（様式３号）

学 位 論 文 の 要 旨

氏名　岡田　真紀

〔題名〕

Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats.

（顆粒膜細胞の黄体化に伴うCyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現のエピジェネティクス制御）

〔要旨〕

【目的】卵巣の顆粒膜細胞では、 LH サージ後の黄体化に伴い Cyp11a1 遺伝子発現が急速に増加する。このCyp11a1 遺伝子の発現変化にプロモーター領域のヒストン修飾や DNA メチル化を含むエピジェネティックな制御が関与するかを検討した。

【方法】3 週齢雌ラットに eCG－hCG 投与による排卵誘発を行い、hCG 投与前(0h)と投与後4時間、12時間の黄体化顆粒膜細胞を回収し、Cy11a1 mRNA （RT-PCR）と Cyp11a1 プロモーター領域について、ヒストン修飾状態（ChIP assay）、ヒストン修飾酵素 EZH2 結合（ChIP assay）、DNA メチル化状態（Bisulfite sequencing 法）、クロマチン構造（CHART-PCR法）、転写因子C/EBPβ結合（ChIP assay）、および C/EBPβ 結合部位の転写活性（ルシフェラーゼ解析）を解析した。

【結果】Cyp11a1 mRNA は hCG 投与後増加し、4時間でピークとなり、それ以降高値を維持した。hCG 投与後4時間と12時間では、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域のヒストン修飾は、転写活性に働くH3K4me3は増加し、転写抑制に働くH3K9me3とH3K27me3は低下した。H3K27me3 を誘導するヒストン修飾酵素である EZH2 のプロモーター領域への結合は低下した。DNA メチル化状態は、hCG 投与後で変化せず、低メチル化状態であった。クロマチン構造は hCG 投与後4時間と12時間で弛緩し、それに伴い C/EBPβ の Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域への結合は増加した。さらに、ルシフェラーゼ解析によりC/EBPβ結合配列は、転写活性に関与する発現制御領域であることが示された。

【結論】顆粒膜細胞において LH サージ後の黄体化に伴い増加する Cyp11a1 mRNA の発現変化には、近位プロモーター領域のヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を介した転写調節が関与する。このクロマチン構造の変化に伴う転写因子の C/EBPβ の結合が増加し転写を活性化していると考えられる。

作成要領

１．要旨は、８００字以内で、１枚でまとめること。

２．題名は、和訳を括弧書きで記載すること。

（様式９号）

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1465 号	氏　名	岡田　真紀
論文審査担当者	主査教授	中井　彰	
	副査教授	谷澤　幸生	
	副査教授	杉野　法広	

学位論文題目名（題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。）

Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats.

（顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1(P450scc)遺伝子発現のエピジェネティクス制御）

学位論文の関連論文題目名（題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。）

Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats.

（顆粒膜細胞の黄体化に伴う Cyp11a1(P450scc)遺伝子発現のエピジェネティクス制御）

掲載雑誌名　Endocrinology

第 157 巻　　第 9 号　　P. 3344 ～ 3354　　（ 2016 年 9 月 (掲載)・掲載予定）

（論文審査の要旨）

(目的) 卵巣の顆粒膜細胞では、LH サージ後の黄体化に伴い Cyp11a1 遺伝子発現が急速に増加する。この Cyp11a1 遺伝子の発現変化にプロモーター領域のヒストン修飾や DNA メチル化を含むエピジェネティックな制御が関与するかを検討した。

(方法) 3 週齢雌ラットに eCG - hCG 投与による排卵誘発を行い、hCG 投与前(0h)と投与後 4 時間、12 時間の黄体化顆粒膜細胞を回収し、Cyp11a1 mRNA (RT-PCR) と Cyp11a1 プロモーター領域について、ヒストン修飾状態 (ChIP assay)、ヒストン修飾酵素 EZH2 結合 (ChIP assay)、DNA メチル化状態 (Bisulfite sequencing 法)、クロマチン構造 (CHART-PCR 法)、転写因子 C/EBPβ結合 (ChIP assay)、および C/EBPβ 結合部位の転写活性 (ルシフェラーゼ解析) を解析した。

(結果) Cyp11a1 mRNA は hCG 投与後増加し、4 時間でピークとなり、それ以降高値を維持した。hCG 投与後 4 時間と 12 時間では、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域のヒストン修飾は、転写活性に働く H3K4me3 は増加し、転写抑制に働く H3K9me3 と H3K27me3 は低下した。H3K27me3 を誘導するヒストン修飾酵素である EZH2 のプロモーター領域への結合は低下した。DNA メチル化状態は、hCG 投与後で変化せず、低メチル化状態であった。クロマチン構造は hCG 投与後 4 時間と 12 時間で弛緩し、それに伴い C/EBPβ の Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域への結合は増加した。さらに、ルシフェラーゼ解析により C/EBPβ結合配列は、転写活性に関与する発現制御領域であることが示された。

(結語) 顆粒膜細胞において LH サージ後の黄体化に伴い増加する Cyp11a1 mRNA の発現変化には、近位プロモーター領域のヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を介した転写調節が関与する。このクロマチン構造の変化に伴い転写因子の C/EBPβ の結合が増加し転写を活性化していると考えられる。

本研究成果は、排卵のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、また、不妊症における排卵障害の原因の解明に繋がるものでもあり、学位論文として価値あるものと認めた。

備考　審査の要旨は８００字以内とすること。