

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791705

研究課題名(和文) ラット黄体化顆粒膜細胞におけるステロイド合成関連遺伝子のエピジェネティクス制御

研究課題名(英文) Epigenetics regulation of steroid synthesis related gene promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats

研究代表者

李 理華 (LEE, Lifa)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90610668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣黄体化顆粒膜細胞において、LHサーージ後に急速に発現が上昇するStAR遺伝子と急速に発現が低下するCyp19a1遺伝子の調節機構に、ヒストン修飾によりepigeneticsな変化が関与し、そのプロモーター領域のクロマチン構造が変化することで、StARでは転写因子C/EBP β の、Cyp19a1ではリン酸化CREBのDNAへの結合を変化させることでそれぞれのmRNA発現を調節していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The ovulatory LH surge rapidly alters the expression of steroidogenesis-related genes in granulosa cells. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is rapidly induced and aromatase (Cyp19a1) is rapidly suppressed after the LH surge. The rapid shift of estrogen synthesis to progesterone synthesis after the LH surge is crucial for ovulation and the following luteinization. We revealed changes of histone modification status and chromatin structure in the StAR and Cyp19a1 promoter region in addition to DNA hypomethylation status of the promoter are closely associated with the rapid change of StAR and Cyp19a1 mRNA expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation.

研究分野：生体分子学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、産婦人科学

キーワード：エピジェネティクス プロゲステロン合成

1. 研究開始当初の背景

排卵過程において、顆粒膜細胞で、LHサージによる黄体化により、プロゲステロン合成に関与する種々の遺伝子発現が急速に変化する。その代表的なものとして StAR 蛋白があり、黄体化に伴い、遺伝子発現が急速に増加する。一方で、顆粒膜細胞で LH サージ前に高い発現を示すエストロゲン合成酵素のアロマターゼ (Cyp19 遺伝子によりコードされる) は、黄体化に伴い急速に減少する。このように排卵過程においては、複雑な遺伝子発現調節が何われ、現在まで特に転写因子による調節が中心に報告されている。StAR 遺伝子転写開始地点より 500bp 上流の領域は種を超えて保存されており、様々な転写因子が結合することが分かっている。また、アロマターゼをコードする Cyp19a1 遺伝子は各組織で異なるプロモーター領域が存在しているが、ラット卵巢で発現している Cyp19a1 遺伝子のプロモーター領域は第 2 エクソンの転写開始地点より上流 200bp の部位に存在し、ここに種々の転写因子が結合すると報告されている。両遺伝子のプロモーターへ結合する転写因子は SF-1/Ad4BP、C/EBP、GATA-4 等共通しているものが多いにもかかわらず、排卵過程において見られた両遺伝子の変化は相反しており、両遺伝子の発現調節がどのように行われるかについては未だ解明されていない。

近年遺伝子発現調節には、プロモーター領域の CG 部位のメチル化や、ヒストン修飾が関与していることが分かっている。ヒストンアセチル化やヒストン H3 の 4 番目のリジン (H3K4) のメチル化は転写促進に、また DNA のメチル化やヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のメチル化は転写抑制に働くとされている (図 2)。これらの修飾はクロマチン構造を変化させることで、転写因子の DNA への結合が変化し、転写調節を行っていると考えられている。LH サージ後の排卵過程 (黄体化初期) における StAR 蛋白とアロマターゼの発現調節にも、このようなエピジェネティクス制御が存在するのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ラット過排卵モデルを用いて、顆粒膜細胞の黄体化によって変化する StAR mRNA や Cyp19a1 mRNA 発現に伴い DNA メチル化やヒストン修飾などがどのように変化するか、またこれらの変化に伴いプロモーター領域の各転写因子の結合がどのように変化するかを検討することで、排卵過程の黄体化に伴うエピジェネティックな遺伝子調節の関与を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

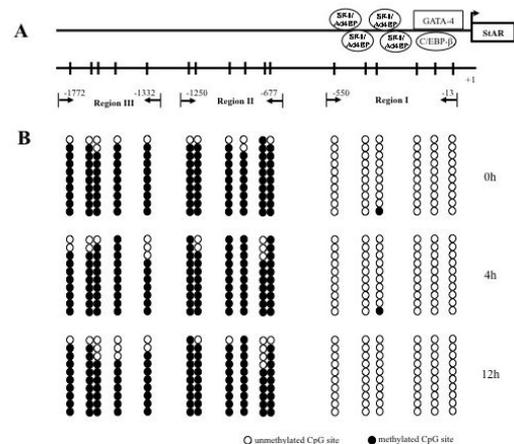
3 週齢幼若雌ラットを用いて eCG、hCG で過排卵刺激を行い、hCG 投与前と、投与 4、12hr 後の卵巢から排卵過程にある黄体化顆

粒膜細胞を回収した。

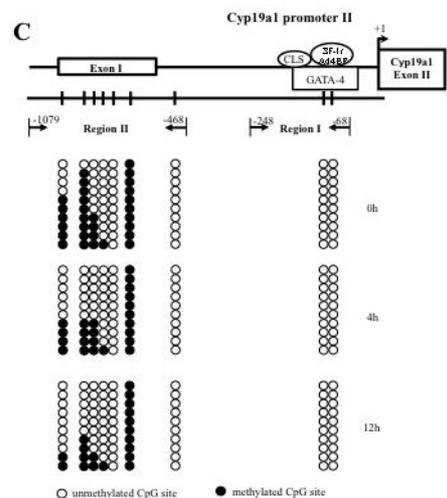
- (1) 排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞で、StAR 遺伝子と Cyp19 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化状態の経時的变化を Bisulfite genomic sequencing 法を用いて明らかにする。
- (2) 排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞で、StAR 遺伝子と Cyp19 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾の経時的变化をクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。
- (3) StAR 遺伝子と Cyp19 遺伝子のプロモーター領域における、クロマチン構造の経時的变化を DNase accessibility assay を用いて明らかにする。
- (4) 種々の転写因子の両遺伝子プロモーター領域への結合活性の経時的变化をクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。

4. 研究成果

StAR と Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を Bisulfite genomic sequencing 法を用いて検討したところ、そのプロモーター領域は低メチル化状態に維持されていたが、排卵刺激では DNA メチル化状態は変化しないことがわかった (図 1、2)。

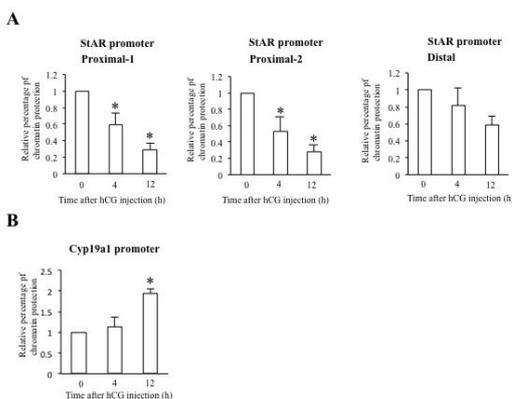


(図 1) StAR プロモーター領域 DNA メチル化状態



(図 2) Cyp19a1 プロモーター領域 DNA メチル化状態

一方でヒストン修飾を ChIP assay で検討したところ、StAR は発現の上昇に伴い、転写促進に働くヒストンアセチル化や H3K4 のメチル化が増加しており、転写抑制に働く H3K9 や H3K27 のメチル化が減少していた。つまり転写が促進となるようなヒストン修飾変化が認められた。一方で Cyp19a1 は発現の減少に伴い、H3K9 や H3K27 のメチル化が増加し、H3K4 メチル化やヒストンアセチル化が減少していた。つまり転写抑制となるヒストン修飾変化を認めた。そこで、このヒストン修飾変化が実際にクロマチン構造を変化させるかを DNase accessibility assay で検討したところ、StAR のプロモーター領域は hCG 刺激でクロマチン構造が弛緩する方向に向かい、Cyp19a ではクロマチン構造が凝縮する方向に向かうことが分かった(図 3)。



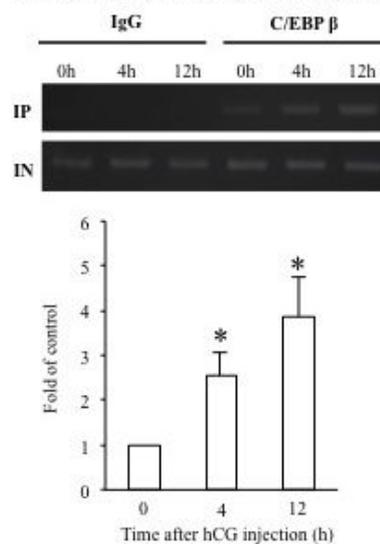
(図 3) DNase accessibility assay

つまり、排卵刺激による遺伝子発現調節には、ヒストン修飾によるクロマチン構造変化を介した制御が働いていることが示された。DNA メチル化は排卵刺激では変化はしなかったが、そのプロモーター領域は低メチル化状態であり、顆粒膜細胞では StAR、Cyp19a1 遺伝子発現可能状態を規定していることが示唆された。

hCG 刺激で StAR、Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾変化に伴いクロマチン構造変化が認められたため、次に転写因子の結合がどのように変化しているかを検討した。StAR 遺伝子は、排卵刺激後に発現が上昇する C/EBPβ がその発現に重要な転写因子であることが分かっている。そこで、この転写因子のプロモーター領域への結合を検討したところ、C/EBPβ の StAR プロモーター領域への結合は hCG 投与後に有意に増加していた(図 4)。一方で Cyp19a1 については、FSH 刺激により活性化しているリン酸化 CREB が、その発現に関与していることが分かっている。LH サーージ後もこのリン酸化 CREB 発現は上昇することが知られているが、Cyp19a1 発現が低下するメカニズムは分かかっていなかった。今回このリン酸化 CREB の Cyp19a1 遺伝子プロモーターへの結合を検討したところ、hCG 刺激後に結合は減少していた(図 5)。つまり、Cyp19a1 遺伝子プロ

