

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770068

研究課題名(和文) ゲノムの多機能性を検証する：その意義とメカニズム

研究課題名(英文) The significance of and the mechanism underlying the genomic multi-functionality.

研究代表者

木村 敦 (KIMURA ATSUSHI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：90422005

研究成果の概要(和文)：哺乳類のゲノム配列が組織によって異なった機能を持つというゲノム配列の多機能性について、3つの遺伝子座を用いて検証した。その結果、いくつかのゲノム配列が組織によって異なった転写調節活性を持つことが明らかになった。そして、このような組織による機能の違いは、エピジェネティックな状態の違いや調節配列自体が転写されているかどうかによって決められることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I investigated whether the functional regions that we identified before at three mouse gene loci have different roles in different tissues. I found that some of the regions showed different activities to regulate gene transcription in different tissues. This difference is probably attributed to the epigenetic status and the transcription of the regulatory sequence itself.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：ゲノム、クロマチン、転写、エピジェネティクス、卵巣顆粒膜細胞、noncoding RNA

1. 研究開始当初の背景

主要な生物のゲノムプロジェクトが終了してポストゲノムと呼ばれる研究が盛んに行われているが、そんな中でもエクソン以外のゲノム配列が持つ機能についてはほとんどわかっていない。本研究はそのようなエクソン以外のゲノム配列が持つ機能を明らかにするために始まった。最初に卵巣と精巣においてクロマチン構造の緩んでいる領域を探することで、生殖器官で今まさに機能を発揮しているゲノム領域(機能ゲノム領域)を探

索した。その結果、卵巣顆粒膜細胞で発現する3つの遺伝子座(Amhr2、Scd2、POP)において多数の機能ゲノム領域を同定した。興味深いことに、これらの機能ゲノム領域の多くが卵巣だけでなく肝臓などの他の組織でもクロマチン構造の緩んだ状態にあることがわかった。このことは、これらの機能ゲノム領域の多くが卵巣だけでなく他の組織でも何らかの機能を持つ多機能性の配列であることを示唆した。そして、実際にAmhr2遺伝子座で同定した2つの機能ゲノム領域の

うち1つ (HSII) は、卵巣で *Amhr2* を活性化する一方で肝臓ではその発現を抑制するという多機能性を *in vitro* の実験で示した。このことから、同定した他の機能ゲノム領域も同様に多機能性を示す可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は哺乳類のゲノムが持つすべての機能を明らかにすること、すなわちゲノム機能の完全解明である。今回は、機能的に無関係な、しかしいずれも卵巣顆粒膜細胞で非常に高い発現をする3つの遺伝子座 (*Amhr2*, *Scd2*, *POP*) で同定した機能ゲノム領域の多機能性について調べた。これまでの解析で同定した機能ゲノム領域の多くが遺伝子発現調節に関わることが示唆されていることから、本研究ではこれらのゲノム配列による転写調節メカニズムを解析した。3つの遺伝子座で明らかになったメカニズムを比較することにより、ゲノムが持つ多機能性を生み出すメカニズムやその意義について考察した。

3. 研究の方法

本研究ではマウスの卵巣顆粒膜細胞と肝臓をモデルにして、各遺伝子座で同定した機能ゲノム領域の転写調節機能について以下のような検討を行った。

(1) *in vitro* における転写調節活性の検証。

まずはそれぞれの機能ゲノム領域が持つ転写調節活性を *in vitro* のレポーター解析で検証した。同定した機能ゲノム領域をクロニングして近傍のタンパク質コード型の遺伝子 (すなわち *Amhr2*, *Scd2*, *POP*) のプロモーターとルシフェラーゼ遺伝子につないだ。このコンストラクトを卵巣顆粒膜細胞由来の OV3121 や肝臓由来の Hepa1-6 などの培養細胞や顆粒膜細胞の初代培養系にトランスフェクトして、2日後にルシフェラーゼ活性を測定した。これにより、それぞれの機能ゲノム領域が各遺伝子のプロモーター活性をどのように変化させるか検討した。

(2) *in vivo* における転写調節活性の検証。

次に同定した機能ゲノム領域が *in vivo* でどのような転写調節活性を持つか、トランスジェニックマウスを作製して検討した。(1)で述べたコンストラクトにおいてルシフェラーゼを GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子に置換したコンストラクトを用意し、マウス受精卵の雄性前核にインジェクトした。その後、生まれてきたマウスの尻尾から DNA を抽出してインジェクトしたコンストラク

