

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18237

研究課題名（和文）卵巣機能制御における転写因子Runx3の標的遺伝子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the target genes of the transcription factor Runx3 in the regulation of ovarian function

研究代表者

小島 史也 (Ojima, Fumiya)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10771157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵胞内成長因子のactivinやinhibinの遺伝子（Inhbb）の転写活性は、転写因子Runx3によって上昇することが分かった。また、その転写活性はエストロゲン受容体（ER α ）とそのリガンドのエストロゲン（E2）によってさらに上昇することが分かった。マウスInhbb上流にはRuntドメイン転写因子結合配列が存在し、その配列を含む領域にRunx3が結合していることが分かった。InhbbはRunx3の標的遺伝子の一つであり、直接的に転写制御されていることが示唆された。Runx3はactivinやinhibinの転写を制御することによって卵巣発達制御に関与する転写因子であることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Runx3はマウス雌生殖機能制御に重要な転写因子であることは示唆されているが、その詳細は不明であった。activinやinhibinは、マウス卵巣において卵巣発達や排卵に重要なステロイド産生や、視床下部-下垂体系からのホルモン受容体に関わる卵巣顆粒膜細胞の成長因子である。本研究では、Runx3によってInhbbの転写制御が直接的に促進されていることを明らかにすることができた。また、エストロゲン受容体やE2とRunx3の相互作用も明らかにできた。これらは卵巣機能における卵巣発達や排卵の制御機構における転写因子Runx3の新規作用を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The transcriptional activity of the genes for activin and inhibin (Inhbb), intrafollicular growth factors, was increased by the transcription factor Runx3. The transcriptional activity was further increased by estrogen receptor alpha (ER α) and its ligand estrogen (E2). Several Runt domain transcription factor binding sequences are present upstream of mouse Inhbb, and Runx3 was found to bind to the region containing these sequences. These findings suggest that Inhbb is one of the target genes of Runx3 and is directly transcriptionally regulated. Runx3 may be a transcription factor involved in the regulation of follicle development by regulating the transcription of activin and inhibin.

研究分野：内分泌学

キーワード：Runx3 Inhbb 卵巣顆粒膜細胞 転写制御 マウス 卵巣 成長因子 ステロイドホルモン

1. 研究開始当初の背景

Runx 転写因子ファミリーは、DNA との結合を担う Runt ドメインをもつ Runx タンパクと、core binding factor (CBF) /polyomavirus enhancer binding protein 2 (PEBP2) タンパクとのヘテロ二量体として機能する。哺乳類における Runx タンパクは、Runx1, Runx2, Runx3 の 3 種類が同定されており、Runx1 は造血細胞の分化や神経発生の制御、Runx2 は骨形成の制御、Runx3 は胃や腸における腫瘍抑制に関与することが知られている。また 2000 年代に入ると、これら Runx 転写因子が卵巣機能制御に関与していることが明らかになってきた。*Runx3* 欠損マウス (*Runx3*^{-/-}マウス) の雌は無排卵で不妊になることが報告され、Runx3 のマウス雌生殖機能制御への関与が示唆された。すなわち、野生型マウスであれば性的に成熟する 8 週齢においても *Runx3*^{-/-}マウスの卵巣内では成熟した胞状卵胞数が減少しており黄体を欠き、子宮は卵巣由来の雌性ホルモン (E2) 依存的な細胞増殖がみられず退化的である。雌生殖系においてその重要性が示唆された Runx3 の作用について、その詳細の多くが不明であったため、雌生殖系である視床下部 - 下垂体 - 卵巣軸における Runx3 の卵巣機能制御のメカニズムの解明は重要な課題の 1 つであると考えた。

申請者はこれまでに、視床下部 - 下垂体系に関する Runx3 の新たな知見を報告するとともに、卵巣に関する Runx3 の知見として次のことを報告している。マウス卵巣における *Runx3* mRNA 発現の局在を調べ、卵胞成熟過程における一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の卵胞顆粒膜細胞に *Runx3* mRNA 発現が局在していることを明らかにした (図 1)。*Runx3*^{-/-}マウス卵巣では、activin や inhibin の遺伝子である *Inha*, *Inhba*, *Inhbb* の mRNA 発現が低下していることを明らかにした。予備的研究において、卵胞成熟初期の卵胞顆粒膜細胞において、*Inhbb* mRNA 発現が低下傾向にあることが分かっている。さらに、マウスゲノムデータベースおよび転写因子結合予測配列検索により、*Inhbb* の上流には Runx 転写因子結合配列が存在することが判明した。これにより、卵胞顆粒膜細胞における Runx3 の標的遺伝子の候補として *Inhbb* が考えられた。

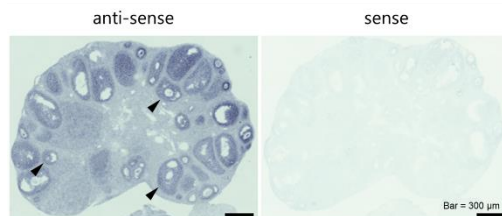


図1 マウス卵巣における*Runx3* mRNAの発現局在
Runx3 mRNA発現は卵胞顆粒膜細胞に発現している(矢頭)。

2. 研究の目的

卵胞顆粒膜細胞における卵巣機能制御における Runx3 の新規作用の解明を目的として、Runx3 が *Inhbb* の転写制御に関与しているかを明らかにする。また、Runx3 と結合することが知られている核内受容体であるエストロゲン受容体 (ER) との共役があるかどうか併せて明らかにする。

3. 研究の方法

Inhbb のプロモーター領域の解析

マウスの組織より抽出したゲノムから、*Inhbb* の転写開始点を+1 として、5' 上流域-2579bp までの欠失変異コンストラクトを作製した。欠失変異コンストラクトを pGL3-Basic vector に組み込んだレポーターベクターを、初代培養系を用いたマウス卵胞顆粒膜細胞やマウス卵胞顆粒膜細胞由来の培養細胞株である OV3121 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

Runx3 発現およびエストロゲン受容体発現による *Inhbb* プロモーター活性の解析

pcDNA3 vector に、*Runx3* cDNA 配列を組み込んだ Runx3 発現ベクターおよびエストロゲン受容体遺伝子である *Esr1* cDNA を組み込んだ ER 発現ベクターを作製した。*Inhbb* 転写制御における Runx3 と ER の作用を明らかにするため、これらの発現ベクターを OV3121 細胞にレポーターベクターとコトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

Runx 転写因子結合配列に対する Runx3 結合能の解析

Runx3 発現による *Inhbb* 転写制御への作用が *Inhbb* の上流に Runx3 が結合することによるものかを確認するため、OV3121 細胞および HepG2 細胞とルシフェラーゼアッセイに用いた各ベクターと Runx3 抗体を用いて ChIP アッセイを行った。

4. 研究成果

Inhbb 上流-843~+58bp コンストラクトは初代培養系を用いたマウス卵胞顆粒膜細胞においても転写活性を有していた (図 2)。OV3121 細胞においても、-843/+58 コンストラクトは活性を有していた。また、*Inhbb* 上流-63~-40bp の範囲内が転写活性を有しており、-843~-821bp の範囲内でこの転写活性は促進されていることが考えられた (図 3)。

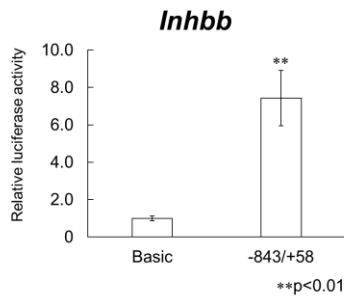


図2 マウス卵巣顆粒膜細胞の初代培養系を用いたプロモーター解析

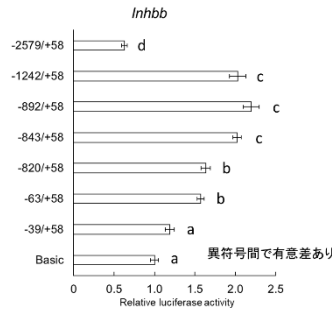


図3 OV3121細胞を用いたプロモーター解析

OV3121 細胞において、-843/+58 のコンストラクトが有する転写活性は、Runx3 発現により上昇した (図 4)。さらに、Runx3 による促進作用はER α とそのリガンドのE2によってさらに上昇した (図 5)。Runx3 は *InhbB* の転写を促進的に制御しており、E2 存在下ではER α とともに相乗的に転写を促進していることが考えられた。

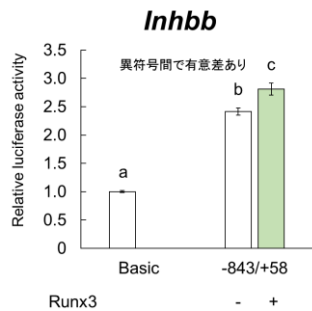


図4 Runx3発現による作用の解析

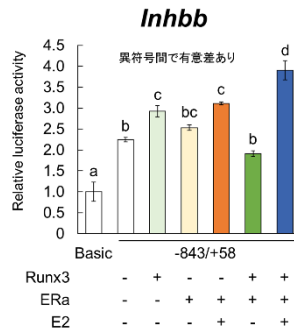


図5 ER α 発現による作用の解析

Runx3 発現ベクターをトランスフェクションした OV3121 細胞からマウス Runx3 抗体による ChIP で得られた DNA 断片に対して、ルシフェラーゼアッセイにおいて Runx3 の促進的作用が見られた *InhbB* 上流域に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、Runx3 を過剰発現させた場合に Runx 転写因子結合配列を含む DNA の濃縮レベルはコントロール群と比較して上昇した。

ルシフェラーゼアッセイで用いたレポーターコンストラクトおよび Runx3 発現ベクターをコトランスフェクションしたヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を用いて ChIP アッセイを行ったところ、OV3121 細胞と同様の結果が得られた (図 6)。Runx3 は-843~-821bp 内の Runx 転写因子結合配列に結合し、*InhbB* の転写制御に関与していることが考えられた。

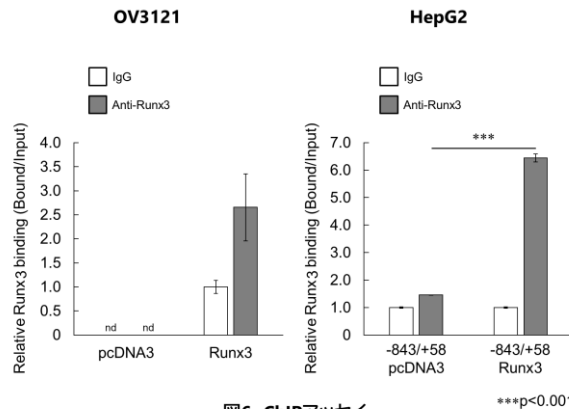


図6 ChIPアッセイ

本研究の結果から転写因子 Runx3 の卵巣機能制御における新規の役割として、Runx3 は卵巣顆粒膜細胞において卵巣発達やステロイド合成に重要な成長因子をコードする *InhbB* を標的遺伝子として転写を促進し、また、ER α と協同的に作用することが示唆された (図 7)。

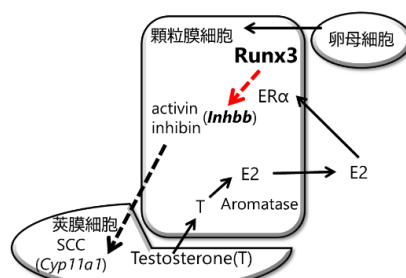


図7 卵巣顆粒膜細胞におけるRunx3の役割(仮説)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokogi Kyoka, Goto Yuki, Otsuka Mai, Ojima Fumiya, Kobayashi Tomoe, Tsuchiba Yukina, Takeuchi Yu, Namba Masumi, Kohno Mayumi, Tetsuka Minami, Takeuchi Sakae, Matsuyama Makoto, Aizawa Sayaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Neuromedin U-deficient rats do not lose body weight or food intake	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-21764-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横木杏香, 大塚舞, 小島史也, 竹内優羽, 手塚都仁, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香
2. 発表標題 ラットにおけるニューロメジンUの欠損は体重も摂食量も減少させない
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋純夫, 岩崎拓弥, 小島史也, 木村敦, 竹内栄
2. 発表標題 マウス子宮におけるKallikrein 1 遺伝子 (Klk1) の発現制御機構
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島史也, 御興真穂, 相澤清香, 竹内栄, 高橋純夫
2. 発表標題 転写因子Runx3のマウス卵巣顆粒膜細胞におけるInhbb転写制御への関与
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横木杏果, 小島史也, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香
2. 発表標題 ラットにおけるニューロメジンU遺伝子欠損の摂食や肥満への影響
3. 学会等名 2021年度中四国地区生物系三学会合同大会香川大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横木杏香, 小島史也, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香
2. 発表標題 ニューロメジンU遺伝子改変ラットにおける摂食と脂肪蓄積の解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島史也, 藤岡竜矢, 相澤清香, 御輿真穂, 竹内栄, 高橋純夫
2. 発表標題 マウス卵巣におけるエストロゲン合成酵素アロマターゼ遺伝子Cyp19a1の発現制御
3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島史也, 泰山浩司, 竹内栄, 高橋純夫
2. 発表標題 マウス卵巣顆粒膜細胞のInhbb転写制御におけるRunx3の関与
3. 学会等名 日本動物学会第91回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤佑紀, 横木杏香, 小島史也, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香
2. 発表標題 ニューロメジンU (NMU) 遺伝子改変ラットを用いたストレス応答機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第91回オンライン大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 自然科学教室 https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=104
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------