

氏名(本籍)	林 滉 平 (埼玉県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 165 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	DNA メチル化による遺伝子発現制御機構に関する分子生物学的研究 ～コイ <i>Ucp1</i> 遺伝子とマウス <i>Hepcidin</i> 遺伝子に注目して～
論文審査委員	(主査) 村 上 賢 (副査) 折 戸 謙 介 佐 原 弘 益 舟 場 正 幸 (京都大学)

論 文 内 容 の 要 旨

プロモーターやエンハンサー領域における DNA メチル化(CpG 配列部分でシトシンにメチル基が付加する化学反応)は、一般にその遺伝子の転写を抑制し、ゲノムインプリンティングや X 染色体不活性化、組織特異的な遺伝子発現パターンなどに関与し、正常な分化発生に重要な役割を持つ。

本研究では特に組織特異的な遺伝子発現パターンの制御に注目し、組織特異的発現を特徴とする遺伝子について、その遺伝子発現制御における DNA メチル化の関与を明らかにすることを目的とした。そこで、所属研究室でこれまで扱ってきた遺伝子のうち、特徴的な組織特異的発現を示した、コイ *Ucp* (uncoupling protein)1 及びマウス *Hepcidin* の遺伝子に注目して DNA メチル化との関連を調べた。

第 1 章 プロモーター領域の DNA メチル化によるコイ *Ucp1* 遺伝子発現への影響

UCP1 は恒温動物であるマウスなどの哺乳類においては褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に限局するイオン輸送体タンパク質として知られ、体温の維持やエネルギー代謝調節などに関与する。一方、変温動物であるコイでは肝臓で特異的に高い発現がみられる。マウスにおいては *Ucp1* プロモーターならびにエンハンサー領域における特に CRE(cAMP 応答配列)のメチル化が *Ucp1* 遺伝子発現を直接抑制することが報告されている。しかし、魚類における *Ucp1* 遺伝子上流の DNA メチル化状態ならびにその遺伝子発現制御への関与についてはまだ明らかにされていない。そこで、コイ *Ucp1* 発現におけるプロモーターとその上流領域の DNA メチル化の影響を調べた。

まず、コイの肝臓、脳、腎臓、骨格筋、鱗の 5 つの組織について *Ucp1* mRNA 発現レベルを real-

time qPCR により調べたところ、既報と同様に肝臓でもっとも高い発現であった。次に、バイサルファイト法を実施して、同組織のコイ *Ucp1* 遺伝子上流領域の DNA メチル化状態を調べた。バイサルファイト法では、マウスにおいて DNA メチル化による *Ucp1* 発現制御への関与が報告されている CRE 配列と比較的相同性の高い配列を含む 2 つの領域に注目して実施した。2 つの領域は *Ucp1* 転写開始点 (+1) より上流の nt -2562~ nt -2102 領域 (CpG を 7 ヶ所含み、遠位領域とする) と nt -215~ nt -12 領域 (CpG を 5 ヶ所含み、近位領域とする) である。その結果、遠位領域の nt -2178、nt -2173、nt -2103 の 3 ヶ所のシトシンにおいて肝臓と腎臓では他の組織に比べてメチル化の程度が有意に低かった。近位では 5 ヶ所の CpG すべてにおいてメチル化の程度が肝臓で有意に低いことがわかった。これらの結果から、肝臓での *Ucp1* 遺伝子上流領域の低 DNA メチル化状態が *Ucp1* 遺伝子の高発現に関与している可能性があると考えられた。そこで次に、この上流領域の DNA メチル化によるコイ *Ucp1* 転写活性への直接的な影響を検討するために、転写開始点より上流の推定プロモーター領域 (nt -2634~ nt +49 : 遠位と近位を含む) ならびに近位領域 (nt -236~ nt +49) のみをそれぞれ組み込んだプラスミドコンストラクトを作製して、ゼブラフィッシュの肝臓由来細胞株 ZF-L を用いてレポーターアッセイを実施した。その結果、いずれの領域をメチル化した場合でも、*Ucp1* プロモーターの転写活性は抑制しないことが分かった。このことは、コイ *Ucp1* 転写活性の抑制は、調べたプロモーター領域の DNA メチル化によって引き起こされるのではないのかもしれない。クロマチンリモデリングを介して転写調節に関与している可能性もあり、今後の検討課題である。一方で、プロモーター領域の各 CpG サイトに変異導入したレポーターアッセイ法を実施したところ、DNA メチル化による影響とは直接関与しないものの、nt -108 の塩基置換が *Ucp1* プロモーター活性を有意に減少させた。この領域にはいくつかの転写関連因子が結合することが推定されたことから、コイ *Ucp1* の転写制御に関与する新たな転写制御サイトの候補を見つけることができた。

第 2 章 プロモーター領域の DNA メチル化によるマウス *Hepcidin* 遺伝子発現への影響

ヘプシジンは正常なマウスの肝臓で高く発現して血中鉄量調節に関与するペプチドホルモンであり、主に炎症による IL-6 シグナルや、貯蔵鉄増加による BMP シグナルを介して *Hepcidin* 遺伝子発現が増加する。一方で、マウス肝癌由来細胞株である hepa1-6 細胞ではほとんどその発現が認められず、BMP シグナル刺激によっても検出可能レベルに至らない。また、ヒト肝癌由来細胞株である Huh7 や HepG2 でも *Hepcidin* の低発現が報告されている。Huh7 では *Hepcidin* の近位上流領域(開始コドン +1 とする nt -154 までの領域)における DNA メチル化と遺伝子発現との間で負の相関が示唆されている一方で、HepG2 では同領域においては負の相関がないとされている。本研究ではまだ明らかにされていない、マウスの各組織及び hepa1-6 細胞での *Hepcidin* 遺伝子発現における *Hepcidin* プロモーター領域の DNA メチル化による影響を検討した。

マウスの肝臓、白色脂肪組織、骨格筋の 3 つの組織と hepa1-6 細胞の *Hepcidin* mRNA 発現レベルを real-time qPCR により調べたところ、既報の通り肝臓で最も高い *Hepcidin* の遺伝子発現と、その

他組織ならびに hepa1-6 細胞ではほとんど発現していないことが確認できた。次に *Hepcidin* 遺伝子の開始コドン(+1)より上流の既知のプロモーター領域(約 2.3kbp)に含まれる 29 ヶ所の CpG のメチル化状態をバイサルファイト法により調べたところ、肝臓では特にメチル化の程度が低い 2 つの領域があることが分かった。それらの領域を遠位領域(nt -1708~ nt -1454 であり 8 ヶ所の CpG を含む)ならびに近位領域(nt -678~ nt -102 であり 9 ヶ所の CpG を含む)とした。特に遠位領域のうち 7 ヶ所の CpG と近位領域のうち 6 ヶ所の CpG については、肝臓では他組織ならびに hepa1-6 細胞と比較してメチル化の程度が有意に低かった。次に、プロモーター領域の DNA メチル化による *Hepcidin* 転写発現への直接的な影響を調べるために、レポーターアッセイを実施した。その結果、プロモーター領域全長(nt -2018~ nt -35)、近位領域のみを含む領域(nt -565~ nt -35)、遠位領域のみを含む領域(nt -2018~ nt -1448)をそれぞれ組み込んだコンストラクトにおいて、全ての CpG メチル化処理はいずれの転写活性も有意に減少させた。また、*Hepcidin* プロモーターには、*Hepcidin* 遺伝子発現を促進する転写因子として知られるリン酸化 Smad1/5/8 の結合領域と推測される BMP-RE1(nt -155~ nt -150)または BMP-RE2(nt -1678~ nt -1673)が含まれる。BMP-RE1、BMP-RE2 にはそれぞれ CpG 配列が一つずつ含まれている。そこで、これらの BMP-RE の CpG のみをメチル化処理し同様にレポーターアッセイを行ったところ、転写活性が有意に減少した。BMP はキナーゼ型受容体である ALK3 や ALK2 の活性化を介して、Smad1/5/8 をリン酸化する。リン酸化した Smad1/5/8 は Smad4 と複合体を形成し、核内に移行して、BMP-RE を介して *Hepcidin* 転写を促進する。そこで、本研究ではさらに恒常活性化型 BMP 受容体である ALK3(QD)を一過性過剰発現させた HepG2 細胞を用いて、レポーターアッセイを行い、受容体過剰発現に対する転写活性化効果におけるメチル化の影響を比較した。その結果、BMP-RE1 または BMP-RE 2 の CpG がメチル化されたレポーターコンストラクトにおいて、ALK3(QD)による転写活性化効果は強く減弱した。これらのことから、マウスにおける組織特異的な *Hepcidin* 遺伝子発現は *Hepcidin* プロモーター領域の特徴的なメチル化状態がその制御に関与しており、特に BMP-RE のメチル化がリン酸化 Smad1/5/8 の BMP-RE への結合を直接阻害して *Hepcidin* 転写発現を抑制していることを示した。

本研究では、第 1 章において、コイの *Ucp1* 遺伝子発現制御における DNA メチル化の影響について、既報のマウスと同様に高発現組織における低メチル化パターンの傾向が維持されている一方で、遺伝子発現制御への関与はマウスとは異なることを示唆することができた。さらに、コイ *Ucp1* 遺伝子発現制御における新たな転写制御因子結合サイトの候補を見つけることができた。また、第 2 章においてマウス *Hepcidin* 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が、*Hepcidin* 遺伝子発現を直接抑制することを証明した。さらに、メチル化による *Hepcidin* 遺伝子発現抑制において、BMP 応答配列におけるメチル化が特に重要な要因であることを見出した。以上の結果を通して本研究では、まだ DNA メチル化との関与が明らかにされていない組織特異的な発現を示す複数の遺伝子についてその DNA メチル化による遺伝子発現制御への影響を示唆することができた。

本研究内容の一部は K. Hayashi, M. Funaba, and M. Murakami.

