

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791139  
 研究課題名 (和文) 転写因子 SF-1 および LRH-1 による卵巣分化の分子メカニズムの解明  
 研究課題名 (英文) Elucidation of the molecular mechanism by which NR5A family induces ovarian differentiation

研究代表者  
 水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)  
 福井大学・医学部・講師  
 研究者番号：90322734

研究成果の概要(和文):転写因子 SF-1 と LRH-1 の標的遺伝子である *StAR* 遺伝子領域において、新たなエンハンサー領域を同定すると共に、この領域とプロモーター領域との間でループ構造をとることが転写の活性化に重要であることを明らかにした。さらに私どもが生化学的手法により同定した SF-1 複合体構成タンパク質の1つ C/EBP $\beta$  が、SF-1 と共にその標的遺伝子にリクルートされ協調的に転写調節に関与することが示された。本研究により SF-1 と LRH-1 によってひきおこされる新たなクロマチン構造変換メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : We identified novel SF-1/LRH-1 binding sites in human *StAR* gene about 3,000 bp upstream from the transcriptional start site. We demonstrated by a luciferase reporter system that the upstream region was important for the activation of gene expression. Interestingly, nucleosome eviction has been found at those SF-1/LRH-1 binding sites (both promoter and enhancer region) by ChIP assay. 3C analysis revealed that DNA loop was formed between the promoter and the enhancer regions. These results indicate that the novel enhancer region participates in the human *StAR* gene activation by orchestrating chromatin loop architecture. Furthermore, we characterized transcription factor C/EBP $\beta$  which is identified as one of the components of SF-1 complex by biochemical approach. We elucidated C/EBP $\beta$  is also important for SF-1/LRH-1-induced ovarian differentiation as a these partner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野:生殖内分泌学

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:SF-1、LRH-1、卵巣、幹細胞、分化、StAR、クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 Ad4BP/SF-1(SF-1)と LRH-1 は卵巣の発生・分化・機能維持に重要な役割を果たしている。これらの転写因子はステロイド合成関連酵素の転写促進に必須であり、またノックアウトマウスやヒトの遺伝子変異による解析から卵巣の発生・分化・機能維持に重要であることが明らかとなっているが、その分子メカニズムは解明されていない。またこれらの転写因子は同じ DNA 配列に結合して作用するが、卵巣の分化に対して同じ作用をしているのか、それとも異なる機能を持つのかも明らかではない。

私どもは、間葉系幹細胞に SF-1 を導入することによりステロイドホルモン産生細胞の創出に成功している。ES 細胞を初めとするその他の細胞では、同処理でステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導出来なかったことから、間葉系幹細胞は卵巣の分化機構解明や再生医療への応用の良いモデルと考えられる。幹細胞から SF-1 や LRH-1 によってステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導されるメカニズムを解明し、これら転写因子の卵巣分化(不可逆的な転写調節)に対する役割を明確にする。本研究により SF-1 と LRH-1 の卵巣分化に対する役割を明らかにし、これら遺伝子変異による疾患の解明や、機能を代替する新たな治療法の開発につなげる。また本研究の知見を基に、骨髄間葉系幹細胞からフィードバック機構を有した莖膜細胞や顆粒膜細胞機能を持つ細胞の創出方法を確立し、新たな再生医療法の開発につなげたい。

## 2. 研究の目的

- (1) SF-1 および LRH-1 による StAR の発現誘導メカニズムを解明する。
- (2) 間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導時における SF-1 複合体を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) StAR のクロマチン構造変換および転写活性化メカニズムの解明

- ①間葉系幹細胞株 UE7T13 細胞へ myc タグ付き SF-1 導入前後における、StAR 遺伝子上の RNA polymeraseII、SF-1 のリクルートおよびヒストン量(H2B)を ChIP 法により解析した。
- ②本研究で新たに同定した StAR エンハンサー

領域の活性化能を明らかにするために HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイにより検討した。

- ③間葉系幹細胞株 UE7T13 細胞への SF-1 導入前後において、プロモーター領域と私どもが新たに同定したエンハンサー領域とでループ構造を形成するか否かについて、Chromosome Conformation Capture assay (3C assay)により検討した。

### (2) 幹細胞における SF-1-クロマチンタンパク質転写複合体の同定

Flag タグ付 SF-1 を幹細胞株 hMSC-TERT-E6/E7 細胞へ安定導入し核抽出物を回収した。さらに抗 Flag 抗体を用いたアフィニティー精製により SF-1 複合体を単離した(図3)。SF-1 複合体を SDS-PAGE で分離後、回収し MS/MS 解析により約 20 の複合体を同定した。その複合体の 1 つである C/EBP $\beta$  の標的遺伝子へのリクルートを ChIP 法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) StAR のクロマチン構造変換および転写活性化メカニズムの解明

- ①図 1A に示すように、プロモーター領域と共に転写開始地点上流 3kbp に SF-1 が結合する領域を新たに同定した。また SF-1 結合領域特異的にヒストンが減少することを見出した。このことから StAR の転写活性化の際、SF-1 結合領域のヌクレオソーム変換、特にヌクレオソームフリーな状態をつくり SF-1 の結合を促進することが重要ではないかと考えられた。
- ②新たに同定したエンハンサー領域が、その活性に重要であることが明らかとなった(図1B)。
- ③3C assay により SF-1 によるクロマチン構造変換を検討したところ、新規エンハンサー領域特異的にプロモーター領域とループ構造を形成していることが明らかとなった(図 2)。本研究により、StAR の転写活性化には SF-1 とその複合体と共にループ構造を形成することが重要であると推察され、ステロイド関連遺伝子の新たな転写メカニズムが示された。

### (2) 幹細胞における SF-1-クロマチンタンパク質転写複合体の同定

私どもは SF-1 導入幹細胞から、生理的な条件で SF-1 複合体を抽出し、MALDI TOF-MS/MS 解析により約 20 の SF-1 複合体構成タンパク質

を同定した。その中から、cAMP 刺激により SF-1 との相互作用が強くなる C/EBP  $\beta$  に着目し、SF-1 標的遺伝子 StAR へのリクルートを ChIP assay により検討した(図4)。その結果、プロモーター領域には SF-1 および C/EBP  $\beta$  が共にリクルートされるが、上流 3 kb のエンハンサー領域には、SF-1 のみが主にリクルートされていた。このことから SF-1 標的遺伝子上では、SF-1 と C/EBP  $\beta$  をはじめとする複合体が領域特異的に精巧なクロマチン構造を構築し転写調節していることが示された。

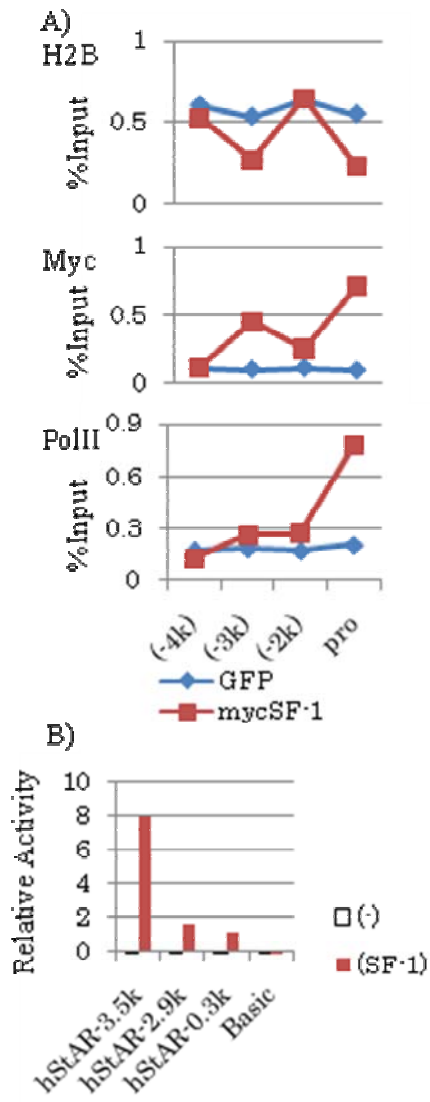


図1 SF-1 による StAR プロモーター領域のクロマチン構造変換(A)と転写活性化(B)

