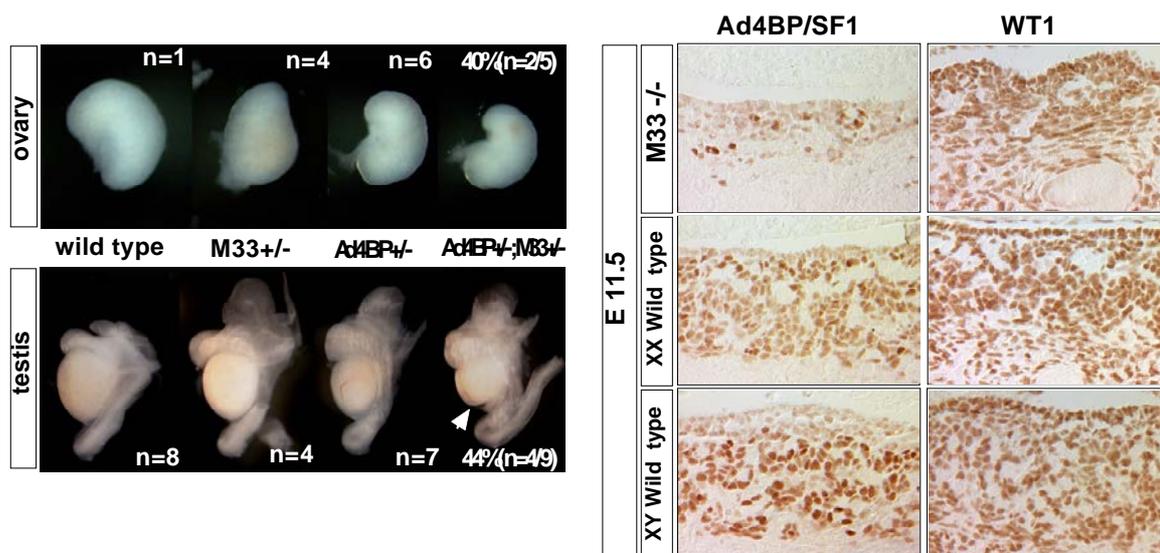


図 1 (左) : 胎生 18 日における C57BL6 の遺伝背景での複合ヘテロ型マウスの卵巣 (上段) および精巣 (下段)

図 2 (右) : 胎生 18 日における M33KO マウス性腺における、免疫組織化学的 Ad4BP/SF1 および WT1 の発現解析。

また、複合ヘテロ型胎児において、Ad4BP/SF1 あるいは M33 単独ヘテロ型より矮小化した副腎が認められた。さらに、ウェスタンブローディングおよび定量的 RT-PCR 解析により、M33KO 胎児副腎において Ad4BP/SF1 の発現量の低下を確認した。胎生期副腎形成においても M33 と Ad4BP/SF1 が協調し、M33 が Ad4BP/SF1 発現量を遺伝子量依存的に正に制御していることを示す。Ad4BP/SF1 は性腺体細胞および副腎皮質細胞の生存に必須であることから複合ヘテロ型胎児副腎では、Ad4BP/SF1 の発現量低下により、副腎皮質細胞数が減少し矮小化した性腺が形成されていると予想される。

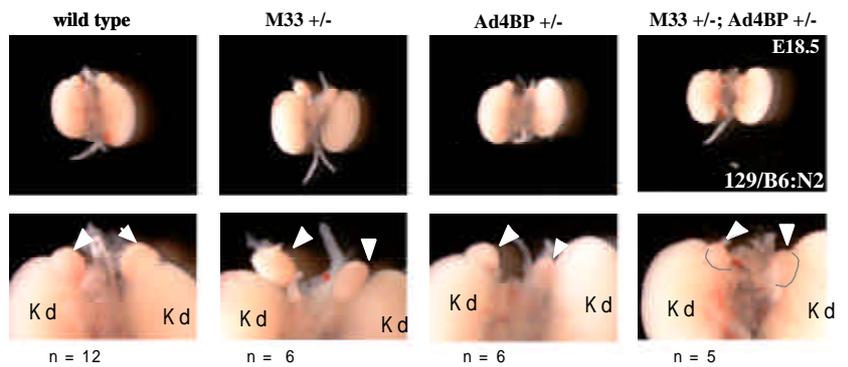


図3：胎生 18 日における 129/C57BL6 遺伝背景での複合ヘテロ型マウスの副腎

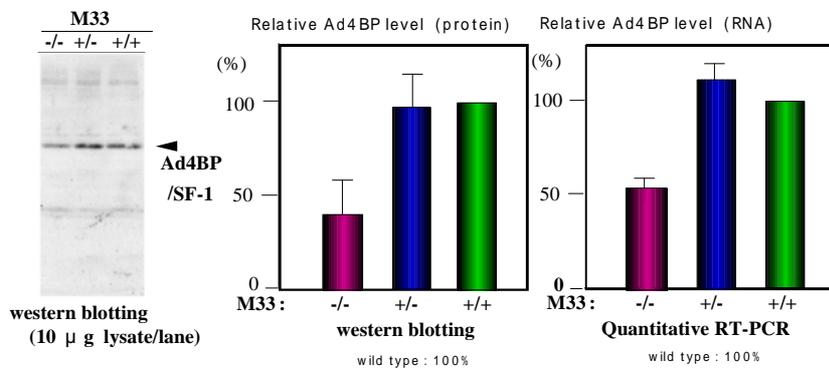


図4：M33KO マウスの胎児副腎を用いた Ad4BP/SF1 発現量の解析



図5：胎生 18 日における Ad4BP/SF1 および M33KO マウスの脾臓

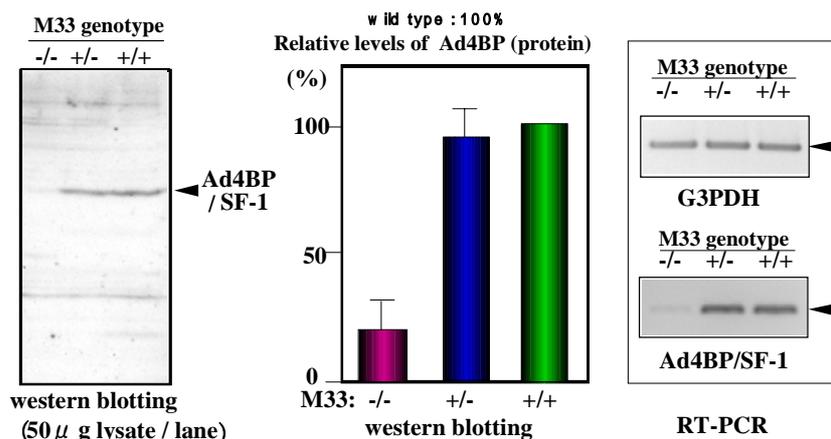


図6：M33KO マウス胎仔脾臓におけるAd4BP/SF-1の発現量

M33 KO 胎児脾臓において、赤血球，リンパ球の増殖が認められず，血球幹細胞のホーミングが著しく低下した。電子顕微鏡を用いた構造解析により，胎児脾臓血管内皮細胞の構造異常が観察された。これらの表現型は，Ad4BP/SF1KO 脾臓に見られる異常に酷似しているものであった。さらに M33KO 胎児脾臓を用いたウェスタンブロッティングおよび RT-PCR 解析により *Ad4BP/SF1* 遺伝子の発現低下が認められ，脾臓形成においても M33 が Ad4BP/SF1 の発現を正に制御していることが明らかになった。

(2) 研究成果の今後の期待される効果

以上の結果は，性腺，副腎，脾臓いずれの組織においても，M33 は Ad4BP/SF1 遺伝子の発現の正の制御を通じて，組織形成に関わっていることが明らかになった。標的遺伝子座に集積するとされる M33 による制御が，Ad4BP/SF1 遺伝子座である可能性を検討する目的で，Chromatin Immuno-Precipitation 解析のための M33 抗体を作成している。このような M33 を対象とする研究からクロマチンレベルでの Ad4BP/SF-1 遺伝子の転写制御機構が明らかになるものと期待される。

3—1—7 マウス雄生殖腺における Arx の機能解析とヒト遺伝性疾患 XLAG における ARX 遺伝子の変異解析

(1) 研究内容及び成果

生殖腺形成および性分化過程における，遺伝子破壊・改変マウスの表現系およびヒト性分化異常症の解析より，様々な転写因子が重要な役目を果たしていることが知られている。本研究室において生殖腺や副腎皮質の形成に不可欠な因子として核内受容体型転写因子 Ad4BP/SF-1 を同定しその機能の解析を行なってきた。その過程で，Arx が Ad4BP/SF-1 と相互作用する因子として単離された。Arx は Paired タイプの

Homeobox を有する転写因子であり，胎生期の脳と生殖腺で発現していた。本研究は Arx の生殖腺での発現パターンを詳細に解析すると共に，Arx 遺伝子破壊マウスの解析を通じ，その機能解析を試みた。

Arx は性分化開始時期である 11.5 日胚から成体までの生殖腺で雌雄共に発現していた。その発現細胞は，未分化生殖腺では腹腔上皮細胞と間質細胞，その後，雄生殖腺では，繊維芽細胞様の間質細胞と Peritubular 細胞であった。

Leydig 細胞，生殖細胞および Sertoli 細胞では発現していなかった（図 1）。雌生殖腺においては theca 細胞と黄体細胞の一部で発現が認められ，卵子と顆粒層細胞では発現していなかった。生殖腺における Arx の機能を明らかにするために Arx 遺伝子破壊マウスの解析を行った。Arx 遺伝子破壊マウスの出生直後の精巣，および雄性ホルモン依存的に発達する精嚢は野生型に比べて扁平であった。また精細管は太く，間質の細胞密度が低下していた（図 2）。組織学的解析を行ったところ，Arx 遺伝子破壊マウスの出生直後の精巣の間質に繊維芽様の細胞が多く観察された。免疫組織学的解析では，遺伝子破壊マウスの 11.5 日胚の未分化生殖腺では形態および各種遺伝子マーカーの発現には顕著な変化は認められなかったが，12.5 日胚では間質の Ad4BP/SF-1 陽性細胞の減少ある

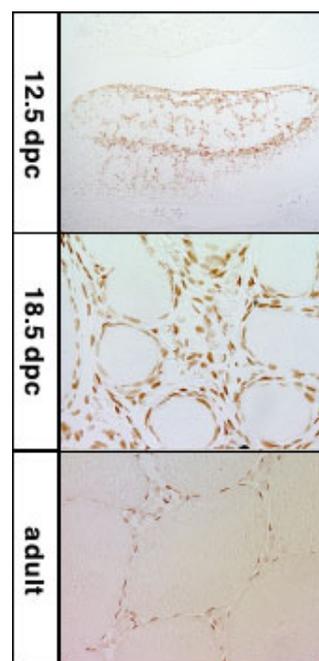


図 1 雄生殖腺における Arx の発現パターン

いは消失が認められ，14.5 日胚でも同様に間質の Ad4BP/SF-1 陽性細胞と 3 β -HSD 陽性細胞の著しい減少あるいは消失が観察された（図 3）。一方，生殖細胞や Sertoli 細胞に異常は認められなかった。その後，16.5 日胚および出生直後の生殖腺の Ad4BP/SF-1 陽性細胞および 3 β -HSD 陽性細胞の局在と細胞数は野生型と差異はなかった。間質の Ad4BP/SF-1 陽性細胞および 3 β -HSD 陽性細胞は Leydig 細胞であることから，Arx 遺伝子破壊マウスでは Leydig 細胞の分化が遅延していた事が明らかとなった。その結果として，雄性ホルモンの産出量が減少し，副生殖器官が未発達となったと考えられた。

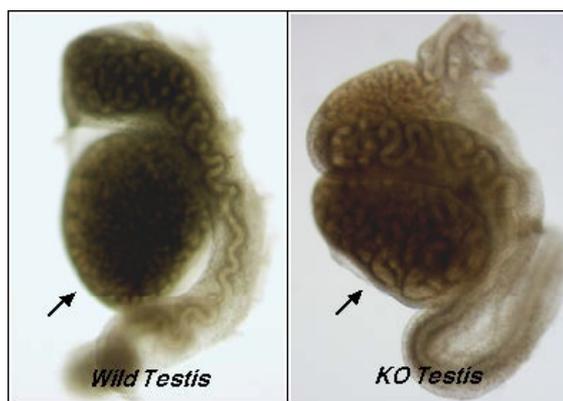


図 2 出生直後の Arx 遺伝子破壊マウスにおける精巣

Arx 遺伝子は魚類からヒトまで非常に高く保存されていることから，脊椎動物を通じて生殖腺形成および性分化に関与することが予想された。そこで我々は ARX 遺伝子が位置する X 染色体連鎖であり，Arx 遺伝子破壊マウスと表現型が類似するヒト遺伝子性

疾患の探索を行った。その結果、外部雄性生殖器官の矮小化および滑脳症を示し、X 染色体連鎖であるヒト遺伝性疾患 XLAG を見出した。XLAG 患者 15 人における ARX 遺伝子の構造解析を行ったところ、13 人の患者に変異を検出した(図 4)。さらに患者の変異 ARX タンパク質の Paired-Homeobox の DNA 結合活性を調べたところ、ほとんどの変異タンパク質で DNA 結合能の消失が確認された。以上のことから、XLAG は ARX 遺伝子の欠損・変異により発症することが明らかになった。

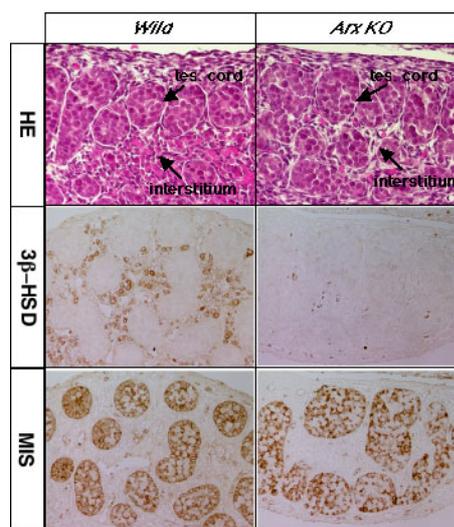


図3 Arx 遺伝子破壊マウスの 14.5 日胚における雄生殖腺の異常

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、Arx は Leydig 細胞の分化に必須であることが明らかとなった。しかし、興味深いことに Arx は Leydig 細胞では発現していない。このことから Leydig 細胞の分化には Arx を発現する周囲の間質細胞の関与が示唆された。この Arx を発現する間質細胞は胎仔精巣に顕著で、繊維芽細胞様の特殊な細胞として古くから

その存在が認められていたにもかかわらず、その生理学的・発生生物学的意義は未だ不明である。本研究から Arx の発現が認められたことで、唯一 Arx のみがこの細胞の機能を探る手がかりとなることが期待される。また、男性ホルモンを産生するという重要な機能を有しているにもかかわらず、未だ Leydig 細胞の分化メカニズムは不明である。Leydig 細胞の分化に関与する因子として中腎および生殖腺の中腎との境界領域で発現している Wnt4 や Sertoli 細胞で分泌されている Dhh が知られている。今後、Arx とこれらの因子との関係を調べると共に Arx の機能、ひいては間質細胞の機能の解明を通じ、Leydig 細胞の分化メカニズムが明らかになるものが期待される。

また、本研究では ARX 遺伝子の変異がヒト XLAG の原因遺伝子であることが明らかになった。このことは XLAG の臨床診断に有効であるばかりでなく、今後、ARX の機能

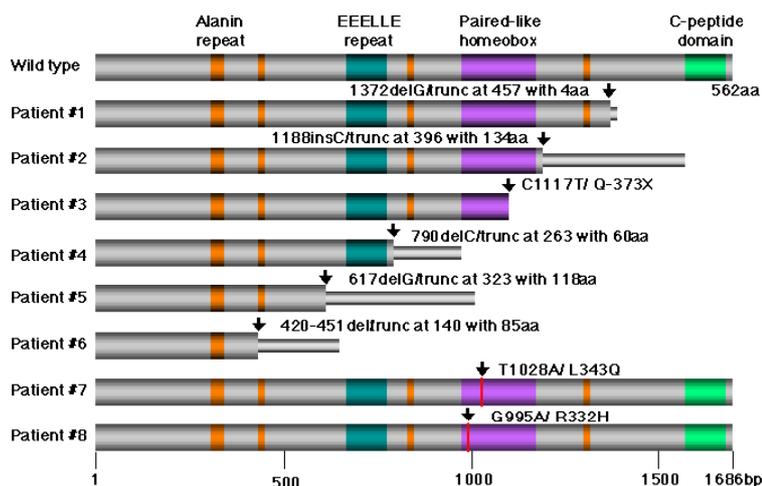


図4 XLAG 患者における ARX 遺伝子

解析を行なうことで、生殖腺に異常を示す疾患の原因解明に貢献出来ると思われる。

3—1—8 AhRの卵巣における機能と内分泌攪乱作用の分子メカニズム

(1) 研究内容及び成果

人類が産み出した最強の生体毒であるTCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)は、人体に様々な毒作用を及ぼす。その生体毒性は急性毒性による致死と慢性毒性にわけて考えることができる。慢性毒性には、肝障害、発癌プロモーション作用、胸腺の縮退に伴う免疫力の低下、繁殖障害などがある。また、胎児においては口蓋裂、水腎症などの発症を誘導する催奇形性などの毒性を示す。これらダイオキシンによる多岐にわたる毒性は、マウスの遺伝学から

AhR (Aryl hydrocarbon receptor)に仲介されて発現されると考えられている。AhRはbHLH-PASスーパーファミリーに属する転写因子で(図1A)、通常HSP90, P23, XAP2などのタンパク質と複合体を形成し細胞質に存在しているが、TCDD等のリガンドと結合すると核内へ移行し、Arnt(AhR nuclear translocator)とヘテロダイマーを形成する。AhR/ArntヘテロダイマーはXRE(Xenobiotic Responsive Element)と呼ばれるエンハンサー配列に結合し下流の遺伝子の転写を活性化する(図1B)。これまでに、Cyp1a1,

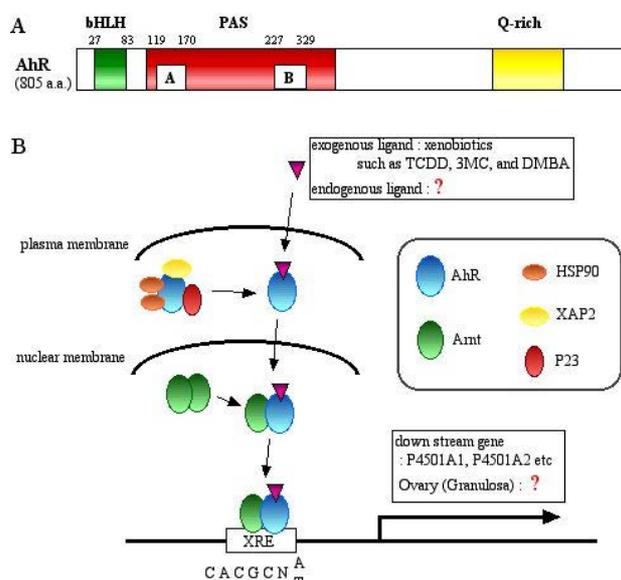


図1 A. AhRのドメイン構造
B. AhRによる標的遺伝子の転写活性化機構

UDP-glucuronosyl transferase, Glutathione-S transferase などの一連の薬物代謝酵素が AhR の下流遺伝子として同定されている。しかし、AhR のリガンドとして機能する外来性の化学物質 (TCDD 等) が登場したのは産業革命以降のことである。外来性の異物に応答するために AhR が人類の誕生以来ヒトゲノム上に保存されていたとは考えにくく、なにか他のメカニズムによって活性化し、個体の恒常性の維持に必要な遺伝子の転写制御を行っているの自然である。このような観点から AhR ノックアウトマウスが作製されたが、その遺伝的背景を C57BL6/J に統一すると、♀-/-の生殖能が著しく減少することが分かり、AhR が雌の生殖能に必要な因子の転写を調節していることが示唆された。卵巣における AhR の新規標的遺伝子を同定することにより、AhR の生殖腺における機能、そして AhR を介した内分泌攪乱作用の分子メカ

リズムを明らかにすることが本研究の目的である。

AhR(-/-)雌マウスを3か月間雄と交配させ、その生殖能を AhR(+/+)雌と比較した。その結果、AhR(-/-)雌において1回の出産あたりの産児数、および総産児数ともに AhR(+/+)雌と比較して約40%、25%に低下していたことから、AhR(-/-)雌の生殖能の低下が明らかとなった(図2A)。また、通常マウスでは4~5日の周期で観察される性周期に関して、AhR(-/-)雌ではその周期が長くなるまたは全く周期性が見られなくなるといった異常がみられた(図2B)。次に AhR(-/-)雌において排卵が正常に行



図2 A. 1回の出産あたりの産児数および総産児数のAhR(+/+)とAhR(-/-)雌間での比較
 B. AhR(-/-)雌にみられる性周期の乱れ。"- "は発情後期および発情間期を、"+ "は発情前期および発情期を示す。
 C. AhR(+/+)とAhR(-/-)雌の卵巣切片像の比較。"CL"は黄体を示す。

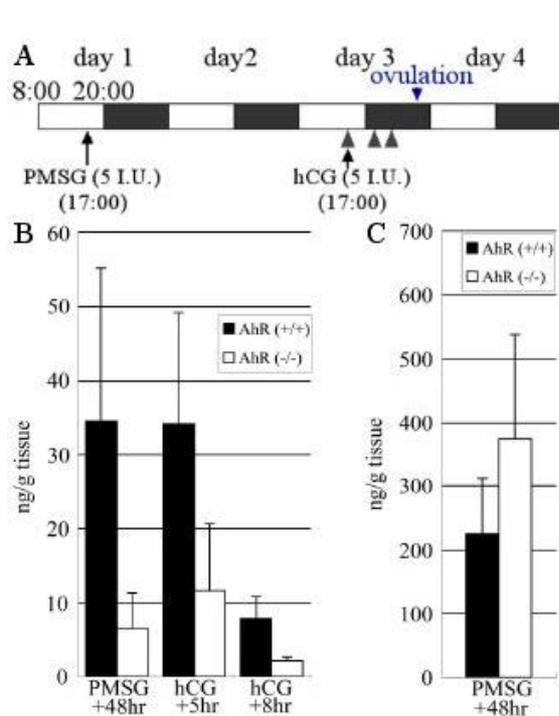


図3 A. 過排卵処理のタイムスケジュール。矢戻は卵巣を採取した時刻を示す。
 B. 卵巣内エストラジオール濃度の測定結果。
 C. 卵巣内テストステロン濃度の測定結果。

われているのかどうかを調べるために、マウスに過排卵処理を施し、排卵数の測定を行った。過排卵処理は21日齢の幼弱マウスおよび12週齢のアダルトマウスに対して行ったが、どちらのステージにおいても AhR(-/-)の排卵数は AhR(+/+)と比較して約1/6に減少していた。この結果は、AhR(-/-)雌の卵巣が、視床下部から発せられる排卵を誘発する刺激に対して非感受性になっているということを示唆する。そこで、卵巣の組織学的解析を行った結果、正常な卵巣には存在する黄体が、AhR(-/-)の卵巣では観察されないことが明らかとなった(図2C)。黄体は排卵後の卵胞の granulosa 細胞が分化した黄体細胞によって構成されるということと考えあわせると、黄体が観察されないという事実は、AhR(-/-)雌の排卵数の減少と

矛盾しない結果である。

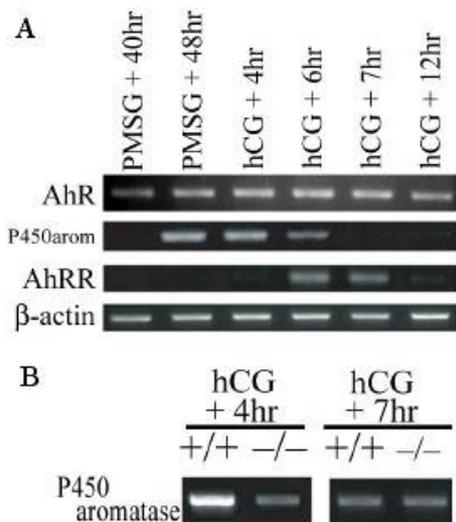


図4 A. 排卵前の時期の卵巣におけるAhR, AhRR およびP450aromataseの発現。 B. AhR(+/+)とAhR(-/-)間での、hCG 投与後4時間または7時間後のP450 aromataseの発現の比較。

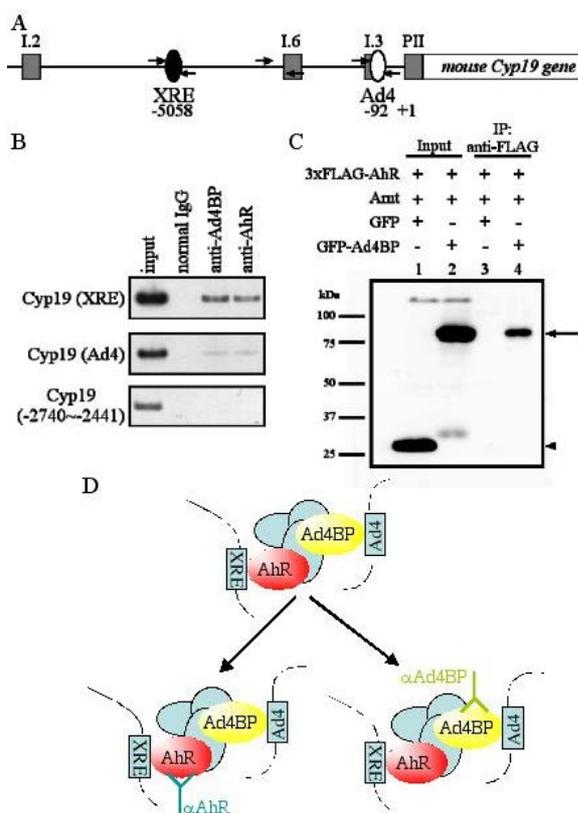


図5 A. Cyp19 (aromatase) 遺伝子の5'上流領域 B. AhRおよびAd4BP抗体を用いたChIP assay C. AhR-Ad4BP間の相互作用の検出 D. Cyp19遺伝子上流におけるAhRとAd4BPを含む複合体の模式図

AhR(-/-) 雌の排卵数の減少の原因を明らかにするため、過排卵処理を施し人工的な性周期を作ったマウスから、排卵前のいくつかの時刻に卵巣を採取し (図3A), 卵巣内のエストラジオール濃度を測定した。エストラジオールは雌の生殖能に必要な不可欠である性ホルモンであり、排卵前にその血中濃度が一過的に上昇することが知られている。図3Bに示す通り、AhR(-/-) 雌の卵巣内エストラジオール濃度はAhR(+/+)と比較して、明らかに減少していた。一方、エストラジオールの前駆体であるテストステロンの卵巣内濃度はAhR(-/-) でやや高い値を示した。これらの結果から、我々は卵巣のエストラジオール濃度の減少が、AhR(-/-) 雌における生殖能

の低下の原因であると考え、AhR(-/-) 雌にエストラジオールを投与した上で過排卵処理を施し、排卵数の測定を行った。その結果、排卵数はAhR(+/+) 雌の1/2程度まで回復した。以上の結果より、産児数の低下、性周期の乱れ、排卵数の減少といったAhR(-/-) 雌に見られる異常の主な原因は、卵巣内エストラジオール濃度の減少であると結論し、以下の実験を行った。

AhRが転写因子であることを考慮すると、AhR(-/-) 雌の卵巣では遺伝子発現の異常が観察されるはずであり、この以上を通じて、卵巣内エストラジオール濃度の低下が説明できると期待された。そこで、AhRが性周期のどの時期で発現しているのかを確かめるために、人工的にホルモン処理によって性周期を作ったマウスから、排卵前の複数の時間で卵巣のRNAを抽出し、RT-PCRを行った (図4A)。その結果、AhR mRNAは排卵の前後ではほぼ一定量発現していた。一方、AhR

の標的遺伝子である AhRR (AhR repressor) mRNA は hCG 投与後 6 – 7 時間の排卵前約 6 時間の時期に一過的に発現することが分かった。このことから AhR は排卵前約 6 時間の時期に活性化されていることが分かった。

次に AhR(-/-)マウスと AhR(+/-)の間で発現に差がある遺伝子の探索を行うために、AhR が活性化していると思われる hCG 投与後 4 時間と 7 時間で、AhR(-/-)および(+/-)マウスそれぞれの卵巣から RNA を調製し、コレステロールからステロイドホルモンへの代謝に関わる遺伝子の発現を RT-PCR で確認した。その結果、P450scc, 3 β HSD, 17 α Hydroxylase の発現は AhR(-/-)と AhR(+/-)のあいだで hCG 投与後 4 時間においても hCG 投与後 7 時間においても特に変化は見られなかった。しかし、テストステロンからエストラジオールを合成する酵素である P450aromatase の mRNA が AhR(+/-)では hCG 投与後 4 時間で強い発現を示すのに対して AhR(-/-)ではほとんど発現していないことが分かった。また、AhR 同様 granulosa cell で発現し、そのノックアウトマウスの表現型が不妊であることが知られている p27^{kip1} および C/EBP β の mRNA の発現は WT と AhR(-/-)マウスで hCG 投与後 4 時間, 7 時間において差がみられなかった。以上の結果より、AhR は排卵前の卵巣におけるエストラジオール合成に必要な酵素, P450aromatase 遺伝子の転写を活性化するのに必要不可欠である事が明らかとなった。

次いで、AhR による P450aromatase 遺伝子の転写活性化の分子メカニズムを解析した。図 5 A に示すように、P450aromatase は Cyp19 遺伝子にコードされる。Cyp19 遺伝子は複数の組織特異的的第一エクソンを有するが、卵巣においてはエクソン PII が転写され、その転写開始点から約 5 kb 上流に XRE が存在する。排卵前の卵巣 (hCG 投与後

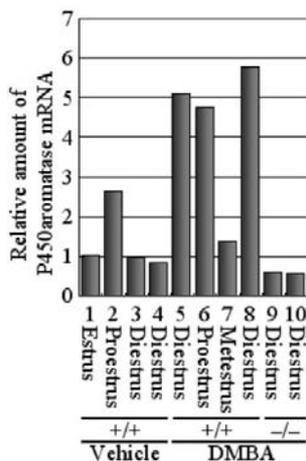


図6 DMBA投与5時間後の卵巣における P450aromatase mRNAの発現量

2時間) からクロマチンを精製し、AhR 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、免疫沈降されたクロマチン断片をテンプレートに PCR を行うと、Cyp19 遺伝子上流の XRE を含む領域が増幅された (図 5 B)。この結果は、排卵前の卵巣において P450aromatase 遺伝子が転写活性化している時に、AhR がそのエンハンサー領域に結合していることを示している。また、Cyp19 遺伝子上流には Ad4BP の結合配列である Ad4 も存在している。興味深いことに、AhR 抗体は Ad4 を含む領域も免疫沈降することが分かった。また Ad4BP 抗体も、Ad4 だけでなく XRE も免疫沈降した (図

5 B)。これらの結果は、Cyp19 遺伝子のプロモーター上において AhR と Ad4BP を含む転写因子の複合体が形成されていることを示唆している (図 5 D)。この AhR と Ad4BP の間の物理的相互作用は、培養細胞に FLAG-AhR と GFP-Ad4BP をトランスフェクションし、

全細胞抽出液を FLAG 抗体で免疫沈降し、その沈降物を GFP 抗体でイムノブロットすることにより、*in vitro* の系においても確認された (図 5 C)。さらに、AhR と Ad4BP の物理的相互作用が Cyp19 遺伝子の転写活性に及ぼす影響を確かめるために、培養細胞を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、AhR と Ad4BP は相乗的に作用して Cyp19 遺伝子の転写活性を誘導することが明らかとなった。この結果から、Cyp19 遺伝子のハイレベルな転写活性の誘導には AhR と Ad4BP、2 つの転写因子の相乗的な効果が必要不可欠であるということが分かった。

これまでの実験から、AhR が P450aromatase の発現に必要不可欠であることが分かった。それでは外来性のリガンドによる AhR の活性化によって、P450aromatase の卵巣における発現は誘導されるだろうか？図 6 Lane1-4 に示すように通常 P450aromatase の発現は発情前期 (Proestrus) に一過的に観察される。しかし、AhR の外来性のリガンドである DMBA (9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene) を投与すると、P450aromatase の発現が本来発現していない発情後期 (Diestrus) においてもハイレベルに誘導されてしまうことが分かった (図 6 Lane5-8)。発情後期における DMBA による P450aromatase の発現の誘導は AhR (-/-) では観察されないことから (図 6 Lane9, 10)、この DMBA は AhR を介して P450aromatase の発現を誘導していることが分かる。以上の結果より、AhR の外来性のリガンドは、性周期非依存的に本来発現すべき時期以外に P450aromatase の転写を活性化してしまうことが分かった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究において排卵前卵胞における P450aromatase 遺伝子の転写活性化を介した正常な排卵過程に AhR が必要不可欠であることを示した (図 7)。今日までにエストロジェンが生殖能に必要不可欠であるという報告が多数ある。Fisher らは P450aromatase ノックアウトマウス (ArK0) を作成し、ArK0 マウスの卵巣には granulosa 細胞に囲まれた多数の大きな卵胞が存在するが、黄体は存在しないということを示し、Dupont らは Estrogen receptor $\alpha\beta$ のダブルノックアウトマウスを作成し、これらのマウスを過排卵処理しても卵胞は排卵可能な大きさまで成熟しないことを示した。これらの結果から、AhR ノックアウトマウスの生殖能の異常の主な原因は卵巣内のエストロジェン濃度の減少であると結論した。

AhR ノックアウトマウスの卵巣内エストロジェン濃度減少の原因は P450aromatase の発現量の減少であると考えられる。そこで我々は AhR による P450aromatase 遺伝子の転写活性化の分子メカニズムの解析を行った。その結果、AhR は Ad4BP/SF-1 と物理的に相互作用することにより、相乗的に P450aromatase の転写を活性化していることが明らかとなった。Ad4BP/SF-1 は Cyp11b1 遺伝子のプロモーターに結合する因子として

同定された因子であるが、現在ではステロイド合成系に關与する多くの酵素の遺伝子の転写を活性化することが知られている。AhR と Ad4BP/SF-1 の物理的相互作用は他のステロイド合成系酵素の転写活性化に AhR が関わっていることを示唆する。本研究においては AhR のリガンドによって P450aromatase 遺伝子の転写が活性化されることを示したが、他の遺伝子の発現が変化している可能性は未だ残っており、今後の興味深い課題の一つであると思われる。

AhR は排卵前の卵巣においてどのようなシグナルを受けて活性化しているのだろうか？ひとつの可能性は内在性のリガンドがその時期の卵巣に分泌されることによって AhR が活性化しているという考えである。他の可能性としては LH(Luteinizing hormone)のシグナルが AhR の活性化することも考えられる。最近、AhR が PKC(Protein Kinase C)のシグナルによって活性化されるという報告がなされた。LH receptor は Gタンパク質供役7回膜貫通型の受容体であるが、リガンドの刺激に応答して PKC を活性化することが知られている。どのようなシグナルが AhR を活性化するのか、また内在性のリガンドは存在するのかという問題は今後の最も重要な問題の一つであると考えられる。

現在、Estrogen Receptor に対して結合能を示す多数の物質が内分泌攪乱物質として同定されている。これらの化学物質は Estrogen Receptor を活性化することによってエストロゲン様の機能を発揮するが、AhR の ligand は P450aromatase の転写を活性化することで、体内におけるエストロジェンの合成量を増加させ、その結果としてエストロゲン様の作用を發揮することが本研究により示唆された。最近、Ohtake らによって AhR シグナルとエストロゲンシグナルのクロストークが示された。

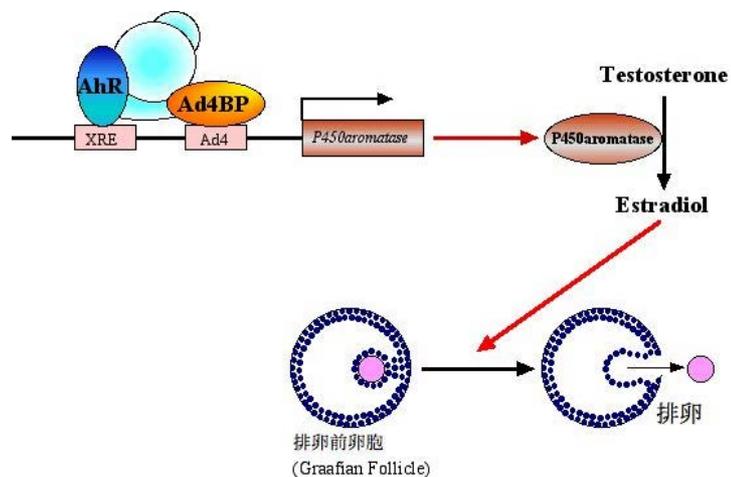


図7 正常な排卵過程におけるAhRの役割

た。彼等の示したモデルは、リガンドと結合していない Estrogen Receptor に対してリガンドと結合した AhR がコアクチベーター的に作用し、Estrogen Responsive Element によってドライブされる遺伝子の転写を活性化するというものである。我々の研究結果と考えあわせると、AhR のリガンドは少なくとも2つの独立した経路、すなわちエストロゲン合成の増加と Estrogen Receptor の活性化、を介して生体にエストロゲン様の作用を及ぼしていると考えられる。エストロゲン等のホルモンが正常な機能

を發揮するには、正しいタイミングで必要な量だけ存在することが重要である。その微妙なバランスを AhR の ligand が破壊してしまうことが本研究より明らかにされた。最後に我々は AhR の ligand の危険性、特に女性の性周期を P450aromatase の活性化を介して乱してしまう危険性を示唆したい。

3—1—9 内分泌かく乱物質の生体評価系 戸田勝己（高知大学）

(1) 研究内容及び成果

エストロゲン及びエストロゲン活性を有する化学物質の生理作用を解析するためにエストロゲン合成が欠損したマウス(アロマトラーゼ遺伝子破壊マウス; ArKO マウス) を作製した。一方、エストロゲン応答配列により EGFP 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (EGFP—野生型マウス) を作製した。これらの2種類のマウスを交配することで、エストロゲン合成が欠損し、かつエストロゲン応答性に EGFP の発色を示す EGFP-ArKO マウスを確立した。このマウス系統は、種々の化学物質のエストロゲン活性を検出するための生物センサーとして利用できると推測された (図1)。

また、エストロゲン受容体 α はエストロゲンの受容体として生体内で主要な役割を担っ

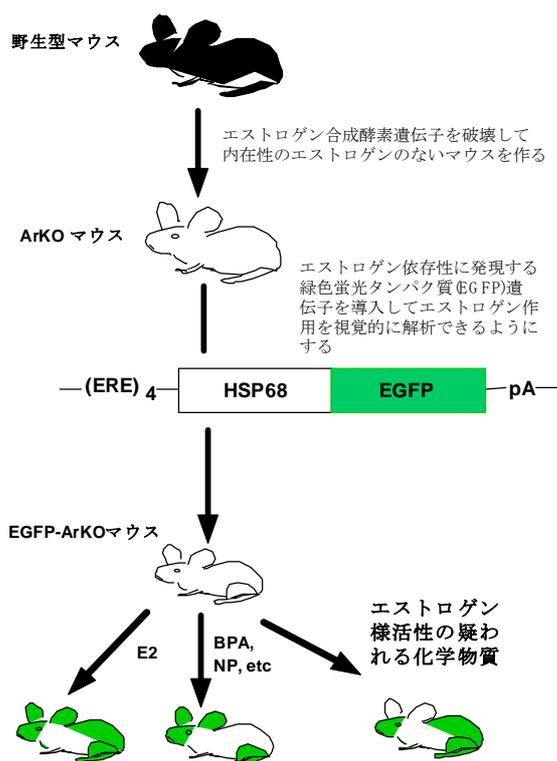


図1：エストロゲン様活性のある化学物質を検出するための生物センサーの開発

ている核内転写因子である。その遺伝子を破壊した α ERKO マウスとエストロゲン誘導性 EGFP 遺伝子を持つマウスとの交配を通じて、EGFP 遺伝子を α ERKO マウスに導入し、EGFP- α ERKO マウスを作製した。GFP 遺伝子を持つマウス組織を観察すると緑色蛍光が見られる。EGFP—野生型マウスの子宮、卵巣、脳下垂体では強い蛍光が観察できるが、EGFP-ArKO マウスと EGFP- α ERKO マウスでは弱い蛍光しか見られなかった。特に、両 KO マウスの脳下垂体ではほとんど EGFP 遺伝子は発現していなかった (図2)。このことはマウス組織に認められた発色がエストロゲン依存性であることを示すものであった。EGFP-ArKO マウスの各組織の EGFP 遺伝子の発現量を定量して、EGFP

—野生型マウスと比較した。その結果、副腎、脳下垂体、卵巣、子宮、脂肪、筋などで両者に差が見られた (図3)。

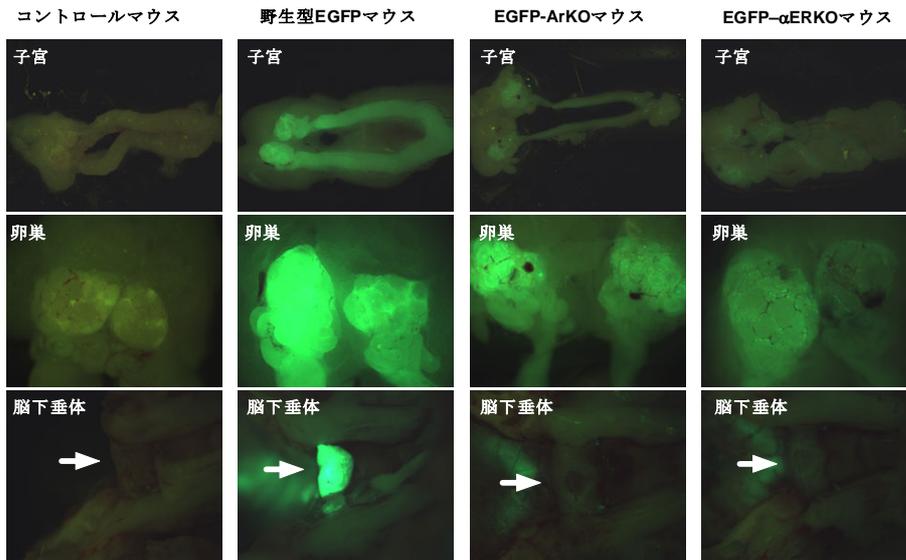


図 2 : 実体蛍光顕微鏡によるEGFP発現の解析

さらに、8週齢のEGFP-ArKO雌マウスに一週間に4回、種々の濃度の17β-エストラジオール (E2) やジエチルstilbestロール (DES) を皮下投与し、副腎、脳下垂体、卵巣、子宮でのEGFPの発現量を解析した。そ

の結果、脳下垂体はE2やDESに極めて高い感受性を示すことがわかった。また、DESは子宮ではE2以上にエストロゲン作用を示した。一方、卵巣や副腎では、解析した最高濃度のE2 (500 ng/μl) でエストロゲン作用が検出できた。さらに、子宮で強いエストロゲン作用を引き起こした濃度のDESでも、卵巣や副腎では、エストロゲン作用を検出できなかった。これらの解析から、(1) 同じ化学物質でも組織によって異なる強さのエストロゲン作用を引き起こすこと、(2) エストロゲン作用は組織ごとに異なる反応を示すことが明らかとなった。

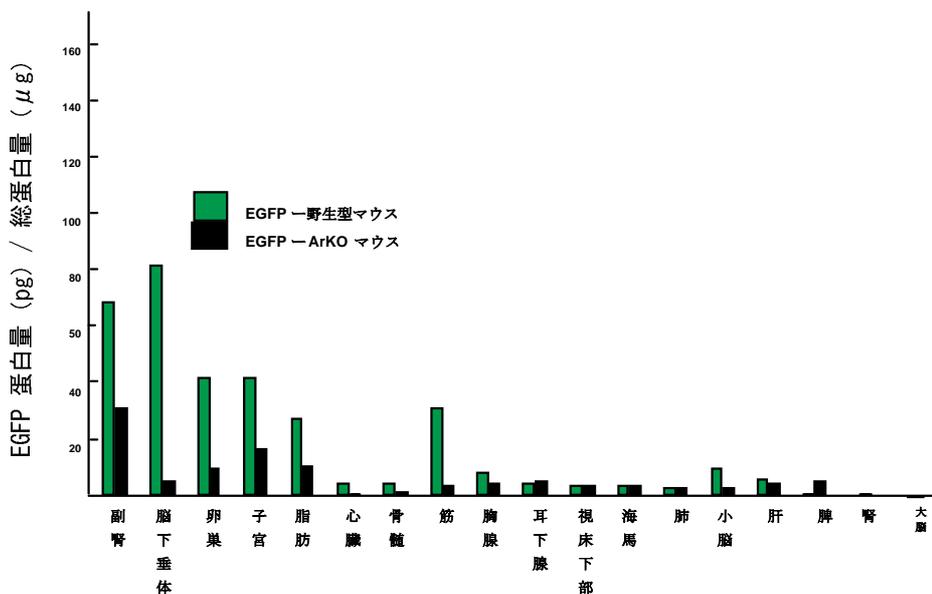


図 3 : EGFP-野生型マウスとEGFP-ArKOマウスのEGFP発現の定量的解析

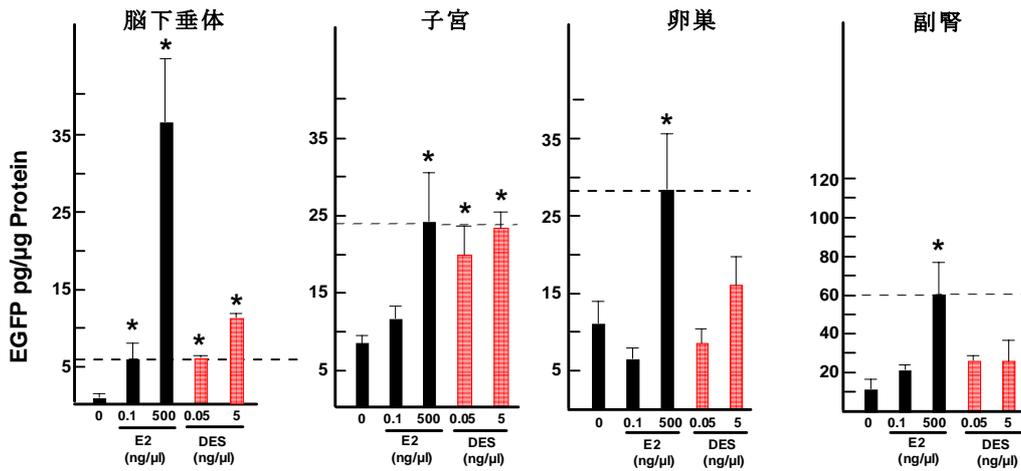


図 4 : EGFP- α ERK0 のEGFP発現を指標にした17 β -エストラジオール (E2)とジエチルstilbestロール(DES)のエストロゲン活性の解析

(2)研究成果の今後期待される効果

同様の解析をEGFP- α ERK0マウスを用いて行うことによって、生体における化学物質のエストロゲン作用を受容体特異性や依存性という観点から解析できると考えられる。また、試験する化合物を混入させた食餌で、これらのマウスを飼育すれば、食物由来の化学物質の慢性的暴露によるエストロゲン作用の詳細な解析が可能となると考えられる。さらに、EGFP-野生型マウスのEGFP発現の減少を指標にすることによって、組織特異的な抗エストロゲン作用の解析にも応用ができると思われる。

3. 2 川尻グループ

ダイオキシン受容体の機能解析

(1) 研究内容及び成果

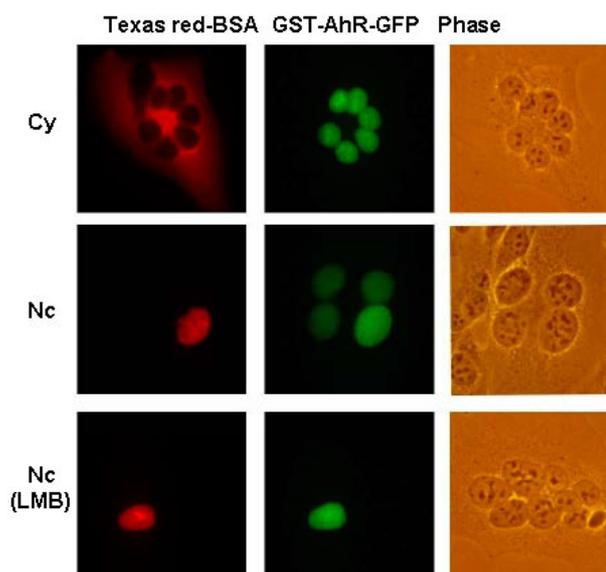
刺激に対する生物応答の分子機構の研究が進むにつれ、高度に調節された細胞内の情報伝達はその中心的メカニズムとして機能していることが明らかになってきた。情報伝達の主役は主に転写因子や核内受容体であり、核膜孔をはさんでの機能蛋白質の輸送の調節が、標的遺伝子の特異的発現機構のバイオロジカルスイッチとして重要であることが明らかになりつつある。生物を取りまく環境中にはさまざまな化学物質が存在し、発がんや内分泌攪乱などに影響を及ぼしていると考えられているが、その作用機序も化学物質の細胞内情報伝達として理解することが重要である。

3-2-1 ダイオキシン受容体の機能解析

ダイオキシンは発癌プロモーション、奇形の誘導、免疫能の低下、薬物代謝酵素

(CYP1A1 など) の誘導などの多彩な生物作用を示し、最近では内分泌攪乱化学物質として生殖毒性を示すとも言われている。これらの生物作用は主に basic/HLH/PAS 構造モチーフを持つ受容体型転写因子 Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) とそのヘテロダイマーパートナーである AhR Nuclear Translocator (ARNT) の仲介により引き起こされている。我々はこれまでに AhR の細胞内局在調節について研究を進め、核移行 (NLS) 及び核外移行シグナル (NES) を決定した。本事業ではさらに研究を進展させ、以下の結果を得た。

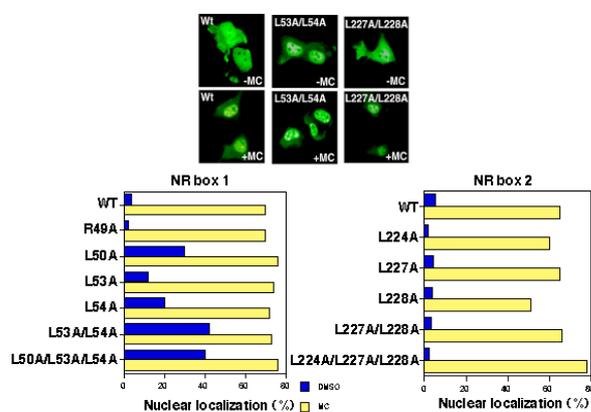
AhR には NLS の他に核外輸送を仲介している NES が存在している。従って、AhR はリガンド及びシグナル依存的に細胞質・核間をシャトルするタンパク質であることが予想された。実際、細胞融合した多核細胞に AhR を微量注入することで、このことを証明した (図 1)。AhR の核外輸送のもつ生物学的な意義は、その生理機能の解明の過程で明らかにされる必要があると考えられた。



AhRの核移行、核外移行によるシグナル伝達メカニズムについての研究の一環としてAhRに存在する2カ所のLxxLLモチーフ (NR box) の機能を検討した。NR box はコアクチベーターに存在し、このモチーフを介して核内受容体が結合してリガンド依存的な転写を促進することが明らかにされたが、その後蛋白質間相互作用にも関与することが示された。AhRのNR box 1はNLSとNESの間に位置しており、このモチーフに変異を導入するとリガンドが存在しなくてもAhRは細胞質から核へと移行する (図2)。Hsp90やARA9との結合に関与はしないことも示された。従って、AhRは単にHsp90などの因子と結合することで細胞質に繫留されているのではなく、核からのNESによる積極的な排出やNR boxを介してのAhRの分子間・分子内相互作用などの複合的メカニズムによる動的なバランスの上で細胞質に存在していることが示唆された。

NLS に依存した蛋白質の核移行は、NLS 近傍のアミノ酸のリン酸化によって調節されることがある。ヒトAhR のNLS周辺にはProtein kinase C (PKC) によりリン酸化されるコンセンサス配列があり、このうちSer36 はin vitro でPKCによりリン酸化された。AhR の核移行がこのリン酸化によって調節されるのかどうかを検討した。

(図 2)



(図 3)

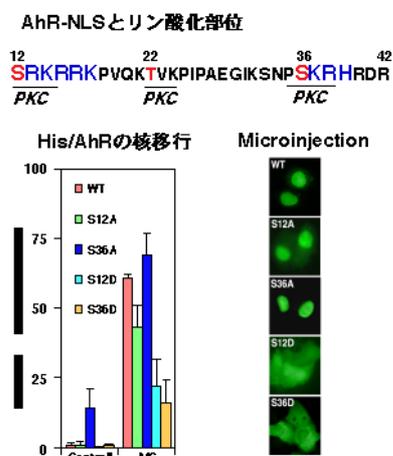
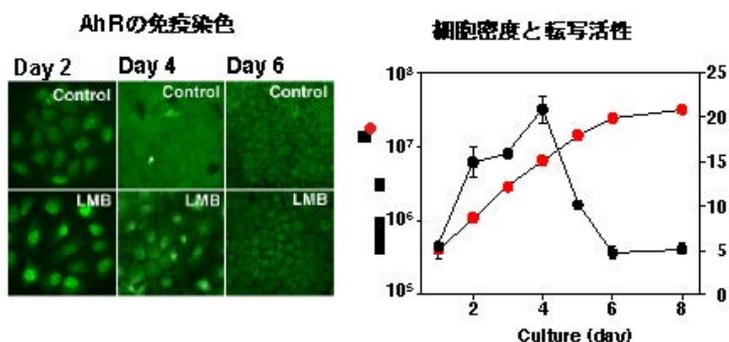


図 3 に示すように NLS を含む配列を GST-GFP 融合蛋白に連結し、マイクロインジェクションにより核移行活性をみた。リン酸化の影響を見るために Ser を Asp に置換した変異体を用いると、核移行活性は著しく低下した。さらに全長の AhR を COS 細胞に一過性に発現させた結果から、リガンド依存的な核移行には双節型 NLS に近接する Ser12, Ser36 が脱リン酸化されている必要があることが示唆された。従って、AhR のリガンド依存的な核輸送にはリガンド結合による NLS の Unmasking とリン酸化による調節との 2 段階のメカニズムが考えられた。

AhR の生理的機能についてはその生理的リガンドが不明なため現状では明確にされていない。AhR の細胞内分布がどのような生理的状態に変化し、その転写機能に影響を与えるかについてダイオキシンの標的組織であるケラチノサイト細胞 (HaCaT) を用いて解析した。その結果、(i) AhR は HaCaT の細胞密度により細胞内局在が変化し、低密度では主に核に、高密度では細胞質に局在する。LMB の添加効果の実験より、密度による分布の変化は高密度における AhR の核外輸送の促進と考えられる (図 4)。(ii) 細胞密度により AhR の転写活性は変化し、その局在性に依拠する (図 4)。(iii) AhR の核外輸送活性は NES のリン酸化により阻害される。(iv) p38MAPK による NES のリン酸化による核への蓄積と細胞間接着シグナルによる NES の脱リン酸化の調節が細胞密度による AhR の分布の変化に関与している可能性を見出した。

(図 4)



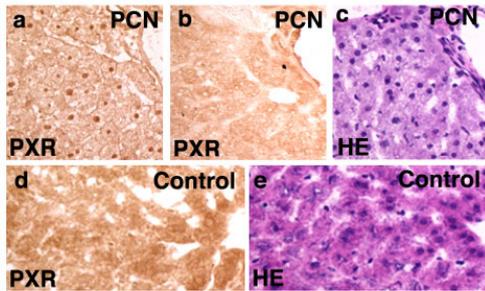
3-2-2 核内受容体（薬物受容体）による情報伝達の解析

オーファン受容体と呼ばれる核内受容体がある種の化学物質と結合して遺伝子発現に影響することも示唆されており、細胞内におけるこれらの受容体とステロイドホルモン受容体、性分化関連転写因子群とのクロストークの解析も化学物質による生物への影響を明らかにするために必要である。核内オーファン受容体 SXR は薬物センサーとして CYP3A4 や MDR1 などの薬物の代謝や排出に関与する遺伝子の発現制御に関与するだけでなく、生体内ステロイド代謝体センサーとして肝臓などでの脂質代謝に重要な役割をしているリガンド依存的な転写因子である (図 5)。SXR はある種の内分泌攪乱物質により活性化されることが知られており、内分泌攪乱のメカニズムを理解するためにはその機能解析が重要である。SXR の NLS を同定し、核移行のメカニズムを CAR と比較した。SXR は双節型 NLS を構成しているのに比べ、CAR は NLS 中の塩基性アミノ酸が変化していることにより NLS 活性を持たないこと、CAR で見られた核移行に関与する XRS (Xenochemical response signal) は SXR にも存在するが、核輸送能力はなく、むしろその疎水的な性質より分子間相互作用を介して細胞質に留める作用がある可能性を議論した (図 6)。尚、この研究は東京理科大学・武田健教授との共同研究である。

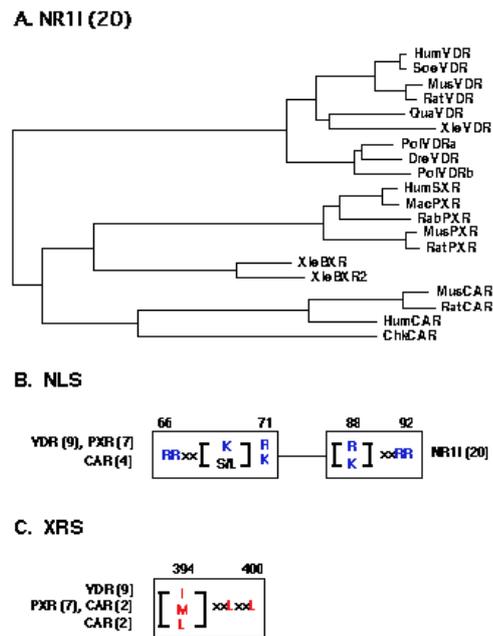
一方、性分化関連因子でありステロイドホルモン合成を調節する Ad4BP/SF-1 とその抑制作用を示す Dax-1 の細胞内での相互作用についても検討した。従来、Ad4BP/SF-1 は NLS を有する核タンパク質であることが報告されているが、Dax-1 には典型的な NLS が見られず、その細胞内分布についても明確な結論が下されていなかった。本研究の結果、(i) マウス胎児 E10.5 においては Ad4BP/SF-1 の発現は見られず、Dax-1 は細胞質と核に分布する。E18.5 においては Ad4BP/SF-1 の核での分布が観察され、Dax-1 も核に強く局在している (図 7)。(ii) Dax-1 は Ad4BP/SF-1 と結合して Ad4BP/SF-1 の NLS を利用して核に移行する (図 8)。(iii) Ad4BP/SF-1 との結合には Dax-1 の 3 カ所に存在している NR box のうちで最も N 端に近い Motif 1 が関与する。(iv) これらの複合体

の核への移行には Dax-1 の C 端の AF2 ドメインも重要である。(v)AF2 ドメインに変異のある先天性副腎低形成 (AHC) 患者の DAX-1 は Ad4BP/SF-1 依存的な核移行活性が非常に低下していることが示された。従って, 正常な DAX-1 の細胞内局在性が変異により変化することにより遺伝性疾患 AHC の原因の一部になることが示唆された。尚, この研究は基礎生物学研究所・諸橋憲一郎教授との共同研究である。

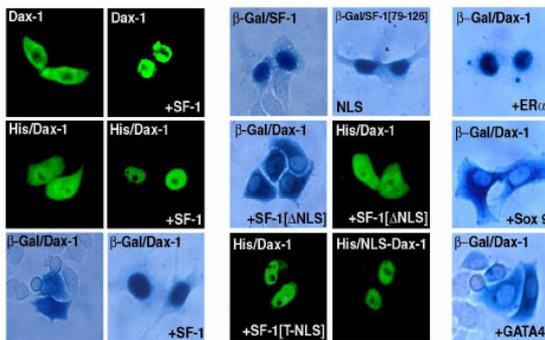
(図 5)



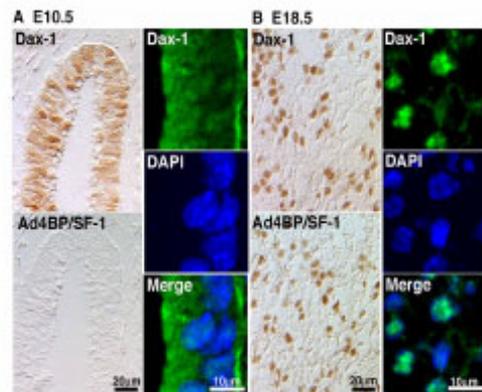
(図 6)



(図 7)



(図 8)



(2) 研究成果の今後期待される効果

さまざまな化学物質による生物への影響は複合的であり, 多くの受容体や転写因子が細胞内でクロストークをしながら遺伝子発現に影響を与えることにより生物

作用を示すと考えられる。薬物受容体の細胞質・核間輸送は、環境中に存在している多くの低分子化学物質による生物応答へのバイオロジカルスイッチとして、特異的遺伝子発現機構の理解に本質的な知見を与えるのみならず、薬理ゲノミクスによるテーラーメイド医療の基礎となる重要な位置を占めている。薬物（化学物質）による情報伝達とその生物応答の分子機構の解明が今後、進展することが期待される。

3—3—1 エストロジェンレセプターの標的遺伝子の解析

井上グループ

(1) 研究内容及び成果

内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンのシグナル経路を攪乱させる。特にエストロゲン受容体(ER)と結合し、その下流のシグナルを乱す物質が注目されている。従って、内分泌攪乱物質の作用メカニズムを明らかにするためには、エストロゲン受容体とその下流因子の生理機能を解析し、生体内における役割を明らかにする必要がある。エストロゲンは広範な標的臓器において細胞分化、増殖、機能の調節に多彩な働きを与え、骨粗鬆症や乳癌、泌尿器癌をはじめとする各種疾患の原因や治療と密接に結びついている。エストロゲンの主な作用は、ERを介する標的遺伝子の直接の活性化と考えられるが、その標的遺伝子は少数しか知られていない。本研究では、新しい標的遺伝子を探索する目的で、DNA、mRNA、ならびに蛋白レベルにおける探索を行った。DNAレベルでは、標的遺伝子のゲノム上での同定を試みるために、ヒトゲノム上に存在するERが結合するDNA断片を単離した。その近傍に、複数の新規エストロゲン応答遺伝子を同定し、この方法をゲノム結合部位(GBS)クローニング法と名付けた。mRNAレベルでは、DNAチップ法により、エストロゲン応答遺伝子を同定した。蛋白レベルでの同定として、プロテオーム法も試みている(図1)。

材料	DNA	RNA	蛋白質
原理	転写因子の ゲノム結合部位	mRNA発現量の差	蛋白発現量の差
方法	GBSクローニング Genome DB search	Differential Display Differential Screening DNA chip	二次元電気泳動 Proteome analysis
長所	直接の応答遺伝子 発現量に左右されない	手法が簡便	最終産物としての差異

図1. 未知のエストロゲン標的遺伝子の同定法

ERE をゲノム上に同定するゲノム結合部位 (GBS) クローニング法を用いてエストロゲン応答遺伝子を探索し, Efp, NR2D, COX7RP などの新しいエストロゲン応答遺伝子 を特定した。特に, RING フィンガーモチーフをもつエストロゲン応答遺伝子 Efp の発現部位は, 子宮, 乳腺, 卵巣において ER α の発現部位と一致し, エストロゲンにより 刺激された子宮において, 迅速な応答性を示した。

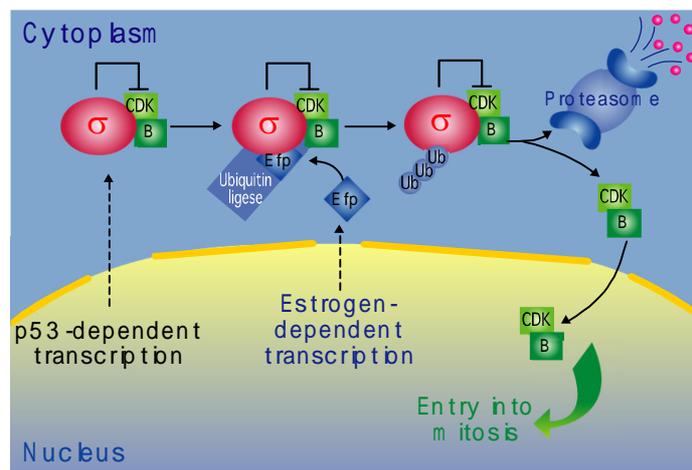


図 2. エストロゲン応答遺伝子 Efp の作用メカニズムのモデル図

Efp のノックアウトホモ接合体マウスは, 雌マウスにおいて子宮低形成及び子宮内膜のエストロゲン応答性増殖に関する抵抗性が認められた。また, 乳癌に Efp を過剰に発現させると, 本来エストロゲンがないと増殖できない乳癌細胞がエストロゲン非依存下でも増殖することが観察された。逆に乳癌細胞の Efp の発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて抑制することにより, 腫瘍形成も抑えられ, 乳癌治療の新しい分子標的として

の役割が示された。このメカニズムに関して, Efp は, 細胞周期進行のブレーキ役である 14-3-3 σ に対してユビキチンを結合させる酵素 (E3) として働き, 同蛋白の分解を介して, 細胞増殖を引き起こすことを見出した (図 2)。

骨は, エストロゲンの主要な標的臓器であり, 内分泌攪乱作用が骨代謝に及ぶことが想定される。しかしながら, 骨代謝に対するエストロゲンの作用における ER の役割に関しては未だ不明な点が多い。われわれは, ER α と ER β 両方のシグナルを阻害するドミナントネガティブ体を人工変異体もしくは天然の変異体として見出した。このドミナントネガティブ体 (dnER) を発現させたトランスジェニックラットを作製することにより, 骨に対するエストロゲン作用における ER の役割を検討した。ER α の変異体 (ER α 1-535) は, いわゆるドミナントネガティブ体として働くことを明らかにし, この ER α 1-535 発現ユニットをラット受精卵に導入しトランスジェニックラットを作製した。少なくとも 2 系統のトランスジェニックラットにおいて, ER α 1-535 の導入と発現が確認された。これらのラットのうち雌を 6 月齢において手術し Sham 手術群, 卵巣摘除群, 卵巣摘除後エストロゲン補充群 (4 週間) にわけて処置し骨量を測定した。

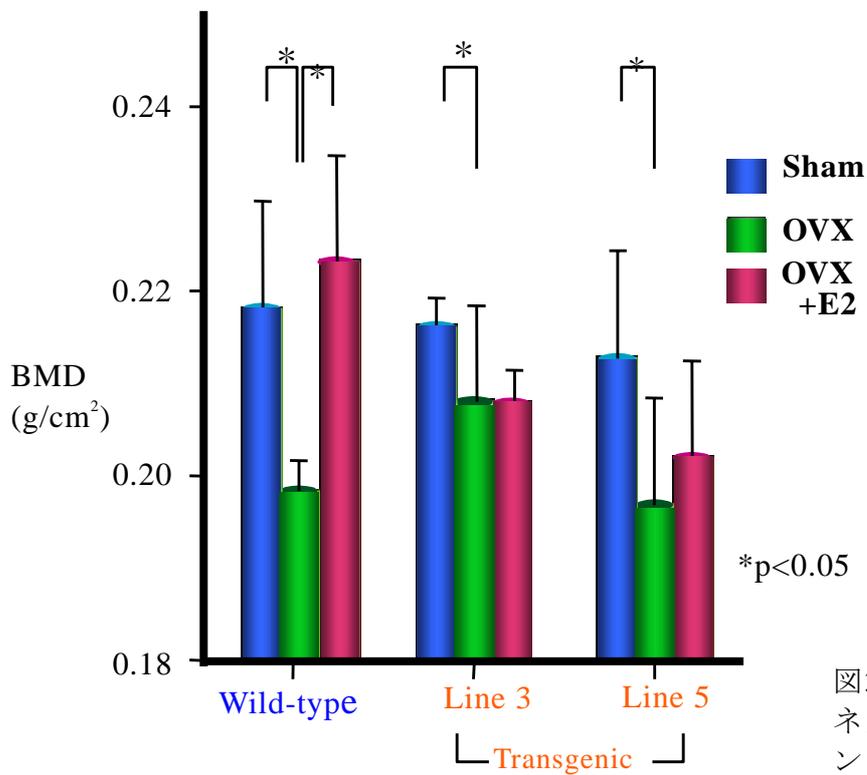


図3. ERドミナントネガティブ体現トランスジェニックラットの骨密度におけるエストロゲン低応答

卵巣摘除後エストロゲン補充群では野生群でエストロゲン補充によって骨量減少が予防されるのに対して、トランスジェニックラット群には骨量減少が予防できず、卵巣摘除群と同程度の骨量減少が観察された（図3）。次に、雄ラットを3月齢において、エストロゲン投与群、プラセボ投与群に分け、2ヶ月後の骨量をみたところ、野生群でエストロゲン補充によって骨量が増加するのに対し、トランスジェニックラット群では骨量増加がみられなかった。このことは、エストロゲンの骨量に対する作用は、雄においてもERを介していることが示唆するものである。興味深いことに、ER α が欠損したマウスと、それ由来の骨芽細胞において、負荷刺激に対する骨量の増加ならびに骨芽細胞の増殖にER α が重要であることが報告され、ERの骨形成に対する働きが注目されている。我々は、先に開発したトランスジェニックラットの骨芽細胞初代培養細胞で、細胞増殖能が損なわれていることを見出した。

そこで、この系を用いてエストロゲンシグナルの標的を探るためにDNAチップ解析を行い、骨芽細胞におけるERの下流応答遺伝子群を探索した。その結果、サイクリンD2を含むいくつかの候補遺伝子を同定された（図4）。

図4. DNAチップを用いて見出したERドミナントネガティブ体過剰発現骨芽細胞にて発現変化する遺伝子

発現増加する遺伝子	発現減少する遺伝子
Angiotensin receptor (AT1) Vascular type-1 angiotensin II receptor Proenkephalin Tropoelastin mRNA, 3 Catechol-O-methyltransferase mRNA, 3 dUTPase mRNA, complete cds Clathrin-associated adaptor protein homolog (p47A) Insulin growth factor-binding protein BRL-3A binding protein Cell cycle progression related D123 MRC OX-45 surface antigen	MHC class II A-beta RT1.B-b-beta angiotensinogen gene-inducible enhancer-bp 1 calcium/calmodulin-dependent nrotein kinase II delta NF1-B2 Fibronectin NF1-X1, partial Mucin Plecti Transfer RNA-Valine synthetase mRNA, partial MHC class II antigen RT1.B-1 beta-chain Olfactory receptor-like protein (SCR D-9) Moesin Mitogenic regulation SSeCKS (322) Type XI collagen alpha-1 chain (COL11A1) Protocadherin 5, partial R2 cerebellum DDRT-T-PCR Glycoprotein CD44 (CD44) NF1-X1 cyclin D2, complete Entactin
85kDa sialoglycoprotein (LGP85) Cytoplasmic dynein heavy chain (MAP 1C) CL2AA 140-kD NCAM polypeptide	

サイクリン D2 は細胞周期の正の調節を担い CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し、その酵素活性を上昇させることが知られている。骨芽細胞に生理的濃度のエストロゲンを添加し、その増殖が誘導されるときにサイクリン D2 の発現増加が確認された。さらにサイクリン D3 の発現も同様に増加した。免疫沈降法を用いてエストロゲン添加により骨芽細胞内でサイクリン D2 と D3 が CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し CDK4 ならびに CDK6 の酵素活性を上昇させることを見出し、エストロゲンによる骨芽細胞増殖にはサイクリン D2, D3/CDK4, CDK6 を介した経路が機能していることが示した (図 5)。

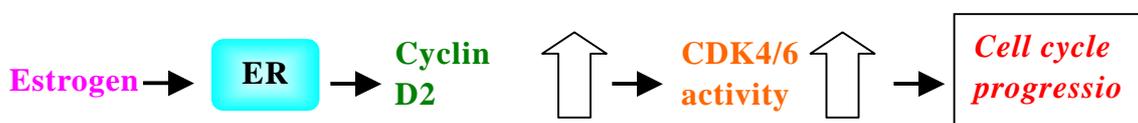


図 5. 骨芽細胞におけるエストロゲンによる増殖シグナル経路のモデル

DES は薬物として実際に人体に使用された内分泌攪乱物質である。妊娠中に暴露された女兒に腫瘍が発生し、また男児に対しても精巣機能低下や発癌への影響が懸念されている。エストロゲンが精巣に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするため、2ヶ月齢マウスを用いてエストロゲン投与後6時間後の発現変化をDNAチップで解析した。17βエストラジオール, DES 刺激により発現が増加もしくは減少する遺伝子がリストアッ

プされ、重複しているものと、それぞれに特異的なものが存在した。そのうち精巣機能に関与する可能性のある遺伝子を図6に示した。ERのノックアウトマウスでは、精子形成異常がおこるが、精巣におけるエストロゲン作用の分子標的としてこれらの遺伝子が注目される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

内分泌攪乱物質作用の入り口であるERはエストロゲン依存性の転写因子であり,EREの近傍に位置する様々な下流応答遺伝子を調節することにより,多彩な機能を起こすと考えられる。しかし,エストロゲンの多彩な作用に比べ直接応答する遺伝子は少数しか知られていない。エストロゲンと乳腺上皮の増殖や乳癌との関係,子宮内膜の増殖作用を結びつける応答遺伝子に関しても不明な点が多く,骨,精巣,脳といった女性生殖系外の組織では,さらに研究が遅れている。

Fold change		発現増加がみられた遺伝子	機能
E2	DES		
36.8	90.5	Immunoglobulin	
21.1	9.8	Aquaporin2	水吸収, 精子の成熟, 濃縮
9.8	21.1	Calcium-transporting ATPase	カルシウムポンプ, (筋) 小胞体
3.2	3.5	P450scc	コレステロール側鎖切断
2.3	3.7	Kallikrein	血管拡張, 末梢循環障害の改善
2.6	222.8	Seminal vesicle protein	精子数・運動性増加 (男性不妊症治療薬) 精囊蛋白, 精液凝固, 精子運動抑制 末梢リンパ球増殖抑制

Fold change		発現減少がみられた遺伝子	機能
E2	DES		
0.1	0.8	MAPKK7	細胞増殖抑制
0.4	0.9	β -actin	細胞骨格
0.4	0.7	3 β -HSD	水酸化ステロイド脱水素酵素, テストステロン合成
0.7	0.7	VCAM1	細胞接着因子, 精巣血液関門
0.8	0.9	RNF19	XY body, ユビキチンリガーゼ, 蛋白分解
0.8	0.8	Bhmt	Betamin-homocystein methyltransferase

図 6. 17 β エストラジオール(E2)もしくは DES 投与によってマウス精巣において発現変化がみられた遺伝子

本研究により ERE をゲノム上に同定するゲノム結合部位 (GBS) クローニング法と DNA チップ法を用いてエストロゲン応答遺伝子を多数明らかにした。たとえば脳におい

て各種神経受容体やチャンネルがエストロゲン応答遺伝子として見出されている。特に GBS クローニング法により同定された NR2D は、興奮性グルタミン酸レセプターである NMDA (N-methyl-D-aspartate) レセプターのサブユニットである。性行動や記憶、感情など高次脳機能に対するエストロゲン作用が、中枢神経系の ER から下流の NMDA レセプターなどを介して引き起こされる可能性が考えられ、内分泌攪乱物質の作用点を考える上でも興味深い。乳癌は日本でも増加傾向にあり、環境要因や外来性エストロゲン、内分泌攪乱物質の影響が懸念され、乳癌のエストロゲン依存性増殖のメカニズムの解明が求められている。Efp は細胞周期進行のブレーキ役の 14-3-3 σ に対して RING フィンガー依存性のユビキチンリガーゼ (E3) として作用し、14-3-3 σ のプロテアソームにおける蛋白分解を介して、細胞増殖を促進することを明らかにした。この新規メカニズムの解明は新しい細胞周期調節機構の発見として注目されると同時に、乳癌治療の新しい分子標的として臨床応用が期待される。

ER α 、 β 双方のシグナルを阻害する ER ドミナントネガティブ変異体を発現させたトランスジェニックラットを作成し、骨代謝に対する ER の役割を検討したところ、骨密度値を指標にして、雌ではエストロゲン補充による骨量減少予防効果に関して、雄ではエストロゲン投与による骨量増加効果に対して抵抗性を示すことを明らかにした。これらにより、エストロゲンの骨量に対する作用に雌雄とも ER α / β が重要な役割を果たすことが直接示された。さらに、そのトランスジェニックラットの骨芽細胞初代培養系を用いて DNA チップ解析を行い、骨芽細胞における ER の下流応答遺伝子群を探索したところ、サイクリン D2 を含む複数の候補遺伝子を同定した。そして、初代骨芽細胞において、エストロゲンは、サイクリン D2、サイクリン D3 を誘導し、Cdk4/6 のキナーゼ活性を上昇させることに伴い、細胞増殖促進に寄与することが示唆された。一方、精巣におけるエストロゲンならびに DES 応答遺伝子を DNA チップ法により明らかにした。今回各臓器でリストアップされた標的遺伝子は、内分泌攪乱物質暴露のバイオマーカーもしくは、内分泌攪乱物質作用メカニズムの標的として今後の研究の発展が期待される。

3—4—1 代表的内分泌かく乱物質の影響の解析

佐神グループ

(1) 研究内容及び成果

我々は胎児期の生殖腺分化に重要な役割を持つ転写因子群 (Ad4BP, DAX-1, WT-1, Sox-9, GATA-4等) 及び胎児肝における薬物代謝酵素 P450 (CYP 2B1, 2B2, 3A2) の発現に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に注目し、実験を進めた。

内分泌かく乱化学物質 (EDCs) の影響としては、雄生殖腺の雌化あるいは雌生殖腺の雄化があげられるが、その原因として Ad4BP, DAX-1, WT-1, Sox-9, GATA-4等の胎児

生殖腺の分化に必須な転写因子への影響が考えられた。これらの転写因子には、分化時期の発現量に性差のあるものが多く、EDCsがこれらの転写因子の発現に影響を及ぼした場合、生殖器官の分化異常が現れる可能性を推測した。この推測にもとづき1)～3)の実験を行った。

1) 妊娠マウスにOctylphenol(OP)あるいはDiethylstilbestrol(DES)を投与し、胎児生殖腺に発現する上述の転写因子群に及ぼす影響を評価した。妊娠マウス(ICR:Slc)の胎齢9.5～13.5日に、OPあるいはDESの200 mg/kgを連続投与した後(対照群: Corn oil投与)、胎齢18.5日あるいは出生後約4週齢に生殖腺を摘出した。摘出した生殖腺のうち胎児の生殖腺については、定量的RT-PCRを用いて各転写因子のmRNA量を定量した。また、OP投与群については、精巣及び卵巣の病理学的検索を実施した。その結果、OP、DESのいずれの投与によっても、母動物には異常は認められなかったが、帝王切開時の胎児所見ではDES投与群にミューラー管退縮不全を伴った雄胎児が散見され、死胚数の増加も認められた。

定量的 RT-PCR の結果では、DAX-1 発現量は精巣・卵巣ともに大きな変化はなかった。Ad4BP 発現量は精巣で OP 群に減少傾向が、卵巣では OP 群に減少傾向、DES 群に増加傾向が認められた。GATA4 発現量は精巣、卵巣で OP 群、DES 群ともに増加傾向が認められた。Sox-9 発現量は、精巣で OP 群、DES 群ともに減少傾向が認められた。WT-1 発現量は、卵巣の DES 群に減少傾向が認められた。

OP投与群出生児については生殖腺の病理学的検索を行い、卵巣では対照群とOP投与群の間に違いは認められなかった。一方、精巣では基底層部分の細胞にアポトーシス様変化を示す細胞が認められたほか、精細管の内腔部分に形状の歪な細胞群がOP投与群にやや多く認められた。しかし、これらの変化は対照群にも自然発生的に認められており、今回得られた結果からはOPによる有意な影響とは断定できなかった。

2) 生殖腺分化時期のうちどのタイミングでのDES暴露が各転写因子の発現に影響するのかを確かめる実験を行った。妊娠マウス(ICR:Slc)の胎齢12.5～14.5日の各日においてDESの100 mg/kgを単回投与し(対照群: Corn oil投与)、投与翌日に胎児生殖腺を摘出した。摘出した生殖腺について、定量的RT-PCRを用いて各転写因子のmRNA量を定量した。定量的RT-PCRの結果、胎児精巣におけるSox-9発現量は、12.5、13.5、14.5日齢いずれに投与した場合も、わずかではあるが増加傾向を認め、特に12.5日齢にて投与した際の13.5日齢での増加率が最も大きかった。GATA4発現量でも、12.5、13.5、14.5日齢いずれの投与によっても、増加する傾向が認められた。一方、P450-17 α 発現量は、12.5、13.5、14.5日齢いずれの投与によっても約半分に減少した。Ad4BP発現量では、いずれのタイミングにおいても、薬物投与による変化は認められなかった。特

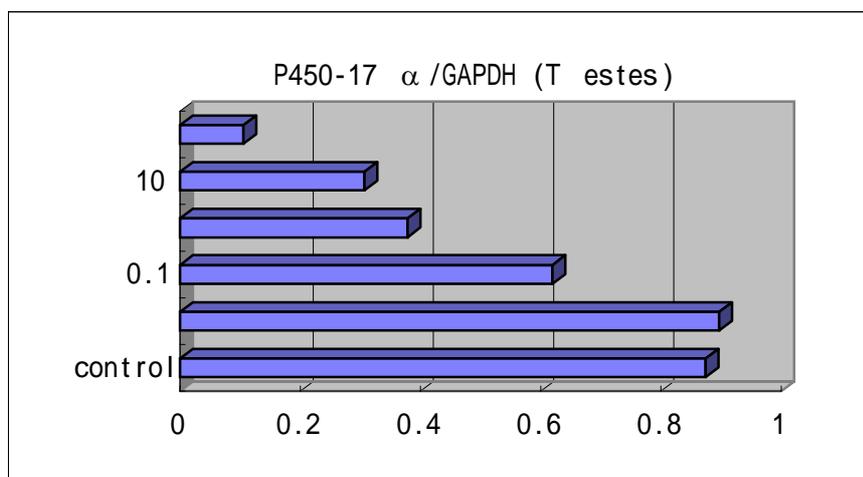
に、Sox-9, Emx-2, GATA-4及びP450-17 α はいずれのタイミングの投与においても対照群とDES投与群間で同様の変動を示し、12.5日齢で投与した場合の変動が最も大きかった。胎児卵巣では、GATA4発現量は精巣で認められた変化とは逆に、12.5, 13.5, 14.5日齢いずれの投与によっても、わずかながら減少する傾向が認められた。WT-1発現量は、12.5, 13.5日齢の投与によって、それぞれ減少する傾向が認められた。また、Ad4BP発現量に関しては、精巣と同様いずれのタイミングにおいても薬物投与による変化は認められなかった。

Table		Value of mRNA in Testes							
Theme	: -	Species (Strain): mouse (Slc:ICR)							
Study No.	: T99009	Route : s.c.							
	GAPDH (E-1)	Ad4BP	Dax1	Sox9	Emx2	GATA4	WT1	P450-17 α	
cont 12.5		39.18	79.24	62.16	22.94	32.48	65.84	34.58	98.30
	mean/GAPDH	39.18	0.0309	0.0227	0.0059	0.0081	0.0203	0.9007	0.2619
DES 12.5		72.30	235.00	321.80	106.40	167.96	387.20	93.30	82.04
	mean/GAPDH	72.30	0.0310	0.0483	0.0143	0.0200	0.0570	1.4094	0.1033
cont 13.5		35.84	95.94	82.64	21.94	44.98	158.58	31.80	169.22
	mean/GAPDH	35.84	0.0277	0.0387	0.0068	0.0100	0.0476	0.2799	0.5147
DES 13.5		24.38	112.28	46.80	23.38	28.70	179.52	30.90	53.96
	mean/GAPDH	24.38	0.0476	0.0307	0.0085	0.0115	0.0657	1.5451	0.2750
cont 14.5		18.47	71.70	42.92	10.95	17.12	100.84	20.02	152.76
	mean/GAPDH	18.47	0.042	0.019	0.005	0.012	0.053	1.204	0.857
DES 14.5		38.48	140.74	243.00	23.82	43.68	208.40	42.70	195.46
	mean/GAPDH	38.48	0.0401	0.0646	0.0070	0.0113	0.0569	1.0938	0.4975

3) DESによる各生殖腺分化関連転写因子群の変化の用量反応性を確認するために、妊娠マウス(ICR:Slc)の胎齢 12.5~14.5日においてDESの0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/kgを連続投与した後(対照群: Corn oil投与), 胎齢 15.5日において胎児の生殖腺を摘出した。摘出した生殖腺について、定量的RT-PCRを用いて各転写因子のmRNA量を定量した。

定量的RT-PCRの結果、Ad4BP及びGATA4の発現量は、各投与量の精巣・卵巣いずれにおいても増加傾向を示したが、用量相関性は認められなかった。DAX-1発現量は、各投与量の精巣・卵巣いずれにおいてもおよそ半減していたが、用量相関性は認められなかった。Sox-9発現量は、各投与量の精巣・卵巣いずれにおいても増加する傾向を示したが、その増加率は精巣において顕著であった。ただし、用量相関性は認められなかった。Emx-2, WT-1の発現量はいずれも、精巣では逆U字型の用量反応性を示し、卵巣では精巣とは逆にU字型の用量反応性を示す傾向にあっ

た。P450-17 α は、卵巣では基礎的な発現量が少ないこともあり発現量に変化は認められなかったが、精巣では、投与量増加に伴い発現量の減少が認められた。



最後に、EDCsの胎児肝に及ぼす影響を検討した。EDCsは、生殖腺への影響がもっとも危惧される一方で、肝などの臓器も影響を受ける可能性が推測される。容易に予測されるのは、ステロイドを代謝する、あるいはステロイドによって発現が制御されている可能性がある薬物代謝酵素への影響である（下表）。

影響の予想されるP450	役割
CYP 1A2	17 β -エストラジオールの代謝に関与
CYP 2A4, 2C11, 2C12, 2D9, 3A2	性特異的発現が認められる
CYP 3A1 (3A23)	新生児に多く発現する
CYP 2B, 3A1 (3A23)	ステロイドの水酸化（不活化）に関与
CYP 3A9	エチニルエストラジオールで誘導
CYP 3A4	テストステロン、プロゲステロンの代謝に関与 エチニルエストラジオールで阻害される

そこで、これら肝薬物代謝酵素へのEDCsの影響を検索するために以下の実験を行った。EDCsとしてBisphenol A(BPA)を用い、妊娠ラットに経口投与した際の胎児肝に及ぼす影響を検討した。ラットの妊娠6～19日にBPAを経口投与し（投与量：0, 1, 10, 100 mg/kg）、妊娠20日に胎児の肝臓、母動物の肝臓及び胎盤を摘出した。摘出した各臓器について薬物代謝酵素P450（CYP 1A2, 2B1, 2B2, 3A2, 3A9, 3A23）のmRNA発現を定量解析した。その結果、測定したP450分子種のうち、胎児肝ではCYP 2B1, 2B2及び3A2の発現が認められた。BPA投与による影響は、雄胎児肝のCYP 2B1及び3A2では100 mg/kg

投与群で、CYP 2B2では10及び100 mg/kg投与群でそれぞれ減少傾向が認められた。雌胎児肝においては、CYP 2B1及び3A2では1 mg/kg投与群で対照群に対して増加傾向が、CYP 2B2では用量依存的な減少が認められた。一方、胎盤でのP450の発現はCYP 2B1のみ認められた。雄胎児由来の胎盤では、100 mg/kg投与群にCYP 2B1発現量の減少が認められた。雌胎児由来の胎盤では、10及び100 mg/kg投与群にCYP 2B1発現量の減少が認められた。母動物の肝では、CYP 1A2, 2B1, 2B2, 3A9及び3A2の発現が認められ、そのうちCYP 2B2及び3A23では用量依存的な減少傾向が認められた。また、CYP 3A9では、1 mg/kg投与群で対照群の約2倍となる増加を示し、逆に100 mg/kgでは対照群の約5分の1となる減少が認められた。なお、胎児の肝、精巣、卵巣及び胎盤の病理組織学的検査では、BPA投与に起因する所見は認められなかった。

Dose group	0 mg/kg/day	1 mg/kg/day	10 mg/kg/day	100 mg/kg/day
Cyp 2B1	7.76E-02	9.86E-02	6.96E-02	4.48E-02
Cyp 2B2	1.28E-02	1.86E-02	5.21E-03	4.43E-03
Cyp 3A2	2.08E-03	2.37E-03	2.41E-03	6.01E-04

Cyp 1A2, 3A9, 3A23: Below the quantifiable limit

Dose group	0 mg/kg/day	1 mg/kg/day	10 mg/kg/day	100 mg/kg/day
Cyp 2B1	6.33E-02	1.19E-01	6.20E-02	8.35E-02
Cyp 2B2	1.66E-02	2.17E-02	7.51E-03	2.88E-03
Cyp 3A2	2.21E-03	4.16E-03	2.42E-03	1.57E-03

(2) 研究成果の今後期待される効果

EDCsの生殖腺分化に関連する転写因子群に及ぼす影響については、1990年代の後半より複数の報告がされているが、一貫性のある結論が得られているものは少ない。P450-17 α の発現減少については、我々が得た結果と同様の結果がラット胎児精巣について報告されている。Ad4BPについてはいくつかの報告があるが、その影響の有無については言及できないのが現状である。今回、我々が検討を行った以外の因子では、Hoxa-10やWnt7aについて、DES投与による生殖腺での減少が報告されている。また、近年ではDNAマイクロアレイ法を用いた研究が進んでおり、EDCsの生殖腺への影響が広く解析されている。このマイクロアレイ法におけるクラスター解析では、同じエストロジェ

ン様物質でも、その活性の強弱によって制御下にある遺伝子発現に及ぼす影響が全く異なることが発表されている。

EDCsの肝薬物代謝酵素に及ぼす影響については、研究があまり進んでおらずデータに乏しい。特に、胎児の肝における定量的データは少ない。これまでに発表されたものとしては、EDCsによってPregnant X receptor (PXR)を介したCYP 3A1の減少が起きるといふ報告や、遺伝子発現を解析したデータではないが、ラット肝ミクロゾーム酵素活性を指標にしてBPAのラット肝P450への影響を評価し、相互作用の予測される酵素種を同定したという報告がある。

今回のCRESTにおける取り組みによって得られた成果について、対外発表は行っていないため、それらの波及効果等については言及できないが、今後の展開の見込みとしては幾つかの可能性が考えられる。特に本研究分野においては、先にも述べたようにDNAマイクロアレイの手法を用いた解析は多くの研究者によって支持されており、既に数多くの結果が発表されている。今回我々が行った検討結果に関しても、DNAマイクロアレイのような網羅的解析と重ね合わせて評価することにより、解析した遺伝子の変化の意義付け及び解釈が可能になることが期待される。

3—5—1 生殖腺の形態形成機構の解明

吉岡グループ

(1) 研究内容及び成果

中間中胚葉からは生殖隆起と中腎、後腎などが形成されるが、後に生殖隆起は生殖腺へ、中腎と後腎は各々付属生殖器官と腎臓へと分化する。この過程で性的に未分化な生殖隆起の形態と機能には「性」の分化が現れ、雌雄生殖腺が形成される。生殖腺で生合成される性ステロイドが2次的性分化に不可欠であることを考慮すると、生殖腺の性決定が動物個体の「性」を決定していると理解することができる。従って生殖腺の性分化の過程を解明することが「性の総合的な理解には不可欠である。

中間中胚葉から未分化性腺への分化過程におけるFGFとWNTシグナルの関与

生殖腺は前腎、後腎には決して形成されずに中腎の腹側に形成されることから、それらの形成に特異的な機構があるはずである。ニワトリ胚を用いて、その機構の一端を明らかにした。st10から頭尾軸にそって体節の形成と同調して、腎管が伸びてくる。この時点で腎管が形成されるということは、すでに中腎管を形成する細胞は、間葉から上皮細胞への分化転換をしていることになる。st12において、体節13から16番目のレベルの中腎予定領域の中間中胚葉に*Fgf8*が発現し、st15では*Fgf8*と重なった領域の中腎中胚葉に*Wnt4*が発現する(図1)。st18では*Fgf8*は中腎細管が中腎管と融

合する領域に発現し、*Wnt4* はより中心軸よりの中腎細管と隣接した中腎中胚葉に発現する。*Fgf8* と *Wnt4* は中腎細管のそれぞれ特異的な領域に分化している (図 2)。これまで主に哺乳類で単離された生殖腺の分化に不可欠な因子は、広く脊椎動物に認められるものも少なくない。このような因子としては *Ad4BP/SF-1* がもっとも解析されている。この因子のノックアウトマウスでは副腎、性腺が欠失することから、両器官の形成に不可欠であることがわかっている。

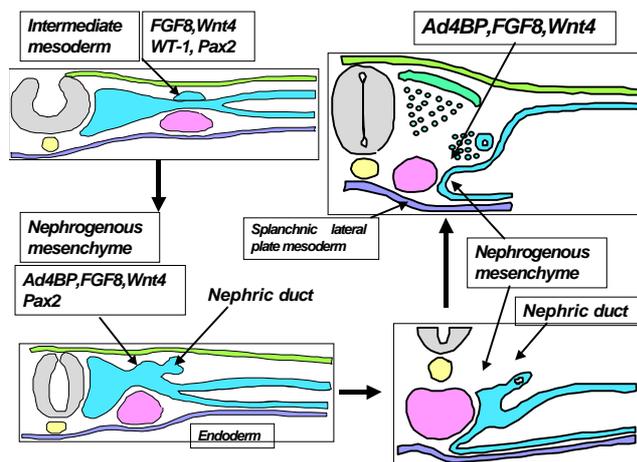


図 1 中間中胚葉から生殖隆起が形成されるまでの発生を模式的に表す。St13 から中間中胚葉に *Fgf8* が発現し、引き続いて *Wnt4* が発現する。St18 で中腎細管の特異的な領域に両者は発現する。それに近接した領域に *Ad4BP/SF-1* は発現し始める。

腺未分化細胞集団は、背側と腹側の領域に、さらに頭部側と尾部側にわかれ、副腎と生殖腺が形成されることを示している (図 3)。

そこで、ニワトリ胚における *Ad4BP/SF-1* の発現を解析した。st18 で中腎細管に発現する *Fgf8*, *Wnt4* に隣接した中腎中胚葉に *Ad4BP/SF-1* が発現し始める。この領域が副腎、性腺予定領域となる。

さらにショウジョウバエと線虫で性分化に関与する転写因子のニワトリ相同遺伝子である *Dmrt-1* の発現をしらべた。st21 で *Fgf9* の発現領域と隣接した中腎中胚葉に発現し始めた。この領域は *Ad4BP/SF-1* 発現領域の腹側の一部と重なっていた。その後、*Ad4BP/SF-1* 発現は背側と腹側の領域に分かれ、*Dmrt-1* はこの腹側の領域と一致した。

このことは、ニワトリ胚でも副腎生殖

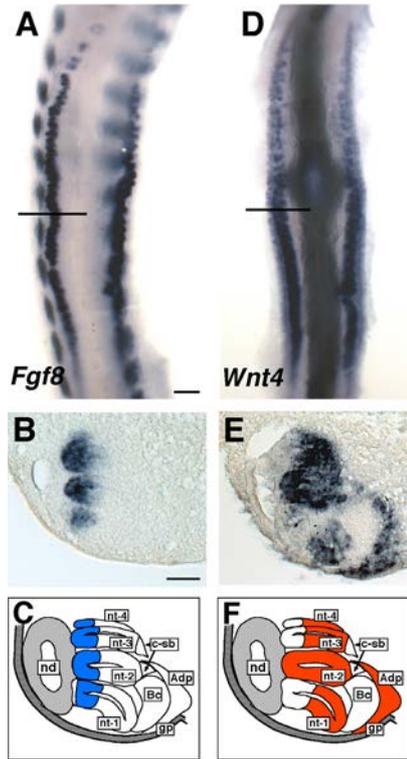


図2 Fgf8 と Wnt4 の3日胚での発現パターン。それぞれの遺伝子は中腎細管の特異的な領域に発現する。Wnt は生殖腺原基にも発現する。

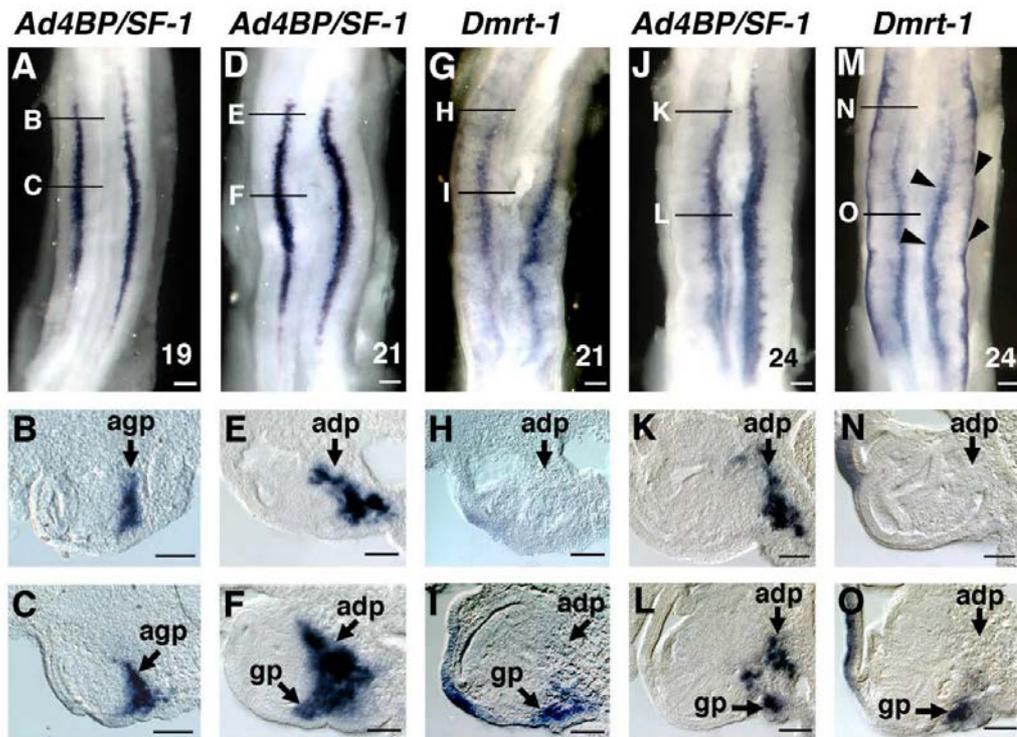


図3 ニワトリ生殖原基における Ad4BP/SF-1, cDmrt-1 の発現様式。副腎性腺原基 (adreno-gonadal primordium) から 副腎原基 (adrenal primordium) と生殖原基 (gonadal primordium) に別れる。

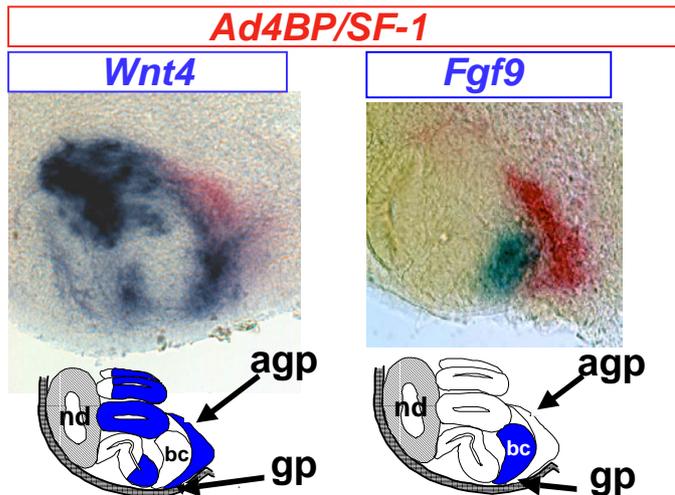


図4 Ad4BP/SF-1 の中腎中胚葉領域における発現は Wnt4, Fgf9 の発現と密接に関係していることが予想される。

Wnt4, *Fgf9* の発現を *Ad4BP/SF-1* の発現と同時にしらべると図4のようになり、先に述べた *Wnt4* とさらに、st21 でボーマン結節に発現する *Fgf9* が生殖腺の形成を誘導するシグナルであることが作業仮説としてでてきた。それを証明するため、*Wnt4*, *Fgf9* の異所性発現により *Ad4BP/SF-1*, *cDmrt-1* の発現変化を調べた。まず *Wnt4* の産生細胞を st13 で中腎中胚葉の生殖腺予定領域に移植して、発生を勧めた後、*Ad4BP/SF-1*, *cDmrt-1* の発現を調べた。*Ad4BP/SF-1* は発現が広がったが *cDmrt-1* の発現には変化が無かった (図5) *Wnt4* は *Ad4BP/SF-1* を誘導するシグナルとして働くことが判った。

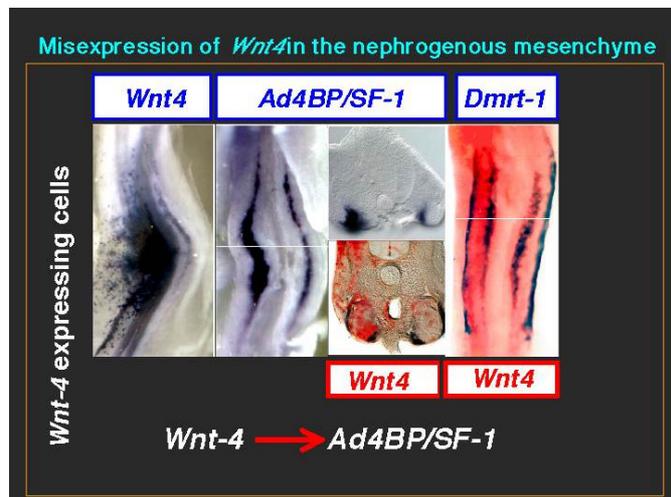


図5 *Wnt4* の異所性発現による *Ad4BP/SF-1*, *Dmrt-1* の変化 *Wnt4* の異所性発現により *Ad4BP/SF-1* は誘導されるが、*Dmrt-1* は誘導されない。

次に、*Fgf9* 産生細胞を同様に移植したところ、*Ad4BP/SF-1*, *cDmrt-1* の発現は広がった (図6)。*Fgf9* は *Ad4BP/SF-1* と *cDmrt-1* を誘導することが判った。さらに、異所性に形成された生殖腺の周りには VASA 抗原陽性の始原生殖細胞が移動してくる。以上の実験は gain of function であるが、loss of function の験を行なうために、FGF9 を特異的に阻害するように、FGF レセプター阻害剤である SU5402 を染み込ませたビーズを 3

日胚の体腔上皮側から移植すると *Ad4BP/SF-1* ならびに *Dmrt-1* の生殖腺における発現が阻害された。

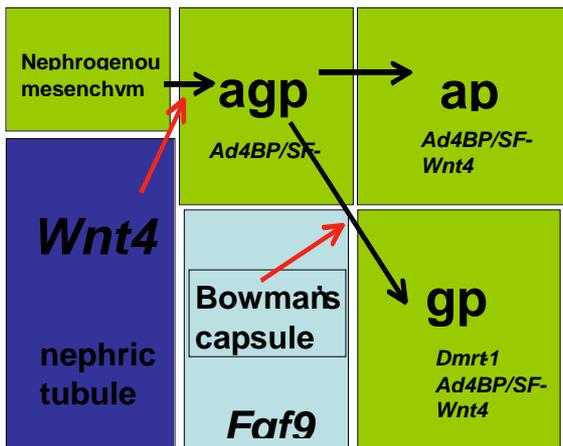
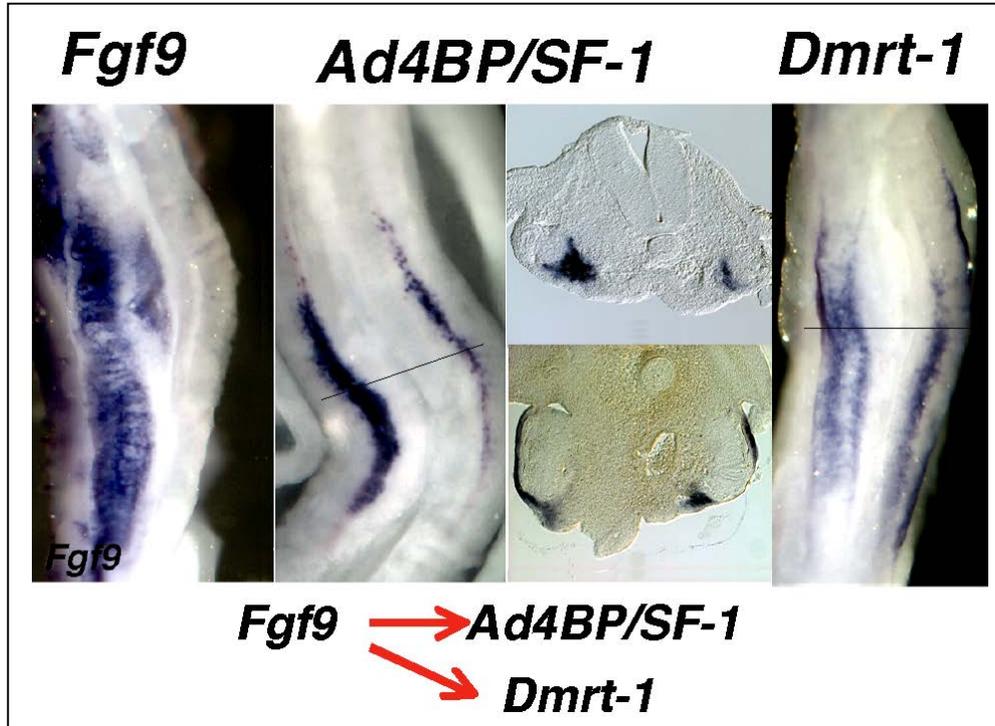


図7 生殖腺と副腎皮質の発生に関わる転写因子と細胞増殖因子 中腎細管 (nephric tubule)からの *Wnt4* のシグナルにより副腎生殖原基細胞が形成される。ボーマン結節からの *Fgf9* のシグナルにより生殖原基細胞が分化してくる。

図7は生殖腺と副腎皮質の発生に関わる転写因子と細胞増殖因子を模式的に表したものである。我々はコンマ様細胞群に発現する *Fgf9*が生殖腺の形成を誘導するシグナルであることを初めて示した。

生殖腺の形態形成におけるレチノイン酸の関与

中腎の腹側に生殖隆起として形成された生殖腺原基は、未分化生殖腺から雌雄生殖腺の形成に至る。生殖腺は主に未分化生殖腺の皮質から卵巣が、髄質からは精巣が分化する。また、鳥類では右側の卵巣が分化の過程で萎縮する。しかしながら、極めて興味深いこの現象の分子的基盤は不明であった。生体内において、レチノイン酸 (RA) はレチナル脱水素酵素 (*Radh2*) により合成され、チトクローム P-450 ファミリーに属する *Cyp26A1* により分解されることで、そのレベルが維持されている。5日胚未分化性腺の皮質と髄質における *Radh2* と *Cyp26A1* の発現を調べたところ、皮質では雌雄差は認められなかったが、*Radh2* は右側に、*Cyp26A1* は左側に発現していた。髄質では左右差も雌雄差も認められなかった。生殖腺の形成に不可欠な転写因子 *Ad4BP/SF-1* の発現を調べると、皮質では RA の存在量と逆相関して、左側に発現していた (図 8)。

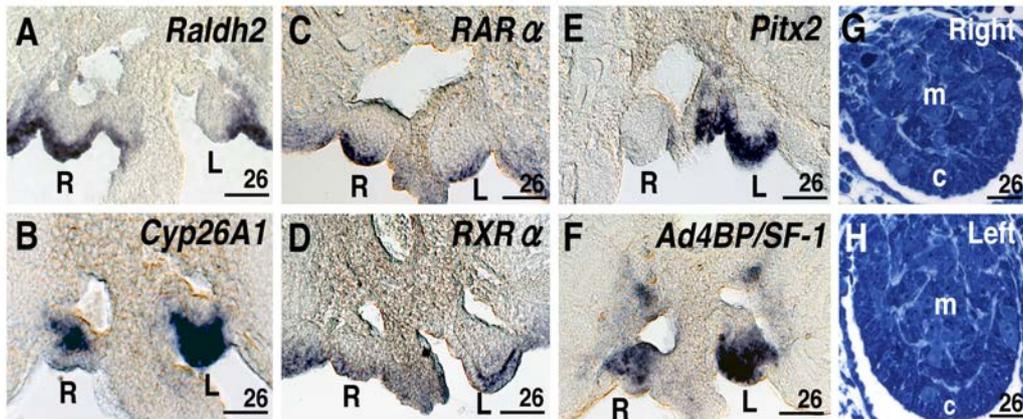


図 8 5日胚では雌雄に無関係に、左の皮質よりも右の皮質でレチノイン酸シグナルが働くことが示唆される。

RA シグナルとの関係を調べるために、RA ビーズを左側の未分化性腺に移植すると *Ad4BP/SF-1* 発現が阻害された。逆に、RA アンタゴニストビーズを右側の未分化性腺に移植すると *Ad4BP/SF-1* の皮質での発現が誘導され、更に興味深いことに卵巣の萎縮がレスキューされた (図 9)。

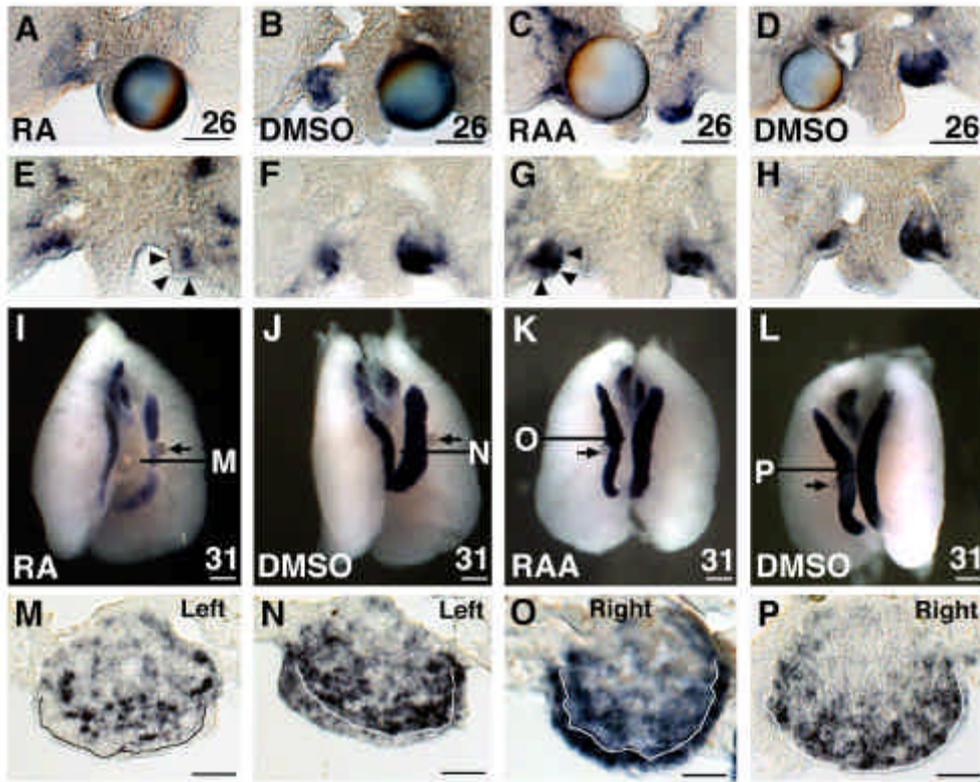


図9 RA bead, RA antagonist bead を3日胚の生殖腺予定領域の体腔上皮直下に移植し、経時的に固定した胚の生殖腺での Ad4BP/SF-1 の発現 A から H までは5日胚, I から P までは7日胚である。

6日胚の性腺の髄質では雌に特異的に *Raldh2*, *RAR α* , *RXR α* が発現し、雌特異的に RA シグナルが働くことが予想される (図10)。

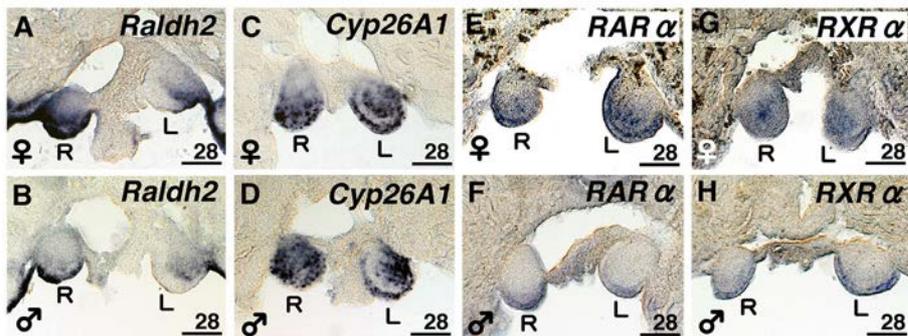


図10 6日胚では雌特異的に髄質にレチノイン酸シグナルが働くことが示唆される。

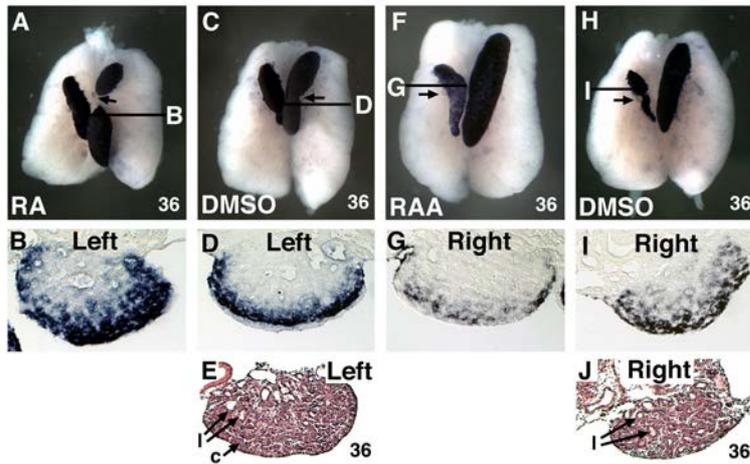


図 1.1 RA bead, RA antagonist bead を 3 日胚の生殖腺予定領域の体腔上皮直下に移植した 10 日胚の生殖腺での *Aromatase* の発現

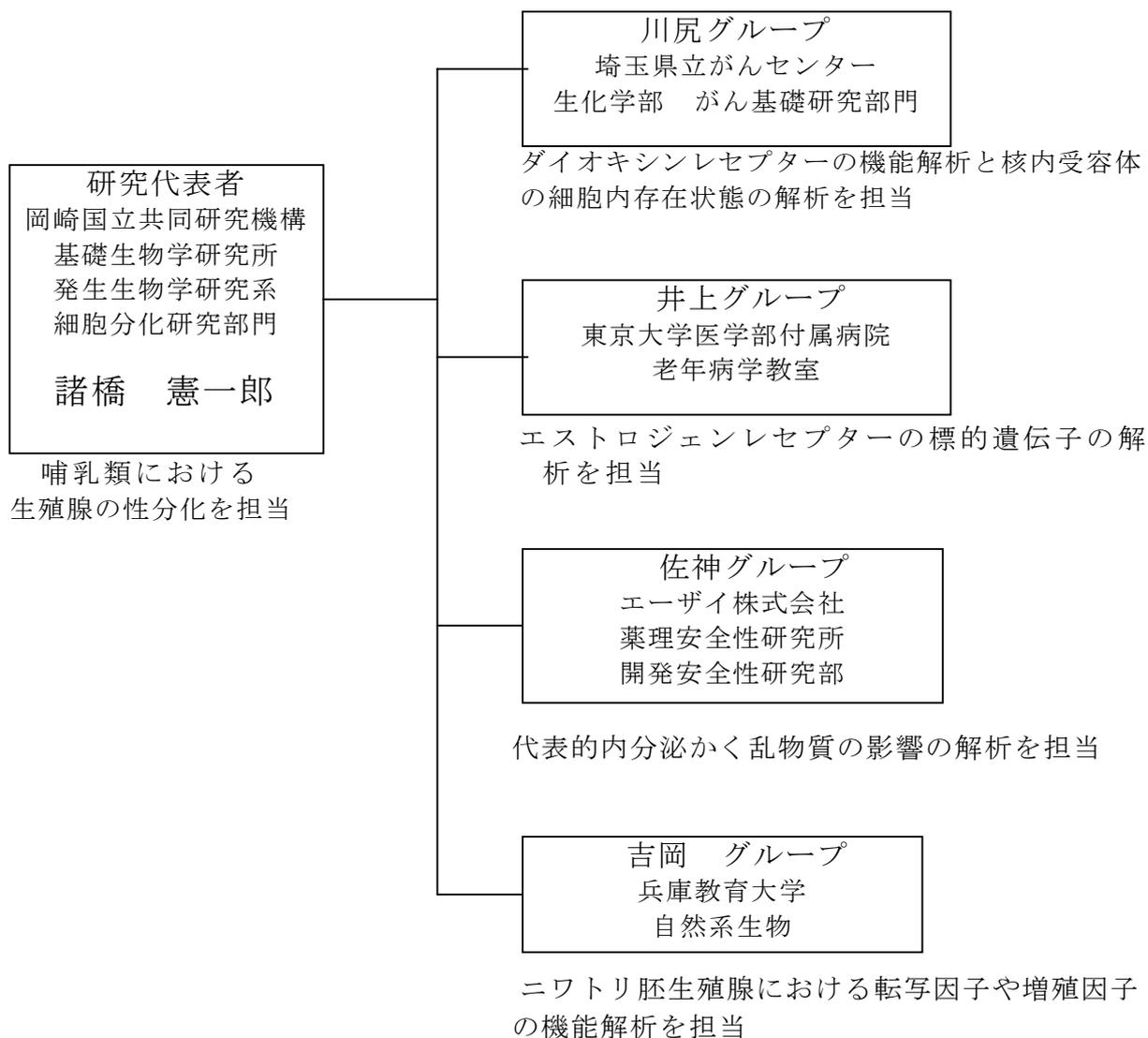
髄質は、エストロゲン合成酵素である *aromatase* が雌特異的に発現し、空洞化を誘導することが inhibitor を用いた実験が報告されている。RA アンタゴニストビーズを雌の右側の未分化性腺に移植することで *aromatase* が阻害され、卵巣の萎縮がまぬがれた。また RA ビーズを左の雌の未分化性腺に移植すると *aromatase* が誘導され、萎縮が促進された。逆に雄の未分化性腺に RA ビーズを移植したが、*aromatase* が誘導されることはなく、髄質が萎縮することもなかった (図 1.1)。髄質に対する RA シグナルは、雌特異的に *aromatase* を誘導することはできるが、雄では更に他の因子を必要とすることが推測される。以上の実験から、RA シグナルは右側皮質での *Ad4BP/SF-1* の発現を抑制することで皮質を退縮させ、同時に雌の髄質における *aromatase* の発現を誘導することで髄質を空洞化させ結果的に萎縮させることが明らかになった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では鳥類の生殖腺の形態形成の機構の一端を明らかにした。特に細胞増殖因子 FGF9 の生殖腺誘導能の発見は、これまでのマウスを用いた遺伝子破壊マウスから得られた結果とは異なるものであったが、loss-of-function と gain-of-function 実験の違いによって、生じたものと考えられれば、これらの結果は矛盾なく理解可能である。また、古くから鳥類の右の卵巣は萎縮することが知られていたが、その分子機構は全く判っていなかった。今回その分子メカニズムを知ることができた。その結果、レチノイン酸が萎縮に関与することが明らかになったが、このことは、RA 作用を持つ化学物質は生殖腺の萎縮を誘導することで生殖腺の形成を乱し、ひいては内分泌攪乱物質として作用する可能性があること示唆するものであった。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2)メンバー表

①諸橋グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
諸橋 憲一郎	基礎生物学研究所	教授	転写因子の定量	平成11年 1月～ 平成15年12月
福井 由宇子	基礎生物学研究所	助手	M33 の機能と生殖腺分化	平成13年 8月～ 平成15年12月
小川 英知	基礎生物学研究所	助手	性分化に関与する転写複合体の精製と解析	平成14年12月～ 平成15年12月
岡 早苗	基礎生物学研究所	技官	ポリクロナール抗体の作成	平成11年 2月～ 平成15年12月
Mohamad Zubair	基礎生物学研究所	CREST 研究員	生殖腺の性分化過程における細胞増殖因子の機能	平成12年 4月～ 平成15年12月
杉山 紀之	基礎生物学研究所	CREST 研究員	トランスジェニックマウスを用いた生殖腺の形成機構の解析	平成12年 4月～ 平成15年12月
水崎 博文	基礎生物学研究所	CREST 研究員	転写因子の機能解析	平成11年 2月～ 平成 15 年 12 月
鈴木 大河	基礎生物学研究所	CREST 研究員	転写因子の機能解析	平成11年12月～ 平成 15 年 12 月
土屋 恵	基礎生物学研究所	日本学術振興会特別研究員	Ad4BP の修飾と翻訳後の機能解析	平成15年 4月～ 平成 15 年 12 月
馬場 崇	基礎生物学研究所	日本学術振興会特別研究員	AhR ノックアウトマウスの生殖腺の解析	平成13年 4月～ 平成15年12月
日下 雅友	基礎生物学研究所	総合研究大学院大学生	免疫染色	平成 12 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
小松 朋子	基礎生物学研究所	総合研究大学院大学生	Ad4BP/SF-1 の修飾と機能調節	平成 13 年 10 月～ 平成15年12月
松山 誠	基礎生物学研究所	総合研究大学院大学生	Vinexin ノックアウトマウスの作成と解析	平成 13 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
佐藤 優子	基礎生物学研究所	CREST 研究補助員	生殖腺の形成機構の解析	平成 15 年 4 月～ 平成 15 年 12 月

嶋 雄一	基礎生物学研究所	特別共同研究学生	Hox 遺伝子の生殖腺で機能解析	平成 12 年 4 月～平成 15 年 12 月
大脇 亜希子	基礎生物学研究所	CREST 技術員	遺伝性疾患の解析	平成 13 年 4 月～平成 15 年 12 月
篠原 結子	基礎生物学研究所	CREST 技術員	ノックアウトマウスの作製	平成 11 年 4 月～平成 12 年 10 月 平成 14 年 4 月～平成 15 年 12 月
河和 寛恵	基礎生物学研究所	CREST 技術員	In situ hybridization による解析	平成 15 年 1 月～平成 15 年 12 月
山中 妙	基礎生物学研究所	CREST 研究補助員	事務	平成 14 年 10 月～平成 15 年 12 月
戸田 勝己	高知医科大学	助教授	内分泌攪乱物質のモニターマウスの作製	平成 15 年 4 月～平成 15 年 12 月
琴村 直恵	基礎生物学研究所	非常勤研究員	生殖腺の形成機構の解析	平成 11 年 2 月～平成 11 年 3 月
坪井 久恵	基礎生物学研究所	技術補佐員	免疫染色	平成 11 年 2 月～平成 11 年 6 月
石原 悟	基礎生物学研究所	助手	遺伝子発現調節機構の解析	平成 11 年 2 月～平成 14 年 7 月
河邊 顕	基礎生物学研究所	CREST 研究員	遺伝子発現調節	平成 11 年 2 月～平成 12 年 7 月
向井 徳男	基礎生物学研究所	特別協力研究員	転写因子 mRNA の微量定量	平成 11 年 2 月～平成 13 年 3 月
井村 朋子	基礎生物学研究所	CREST 研究補助員	事務	平成 11 年 2 月～平成 13 年 3 月
武田 美江	基礎生物学研究所	部門補助員	各種転写因子の定量分析	平成 11 年 4 月～平成 12 年 7 月
飯塚 晶子	基礎生物学研究所	非常勤研究員	脳の性分化機構の解析	平成 11 年 4 月～平成 13 年 3 月
下野 明彦	基礎生物学研究所	助手	ノックアウトマウスの作製	平成 11 年 4 月～平成 14 年 3 月
中村 直人	基礎生物学研究所	CREST 研究員	生殖腺の形成機構の解析	平成 11 年 9 月～平成 13 年 3 月
杉浦 未央	基礎生物学研究所	部門補助員		平成 12 年 7 月～平成 13 年 5 月
有馬 達也	基礎生物学研究所	特別共同研究学生	胎仔生殖腺の培養による性分化	平成 13 年 4 月～平成 14 年 3 月

堂園 朱美	基礎生物学研究所	CREST 研究補助員	事務	平成13年10月～ 平成14年9月
-------	----------	----------------	----	----------------------

②川尻グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
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	内分泌攪乱物質と核内レセプターの相互作用の解析	平成11年2月～ 平成15年12月
生田 統悟	埼玉県立がんセンター生化学部 がん基礎研究部門	主任	ダイオキシンレセプターによるシグナル伝達の解析	平成11年2月～ 平成15年12月
篠田 なほみ	埼玉県立がんセンター生化学部 がん基礎研究部門	CREST 研究補助員	分子生物学的実験補助	平成11年5月～ 平成15年12月
宮浦 陽子	埼玉県立がんセンター生化学部 がん基礎研究部門	CREST 研究補助員	細胞培養	平成11年5月～ 平成15年12月
篠永 文子	埼玉県立がんセンター生化学部 がん基礎研究部門	CREST 研究補助員	研究データの収集・解析	平成12年4月～ 平成15年12月
渡辺 潤子	埼玉県立がんセンター生化学部 がん基礎研究部門	主任	血液細胞におけるダイオキシンレセプターの機能の解析	平成11年2月～ 平成14年3月
角 純子	埼玉県立がんセンター生化学部 がん基礎研究部門	主任研究員	血液細胞におけるダイオキシンレセプターの機能の解析	平成11年2月～ 平成14年3月

③井上グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
井上 聡	東京大学 医学部附属病院 老年病学教室	講師	性分化および性機能におけるエストロゲン受容体の役割	平成11年4月～ 平成15年12月
浦野 友彦	東京大学 医学部附属病院 老年病学教室	教務職員	性分化および性機能におけるエストロゲン受容体の役割	平成11年4月～ 平成15年12月
星野 眞二郎	東京大学 医学部附属病院 老年病学教室	教務職員	性分化および性機能におけるエストロゲン受容体の役割	平成14年4月～ 平成15年12月

藤田 雅代	東京大学 医学部附属病院 老年病学教室	大学院生	性分化および性 機能におけるエ ストロゲン受容 体の役割	平成12年4月～ 平成15年12月
小川 純人	東京大学 医学部附属病院 老年病学教室	教務職員	性分化および性 機能におけるエ ストロゲン受容 体の役割	平成12年4月～ 平成14年3月

④佐神グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
本岡 覚	エーザイ株式会社 薬理安全性研究所	部長	内分泌攪乱物質 の投与とその影 響の解析	平成12年10月～ 平成15年12月
百々 哲史	エーザイ株式会社 薬理安全性研究所	研究員	内分泌攪乱物質 の投与とその影 響の解析	平成11年 4月～ 平成15年12月
佐神 文郎	エーザイ株式会社 薬理安全性研究所	部長	内分泌攪乱物質 の投与とその影 響の解析	平成12年10月～ 平成13年 3月

⑤吉岡グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
吉岡 秀文	兵庫教育大学 自然系生物	助教授	ニワトリの性分 化機構	平成12年 4月～ 平成15年12月
山野井 恵	兵庫教育大学 自然系生物	助手	マウス性分化に 関与する転写因 子(WT1, GATA4, Emx-2, Sox9)の 機能解析	平成12年 4月～ 平成15年12月
石丸 善康	兵庫教育大学 自然系生物	CREST 研究補助員	ニワトリの性分 化機構	平成14年 4月～ 平成15年12月
有吉 悦子	兵庫教育大学 自然系生物	CREST 研究補助員	マウス性分化に 関与する転写因 子(WT1, GATA4, Emx-2, Sox9)の 機能解析	平成13年 4月～ 平成13年 6月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成14年 10月18日 -20日	Molecular Mechanisms of Sex Differentiation	岡崎国立共同研究機構 岡崎コンファレンスセンター	国外30名 国内60名	近年の分子生物学や発生生物学、臨床医学を基盤とする研究は、性決定を制御する遺伝子の同定やその機能の解析を通じ、性決定を支える分子メカニズムを明らかにしてきた。本シンポジウムでは、魚類から哺乳類をモデル動物として行われているこれらの研究の中から質の高い研究を展開している国内外の研究者を招待講演者として迎えた。このような研究者が一同に会し、その成果を発表・討論することで、その現状を認識するとともに、本研究分野の今後の方向性を探ることを目的に行われた。

(2) 招聘した研究者等

なし

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (海外36件)

- 1, Activation of 1. LXXLL motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1.
Suzuki T, Kasahara M, Yoshioka H, **Morohashi K** and Umesono K
Mol. Cell. Biol. **23**, 238-249, 2003
- 2, *Dax-1* gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad.
Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A and **Morohashi K**
Mol. Endocrinol. **17**, 507-519, 2003
- 3, NR boxes of Dax-1 participate both in Ad4BP/SF-1 dependent nuclear import and in cytoplasmic retention of Dax-1.
Kawajiri K, Ikuta T, Suzuki T, Kusaka M, Watanabe J, Muramatsu M, Fujieda K, Tachibana M and **Morohashi K**
Mol. Endocrinol. **17**, 994-1004, 2003
- 4, Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation.
Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, **Morohashi K**, Capel B, Weiss J and Jameson JL
Development **130**, 1029-1036, 2003
- 5, Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR.
Kawana, K., Ikuta, T., Kobayashi, Y., Gotoh, O., Takeda, K. and **Kawajiri, K.**
Mol. Pharmacol. **63**, 524-531, 2003
- 6, Related articles, links expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats.
Okada A, Ohta Y, **Inoue S**, Hiroi H, Muramatsu M and Iguchi T
J Mol Endocrinol **30**, 301-315, 2003
- 7, EBAG9/RCA51 expression and its prognostic significance in prostatic cancer.
Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M and **Inoue S**
Int J Cancer **106**, 310-315, 2003
- 8, Association of Tumor Necrosis Factor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density.
Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y and **Inoue S**
Geriatric Gerontol Int **3**, 101-105, 2003
- 9, Mutations of *Arx/ARX* cause abnormal migration and differentiation of GABAergic interneurons and abnormal development of testes in mice, and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans
Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Omichi K, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M and **Morohashi K**
Nature Genet. **32**, 359-369, 2002
- 10, Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex.
Mukai T., Masatomo Kusaka M, Kawabe K, Goto K, Nawata H, Fujieda K and **Morohashi K**
Genes Cells **7**, 717-729, 2002
- 11, *sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation.
Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, Araki K, **Morohashi K** and Ozato K
Mol. Reprod. Dev. **63**, 5-16, 2002

- 12, Activation of cAMP-dependent Protein Kinase increases the protein level of Steroidogenic Factor-1.
Asoy R, Mellgren G, **Morohashi K** and Lund J
Endocrinol. **143**, 295-303, 2002
- 13, Characterization of the LxxLL motif in aryl hydrocarbon receptor: effects on subcellular localization and transcriptional activity.
Ikuta, T., Watanabe, J., and **Kawajiri, K.**
J. Biochem., **131**, 79-85, 2002
- 14, Changes in ontogenetic expression of estrogen receptor alpha and not of estrogen receptor beta in the female rat reproductive tract.
Okada A, Ohta Y, Buchanan DL, Sato T, **Inoue S**, Hiroi H, Muramatsu M and Iguchi T
J Mol Endocrinol **28**, 87-97, 2002
- 15, Efp targets 14-3-3sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth.
Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y and **Inoue S**
Nature **417**, 871-875, 2002
- 16, Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts.
Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsui O, Ouchi Y and **Inoue S**
Biochem Biophys Res Commun **299**, 222-228, 2002
- 17, FGF10 is a mesenchymally derived stimulator for epidermal development in the chick embryonic skin
Tao H., Yoshimoto Y., **Yoshioka H.**, Nohno, T., Noji S. and Ohuchi H.
Mechanisms of Development **116**, 39-49, 2002
- 18, Expression profiles of COUP-TF, DAX-1 and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: Possible implications in steroidogenesis.
Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, **Morohashi K**, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I and Saruta T.
Mol. Genet. Metab. **74**, 206-216, 2001
- 19, Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis implies their closely related and distinct functions.
Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S and **Morohashi K**
Develop. Dynam. **220**, 363-376, 2001
- 20, Differential expression of estrogen receptor beta (ER beta) and its C-terminal truncated splice variant of ER beta cx as prognostic predictors in human prostatic cancer.
Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M and **Inoue S**
Biochem Biophys Res Commun **289**, 692-699, 2001
- 21, Possible involvement of the p57(Kip2) gene in bone metabolism
Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Toyoshima H, Ouchi Y and **Inoue S**
Biochem. Biophys. Res. Commun. **269**, 422-426, 2000
- 22, Identification of Novel First Exons in Ad4BP/SF-1 (NR5A1) Gene, and Their Tissue- and Species-Specific Usage.
Kimura R, Yoshii H, Nomura M, Kotomura N, Mukai T, Ishihara S, Ohba K, Yanase T, Gotoh O, Nawata H and **Morohashi K**
Biochem. Biophys. Res. Commun. **278**, 63-71, 2000
- 23, Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor.
Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y., and **Kawajiri, K.**
J. Biochem. **127**, 503-509, 2000
- 24, Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer.
Watanabe, J., Simada, T., Gillam, E.M.J., Ikuta, T., Suematsu, K., Higashi, Y., Gotoh, O., and **Kawajiri, K.**
Pharmacogenetics, **10**, 25-33, 2000

- 25, Expression of androgen receptor in mouse eye tissues.
Tachibana, M., Kobayashi, Y., Kasukabe, T., **Kawajiri, K.** and Matsushima, Y.
Invest. Opth. Vis. Sci. **41**, 64-66, 2000
- 26, Population-based mapping of pulmonary adenoma susceptibility 1 locus.
Dragani, T.A., Hirohashi, S., Juji, T., **Kawajiri, K.**, Kihara, M., Ono-Kihara, M., Manenti, G., Nomoto, T., Sugimura, H., Genka, K., Yokota, J., Takahashi, T., Mitsudomi, T., and Nagao, M.
Cancer Res., **60**. 5017-5020, 2000
- 27, Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways.
Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M and **Inoue S**
Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways.
J Biol Chem **275**, 21372-21379, 2000
- 28, Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone mineral density.
Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y and **Inoue S**
Biochem Biophys Res Commun **269**, 537-541, 2000
- 29, Possible involvement of p57Kip2 gene in the bone metabolism.
Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y and **Inoue S**
Biochem Biophys Res Commun **269**, 422-426, 2000
- 30, Efp as a primary estrogen responsive gene in human breast cancer.
Ikeda K, Orimo A, Higashi Y, Muramatsu M and **Inoue S**
FEBS Lett **472**, 9-13, 2000
- 31, Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure
Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y and **Inoue S**
J Hum Genet **45**, 327-330, 2000
- 32, An estrogen receptor beta (ER beta) Isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ER alpha and ER beta.
Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, Goto W, Hosoi T, Tsutsumi O, Muramatsu M, Ouchi Y
Biochem Biophys Res Commun **279**, 814-819, 2000
- 33, *Dax-1* as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. Kawabe K, Shikayama T, Tsuboi H, Oka S, Oba K, Yanase T, Nawata H and **Morohashi K**
Mol. Endocrinol. **13**, 1267-1284, 1999
- 34, Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants.
Simada, T., Watanabe, J., **Kawajiri, K.**, Sutter, T.R., Guengerich, F.P., Gillam, E.M.J., and Inoue, K.
Carcinogenesis **20**, 1607-1613, 1999
- 35, Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts.
Inoue S, Urano T, Ogawa S, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y and Masami Muramatsu M
Biochem Biophys Res Commun, **261**, 412-418, 1999
- 36, Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts
Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, Hoshino S, Fujita M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y and **Inoue S**
Biochem Biophys Res Commun **260**, 122-126, 1999

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 65件、海外7件) (国内)

諸橋グループ

- 1, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
性分化機構の解明
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月22日
- 2, Morohashi K, Zubair M, Shima Y, Mizusaki H, Sugiyama N, Ishimaru Y, Yoshioka H, Katoh-Fukui Y The 3rd Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice
MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING GONAD DIFFERENTIATION
Oct 2-4th, 2003, Kumamoto
- 3, Yoshioka, H.¹, Ishimaru Y.¹, Sugiyama N.², Kasahara M¹ and Morohashi K²
(Hyogo University of Teacher Education¹, NIBB/CREST²)
Mesonephric FGF9 is the initiation signal for gonad formation in chick
Workshop on Molecular Steroidogenesis (IV), Bath, United Kingdom, April 24-27, 2003
- 4, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
生殖腺・副腎の発生分化メカニズム
第26回日本医学会総会、福岡、2003年4月4-6日
- 5, Morohashi K., Zubair M., Mizusaki H., Suzuki T., Sugiyama N., Yoshioka H., Katoh-Fukui Y.
Molecular Mechanisms underlying steroidogenic tissue differentiation
The 2nd international nuclear receptor meeting in Japan, Osaka, Feb 14-16, 2003
- 6, 諸橋 憲一郎^{1,2}、杉山 紀之^{1,2}、鈴木 大河^{1,2}、水崎 博文^{1,2}、笠原 恵^{2,3}、吉岡 秀文^{2,3}、Mohamad Zubair^{1,2}、生田 統悟^{2,4}、川尻 要^{2,4}、福井 由宇子^{1,2} (基生研¹、CREST²、兵庫教育大学³、埼玉県立がんセンター⁴)
生殖腺・副腎皮質の形成を支える核内受容体の機能調節機構
第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002年12月12日
- 7, Morohashi K, Zubair M, Mizusaki H, Suzuki T, Sugiyama N, Yoshioka H, Kitamura K and Katoh-Fukui Y
Plenary lecture, Molecular Mechanisms underlying Steroidogenic Tissue Differentiation
The 11 th International Congress on Hormonal Steroid/7 th International Congress on Hormones and Cancer (Fukuoka, Japan) Oct. 21-25, 2002
- 8, Morohashi K, H. Mizusaki, N. Sugiyama, T. Fukuda, M. Kusaka, T Suzuki, H. Yoshioka, Y. Katoh-Fukui
Molecular Mechanism underlying Gonad Differentiation.
The 48 th NIBB conference “Molecular Mechanisms of Sex Differentiation” (Okazaki, Japan) Oct. 18-20, Organizer
- 9, Morohashi K, M. Zubair, H. Mizusaki, T Suzuki, N. Sugiyama, H. Yoshioka, Y. Katoh-Fukui
Molecular Mechanism underlying Gonad Differentiation, Invited Speaker at symposium “Transgenic and Gene Knock Out”
The 12 th Asia-Oceania Congress of Endocrinology (Taipei, Taiwan) Sep. 20-24, 2002
- 10, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
生殖腺形成に不可欠な核内受容体とその関連因子
シンポジウム「核内受容体の新展開」
第75回日本内分泌学会、大阪、2002年6月28-30日
- 11, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
性決定を支える役者達
第765回 科学ゼミナール、東京、2002年4月20日
- 12, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)

- 生殖腺の性分化と核内受容体
第1回ステロイドホルモンを考える会、東京、2002年3月15-16日
- 13, Morohashi K, Taiga Suzuki, Hirofumi Mizusaki and Kaname Kawajiri
Functions of Orphan Nuclear Receptors in Gonad Differentiation
The 1st International Nuclear Receptor Meeting in Japan (Kyoto) March 1-3,2002
 - 14, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
哺乳類の性決定機構に關与する転写因子の機能
第4回「生物多様性」懇談会、京都、2002年2月18日
 - 15, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
性分化の分子メカニズム、第2回旭川ウィンターカンファレンス、旭川、2002年2月16日
 - 16, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
脊椎動物における性決定及び性分化の比較生物学
Function of Nuclear Receptors, Ad4BP/SF-1 and Dax-1, in mammalian gonad differentiation
第7回「性と生殖」シンポジウム、東京、2002年2月9日
 - 17, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
生殖腺の分化を支える分子的基盤—転写調節因子と細胞増殖因子
第5回 日本小児内分泌学会、東京、2001年10月5日
 - 18, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
生殖腺の性分化—精巣と卵巣の構築を支える役者達
内分泌かく乱物質 CREST 領域シンポジウム、東京、2001年9月19日
 - 19, H. Yokoi, K. Morohashi, T. Kobayashi, M. Tanaka, Y. Nagahama, Y. Wakamatsu, H. Takeda, K. Araki and K. Ozato
Evolutional significance of medaka sox9 in gonad and cartilage development
34th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July 8-12, 2001
 - 20, Y. Katoh-Fukui, M. Kusaka, S. Ina, S. Okamoto, T. Kamiya and K. Morohashi
Expression analyses of male and gonad specific genes in XY sex-reversal M33 mutant mouse.
34th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July 8-12, 2001
 - 21, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
生殖腺の形成を支える転写因子と細胞増殖因子
第74回日本内分泌学会、サテライトシンポジウム、第2回ウーマンヘルスフォーラム横浜、2001年6月30日
 - 22, Morohashi K(NIBB/CREST), K. Kawabe, T. Suzuki, H. Mizusaki, H. Yoshioka
Transcriptional regulation in differentiating gonads
14th International Congress of Developmental Biology, Symposium 'differentiation of sexes', Kyoto, July 8-12,2001 Invited speaker/Session organizer
 - 23, Morohashi K (NIBB/CREST), H. Yoshioka, K. Kawajiri
"Organogenesis of Gonads and Trnascrption Factors"
The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting, Fifth Shionogi Transpasific Sympojium-Frontiers in Reproductive Endocrinology, Invited speaker
Denver, USA, June 20-23, 2001
 - 24, Morohashi K (NIBB/CREST)
"Concerted Regulation of gonad differentiation by transcription Factors and Growth Factors"
Novartis Foundation Sympojium No. 244, The Genetics and Biology of Sex Determination, London, UK, April 30-May 3, 2001, Invited speaker
 - 25, Morohashi K (NIBB/CREST)
"Transcription Factors implicated in Gonad Differentiation", Recent Progress in Endocrine Disruptor Research, The 45th International NIBB Conference, Okazaki, March 3-5, 2001, Invited speaker
 - 26, Morohashi K (NIBB/CREST)

Transcription Factors supporting Gonad Sex Differentiation
International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors 2000 (Yokohama, Japan) Dec. 16-18, Invited speaker

- 27, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)、中村直仁、鈴木大河、向井徳男、難波 聡、水崎 博文、河辺 顕、藤井 義明
生殖腺の性分化と核内受容体の機能
第 72 回日本生化学会、京都市、2000 年 10 月 11-14 日
- 28, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
生殖腺の性分化と遺伝子発現調節
第 6 回 山口県生殖内分泌研究会、山口、2000 年 8 月 10 日
- 29, Morohashi K (NIBB/CREST)
Adrenocortical and Gonadal Differentiation Regulated by
Transcription Factors, Ad4BP/SF-1 (NR5A1) and Dax-1 (NR0B1)
9th Adrenal Cortex Conference, トロント カナダ、2000 年 6 月 17-20 日
- 30, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
性分化の遺伝子制御
第 73 回 日本内分泌学会、京都、2000 年 6 月 16 日
- 31, 諸橋憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)、河辺顕、水崎博文、鈴木大河、
中村直仁、笠原 恵、生田統悟、石原 悟、吉岡秀文、梅園和彦、川尻要
Transcriptional Regulation in Differentiating Gonads
Second International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination ハワイ、
2000 年 4 月 10-14 日
- 32, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
性分化の分子メカニズム
第 4 回環境ホルモン学会講演会「性分化の生物学」、東京 2000 年 2 月 28 日
- 33, Morohashi K (NIBB/CREST)
Expression and Function of Transcription Factors Implicated in Differentiation of the
Gonads International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors '99 (Kobe,
Japan) Dec. 9-11, 1999, Invited speaker
- 34, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
生殖腺の分化に関与する転写因子の発現と機能
環境ホルモンシンポジウム、神戸、1999 年 12 月 9 日
- 35, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)、河辺 顕、向井 徳男、水崎 博文、
石原 悟
生殖腺形成過程におけるオーファンレセプターの機能
第 22 回日本分子生物学会、福岡、1999 年 12 月 7-10 日
- 36, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
性分化の分子学的メカニズム
泌尿器学会、大阪、1999 年 11 月 18 日
- 37, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
特別講演「生殖腺の分化を支える核内レセプター」
第 2 回生殖毒性シンポジウム、名古屋、1999 年 11 月 4 日
- 38, Morohashi K (NIBB/CREST)
Transcription factors implicated in the gonadal and adrenocortical development
Japanese-Hungarian Binational Symposium on "Developmental and environmental
control of cell differentiation" (Szeged, Hungary) Oct. 14-15, 1999
- 39, Morohashi K (NIBB/CREST)
Transcription factors implicated in the gonadal and adrenocortical steroidogenesis
The 4th International Symposium on Molecular Steroidogenesis (Nara) Invited Speaker,
Aug. 25-28, 1999
- 40, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
特別講演「性分化のメカニズム」

第 8 回産婦人科内分泌懇話会、千葉、1999 年 7 月 31 日

- 41, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
第 18 回日本アンドロロジー学会 (東京) 1999 年 7 月 2-3 日
招請講演「生殖腺の分化を支えるメカニズム」諸橋憲一郎
- 42, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
日本学術会議共催シンポジウム
「生殖腺形成過程における内分泌攪乱物質の影響」
第 72 回日本内分泌学会 (横浜) 1999 年 5 月 31 日～4 月 2 日
- 43, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
生殖腺の形成を制御する核内レセプター
第 25 回 日本医学会総会 (東京)、シンポジウム「核内受容体と個体発生」
1999 年 4 月 2-4 日

川尻グループ

- 44, 川尻 要、生田 統悟 (埼玉県立がんセンター 生化学部 がん基礎研究部門/CREST)
AhR の細胞内局在の調節機構
フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台、2003 年 10 月
- 45, 川名克芳、生田統悟、小林康人、後藤 修、武田 健、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/CREST)
核内受容体 SXR の細胞質・核間輸送の分子機構
第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月
- 46, Kawajiri, K. and Ikuta T.
Signal transduction of chemicals mediated by aryl hydrocarbon receptor.
Toxicogenomics International Forum 2003. Tokyo, Japan, October, 2003
- 47, Kawana, K., Ikuta, T., Takeda, K., and Kawajiri, K.
Molecular mechanism of nuclear translocation of the nuclear orphan receptor SXR.
14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Japan (Sapporo)
July, 2002
- 48, Ikuta, T. and Kawajiri, K.
Regulation of subcellular localization of aryl hydrocarbon receptor.
14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Japan (Sapporo)
July, 2002
- 49, 諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)、吉岡 秀文 (兵庫教育大学/CREST)、
川尻 要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
性の分化を支える遺伝子発現調節
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 50, 川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)、生田統悟、鈴木大河、日下雅友、渡辺潤子、藤枝憲二、橘正芳、諸橋憲一郎
Ad4BP/SF-1 の suppressor である DAX-1 の核外輸送の変異と先天性副腎低形成
第 3 回環境ホルモン学会、横浜、2000 年 12 月
- 51, 川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)、生田統悟、鈴木大河、日下雅友、渡辺潤子、諸橋憲一郎
生殖腺の分化を制御する核内受容体の細胞質・核間輸送
第 73 回日本生化学会大会、横浜、2000 年 10 月
- 52, 渡辺潤子、島田 力、川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
チトクローム P450 の遺伝子多型と発癌感受性について : CYP1B1 を中心として
第 27 回日本トキシコロジー学術年会、横浜、2000 年 6 月
- 53, 川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)、生田統悟
ダイオキシンの毒性発現のメカニズム
第 72 回日本生化学会大会
1999 年 10 月、横浜

- 54, Kawajiri, K., Watanabe, J., and Ikuta, T.
Mechanism of signal transduction mediated by aryl hydrocarbon receptor.
11th International Conference on Cytochrome P450.
August-September, 1999, Japan (Sendai)
- 55, Shimada, T., Watanabe, J., Kawajiri, K., Gillam. E.M.J., and Inoue, K.
Human CYP1B1 and chemical carcinogenesis.
11th International Conference on Cytochrome P450.
August-September, 1999, Japan (Sendai)
- 56, 川尻 要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
Aryl hydrocarbon receptor (AhR) と内分泌攪乱物質
第 72 回日本内分泌学会学術総会、横浜、1999 年 6 月 1 日

井上グループ

- 57, 井上聡 [シンポジウム] 男性ホルモンと骨- 女性ホルモン受容体遺伝子改変動物の骨における雌雄差- 第 5 回日本骨粗鬆症学会、福岡、2003 年 10 月 10 日
- 58, 井上聡 [シンポジウム] 標的遺伝子からみたエストロゲン作用メカニズム
第 26 回日本医学会総会、福岡、2003 年 4 月 6 日
- 59, 井上聡 [シンポジウム] ホルモンと長寿：エストロゲンの作用の分子機序と骨代謝、脳機能における役割、第 100 回日本内科学会講演会、福岡、2003 年 4 月 1-3 日
- 60, Inoue S [Symposium] Estrogen responsive genes and breast cancer, International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2003, 2003.3.12-13
- 61, Inoue S [Symposium] Role of estrogen responsive RING finger protein in growth control of breast cancer. 11th International Congress on Hormonal Steroids and 7th International Congress on Hormones and Cancer, Fukuoka, Japan, 2002. 10. 21-25
- 62, Inoue S [Workshop] Differential growth control of cells via multiple estrogen-responsive pathways, 12th International Vascular Biology Meeting, Karuizawa, Japan, 2002.5.1
- 63, 井上聡 [シンポジウム] エストロゲン受容体標的遺伝子とがん、第 59 回日本癌学会、横浜、2000 年 10 月 4 日
- 64, 清水 省志^{1,2}、津久井 通¹、久武 幸司¹、畑 俊夫²、村松 正寛³、井上 聡^{1,3,4,5}
(1.埼玉医科大学第二生化、2.埼玉医科大学産婦人科 3.埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 4.東京大学医学部老年病科 5.CREST)
エストロゲン下流応答遺伝子 EFPE と BAG9 の機能解析、第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、2001 年 12 月 12 日
- 65, 井上 聡 (東京大学/CREST) エストロゲン標的遺伝子の同定とその機能解析、第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、2001 年 12 月 12 日
- 66, 井上 聡 (東京大学/CREST)
エストロゲンの生理作用とその病態における役割
第 9 回日本ステロイドホルモン学会、東京、2001 年 11 月 7 日
- 67, 井上聡、小川純人、大内尉義：[シンポジウム] 血管のエストロゲン受容体とその生体機能、第 74 回日本内分泌学会、横浜、2001 年 6 月 29 日-7 月 1 日
- 68, 井上聡 [シンポジウム] エストロゲンレセプターのドミナントネガティブ体と生体機能、第 73 回日本生化学会、横浜、2000 年 10 月 14 日
- 69, 井上 聡 (東京大学/CREST)、折茂 彰、小川 純人、大内 尉義、村松 正実
エストロゲン受容体とその標的遺伝子の生体機能
第 72 回日本生化学会大会、横浜市、1999 年 10 月 7 日
- 70, 井上聡、大内尉義、村松正實：[シンポジウム] ステロイドホルモン標的遺伝子、第 25 回日本医学会総会、東京、1999 年 4 月 2-6 日

吉岡グループ

- 71, Yoshioka H., Ishimaru Y., Sugiyama N., Kasahara M. and Morohashi K.

Mesonephric *Fgf9* is the Initiation Signal for Gonadal Formation in Chick
第76回日本生化学会大会、横浜、2003年10月

72, Yoshioka H.

Signaling and Transcriptional control of gonadal organogenesis in chick embryos
48th NIBB Conference, Molecular Mechanisms of sex differentiation
oct18-20, 2002, Okazaki, Japan

② ポスター発表 (国内 42件、海外 8件)

諸橋グループ

- 1, 戸田 勝己 (高知大学医学部/CREST)
エストロゲン合成酵素遺伝子欠損マウスを用いた内分泌攪乱作用を有する化学物質の評価法の開発
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月21-22日
- 2, 福井 由宇子・大脇 亜希子・日下 雅友・篠原 結子・諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
性腺形成過程におけるマウスポリコム M33 の機能解析
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月21-22日
- 3, Mohamad Zubair・岡 早苗・河和 寛恵・Fatchiyah・石原 悟・諸橋 憲一郎
(基礎生物学研究所/CREST)
マウス Ad4BP/SF-1 の副腎特異的なエンハンサーの同定および分子機構の解析
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月21-22日
- 4, 鈴木 大河・笠原 恵・吉岡 秀文・梅園 和彦・諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST・兵庫教育大学・京都大学)
Dax-1 による Ad4BP/SF-1、LRH-1 の活性調節機構
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月21-22日
- 5, 杉山紀之^{1,2}、福田隆之^{1,3}、日下雅友^{1,4}、緒方勤⁵、近藤郁子³、加藤光広⁶、William B. Dobyns⁶、北村邦夫⁷、諸橋憲一郎^{1,2,4} (1 基生研、2 CREST、3 愛媛大学、4 総研大、5 慶應大、6 シカゴ大、7 三菱生命研)
マウス雄胎生生殖腺における Arx の機能とヒト遺伝病 XLAG における ARX 遺伝子の変異解析
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月21-22日
- 6, 水崎博文 (基礎生物学研究所、CREST)、河辺顕 (基礎生物学研究所、CREST)、向井徳男 (基礎生物学研究所)、有吉悦子 (兵庫教育大学)、笠原恵 (兵庫教育大学、CREST)、吉岡秀文 (兵庫教育大学、CREST)、Amanda Swain (Institute of Cancer Research, London)、諸橋憲一郎 (基礎生物学研究所、CREST)
Dax-1 遺伝子の転写制御における Wnt シグナルと Ad4BP/SF-1 の相互作用
内分泌かく乱物質 CREST 第4回領域シンポジウム、東京、2003年10月21-22日
- 7, 杉山 紀之^{1,2}、日下 雅友³、福田 隆之⁴、北村 邦夫⁵、諸橋 憲一郎^{1,2} (基生研¹、CREST²、総研大³、岡山大⁴、三菱生命研⁵)
生殖腺におけるマウス Arx 遺伝子の発現と機能解析、日本発生生物学会第36回大会、札幌、2003年6月11-13日
- 8, Y. Katoh-Fukui (NIBB/CREST), Y. Handa, A. Owaki, M. Kusaka and K. Morohashi
Genetic interaction between M33 and Ad4BP/SF-1 in the adrenal, splenic and gonadal development.
The Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination
Kona, Hawaii, March 24-28, 2003.
- 9, N. Sugiyama (NIBB/CREST), T. Fukuda, M. Kusaka, T. Ogata, I. Kondo, M. Kato, W.B. Dobyns, K. Kitamura and K. Morohashi
Functional analysis of Arx in male gonad and mutational analysis of the ARX gene in XLAG patients.
The Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination
Kona, Hawaii, March 24-28, 2003.
- 10, H Mizusaki (NIBB/CREST), K Kawabe, T Mukai, E Ariyoshi, M Kasahara, H Yoshioka,

A Swain and K Morohashi

Dax-1 gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad.

The Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination
Kona, Hawaii, March 24-28, 2003.

- 11, 鈴木大河 (基生研、CREST)、笠原恵、吉岡 秀文、梅園和彦、諸橋 憲一郎
Dax-1 による Ad4BP/SF-1, LRH-1 の活性調節機構、第 25 回日本分子生物学会、
横浜、2002 年 12 月 11 日
- 12, 杉山 紀之 (基生研、CREST)、福田隆之、日下雅友、柳沢昌子、緒方勤、近藤郁子、加藤光広、WILLIAM b. DoBYNS、北村邦夫、諸橋 憲一郎
マウス雄胎生生殖腺における Arx の機能とヒト遺伝病 XLAG における ARX 遺伝子の
変異解析、第 25 回日本分子生物学会、横浜、2002 年 12 月 11 日
- 13, H.Mizusaki (NIBB/CREST), Ken Kawabe, T. Mukai, E.Ariyoshi, M. Kasahara, H. Yoshioka, A.Swain and K.Morohashi,
Interaction of Wnt-4 Signal with Ad4BP/SF-1 Regulates Transcription of the Dax-1
Gene during Gonad Differentiation
International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer, Fukuoka,
October 25, 2002.
- 14, Mohamad Zubair, S Oka, S Ishihara and K Morohashi (NIBB/CREST)
Analysis of Ad4BP/SF-1 gene regulatory region
“ADRENAL 2002”(Xth Conference on the Adrenal Cortex), San Francisco, California,
USA, June 16, 2002.
- 15, Taiga Suzuki (NIBB/CREST)
LXXLL Motifs in Dax-1 Have Target Specificity for the Orphan Nuclear Receptors
Ad4BP/SF-1 and LRH-1
“ADRENAL 2002”(Xth Conference on the Adrenal Cortex), San Francisco, California,
USA, June 16, 2002.
- 16, 向井 徳男, 鹿山 達司, 藤枝 憲二, 名和田 新, 諸橋 憲一郎 (基生研/CREST)
マウス副腎における Dax-1 の発現調節
第 9 回日本ステロイドホルモン学会、東京、2001 年 11 月 17 日
- 17, 水崎博文 (基礎生物学研究所/CREST), 河辺 顕, Mohamad Zubair, 有吉悦子, 笠原恵, 吉岡秀文, 諸橋憲一郎
Dax-1 遺伝子の転写制御における Ad4BP/SF-1 と Wnt-4 シグナルの相互作用
第 24 回日本分子生物学会、横浜、2001 年 12 月 9-12 日
- 18, Mohamad Zubair (基礎生物学研究所/CREST), 岡早苗, 石原悟, 諸橋憲一郎
転写因子 Ad4BP/SF-1 遺伝子の転写調節領域の解析
第 24 回日本分子生物学会、横浜、2001 年 12 月 9-12 日
- 19, 加納卓也, 山下大輔, 深水昭吉, 諸橋憲一郎, 貞野宏之, 大隅隆
転写調節関連蛋白質と核マトリックスの相互作用の解析
第 24 回日本分子生物学会、横浜、2001 年 12 月 9-12 日
- 20, 福井 由宇子 (三菱化学生命科学研究所)、伊奈 佐和子、岡本 志乃、上條 岳彦、諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
性腺形成異常および雄性性分化異常を示すマウスポリコム遺伝子変異マウス
M33cterm/cterm における胎児性腺の既知遺伝子発現解析
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 21, 河辺 顕 (基礎生物学研究所/CREST)、水崎 博文、Mohamad Zubair、諸橋 憲一郎
Dax-1 遺伝子の転写制御における Wnt シグナルの関与
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 22, 向井 徳男 (基礎生物学研究所/CREST)、鹿山 達司、藤枝 憲二、名和田 新、諸橋 憲一郎
マウス副腎における Dax-1 の発現調節
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 23, 水崎 博文 (基礎生物学研究所/CREST)、松山 誠、笠原 恵、繁戸 克彦、有吉 悦

- 子、阿部 訓也、吉岡 秀文、諸橋 憲一郎
生殖腺の形成に不可欠な転写因子と相互作用する新規因子の検索
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 24、鈴木 大河 (基礎生物学研究所/CREST)、川尻 要、梅園 和彦、諸橋憲一郎
共役因子型核内レセプター-DAX-1 による転写抑制と先天性副腎低形成(AHC)
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 25、下野 明彦 (基礎生物学研究所/CREST)、岡 早苗、後藤 貴文、諸橋 憲一郎、
Behringer, Richard
Lim1 転写因子の制御下で脳形成に関わる遺伝子群の単離と機能解析
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 26、木村 利奈 (久留米大・癌治研)、石原 悟、向井 徳男、吉井 洋紀、野村 政寿、
諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所/CREST)
脳下垂体で主に用いられる Ad4BP/SF-1 遺伝子第 1 エキシソンの定量的解析
第 23 回日本分子生物学会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日
- 27、鈴木大河 (基礎生物学研究所/CREST)、諸橋憲一郎、梅園和彦
Role of Orphan Receptor-interactive LXXLL Motif for Suppressive Regulation by Dax-1.
Second International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, ハワイ, 2000 年 4 月 10-14 日
- 28、向井 徳男 (基礎生物学研究所/CREST)、鹿山 達司、岡 早苗、藤枝 憲二、名
和田 新、諸橋 憲一郎
マウス副腎における Dax-1 の発現
第22回日本分子生物学会、福岡、1999年12月7-10日
- 29、向井 徳男 (基礎生物学研究所/CREST)、鹿山 達司、岡 早苗、藤枝 憲二、諸橋 憲一郎
Expression of Dax-1 in the Adrenal Gland.
International Symposium on Molecular Steroidogenesis, 奈良, 1999 年 8 月 25-28 日
- 30、河辺 顕 (基礎生物学研究所/CREST)
Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1.
International Symposium on Molecular Steroidogenesis, 奈良, 1999 年 8 月 25-28 日
- 31、向井 徳男 (基礎生物学研究所/CREST)、百々 哲史、佐神 文郎、諸橋 憲一郎
性分化機構と内分泌攪乱物質
第 72 回日本生化学大会、横浜、1999 年 10 月 6-9 日

川尻グループ

- 32、生田 統悟、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
/CREST)
ダイオキシン受容体の機能解析
内分泌かく乱物質 CREST 第 4 回領域シンポジウム、東京、2003 年 10 月 21-22 日
- 33、川尻 要、生田 統悟 (埼玉県立がんセンター 生化学部 がん基礎研究部門
/CREST)
核内受容体の細胞質・核間輸送と内分泌攪乱物質
内分泌かく乱物質 CREST 第 4 回領域シンポジウム、東京、2003 年 10 月 21-22 日
- 34、川名克芳、生田統悟、小林康人、後藤 修、武田 健、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/CREST)
核内受容体 SXR の細胞質・核間輸送の分子機構
第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月
- 35、生田統悟、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
/CREST)
Aryl hydrocarbon receptor の局在調節におけるリン酸化の関与
第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月
- 36、生田統悟、渡辺潤子、川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
表皮角化細胞における XRE を介した遺伝子発現調節の解析

- 第 74 回日本生化学会大会、京都、2001 年 10 月
- 37, 本清憲一、生田統悟、金子安比古、川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
EWS-FLI1 融合蛋白の細胞内局在とユースイング肉腫の発生機構
第 60 回日本癌学会総会、横浜、2001 年 9 月
- 38, 渡辺潤子、角純子、生田統悟、本間良夫、十川和博、藤井義明、川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
単球系細胞の分化に伴って誘導されるヒト AhR の転写機能
第 60 回日本癌学会総会、横浜、2001 年 9 月
- 39, 生田統悟、渡辺潤子、川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST)
Ah レセプターの細胞内局在および転写調節能に与える LXXLL-motif (NR box) の影響
第 73 回日本生化学会大会、横浜、2000 年 10 月
- 40, 渡辺潤子、角純子、生田統悟、本間良夫、川西政史、十川和博、藤井義明、川尻要
(埼玉県立がんセンター/CREST)
ヒト AhR 遺伝子の単球分化に伴う転写調節
第 59 回日本癌学会総会、横浜
2000 年 10 月
- 41, 川尻要 (埼玉県立がんセンター/CREST) 生田統悟、渡部潤子
Regulation of arylhydrocarbon receptor function : possible role of its LXXLL-motif
第 13 回ミクロソームおよび薬物の酸化に関する国際シンポジウム、ストレッサ
イタリア 2000 年 7 月 12 日
- 42, 渡辺潤子、角純子、生田統悟、本間良夫、川西政史、十川和博、藤井義明、川尻要
(埼玉県立がんセンター/CREST)
ヒト AhR 遺伝子の転写調節
第 22 回日本分子生物学会年会、福岡、1999 年 12 月
- 43, Watanabe, J., Shimada, T., Gillam, E.M.J., Ikuta, T., Suematsu, K., Higashi, Y., Gotoh, O.,
and Kawajiri, K.
Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer.
11th International Conference on Cytochrome P450.
August-September, 1999, Japan (Sendai)

井上グループ

- 44, 藤田 雅代・浦野 友彦・井上 聡 (東京大学医学部附属病院老年病科/CREST)
骨芽細胞におけるエストロゲンの分子標的の探索と機能解析
内分泌かく乱物質 CREST 第 4 回領域シンポジウム、東京、2003 年 10 月 21-22 日
- 45, 小川 純人 (東京大学)、井上聡 (東京大学/CREST)、大内尉義
エストロゲン受容体 (ER) と相互作用する ERIF の同定
第 22 回日本分子生物学会、福岡 1999 年 12 月 7 日

吉岡グループ

- 46, 吉岡秀文 1, 3 石丸善康 1, 3 諸橋憲一郎 2, 3, 4 (1 兵庫教育大 2 基生研 細胞
分化 3 科技団 4 総研大)
左右不斉的な生殖腺皮質の分化と性依存的な生殖腺髄質の分化のレチノイン酸
による制御
内分泌かく乱物質 CREST 第 4 回領域シンポジウム、東京、2003 年 10 月 21-22 日
- 47, 石丸善康 (CREST/兵庫教育大学)、杉山紀之、笠原恵、諸橋憲一郎、吉岡秀文
生殖腺形成におけるレチノイン酸シグナルの関与
日本発生生物学会第 36 回大会、札幌、2003 年 6 月 11-13 日
- 48, H Yoshioka, (CREST/Hyogo Univ. of Teacher Education), Y Ishimaru, N Sugiyama, N
Tsunekawa, T Noce, M Kasahara, K Morohashi
FGF and WNT signals are required for the mesonephric tubulogenesis and initiation

7. 結び

【研究の目標等から見た達成度，得られた成果の意義等の自己評価】

本研究では「性分化機構」の解明を目的に，多角的な視点から研究を遂行した。特に遺伝子の転写制御機構に着目し，生殖腺で発現する転写制御因子の機能解析を行なった。得られた結果の中で特に注目すべき点は，これまであまり研究がなされていなかった生殖腺の雌化の分子メカニズムの一端が明らかになったことである。また，本研究では生殖腺の分化に不可欠であることが予想される新たな因子の単離がなされた。これらの因子のうちホメオボックスを有するARXが脳と外生殖器に異常を示すヒト遺伝性疾患の原因遺伝子であることを明らかにしたことは，本疾患の診断や治療の道を開くものとして高い評価を受けるとともに，ARXの機能を通じた生殖腺分化のメカニズムの解析へとつながるものであった。Ad4BP/SF-1の機能発揮のメカニズムの理解も進んできた。特にDAX-1や β カテニンとの相互作用を通じた転写調節機構は，相互作用領域の同定を通じてその分子メカニズムの詳細が明らかになった。一方，Ad4BP/SF-1の翻訳後修飾による調節機構として，新たにSUMO化を受けることが示された。リン酸化やアセチル化と合わせて，多彩な転写調節を可能にするメカニズムを担っているものと推測される。以上のように，必ずしも満足するものではないが，生殖腺の分化を制御する遺伝子カスケードが明らかになってきた。

一方，ニワトリ胚を用いた実験では，生殖腺の発生過程における増殖因子と転写因子の関連が明らかになってきた。また，鳥類卵巣の左右非対称性を誘導する分子メカニズムを明らかにすることができた。現在，最終の実験を行なっているところであるが，この結果は古くから知られていた興味深い生物現象に対して，その解答を与えたものとして高い評価を受けることが期待される。

Ad4BP/SF-1遺伝子の組織特異的エンハンサーの解析からは，胎仔副腎皮質，脳下垂体，視床下部腹内側核特異的エンハンサーが同定されたものの，生殖腺特異的エンハンサーの同定には至らなかった。実験にはAd4BP/SF-1遺伝子の前後の遺伝子まで含む，全長200Kbを超えるバッククローンをを用いたが，全長では生殖腺における発現が確認されるにも関わらず，この領域を断片化した場合にはいずれの断片にもその活性を確認することができなかった。今後明らかにすべき点である。また，この研究には予想以上に長い時間を費やしたため，本研究で同定されたDNA断片を用いた研究を展開することができなかった。特に，視床下部腹内側核における雌の性行動の制御メカニズムは本研究の対象とするところであったが，今後の問題として残された。一方，胎仔副腎皮質，脳下垂体，視床下部腹内側核特異的エンハンサーについては，今後その成果を発表する予定である。

藤井研究チームとの共同研究で、ダイオキシンレセプターの卵巣における機能の解明を行なったが、この成果はダイオキシンレセプターの生理学的機能をはじめ明らかにしたものとして高く評価されるとともに、ダイオキシンが女性ホルモン様活性を示す分子メカニズムを明らかにした点で、極めて意義深いものであった。この成果は生殖腺を対象とする基礎研究の上に立つものであり、このような基礎的研究が内分泌かく乱物質研究には不可欠であることを示すものであった。

以上のように、本研究では当初の目的にそって各々の研究を展開した。なかには予想以上に長い時間を費やした研究もあったが、概ね期待通りの成果を得ることができた。

【今後の研究の展開】

本研究の推進中に、生殖腺の分化を制御する遺伝子カスケードの解析には各種遺伝子変異マウスを用いた遺伝学的解析が必要であるとの認識にいたった。そこで、我々自身が作製した遺伝子破壊マウスと他の研究者が作製したもの、及び自然発症のマウスを収集し、その遺伝的背景をC57BL/6とFVBに統一してきた。N5世代を得た後に交配実験に用いているが、これまでおよそ3年を費やして、10種類を超えるマウスを収集してきた。これらの各種遺伝子変異マウスを用いて遺伝的相互作用の解析を開始したが、交配実験からは予想以上の成果が得られ始めており、遺伝子カスケードを検討するにあたり主要な手段として確立することができたと思われる。

また、本研究では生殖腺の分化に関与する新たな因子の同定を行なった。これらの因子のうち、その構造と発現が興味深いものについては遺伝子破壊マウスを作製し、その解析を行なっているところであり、新たな展開が期待できる。

ニワトリ胚を用いた研究からは、極めて貴重な成果を得ることができたが、哺乳類での結果と比較することで脊椎動物における性決定の多様性と普遍性を議論する基盤が形成された。性分化機構の研究領域において、鳥類を対象とする研究の展開と、他の動物種における展開に与える影響は大きい。

このように、本研究では当初の目的を達成するとともに、生殖腺の分化や性分化の分子メカニズムを解明するための、次の展開を可能にする基盤の形成が行なわれた。

【研究代表者としてのプロジェクト運営】

(チーム全体の研究遂行、研究費の使い方、若手研究者の育成等)

本研究チームは生殖腺の形成機構に関連の研究を推進してきた研究グループ

で構成したため、各グループとも研究の趣旨が一貫していた。そのため、研究の遂行は各グループの自主性にゆだねられたが、グループ間の共同研究や他の研究チームとの共同研究が盛んに行なわれた。各グループとも配分された研究費を本研究の趣旨にあわせて適正に使用した。

本研究に参加した若手研究者の中で、他大学へ助手として転出した者が1名、学位を取得した者が4名（うち1名は来春より他大学で助手として採用予定、2名は海外の研究室で博士研究員として採用予定）、今後学位を取得する予定の者が6名にのぼる。決して満足できる状況ではないが、性分化に興味を持ち、本研究への参加を希望する若手研究者や大学院生によって本研究が支えられた。これらの若手研究者の今後の活躍が期待される。

【その他戦略的基礎研究推進事業に対する意見，要望】

5年の長期に渡り、このような基礎研究を「内分泌かく乱物質」と題した研究領域に採用して頂き、また暖かく御支援頂きました鈴木統括をはじめアドバイザーの先生方には深く感謝致します。また、領域事務所の皆様方には本研究の遂行にあたり、後方支援をして頂きました。感謝致します。

本研究領域は「内分泌かく乱物質」の領域名を冠しており、単に学術的研究領域とは趣を異にするところがあったと認識しています。しかしながら、5年間の研究を終了するにあたって確信致しますことは、いかに「内分泌かく乱物質」の研究であっても基礎的研究の基盤なしには重要な成果を出すことは不可能であることです。ここ数年の研究費の配分をみるにつけ、応用への傾倒が著しく、基礎研究が軽んじられる傾向にあります。基礎研究の成果を応用研究へと発展させることの重要性を否定するものではありませんが、そのような研究へ研究費が投入されたからといって、基礎研究へ配分される研究費が減少することはあってはならないことだと考えます。文科省関連の国立研究所や大学等が来春をもって独立行政法人へ移行しますが、ここにおいても効率化のみが優先され基礎的学術研究の重要性や継続性が脅かされる状況です。わたくしが大学院生の頃、およそ20年程前のことですが、CellやNatureなどの一流誌に本邦から発信される論文はわずかでしたが、最近ではそのような研究は珍しくありません。CellやNatureなどに掲載される論文のみが評価される研究であるとは思いませんが、本邦から多くの世界的に評価される研究が発信されるようになってきたのは真実であります。そして、このような状況を作り出す原動力となったのが戦略的創造研究推進事業をはじめとする研究費であることは疑うべくもありません。100年後の日本の

学術研究のありかたを見定め、今後とも基礎研究を育てて頂くことを願うもの
あります。

【研究室の集合写真】

基礎生物学研究所細胞分化研究部門（諸橋研究室）



2002年10月に基礎生物学研究所にて開催された国際シンポジウム
“Molecular Mechanisms of Sex Differentiation”の参加者