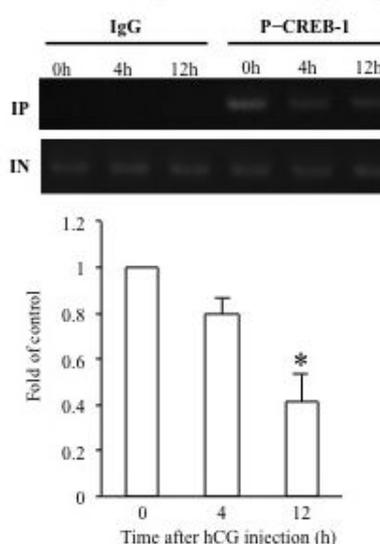
モーター領域では、クロマチン構造が凝縮することで、リン酸化 CREB が結合できない状態になったと考えられた。このように排卵刺激により、エピジェネティクス制御を介してクロマチン構造が変化し、転写因子の結合を調整していることが示唆された(図 6)。

C/EBPβ binding activities in the StAR proximal promoter

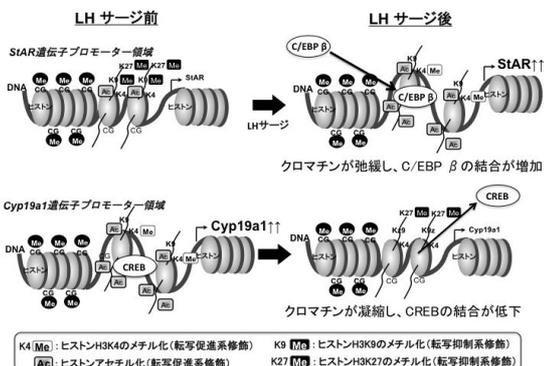


(図 4) StAR プロモーター領域の C/EBPβ の結合

P-CREB-1 binding activities in the Cyp19a1 promoter



(図 5) Cyp19a1 プロモーター領域のリン酸化 CREB の結合



(図 6) StAR、Cyp19a1 遺伝子発現のエピジェネティクス制御

K4 Me: ヒストンH3K4のメチル化(転写促進系修飾) K9 Me: ヒストンH3K9のメチル化(転写抑制系修飾)
K27 Me: ヒストンH3K27のメチル化(転写抑制系修飾) K4 Ac: ヒストンアセチル化(転写促進系修飾)

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 1 件)

Lifa Lee, Hiromi asada, Fumie Kizuka, Isao Tamura, Ryo Maekawa, Toshiaki Taketani, Shun Sato, Yoshiaki Yamagata, Hiroshi Tamura, and Norihiro Sugino, Change in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter region in granulosa cells undergoing kuteinization during ovulation in rats. ,Endocrinology, 154:458-470/2013,査読あり

[学会発表](計 7 件)

Lifa Lee, Changes in histone modification and DNA methylation of the Cyp11a1 promoter region and mRNA expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation, SSR's 46th annual meeting, 2013.7.22-26, Palais des congres de Montreal(Canada)

李 理華, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う P450sc(Cyp11a1)遺伝子発現における epigenetics 制御機構の関与, 第 65 回日本産科婦人科学会学術集会, 2013.5.10-12, ロイトン札幌(北海道)

李 理華, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Steroidogenic Acute Regulatory(StAR) 遺伝子 Cyp19a1(aromatase)遺伝子発現の epigenetics 制御の関与, 第 86 回日本内分泌学会学術集会(招待講演), 2013.4.25-27, 仙台国際センター(宮城県)

李 理華, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Steroidogenic Acute Regulatory(StAR) 遺伝子、Cyp19a1(aromatase)遺伝子発現の epigenetics 制御の関与, 第 57 回日本生殖医学会(招待講演), 2012.11.7-8, 長崎ブリックホール(長崎県)

李 理華, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Steroidogenic Acute Regulatory(StAR) 遺伝子、Cyp19a1(aromatase)遺伝子発現の epigenetics 制御の関与, 第 105 回繁殖生物学会, 2012.9.5-8, 筑波大学大学会館(茨城県)

李 理華, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Steroidogenic Acute Regulatory(StAR) 遺伝子、Cyp19a1(aromatase)遺伝子発現の epigenetics 制御の関与, 第 6 回日本エピジェネティクス研究会, 2012.5.14-15, 学術総合センター(東京都)

李 理華, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Steroidogenic Acute Regulatory(StAR) 遺伝子、Cyp19a1(aromatase)遺伝子発現の epigenetics 制御の関与, 第 85 回日本内分泌学会, 2012.4.19-21, 名古屋国際会議場

(愛知県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

李 理華 (LEE, Lifa)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 90610668

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし