

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791523

研究課題名（和文） 卵巣分化における新たなエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of the mechanisms of novel epigenetic regulations in ovarian differentiation

研究代表者

水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：90322734

研究成果の概要（和文）： 私どもはヒト間葉系幹細胞株 hMSC-TERT-E6/E7 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。この分化誘導系を用いて、卵巣を含むステロイド産生細胞分化へのエピジェネティックな制御機構を解明するために、①生化学的な手法によって同定した SF-1 複合体構成タンパク質の機能解析と②DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析による新たな SF-1 標的遺伝子の同定を行った。①により、SF-1 複合体構成タンパク質の 1 つとして同定した転写因子 C/EBP β は、SF-1 と協調的にステロイド代謝酵素 HSD3B2 遺伝子の発現を調節していることを明らかにした。②により、新たな SF-1 標的遺伝子としてグルタチオントランスフェラーゼ A3 (GSTA3)、5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) およびフェレドキシンリダクターゼ (FDXR) を同定した。そしてこれら遺伝子が、SF-1 によってエピジェネティックな変化を介して転写が活性化されること、さらにステロイド産生に機能的にも重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We showed that SF-1 expression induces differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. In order to elucidate the mechanisms of epigenetic regulations in differentiation into steroidogenic cells including ovarian cells, we attempted a couple of experiments using the differentiated cell. ①One is functional analysis of the nuclear complex components with SF-1. ②The other is combined-analysis with ChIP-on-Chip and DNA microarray to identify novel SF-1 target genes. ① Transcription factor C/EBP β was identified as one of the nuclear complex components with SF-1. We found that C/EBP β cooperated with SF-1 to enhance the transcriptional activity of HSD3B2 gene expression, which codes for one of the enzymes for progesterone production. ② We identified GSTA3, ALAS1 and FDXR as novel SF-1-target genes. Transcriptional activity of these genes were enhanced by SF-1 via epigenetic change. We also found these factors were involved in steroidogenesis. These results indicate that these factors are novel SF-1-target genes and participate in steroid hormone production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：生殖医学

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。

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おり、この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。本研究ではこの分化誘導系を用いて、エピジェネティックな変化を介した卵巣分化のメカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

- (1) SF-1 複合体構成タンパク質の機能解析
- (2) 新たな SF-1 標的遺伝子の同定とエピジェネティックな変化を介した転写調節メカニズムの解析

3. 研究の方法

(1) SF-1 複合体構成タンパク質の機能解析

私どもは、生化学的な手法を用いて SF-1 複合体構成タンパク質を同定している。その一つが転写因子 C/EBP β であった。本研究では、SF-1 と C/EBP β による転写調節機構について解析した。そこで C/EBP β の転写調節メカニズムを明らかにするため、ChIP-on-Chip 法を用いてゲノムワイドに C/EBP β の DNA 結合領域を同定した。さらに C/EBP β と共に SF-1 および Histone H3 リジン 4 番目ジメチル化 (転写因子やインスレーター結合領域の検出) される領域についても検討した。そして、SF-1 と C/EBP β によって調節される因子 HSD3B2 遺伝子の解析を ChIP 法、遺伝子発現解析、レポーターアッセイにより行った。

(2) 新たな SF-1 標的遺伝子の同定とエピジェネティックな変化を介した転写調節メカニズムの解析

幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用したゲノムワイドな解析より、新たな SF-1 標的遺伝子を同定した。これら因子の中からグルタチオントラン

スフェラーゼ A3 (GSTA3)、5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) およびフェレドキシニンリダクターゼ (FDXR) に着目した。そしてこれら遺伝子の SF-1 によるエピジェネティックな変化を ChIP 法により検討し、その転写制御メカニズムを、遺伝子発現解析、レポーターアッセイにより解析した。さらにこれら因子によるステロイド産生を ELISA 法により解析した。

4. 研究成果

(1) SF-1 複合体構成タンパク質の機能解析

ChIP-on-Chip 法を用いて SF-1 および C/EBP β の DNA 結合領域の同定と Histone H3 リジン 4 番目ジメチル化される領域について検討したところ、プロゲステロン産生を司る HSD3B2 上流域に SF-1 と C/EBP β が同時にリクルートされ、H3K4me2 化される領域を明らかにした。そこで HSD3B2 の転写が実際に SF-1 と C/EBP β によって調節されているかを明らかにするために、HSD3B2 プロモーター領域を単離し、この領域を含むレポーターベクターを構築した。293 細胞を用いてこのレポーターベクターと共に SF-1 や C/EBP β を導入し、転写活性に対する影響を検討したところ、C/EBP β 単独の導入では転写活性に影響を与えなかったが、SF-1 と共に導入することで SF-1 単独で導入した場合よりも転写活性が増強した。さらに C/EBP β のアデノウィルス発現系を構築し、KGN 細胞への強制発現の影響を検討したところ、C/EBP β の強制発現により KGN 細胞に内在性に発現する HSD3B2 遺伝子の転写が促進した。この結果から、HSD3B2 の転写に対して C/EBP β は SF-1 の転写活性を増強する因子であることが示された。

(2) 新たな SF-1 標的遺伝子の同定とエピジェネティックな変化を介した転写調節メカニズムの解析

① ALAS1、FDX1 および FDXR の転写制御メカニズムとステロイド産生に対する役割

ステロイド産生細胞における ALAS1 の転写調節メカニズムについて検討したところ、転写開始点上流 3.5 kb に SF-1 が結合することで活性化され、さらにこの領域を介した転写の活性化には組織特異性があることを明らかにした。

一方、ミトコンドリア内の P450 の電子伝達に参与する FDXR は転写開始点近傍に存在する SF-1 結合領域を介して、転写が活性化されることを明らかにした。さらにこの SF-1 結合領域近傍では、ヒストン H3K4me2 と H3K27Ac 化が促進した。

以上の結果から、P450 ファミリーへのヘム供給に参与する ALAS1 と電子伝達を担う FDX1、FDXR が SF-1 によって発現誘導されることで、P450 ファミリーに属するステロイド代謝酵素の活性化に参与していることが示された。

②GSTA3 の転写制御メカニズムとステロイド産生に対する役割

GST は解毒作用を持つことで知られているが、このファミリーの中で GSTA3 が、プロモーター領域への SF-1 結合依存的に転写調節されていることを見いだした。内在性に SF-1 の発現するヒト副腎由来 H295R 細胞では、内在性の SF-1 をノックダウンすると GSTA3 の発現は低下した。さらに SF-1 のノックダウンにより SF-1 結合領域近傍で見られていた nucleosome eviction とヒストン H3K4me2 と H3K27Ac 化が共に抑制された。最後に GSTA3 のステロイド合成における役割を検討するために、卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞に GSTA3 を導入したところ、ステロイド産生の増加が認められた。これらのことから、GSTA3 が SF-1 の新たな標的遺伝子として、ステロイド合成において機能的にも重要な因子であることが示された。

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 6 件)

- ① Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J. Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., Mizutani, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Miyamoto, K., Uchida, H., Oki, M.: Fublp, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes & Genetic Systems* 86, 305-314, 2011, 査読有. DOI: 10.1266/ggs.86.305
- ② 水谷哲也, 宮本 薫: クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定. 日

本生殖内分泌学会雑誌. 16, 27-29, 2011, 査読無.

http://seishoku.org/11_16kan/09-topics1.pdf

- ③ 水谷哲也, 宮本 薫: ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質 StAR の新たな転写調節機構. *生化学*. 83(5), 388-391, 2011, 査読無. <http://www.soc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/83-05-05.pdf>
- ④ Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Kanno, M., Matsumura, T., Ju, Y., Umezawa, A.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 123-126, 2011, 査読有. DOI:10.1016/j.mce.2010.11.031
- ⑤ Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 127-132, 2011, 査読有. DOI:10.1016/j.mce.2010.11.025
- ⑥ Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J. Biol. Chem.* 285(36), 28240-28251, 2010, 査読有. DOI:10.1074/jbc.M110.129510

[学会発表] (計 26 件)

1. 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: 転写因子 SF-1 による FDX1 および FDXR の転写制御. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12, 13-16, 横浜.
2. 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢澤隆志, 菅野真史, 河邊真也, 梅澤明弘, 稲谷 大, 赤木好男, 宮本 薫: Glutathione S-transferase A3 (GSTA3) プロモーター領域における転写制御. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12, 13-16, 横浜.

3. Ju, Y., **Mizuani, T.**, Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Delta-aminolevulinic synthase 1 (ALAS1) is a novel steroidogenic factor-1 (SF-1) target gene important for steroidogenesis. 第34回日本分子生物学会年会. 2011, 12, 13-16, 横浜.
4. 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子, **水谷哲也**, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写因子LRH-1の転写調節機構. 第36回日本比較内分泌学会大会. 2011, 11, 23-26, 東京.
5. 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宇佐美陽子, **水谷哲也**, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫: 排卵におけるアンドロジェンの役割. 第36回日本比較内分泌学会大会. 2011, 11, 23-25 東京.
6. **水谷哲也**: 卵巣におけるクロマチン構造変換を介した転写調節機構. 第16回日本生殖内分泌学会学術集会. **性腺における新たな転写制御とエピジェネティクス**. 2011, 11, 19, 東京都.
7. 今道力敬, **水谷哲也**, 具云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: ヒト顆粒膜細胞由来KGN細胞におけるFDAX1およびFDXR遺伝子の転写制御機構. 第16回日本生殖内分泌学会学術集会. 2011, 11, 19, 東京都.
8. 具云峰, **水谷哲也**, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: ヘム合成律速因子ALAS1の新たな転写調節機構と機能解析. 第16回日本生殖内分泌学会学術集会. 2011, 11, 19, 東京都.
9. 松村健大, 今道力敬, **水谷哲也**, 具云峰, 矢澤隆志, 菅野真史, 河邊真也, 稲谷大, 赤木好男, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞におけるGSTA3の転写調節について. 第16回日本生殖内分泌学会学術集会. 2011, 11, 19, 東京都.
10. 菅野真史, 矢澤隆志, 河邊真也, 宇佐美陽子, **水谷哲也**, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 藤枝重治, 宮本 薫: ES細胞特異的LRH1の発現調節機構の解析. 平成23年度日本動物学会中部支部大会. 2011, 7, 30-31, 福井市.
11. 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子, **水谷哲也**, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫: 転写因子LRH-1の卵巣特異的転写調節機構. 平成23年度日本動物学会中部支部大会. 2011, 7, 30-31.
12. 宇佐美陽子, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 山崎由希子, **水谷哲也**, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫: 電子伝達体p450 オキシドレダクターゼの転写調節機構. 平成23年度日本動物学会中部支部大会. 2011, 7, 30-31, 福井市.
13. **水谷哲也**, 具云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 尾崎司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1によるクロマチン構造変換を介した新たな転写調節機構. 第84回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸.
14. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 河邊真也, **水谷哲也**, 今道力敬, 梅澤明弘, 宮本 薫: ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞への分化誘導. 第84回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸.
15. 今道力敬, **水谷哲也**, 具云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 小亀浩一, 寒川賢治, 宮本 薫: 転写因子SF-1の新たな標的遺伝子の同定. 第84回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸.
16. 具云峰, **水谷哲也**, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: 新たなSF-1標的遺伝子ALASの転写調節とステロイドホルモン産生に対する役割. 第84回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸.
17. 松村健大, 今道力敬, **水谷哲也**, 具云峰, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 赤木好男, 宮本 薫: 転写因子SF-1によるGSTA3の転写調節について. 第84回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸.
18. **Mizutani, T.**, Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of steroidogenic-related genes by SF-1 through its dependent alternations of chromatin structure. *Experimental Biology* 2011. 2011, 4, 9-13, Washington, DC.
19. **水谷哲也**, 具云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 尾崎司, 南野直人, 宮本 薫: クロマチン構造変換を介したStARの新たな転写調節メカニズム. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010, 12, 7-10, 神戸.
20. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 河邊真也, **水谷哲也**, 今道力敬, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: PGC-1 α はSF-1とLRH-1のコアクチベーターとしてプロジェステロン産生を促進する. 第83回日本生化学会大会・第

- 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010, 12, 7-10, 神戸.
21. **水谷哲也**, 宮本 薫: 卵巣における転写制御とエピジェネティクス. 第 55 回日本生殖医学会. **卵巣機能に関する基礎研究の進歩. 最近の知見から**. 2010, 11, 11-12, 徳島.
22. 矢澤隆志, 河邊真也, 稲岡齊彦, 岡田令子, **水谷哲也**, 今道力敬, 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アンドロジェンの作用. 日本動物学会第 81 回大会. 2010, 9, 23-25, 東京.
23. 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 α の機能. 日本動物学会中部支部大会 2010. 2010, 7, 25, 岐阜.
24. **Mizutani, T.**, Yazawa, T., Ju, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Imamichi, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Regulation of SF-1-mediated transcription of the human steroidogenic acute regulatory protein gene by chromatin-loop formation. The 92th Annual Meeting & Expo 2010, 6, 19-22, San Diego.
25. Miyamoto, K., **Mizutani, T.**, Yazawa, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium. **Adrenal growth and development**. 2010, 6, 16-18, San Diego.
26. **水谷哲也**, 矢澤隆志, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 河邊真也, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 宮本 薫: ヒトStAR 遺伝子の新たな転写調節機構. 日本生化学会北陸支部第 28 回大会. 2010, 5, 29, 福井.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 体外受精におけるヒト成熟卵マーカー及びその使用

発明者: 宮本 薫、水谷哲也、折坂 誠

権利者: 国立大学法人 福井大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-284430

出願年月日: 23 年 1 月 26 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号: 90322734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし