

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 24 日現在

機関番号： 33916
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22591019
 研究課題名（和文） クロマチン構造変化に伴うアロマターゼ遺伝子のエピジェネティック修飾調節
 研究課題名（英文） Epigenetic regulation of aromatase gene by changes of chromatin structure
 研究代表者
 原田 信広（HARADA NOBUHIRO）
 藤田保健衛生大学・医学部・教授
 研究者番号： 00189705

研究成果の概要（和文）：アロマターゼ遺伝子の多重プロモーターの組織特異的選択に対しエピジェネティックマーカーであるヒストンの化学修飾の関与をクロマチン免疫沈降法で解析した。その結果、ヒストン H3K27 のトリメチル化を介したポリコーム複合体の結合がプロモーターの組織選択的不活性化に重要であり、使われないプロモーターは凝集したクロマチン構造を示した。クロマチン構造の違いがプロモーター選択機構の分子基盤であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The human aromatase (*CYP19*) gene has three major promoters. Human placenta-derived JEG3, hepatoma-derived HepG2, and ovary-derived KGN cells mainly utilize the promoters Ia, Ib, and Ic, respectively. In order to evaluate histone modifications responsible for these promoter usages, we first performed ChIP assays, which are well-known as epigenetic markers of transcribed loci. The results showed that lysine 27 of histone H3 at the inactive promoters was apparently trimethylated and the trimethylated levels at the resting promoters was higher than that at the active one. These suggest that alternative promoter usage in the *CYP19* locus is controlled by this silencing complex recruited by tri-methylation of lysine 27 of histone H3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学、エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は従来よりアロマターゼの多様な生理機能に注目し研究してきた。本酵素遺伝子を単離し、その特徴的な多重エクソン1構造と組織特異的発現調節機構の解明、そして生化学、分子生物学及び免疫組織化学的解析を行ってみると、多くの興味ある知見が見出された。(1) ヒト・アロマターゼ遺伝子の多重エクソン1及びプロモーター構造の決定。

(2) アロマターゼ発現の組織特異的発現調節機構の解析 (3) プロモーター領域のフットプリンティング、ゲルシフトアッセイ、レポーター解析を行ってきた。しかしアロマターゼ遺伝子の *in vitro* 転写活性の解析では説明できないような遺伝子発現調節機構も観察された。そこで (4) 培養細胞の染色体中へレポータートランスジーン遺伝子を挿入することによってアロマターゼ遺伝子のプロモーター解析を行ってみると、細胞に加えた誘導因子による発現調節が再現された。この事は、アロマターゼ遺伝子は今まで考えていたようなプロモーター領域への転写因子・転写共役因子の結合による転写開始複合体の形成を通じた転写調節では説明できないような、エピジェネティックな調節機構が予想させる。そこで細胞内の染色体上のアロマターゼ遺伝子のクロマチン構造の開閉状態（緊縮あるいは弛緩状態）を調べるための SEVENS Assay を確立し、その解析法を使用してヒト染色体構造の解析を実施する。

2. 研究の目的

癌化などの動的変化に伴って、アロマターゼ遺伝子のクロマチン構造、そして転写調節機構が変化していくことが示唆されている。そこで本研究では、エストロゲン合成を律速するアロマターゼ遺伝子について、クロマチン構造の変化、アセチル化やメチル化などによるエピジェネティックな転写調節をクロマチン構造の動的変化を追求する SEVENS Assay を活用して解析していく。同時に、アロマターゼ遺伝子のアセチル化、メチル化の寄与も解析する。

アロマターゼはエストロゲン産生を通して生殖生理機能のみならず、骨、血管、脳など種々の末梢組織で生理的に重要な役割を担っており、アロマターゼの発現異常は生殖生理、骨粗鬆症、動脈硬化症、神経細胞死、神経機能異常、あるいはエストロゲン依存性癌の癌化・進展などの病態を引き起こすことを報告してきた。こうしたアロマターゼの発現異常に起因する多様な病態を考える時、発現異常の分子機構の解明は、これらの疾患の予防・防止を考える上で有用な情報を与えるものと期待出来る。