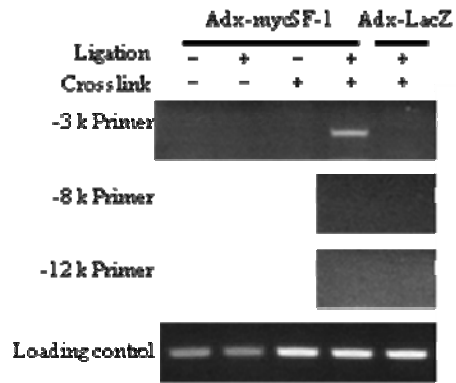


図2 Chromosome Conformation Capture assay (3C assay)によるクロマチン構造変換解析

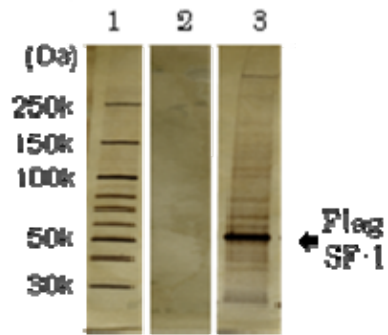


図3 間葉系幹細胞における SF-1 複合体の同定 (1)分子量マーカ、(2)SF-1 導入前、(3)導入後の核抽出液を用いた免疫沈降

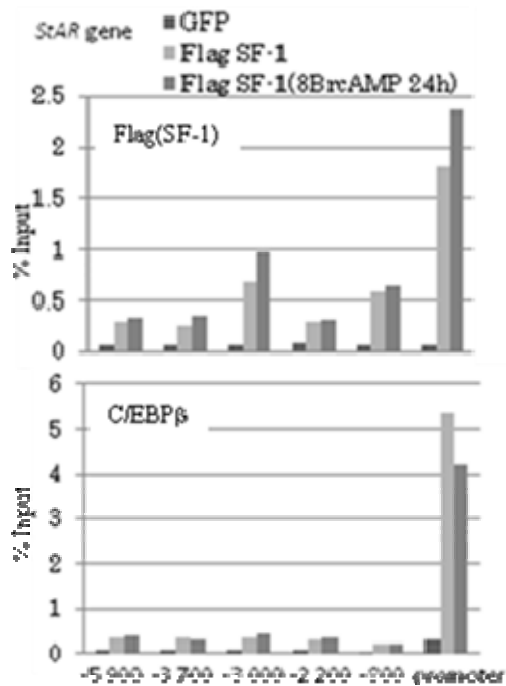


図4 SF-1 導入幹細胞における StAR プロモーター領域への SF-1 および C/EBP $\beta$  のリクルートの解析 (ChIP assay)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yazawa, T., Inaoka, Y., Okada, R., **Mizutani, T.**, Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Orisaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Endocrinol.* 24(3), 485-496, 2010. 査読有.
- ② Yazawa, T., Inaoka, Y., **Mizutani, T.**, Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Liver Receptor Homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology* 150(8), 3885-3893, 2009. 査読有.
- ③ Inaoka, Y., Yazawa, T., **Mizutani, T.**, Kokame, K., Kangawa, K., Uesaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Regulation of P450 oxidoreductase by

gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16:6(1),62, 2008. 査読有.

[学会発表] (計 19 件)

- ① **Mizutani, T.**, Yazawa, T., Uesaka, M., Inaoka, Y., Ju, Y., Okada, R., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of a novel enhancer region in the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.
- ② 安部由美子, 小松原麻紀, 齋藤恵美, 戸田麻友穂, 平石 光, 田村友宏, 笠原慶充, 定方久延, 勝俣祐介, 峯岸 敬, **水谷哲也**, 宮本 薫: 羊膜上皮細胞におけるダイオキシンの matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 発現に対する作用. 第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2009,11,28, 東京.
- ③ 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, **水谷哲也**, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子 PGC-1 $\alpha$  の機能. 第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2009,11,28, 東京.
- ④ **水谷哲也**, 矢澤隆志, 上坂美紀, 稲岡齊彦, 具 云峰, 岡田令子, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 宮本 薫: ヒト Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) 遺伝子における新たな SF-1/Ad4BP 結合領域の同定. 第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2009,11,28, 東京.
- ⑤ **水谷哲也**, 矢澤隆志, 上坂美紀, 稲岡齊彦, 具 云峰, 岡田令子, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 宮本 薫: Identification of a novel enhancer region in the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. 第 82 回日本生化学会大会. 2009,10,21-24, 神戸.
- ⑥ 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, **水谷哲也**, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: PGC-1 $\alpha$  は卵巣顆粒膜細胞のプロジェステロン合成を亢進させる. 日本動物学会第 80 回大会. 2009,9,17-20, 静岡.
- ⑦ 安部由美子, 小松原麻紀, 齋藤恵美, 戸田麻友穂, 水流奈己, 丸川りさ, **水谷哲也**, 宮本 薫: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin のヒト羊膜上皮細胞における matrix metalloproteinase-9 発現誘導作

- 用. 日本下垂体研究会第 24 回学術集会. 2009,8,27-29,青森.
- ⑧ 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 岡田令子, 山崎由希子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: PGC-1 $\alpha$  のステロイドホルモン合成に対する作用. 日本生化学会北陸支部第 27 回大会. 2009,5,23, 福井. 要旨集 27,2009.
- ⑨ 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣におけるゴナドトロピンによる P450 oxidoreductase の発現調節とエストロゲン産生への影響. 日本生化学会北陸支部第 27 回大会. 2009,5,23, 福井. 要旨集 26,2009.
- ⑩ 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣でのゴナドトロピンによる P450 oxidoreductase の発現調節とエストロゲン産生に及ぼす効果. 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 2009,4,23-25,前橋. 日本内分泌学会雑誌 85(1), 348, 2009.
- ⑪ 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 宮本 薫: 転写共役因子 PGC-1 $\alpha$  の卵巣機能における役割. 第 82 回日本内分泌学会学術総会 公開シンポジウム 4 間脳下垂体性腺系の分子機構の新知識. 2009,4,23-25,前橋. 日本内分泌学会雑誌 85(1), 213, 2009.
- ⑫ 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: 間葉系幹細胞のステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008,12,4-12,神戸.
- ⑬ 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase ゴナドトロピンによる発現制御とエストロゲン産生に及ぼす影響. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008,12,9-12,神戸.
- ⑭ 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会 2008,11,29,大阪.
- ⑮ 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ゴナドトロピンによるラット卵巣での P450 oxidoreductase の発現調節とアロマターゼ活性への影響. 第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会 2008,11,29,大阪.
- ⑯ 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 日本動物学会第 79 回大会 2008,9,5-7,福岡.

- ⑰ 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase ゴナドトロピンによる発現誘導と aromatase 活性に及ぼす影響. 第 26 回内分泌代謝学サマーセミナー 2008,7,11-12,愛知. 抄録集, 29.
- ⑱ 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008,5,16-18,青森. 日本内分泌学会雑誌 84(1), 208, 2008.
- ⑲ 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase(POR)のホルモンによる発現誘導と aromatase 活性に及ぼす影響. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008,5,16-18,青森. 日本内分泌学会雑誌 84(1), 208, 2008.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/SEIKA2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)

福井大学・医学部・講師

研究者番号: 90322734