

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18191

研究課題名（和文）エピゲノム情報の統合解析による顆粒膜細胞の黄体化に伴う遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice

研究代表者

白蓋 雄一郎（SHIRAFUTA, YUICHIRO）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00845050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：RNAシーケンスを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、顆粒膜細胞ではLHサージから排卵までの12時間で約6000もの遺伝子の発現が変化することを見出した。さらにChIPシーケンスによって、ヒストン修飾H3K4me3のゲノムワイドな変化があることが明らかになった。H3K4me3変化を伴う遺伝子はH3K4me3変化を伴わない遺伝子に比べて、発現変化量が大きいことがわかった。これらのH3K4me3に制御される遺伝子は、種々の細胞機能変化に関与し、顆粒膜細胞の黄体化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、LHサージ後に起こるゲノムワイドな遺伝子発現とヒストン修飾変化が、顆粒膜細胞の黄体化に寄与することがわかった。黄体化は妊娠の維持に必須の事象である。本研究により黄体化の調節機構のひとつが明らかになり、不妊症の一因である黄体機能不全の治療にも繋がるため、社会的意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide gene expression analysis using RNA sequencing revealed that the expression of about 6000 genes changes within 12 hours after the LH surge in mouse granulosa cells. Furthermore, ChIP sequencing revealed that genome-wide changes of the histone modification H3K4me3 are induced. Genes with H3K4me3 changes have greater expression changes than genes without H3K4me3 changes. These H3K4me3-regulated genes are involved in various cellular functional changes and may contribute to the luteinization of granulosa cells.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵巣 黄体化 epigenetics

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣では LH サージを契機に、卵胞内の顆粒膜細胞 (granulosa cells: GCs) が黄体化し、プロゲステロン産生能の獲得、卵子卵丘細胞複合体の膨化、卵胞破裂、血管新生、免疫などに関連する様々な細胞機能を獲得する<sup>(1-5)</sup>。我々は RNA シークエンス (RNA-seq) を用いた網羅的遺伝子発現解析によって、マウス GCs では LH サージから排卵までの 12 時間で約 6000 もの遺伝子の発現が変化することを見出した (図 1)。このような短時間の劇的な遺伝子発現変化には、転写因子による制御だけでなく、エピジェネティックな調節機構が働く必要がある<sup>(6-8)</sup>。我々はこれまで、LH サージ後のラット GCs において、*Vegf*、*Cyp11a1*、*StAR*、*Cyp19a1* の急激な発現変化に、ヒストン修飾とクロマチンリモデリングが関与していることを報告した<sup>(5,9-11)</sup>。しかし、黄体化過程の遺伝子発現変化におけるエピジェネティックな変化はまだ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではプロモーター領域のエピゲノム情報をゲノム全域にわたり取得し、GCs の黄体化におけるエピジェネティクス変化を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノムワイドヒストン修飾変化解析 (ChIP シークエンス)

クロマチン免疫沈降法 (ChIP) は特定の蛋白質が結合する DNA 領域を同定する手法であり、ChIP に次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP シークエンス (ChIP-seq) は、全ゲノム領域で特定のヒストン修飾や転写因子の結合する領域の情報を得ることができる。3 週齢幼若雌マウスに PMSG、hCG を投与したモデルを作成し、hCG 投与前 (0h)、投与後 4、12 時間後に卵巣から GCs を採取し、H3K4me3 抗体を用いて ChIP-DNA を作成する。この DNA をシーケンシングし、ゲノム配列にマッピングさせ、黄体化によりこれらのヒストン修飾が変化する領域を同定する。

### (2) RNA-seq、ChIP-seq の統合解析

RNA-seq と ChIP-seq の情報をゲノム配列に配置することにより、黄体化によって変化するエピゲノム情報を明らかにする。さらに、黄体化によって mRNA 発現が変化する遺伝子のうち、ヒストン修飾およびクロマチン構造の変化があった遺伝子 (エピジェネティックなメカニズムによって発現が制御される遺伝子) を抽出し、Gene Ontology 解析を行う。これにより、エピジェネティクスによって制御される細胞の機能的変化を同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 黄体化過程の顆粒膜細胞における H3K4me3 修飾のゲノムワイドな変化

hCG 刺激後の GCs において、ゲノム全域で H3K4me3 の状態がどのように変化するかを ChIP-seq を用いて調べた。0 時間から 4 時間において、H3K4me3 増加領域が 6203 領域 (5901 遺伝子)、減少領域が 3999 領域 (4542 遺伝子) であった。4 時間から 12 時間において、H3K4me3 増加領域が 3228 領域 (3717 遺伝子)、減少領域が 6563 領域 (6414 遺伝子) であった。H3K4me3 は、0 時間から 4 時間までは増加領域が多く、4 時間から 12 時間までは減少領域が多いことがわかった。

これらの領域の分布を転写開始点 (Transcription start site; TSS) からの距離に基づいて分類したところ、0 時間から 4 時間の間に H3K4me3 が増加した領域の 43.8% は近位プロモーター領域に位置し、44.2% は下流の遠位領域に位置していた (図 2A)。H3K4me3 は転写活性化指標であり、TSS 近傍に分布すると報告されているが (37)、今回の結果から下流の遠位領域にも多く存在することがわかった。0 時間から 4 時間までの H3K4me3 減少領域、および 4 時間から 12 時間までの H3K4me3 変化領域でも、同様の分布が確認された (図 2A)。

次に、TSS 周囲の H3K4me3 のシグナルの強さを、0 時間、4 時間、12 時間の間で比較した (図 2B)。TSS 周囲の H3K4me3 のレベルは、0 時間から 4 時間にかけて増加し、4 時間から 12 時間にかけて減少した。これらの結果より、黄体化過程の GCs では、H3K4me3 のレベルは

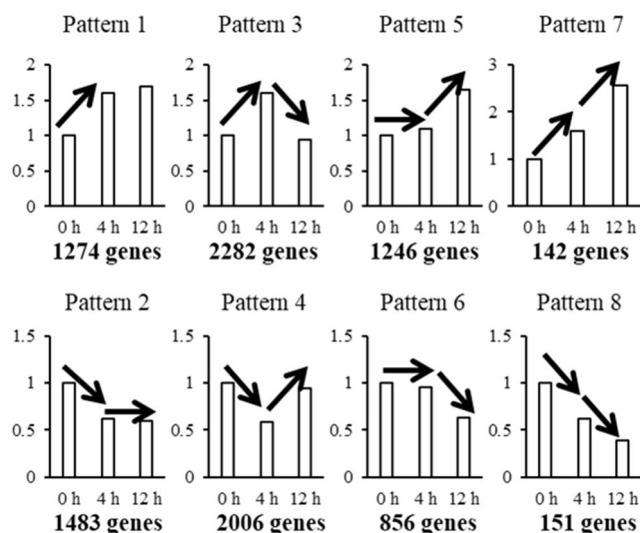


図 1 GCs の黄体化過程における mRNA 発現の経時的変化: 3 週齢雌マウスに PMSG-hCG 投与 (排卵刺激) し、投与前 (0h)、投与後 4h、12h に卵巣から GCs を回収し、全遺伝子の mRNA 発現量を RNA-seq によって定量した。約 6000 遺伝子の発現が経時的に変化していた。

