

シンポジウム 2 「配偶子形成とその成熟の分子機構」

卵子形成・成熟過程におけるエピジェネティクスの解明

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

田 中 守

Epigenetic Reprogramming in the Course of Oocyte Development and Maturation

Mamoru TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo

Key words : Epigenetics · Linker histone · Oocyte · Nuclear reprogramming

緒 言

多細胞生物の 1 個体内の細胞は基本的に同一ゲノムを有しているにもかかわらず、個々の細胞機能はまったく異なっている。このような遺伝子配列の変化を伴わない遺伝子発現のメカニズムがエピジェネティクスである。各細胞におけるゲノム上の遺伝子活用の方法、すなわちエピジェネティクスの解明がポストゲノム時代の重要なテーマとなってきている。クロマチン構造は、従来静的な構造物として考えられてきたが、近年の研究によりその構造は動的であり、積極的に遺伝子の発現とその抑制を調節し、ゲノム上の遺伝情報を必要に応じて取捨選択していることが分かってきた¹⁾。さらに生殖細胞系列は、唯一、そのゲノムを次世代に伝達する役割を担っており、生殖細胞に特異的なエピジェネティクスの機構が備わっていることが想定される。

膨大な量の真核生物のゲノムは、塩基性蛋白であるヒストン蛋白が結合することによって折りたたまれて凝縮し、染色体として核内に収納されている。その基本構造として、ヌクレアーゼで消化された後に残存するヌクレオソームが知られ、ヌクレオソームは、コアヒストン 8 量体とその周囲を 2 周する DNA よりなるヌクレオソームコアとコア同士を繋げるリンカー DNA とリンカーヒストン H1 の 3 つから構成されている¹⁾。一般にリンカーヒストンは、コアヒストンに比べてクロマチンより容易に外れる。この作用は、可逆的でリンカーヒストン H1 を加えらるとほどけたクロマチンは再び折りたたまれる。このリンカーヒストン

は、容易にリン酸化修飾を受けることが知られている。Horn et al. の研究によると、Cdc2/Cyclin B リン酸化酵素によってリンカーヒストンをリン酸化すると、通常はリンカーヒストンによって抑制されている、クロマチンリモデリング因子が DNA に作用することが可能になった²⁾。この作用機序としては、リンカーヒストンのリン酸化によって、部分的に DNA との相互作用が弱まり、リモデリング因子が作用する空間をヌクレオソーム DNA 上に生み出しているものと考えられている。さらにリンカー DNA に結合する HMGN (High mobility group N) タンパク質も、リンカー DNA に結合すると高次のクロマチン構造を不安定化し、転写を活性化することが知られている³⁾。

また、今までカエルおよびウニにおいては卵子のみに発現する卵子特異的リンカーヒストンが存在することが知られていた^{4)~7)}。カエルにおいて、卵子核には卵子特異的リンカーヒストンが、接合子核には体細胞型リンカーヒストンが発現していることが明らかになっている。これらの卵子特異的リンカーヒストンと体細胞型リンカーヒストンは、DNA の結合部位が異なり、転写調節因子の結合を調節していることが知られている(図 1)⁸⁾。

本研究では、我々が哺乳類で初めて発見した卵子特異的リンカーヒストンに注目し、受精過程におけるクロマチンの修飾機構から見た配偶子形成、成熟のメカニズムを明らかにすることを目的とした。この趣旨に従って、1) 卵子特異的リンカーヒストンの発見過程、2) 卵子特異的リンカーヒストンの機能解析、3) ヒト

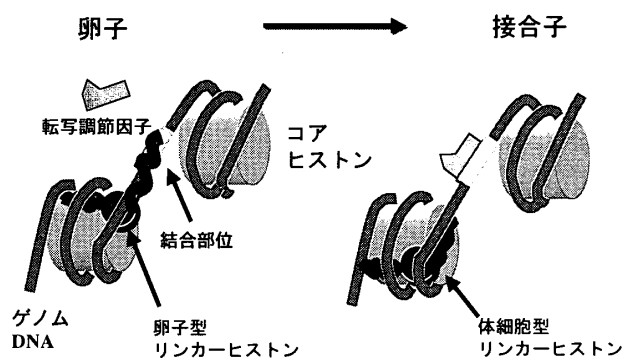


図1 カエルで明らかとなっているリンカーヒストンの機能

H1foo の解析について検討を加えた。

方 法

1. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 法による卵子特異的のリンカーヒストン H1foo の発見

