

性腺系特異的に発現する新規 HMG-box 蛋白質の解析

梶谷 宇, 水谷 哲也, 宮本 薫

福井医科大学大学生化学第二講座, 科学技術振興事業団・CREST

要 旨

われわれは, 種々の細胞生物学および分子生物学的手法を用いて卵胞発育を司る因子の探索および機能解析を行っている。その中で, ラット卵巣 cDNA ライブラリーより, 転写因子のモチーフである HMG-box モチーフを有する新規蛋白質 (Granulosa cell HMG-box protein-1; GCX-1と命名)をコードする遺伝子を単離し, この新規因子の発現様式および機能について解析を行った。この遺伝子の mRNA は視床下部一下垂体一性腺系に特異的な発現が認められ, 特に卵巣において強く発現していた。卵巣内においては未成熟卵胞の顆粒膜細胞において強い発現が認められた。細胞内では核に存在することが明らかとなり, Mammalian GAL4 one-hybrid system により強力な転写活性化能を有していることが示された。以上より, GCX-1は性腺系特異的な新規転写活性化因子であることが明らかとなり, 卵胞の発育分化に重要な関りをもつことが示唆された。

はじめに

卵胞発育は, 胎生期における原始卵胞の形成に始まり, ゴナドトロピン非依存性および依存性の発育を経て主席卵胞が選択され, 排卵, 黄体形成に至る過程であり, そのメカニズムに関しては古くから数多くの研究が行われている。特に, 近年の分子生物学, 細胞生物学の飛躍的な進歩に伴って, これらの手法を用いて, これまで不明であったさまざまな生理現象のメカニズムを細胞レベル, 遺伝子レベルで明らかにしようという試みが活発に行われている。このような研究は, 単に卵胞発育のメカニズムを理解するというだけでなく, 体外受精—胚移植 (IVF-ET) における効率的な排卵誘発法や, 多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) をはじめとする排卵障害や黄

体機能不全などの病因解明および治療法の確立など, 生殖医療の現場における臨床応用へ向けても非常に重要であると考えられる。われわれはこれまで, 卵巣内で発現しているさまざまな遺伝子を単離し, その遺伝子産物の機能解析を行うことで卵胞発育のメカニズムに迫ることを目標として研究を行ってきた。その中で今回は, 視床下部一下垂体一性腺系に特異的に発現する新規転写因子 GCX-1を単離し, 詳細な解析を行ったのでその結果を中心に報告する。

卵巣からの機能的遺伝子の単離

ある組織で発現している遺伝子を単離する方法としてこれまでに数多くの手法が考案され, さらに改良が重ねられ, 効率的な遺伝子のクローニング法が確立されてきている。その中でもわれわれが主に用いている方法が PCR を利用したサブトラクショナルクローニング法 [1] と酵母 one-hybrid 法および two-hybrid 法 [2, 3] である。サブトラクショナルクローニング法はある特定の組織に特異的に発現している遺伝子群をクローニングする方法であり, ある組織で発現している遺伝子から, 別の組織で発現している遺伝子を差し引くことで, その特定の組織にだけ発現している遺伝子を同定しようとするものである。この方法は, 同じ組織であっても, 発育段階あるいはホルモン等の刺激の有無による遺伝子発現の違いを見出すことも可能であるため, われわれはラットをモデル動物として, ゴナドトロピン刺激によって卵巣内で発現が誘導あるいは抑制される遺伝子群を網羅的に探索し, 卵胞発育メカニズムの解明への足がかりにすべく研究を継続している。これまでに, サブトラクショナルクローニング法によって StAR や SR-BI といったステロイド合成に関与する因子群や Epregrulin, Amphiregrulin 等の成長因子の遺伝子が, ラット卵巣においてゴナドトロピン刺激によって早期に発現誘導される遺伝子群としてクローニングされている [4-6]。一方, 酵母 one-hybrid 法および two-hybrid 法は, ある特定の DNA 配列もしくは蛋白質と, cDNA ライブラリー内のある特定の遺伝子産物との相互作用を酵母内でのレポーターシ