hCG 刺激後 4 時間で最も高くなることがわかった。

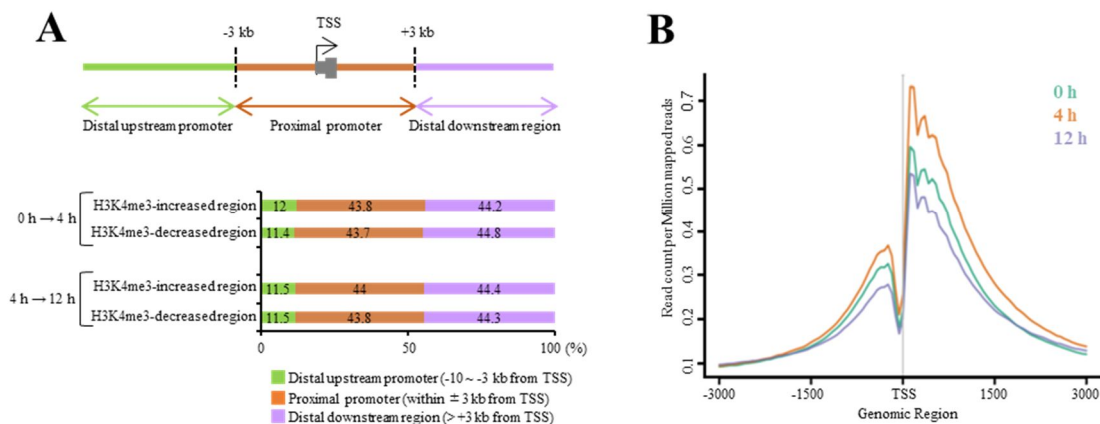


図 2. 黄体化過程の GCs における H3K4me3 のゲノムワイドな分布 A、H3K4me3 が増加した領域と減少した領域を、TSS からの距離に応じて、「proximal promoter」(TSS から ±3kb の領域内)、「distal upstream promoter」(TSS から 3kb 以上上流)、「distal downstream region」(TSS から 3kb 以上下流)の 3 つに分類した。結果は、全領域に対する割合で表した。B、3 つの時点での TSS 周辺の H3K4me3 レベルの変化を示す。0 時間後 (緑)、4 時間後 (オレンジ)、12 時間後 (紫) の全遺伝子における TSS 周辺の H3K4me3 のレベルを表す。

(2) H3K4me3 の変化と遺伝子発現の制御との関連について

黄体化過程の GCs において、H3K4me3 の変化が遺伝子発現変化の制御と関連しているかを調べた。

mRNA 発現変動遺伝子を、H3K4me3 の変化を伴う遺伝子と伴わない遺伝子に分類した。0 時間から 4 時間までに mRNA 発現が上昇した 3519 遺伝子のうち、H3K4me3 が増加した遺伝子は 1542 遺伝子 (43.8 %)であった (図 3A 上)。H3K4me3 の増加を伴う遺伝子と伴わない遺伝子の間で、mRNA レベルの変化量を比較したところ、H3K4me3 の増加を伴う遺伝子は、伴わない遺伝子に比べて、mRNA レベルの増加量が大きかった (図 3A 下)。一方、0 時間

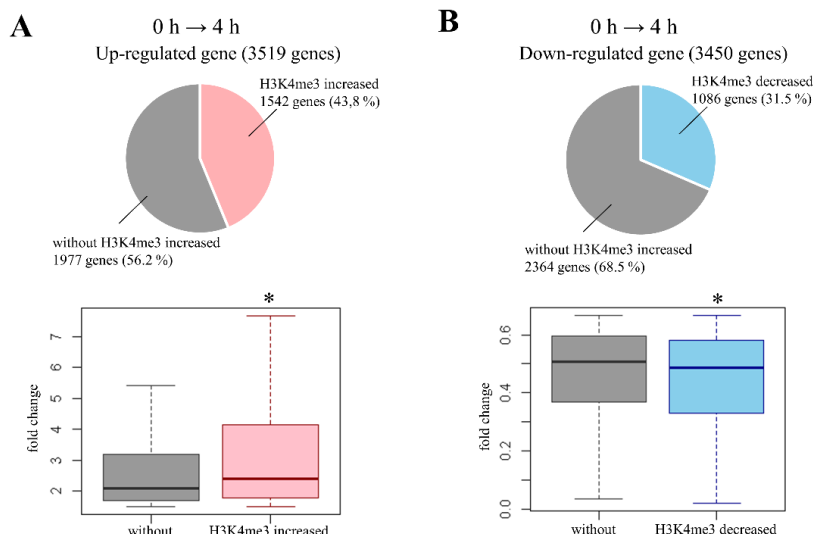


図 3. 黄体化過程の GCs における遺伝子発現と H3K4me3 の関連 A、円グラフは 0 時間から 4 時間までに発現上昇した遺伝子のうち、H3K4me3 の増加を伴う遺伝子の数と割合を示す (上)。2 つの時点の間で出現あるいは消失した H3K4me3 のピークを、H3K4me3 増加領域または減少領域と定義した。また、これらの領域が TSS の上流 10 kb から TSS の下流 10 kb の間に存在する遺伝子を、H3K4me3 増加遺伝子または減少遺伝子とした。H3K4me3 変化領域を伴う遺伝子と伴わない遺伝子の間で、発現上昇遺伝子の mRNA レベルの変化量を比較した (下)。P 値は Mann-Whitney U 検定を用いて算出した。\*P<0.05。B、0 時間から 4 時間の間に発現低下した遺伝子の解析結果。

から 4 時間の間に発現低下した 3450 遺伝子のうち、H3K4me3 が減少した遺伝子は 1086 遺伝子 (31.5 %)であった (図 3B 上)。H3K4me3 が減少を伴う遺伝子は伴わない遺伝子に比べて、mRNA レベルの減少量が大きかった (図 3B 下)。このような H3K4me3 変化の影響は、4 時間から 12 時間までの間に発現上昇・低下した遺伝子でも観察された。これらの結果から、H3K4me3 の変化は、発現変動遺伝子の多くにみられ、黄体化過程の GCs の遺伝子発現調節に寄与していることがわかった。

(3) 黄体化過程の顆粒膜細胞における H3K4me3 関連遺伝子の同定とその機能

H3K4me3 によって制御される H3K4me3 関連遺伝子を同定し、それらが関与する細胞機能を調べた。H3K4me3 は転写活性化指標であることから、黄体化過程の GCs において、mRNA 発現変化のパターン (図 1) と H3K4me3 変化のパターンが一致する遺伝子を H3K4me3 関連遺伝子と定義した。例えば図 4 のパターン 1 に示すように、hCG 投与後 4 時間で mRNA 発現

が上昇し、12 時間まで発現レベルが維持される遺伝子 (1274 個) のうち、H3K4me3 も 4 時間でリクルートされ、12 時間まで修飾が維持される遺伝子 (240 個) が、この定義に該当する。この定義に基づき、各 mRNA 発現変化パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子を同定したところ、パターン 3 の H3K4me3 関連遺伝子は 758/2282 個 (33.2%) であり、占める割合が他のパターンと比べ有意に高かった。H3K4me3 が制御すると考えられる細胞機能を調べるために、各パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子について、Gene ontology 解析を行った。H3K4me3 関連遺伝子は、発現上昇または低下遺伝子に関連する細胞機能 (図 5) の大部分に関連していた。

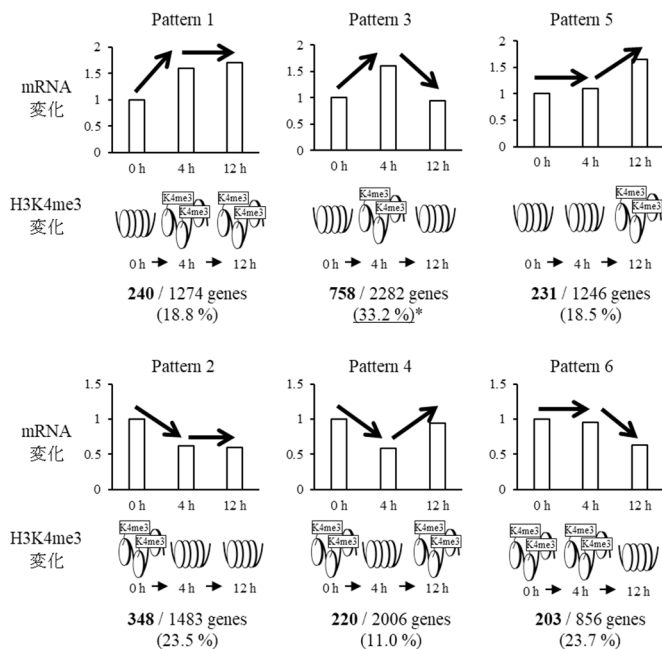


図 4. 各経時的パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子の同定

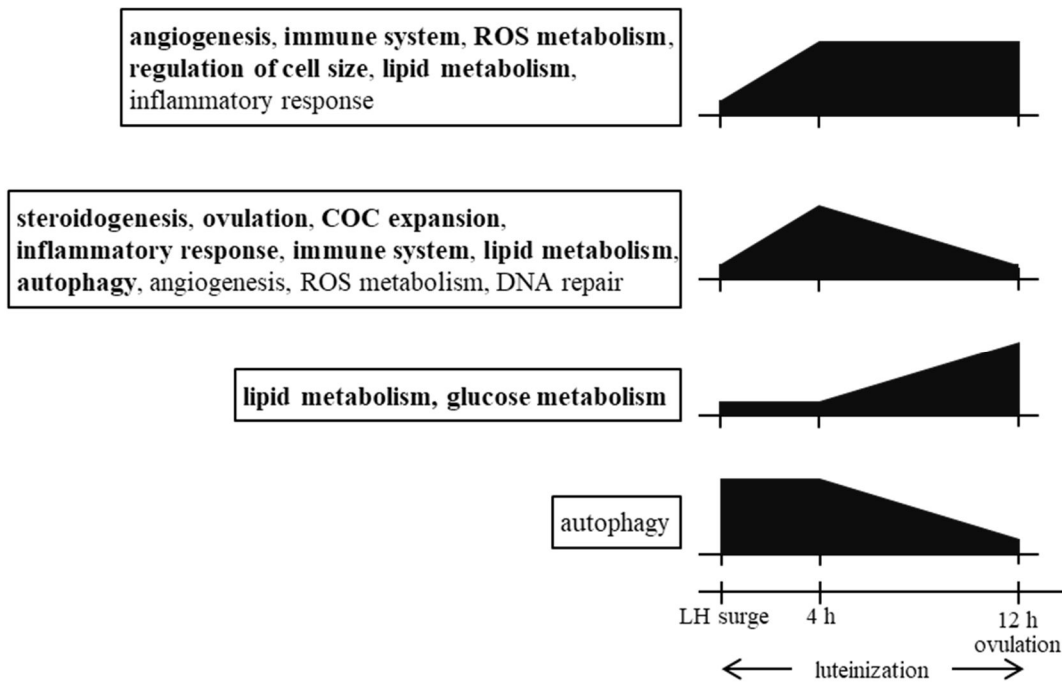


図 5. 黄体化過程の GCs における細胞機能の変化のまとめ。LH サージ後の GCs における細胞機能の経時的変化を示す。H3K4me3 の変化に関連する細胞機能を太字で示した。

<引用文献>

1. Prochazka R, et al. Biol Reprod. 2017;97(4):537–549.
2. Alam MH, et al. Reprod Med Biol. 2020;19(1):13–23.
3. Kizuka F, et al. Biol Reprod. 2012;87(3):55.
4. Duffy DM, et al. Endocr Rev. 2019;40(2):369–416.
5. Shinagawa M, et al. Sci Rep. 2019;9(1):714.
6. Li B, et al. Cell 2007;128(4):707–719.
7. Lauberth SM, et al. Cell 2013;152(5):1021–1036.
8. Tamura I, et al. J Biol Chem. 2018;293(14):5270–5280.
9. Okada M, et al. Endocrinology. 2016;157(9):3344–3354.

10. Lee L, et al. *Endocrinology*. 2013;154(1):458–470.

11. Maekawa R, et al. *J Ovarian Res*. 2016;9:15.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shirafuta Yuichiro, Tamura Isao, Ohkawa Yasuyuki, Maekawa Ryo, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Mihara Yumiko, Shinagawa Masahiro, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 162
2. 論文標題 Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1,17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endoqr/bqab128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白蓋雄一郎
2. 発表標題 マウス顆粒膜細胞の黄体化過程におけるゲノムワイド遺伝子発現とヒストン修飾の統合解析
3. 学会等名 第24回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------