

原 著 (第13回徳島医学会賞受賞論文)

性分化と精子形成機構に対するプロテオミクスからのアプローチ

佐藤 陽¹⁾, 新家 利¹⁾, 陳 剛¹⁾, 閻 洪 涛¹⁾,
坂本 梢¹⁾, 楊 新 軍¹⁾, 梅野 真由美²⁾, 中堀 豊¹⁾

¹⁾ 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体制御医学講座分子予防医学分野

²⁾ 徳島大学医学部保健学科

(平成16年10月20日受付)

(平成16年11月18日受理)

ヒトの性分化は体細胞の生殖細胞支持細胞で、精巣決定因子として発見された SRY (sex determining region on the Y chromosome) が発現し¹⁾、未分化性腺から精巣へと分化される。精巣決定因子である SRY は Y 染色体上に存在し、204 のアミノ酸をコードしている 1 つのエクソンからなり、その中央部に HMG box と呼ばれる DNA 結合領域が存在することから、転写因子として考えられてきた²⁾。しかし、SRY が発見されてから、14 年間、多くの研究者の努力にも関わらず、その標的遺伝子は発見されておらず、性分化の詳細なメカニズムも明らかとなっていない。そこで、われわれはプロテオミクスという手法を用いて、SRY 影響下にあるタンパク質を同定し、性分化のカスケードを明らかにすることを目指した。

方 法

1. SRY 安定発現株の作成

宮崎より提供された pCXN2 ベクターにヒトの SRY cDNA を挿入し、発現ベクターを構築した³⁾。構築した発現ベクターを FuGENE 6 (Roch) を用いてヒト精巣腫瘍由来の NT2/D1 (ATCC) にトランスフェクションし、G418 を含む培養液中で選択することによって SRY 安定発現株を得た。またコントロールとしてベクターのみをトランスフェクションさせた細胞を使用した。

2. 二次元電気泳動とタンパク質の同定

作成した細胞からタンパク質を抽出後、二次元電気泳動を行った。pH4-7 の 11cm IPG strip (Amersham) に 500 µg のタンパク質を添加し、IPGphor (Amersham) を用いて等電点電気泳動を行った。平衡化処理を行った後、二

次元目の泳動ゲル (13×13cm, 12% アクリルアミド) 上に固定した。SDS 電気泳動は 20mA 定電流で行った。泳動後、銀染色を行い、二次元電気泳動解析ソフトである PDQuest (Bio Rad) を用いて定量的に解析した。変化がみられたタンパク質はゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行なった後、4700 Proteomics Analyzer (ABI) を用いて MALDI TOF/TOF 解析を行った。同定は MASCOT search (<http://www.matrixscience.com/>) を用いて行った。

3. cell cycle に対する解析

80% コンフルエントになった細胞を trypsin で剥がした後、PBS () で 2 回洗浄を行った。

20 分で冷却した 70% エタノールで固定後、500 µg/ml RNase, 20 µg/ml propidium iodide を含む PBS () で懸濁し、セルアナライザー (コールター EPICS XL) で解析した。

結 果

1) 二次元電気泳動とタンパク質の同定

SRY 発現ベクターを構築後、NT2/D1 細胞にトランスフェクションし、SRY 安定発現株を作成した。作成した細胞が SRY を発現しているのを RT-PCR 法で確認後、タンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。銀染色後、二次元電気泳動解析ソフトである PDQuest を使用し、定量解析を行った。その結果を図 1 に示したが、観察されたスポットのうち 14 個が 2 倍以上 up regulate, 38 個が 1/2 以下に down regulate と多くのタンパク質の発現が抑制されていることがわかった。

次に、これら変化のみられたタンパク質を切り出し、

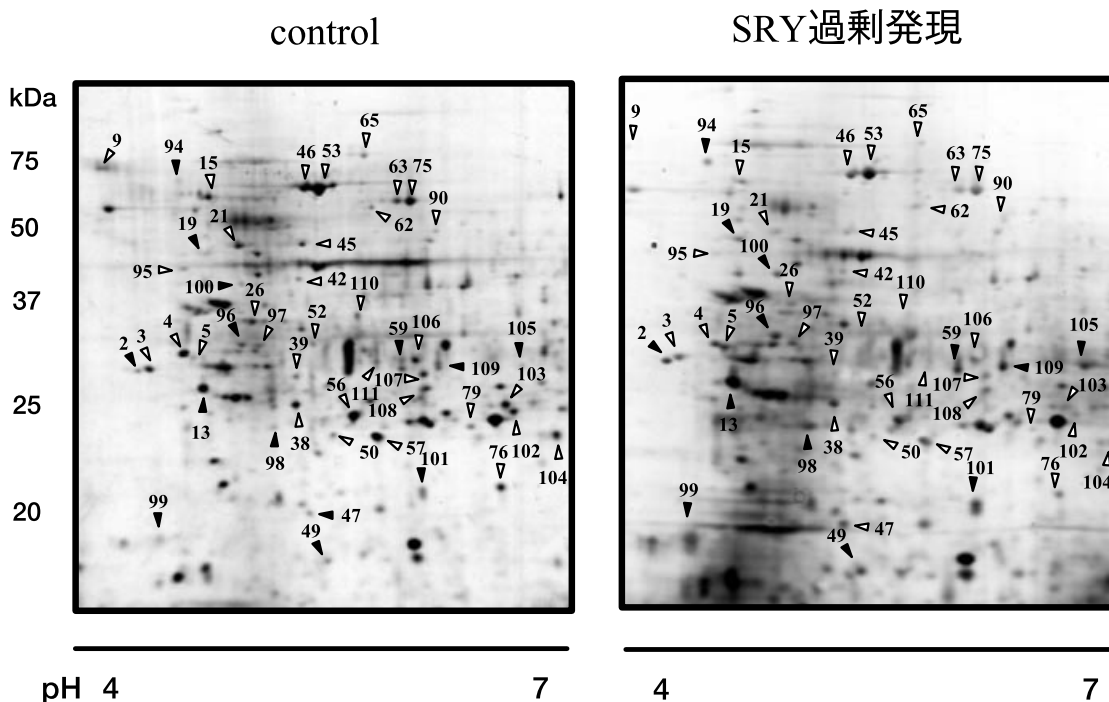


図1. コントロール細胞と SRY 過剰発現細胞の二次元電気泳動像の比較

二次元電気泳動後、銀染色を行い、PDQuest (Bio Rad) でスポットの定量解析を行い、SRY 過剰発現で、2 倍以上 up regulate したスポットを ▽ で、1/2 以下に down regulate したスポットを △ で示した。

ゲル内でトリプシン消化後、MALDI TOF MS を用いて質量分析し、MASCOT search というデータベースによりタンパク質の同定を行った。今回、同定されたタンパク質の結果の一部のみを示すが、53番のスポットは60 kDa heat shock protein (HSP60)、75番のスポットはprobable protein disulfide isomerase (ER60) であることがわかった。HSP60はミトコンドリアタンパク質で、タンパク質の折りたたみや輸送といった機能がある。また、ER60は intrachain と interchain の S S 結合を再構成する機能があり、HSP60、ER60共に細胞の増殖や分化と関係があると報告されている⁴⁾。

2) SRY 過剰発現の影響

このように SRY 過剰発現により、抑制されたタンパク質 HSP60や ER60は増殖活性や分化と関係があるタンパク質であったことから、多くのタンパク質の発現が抑制されていたことから、SRY の過剰発現は増殖に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、SRY 過剰発現による NT2/D1細胞の増殖に対する影響を MTT assay 法で調べた。その結果 SRY 過剰発現細胞はコントロールと比較し、増殖が抑制されたことがわかった (data not shown)。

次に、SRY 過剰発現による増殖活性抑制のメカニズムを調べるため cell cycle に対する影響を検討した。その結果、コントロール細胞では G0/G1期の割合が高く、41.8%、また S 期が40.9%、G2/M 期が17.2%であったのに対し、SRY 過剰発現株では G0/G1期の割合が減少し、25.3%、S 期、G2/M 期は上昇し、S 期は52.9%、G2/M 期は21.8%であった (図2)。これらの結果から SRY の発現は cell cycle の特に S 期以降にダメージを与えることがわかった。

考 察

SRY は HMG box と呼ばれる DNA 結合領域をもつことから転写因子であると考えられてきた。しかし、SRY が発見されてから14年間経過したが、標的遺伝子は明らかとなっておらず、また、生体内での詳細な機能もわかっていない。従って転写因子以外の新たな機能が存在する可能性も考えられる。そこで、われわれは SRY の性分化に関するメカニズムに対して、何らかの情報を得るため、SRY 過剰発現株を作成し、二次元電気泳動を行い、プロテオミクスという手法を用いて SRY 影響下にあるタンパク質を解析することを検討した。その結果、SRY

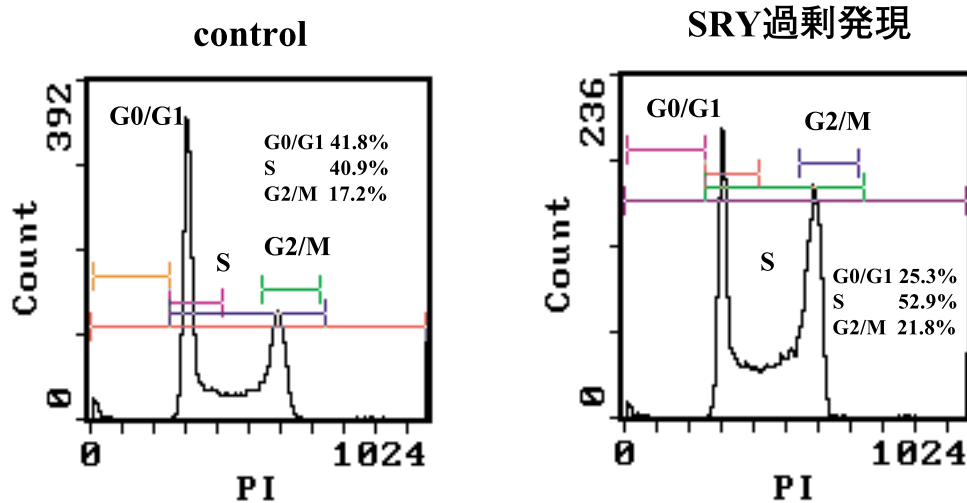


図2 . SRY 過剰発現による NT2/D1 細胞の細胞周期に対する影響

の過剰発現により非常に多くのタンパク質の発現が影響を受けており、その多くは抑制されていることが明らかとなった。抑制されていたタンパク質の中に、HSP60やER60といったタンパク質を構築するのに重要なタンパク質が含まれており、またこれらのタンパク質は細胞の増殖活性や分化と関係があると報告されていることから³⁾、SRYの過剰発現は細胞の増殖活性に影響を与えていることが予測された。実際に増殖活性を測定してみると、コントロールと比較し、SRY過剰発現株の増殖活性は抑制されていることがわかった。また、細胞周期に対する影響を調べると、S期以降に影響を与えていることがわかった。細胞が分裂を繰り返すにはDNAを複製し、染色体を分裂させる必要がある。1つの細胞が分裂して2つの細胞に分裂する期間を細胞周期といい、DNA合成準備期のG1期、DNA合成期のS期、細胞分裂準備期のG2期、細胞分裂期のM期がある。SRYの発現によりS期以降の割合が高くなったということは、DNA合成から細胞分裂の間に何らかの影響を示し、増殖活性を抑制させたと考えられた。

一方、メダカの性分化においては、stage 38~39にかけて生殖細胞の数は雌の方が雄より多くなり、雌の卵原細胞は孵化後も増殖し続けるが、雄の精原細胞は一時細胞分裂を停止する。また、雌の卵母細胞は孵化後、すぐに減数分裂を開始するが、雄で減数分裂が始まるのは孵化後20~30日目からといわれており、雄雌間で生殖細胞の増殖活性や減数分裂の開始時に差が認められている⁵⁾。

今回のわれわれの結果もSRYを過剰発現させたこと

により、増殖活性を抑制させたことを示した。このことはヒトの間でも男女間で生殖細胞の増殖活性に差を生じている可能性を示唆している。

今後、変化がみられたスポットの同定が進むことで、ヒトの性分化のメカニズムに関するさらなる情報が得られると思われる。

謝 辞

二次元電気泳動およびMALDI TOF MSの使用に関して、御協力いただきましたゲノム機能センター遺伝情報分野の板倉光夫教授に深謝致します。また、本研究を遂行する上で多大の協力を頂いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体制御医学講座分子予防医学分野（主任：中堀豊教授）の教職員各位に感謝します。

文 献

- 1) Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., *et al.*: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244, 1990
- 2) 新家利一, 中堀豊: 性の分化と性染色体. *日本臨床*, 62: 247-254, 2004
- 3) Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., *et al.*: Expression vector system based on the chicken beta actin promoter directs efficient production of

- interleukin-5. *Gene*, 15 : 269-277, 1989
- 4) Rob, S., Marco, G., Yvonne, D., Taoufik, O., *et al.* : Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco 2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1650 : 73-91, 2003
- 5) Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., *et al.* : Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1* involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.*, 231 : 518-526, 2004

Proteomics approach for the mechanism of sex determination

*Youichi Sato*¹⁾, *Toshikatsu Shinka*¹⁾, *Gang Chen*¹⁾, *Hong-Tao Yan*¹⁾, *Kozue Sakamoto*¹⁾, *Xin Jun Yang*¹⁾, *Mayumi Umeno*²⁾, and *Yutaka Nakahori*¹⁾

¹⁾Department of Human Genetics and Public Health, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, and ²⁾School of Health Science, The University of Tokushima Faculty of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

SRY (sex determining region on the Y chromosome) was a gene isolated as the testis determining factor on the Y chromosome in 1990. The gene consisted of single exon and encodes a 204 amino acid protein. Since SRY protein has a HMG domain, which functions as DNA binding domain, it has been considered to be a transcription factor. Direct target of SRY, however, have not yet identified for 14 years.

In this study, we have performed a proteomics approach to analyze the function of SRY. Two dimensional gel electrophoresis after over expression of SRY showed considerable down regulation in many proteins. Among the proteins, mitochondrial 60 kDa heat shock protein (HSP60) and probable protein disulfide isomerase (ER60) remarkably decreased. Since they were reported to be associated with cell proliferation and differentiation, we investigated the effects of SRY on cell cycle profiles. It was shown that the over expression of SRY negatively regulated the cell growth with significant S or G2/M arrest of cell cycle.

Key words : SRY, sex determination, Y chromosome, proteomics