連絡先: 梶谷 宇, 福井医科大学大学生化学第 2 講座,
〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月23-3
TEL: 0776-61-3111
FAX: 0776-61-8102
E-mail: kajitani@fmsrsa.fukui-med.ac.jp

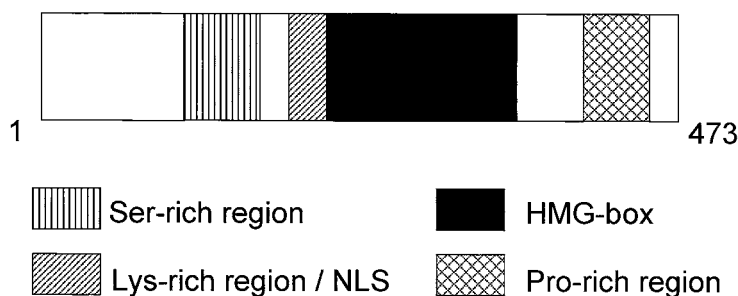


図1 GCX-1のドメイン構造の模式図

ステムを用いて検出し、ある特定のDNA配列もしくは蛋白質に結合する蛋白質の遺伝子を同定する方法であり、これまでにEgr-1, USF-2といった転写調節に関わる因子をラット卵巣顆粒膜細胞のcDNAライブラリーより単離し、機能解析を行ってきた [7, 8].

以上に紹介した方法では、当然のことながら既知遺伝子のみならず未知遺伝子も数多く単離されてくる。われわれは、サブトラクショナルクロニング法を用いてゴナドトロピン誘導性新規転写抑制因子GIOT-1をクローニングし、その機能解析を行っているが、標的遺伝子等、その生理機能に関しては不明な点が多い [9, 10]. そこで、卵巣内でGIOT-1と相互作用している蛋白質を同定することでGIOT-1の機能解明への手がかりにしようと考え、GIOT-1をおとり蛋白に用いた酵母two-hybrid法によるラット卵巣顆粒膜細胞cDNAライブラリーの探索を行った。その結果、いくつかの既知の転写制御蛋白質とともに、新規転写因子様蛋白質のcDNAが単離された。この新規遺伝子産物は、アミノ酸配列より、転写因子のDNA結合モチーフの1つであるHigh Mobility Group (HMG)-boxモチーフを有していることが示唆され、あとで述べるように視床下部-下垂体-性腺系に特異的に発現していることから、卵胞発育をはじめ生殖生理現象に深く関与している新規転写因子であると考えられる。そこでわれわれは、新たにこの因子(Granulosa cell HMG-box protein-1; GCX-1と命名)について詳細に解析を行うこととした。

GCX-1の発現解析

図1にはGCX-1のドメイン構造を模式的に示した。全長473アミノ酸よりなり、N末端とC末端のちょうど中ほどにHMG-boxモチーフをひとつ有している。HMG-boxモチーフは、酵母から植物、昆虫、哺乳類にいたるまで真核生物に広く分布しているDNA結合モチーフである。図2のように3本の α -ヘリックス構造

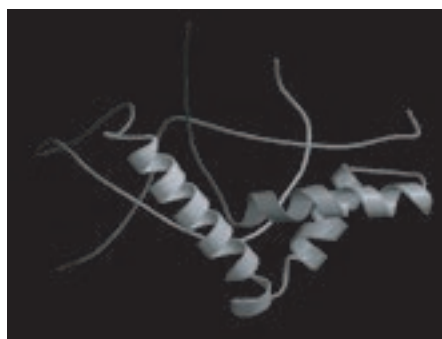


図2 精巣決定因子SRYのHMG-boxモチーフの立体構造

もったポリペプチド鎖がL字型に配置されており、このL字型の先端がDNA鎖の二重らせんにはまりこむことでDNA鎖と結合し、さらにDNA鎖を折り曲げることで転写調節に関与していることが知られている [11]. これまで、数多くのHMG-box蛋白質が同定され、その中には、精巣の発生に深く関与しているSRYやSox9など、生殖生理現象に深く関与している蛋白質もある [12]. さらに最近では、あるHMG-box蛋白質がステロイドホルモン受容体と相互作用し、その転写調節能に関する報告 [13] もあることから、卵巣内で発現しているGCX-1も同様に、卵胞発育をはじめなんらかの生殖生理現象に関与しているのではないかと考えられた。また、GCX-1はHMG-boxモチーフの他にも、核局在シグナル(NLS)やセリン、リジン、プロリンといった特定のアミノ酸に富む領域も有しており、典型的な転写制御因子様の蛋白質であると推定された。

発現解析においては、まず、GCX-1遺伝子発現の組織分布を調べたところ、図3のように視床下部、下垂体、精巣、子宮および卵巣にのみその発現が確認された。このような組織分布を示す転写因子としては、先述のGIOT-1や、ステロイド合成に深く関与しているAd4BP/SF-1やDax-1等があげられるが、いずれも、副腎にもその発現が認められており、厳密に生殖系でのみ働いている転写因子であるとはいえない。しかしながら、

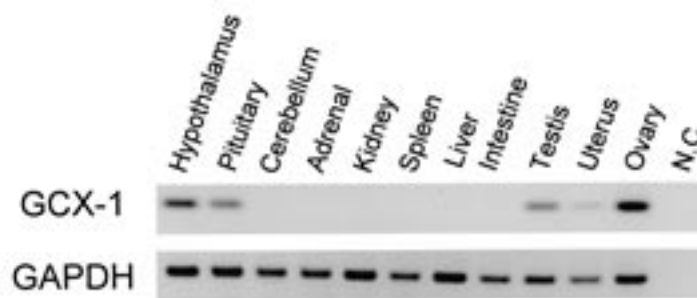


図3 GCX-1 mRNA の組織分布
視床下部, 下垂体, 精巣, 子宮, 卵巣においてのみ発現しており, 特に卵巣において強い発現が認められる。

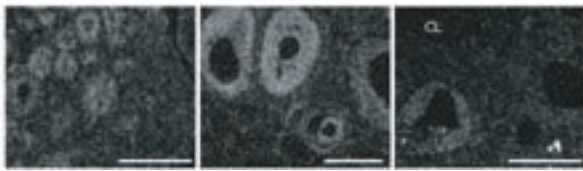


図4 *In situ* ハイブリダイゼーションによる卵巣内の各発育段階における GCX-1 mRNA の発現解析
左から, 8日齢, 21日齢, 8週齢ラット卵巣. 未成熟な卵胞では非常に強い発現が認められるが卵胞の発育とともに発現量は低下し, 黄体 (CL) ではごくわずかに発現しているのみである.
Scale bar=0.2 mm

GCX-1は副腎での発現が認められず, 生殖機能に特化して機能している転写因子である可能性が強く示唆された. 続いて, *in situ* ハイブリダイゼーションによる卵巣内における発現パターンの解析を行ったところ, 図4のように, 未成熟卵胞の顆粒膜細胞中に強く発現していることが分かった. この発現は, 卵胞発育に伴って顕著に減少していき, 黄体化細胞においてはごくわずかに発現しているのみであることが明らかになった. 以上のことから, GCX-1は卵胞発育, 特に, 初期のゴナドトロピン非依存性発育に重要な役割を果たしている可能性が考えられた. しかしながら, 初代培養のラット卵巣顆粒膜細胞を用いたゴナドトロピン刺激試験においては, GCX-1 mRNA は FSH, hCG 刺激によって発現量が変化せず, ゴナドトロピン刺激による直接の発現調節は受けていないことが示唆された. 単離した顆粒膜細胞中ではゴナドトロピン刺激による発現調節を受けていないのに, 生体内では卵胞発育のステージが進むにつれて発現量が低下するという事実より, GCX-1の発現調節には, ゴナドトロピン刺激が直接関わっているというよりもむしろ, 卵母細胞や莖膜細胞との相互作用, あるいは, オートクライン的, パラクライン的に発現調節に関わる因子の存在が重要なのではないかと思われた. 続いて, GCX-1は細胞内において核に局在することが緑色蛍光



図5 Mammalian GAL4 one-hybrid システム
GAL4 DNA 結合ドメイン (DBD) と融合させた目的の蛋白質をレポーター上に強制配置させることで転写制御能を調べる。

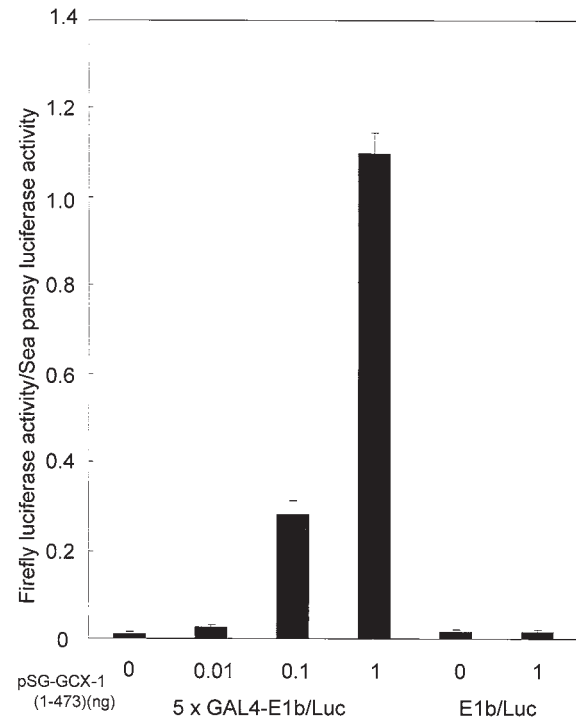


図6 GCX-1の転写活性化能
GAL4 DBD-GCX-1融合蛋白発現ベクターの用量依存的に転写活性化能の顕著な増大を確認した. E1b/Luc は GAL4結合配列を持たないレポーターである。

蛋白 (GFP) との融合蛋白質を用いた実験で明らかとなり, さらに, この局在には, アミノ酸配列より推定された NLS 領域が必須であることが分かった. また, ウエスタンプロット法によりラット卵巣顆粒膜細胞抽出液の

核画分から GCX-1 蛋白質が検出されたことと合わせ、GCX-1 は実際にラット卵巣顆粒膜細胞中で転写調節に関っている可能性が示唆された。

GCX-1 の転写調節能解析

続いて、培養細胞を用いて GCX-1 の転写制御能の解析を行った。GCX-1 は新規の遺伝子産物であり、HMG-box モチーフを有していることから DNA 結合性ではあると考えられるが、実際の標的配列などはまだ明らかではない。そこで、その転写調節能を調べるため、Mammalian GAL4 one-hybrid システム [14] を用いた解析を行った。Mammalian GAL4 one-hybrid システムとは、図 5 に示すように、酵母の転写因子 GAL4 の結合配列を上流に配置したレポーター遺伝子と、DNA 結合能の分からない蛋白質を GAL4 の DNA 結合ドメイン (DBD) と融合させた蛋白質の発現ベクターとを同時に哺乳類細胞に導入し、転写制御能を調べたい蛋白質を強制的にレポーター上に配置させることでその転写制御能を解析する方法である。GCX-1 と GAL4 DBD との融合蛋白質発現ベクターを構築してヒト肝癌由来 HepG2 細胞にレポーターとともに導入し、転写制御能の検討を行った。その結果、発現ベクターの用量依存的な転写活性化能の増大を確認した。発現ベクターの用量がごく少量でも十分な転写活性化能がみられたことから、GCX-1 は非常に強力な転写活性化因子であることが示唆された。続いて、GCX-1 蛋白質中における転写活性化能に必須のドメイン検索を、さまざまな長さに欠損させた GCX-1 蛋白質と GAL4 DBD との融合蛋白質を用いて同様の系で行った。その結果、N 末端側 25~63 アミノ酸領域が転写活性化に必須の最小領域であることが分かった。さらに、変異導入により、転写活性化に関する重要なアミノ酸残基の同定を試みたが、さまざまな変異体を作製した結果、どれも一様に転写活性化能が低下していたことから、この領域全体の構造が転写活性化には重要であると考えられた。この 25~63 アミノ酸領域は、明確な二次構造をもたないと予測され、既知の転写活性化モチーフとも相同性を示さないことから、新たな転写活性化ドメインとしても興味深い。

おわりに

以上、本研究では、卵巣発育に関与する遺伝子群の検索の過程において、ラット卵巣顆粒膜細胞 cDNA ライブラリーより、新規の HMG-box 転写活性化因子

GCX-1 遺伝子をクローニングし、その詳細な解析を行ってきた。GCX-1 mRNA は視床下部-下垂体-性腺系において特異的に発現しており、特に卵巣内において未成熟卵巣の顆粒膜細胞において強く発現していた。副腎や胎盤での発現は認められなかったことと合わせて考えると、GCX-1 蛋白質は、卵巣内ではゴナドトロピン依存性の卵巣発育やステロイド産生よりも、むしろ初期のゴナドトロピン非依存性発育に関与していると思われる。ゴナドトロピン非依存性の卵巣発育には、卵巣局所で産生される局所因子の関わりが重要視されており [15, 16]、GCX-1 はこれらの因子の発現調節に関っているかもしれない。今後さらなる解析を行って、GCX-1 の生理作用についても明らかにし、これまでの成果と合わせ、複雑な卵巣発育のメカニズム解明へとつなげていきたいと考えている。

謝辞

本稿は 2002 年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞の受賞対象になった研究をまとめたものですが、本奨励賞にご推薦くださいました日本生殖内分泌学会理事長 青野敏博先生に心より感謝いたします。また、本稿の執筆の機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会広報担当理事 西原真杉先生に深く感謝いたします。また、研究遂行に際しご助言、ご協力をいただきました福井医科大学第二生化学講座諸氏に感謝の意を表します。

文 献

1. Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240, 90-97.
2. Chevray PM, Nathans D (1992) Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5789-5793.
3. Wang MM, Reed RR (1993) Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* 364, 121-126.
4. Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K (1997) Molecular cloning, characterization and cellular distribution of rat steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the ovary. *Life Sci* 61, 1497-1506.
5. Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K (1997) Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 518-523.

6. Sekiguchi T, Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Kawata H, Yoshino M, Kajitani T, Kameda T, Minegishi T, Miyamoto K (2002) Transcriptional regulation of epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinology* 143, 4718-4729.
7. Yoshino M, Mizutani T, Yamada K, Tsuchiya M, Minegishi T, Yazawa T, Kawata H, Sekiguchi T, Kajitani T, Miyamoto K (2002) Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 66, 1813-1819.
8. Yamada K, Mizutani T, Shou Z, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Inazu T, Miyamoto K (2001) Cloning and functional expression of an E box-binding protein from rat granulosa cells. *Biol Reprod* 64, 1315-1319.
9. Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Okada T, Minegishi T, Miyamoto K (2001) Cloning and characterization of gonadotropin-inducible ovarian transcription factors (GIOT1 and -2) that are novel members of the (Cys)₂-(His)₂-type zinc finger protein family. *Mol Endocrinol* 15, 1693-1705.
10. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Miyamoto K (2003) Involvement of cyclic adenosine 5' -monophosphate response element-binding protein, steroidogenic factor 1, and Dax-1 in the regulation of gonadotropin-inducible ovarian transcription factor 1 gene expression by follicle-stimulating hormone in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 144, 1920-1930.
11. Thomas JO, Travers AA (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 163-174.
12. Clarkson MJ, Harley VR (2002) Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *Trends Endocrinol Metabol* 13, 106-111.
13. Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast, P, Altmann M, Ronfani L, Bianchi ME, Taraseviciene L, Nordeen SK, Allegretto EA, Edwards DP (1998) High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 18, 4471-4487.
14. Webster N, Jin JR, Green S, Hollis M, Chambon P (1988) The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* 52, 169-178.
15. Richards JS (2001) Perspective: The ovarian follicle-a perspective in 2001. *Endocrinology* 142, 2184-2193.
16. Epifano O, Dean J (2002) Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol Metab* 13, 169-173.