1) C57BL6/J マウスを使用し、卵巣 (tester) とその他の組織 (driver) より抽出した mRNA を使用して、SSH 法を行い卵巣特異的の遺伝子ライブラリーを作成した⁹⁾¹⁰⁾。

2) 得られた cDNA 断片をシーケンスし、データベース上で既知の遺伝子に類似性について検索し、新規遺伝子 H1foo を同定した。さらに Northern Blot 法による組織別 mRNA 発現、*in situ* Hybridization 法による卵巣組織内発現を検討した。

3) RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により全長 cDNA を求め、得られたアミノ酸シーケンスを元にポリクローナル抗体を作成し、H1foo 蛋白の卵巣組織内発現、卵子・受精卵内発現を検討した。

4) 卵子・初期胚より mRNA および蛋白を抽出し、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法で H1foo mRNA および蛋白の受精前後での変化を定量した。

2. 体細胞核移植における卵子特異的のリンカーヒストン H1foo の発現変化

1) MII 期卵子をサイトカラシン B およびノコダゾールを添加した M2 培地内で、マイクロマニピュレーターを用いて除核し、囲卵腔に留置した 3T3 細胞を不活化センダイウイルスを用いて融合させた。融合後、ストロンチウムを使用し、活性化させ、発生を促し、体細胞核移植過程における H1foo の体細胞核での発現変化を検討した¹¹⁾。

2) 体細胞型リンカーヒストン H1c に EGFP を結合

させた EGFP-H1c を恒常発現させた 3T3 細胞を MII 期卵子に融合させ、体細胞核上に存在している体細胞型リンカーヒストンの核移植後の動態を検討した。

3. EGFP 結合 H1foo 蛋白の染色体への動的結合の検討

EGFP-H1foo, EGFP-H1c 融合ベクターを作成し、各々の恒常発現 3T3 細胞を作成した。共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 を用いて、カバーガラスボトムディッシュ上に培養した 3T3 細胞内の EGFP-H1foo, EGFP-H1c 蛋白の染色体結合動態について Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いて検討した。

4. H1foo 蛋白の機能調節機構の検討

卵子の成熟化機構における H1foo 蛋白の役割を明らかにするために、大腸菌で作成したリコンビナント H1foo 蛋白を MPF (cdc2/cyclin B 複合体) のセリン/スレオニンリン酸化酵素活性中心である活性型 cdc2 によって、リン酸化されるかどうかを検討した。

5. ヒト H1foo の全長 cDNA のクローニング

1) 当院倫理委員会の承認の下、十分な説明と同意のうえで得られた体外受精後 48 時間未分割卵を用い、direct nested RT-PCR 法により、ヒト H1foo cDNA のクローニングを行った¹²⁾。

2) 得られた cDNA シーケンスを元に、RT-PCR を施行し、ヒト H1foo の組織別発現を検討した。

3) ヒト H1foo のアミノ酸シーケンスを元にポリクローナル抗体を作成し、未分割卵子を免疫抗体法により染色した。

成 績

1. SSH 法による卵子特異的のリンカーヒストン H1foo の発見

SSH により得られた卵巣特異的の新規遺伝子ライブラリーの中から、卵子特異的のリンカーヒストンが発見され、H1foo と名付けた。Northern Blot 法による組織別の mRNA 発現の検討では¹⁰⁾、H1foo mRNA は卵巣特異的に発現していた。また、*in situ* Hybridization 法により卵巣組織内での発現を検討すると、H1foo mRNA は、一次卵胞形成期より発現を開始し、卵胞発育とともにその発現量は増加する傾向を示した。

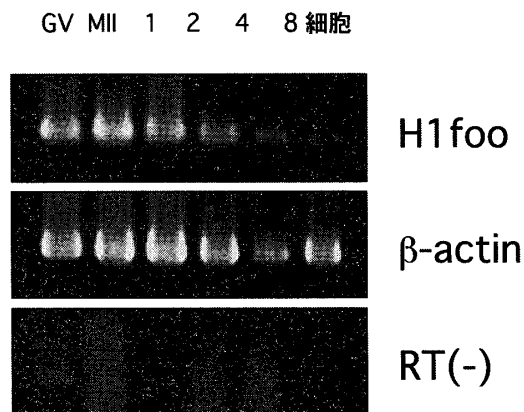
RACE 法により得られた全長 cDNA は、cDNA レベルでは既知のシーケンスにホモロジーはなかったものの、アミノ酸配列ではカエルとウニの卵子特異的のリンカーヒストンとホモロジーを有していた。一般に

リンカーヒストンは、N末端ドメイン、球状ドメイン、C末端ドメインの3つのドメイン構造を有していると考えられるが、特にDNAに結合すると考えられている球状ドメインの部分で高いホモロジーを有していた。また、3'側非翻訳領域はpoly A tailを有し、成熟卵子での蛋白翻訳に必要とされる卵子型のCytoplasmic polyadenylation elementを有していた。さらに、接合子遺伝子発現後のRNA分解に必要とされるDeadenylation elementを有しており、H1foo mRNAは、卵子成熟から受精直後まで発現していることが推察された。

ポリクローナル抗体を使用し、卵巣組織におけるH1foo蛋白の発現を免疫組織化学法によって検討した結果、*in situ* Hybridization法の結果に一致して、成熟した卵子核に陽性シグナルが検出された。さらに、蛍光抗体法により卵子・初期胚におけるH1foo蛋白の発現を検討したところ、GV期卵およびMII期卵子の卵子核に陽性であり、受精直後2次極体放出時の精子核、雌性・雄性前核に発現を認めたが、2細胞期の核ではその発現が減弱し、4細胞期には極体を除き消失した。RT-PCR法およびウエスタンブロット法によって、H1foo mRNAおよび蛋白はMII期卵子および1細胞期に強い発現を認めたが、2細胞期以降急速に消失した(図2, 3)。

今までに報告されているカエルの卵子特異的リンカーヒストンと今回のマウスのH1fooの発現変化について比較検討した。図4に示したように、カエルにおいては受精後、約4,000の細胞からなる中期胞胚変移期まで30分に1回の分裂を繰り返した後、接合子の遺伝子発現が開始する。カエルにおける卵子特異的リンカーヒストンは、この中期胞胚変移期まで発現しており、その後、急速に消失し体細胞型リンカーヒストンが交代で発現する。一方、マウスにおいては、接合子の遺伝子は、1細胞期から2細胞期にかけて発現を開始するといわれている。H1fooは、卵子から1細胞期の核まで強い発現を認め、その後、急速に消失した。諸家の報告によると、2細胞期以降に体細胞型リンカーヒストンが発現するとされており、カエルとマウスにおいてその時期は異なるものの、接合子の遺伝子発現が開始する時期に一致して、卵子特異的リンカーヒストンが消失し、体細胞型リンカーヒストンが発現開始することが明らかになった。

H1fooの発現を図5にまとめる。H1fooは、卵子形成



(1レーンあたり15個の卵子または接合子使用)

図2 H1foo mRNAの卵子・初期胚での発現(RT-PCR法, 文献10より引用)

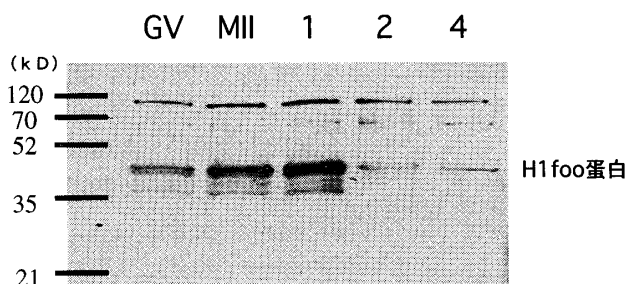


図3 H1foo蛋白の卵子・初期胚での発現(ウエスタンブロット法, 文献10より引用)

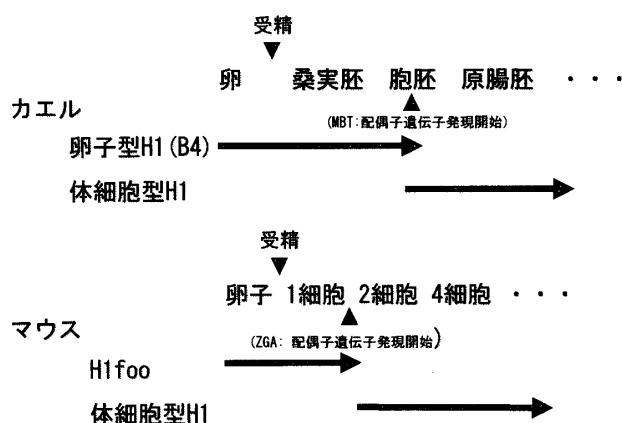


図4 初期発生におけるリンカーヒストンの発現比較

から受精後配偶子の遺伝子発現が開始するまでの間、細胞核に局在していることが確認された。

2. 体細胞核移植時の卵子特異的リンカーヒストンの発現変化の検討

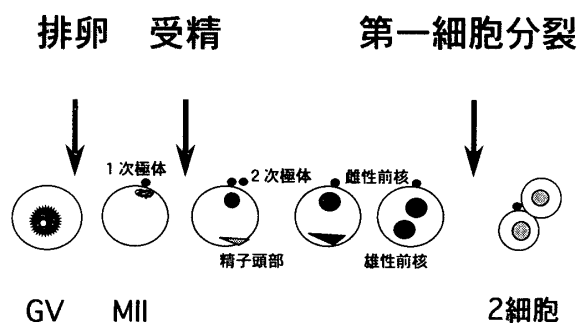


図5 受精前後でのH1foo蛋白の発現シエマ

```

ヒト : MAE GSVTS I S S S S T A G S S R S E S E K P G P S H G V P P G P S H S S P V G R R E P V I R M V I
マウス : MAE GSV S S S S S P P G R D T S S G S C G L P G A D K P G P S C R R T Q A G O R S E M I R M V I
カエル : MAE K K A V A A P E G G N K E N A V K G S K V K V K R S I K I V K T Q S E P T S M V V
メダカ : MAE K K A A P E T A T I K G S S N E I T T K P A P E D S N A K S A A R K V S P S E S T M E M K
ウニ : M S S S D D V D I P N G S T P S K A I K S R K T V T S S K Y N D M L I

ヒト : E A L O G C H P G T S V A A T R V I T H K Y P T V I R E K Y L K C A I A T Q M R G L I A P E A N S S
マウス : E A L O G C H P G T S V A A T R V I T H K Y P T V I R E K Y L K C A I A T Q M R G L I A P E A N S S
カエル : E V I R K N T E R R G S S C A I R T R I S A L P T V P I E R I T I A I N G I G R G L I T R E A H S S
メダカ : E A I L D S R K G S D O A T R G Y K E R V I V E T F U K M W B R A I N G M D T C V E V R R A X G S T
ウニ : E A I L D E M A S I I A T H W I T Q T T E M N O T M A I N I G I K R A V S S I V E K K S E G M G

ヒト : R G A T G S E K I V P H H K K I O P R M A P A T F E R R E A K G K P K P S E A E D P P N V G V R K A A
マウス : R G A T G S E K I V P H P P T T K A C A P A C G C A G A E T G S K S G L L A D Q V G A T M B S G G
カエル : T G A N G R F K I A K V P T T T I A G K E N V A S E N V D P N A E Q E T C K A P K I P K A T E S
メダカ : T E A G R E R I A A T I T A K P K A O S K E N A D P N E H A T K E S A K A T I S G E G D T S
ウニ : A A I L G H P I G K P P P A K A E K K E N K R V A K K K I A K S P T K K K D P Q S D H D V F D Y E D D T

ヒト : R P A K V Q K P P P K P G A A T E A R K O G G A A D T R A O S G E A R V E E F D F A M R P S S A C L S R A
マウス : R P A K V Q K P P P K P G A A T E A R K O G G A A D T R A O S G E A R V E E F D F A M R P S S A C L S R A
カエル : R P A K V Q K P P P K P G A A T E A R K O G G A A D T R A O S G E A R V E E F D F A M R P S S A C L S R A
メダカ : R P A K V Q K P P P K P G A A T E A R K O G G A A D T R A O S G E A R V E E F D F A M R P S S A C L S R A
ウニ : R P A K V Q K P P P K P G A A T E A R K O G G A A D T R A O S G E A R V E E F D F A M R P S S A C L S R A

ヒト : R A K G S S Q G A E A Y R T T E S K S S P T S S V K N G A A S P R V V A K A A P K A G O P N
マウス : R A K G S S Q G A E A Y R T T E S K S S P T S S V K N G A A S P R V V A K A A P K A G O P N
カエル : R A K G S S Q G A E A Y R T T E S K S S P T S S V K N G A A S P R V V A K A A P K A G O P N
メダカ : R A K G S S Q G A E A Y R T T E S K S S P T S S V K N G A A S P R V V A K A A P K A G O P N
ウニ : R A K G S S Q G A E A Y R T T E S K S S P T S S V K N G A A S P R V V A K A A P K A G O P N

ヒト : K A A A P P G S G S V V A H L S R R T A P K G P R K A G L P I K A S S K V S S Q R A E A
マウス : Q E K V P T P S D I G H V C T P R V R A A T P E N T Q A
カエル : D S T D E G A V K A G A S R V T N
メダカ : K K V V K K K T P T R A A K T T K K I N
ウニ : K K V V K K K T P T R A A K T T K K I N

```

図6 ヒトH1foo蛋白のシーケンスと他種の卵子特異的リンカーヒストンのホモロジーDNAに結合する球状ドメインにおいて強いホモロジーを認めた(文献12より引用)。

除核卵子に体細胞核を移植すると、体細胞核移植10分後には、移植した体細胞核に卵子特異的リンカーヒストンH1fooが取り込まれ、ストロンチウムによる活性化後の前核期にもH1fooは陽性であった¹¹⁾。しかしながら、正常初期胚の発生と同様に2細胞期以降急速に核での染色性が低下した。また、EGFP-H1c発現した3T3細胞を卵子に融合させた実験では、体細胞型リンカーヒストンは融合後数時間で体細胞核上から消失することが確認された。以上の結果より体細胞核移植時にも体細胞型リンカーヒストンから卵子型リンカーヒストンへの置換が速やかに行われることが明らかとなった。

3. EGFP結合H1foo蛋白の染色体への動的結合の検討

FRAPによる解析で、50%回復時間は、EGFP-H1foo

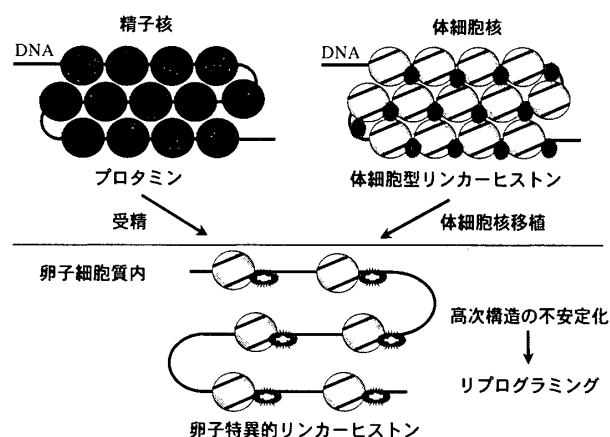


図7 卵子特異的リンカーヒストンの役割

精子核ではプロタミンにより、体細胞核では体細胞型リンカーヒストンにより折りたたまれた状態でDNAが収納されている。この精子核は受精時に、体細胞核は核移植時に卵子細胞質内に入り、卵子細胞質内に多量に存在する卵子特異的リンカーヒストンH1fooが、それぞれプロタミン、体細胞型リンカーヒストンを置換し、クロマチン構造を柔軟にする。

での平均21.6秒に対し、EGFP-H1cでは平均29.4秒と有意に延長していた¹¹⁾。また、染色体上を移動している可動性分と比較すると、EGFP-H1fooの平均91.7%に対しEGFP-H1cは平均85.0%であった。したがって、卵子特異的リンカーヒストンH1fooは、体細胞型リンカーヒストンに比べ、動的成分が多く、きわめて短時間にクロマチンに結合、解離を繰り返していることが明らかになった。

4. H1foo蛋白の機能調節機構の検討

大腸菌で作成されたりコンビナントH1foo蛋白は、MPFの活性中心である活性型cdc2によってリン酸化された。

5. ヒトH1fooのcDNAのクローニング

単一卵子を用いたdirect nested RT-PCR法により、ヒトH1fooのcDNAがクローニングされた。得られたcDNAシーケンスを元にRT-PCRを施行し、ヒトにおいてもH1fooは卵子特異的に発現していることを確認した。ヒトH1fooとマウス、カエル、ウニ等の他の卵子特異的リンカーヒストンと比較すると、DNAに結合すると考えられている球状ドメインのアミノ酸配列が極めてよく保存されていることが判明し、重要な機能を持っていると考えられた(図6)。また、アミノ酸配列を元に作成されたポリクローナル抗体により、卵子核および極体が染色され、マウスH1

fooと同様な局在を示すことが明らかになった。

結 論

卵巣特異的 cDNA ライブラリーを作成し、哺乳類で初めて卵子特異的リンカーヒストン H1foo を発見した。この H1foo は、卵子形成期の卵子核から受精後配偶子の遺伝子発現が開始するまでの配偶子核に局在していることが確認された。体細胞核移植時にも、速やかに体細胞型リンカーヒストンから卵子型リンカーヒストンへの置換が起こった。また、卵子特異的リンカーヒストンは、体細胞型に比べ緩やかに DNA に結合していた。したがって卵子特異的リンカーヒストン H1foo は、クロマチン構造を柔軟にすることによって、卵子の核成熟・初期胚発生を誘導しているものと考えられた(図 7)。

謝 辞

本講演の機会を与えて頂きました野澤志朗学会長並びに会員各位、座長の労をお執り頂いた吉村泰典教授、峯岸敬教授に深謝致します。

また、研究を遂行するにあたり、本研究を直接ご指導頂きました吉村泰典教授および慶應義塾大学医学部産婦人科学教室員各位に深く感謝致します。

共同研究者(敬称略)

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室：寺西貴英，古谷正敬，上野和典，上原克彦，松本 直，服部純尚，宮越 敬，田中雄大，久慈直昭，内田 浩，丸山哲夫，末岡 浩，吉村泰典，野澤志朗

University of Utah：Eli Y. Adashi

Oregon Health Science University：Jon D. Hennebold

東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科動物発生工学研究室：木元真吾，小野由紀子，尾畑みつよ，河野友宏

理化学研究所理研バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室：小倉淳郎

東京女子医大第二生理学教室：宮崎俊一

東京大学大学院新領域創世科学研究科先端生命科学：青木不学

文 献

1. Wolffe A. Chromatin. San Diego : ACADEMIC PRESS 1998
2. Horn PJ, Carruthers LM, Logie C, Hill DA, Solomon MJ, Wade PA, Imbalzano AN, Hansen JC, Peterson CL. Phosphorylation of linker histones regulates ATP-dependent chromatin remodeling

enzymes. Nat Struct Biol 2002 ; 9 : 263—267

3. Ura K, Nightingale K, Wolffe AP. Differential association of HMG1 and linker histones B4 and H1 with dinucleosomal DNA : structural transitions and transcriptional repression. EMBO J 1996 ; 15 : 4959—4969
4. Childs G, Nocente-McGrath C, Lieber T, Holt C, Knowles JA. Sea urchin (*lytechinus pictus*) late-stage histone H3 and H4 genes : characterization and mapping of a clustered but nontandemly linked multigene family. Cell 1982 ; 31 : 383—393
5. Mandl B, Brandt WF, Superti-Furga G, Granger PG, Birnstiel ML, Busslinger M. The five cleavage-stage (CS) histones of the sea urchin are encoded by a maternally expressed family of replacement histone genes : functional equivalence of the CS H1 and frog H1M(B4) proteins. Mol Cell Biol 1997 ; 17 : 1189—1200
6. Ohsumi K, Katagiri C. Occurrence of H1 subtypes specific to pronuclei and cleavage-stage cell nuclei of anuran amphibians. Dev Biol 1991 ; 147 : 110—120
7. Smith RC, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB. Expression of a histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development. Genes Dev 1988 ; 2 : 1284—1295
8. Zlatanova J, Caiafa P, Van Holde K. Linker histone binding and displacement : versatile mechanism for transcriptional regulation. Faseb J 2000 ; 14 : 1697—1704
9. Hennebold JD, Tanaka M, Saito J, Hanson BR, Adashi EY. Ovary-selective genes I : the generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. Endocrinology 2000 ; 141 : 2725—2734
10. Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo : homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. Development 2001 ; 128 : 655—664
11. Teranishi T, Tanaka M, Kimoto S, Ono Y, Miyakoshi K, Kono T, Yoshimura Y. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. Dev Biol 2004 ; 266 : 76—86
12. Tanaka Y, Kato S, Tanaka M, Kuji N, Yoshimura Y. Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte. Biochem Biophys Res Commun 2003 ; 304 : 351—357

Abstract

The linker histones constitute the major proteins bound linker DNA, the DNA bridging nucleosome core particles. The composition of the linker histone fraction is tissue- and species-specific, as well as developmentally-regulated. As such, linker histones play a critical role in the higher-order packaging of chromatin and thus inevitably in an impressive array of regulatory functions. Recently, we have uncovered a mammalian oocyte-specific linker histone H1foo in the course of a differential screening project. Elucidation of the full-length sequence of this novel 1.2 kb cDNA led to the identification of a 912 bp open reading frame. The latter encoded a novel 34 kDa linker histone protein comprised of 304 amino acid. Amino acid BLAST analysis revealed H1foo to display the highest sequence homology to the oocyte-specific B4 histone of the frog, the respective central globular (putative DNA binding) domains displaying 54% identity. Substantial homology to the cs-H1 protein of the sea urchin oocyte was also apparent. Northern blot analysis documented H1foo transcripts to be uniquely expressed in whole ovarian material but not in any of twelve non-ovarian tissues tested. *In situ* hybridization studies placed the H1foo mRNA exclusively in oocytes at or beyond the primary-secondary follicle stage. H1foo protein localized to the intact germinal vesicle (GV) of preovulatory oocytes, to the condensed chromosomes of ovulated oocytes arrested at metaphase (M) II, and to the first polar body. The pronuclei were both positive in 1-cell stage. Nuclear staining, however, was reduced in 2-cell embryos and no longer detectable at the 4-cell stage of embryonic development. These findings indicate oocyte-specific linker histones may play some roles on genome-wide reprogramming in vertebrate eggs. The most distinctive feature of oocyte-specific linker histones is the specific timing of their expression during embryonic development. In *Xenopus* nuclear transfer, somatic linker histones in the donor nucleus are replaced with oocyte-specific linker histone B4, leading to the involvement of oocyte-specific linker histones in nuclear reprogramming. We then tried to determine whether the replacement of somatic linker histones with H1foo occurs during the process of mouse nuclear transfer. H1foo was detected in the donor nucleus soon after transplantation. Thereafter, H1foo was restricted to the chromatin in up to two-cell stage embryos. After fusion of an oocyte with a cell expressing GFP (green fluorescent protein)-tagged somatic linker histone H1c, immediate release of H1c in the donor nucleus was observed. In addition, we found that H1foo is more mobile than H1c in living cells using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). The greater mobility of H1foo may contribute to its rapid replacement and the less stability of an embryonic chromatin structure. These results suggest that rapid replacement of H1c with H1foo may play a significant role in nuclear remodeling. Finally, we identified human H1foo using direct RT-nested PCR of a single human oocyte.

Taken together, we conclude that the replacement of oocyte specific linker histones in the donor or sperm nucleus leads to the less stable assembly of chromatin, and thus it might contribute to the assembly of embryonic chromatin structures that are more easily replicated and transcribed when zygotic gene activation occurs.