

平成21年 5月21日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770048

研究課題名（和文） 生殖器官における機能ゲノム領域の探索・同定・解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of functional genomic regions in reproductive organs.

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：哺乳類の生殖器官におけるゲノム機能を明らかにするために、卵巣と精巣でクロマチンの緩んでいるゲノム領域を探索した。その結果、生殖器官で発現する遺伝子の転写をコントロールと思われる新規の配列が複数同定できた。その中でも特に卵巣の顆粒膜細胞特異的に発現する *Amhr2* 遺伝子座においては2つの機能領域が同定され、それぞれが組織によって異なる転写調節活性を持つことが示唆された。このことからこれらのゲノム領域が多機能である可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

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：クロマチン、ゲノム、転写、生殖、卵巣、精巣

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムにはその生命体が生きていくうえで必要なすべての情報が含まれると言われている。主要な生物のゲノムプロジェクトが終了した結果、ゲノム配列の中で遺伝子にあたる部分がほんの一部であることがわかった。ヒトの場合では全ゲノム配列の約4分の1が遺伝子であり、実際にタンパク質をコードするエクソンは約1%しかなかった。したがって、多くの研究者がポストゲノム研究としてタンパク質の構造や機能の解

析を行っている状況では、ゲノムの大部分を占めるイントロンや遺伝子間領域の機能に関する研究が進展しないことが危惧された。一方で、non-coding RNA（遺伝子をコードしないRNA）やSNPs（Single Nucleotide Polymorphisms: 一塩基多型）に代表されるように、エクソン以外の配列が重要な機能を持つことを示唆する報告も増えていた。このような背景のもと本研究が始まった。

2. 研究の目的

本研究では、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を究極目標にして、特に研究の遅れている遺伝子間領域やイントロンの機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

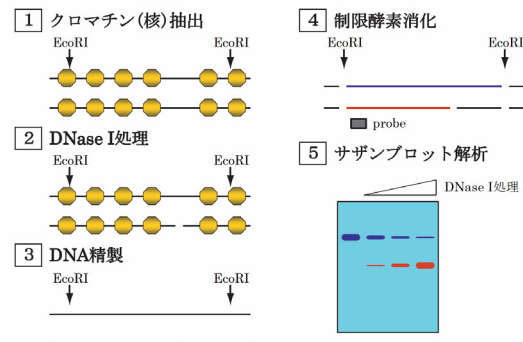
- (1) ゲノム上の各配列は組織や発生時期、外部環境などのさまざまな要因によって、その機能を発揮したりまったく働かなかったりすると考えられる。したがって、それぞれの状況において *in vivo* で機能している領域を同定することが必要であるが、そのための指標となるのが DNase I 高感受性領域 (HS: Hypersensitive Site) である。DNase I HS は文字通り、DNase I (DNA 分解酵素) によって真っ先に分解されるクロマチン領域のことであり、これは、ヒストンと DNA の結合が緩くなっているか、あるいはヒストンがまったくない領域であることを意味する。多くの場合、それは何らかのタンパク質がその領域に結合して、その機能を発揮していることを反映する。つまり、さまざまな状況下で DNase I HS を探索することによって、その細胞・組織において今まさに機能を発揮しているゲノム領域を同定できると考えた。そして本研究ではそのようなゲノム配列を「機能ゲノム領域」と呼ぶことにした。
- (2) 今回は生命の本質とも言える生殖活動を担う組織である卵巣と精巣に焦点をあてて、機能ゲノム領域の探索を行った。生殖器官で機能している可能性が高いゲノム領域として、生殖機能に重要な役割を果たすことが知られている遺伝子とその周辺の配列が考えられるため、まずこれらについて機能ゲノム領域の探索を行った。具体的には卵巣の顆粒膜細胞で発現している *Amhr2*、*Scd2*、*POP* の各遺伝子と、我々がクローニングした精巣特異的遺伝子である *Tessp1* 遺伝子について主に解析を行った。
- (3) (1)と(2)のようにして同定された機能ゲノム領域は、過去の報告から考えると、遺伝子発現調節という機能を持つ可能性が高いと考えられた。そこで *in vitro* のレポーター解析によってその転写調節活性を検討した。また、一部の配列についてはレポーター遺伝子とつないだコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスの作製を行い、*in vivo* での解析が可能な状況を作った。
- (4) 同定した機能ゲノム領域においてどの

ようなタンパク質が結合しているのかを、ゲルシフト解析やクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにしようと試みた。しかし、この実験はこれまでのところ成功していない。

4. 研究成果

- (1) 生殖器官ではたらく遺伝子を含むゲノム領域について DNase I HS の探索を行った。DNase I HS はサザンプロット法を用いた図 1 のような方法によって検出した。まず調べたい細胞や組織から核を抽出して、その核を DNase I で処理する。今回はタカラバイオ株式会社より購入した DNase I を用いており、75-cm² フラスコから回収した細胞の場合 50 ユニットで 0~60 秒間処理を行った。EDTA を加えることで DNase I の反応を止めてから、プロテアーゼ K 消化とフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によってゲノム DNA を精製した。次に調べたい領域を含む DNA 断片を生じるような制限酵素で DNA を一晚消化し、その後電気泳動を行ってサザンプロット解析を行った。プローブを各断片のどちらかの端に設定しておくことで、DNase I によって消化された結果生じた DNA 断片が検出できる。このバンドの分子量を算出することで DNase I HS の位置が同定できる。

図1: DNase I HS の検出方法



- (2) 本研究では卵巣と精巣に発現する遺伝子を含むいくつかのゲノム領域について解析を行った。ここでは卵巣の顆粒膜細胞で発現する *Amhr2*、*Scd2*、*POP* の各遺伝子座と精巣に特異的に発現する *Tessp1* の遺伝子座について報告する。解析には樹立された培養細胞である OV3121 (マウス卵巣顆粒膜細胞の癌細胞)、NIH3T3-3-4 (マウス胚性繊維芽細胞)、Hepa1-6 (マウス肝細胞)、TM4 (マウス精巣のセルトリ様細胞) などとともに卵巣顆粒膜細胞の初代培養と肝臓の組織も用いた。なお卵巣・精巣以外の細胞は比較のためのコントロールである。

それぞれの細胞・組織から核を抽出して DNase I を処理し、(1)で述べたようにして DNase I HS の検出を試みた。結果は図2にまとめた通りで、Amhr2、Scd2、POP、Tesspl の各遺伝子座で合計 15 ヶ所の DNase I HS を同定することに成功した。Amhr2 遺伝子座では OV3121 と Hep1-6 の他、初代培養した顆粒膜細胞と肝臓でも2つの DNase I HS が同定された。Scd2 遺伝子座では OV3121 細胞において3つの DNase I HS が同定された。POP 遺伝子座の解析は主に OV3121 と NIH3T3-3-4 細胞を用いて行ったが、遺伝子が大きいために遺伝子の前半部分のみ解析を行い、少なくとも8つの DNase I HS が存在することがわかった。Tesspl 遺伝子座については TM4、NIH3T3-3-4、Hep1-6 を用いて解析した結果、2つの DNase I HS を検出した。これら15個の DNase I HS すなわち機能ゲノム領域はほとんどが組織特異的ではなく、複数の細胞種に共通して存在していた。遺伝子の発現状態（発現の有無、発現の強弱）と DNase I HS の存在についても明確な相関はみられなかった。

図2：各遺伝子座におけるDNase I HSの同定



- (3) 同定した DNase I HS が転写調節活性を持つ可能性を検討した。まず、Amhr2 遺伝子座において同定した2つの DNase I HS (下流からそれぞれ HSI、HSII と名づけた) についてさらに詳しいマッピングを行い、それぞれを約 1.5kb と約 2kb に絞り込んだ。これらの配列を Amhr2 のプロモーターとともにレポーター遺伝子であるルシフェラーゼにつないで、培養細胞に導入しその転写調節活性を検討した (図3)。まず卵巣顆粒膜細胞由来の培養細胞である OV3121 を用いた場合、HSI はプロモーター活性にほとんど影響を与えなかったのに対し、HSII はプロモーター活性を約2倍に増加させることがわかった。一方、肝臓由来である Hep1-6 細胞を用いた場合、HSII がプロモーター活性に影響しなかったのに対し、HSI はプロモーター活性をバックグラウンド

レベルまで低下させることがわかった。我々の RT-PCR 解析の結果によると、Amhr2 は OV3121 細胞では発現しているが、Hep1-6 細胞では発現していないことがわかっている。これらのことから、Amhr2 遺伝子座で同定した2つの機能ゲノム領域は卵巣と肝臓で異なる機能を持つことが示唆された。すなわち、HSI は肝臓において（そしておそらくそれ以外の Amhr2 が発現していない組織においても）Amhr2 の発現を抑えており、HSII は卵巣顆粒膜細胞で Amhr2 のエンハンサーとして働いている可能性がある (図4)。

図3：Amhr2遺伝子座におけるDNase I HSIの転写調節活性

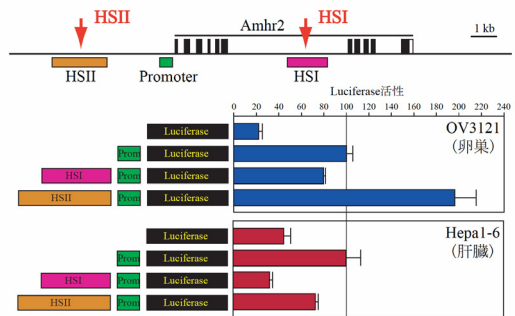
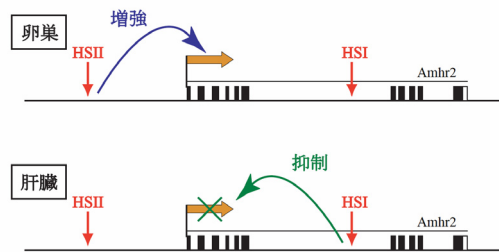


図4：Amhr2遺伝子の卵巣特異的発現調節モデル



- (4) Scd2 遺伝子座において同定した3つの DNase I HS についても(3)と同様の解析を行った結果、この3つの機能ゲノム領域はいずれも in vitro では Scd2 のプロモーター活性を抑制することがわかった。しかしながら、この転写抑制活性は用いた4種類の培養細胞すべてで見られたために in vivo における活性を必ずしも反映していないことが考えられた。そこで、これらの DNase I HS の in vivo での転写調節活性を検討するためにトランスジェニックマウスの作製を行った。ここではレポーター遺伝子として EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)を用いて、Scd2 のプロモーターのみの、あるいは DNase I HS とプロモーターをつないだコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトをマウスの受精卵に導入した結果、それぞれ 13 匹と 6 匹の F0 マウスを得ることに成功した。
- (5) 本研究では生殖器官ではたらく遺伝子

を含むゲノム領域の探索から、多数の新しい機能ゲノム領域を同定した。そして、それらの遺伝子発現調節という機能を詳しく調べた結果、*Amhr2* 遺伝子座における機能ゲノム領域のように組織によって全く違った機能を持つものが存在する可能性が明らかになった。近年 DNase I HS の網羅的な解析が報告されるようになり、それらの結果を見るとやはり複数種類の細胞・組織に共通した DNase I HS が多数存在することがわかっている。しかし生殖器官とその他の組織を比較した報告はまだなく、本研究によって生殖器官における DNase I HS も他の組織と共通しているものが多い、ということが明らかになった。また、ほとんどの網羅的解析では個々の DNase I HS の機能までは調べられておらず、本研究のように個々の機能を丁寧に調べた研究の意義は大きい。そして、何より *Amhr2* 遺伝子座の解析によって機能ゲノム領域が組織によって異なった複数の機能を持つ可能性を示唆できたことは大きな成果である。このようなゲノムの多機能性を追及する研究は今後ますます発展が見込まれる分野であり、本研究の成果はそのための基盤とな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2件)

- ① Takano N., Kimura A., and Takahashi T. (2009) Two distinct localization patterns of Testis-Specific Serine Protease 1 (TESSP1) in the seminiferous tubules of the mouse testis. *Zoolog. Sci.* (有) 26:294-300.
- ② Kimura A. P., Sizova D., Handwerger S., Cooke N. E., and Liebhaber S. A. (2007) Epigenetic activation of the human growth hormone gene cluster during placental cytotrophoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.* (有) 27: 6555-6568.

[学会発表] (計5件)

- ① 木村敦 「マウス *Amhr2* 遺伝子の新たな発現調節機構についての考察」第33回日本比較内分泌学会年会 (東広島、2008年12月5日)
- ② 松原伸、木村敦 「妊娠マウスにおけるプロリルオリゴペプチダーゼの発現およびDNAメチル化解析」第79回日本動物学会大会 (福岡、2008年9月7日)
- ③ 松原伸、木村敦 「マウスの卵巣と胎盤に

おけるプロリルオリゴペプチダーゼの発現とDNAメチル化」日本動物学会北海道支部第54回大会 (札幌、2008年8月9日)

- ④ Ribeiro V. and Kimura A. 「Expression and epigenetic regulation of the murine *Scd2* gene.」日本動物学会北海道支部第54回大会 (札幌、2008年8月9日)
- ⑤ 木村敦 「マウスミューラー管抑制因子受容体遺伝子のイントロン中に発見された機能領域の解析」第78回日本動物学会大会 (弘前、2007年9月22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