

尿道形成過程におけるアンドロゲンによる *Mafb* 遺伝子発現制御機構の解明

松下 祥子, 鈴木堅太郎, 山田 源

和歌山県立医科大学先端医学研究所遺伝子制御学研究室

はじめに

多くの生物種において、雄と雌を作り出す仕組み（性差構築）は生殖に不可欠であり、その確立は種の存続をかけた重要課題である。ヒトを含む哺乳類の性差構築は、遺伝的支配による性差構築と分化後の生殖腺より分泌されるホルモンによる支配をうけるもの（ホルモンによる性差構築）に大別される。外生殖器は、ホルモンによる性差構築を示す代表的な器官である。また、さまざまな種において子孫を残すため必要不可欠な生殖器官であり、雌雄においてその形態は大きく異なる。マウスの場合、外生殖器の原基である生殖結節（genital tubercle: GT）は、胎生10.5日目（E10.5）以降に体幹末端の総排泄腔領域から隆起する。E11.5~14.5の間、GTは著しく伸長し、その後E15.5以降になると精巣から分泌されるアンドロゲンの作用によって、形態学的な性差が認められるようになる。雄では将来尿道が形成される周辺の間葉細胞（尿道両側間葉細胞）と包皮が正中線に沿って癒合し、尿道がGT内部に取り込まれる（図1A）。また雄のGTは、雌に比べてサイズが増大し、陰茎および亀頭を形成する。一方、雌のGTは、尿道の取り込みが起こらず、GTは陰核を形成する[1, 2]。尿道形成過程は、特に顕著に性差がみられるプロセスであり、性ホルモンによる性差構築の分子基盤を理解するうえで有用なモデルである。また尿道下裂は、外生殖器に高頻度に見られる先天異常である[3]。よって、尿道形成過程の分子機構を解明することは、性差構築の理解に加えてその病態発症機構の理解にも寄与することが期待される。

外生殖器形成過程の分子機構は、遺伝子改変マウスを駆使した遺伝学的解析により明らかになりつつある。外生殖器は、間葉細胞、外胚葉性上皮細胞、総排泄腔由来の内胚葉性上皮細胞から構成されている。特に尿道両側

間葉細胞におけるアンドロゲン受容体（AR）シグナルが雄型の尿道形成に必須であることが明らかになっている[4]。さらに、尿道両側間葉細胞においてWntシグナルの細胞内伝達因子である β -cateninが雄型の尿道形成に関与していることが示唆されている[4]。このように雄型の尿道形成は、ARシグナルに加えて増殖因子による制御の重要性が示唆されているが、その詳細は明らかではなかった。これまでホルモンによる外生殖器形成における性差構築の理解が大きく遅れていた一因は、ARシグナルの標的遺伝子が同定されていなかったことにある。以前我々は、尿道の雄性化因子、特にアンドロゲン標的遺伝子の探索を目的として、ARシグナルが機能する尿道両側間葉細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った[5]。その結果、雄の尿道両側間葉細胞に強く発現する *Mafb* 遺伝子を同定した（図1B）。MAFBはベーシックジッパープロテイン型転写因子であり、血球分化などに重要な機能をもつことが報告されているが、ホルモン応答性や性差構築に関与するといった報告はなかった。我々は、このMAFBがARシグナルの下流で尿道の雄性化に重要な因子であることを *Mafb* 遺伝子改変マウスの解析などによって明らかにした[6]。しかしながら、尿道形成過程における *Mafb* 遺伝子の発現制御機構は、依然として不明であった。

本研究では、*Mafb* 遺伝子の発現制御機構を理解し、その発現制御エレメントを同定するために、マウスGTを用いた詳細な発現解析、*in silico* 解析、*in vitro* レポーターアッセイ、そしてARに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析（ChIP assay）を行った。また *Mafb* の上流因子の候補として、外生殖器雄性化因子の1つである β -cateninが *Mafb* の発現を制御する可能性についても検討を行った。

Mafb mRNA の発現は、アンドロゲン投与によって亢進する

遺伝子発現制御機構を理解するために、まず *Mafb* mRNA の発現を *in situ* hybridization 法により解析を

連絡先：松下祥子, 和歌山県立医科大学先端医学研究所遺伝子制御学研究室

〒641-8509 和歌山市紀三井寺811-1
TEL/FAX: 073-499-5026 内線: 5525
E-mail: smatsu@wakayama-med.ac.jp

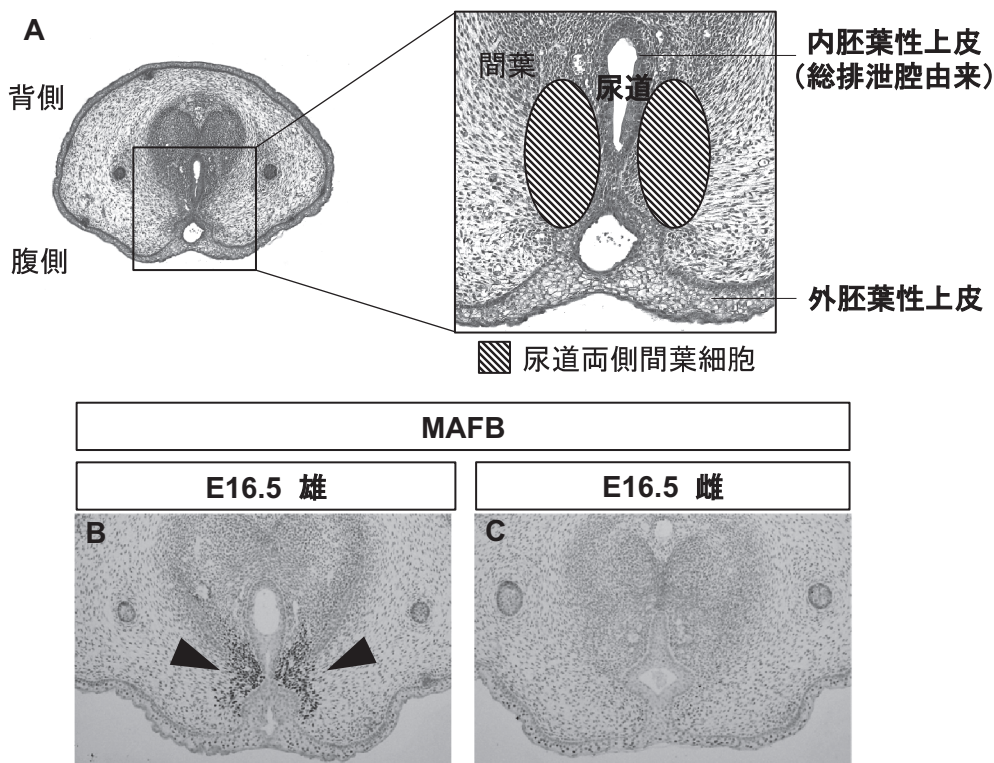


図1 マウス生殖結節 (GT) における MAFB の発現パターン
 (A) E16.5雄マウスのGTの冠状断面図。尿道周辺には尿道形成に重要な尿道両側間葉細胞が存在する。
 (B) E16.5マウスGTにおけるMAFBの発現。雄マウスでは、尿道両側間葉細胞にMAFBの発現が認められる(矢頭)。

行った。E13.5までは *Mafb* mRNA の発現に雌雄差が認められなかったが、E14.5から尿道両側間葉細胞において雄特異的な発現が認められた。次に *in vitro* 器官培養系を用いて、アンドロゲン投与によって *Mafb* mRNA の発現が亢進するかどうか定量的PCR法により解析を行った。その結果、アンドロゲン投与24時間後、雌雄どちらにおいても非投与群に比べてアンドロゲン投与群で *Mafb* mRNA の発現が亢進した。

Mafb 3'非翻訳領域(3'UTR)は、ARシグナルによって制御されるエンハンサー活性をもつ

Mafb mRNA の発現が尿道形成過程においてアンドロゲン投与によって顕著に亢進したことから、我々は *Mafb* がARシグナルの直接的なターゲットである可能性について検証した。*Mafb* 遺伝子近傍のアンドロゲン応答性の領域を明らかにするために、*Mafb* 遺伝子の配列を生物種間で比較した。その結果、5'上流領域、3'非翻訳領域(3'UTR)を含む約6.6kb(-2900~+3679, +1=転写開始点)は、多くの生物種で保存されていることが明らかになった。実際にこの領域がアンドロゲン応答性を有しているのかを検証するために、この領域をク

ローニングし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。アンドロゲン応答性を有するヒト肝がん細胞株であるHepG2細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、アンドロゲン投与群が非投与群に比べ約10倍の活性を示した。以上の結果より、*Mafb* 遺伝子近傍の多くの生物種に保存されている領域は、アンドロゲン応答性の領域であることが示唆された。

次に、この多くの生物種に保存されている領域の中で、アンドロゲンによる制御における重要な制御領域の同定を行った。まず、同領域の中で特に高い保存性を示した3'UTRに注目した。その結果、3'UTR前半部(+1362~+2307)・後半部(+2308~+3679)は、AR受容体シグナルによって制御されるエンハンサー活性をもつことが明らかになった。さらに、クロマチン免疫沈降実験、変異を導入したレポーターベクターを用いた解析により、雄のGTにおいてARが*Mafb* 3'UTR上に存在する2つの機能的なアンドロゲン応答エレメント(ARE)に結合することが示唆された。

Mafb 5'UTRもアンドロゲン応答性を示す

次に3'UTR以外の領域のプロモーターを含む5'上

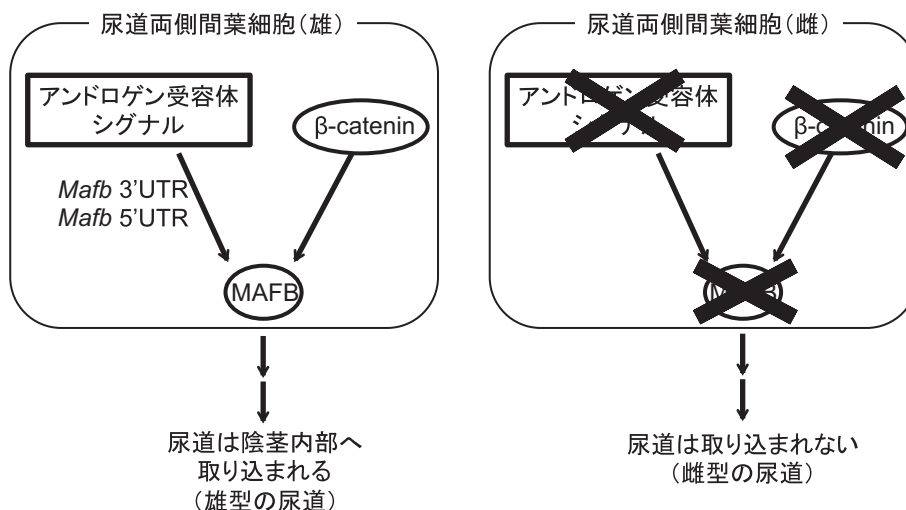


図2 マウス胎仔期尿道形成過程における MAFB の発現制御機構

流領域 (-2900~-1), 5' UTR (+1~389) に注目した。その結果, 5' UTR はアンドロゲン応答性を示し, 一方でプロモーターを含む 5' 上流領域はアンドロゲン応答性を示さなかった。さらに 5' UTR に関して詳細に解析を行ったところ, 5' UTR の後半部 (+250~+389) がアンドロゲン応答性の領域であることが示唆された。

外生殖器雄性化因子の1つであるβ-catenin は, *Mafb* の上流候補因子である

本研究により, *Mafb* の 3' UTR だけでなく, 5' UTR もアンドロゲン応答性の領域であることが示唆された。しかしながら, 5' UTR には 3' UTR と違ってアンドロゲン応答エレメント (ARE) は存在しなかった。そこで, 5' UTR を介したアンドロゲンによる発現制御には AR に加え, 他の因子を介した制御の可能性が想起された。そこで我々は, *Mafb* の上流候補因子としてβ-catenin に注目した。β-catenin は Wnt シグナルの構成因子として, 転写制御因子としての機能を有している。Wnt シグナルは, 胚発生やがんに関連する多くのタンパク質のシグナルネットワークである[7]。当研究室の解析により, β-catenin が外生殖器雄性化因子の1つであることが明らかになっている[4]。間葉細胞特異的β-catenin knock-out マウスの雄では, 正常な雄型の尿道形成が認められなかった。またβ-catenin は AR と直接結合して, 下流遺伝子の転写を協調的に活性化することも報告されている[8]。そこでβ-catenin が *Mafb* の発現をマウス GT において制御するか検討を行った。まず外生殖器における MAFB とβ-catenin の発現の比較を行ったところ, MAFB とβ-catenin の発現は E16.5 の雄の尿道周辺間葉細胞で

部分的に重複した。さらにβ-catenin が *Mafb* の発現を誘導する可能性をレポーターアッセイにより検証したところ, 恒常的活性化型β-catenin を発現させた実験群では非発現群に比べ10倍以上の活性を示した。以上の結果より, 外生殖器雄性化因子の一種であるβ-catenin は, *Mafb* の上流候補因子である可能性が示唆された。

おわりに

本研究により *Mafb* 遺伝子 3' 非翻訳領域 (UTR) がアンドロゲン受容体 (AR) シグナルによって制御されるエンハンサー様の領域であること, そして同領域に含まれる 2 個のアンドロゲン応答エレメント (ARE) が明らかになった。また 3' UTR に加えて, 5' UTR もアンドロゲン応答領域を含んでいた。さらに, 外生殖器雄性化因子の1つであるβ-catenin が *Mafb* の発現を制御する可能性が初めて示唆された (図2) [9]。3' UTR は, 従来から解析が進んでいる翻訳制御のみならず, 転写制御にも重要であることが報告され, 近年注目されている。実際に外生殖器先天異常である尿道下裂の患者の中には, *Bmp7* 遺伝子や *Mafb* 遺伝子と同じ bZip ファミリーの *Azf3* 遺伝子の 3' UTR 上の変異が報告されている [10, 11]。このように UTR を介した転写制御メカニズムをさらに詳細に解析することは, 尿道下裂をはじめとした病態解明に役立つと考えられる。さらにアンドロゲン応答性の遺伝子発現制御機構のモデルとしても今後注目される。

Wnt シグナルの重要な制御因子であるβ-catenin は, 外生殖器雄性化因子の1つであることが明らかになっているが, 尿道両側間葉細胞における下流因子は不明で

あった。今回の解析によって β -catenin が *Mafb* の発現を制御する可能性が示唆された。今後は遺伝子改変マウスを用いた解析に加え、タンパク質相互作用解析等を行い、外生殖器における AR と β -catenin の直接的な相互作用の可能性も含めて、詳細に分子メカニズムを調べる予定である。さらに、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな解析を行い、*Mafb* を軸とした性差発現制御機構を理解することで、これまで未解明であった外生殖器形成過程におけるホルモン依存的性差構築機構の全容が解明されることが期待される。

謝 辞

本稿は2015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。執筆する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 苛原 稔教授、第20回学術集会会長 藤澤正人教授、ならびに筒井和義教授、井上 聡教授に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Yamada G, Suzuki K, Haraguchi R, et al (2006) Molecular genetic cascades for external genitalia formation: an emerging organogenesis program. *Dev Dyn* 235, 1738-1752.
2. Suzuki H, Suzuki K, Yamada G (2016) Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters. *Dev Growth Differ* 57, 639-647.
3. van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, Franke B, Knoers NV, Roeleveld N (2012) A etiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update* 18, 260-283.
4. Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R, et al (2009) Genetic interactions of the androgen and Wnt/ β -catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol Endocrinol* 23, 871-880.
5. Nishida H, Miyagawa S, Matsumaru D, et al (2008) Gene expression analyses on embryonic external genitalia: identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes. *Congenit Anom (Kyoto)* 48, 63-67.
6. Suzuki K, Numata T, Suzuki H, et al (2014) Sexually dimorphic expression of *Mafb* regulates masculinization of the embryonic urethral formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 16407-16412.
7. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W (2008) Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of β -catenin in mice. *Genes Dev* 22, 2308-2341.
8. Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, et al (2007) Liganded androgen receptor interaction with β -catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* 277, 20702-20710.
9. Matsushita S, Suzuki K, Ogino Y, et al (2016) Androgen regulates *Mafb* expression through its 3' UTR during mouse urethral masculinization. *Endocrinology* 157, 844-857.
10. Chen T, Li Q, Xu J, et al (2007) Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet* 15, 23-28.
11. Beleza-Meireles A, Töhönen V, Söderhäll C, et al (2008) Activating transcription factor 3: a hormone responsive gene in the etiology of hypospadias. *Eur J Endocrinol* 158, 729-739.