トがゲノムに導入されているかどうか調べた。導入されていたマウスについては野生型マウスと交配させて F1 マウスを作製して解析に用いた。ここでは卵巣と肝臓における GFP 遺伝子の発現パターンを調べた。

(3) エピジェネティックな調節の検証。

ゲノムが多機能性を発揮するメカニズムの1つはヒストン修飾や DNA メチル化状態が組織によって異なることにあると考えられる。そこで、卵巣顆粒膜細胞と肝臓において同定した機能ゲノム領域がどのようなヒストン修飾状態にあるのかをクロマチン免疫沈降法によって検証した。POP 遺伝子座については CpG アイランドが存在するので、bisulfite sequencing 法を用いて DNA メチル化パターンを調べた。

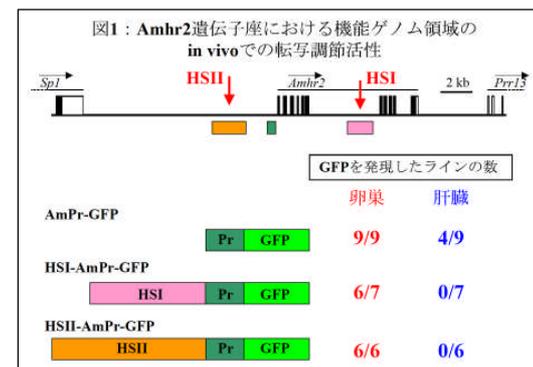
(4) 調節領域自体が転写されているかどうかの検証。

近年の研究によると、タンパク質をコードしないゲノム領域の多くが noncoding RNA として転写されており、近傍の遺伝子発現を調節しているという例が多数報告されている。そこで、本研究でも、同定した機能ゲノム領域自体が卵巣と肝臓で転写されているのかについて RT-PCR 法によって検討した。

4. 研究成果

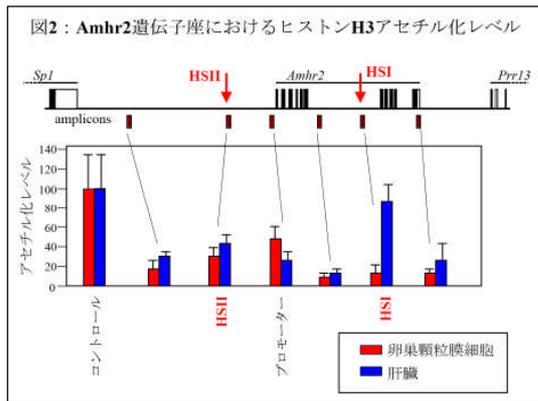
ここではそれぞれの遺伝子座について本研究で明らかにしたことを記述する。

(1) *Amhr2* 遺伝子座の機能ゲノム領域。

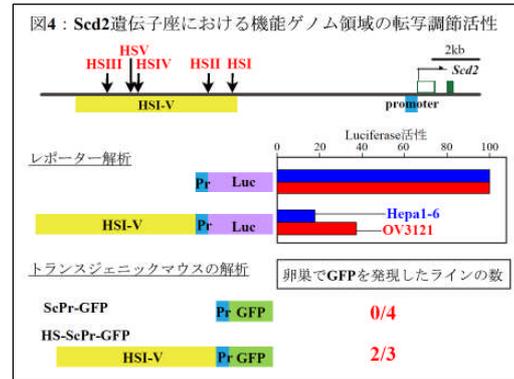
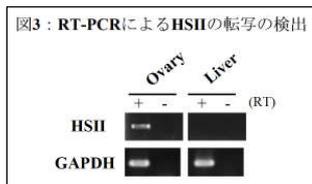


この遺伝子座では2つの機能ゲノム領域 (HSI, HSII) を同定した (図1)。これまでの *in vitro* の解析結果によると、卵巣顆粒膜細胞由来の OV3121 細胞において HSII が *Amhr2* のプロモーター活性を有意に上昇させる一方で、肝臓由来の Hepa1-6 細胞においては HSI と HSII がともにそのプロモーター活性を抑制することがわかっている。そこで、今回はまず *in vivo* における HSI と HSII の転写調節活性を検討するために、図1のようなコンストラクトを用意してトランスジェニックマ

