

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号: 34419

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2011~2012

課題番号: 23780280

研究課題名(和文) マウス卵巣にて時計遺伝子群に転写制御される遺伝子の網羅解析

研究課題名(英文) Identification of the genes of which expression was regulated by the circadian clock in the mouse ovaries using microarray analysis

研究代表者

天野 朋子 (AMANO TOMOKO)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号: 60388585

研究成果の概要 (和文):

本研究では、マウス卵巣における時計遺伝子の機能を明らかにするために、時計遺伝子欠損マウスと野生型マウスの卵巣に発現する遺伝子種を網羅的に比較し、時計遺伝子に転写制御される遺伝子(Clock controlled genes: CCGs)の同定を目指した。その結果、*StAR*を始め、卵巣の機能への強い関与がすでに知られるいくつかの遺伝子が検出され、CCGs候補遺伝子とした。今後、これらの遺伝子のプロモーター領域における時計遺伝子群タンパク質の関連を検討していく。

研究成果の概要 (英文):

To identify the genes of which transcriptions are regulated by the circadian genes (Clock controlled genes: CCGs) in the mouse ovaries, we compared the gene expression in the ovaries of the mice bearing deficiencies of the circadian genes, Clock mutant mice and Per1/Per2 knockout mice, with that of the ovaries of wild type mice by microarray analysis. As a result, we detected some genes known to regulate reproductive ability in females including *StAR*. We will examine the interaction of the circadian genes on the promoter region of those genes in our next experiments.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード: 時計遺伝子、卵巣機能

## 1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子群(*clock*, *bmal1*, *per1*, *per2*, *cry1*, *cry2*)は生物時計の分子実体であり、その発現量は24時間周期の増減を示す。時計遺伝子群は転写因子であり、多くの遺伝子の発現を制御して生命現象に周期性を与える。我々の研究を含めた近年の研究から、卵巣には時計遺伝子群の明瞭な周期的発現が

確認され、時計遺伝子群の欠損や発現異常を呈す雌マウスには、排卵時刻のばらつき、排卵数の減少、受精卵の死亡、性周期の延長、流産・早産などが起きやすく、排卵や卵胞発育、ホルモン分泌などの卵巣の諸機能が、時計遺伝子群に制御される可能性が示唆される。これらの卵巣の諸機能を制御する遺伝子群の中で、時計遺伝子群に転写が制御される

ものが特定できた場合、生物時計を介した卵巣機能の分子制御機構が明らかとなり、生物時計の乱れ(=時計遺伝子群の発現周期の乱れ)が排卵・卵胞発育の異常、流産・早産を引き起こす機序が分子レベルで解明される。またヒトや家畜において、より正確な過排卵処理適期の判断や、排卵時刻の人為的制御、不妊や流産・早産の治療薬開発、及びその投薬適期の判断に関わる諸技術の開発も見込まれる。本研究では、まず卵巣にて発現量に24時間周期の増減を示す遺伝子群(候補遺伝子群)を網羅的に探索し、次にこれらのプロモーター領域に対する時計遺伝子群の制御などを検証し、卵巣にて時計遺伝子群の制御を受ける遺伝子群を同定する。

## 2. 研究の目的

本研究では卵巣で起きる周期的現象(排卵や卵胞発育など)を制御する未知の分子機構を明らかにするため、マウス卵巣にて時計遺伝子に転写制御される遺伝子(Clock controlled genes: CCGs)の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

CCGsには24時間のうち、転写が促進される時間帯と抑制される時間帯がある。そのためそれぞれの時間帯に採取した卵巣または卵巣由来細胞に発現する遺伝種を網羅的に解析・比較すれば、卵巣におけるCCGsの同定が可能である。当初この検討を予定していたが、時計遺伝子転写フィードバックループを失い、CCGsの転写が常に抑制されるClock変異マウス(C1-)と、CCGsの転写が常に促進されるPer1/Per2ダブルノックアウトマウス:(PIP2-)の卵巣サンプルが入手できたため計画を変更した。具体的には、C1-の卵巣にはCCGsの転写が促進されている時間帯の野生型マウスの卵巣、PIP2-の卵巣にはCCGsの転写が抑制されている時間帯の野生型マウス卵巣を組み合わせ、それぞれ発現遺伝子の網羅的な解析・比較を行なった。

## 4. 研究成果

平成24年度の検討:本検討の結果、野生型マウスの卵巣に比べ、C1-卵巣にて転写量が有意に減少した378の遺伝子、PIP2-卵巣にて転写量が有意に上昇した750の遺伝子を得た( $P < 0.05$ )。検出されたこれらの遺伝子を、時計遺伝子にて制御される可能性のある遺伝子として取り上げた。

平成25年度の検討:H24年度に取り上げられた遺伝子の卵巣における発現・機能を確認するために、卵巣に発現し、生殖への影響が報告されている遺伝子を集積したデータベース(Ovarian Kaleidoscope)にて検索を行った。その結果、C1-とPIP2-と野生型マウス卵巣との転写量の違いが顕著であった数十の遺伝子が、卵胞の顆粒層細胞や卵子にRNAとタンパクのレベルで発現しており、その欠損が生殖機能を低減させることが知られているなど、生殖の良否に機能するものであることもつきとめた(表1、表2)。この検索によって検出されたこれらの遺伝子を、我々は卵巣にて時計遺伝子群に制御される可能性のある遺伝子群(CCGs候補遺伝子)とした。我々は同時に、時計遺伝子タンパク質が卵胞の顆粒層細胞や卵子に局在することも確認しており、これらの候補遺伝子が卵巣でのCCGsである強い可能性を示唆した。またこれらCCGs候補遺伝子には、StARを始め、卵巣の機能への強い関与がすでに知られているいくつかの遺伝子が含まれており、時計遺伝子群による卵巣機能の制御における新しい経路が暗示された。CCGs候補遺伝子のプロモーター領域には、すでに時計遺伝子タンパク質の標的となりうるE-box等を認めており、今後、これらのプロモーター領域への各時計遺伝子タンパク質の関与をChIPなどで検討していく予定である。

また野生型マウスとC1-の卵巣におけるマイクロアレイ解析・発現遺伝子種の比較から検出された遺伝子についてGO解析も行った。特にC1-にて検出された遺伝子群には、ステロイドホルモン合成に欠かせない脂質代謝系(Lipid transfer activity)や、卵胞腔への物質の分泌の機能と関わりの深い、Extracellular regionに分類されたものが多く、時計遺伝子が性ホルモンの分泌や、卵子形成、排卵などの卵胞の諸機能を制御する可能性があることも、新規な知見として示された(図1、図2)。

表1 Clock変異マウス卵巣にて、野生型マウス卵巣に比べて発現量が有意( $P < 0.05$ )に増加していた遺伝子群(FCAbsolute>1.5)のうち、データベース解析から、雌性生殖機能への顕著な影響が明らかな遺伝子を示す。

ProbeName	p-value	FCAbsolute	GeneSymbol
A_55_P2032081	0.00296	3.75	Dbp
A_55_P2032079	0.00199	3.59	Dbp
A_55_P1977431	0.020936	2.30	Cck
A_52_P544476	0.033848	2.20	Terc
A_52_P165654	0.00975	2.02	Star
A_51_P150120	0.044958	1.93	Mgst2
A_51_P237040	8.97E-04	1.89	Nog
A_55_P2094060	0.038419	1.86	Gzma
A_55_P1963764	0.047509	1.85	Sept1
A_55_P1979893	0.001151	1.85	Tef
A_55_P2038106	0.00242	1.84	Cst8
A_55_P2004624	0.019962	1.78	Msi2
A_52_P114722	0.015057	1.77	Ptpn6
A_51_P355427	0.02183	1.59	Timp4
A_51_P229163	0.047045	1.59	Crhr1
A_55_P2158448	0.045276	1.56	Gdf3
A_55_P2016462	0.023774	1.55	Cxcl10
A_52_P172014	0.043203	1.54	Ramp1
A_52_P671543	0.044546	1.52	Pomc
A_55_P2024080	0.025678	1.52	Rpl7a

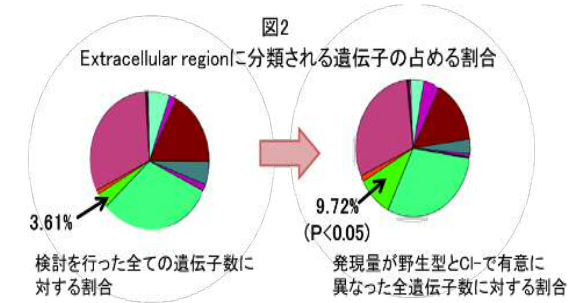
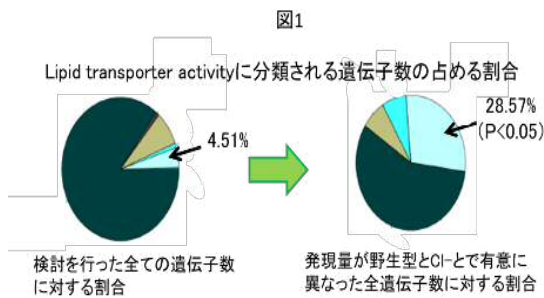


表2 Per1/Per2欠損マウス卵巣にて、野生型マウス卵巣に比べて発現量が有意( $P < 0.05$ )

に増加していた遺伝子群(FCAbsolute>1.5)のうち、データベース解析から、雌性生殖機能への顕著な影響が明らかな遺伝子を示す。

ProbeName	p-value	FCAbsolute	regulation	GeneSymbol
A_55_P2044498	0.005119	4.69	up	Pad16
A_55_P2045886	0.002223	4.47	up	Stk3
A_55_P1969156	8.75E-04	4.04	up	Pam
A_51_P246677	0.016138	3.36	up	Rec8
A_51_P284608	0.01771	3.15	up	Cd74
A_51_P349087	0.01444	2.74	up	Sall4
A_51_P282760	0.019872	2.62	up	Per2
A_66_P128537	0.019608	2.60	up	Isg15
A_52_P28651	0.02389	2.56	up	Pvr11
A_55_P2151609	0.002095	2.45	up	Sorl1
A_55_P2103698	0.042437	2.41	up	Isg15
A_51_P424854	0.009387	2.21	up	Ahsg
A_55_P2062953	0.002684	2.20	up	Amh
A_51_P359636	0.012825	2.19	up	Leals3bp
A_52_P413646	0.030092	2.14	up	Bmp6
A_55_P2179413	0.012658	2.14	up	Leals3bp
A_52_P639402	0.001741	2.12	up	Kcnk3
A_55_P2143075	2.54E-04	2.08	up	Ubc
A_55_P1972991	0.00279	2.06	up	Pcsk6
A_51_P327491	0.001339	2.05	up	Apoa4
A_55_P2096081	0.013818	2.00	up	Myo5b
A_52_P66130	0.049209	1.99	up	Myo5b
A_52_P331981	0.048328	1.99	up	Zp2
A_55_P2009752	0.010927	1.99	up	Hlf
A_55_P2090798	0.019001	1.98	up	Mtus1
A_51_P408082	0.013898	1.97	up	Apoa1
A_51_P244303	0.037633	1.95	up	Smc1b
A_51_P510418	0.048361	1.95	up	Aldh1b1
A_55_P2151056	0.012835	1.93	up	Rarg
A_51_P138044	0.037019	1.93	up	Foxo1
A_51_P237383	0.027949	1.92	up	Rhase4
A_52_P46085	0.014368	1.89	up	Myp
A_51_P179578	0.018664	1.88	up	Gbx2
A_55_P2123626	0.040078	1.87	up	Zp1
A_55_P2035946	0.016358	1.85	up	Penk
A_52_P42762	0.026342	1.85	up	Zp3