Tissue-dependent DNA methylation of carp uncoupling protein 1 promoter. *Physiol Genomics* 51: 623-629, 2019.として掲載済みである。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は、脊椎動物における組織特異的な遺伝子発現制御機構に関して、エピジェネティクスの観点から、遺伝子発現制御領域の DNA のメチル化 (CpG 配列のシトシンにメチル基が付加する化学修飾) に注目して解析した研究である。申請が所属する研究室でこれまで扱ってきた遺伝子のうち、特徴的な組織特異的な発現を示した、コイ *Ucp* (uncoupling protein) 1 遺伝子及びマウス *Hepcidin* の遺伝子に注目して DNA メチル化との関連を調べている。

論文は 2 章から構成されている。第 1 章では、コイでは他の組織に比べて肝臓で *Ucp1* 遺伝子の高い発現がみられることを定量的リアルタイム PCR 法で確認し、バイサルファイト法により肝臓では *Ucp1* 遺伝子発現制御領域の DNA メチル化が有意に低いことを示した。次に、DNA メチル化関連遺伝子の発現を調べるとともに、コイの *Ucp1* 遺伝子発現制御領域のプラスミドコンストラクトを作製し、レポーターアッセイ法を用いてこの遺伝子発現制御領域の DNA メチル化状態と *Ucp1* 遺伝子発現の関係を詳細に調べた。その結果、マウス *Ucp1* 遺伝子での知見とは異なり、コイでは高い DNA メチル化状態が直接的に転写活性を抑制するのではないことを示した。これらの分析過程における副産物として、コイ *Ucp1* の転写制御に関与する新たな転写制御部位をみつけている。第 2 章では、ヒト肝癌由来細胞株における *Hepcidin* 遺伝子発現制御の知見を踏まえ、未解明のマウスの各組織及び肝癌由来細胞株における *Hepcidin* 遺伝子発現状態とその遺伝子発現制御領域の DNA メチル化との関連を詳細に調べた。その結果、マウスにおける組織特異的な *Hepcidin* 遺伝子発現は *Hepcidin* プロモーター領域の特徴的なメチル化状態がその制御に関与しており、特に BMP 応答配列のメチル化がリン酸化 Smad1/5/8 の BMP 応答配列への結合を直接阻害して *Hepcidin* 転写発現を抑制していることを明らかにした。本研究の成果は、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関する基礎生物学分野に貢献する有用な知見である。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、組織特異的な遺伝子発現がエピジェネティックな修飾で起こることに興味を持ち、複数の遺伝子発現についてそれらの遺伝子発現制御領域の DNA メチル化に注目して制御機構を明らかに

しようとした内容であり、明確なテーマが設定され、調査項目が整理されて示されている。

2) 研究の背景

本研究で注目したコイの *Ucp1* 遺伝子*1やマウスの *Hepcidin* 遺伝子*2のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構については明らかにされておらず、これまでにマウスやヒトで明らかにされた先行研究の知見を整理し、自分の研究内容と関連づけて解析に取り組んでいる。

*1 *Ucp1* : マウスなどの哺乳類においては褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に存在し、酸化リン酸化を脱共役させるタンパク質であり、体温の維持やエネルギー代謝調節などに関与する。コイでは肝臓で特異的に高い発現がみられるが機能は不明である。

*2 *Hepcidin* : 肝臓で産生されるペプチドホルモンであり、血中の鉄量調節に大きく関与する。

3) 研究の方法

定量的リアルタイム PCR 法、クローニング技術、シーケンシング技術、バイサルファイト法、レポーターアッセイ法、各種 DNA メチル化酵素の使用など、研究の目的に相応しい分子生物学的、エピジェネティック解析を実施して、研究内容を深化させている。

4) 研究の結果

第 1 章のコイの *Ucp1* 遺伝子発現制御における DNA メチル化の影響について、既知のマウスの報告と同様に高発現組織における低メチル化パターンが維持されていることを示した一方で、DNA メチル化の遺伝子発現制御への関与はマウスとは異なることを示唆した。また、コイ *Ucp1* 遺伝子発現制御における新たな転写制御因子結合候補部位を見つけた。また、第 2 章においてマウス *Hepcidin* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が、*Hepcidin* 遺伝子発現を直接抑制することを証明した。さらに、メチル化による *Hepcidin* 遺伝子発現抑制において、BMP 応答配列におけるメチル化が特に重要な要因であることを見出した。いずれも十分なデータをまとめて解析している。

5) 考察と結論

これまで DNA メチル化との関与が明らかにされていなかった組織特異的発現を示す複数の遺伝子について、それらの遺伝子発現制御領域における DNA メチル化による遺伝子発現制御への影響を明らかにした。研究結果から明らかになったことを踏まえ、仮説との整合性を含め論理的に説明できている。

6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上及び基礎生物学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。