

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670440

研究課題名(和文) 高次クロマチン構造変換を介した新たな先天性内分泌疾患の解明

研究課題名(英文) Analysis of congenital endocrine disorders by chromatin structure changes

## 研究代表者

宮本 薫 (MIYAMOTO, Kaoru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30125877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子SF-1の新たな標的遺伝子GST-Aファミリーの転写調節機構を3C assayなどの高次クロマチン構造解析により明らかにし、すべてのGST-Aファミリー(GSTA1-A4)遺伝子が高次クロマチン構造変換を通してSF-1依存的に転写調節されていることが明らかになった。これはクラスターとして存在するGST-Aファミリー遺伝子が高次クロマチン構造変換を介して共通に転写制御されていることを示している。またGSTA1およびGSTA3はステロイドホルモンイソメラーゼとして働くことから、高次クロマチン構造変換の異常を介した先天性ステロイドホルモン産生異常症の原因となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Transcriptional regulation of new SF-1 target genes, glutathione S transferase A family, were analyzed by chromatin structural changes such as 3C assays. We found that all GSTA family genes were under control by SF-1. These observations indicate that clustering GSTA family genes were organized by three dimensional chromatin structure induced by SF-1 binding to the gene locus. Together with the observations that gene products from GSTA1 and GSTA3 work as steroid isomerases, these SF-1 target genes would cause congenital steroid hormone deficient syndromes based on the chromatin structure changes.

研究分野：内分泌学

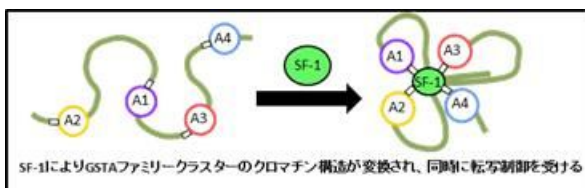
キーワード：クロマチン構造変換 転写制御 GSTA 3Cアッセイ SF-1

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは世界に先駆け、間葉系幹細胞に転写因子 SF-1 を導入することで、ステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導することに成功している (Yazawa, Miyamoto *et al.*, *Endocrinology*, 2006)。私どもはこの分化誘導系を用いて Genome wide に SF-1 標的遺伝子の探索を行い、約 250 kb にわたりクラスターを形成して存在する Glutathione S-transferase A 遺伝子ファミリー (GSTA ~ GSTA4) の全 4 遺伝子が、SF-1 標的遺伝子であることを突き止めた。さらに、ChIP-on-Chip 法の解析結果などから、GSTA ファミリー遺伝子近傍の高次クロマチン構造変換がこれら遺伝子の SF-1 依存的制御に必須であることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、SF-1 による高次クロマチン構造の変化を介した新たな転写調節機構の解明 (図参照) を目指すとともに、GSTA ファミリー遺伝子近傍の高次クロマチン構造変換を原因とする先天性ステロイドホルモン産生異常症の存在を明らかにすることで、新たな先天性内分泌疾患のメカニズムを提唱したい。



### 3. 研究の方法

GSTA ファミリーの全 4 遺伝子は 250 kb にわたりクラスターを形成している。私どもは、これら全遺伝子が SF-1 により制御されていること、genome-wide な ChIP-on-Chip assay により、GSTA ファミリーのプロモーター領域では、GSTA3 プロモーターにのみ SF-1 が結合していることを明らかにしている。これらは GSTA ファミリー遺伝子の転写が、クラスター

全体の高次クロマチン構造の変換に依存していることを示している。そこで本研究ではクロマチン上での long-range interaction を検出できる Chromosomal conformation capture (3c) assay を用いて、GSTA ファミリー遺伝子の SF-1 依存性高次クロマチン構造変換機構を解明する。

#### (1) Chromosomal conformation capture (3C) 法による GSTA ファミリーの高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明

SF-1 結合領域と 4 カ所のプロモーター領域との間で、核内で 3 次的に近接しているかを 3C-qPCR 法で検討する。GSTA ファミリーの全遺伝子プロモーター領域が、SF-1 依存的に 3 次的に近接することを証明し、SF-1 依存性に高次クロマチン構造変換が生じることを明らかにする。

#### (2) SF-1 依存的なインスレーター及びヒストン修飾変化の解析

私どもは転写因子やインスレーターの結合依存的なヒストン修飾であるヒストン H3K4 ジメチル化についても、ChIP-on-Chip 法により SF-1 導入および非導入幹細胞を用いてゲノムワイドに明らかにしている。SF-1 導入特異的に H3K4 ジメチル化された領域と、それぞれ 4 カ所のプロモーターおよび SF-1 結合領域との間で 3C-qPCR 法により検討し、これらの領域が 3 次的に近接しているか明らかにする。

#### (3) 高次クロマチン構造変換に起因する先天性ステロイドホルモン産生異常症の検索

ステロイドホルモン産生異常症では、ステロイドホルモン合成酵素の欠損により引き起こされるケースが数多く報告されている。一方で、これらの酵素遺伝子に欠損が見られないステロイドホルモン産生異常症もまた多くの症例があり、原因不明の non-classic type として分類されている。本研究では原因不明の non-classic type として分類されている先天性ステロイドホルモン産生異常症

の症例 40 例以上について、Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法により 250 kb にわたる GSTA 遺伝子クラスター領域における遺伝子変異及び欠失の有無を解析した。

#### 4 . 研究成果

GSTA ファミリーの全 4 遺伝子は 250 kb にわたりクラスターを形成している。私どもは、これら全遺伝子が SF-1 により制御されていること、genome-wide な ChIP-on-Chip assay により、GSTA ファミリーのプロモーター領域では、GSTA3 プロモーターにのみ SF-1 が結合していることを明らかにした。また、ChIP-on-Chip による解析から 250 kb にわたる GSTA 遺伝子クラスター領域に 6 か所の SF-1 結合サイト (GSTA3 プロモーター領域を含む) が存在することを確認し、それぞれ 6 か所の SF-1 結合領域と 4 か所のプロモーター領域との間で、核内で 3 次元的に近接しているかを 3C-qPCR 法で検討した。その結果、GSTA ファミリーの全遺伝子プロモーター領域が、SF-1 依存的に 3 次元的に近接することを証明し、SF-1 依存性に高次クロマチン構造変換が生じることを明らかにした。

原因不明の non-classic type として分類されている先天性ステロイドホルモン産生異常症の症例 40 例以上について、新たに同定された領域全体を CGH 法により解析し、転写調節領域の変異・欠失に伴う高次クロマチン構造形成の異常と、症例との関係を解析したが、現時点では関連性を証明することはできなかった。

細胞レベルで、GSTA ファミリーのステロイドホルモン合成における作用を解析した。その結果、GSTA1 および GSTA3 にはプレグネロンからプロゲステロンへの変換に必須のステロイドイソメラーゼ活性があり、3

HSD とともに働いて、ステロイドホルモン合成に関わっている事が明らかとなった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Mizutani, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi, Y., Umezawa, A., **Miyamoto, K.**: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Molecular and Cellular Endocrinology* 408,133-137, 2015. 査読有.DOI: 10.1016/j.mce.2014.11.019.
2. Yazawa, T., Imamichi, Y., **Miyamoto, K.**, Umezawa, A., Taniguchi, T. : Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. *World J. Stem Cells* 6(2), 203-212, 2014. 査読有. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i2.203.
3. 矢澤隆志, 今道力敬, 梅澤明弘, **宮本 薫**: ES/iPS細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化. *産科と婦人科*. 81(3),351-356,2014. 査読無.
4. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., **Miyamoto, K.** : Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(1), 33-42, 2014. 査読有. DOI:10.1016/j.bbagr.2013.11.005
5. Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Osaki, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Matsumura, T., Kanno, M., Kamiki, Y., Kimura, K., Minamino, N., **Miyamoto, K.**: C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ ) mediates progesterone production through transcriptional regulation in co-operation with SF-1 (steroidogenic factor-1 ). *Biochem. J.* 460,459-471,

