

卵巣発生において卵巣特異的転写因子 FOXL2は WT1による *Sf1* の発現を抑制する

高澤 啓, 鹿島田健一

東京医科歯科大学発生発達病態学分野

はじめに

哺乳類の性腺の分化は、未分化性腺の発生後に Y 染色体上にある *Sex-determining region Y* (*SRY/Sry*) の有無によって精巣・卵巣への分化が決定づけられる [1]。マウス精巣においては性決定期である胎生10.5日から12.5日に *SRY* が発現することで *SRY-box 9* (*Sox 9*) の転写を活性化し、その下流にある一連の精巣分化を誘導する分子の発現が促進される [2]。卵巣においては性決定期以降に *Forkhead box L2* (*FOXL2/Foxl 2*), *Wingless-type MMTV integration site family, member 4* (*WNT4/Wnt 4*), *R-spondin-1* (*RSPO 1/Rspo 1*) といった卵巣特異的因子が発現することで卵巣分化が促進される [3] (図1)。

SF1 (*AD 4BP, NR 5A 1*) / *Sf1* (*Ad 4Bp, NR 5a 1*) は副腎、性腺の発生、分化に必須な転写因子である。これは *Sf1* のノックアウトマウスでは、副腎および性腺が発生しないこと [4]、ヒトでは *SF1* 異常症において、副腎低形成および性腺の低形成が生じ、46XY 性分化疾患を呈すること [5] から確認される。*SF1* は原始性腺の発生に必須であることに加え、性決定後においては、精巣の発生において特に重要な役割を果たす。事実、*SF1/Sf1* の発現パターンは未分化性腺では XX, XY 性腺において均等に発現するのに対し、性決定後では XY 性腺 (精巣) において発現が亢進、XX 性腺 (卵巣) においては発現が抑制され性腺特異的な発現パターンをとる [6]。性決定後の精巣において *SF1* は、*SOX 9/Sox 9* 性腺特異的エンハンサーである *TESCO* において、*SRY* と共役的に働き *SOX 9/Sox 9* の発現を上昇させる [7] など、種々の精巣分化を誘導する分子の転写活性を正に制御する。一方、性決定後の卵巣においてみられる *SF1/Sf1* 発現の抑制は出生時までの間持続するが、胎生期卵巣発生における *SF1* の役割や、転写が抑制される意義、

その転写抑制機構などは不明であり、詳細は明らかでない。特に精巣における *Sf1* の転写の正の制御については *SOX9* が担うと考えられているが [8]、これは卵巣での *Sf1* 発現が上昇しないことを説明できても、発現が抑制されることを説明することはできない。

われわれは、卵巣分化における *Sf1* の発現調節に何らかの卵巣特異的因子が関与していると仮説を立て、卵巣発生およびその維持に必須である *FOXL2* [9] に注目し、*FOXL2* が卵巣分化における *Sf1* 発現に与える影響を検討した。その結果 *FOXL2* が卵巣発生初期において、*Sf1* の発現を能動的に抑制することを示したので、それらについて簡略に報告したい。

Sf1 と *Foxl2* は胎仔卵巣において相反的な発現経過をとる

われわれはまず胎仔マウス性腺における *Sf1*, *Foxl 2* の発現を RT-PCR 法にて定量、評価した。既報の通り、性決定後の胎生12.5日以降、*Sf1* の発現は精巣において亢進、卵巣において有意に抑制される一方、それとほぼ同時期に卵巣における *Foxl 2* の発現が亢進した (図2)。また、未分化性腺において *Sf1* の上流の制御因子であることがすでに報告されている *Wt1* および *Lhx 9* の発現は性差を認めなかった。これらは、*FOXL2* が *Sf1* の発現を抑制するというわれわれの仮説と矛盾しないものであった。

FOXL2 は *WT1-KTS* による *Sf1* の転写活性作用を *in vitro* において抑制する

続いて、内因性 *Foxl 2* の発現がないマウス精巣体細胞由来である *TM3* 細胞を用いて *in vitro* での解析を行った。*TM3* 細胞に *Wt1-KTS*, *Lhx 9* を導入したところ、既報通り [10]、*WT1-KTS* および *LHX9* によって *Sf1* の発現が亢進することが確認された [10] (図3A)。さらに *FOXL2* を共発現することで、*WT1-KTS* による *Sf1* の発現亢進が *FOXL2* によって用量依存的に抑制されることが確

連絡先：高澤 啓, 東京医科歯科大学発生発達病態学分野
〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45
TEL : 03-5803-5249
FAX : 03-5803-5246
E-mail : ktakasawa.ped@tmd.ac.jp

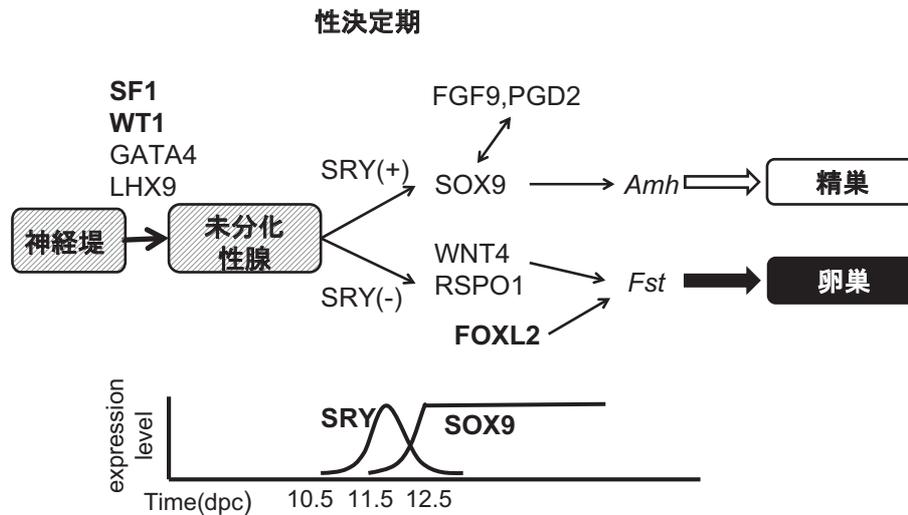


図1 性分化の分子機構 (マウス)
[2] より改変

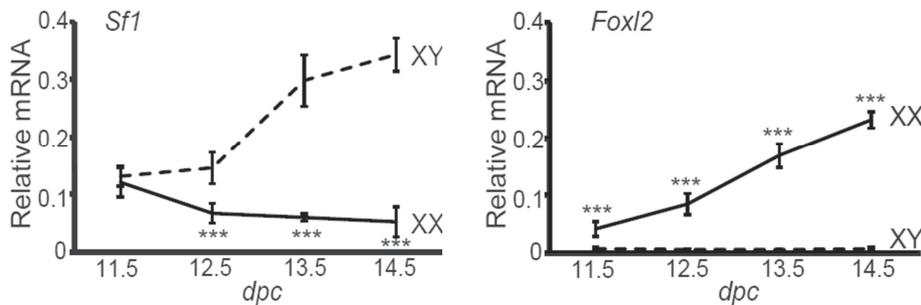


図2 マウス胎仔性腺における *Sf1*, *Foxl2* の経時的発現 (RT-PCR) [14]
胎生11.5~14.5日. 実線 (XX): 卵巢, 破線 (XY): 精巣. ***: $p < 0.001$

認められた (図3B). 一方, FOXL2による *Sf1* 発現抑制作用は LHX9による *Sf1* 転写制御に対しては明らかではなかった (図3C).

FOXL2は *Sf1* 近位 promoter に直接結合し WT1-KTS による *Sf1* 転写活性化を抑制する

FOXL2による *Sf1* の発現抑制の機序を明らかにするために, *Sf1* 遺伝子5'側674bp (-589~+85)のプロモーターを用いてレポーターアッセイを行った. このプロモーターは胎生11.5日の性腺において, WT1-KTSおよびLHX9が直接結合することで活性化されることが *in vivo* で確認されている [10]. レポーターアッセイでもWT1-KTSにより *Sf1* プロモーターの転写活性が上昇し, それはFOXL2によって用量依存的に抑制された (図4A). さらに興味深いことに, われわれはこのプロモーター領域内にFOXL2の結合モチーフと相性の高い配列を (-229~-222)に見出した (図5). この配列

は哺乳類の間ではよく保存されており, その重要性が示唆されるうえ, *Sf1* の転写を活性化するWT1-KTS, LHX9結合領域よりも *Sf1* の近位にあることから, FOXL2による *Sf1* 転写抑制に重要な役割を果たしている可能性が示唆された.