本研究ではクロマチン構造の動的変化に

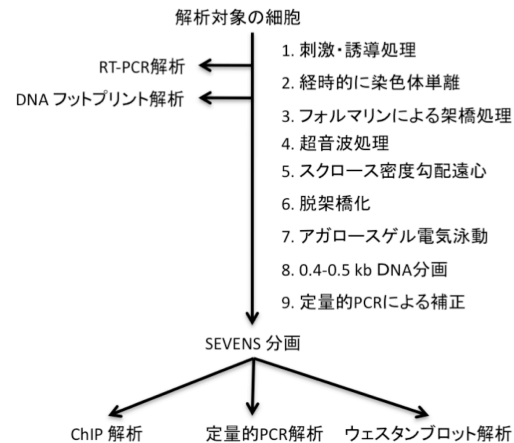
伴う発現調節機構を、研究分担者が開発した SEVENS Assay の解析技術を活用して明らかにしていきたい。SEVENS Assay の解析技術を利用した研究報告は未だなされていないので、この SEVENS Assay では DNA フットプリント法などの解析法に先行するようなクロマチン構造の変化を検出できるように、新規な重要な知見が得られるものと期待している。

既に予備的実験でヒストンのメチル化及びアセチル化によるアロマターゼの発現調節を示唆する研究成果を得ているので、今回の研究期間内に、SEVENS Assay によって発現誘導に伴ったクロマチンの開いた状態 (Sparse state) と閉じた状態 (Compact state) の単離、その単離されたクロマチンのヒストンのアセチル化・脱アセチル化あるいはメチル化・脱メチル化状態を ChIP 法での確認及び DNA フットプリント法を併用した解析、標的遺伝子の発現状態の RT-PCR 法による解析を行い、相互間の関係を綿密に調べていく予定である。

3. 研究の方法

本研究課題ではクロマチン構造の解析に対して本研究室で開発した SEVENS Assay を使用して実施した。エクソン 1a から転写調節

SEVENS Assayを活用したクロマチン構造の解析プロトコール



される胎盤由来 JEG3 細胞、エクソン 1b から転写調節される肝臓癌由来 HepG2 細胞、エクソン 1c/1d から転写調節される卵巣癌由来 KGN 細胞について、上に示した SEVENS Assay プロトコールで解析した。またアロマターゼ遺伝子多重エクソン1選択性及び発現亢進機構についてクロマチン構造の変化との関連をヒストン修飾に特異的な抗体や転写因子抗体などを使用した ChIP 解析により、エピジェネティック修飾の解析を行なった。

4. 研究成果

アロマターゼ遺伝子はエクソン 1 からエクソン 10 までの 10 個のエクソンにより構成されており、特にエクソン 1 は多重エクソン 1 から成り、その組織特異的の選択を通して組織特異的のプロモーターにより発現調節されている (図 1)。本研究ではアロマターゼ遺伝子の主要な多重エクソン 1、エクソン 1a、エクソン 1b、エクソン 1c/d に絞って解析を進めていった。