2014. 査読有. DOI:10.1042/BJ20131522
6. Kanno, M., Yazawa, T., Kawabe, S., Imamichi, Y., Usami, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Mizutani, T., Fujieda, S., **Miyamoto, K.** : Sex-determining region Y-box 2 and GA-binding proteins regulate the transcription of liver receptor homolog-1 in early embryonic cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1839(5),406-414,2014. 査読有. DOI:10.1016/j.bbagr.2014.03.016
  7. Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., **Miyamoto, K.**, Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y.: Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154(8), 2870-2880, 2013. 査読有. DOI:10.1210/en.2012-2173
  8. Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., **Miyamoto, K.** : Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *The FASEB Journal* 27(8), 3198-3208, 2013. 査読有. DOI:10.1096/fj.12-222745
- [学会発表](計 31 件)
1. 水谷哲也, **宮本 薫** : SF-1 による新たな転写調節メカニズム. 生殖内分泌学~基礎から臨床への架け橋. 第19回日本生殖内分泌学会学術集会. 2015,1,10, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市).
  2. 今道力敬, 矢澤隆志, 河邊真也, 石兼 真, 向井邦晃, 折坂 誠, 水谷哲也, **宮本 薫** : 11-ケトテストステロンはエストロゲン変換を受けないアンドロゲンとして機能する. 第19回日本生殖内分泌学会学術集会. 2015,1,10, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市).
  3. 水谷哲也, 河邊真也, 石兼 真, 今道力敬, **宮本 薫** : SF-1 と C/EBP によるステロイドホルモン産生調節機構. 平成26年度日本動物学会中部支部大会. 2014,11,22-24, のと勤労プラザ(石川県鳳珠郡).
  4. 今道力敬, 矢澤隆志, **宮本 薫** : 哺乳類卵巣における 11-ketotestosterone の合成とその役割. **若手研究者のナイトセッション**. 平成26年度日本動物学会中部支部大会. 2014,11,22-24, のと勤労プラザ(石川県鳳珠郡).
  5. 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 石兼 真, **宮本 薫** : C/EBPβ による CYP11A1 の新たな転写調節機構. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー. 2014,7,10-12, 富士レークホテル(山梨県南都留郡).
  6. Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Ishikane, S., Osaki, T., Minamino, N., **Miyamoto, K.** : Steroidogenic Factor 1 (SF-1) and C/EBPβ cooperatively regulate progesterone production. 16<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & EXPO 2014. 2014,6,21-24, Chicago (USA).
  7. Mizutani, T., **Miyamoto, K.** : SF-1 dependent regulation of GSTA family genes and their implication for adrenocortical function. Adrenal growth and development. Session 7: Steroidogenic Factor. The XVIth Conference on the Adrenal Cortex. 2014,6,17-20, Chicago (USA).

8. 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 尾崎 司, 南野直人, **宮本 薫**: SF-1 複合体構成因子の同定とプロゲステロン産生に対する役割. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014,4,24-26, 福岡国際会議場(福岡市).
9. 水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 尾崎 司, 南野直人, **宮本 薫**: SF-1 複合体構成因子 C/EBP $\beta$  のプロゲステロン産生に対する役割. 第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2013,12,7, シェーンバッハ・サボー (東京都).
10. 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢澤隆志, 菅野直史, 河邊真也, **宮本 薫**: ステロイドホルモン産生細胞における GSTA ファミリーの転写制御と機能. 第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2013,12,7, シェーンバッハ・サボー (東京都).
11. 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 河邊真也, **宮本 薫**: 新たなステロイド代謝酵素 GSTA ファミリーの転写調節機構. 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2013,11,22-23, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市).
12. 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 具 云峰, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, **宮本 薫**: SF-1 による Glutathione S-transferase(GST)A family の転写制御機構. 第 31 回内分泌代謝学サマーセミナー. 2013,7,11-13, ゆふいん山水館 (大分県由布市).
13. 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 河邊真也, 菅野真史, 矢澤隆志, **宮本 薫**: Ferredoxin 1 の性腺特異的転写制御機構. 第 31 回内分泌代謝学サマーセミナー. 2013,7,11-13, ゆふいん山水館 (大分県由布市).
14. 水谷哲也, **宮本 薫**: GSTA ファミリーのクロマチン構造の変化を介した転写制御とステロイド産生に対する役割. シンポ

ジウム 17 卵胞発育・排卵・卵成熟の調節機構の分子メカニズム. 第 86 回日本内分泌学会学術総会. 2013,4,25-27, 仙台国際センター (仙台市).

15. 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢澤隆志, 菅野直史, 河邊真也, **宮本 薫**: ステロイドホルモン産生細胞における Alpha class GST の転写制御. 第 86 回日本内分泌学会学術総会. 2013,4,25-27, 仙台国際センター (仙台市).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 子宮肉腫転移モデル

発明者: 吉田好雄、河邊真也、水谷哲也、

**宮本 薫**、石兼 真、清野 泰

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2014-149007 号

出願年月日: 平成 26 年 7 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: 卵子の受精可能性の検査のためのバイオマーカーおよびそれを用いた判定

発明者: **宮本 薫**、水谷哲也、折坂 誠、田中 憲次、李 良子、野中大輔、麻田恭一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2013-156672 号

出願年月日: 平成 25 年 7 月 29 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮本 薫 ( MIYAMOTO, Kaoru )

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 30125877