研究フロンティア

ラット卵巣およびMA-10細胞でのNGFI-B/ nur77遺伝子の発現調節機構

稲岡　斉彦，矢澤　隆志，上坂　美紀，水谷　哲也，山田　一哉，宮本　　薫

福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域

はじめに

NGFI-B/ nur77はオーファンステロイド受容体ファミリーに属する転写因子であり，immediate-early geneの一種である［1］．NGFI-B/ nur77ファミリーは卵巣では20a-HSD［2］，精巣ではCyp17とHSD3b［3］，そして副腎ではCyp11b2とHSD3b［4］の遺伝子発現を調節するという報告がある．このことより，NGFI-B/ nur77が視床下部―下垂体―性腺および副腎において動的な役割を担っているものと考えられる．今回われわれはNGFI-B/ nur77遺伝子が主に幼若ラット卵巣莢膜細胞に発現しているが，DESによりその遺伝子発現が早期に抑制されること，さらにそのときの血中LH濃度は30分で著しく低下することを見い出した．内分泌撹乱物質であるDESの妊娠期や新生児期のマウスへの暴露は，生殖系の発達を大きく変化させることが知られている［5］．また，NGFI-B/ nur77の遺伝子発現はマウスLeydig細胞においては排卵前期の卵胞内の顆粒膜細胞と同様に，LH/ hCGにより誘導されることが知られている［6］．今回，近年明らかにされてきた生殖細胞におけるホルモン，cAMPそしてPKAを介したシグナル経路の関連を考慮し，NGFI-B/ nur77遺伝子の性腺系での転写調節機構について明らかになったことを報告する．

NGFI-B/ nur77遺伝子発現へのDESの効果

*in situ*ハイブリダリゼーションによる幼若ラット卵巣内でのNGFI-B/ nur77遺伝子の発現を解析したところ，図1に示すようにDES投与2時間で莢膜細胞での発現が著しく減少していることが明らかになった．このことをRT-PCRで経時的な変化として，またreal time-PCRで定量的に調べたものを図2に示す．さらにこの時血中LH濃度はDES投与後30分で大幅に低下していた．これ

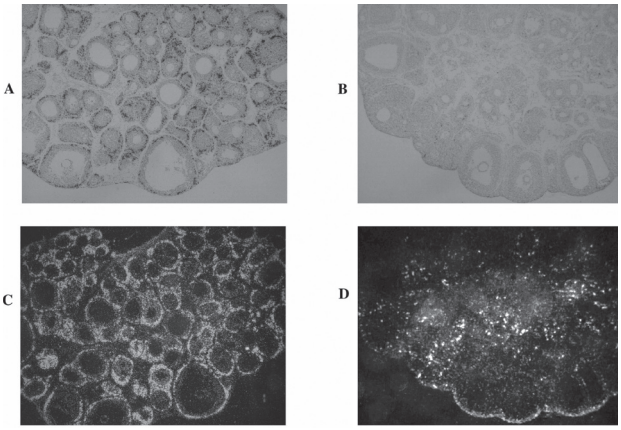

図1　ラット卵巣におけるDESによるNGFI-B/ nur77遺伝子発現変化
A, C: control, B, D: DES投与2時間（A, B: bright fild, C, D: dark fild）

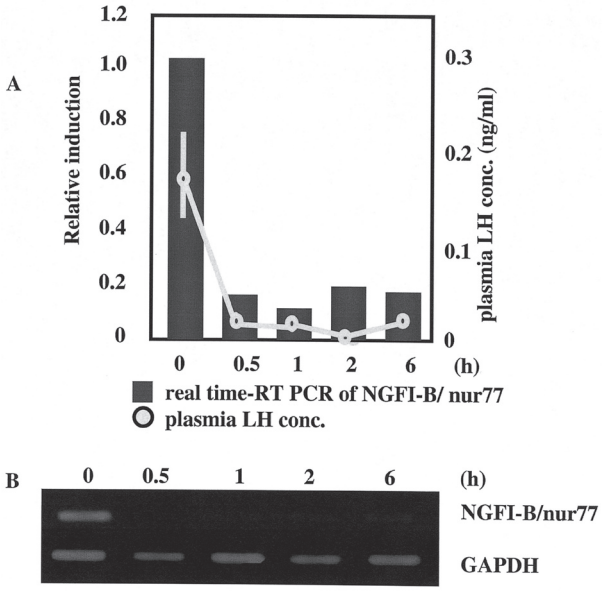

図2　DESによるNGFI-B/ nur77遺伝子発現変化の定量的，経時的評価
A: real time-RT PCRによるNGFI-B/ nur77遺伝子発現と血中LH濃度
B: RT PCR

連絡先：稲岡斉彦，福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域
〒910-1193　福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3
TEL: 0776-61-8316
FAX: 0776-61-8102
E-mail: y_ina-69@u-fukui.ac.jp

により，DESのLHを介したNGFI-B/ nur77遺伝子発現における制御，さらには今までいわれてきた精巣および子宮の他に，中枢系においてもDESが影響を及ぼしている可能性が示唆された．

LH/ hCG，cAMPによる遺伝子発現調節

NGFI-B/ nur77の遺伝子発現が生殖細胞においてLH-cAMP経路により制御されている可能性を調べるために，マウスLeydig細胞腫由来の細胞株であるMA-10細胞を用いてhCGおよびcAMPアナログである8 Br-cAMP刺激による遺伝子発現の変化を図3に示す．hCG，cAMP刺激共にNGFI-B/ nur77の遺伝子発現が早期に誘導されることが分かった．ここで，転写制御に関わる領域を調べるために，NGFI-B/ nur77の転写開始点上流におけるcAMP応答性領域をレポーターアッセイにより調べた．図4に示すとおり，転写開始点上流-253から-165の間と-125から-40の間でcAMP応答性をもつことが示唆された．またこの領域には，AP-1タンパク質結合motif［TGA(C/G)TCA］に類似した配列であるAP-1 like element(TGCGTCA)が，転写開始点-233，-213そして-69に存在している．これら3つのAP-1 like elementにmutation(TGCGTTG)を施したものはそれぞれについてcAMP応答性の減少が認められ，また2ヵ所に入れたものではほとんど応答性を示さなくなり，さらにすべてにmutationを施したものでは，その応答性が消失した（図5）．これにより性腺系におけるNGFI-B/ nur77の遺伝子発現が，LH-cAMPを介した転写因子の結合により制御されていることが示唆された．また-40付近にもAP-1 like elementの存在が知られているが［7］，本研究ではcAMP応答性を示さなかった．

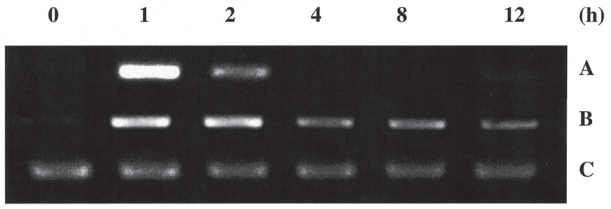

図3　MA-10細胞でのhCG, 8 Br-cAMPによる遺伝子誘導
A: 100 ng/ ml hCGによるNGFI-B/ nur77の遺伝子誘導
B: 1 mM 8 Br-cAMPによるNGFI-B/ nur77の遺伝子誘導
C: GAPDHの遺伝子発現（control）

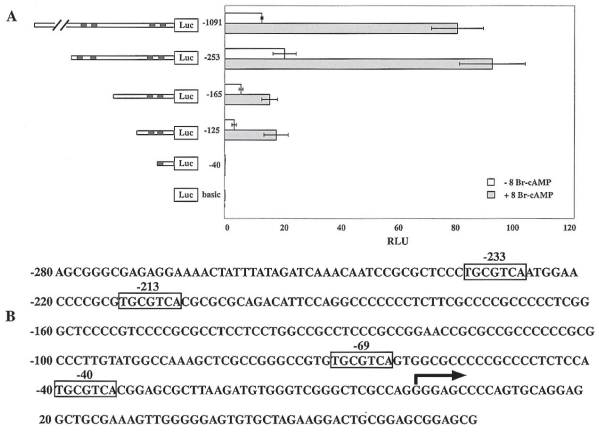

図4　転写開始点上流におけるcAMP応答性領域の解析
A: +/ - 1 mM 8 Br-cAMPによるレポーターアッセイ
B: NGFI-B/ nur77転写開始点上流の配列とAP-1 like element

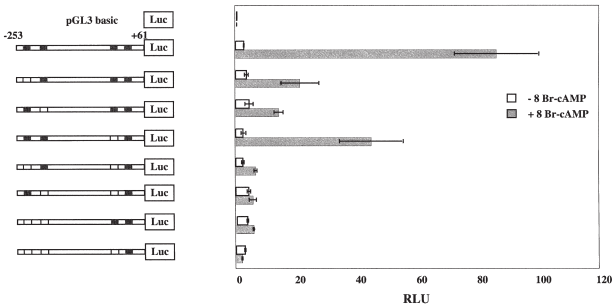

図5　mutationを施した転写開始点上流−253〜+61でのレポーターアッセイ

AP-1 like elementへの結合タンパク質の解析

転写開始点上流に存在するAP-1 like element(TGCGTCA)はAP-1だけではなく，CRE（TGACGTCA)ともよく似た配列である．このため本研究でcAMP応答性を示した-233，-213そして-69付近のAP-1 like elementへの結合タンパク質をEMSAにより解析した．図6 Aに示すとおり，-233のAP-1 elementでは無処理と比べ，cAMP処理によりprobe-protein複合体のバンドが強く現れた．またJun抗体によりprobe-protein複合体のバンドが消失し，CREB抗体によりsuper shiftがみられたことより，この配列にはJunを含むAP-1タンパク質およびCREBが結合するものと思われる．図6 Bでは-213のAP-1 elementにおけるEMSA解析の結果を示している．cAMP処理群においてより強くprobe-protein複合体のバンドが現れ，CREB抗体によりsuper shiftした．一方，Jun抗体において明瞭なprobe-protein複合体の消失は確認されなかったことより，-213のAP-1 like elementには主にCREBタンパク質が結合するものと思われる．図6 Cに示すように-69のAP-1 like elementを用いた場合では，CREB

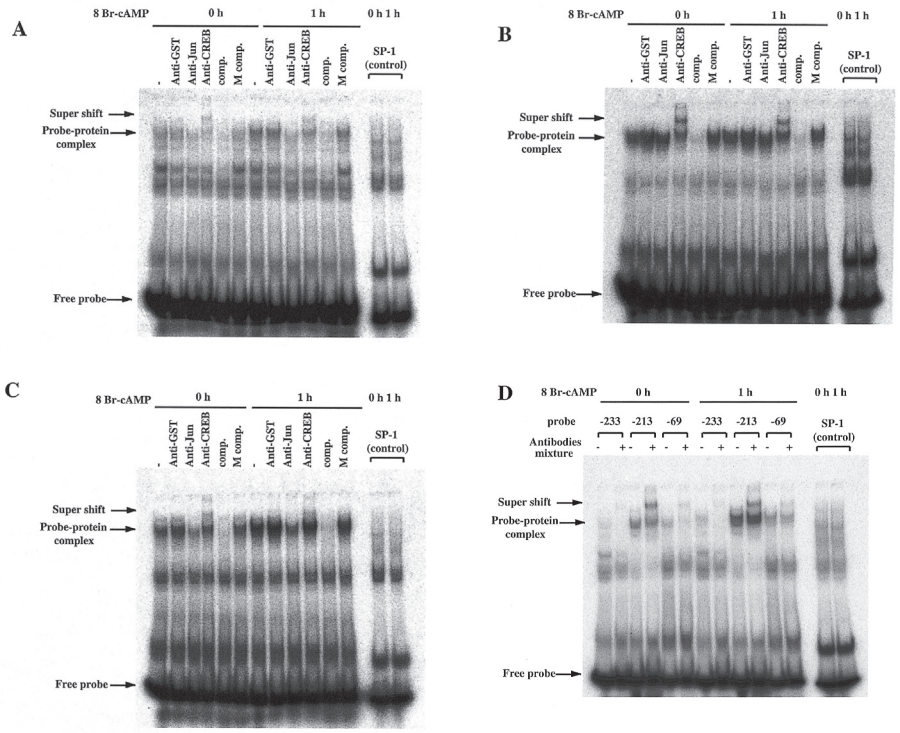

図 6 -233, -213および-70 AP-1 like elementでのcAMP無処理/ 1時間処理した核タンパク質抽出物を用いたEMSA解析
A: -233 AP-1 like elementにおけるEMSA解析
B: -213 AP-1 like elementにおけるEMSA解析
C: -69 AP-1 like elementにおけるEMSA解析
D: 各AP-1 like elementにおけるJun抗体, CREB抗体混合状態でのEMSA解析

抗体によるsuper shiftはみられず，Jun抗体によるprobe-protein複合体の消失が確認されたことより，ここには主にAP-1タンパク質が結合するものと思われる．また，Jun抗体，CREB抗体混合状態でのEMSAを行った場合では，図 6 Dに示すとおり-233ではprobe-protein複合体が完全に消失し，CREBによるsuper shiftのみがみられたのに対し，-213および-69ではCREB抗体，Jun抗体をそれぞれ加えたときと同様の結果であった．このことからも各elementにおけるそれぞれのタンパク質の結合が示唆された．

NGFI-B/ nur77の遺伝子発現における新たなタンパク質合成の関与

EMSA解析から，cAMP刺激によってprobe-protein複合体のバンドが強く現れることが明らかになった．このバンドの強度の増加がCREBやJunタンパク質の量的変化によるものであるのか，またはリン酸化等による質的な変化によるものなのかを調べるために，タンパク質合成阻害剤であるcycloheximide（CHX）処理後のcAMP無刺激または 1 時間刺激でのNGFI-B/ nur77遺伝子発現を調べた．図 7 に示すとおり，遺伝子発現に変化がみられないことより，新たなタンパク質合成は関与しないものと思われる．

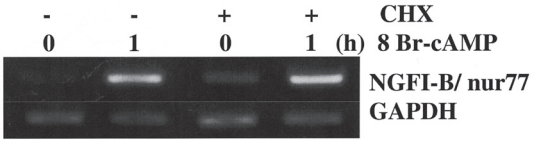

図 7　CHX処理によるNGFI-B/ nur77遺伝子発現変化

おわりに

以上，本研究では強力な内分泌撹乱物質であるDESによる性腺系におけるNGFI-B/ nur77遺伝子発現への作用と，その遺伝子発現調節機構を調べてきた．私共の研究室では，この他にsteroidogenic acute regulatory protein（StAR）やcytochrome P450（P450scc）等の遺伝子発現がDESにより早期に抑制されることも確認して

おり，データーベースとして公表している（http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html）．今回NGFI-B/nur77がLH/ hCG-cAMP経路を介し，さらにPKA等を介しその遺伝子発現が起ること，またDESによりこれらの経路が強く抑制されること，さらにDESが中枢系へ作用している可能性が明らかとなった．今後さらなる解析を行い，これまでの成果と合わせDESによる性腺系への作用を明らかにしていきたい．

謝辞

本稿は2006年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞の候補演題になった研究をまとめたものですが，本稿の執筆の機会を与えて下さいました日本生殖内分泌学会理事長　武谷雄二先生，並びに広報理事　峯岸　敬先生に感謝いたします．また，研究遂行に際しご助言，ご協力いただきました福井大学医学部の分子生体情報学講座諸氏に感謝の意を表します．

文　献

1．Milbrandt J（1988）Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. Neuron 1, 183-188.
2．Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, Gibori G（2000）Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. J Biol Chem 275, 37202-37211.
3．Song KH, Park YY, Park KC, Hong CY, Park JH, Shong M, Lee K, Choi HS（2004）The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. Mol Endocrinol 18, 1929-1940.
4．Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, De Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE（2004）The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. implications for the control of adrenal functional zonation. J Biol Chem 279, 37622-37630.
5．Nagai A, Ikeda Y, Aso T, Eto K, Ikeda MA（2003）Exposure of neonatal rats to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. J Med Dent Sci 50, 35-40.
6．Song KH, Park JI, Lee MO, Soh J, Lee K, Choi HS（2001）LH induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression in testicular Leydig cells. Endocrinology 142, 5116-5123.
7．Darragh J, Soloaga A, Beardmore VA, Wingate AD, Wiggin GR, Peggie M, Arthur JS.（2005）MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. Biochem J 390, 749-59.