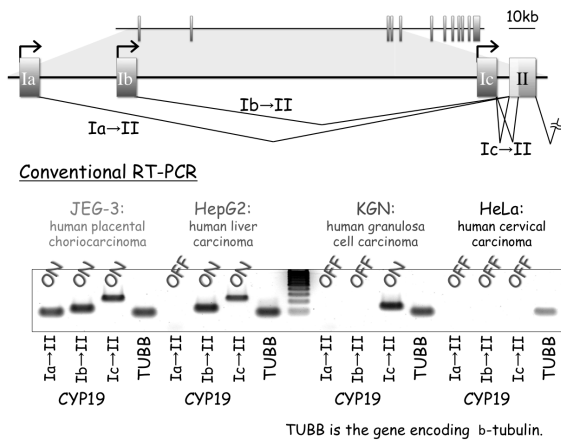


図 1. ヒト・アロマターゼ遺伝子の構造と多重エクソン 1 の組織特異的の選択性

アロマターゼを発現する代表的培養細胞として JEG3、HepG2、及び KGN 細胞、発現が見られない対照の培養細胞として HeLa 細胞を使用して以降の解析を行なった。図 1 で示すように、胎盤由来の JEG3 細胞はエクソン 1a からの強い転写が認められ、エクソン 1b と 1c/d からの転写も弱いながら認められた。一方、肝癌由来の HepG2 細胞ではエクソン 1a からの転写は認められず、エクソン 1b からの強い転写、エクソン 1c/d からの弱い転写が認められた。また卵巣・顆粒膜細胞腫由来

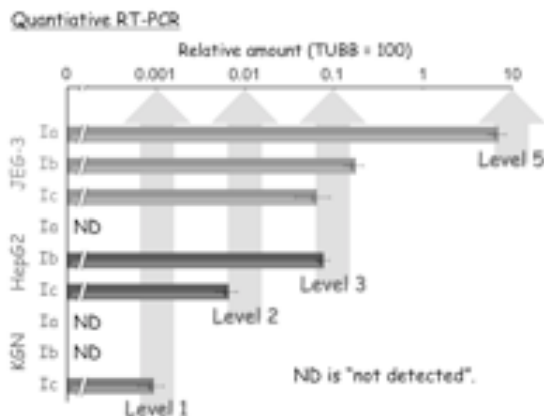


図 2. 各培養細胞におけるアロマターゼ多重エクソン 1 a、1b、1c/d からの転写量

の KGN 細胞ではエクソン 1a や 1b からの転写は認められず、エクソン 1c/d からの転写物のみ認められた。対照として調べた子宮頸癌由来の HeLa 細胞ではアロマターゼの転写は一切検出できなかった。各々の培養細胞で発現するアロマターゼ遺伝子の各多重エクソン 1 別の転写レベルを定量的に図示すると図 2 のようになった。

次に本研究で染色体の圧縮 (凝集) 状態を解析する SEVENS Assay について JEG3 細胞、HepG2 細胞、KGN 細胞の各々について条件設定を行った。図 3 で示すように最適条件の強度・時間で超音波処理により染色体を小断片化後、シヨ糖光度勾配遠心により架橋度の異なる染色体分画を得る事が出来た。

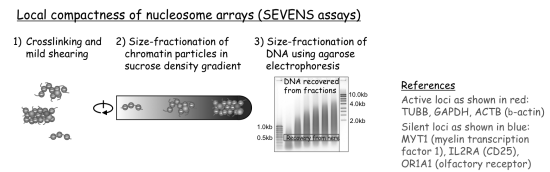


図 3. SEVENS Assay による染色体の分画

遠心チューブ上層から下層にわたって 6 分画に採取し、各分画の DNA サイズ 0.5 kb から 1.0 kb の大きさの断片を脱架橋化後にヒストンのアセチル化及びメチル化に特異的な抗体を使用した ChIP 法により解析した。各アセチル化及びメチル化ヒストン特異的な抗体で免疫沈降した ChIP 分画に対してアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域を含む全遺伝子座、全長 140 kb にわたって細分化した DNA 領域特異的なプライマーで PCR 増幅を行い、各 DNA 領域におけるアセチル化及びメチル化ヒストンの回収を調べた。対照としてコンパクトに圧縮されて転写不活性な遺伝子領域 (MYT1、IL2RA、OR1A1) 及びルーズに弛緩した転写活性な遺伝子領域 (TUBB、GAPDH、ACTB) に対するプライマーを使用した PCR も行なった。

ヒストン H3 のリジン K4 のメチル化、リジン K9 のメチル化及びアセチル化については、アロマターゼ遺伝子座の全領域で特別な促進・抑制は観察されなかった。一方、ヒストン H3 のリジン K27 については各エクソン 1 上流のプロモーター領域 1a、1b、1c/d で細胞株に特異的なアセチル化やメチル化の促進が認められた。JEG3 細胞についての SEVENS Assay の結果を図 4 上段に示す。図 1 及び 2 で観察されたように JEG3 細胞ではアロマターゼ遺伝子はエクソン 1a から主に転写開始され、エクソン 1b 及び 1c/d から弱いながら転写が確認されたが、この結果を支持するようにクロマチン構造はエクソン 1a 上流プロモーター領域で "Open" な状態に大きく開かれており、これは転写活性な対照遺伝子として同時に調べた TUBB、GAPDH、ACTB

と同様の挙動を示した。一方、エクソン 1b 及び 1c/d 上流プロモーター領域では僅かな”Open”状態が観察された。”Compact”

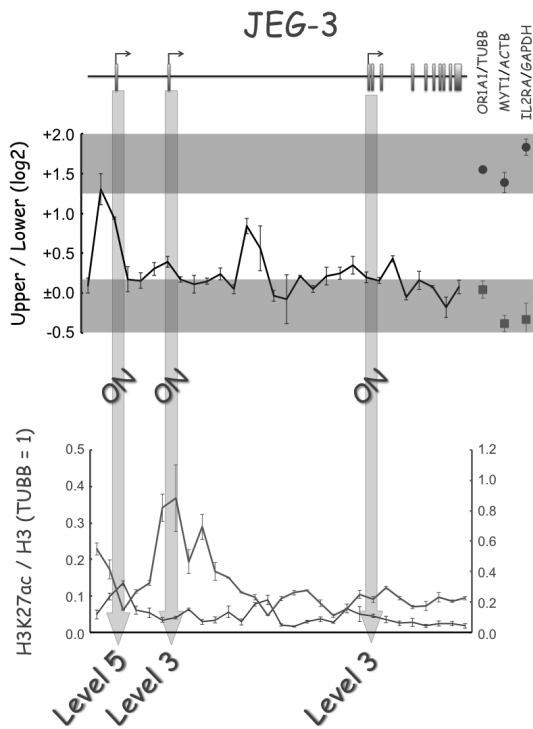


図 4. JEG3 細胞におけるクロマチン構造解析とヒストン H3K27 のエピジェネティック修飾

に閉じられたクロマチン構造に対して、このように”Open”な解けた状態の程度に依存して転写因子・転写共役因子が結合し、転写開始複合体が形成されるものと考えられる。また図 4 下段に示すヒストン H3K27 のアセチル化及びメチル化も JEG3 細胞におけるアロマターゼ遺伝子の各エクソン 1 からの転写レベル及びクロマチン構造の”Open”状態と一致して、エクソン 1a 領域では、エクソン 1b や 1c/d 領域に比べて、アセチル化が大きく促進されていた。逆にヒストン H3K27 のトリメチル化はエクソン 1b や 1c/d のプロモーター領域の方がエクソン 1a 領域より大きく進んでいた。こうした解析結果はヒストン H3K27 のアセチル化は転写の亢進を促し、トリメチル化は転写抑制を促すという結果と一致する。

次に HepG2 細胞のクロマチン構造及びヒストンのエピジェネティック修飾の解析結果を図 5 に示す。図 1 及び 2 で観察されたように HepG2 細胞ではアロマターゼ遺伝子は主にエクソン 1b から転写され、エクソン 1c/d からの転写も僅かながら観察されるが、エクソン 1a からの転写は検出できない。この結果と一致して、図 5 上段で示すようにクロマチン構造はエクソン 1b 付近で”Open”に開いており、エクソン 1c/d 領域では僅かに”Open”

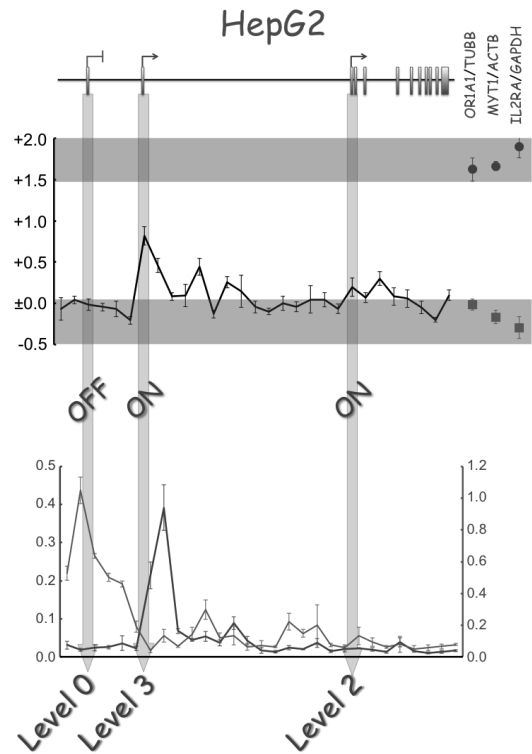


図 5. HepG2 細胞におけるクロマチン構造解析とヒストン H3K27 のエピジェネティック修飾

状態となっていたが、エクソン 1a 領域では転写不活性な対照として解析した MYT1、IL2RA、OR1A1 と同様に閉じられた状態を示した。また図 6 下段で示すヒストン H3K27 のトリメチル化はエクソン 1c/d 領域で低下、エクソン 1a 領域で高くなっていた。

トリメチル化とは逆に、ヒストン H3K27 のアセチル化はエクソン 1a 領域で促進され、エクソン 1c/d 領域で抑制されていた。この HepG2 細胞での結果もヒストン H3K27 のアセチル化は転写の亢進を促し、トリメチル化は転写抑制を促すという結果と一致する。

最後に KGN 細胞のクロマチン構造及びヒストンのエピジェネティック修飾の解析を行なった。KGN 細胞では図 1 及び 2 で観察されたようにアロマターゼ遺伝子は主にエクソン 1c/d から転写され、エクソン 1a 及び 1b からの転写は検出出来ない。この結果と一致して、図 6 上段で示すようにクロマチン構造はエクソン 1c/d 領域では”Open”の開かれた状態、逆に転写が確認できないエクソン 1a 及び 1b のクロマチン構造は不活性化遺伝子の対照として解析した MYT1、IL2RA、OR1A1 と同様に”Closed”の閉じた状態であることが確認できた。また図 6 下段で示すようにヒストン H3K27 は、エクソン 1c/d ではトリメチル化が低く、代わってアセチル化が比較的高くなっていた。逆にエクソン 1a や 1b ではトリメチル化が比較的高く、アセチル化は低

かった。

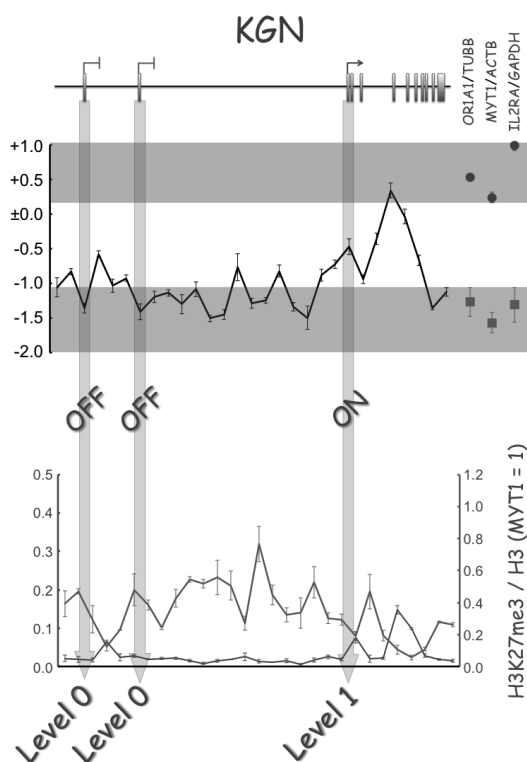


図6. KGN 細胞におけるクロマチン構造解析とヒストン H3K27 のエピジェネティック修飾

以上の SEVENS Assay 及び ChIP 解析の実験結果を合わせて考察すると、転写が活発に行われている「使われているプロモーター領域」ではクロマチン構造は緩く開かれた状態にあり、こうした領域では転写活性の強さを反映するようにヒストン H3K27 のトリメチル化の亢進とトリメチル化の低下が観察された。逆に転写が抑制されているサイレント遺伝子の「使われていないプロモーター領域」ではクロマチン構造が密に凝集した閉じた状態にあり、この時、ヒストン H3K27 はアセチル化の低下とトリメチル化の亢進が観察されていることが確認できた。

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 7 件)

- ① Li, R., He, P., Cui, J., Staufenbiel, M., Harada, N., & Shen, Y., Brain endogenous estrogen levels determine responses to estrogen replacement therapy via regulation of BACE1 and NEP in female Alzheimer's transgenic mice., *Mol. Neurobiol.*, 査読有, 2012
DOI:10.1007/s12035-012-8377-3
DOI:10.1016/j.jchemneu.2012.12.001

- ② Honda, S.-I., Kozako, T., Shimeno, H., Soeda, S., & Harada, N., LIM-homeo domain transcription factor, Lhx2, is involved in transcriptional control of brain-specific promoter/exon 1f of the mouse aromatase gene., *J Neuroendocrinol.*, 査読有, 2012
DOI:10.1111/j.1365-2826.2012.02356.x
- ③ Honda S-I, Wakatsuki T, Harada N., Behavioral analysis of genetically modified mice indicates essential roles of neurosteroidal estrogen., *Front Neuroendocrin.*, 査読有, 2011
DOI:10.3389/fendo.2011.00040
- ④ Charlier TD, Harada N, Balthazart J, Cornil CA., Human and quail aromatase activity is rapidly and reversibly inhibited by phosphorylating conditions., *Endocrinology.*, 査読有, 152(11), 4199-4210, 2011
DOI:10.1210/en.2011-0119
- ⑤ Juntti SA, Tollkuhn J, Wu MV, Fraser EJ, Soderborg T, Tan S, Honda S-I, Harada N, Shah NM., The androgen receptor governs execution but not programming of male sexual and territorial behaviors., *Neuron*, 査読有, 66(2), 260-272, 2010
DOI:10.1016/j.neuron.2010.03.024
- ⑥ McAllister G, Long J, Bowers A, Walker A, Cao P, Honda S-I, Harada N, Staufenbiel M, Shen Y, Li R., Genetic targeting aromatase in male amyloid precursor protein transgenic mice down-regulates β -secretase (BACW1) and prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment., *J Neurosci.*, 査読有, 30 (21), 7326-7334, 2010
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1180-10.2010
- ⑦ Zhang B, Shozu M, Okada M, Ishikawa H, Kasai T, Murakami K, Nomura K, Harada N, Inoue M., Insulin-like growth factor 1 enhances the aromatase P450 expression by inhibiting autophagy., *Endocrinology*, 査読有, 151(10), 4949-4958., 2010
DOI:10.1210/en.2010-0294

[学会発表] (計 15 件)

- ① Harada N & Honda S-I. Transcriptional and post-translational regulation of aromatase in the mouse brain. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer; Kanazawa, Japan. 2012
- ② Hayashi T, Munetsuna E, & Harada N.

- The stability of P450arom is controlled by Ca²⁺-dependent phosphorylation and dephosphorylation. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer; Kanazawa, Japan. 2012
- ③ Kotomura N, Harada N, Ishihara S. A dense chromatin structure selectively represses a promoter(s) of the CYP19 gene producing several transcripts by alternative promoter usage. 第6回日本エピジェネティック研究会年会; 東京. 2012
- ④ 林孝典, 宗綱栄二, 原田信広. Ca²⁺依存的リン酸化はエストロゲン合成酵素アロマターゼの活性・安定性を調節する. 第85回日本生化学会大会; 福岡. 2012
- ⑤ 本田伸一郎, 大下遥子, 民本愛, 小迫知弘, 蔵元佑嘉子, 元流梨恵, 原田信広, 添田泰司. アロマターゼの脳特異的発現に関与する転写因子 Deaf-1 の機能ドメインの解析. 第85回日本生化学会大会; 福岡. 2012
- ⑥ 琴村直恵, 原田信広, 石原悟. プロモーターの転写活性を決めるクロマチン構造. 第35回日本分子生物学会年会; 福岡. 2012
- ⑦ Harada N. Function and regulation of aromatase/estrogen in the brain. 2011 International Mini-Conference on Translational Neuroscience: Neurological Disorders and Psychiatric Diseases (IMCOTN-NDPD); Beijing, China. 2011
- ⑧ Kotomura N, Harada N, Ishihara S. Condensed chromatin marked by K27-trimethylated histone H3 determines alternative promoter usage of the CYP19 gene. CDB Symposium 2011: Epigenetic Landscape in Development and Diseases; Kobe, Japan. 2011
- ⑨ 林孝典, 原田信広. Ca²⁺依存性リン酸化・脱リン酸化によるエストロゲン合成酵素 P450arom の分解制御される. 第19回日本ステロイドホルモン学会学術集会; 福岡. 2011
- ⑩ 石原悟, 琴村直恵, 西芳寛, 野村政壽, 柳瀬敏彦, 原田信広. ヒストン H3K27 トリメチル化によるアロマターゼ遺伝子プロモーターの選択的不活性化. 第19回日本ステロイドホルモン学会学術集会; 福岡. 2011
- ⑪ Kotomura N, Harada N, Ishihara S. The contribution of histone modifications to alternative promoter usage of the human CYP19 gene. 第34回日本分子生物学会年会; 横浜. 2011
- ⑫ 林孝典, 原田信広. エストロゲン合成酵素 P450arom の安定性は Ca²⁺依存性リン酸化・脱リン酸化による制御される. 第84回日本生化学会大会合同大会; 京都. 2011
- ⑬ Kotomura N, Harada N, Ishihara S. Condensed chromatin marked by K27-trimethylated histone H3 determines alternative promoter usage of the CYP19 gene. 第5回日本エピジェネティック研究会年会; 熊本. 2011
- ⑭ 石原悟, 琴村直恵, 原田信広. アロマターゼ遺伝子 CYP19 のプロモーター選択に関するエピジェネティクス解析. 第18回日本ステロイドホルモン学会学術集会; 名古屋. 2010
- ⑮ 林孝典, 若月徹, 吉村憲子, 原田信広. エストロゲン合成酵素アロマターゼの安定性はリン酸化によって制御される. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会; 神戸. 2010
- [図書] (計1件)
- ① Nobuhiro Harada & Shin-ichiro Honda, Oxford University Press (New York), Molecular mechanisms controlling brain aromatase expression, in "Brain Aromatase, Estrogens, and Behavior" Ed. Balthazart, J. & Ball, G.F., pp138-152, 2012
- [その他]
ホームページ等
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~biochem/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
原田 信広 (HARADA NOBUHIRO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 00189705
- (2) 研究分担者
石原 悟 (ISHIHARA SATORU)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号: 00300723