ウスを作製した。その結果、AmPr-GFP コンストラクトを持つマウスを 9 ライン、HSI-AmPr-GFP コンストラクトを持つマウスを 7 ライン、HSII-AmPr-GFP コンストラクトを持つマウスを 6 ライン確立することに成功した。これらのマウスから卵巣と肝臓を取り出して GFP 発現を調べたところ、卵巣では AmPr-GFP を含む 9 ラインすべてで GFP の発現を検出できた (図 1) がその発現レベルは 2 ラインを除いて非常に低く、このことからプロモーターのみでは Amhr2 の発現を十分に活性化できないことがわかった。さらに 9 ライン中 4 ラインでは肝臓においても GFP の発現が確認され、組織特異性も保たれていなかった。これに対して、HSI と HSII を含むライン (HSI-AmPr-GFP、HSII-AmPr-GFP) では、肝臓における GFP の発現はすべてのラインで検出されず (図 1)、HSI と HSII が in vivo でも肝臓で Amhr2 プロモーター活性を抑制することがわかった。興味深いことに、HSI-AmPr-GFP を含むラインでは卵巣における GFP の発現レベルも AmPr-GFP のラインに比べて低い傾向が観察された (データの詳細は示していない)。このことから実際の卵巣

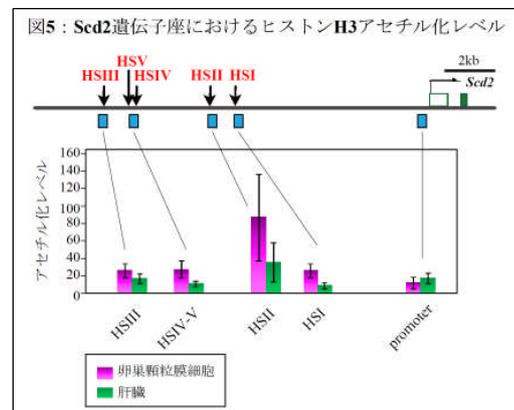


においては HSI の転写抑制活性が働かないためのメカニズムが存在すると考えられた。そこで、HSI が転写抑制活性を示すための条件を検討するために、ヒストンアセチル化パターンを解析した (図 2)。その結果、HSI は肝臓で有意に高いヒストンアセチル化を受けていることがわかり、これによって肝臓のみで転写抑制活性を発揮できるというメカニズムが予想された。一方、HSII は卵巣と肝臓で同じレベルのヒストンアセチル化を受けており、その機能発揮にはさらに別な機構の存在が示唆された。そこで最後に、HSII 領域自体が転写されている可能性を調べた。RT-PCR 解析の結果、HSII 領域は卵巣特異的に転写されていることがわかり (図 3)、このことが卵巣と肝臓における HSII の機能の違いを生み出



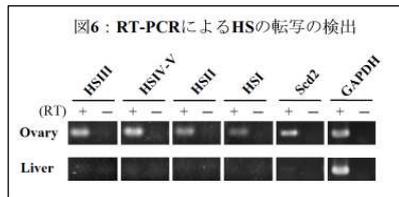
している可能性が示唆された。

(2) Scd2 遺伝子座の機能ゲノム領域。
この遺伝子座では Scd2 遺伝子の 8-14 kb 上流に 5 つの機能ゲノム領域 (HSI、HSII、



HSIII、HSIV、HSV) を同定した (図 4)。最初に in vitro における転写調節活性を調べるために、すべての機能ゲノム領域を含む 6.6 kb の領域を Scd2 のプロモーターにつなげてレポーター解析を行った。その結果、卵巣由来の OV3121 細胞でも肝臓由来の Hepa1-6 細胞でも、これらの機能ゲノム領域が Scd2 のプロモーター活性を抑制することがわかった (図 4)。しかし、ヒストンアセチル化パターンを調べたところ、これら 5 つの機能ゲノム領域はいずれも肝臓よりも卵巣で高いレベルのヒストンアセチル化を受けていたため (図 5)、in vivo での検証も行った。Scd2 のプロモーターのみを GFP につないだコンストラクト (ScPr-GFP) と、その上流に 5 つの機能ゲノム領域すべてを含む 6.6 kb の DNA 断片をつないだコンストラクト (HS-ScPr-GFP) を、それぞれマウスの受精卵にインジェクトしてトランスジェニックマウスを作製した。これらのマウスを解析した結果、ScPr-GFP を含むマウスでは解析した 4 ラインすべてにおいて卵巣における GFP 発現が見られなかったのに対し、HS-ScPr-GFP を含むマウスでは 3 ライン中 2 ラインで卵巣における GFP 発現が検出された (図 4)。このことから同定した機能ゲノム領域は in vivo では卵巣においてエンハンサー活性を持つ

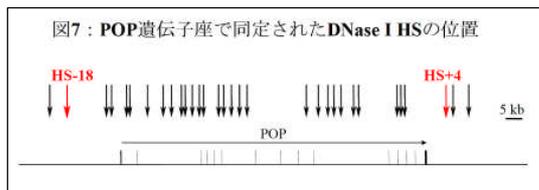
ことがわかった。しかし、HS-ScPr-GFP を含むマウスの卵巣における GFP の発現レベルは内在の Scd2 よりもかなり低く（データは示していない）、卵巣における Scd2 の高発現にはさらに別のメ



カニズムが存在することが考えられた。そこで、最後に同定した機能ゲノム領域自体が転写されている可能性を(1)と同様にして検証した。RT-PCR 解析の結果、すべての HS が卵巣特異的に転写されていることが明らかになり（図 6）、これらの転写産物が Scd2 の卵巣顆粒膜細胞における高発現をコントロールしている可能性が示唆された。

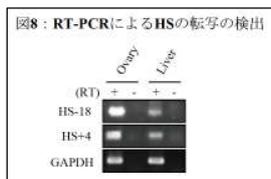
(3) POP 遺伝子座の機能ゲノム領域。

この遺伝子座では 32ヶ所の機能ゲノム領域を同定した（図 7）。これらのうちどれが機能的に重要であるのか絞り込むためにヒトやラットなど他種のゲノム配列との比較解析を行ったところ、POP 遺伝子の 18 kb 上流と 4 kb 下流の機能ゲノム領域（HS-18、HS+4）

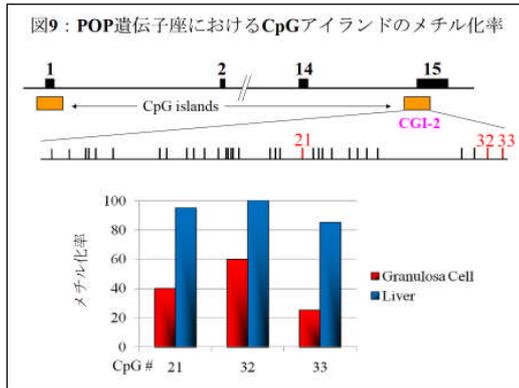


の配列が他の種でも保存されていることがわかった。そこで、まずこの 2つの HS について調べることにした。解析は(1)と(2)と同様に、これら 2つの HS が持つ転写調節活性の検出とこれらの HS 自体が転写されているかどうかの検定という 2点について行った。現時点では後者のみ

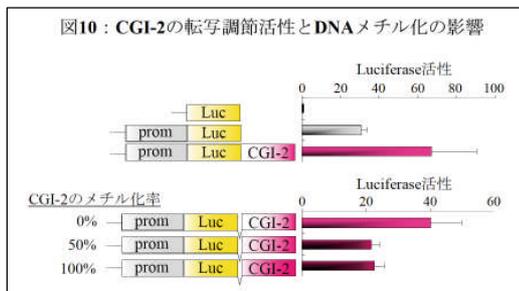
の結果が得られているので、ここでは HS 領域の転写についてのみ報告する。RT-PCR 解析の結果、これら 2つの HS はいずれも POP 発現の高い卵巣においてより高いレベルで転写されていることがわかった（図 8）。このことは POP 遺伝子座においても調節領域の転写が重要である可能性を示唆するものである。



POP 遺伝子座には 2つの CpG アイランドが存在するため、POP 遺伝子のエピジェネティックな調節を明らかにするためには DNA メチル化パターンの解析が不可欠である。そこで、bisulfite sequencing 法を用いて卵巣顆粒膜細胞と肝臓におけるこれら 2つの CpG アイ



ランドのメチル化パターンを調べた（図 9）。その結果、エクソン 15 付近に存在する CpG アイランド（CGI-2）において卵巣特異的に低いメチル化レベルを示す CpG が 3つ確認された。さらに、in vitro のレポーター解析を行ったところ、この CGI-2 はエンハンサー活性を示し、その活性が DNA メチル化によって減少した（図 10）。このことから CGI-2 は DNA



メチル化によって調節される POP 遺伝子のエンハンサーであることが示唆された。

以上の 3つの遺伝子座における解析結果から、機能ゲノム領域による遺伝子の転写調節活性はエピジェネティックな状態だけでなくその領域自体の転写によっても調節されている可能性があることがわかった。そして、このエピジェネティックな状態と転写されているかどうか組織によって異なる結果として、ゲノムの多機能性が生まれていると考えられる。

タンパク質をコードしない領域が転写されることによるゲノム機能の発現は、現在世界中の研究者が注目しているテーマであり、本研究ではその中でも卵巣特異的な Long noncoding RNA の発現といういまだに報告のない新しい現象を発見した。今後、この noncoding RNA の機能をさらに解析することによって、生殖におけるゲノム機能に対する理解が大きく進展することが期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Matsubara S., Takahashi T., and Kimura A. P. (2011) Localization and subcellular distribution of prolyl oligopeptidase in the mouse placenta. *J. Mol. Histol.* (査読有) (印刷中)
- ② Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A., Rajapakse S., Kimura A., and Takahashi T. (2011) Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: Possible involvement in ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* (査読有) 332: 67-77.
- ③ Matsubara S., Takahashi T., and Kimura A. P. (2010) Epigenetic patterns at the mouse prolyl oligopeptidase gene locus suggest the CpG island in the gene body to be a novel regulator for gene expression. *Gene* (査読有) 465: 17-29.
- ④ Kato Y., Ogiwara K., Fujimori C., Kimura A., and Takahashi T. (2010) Expression and localization of collagen type IV $\alpha 1$ chain in the medaka ovary. *Cell Tissue Res.* (査読有) 340: 595-605.

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① 米田竜馬、木村敦「マウス精巣特異的 TESSP クラスターの発現調節機構」(東京大学駒場キャンパス、2010年9月23日)
- ② 松原伸、木村敦「マウスの卵巣におけるプロリルオリゴペプチダーゼのエピジェネティックな発現調節」(東京大学駒場キャンパス、2010年9月23日)
- ③ 木村敦「ミューラー管抑制因子受容体遺伝子の転写調節メカニズム」(東京大学駒場キャンパス、2010年9月23日)
- ④ 栗原美寿々、木村敦「哺乳類における TCAM 遺伝子の発現パターンと調節機構」第 81 回日本動物学会大会 (東京大学駒場キャンパス、2010年9月23日)
- ⑤ Matusbara S. and Kimura A. P. "Epigenetic regulation and hormonal control of the mouse prolyl oligopeptidase gene in the ovary." The Endocrine Society, 92nd Annual Meeting (San Diego, CA, USA, June 21, 2010)
- ⑥ Kimura A. P. "Characterization of two DNase I hypersensitive sites at the mouse *Amhr2*/MISIIR gene locus." The Endocrine Society, 92nd Annual Meeting (San Diego, CA, USA, June 21, 2010)
- ⑦ Yoneda R., Kurihara M., Takahashi T., and Kimura A. P. "The expression pattern and regulation of testis specific serine protease (TESSP) genes during spermatogenesis."

The Endocrine Society, 92nd Annual Meeting (San Diego, CA, USA, June 20, 2010)

- ⑧ 松原伸、木村敦「DNA メチル化によるハウスキーピング遺伝子の発現量の調節」第 34 回日本比較内分泌学会年会 (大阪千里ライフサイエンスセンター、2009年10月23日)
- ⑨ 米田竜馬、高橋孝行、木村敦「マウス精巣特異的 TESSP クラスターの発現解析」第 80 回日本動物学会大会 (静岡、2009年9月17日)
- ⑩ 松原伸、木村敦「マウスの初期発生におけるプロリルオリゴペプチダーゼのエピジェネティックな発現調節」第 80 回日本動物学会大会 (静岡、2009年9月17日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 敦 (KIMURA ATSUSHI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：90422005

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし