

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20146

研究課題名(和文) 顆粒膜細胞の黄体化に伴うCyp11a1遺伝子発現に関するエピジェネティクス制御

研究課題名(英文) Changes in histone modifications and DNA methylation of the Cyp11a1(P450scc) promoter region in rat granulosa cells undergoing

研究代表者

岡田 真紀 (OKADA, Maki)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90736159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣顆粒膜細胞では、LHサージから排卵までの短時間で急速にプロゲステロンが合成される。本研究では、そのプロゲステロンの合成に関する遺伝子の一つであるCyp11a1遺伝子の発現調節機構に、ヒストン修飾の変化によりクロマチン構造が弛緩するというepigeneticな制御が関与することを解明した。さらに、このクロマチン構造の変化に伴い転写因子C/EBP の結合が増加し転写を活性化していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The ovulatory LH surge rapidly alters the expression of steroidogenesis-related genes in granulosa cells. Cyp11a1 is rapidly induced 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 that histone modifications and chromatin remodeling of the Cyp11a1 promoter region are altered in GCs undergoing luteinization during ovulation. These epigenetic changes are involved in the rapid increase of Cyp11a1 expression after the ovulatory LH surge. Our results also show that the C/EBP binding site in the proximal promoter region is a novel regulatory region of Cyp11a1 gene in rats.

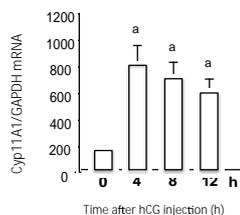
研究分野：生体分子学

キーワード：エピジェネティクス プロゲステロン合成 Cyp11a1

1. 研究開始当初の背景

LH サージ後の顆粒膜細胞では、排卵までの短時間に急速にプロゲステロン合成が進む。このプロゲステロン合成に關与する遺伝子の代表的なものである StAR 蛋白や pregnenolone 合成に關する P450scc(Cyp11a1) は LH サージ後遺伝子発現が急速に増加する。一方で、Aromatase (Cyp19a1)は、LH サージ後急速に減少する。このように顆粒膜細胞における遺伝子の発現は LH サージを契機にエストロゲン合成からプロゲステロン合成に急速にシフトするように調節されている。

近年、遺伝子発現調節には、ヒストン修飾や DNA の CG 部位のメチル化などのエピジェネティクス制御が關与していることが明らかとなっている。これらの修飾が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。実際に我々は、LH サージ後の StAR や Cyp19a1 遺伝子発現調節にこれらエピジェネティックな調節機構が關与していることを報告している(Endocrinology,2013)。このように LH サージにより各遺伝子のヒストン修飾が変化し転写調節に關与していることが分かった。そこで、Cyp11a1 遺伝子発現調節にも同様にエピジェネティックな調節機構が關与しているのではないかと考えた。我々は研究開始前に、ラット顆粒膜細胞を用いた RT-PCR による mRNA 発現解析で、LH サージ後の Cyp11a1 mRNA 発現の急激な増加を確認している(図1)。しかしながら、Cyp11a1 遺伝子発現調節に關しては未だ不明な点が多く残されている。本研究では、Cyp11a1 遺伝子の発現調節に關するプロモーター領域のエピジェネティクス変化とその細胞内情報伝達系を調べることで、遺伝子特異的な発現制御機構を解明する。



(図1) LH サージ後の Cyp11a1 mRNA 発現変化

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 Cyp11a1 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關与を証明することを目的とする。

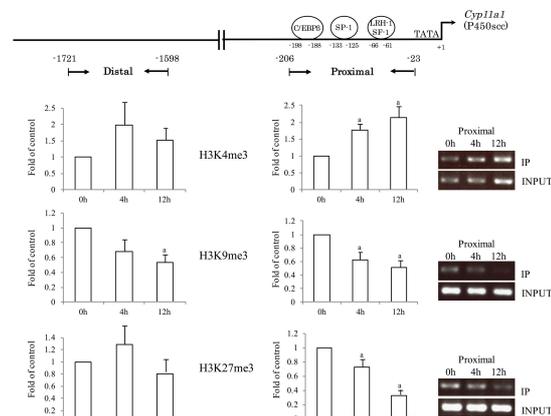
3. 研究の方法

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、12 時間後の卵巣から排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞を回収した。

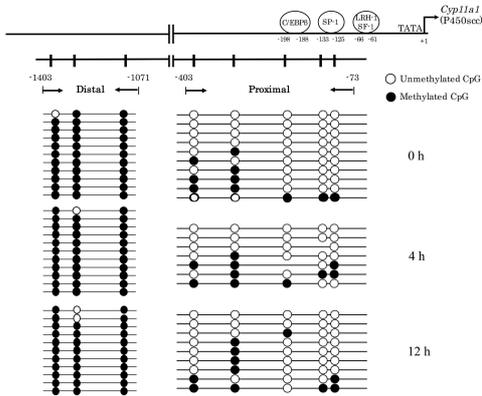
- (1) 排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞で、Cyp11a1 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾の変化をクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。
- (2) 排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞で、Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化状態の変化を Bisulfite genomic sequencing 法を用いて明らかにする。
- (3) Cyp11a1 遺伝子のプロモーター領域におけるクロマチン構造の変化を DNase accessibility assay を用いて明らかにする。
- (4) 排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞で、C/EBP 蛋白発現変化を Western blotting 法を用いて明らかにする。また、C/EBP の Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域への結合変化をクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。C/EBP 結合配列を含む領域が転写活性を有するかをルシフェラーゼ解析を用いて明らかにする。

4. 研究成果

Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾変化を CHIP assay を用いて検討したところ、近位領域において転写促進に働く H3K4me3 が hCG 投与後 4 時間と 12 時間で有意に高値となり、転写抑制に働く H3K9me3 と H3K27me3 は 4 時間と 12 時間で有意に低値となった(図2)。一方、遠位プロモーター領域では優位な変化は認めなかった。また、DNA メチル化を Bisulfite genomic sequencing 法で検討したところ、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域では低メチル化状態に保たれ、hCG 刺激では変化しなかった(図3)。これは、近位プロモーター領域が転写に重要な領域であることを示している。

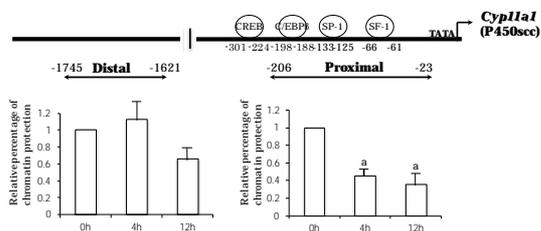


(図2) Cyp11a1 プロモーター領域のヒストン修飾変化



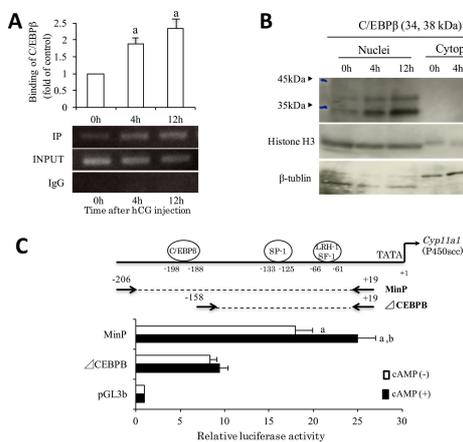
(図3) DNase accessibility assay

そこで、この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、Cyp11a1 近位プロモーター領域ではhCG 刺激後クロマチンが弛緩する方向に変化することが分かった(図4)。



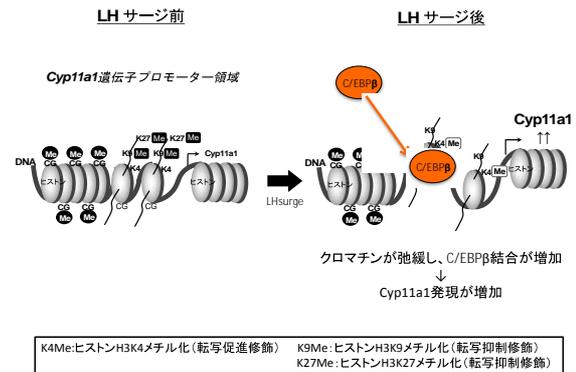
(図4) DNase accessibility assay

さらに、hCG 刺激後クロマチン構造が弛緩した領域への転写因子の結合が変化しているかを ChIP assay で検討したところ、C/EBP の結合は有意に上昇し(図5A)、western blotting 法では核内の C/EBP 蛋白発現はhCG 投与後 12 時間まで増加した(図5B)。また、ルシフェラーゼ解析にて C/EBP 結合配列を含む領域が転写活性を有することを示した(図5C)。



(図5)hCG 刺激後 Cyp11a1 プロモーターへの C/EBP 結合変化、蛋白発現変化、ルシフェラーゼ解析

これらの結果より、LH サージ後の排卵過程における黄体化顆粒膜細胞において急速に増加する Cyp11a1 mRNA 発現に、Cyp11a1 プロモーター領域のヒストン修飾およびクロマチン構造変化など、エピジェネティックな変化が関与していることを証明した。また本研究は、近位プロモーター領域の C/EBP 結合部位が、Cyp11a1 遺伝子上の新規に発見された発現制御領域であることも示した(図6)。



(図6) hCG サージ後の Cyp11a1 発現変化

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)

M. Okada, L. Lee, R. Maekawa, S. Sato, T. Kajimura, M. Shinagawa, I. Tamura, T. Taketani, H. Asada, H. Tamura, N. Sugino, Epigenetic changes of the cyp11a1 promoter region in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats, *Endocrinology*, 157:3344-3354/2016
査読あり, doi: 10.1210/en.2016-1264

〔学会発表〕(計 7 件)

岡田真紀, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1(P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御, 第 109 回日本繁殖生物学会, 2016.9.15, 麻布大学(神奈川県・相模原市)

岡田真紀, Changes in histone modification, DNA methylation and C/EBPb binding of the CYP11A1 promoter region in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation, ASRM's annual meeting, 2015.10.21 ボルチモア(アメリカ)

岡田真紀, Changes in histone modification, DNA methylation and C/EBPb binding of the Cyp11a1 promoter region in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation, SSR's 48th annual meeting, 2015.6.22 サンファン(アメリカ)

岡田真紀, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会, 2015. 5. 23, 学術総合センター橋講堂 (東京都・千代田区)
岡田真紀, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御, 60th Annual Meeting of JSRM, 2015. 4. 29, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
岡田真紀, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御, 第 88 回日本内分泌学会, 2015. 4. 25, ホテルニューオータニ東京 (東京都・千代田区)
岡田真紀, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御, 第 67 回日本産科婦人科学会, 2015. 4. 12, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
岡田真紀, ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御, 第 19 回日本生殖内分泌学会, 2015. 1. 10, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)

無し

(3) 連携研究者
無し

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 真紀 (OKADA, Maki)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：9 0 7 3 6 1 5 9

(2) 研究分担者