われわれはこのFOXL2結合配列と思われる部位に対して *in vitro* のクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行い, FOXL2が *Sf1* 近位プロモーターに直接結合することを確認した. さらにその配列に変異を導入したレポーターを用いてレポーターアッセイを行ったところ, FOXL2による *Sf1* 転写抑制作用が消失することを確認した (図4B). これらは, FOXL2のWT1-KTSへの拮抗作用においては, 本シークエンス (-229~-222)への結合が必須であることを示している. さらに, WT1-KTS結合配列に対するChIPアッセイでは, WT1-KTSの *Sf1* 近位プロモーターへの結合がFOXL2の存在下によって阻害されなかったため, FOXL2の(-229~-222)への結合はWT1のDNAへの結合を阻害しないことが示

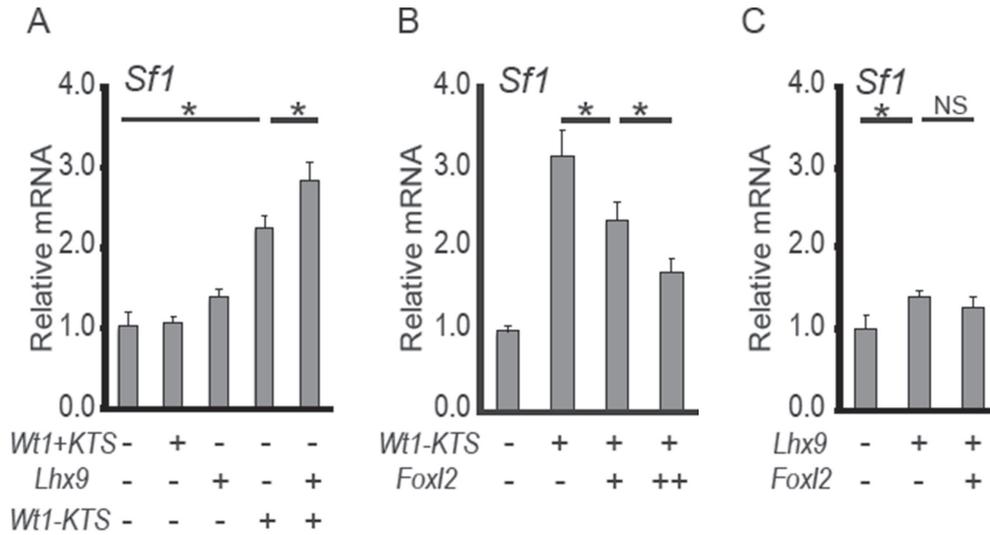


図3 強制発現系 (TM3細胞) における *Sf1* 発現 (RT-PCR) [14]
*: p<0.05

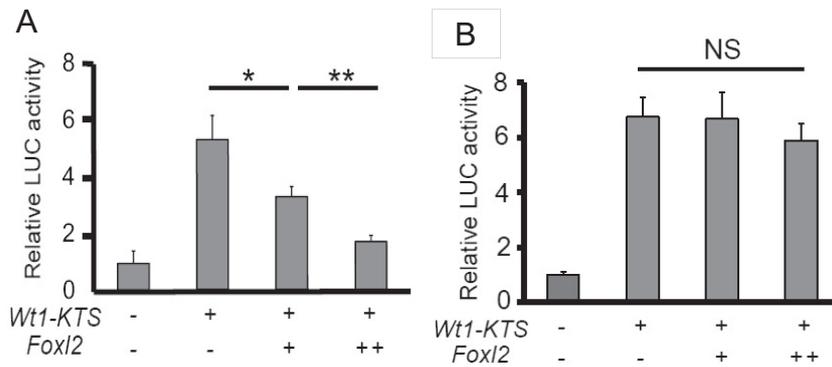
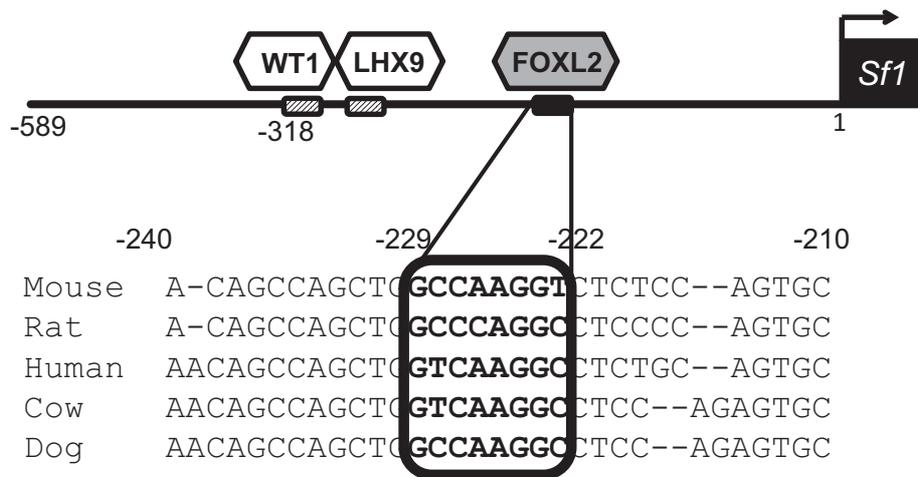


図4 *Sf1* 近位プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ [14]
A: *Sf1* 近位プロモーター, B: FOXL2結合配列に変異を導入したプロモーター.
*: p<0.05, **: p<0.01, NS: 有意差なし.



※FOXL2結合モチーフ: GTCAAGGT/C

図5 *Sf1* 近位プロモーターと FOXL2結合配列 (-229~-222bp)
WT1-KTS および LHX9結合領域 [10]. FOXL2結合モチーフ [15].

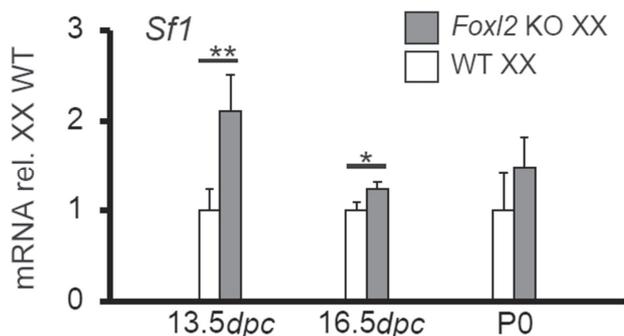


図6 *Foxl2*ノックアウトマウス胎仔卵巣における*Sf1*発現(RT-PCR) [14]
WT: 野生型. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

された。以上の結果より、FOXL2が*Sf1*近位プロモーターに直接結合することで、WT1-KTSによる転写活性を抑制する機序が*in vitro*において示された。

FOXL2は卵巣発生初期に*Sf1*の発現を抑制する

以上で示されたFOXL2が*Sf1*発現を抑制する機構が*in vivo*においても同様に認められるかどうか、という点について検証を行うために、*Foxl2*ノックアウトマウスの胎仔卵巣における*Sf1*の発現をRT-PCR法で定量した。その結果、野生型に対して*Foxl2*ノックアウトマウスでは*Sf1*の発現が有意に亢進していた(図6)。これらは卵巣発生においてFOXL2が*Sf1*の発現を抑制していることを示唆するものである。さらに、ノックアウトマウスと野生型における*Sf1*発現の差は胎生13.5日で最も大きく、出生時にはその差を認めなかったことから、FOXL2による*Sf1*発現抑制は卵巣分化の比較的早期に限定されると考えられた。

おわりに

われわれは、卵巣特異的な*Sf1*の転写抑制において、卵巣特異的転写因子であるFOXL2による能動的な機構が関与することを示した(図7)。近年、性分化において、卵巣特異的因子と精巣特異的因子の拮抗的な機構が報告されるようになってきているが、今回の検討の結果は*Sf1*の転写制御においても、同様の機構が関与し制御されている事を示すものである。

今回の検討より、*Sf1*の卵巣での発現が能動的に抑制されていることが判明したことから、卵巣での*Sf1*の過剰は卵巣発生に何らかの不都合を起こす可能性があるのではないかと考えている。

また、*Foxl2*ノックアウトマウスにおいて、*Sf1*の発現上昇は、胎生16.5日までであったことから、FOXL2

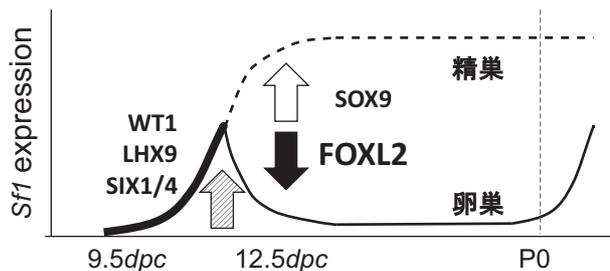


図7 マウス胎仔性腺における*Sf1*発現調節機構

による*Sf1*発現抑制は卵巣分化の比較的早期に限定される可能性が示された。*Foxl2*以外の抑制機序に関しては今後さらなる検討が必要であるが、今回解析に用いた*Sf1*近位プロモーターは卵巣発生初期以降(胎生14.5日以降)において、部分的にしか機能していない可能性が示唆されており[11, 12]、そうした卵巣における特異的エンハンサーの変動などが寄与している可能性がある。これらについては今後の解析が待たれるところである。

近年、熊本大学藤本らが未分化性腺の発生における*Sf1*の発現制御に関わる新たな因子としてSIX1/SIX4を報告した[13]が、SIX1/SIX4の*Sf1*への発現制御におけるFOXL2の作用に関しては今後の検討課題としたい。

一般にWT-KTSは転写因子として、下流遺伝子の転写活性、もしくは抑制に作用することが知られており、それらは標的遺伝子や結合する制御領域によって決まると考えられている。今回の報告は、WT1-KTSが同一の標的遺伝子に対し、同一の結合部位において、他の分子(この場合はFOXL2)の存在/非存在によって、転写活性が抑制されることを示した。こうしたWT1の転写制御については、これまで報告がなく、新たなWT1の制御機構として興味深いと考えている。WT1は性腺だけではなく、心臓や神経系の発生にも重要であり、今回の発見はそうした臓器発生におけるWT1の機能を検討するうえで貴重な示唆を与えるものと考えられる。

本検討は、卵巣分化を制御する新たな分子機構を明らかにしたものであり、今後のさらなる検討を通じて46, XX性分化疾患や卵巣形成不全の原因究明につながることを期待したい。

謝辞

本稿は2014年度に日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものである。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理事長 菅原 稔教授、第19回学術集會会長 北脇 城教授に感謝申し上げます。

引用文献

1. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117-121.
2. Kashimada K, Koopman P (2010) Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 137, 3921-3930.
3. Schlessinger D, Garcia-Ortiz JE, Forabosco A, Uda M, Crisponi L, Pelosi E (2010) Determination and stability of gonadal sex. *J Androl* 31, 16-25.
4. Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
5. Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22, 125-126.
6. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8, 654-662.
7. Sekido R, Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 455, 930-934.
8. Shen JH, Ingraham HA (2002) Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol Endocrinol* 16, 529-540.
9. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139, 1130-1142.
10. Wilhelm D, Englert C (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes Dev* 16, 1839-1851.
11. Beverdam A, Koopman P (2006) Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum Mol Genet* 15, 417-431.
12. Gao L, Kim Y, Kim B, Lofgren SM, Schultz-Norton JR, Nardulli AM, Heckert LL, Jorgensen JS (2011) Two regions within the proximal steroidogenic factor 1 promoter drive somatic cell-specific activity in developing gonads of the female mouse. *Biol Reprod* 84, 422-434.
13. Fujimoto Y, Tanaka SS, Yamaguchi YL, Kobayashi H, Kuroki S, Tachibana M, Shinomura M, Kanai Y, Morohashi K, Kawakami K, Nishinakamura R (2013) Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev Cell* 26, 416-430.
14. Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, Schlessinger D, Mizutani S, Koopman P (2014) FOXL2 transcriptionally represses Sfl expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB J* 28, 2020-2028.
15. Benayoun BA, Caburet S, Dipietromaria A, Bailly-Bechet M, Batista F, Fellous M, Vaiman D, Veitia RA (2008) The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum Mol Genet* 17, 3118-3127.