A_51_P232901	0.001773	1.84	up	Cnp
A_55_P2158741	0.040564	1.83	up	Nos2
A_51_P358316	0.049691	1.82	up	Chga
A_52_P291083	0.034609	1.82	up	Nobox
A_55_P2062190	0.011839	1.81	up	Gstm1
A_55_P2077558	0.001802	1.80	up	Sod3
A_51_P410205	0.011641	1.80	up	Hsd11b2
A_52_P676819	0.031395	1.79	up	Bnc1
A_55_P1959748	7.30E-04	1.79	up	Asns
A_52_P453884	0.022639	1.78	up	Foxo1
A_55_P2147566	0.042419	1.76	up	Tac2
A_51_P117581	0.0287	1.75	up	Cables1
A_55_P1980287	0.008074	1.75	up	Birc3
A_51_P279163	0.044246	1.75	up	Plcg2
A_55_P2154690	0.046153	1.75	up	Smarca4
A_55_P2032079	0.006948	1.74	up	Dbp
A_55_P2019699	0.04539	1.74	up	Samhd1
A_51_P129012	0.046883	1.74	up	B2m
A_55_P1997086	0.040724	1.74	up	Pknnox1
A_51_P134007	0.017698	1.73	up	Ncl
A_51_P137336	0.04085	1.73	up	Cdh1
A_52_P502577	0.008537	1.73	up	Slpr3
A_51_P140211	0.03117	1.73	up	Ndufv3
A_55_P1977943	0.031497	1.73	up	Insm1
A_51_P227222	0.029755	1.72	up	Adams2
A_55_P1988018	0.001008	1.72	up	Gnr7
A_66_P108965	0.01557	1.72	up	Smpd3b
A_52_P278354	0.020712	1.71	up	Bmp7
A_51_P514085	0.008249	1.71	up	Mx2
A_51_P223569	0.045456	1.71	up	Ddx4
A_51_P19899	0.021213	1.71	up	Fto
A_55_P2039603	0.031954	1.70	up	Rhasen
A_52_P466090	0.006563	1.70	up	Samhd1
A_51_P341736	0.004642	1.70	up	Mmp2
A_52_P65108	0.034369	1.69	up	Smad1
A_55_P2053181	0.045608	1.69	up	Nefh
A_55_P1994147	0.039643	1.69	up	Zar1
A_51_P280893	0.004706	1.69	up	Pla2g1b
A_55_P1966432	0.005753	1.69	up	Gstm1
A_51_P302566	0.026288	1.68	up	Maob
A_55_P1967315	0.016781	1.68	up	Ppp1r9b
A_55_P2059352	0.001208	1.67	up	Coll8a1
A_55_P2120055	0.003564	1.67	up	Fgfr4

A51 P376238	0.013377	1.66	up	Serpine1
A51 P355360	0.001413	1.66	up	Jak3
A55 P1972034	0.04815	1.66	up	Muc16
A55 P2146254	0.013383	1.65	up	Ifitm1
A51 P112237	0.003332	1.65	up	Angell
A51 P420415	0.001188	1.65	up	Srd5a1
A55 P2040907	0.036749	1.64	up	Gtf2i
A55 P2013058	0.034342	1.64	up	Shb
A55 P2065562	0.020705	1.64	up	Aldh3a1
A55 P1979833	0.022473	1.63	up	Cited1
A55 P2047310	0.0129	1.63	up	Pdefb
A51 P148060	0.020236	1.63	up	Ptgnr
A55 P2068892	0.010419	1.63	up	Ilfra
A55 P2149540	0.024331	1.62	up	Srf
A55 P2024841	0.001315	1.62	up	Gstt1
A52 P131548	0.017289	1.62	up	Jub
A55 P1987499	7.09E-04	1.62	up	Ptge1
A55 P2042247	0.030831	1.61	up	Nlrp2
A55 P2002376	0.001758	1.60	up	Srm
A55 P2032081	0.00597	1.60	up	Dbp
A55 P2026218	0.017113	1.60	up	Igsf8
A66 P130115	0.025788	1.60	up	Fads2
A55 P2074281	0.035465	1.60	up	Nr2f1
A51 P483118	0.008854	1.60	up	Hmga1
A51 P499599	0.020025	1.60	up	Osr2
A66 P117477	0.035398	1.59	up	Dlk1
A55 P1967978	0.04596	1.59	up	Nfatc2
A55 P2014690	0.006686	1.58	up	Taok3
A51 P151126	0.047065	1.58	up	Cd52
A55 P1992329	0.023859	1.58	up	Gmpr
A51 P196925	0.020006	1.57	up	Cx3cl1
A52 P108346	0.036928	1.57	up	Myc
A55 P2095342	0.018073	1.57	up	Rara
A51 P497985	0.009783	1.56	up	C2
A55 P2124791	0.005269	1.56	up	Cell8a1
A66 P121285	0.010901	1.56	up	Tefi2
A51 P426754	0.016796	1.56	up	Anxa5
A51 P440210	0.041997	1.56	up	Prke1
A55 P2078670	0.007212	1.56	up	Cbs
A52 P578562	0.004928	1.55	up	Slc41a1
A55 P1985015	0.003605	1.55	up	Pard3
A55 P2100884	0.023199	1.55	up	Fjx1
A51 P433733	0.008609	1.55	up	Nucb1
A51 P175871	0.013472	1.55	up	Got2
A55 P2091005	0.049279	1.55	up	Emilin3
A51 P258493	0.010775	1.55	up	Per3
A55 P1960097	0.038867	1.54	up	Epb4.1l3
A51 P110371	0.031767	1.54	up	Wwox
A52 P431894	0.010889	1.54	up	Pknx1
A55 P2139256	0.004366	1.54	up	Rps6ka1
A51 P499864	0.028392	1.54	up	Tube1
A52 P317393	0.019428	1.54	up	Gpr56
A51 P220343	0.005195	1.54	up	Wisp1
A55 P2367250	0.021351	1.53	up	Pou4f1
A66 P106191	0.028178	1.53	up	Eef2
A51 P195573	0.016398	1.53	up	Dnmt1
A55 P2009091	0.016288	1.53	up	Mad1l1
A55 P2132651	0.041895	1.53	up	Wisp1
A51 P151586	1.78E-04	1.53	up	Gse2
A55 P1985984	0.048371	1.53	up	Actg1
A55 P2032258	0.011134	1.53	up	Pdlim1
A55 P1973838	0.010054	1.53	up	Slc6a9
A51 P195506	0.020205	1.52	up	Csf1
A52 P25812	0.010135	1.52	up	Prdm2
A52 P217437	0.002992	1.52	up	Htra3
A51 P238448	7.79E-04	1.52	up	Ccnd3
A55 P1975354	0.003839	1.52	up	Tcf3
A51 P198411	0.001661	1.52	up	Grb2
A55 P2415372	0.038948	1.52	up	Mta1
A51 P461429	0.022328	1.51	up	Cyp7b1
A52 P642488	0.005809	1.51	up	Kenk1
A55 P1980551	0.015197	1.51	up	Dennd1a
A66 P128434	0.044926	1.51	up	Kit
A55 P1978466	0.030272	1.51	up	Pnma5
A65 P20641	0.026989	1.51	up	Fads2
A55 P2010788	0.004371	1.51	up	Slc6a9
A51 P419017	0.037694	1.51	up	Pde10a
A55 P2062793	0.011001	1.51	up	Mfap2
A55 P2092384	0.033666	1.50	up	Pik3r2
A55 P2051414	0.003343	1.50	up	Axl
A55 P2020443	0.007359	1.50	up	Hnrnpa3
A51 P206585	0.037883	1.50	up	Runx1

## 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)

[学会発表] (計3件)

(1) 発表者名: 天野 朋子

論題: 時計遺伝子 *Per1/Per2* を欠損したマウスの雌性生殖生理の解析: 時計遺伝子の卵巣機能への関与

学会名: 第136回日本生殖医学会関西支部集談会・第42回関西アンドロロジーカンファレンス

発表年月日: 2013年3月2日

場所: 大阪ハービスプラザ

(2) 発表者名: 天野 朋子

論題: 時計遺伝子 *Per1/Per2* を欠損したマウスの雌性生殖生理の解析: 時計遺伝子の卵巣機能への関与

学会名: 第105回日本繁殖生物学会

発表年月日: 2012年9月7日

場所: 筑波大学

(3) 発表者名: 天野 朋子

論題: Importance of the circadian clock in ovaries of mice

学会名: 4th congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction(Aspire)

発表年月日: 2012年8月30日

場所: 大阪国際会議場

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 朋子 (AMANO TOMOKO)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号: 60388585

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し