

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 *Ucp1* 遺伝子とマウス *Hepcidin* 遺伝子に注目して～

Studies on the regulation of gene expression via DNA methylation: A focus
on the carp *Ucp1* gene and mouse *Hepcidin* gene

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 分子生物学研究室

DV1704 林 滉平

目次

序文	1
第 1 章 プロモーター領域の DNA メチル化によるコイ <i>Ucp1</i> 遺伝子発現への影響	3
1 序論	3
2 材料および方法	5
3 結果	11
4 考察	15
5 図表	18
6 補足	27
第 2 章 プロモーター領域の DNA メチル化によるマウス <i>Hepcidin</i> 遺伝子発現への影響	30
1 序論	30
2 材料および方法	32
3 結果	35
4 考察	38
5 図表	41
6 補足	48
総括	51
引用論文	53
General overview	59
謝辞	62

序文

近年、後天的な遺伝情報が、遺伝子発現調節に重要な役割を持つことが報告されており、エピジェネティクスと呼ばれている。エピジェネティクスとは、「塩基配列の変化を伴わず、細胞分裂後も継承しうる遺伝情報を研究する学問」と称される。したがって、エピジェネティクス研究の発展によって、塩基配列の解析や転写因子の有無・活性といったこれまでのアプローチだけでは説明できなかった転写発現のメカニズムも説明されつつある。エピジェネティクスには、代表的なメカニズムとして DNA のメチル化やヒストンタンパク質の化学的修飾が含まれる。DNA のメチル化とは、DNA の塩基配列において、シトシンとグアニンが順に並ぶ配列部分(CpG)のうちシトシン塩基の第 5 位炭素にメチル基が付加される化学的修飾である。遺伝子プロモーター領域における DNA のメチル化は一般的にその遺伝子発現を抑制することが報告されている(Ziller *et al.*, 2013; Brandner *et al.*, 2017)。DNA メチル化による遺伝子発現抑制のメカニズムは二種類の方法が知られている。一つは転写因子等の結合領域におけるメチル化 CpG が転写因子の結合性を直接阻害する(Takizawa *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2014)。もう一つは、メチル化配列にメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質(MBD)が結合し、これがさらにクロマチンリモデリング因子等のタンパク質と複合体を形成し、クロマチンの構造を不活化状態にする(Kiskins *et al.*, 2007; Schübeler *et al.*, 2015)。哺乳類における DNA メチル化は、遺伝子刷り込み(ゲノムインプリンティング)や X 染色体不活性化などの重要な役割を担っている(Tremblay *et al.*, 1997; Martina *et al.*, 2001; Andrew *et al.*, 2011)。さらに、DNA メチル化のパターンは時期特異性、組織特異性があり、正常な DNA メチル化パターンは組織特異的な遺伝子発現パターンを形成し、正常な分化発生に重要な役割を持つ(Lei *et al.*, 1996)。

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、まだ DNA メチル化との関与が明らかになっていない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* およびマウス *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 章ではコイの *Ucp1*

を対象として、その遺伝子発現における DNA メチル化の影響を検討した。*Ucp1* はマウスにおいて遺伝子発現制御領域における DNA メチル化がその遺伝子発現に影響することが報告されており (Christian *et al.*, 2005; Leonardsson *et al.*, 2004; Kiskins *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2007)、本研究ではコイの各組織におけるマウスと相同の遺伝子発現制御領域における DNA メチル化パターンを明らかにし、その影響を検討するとともに、マウスとの差異を見出した。第 2 章では、マウス *Hepcidin* を対象として遺伝子発現における遺伝子発現制御領域の DNA メチル化の影響を検討した。本研究ではマウス各組織ならびにマウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 での *Hepcidin* 遺伝子発現への DNA メチル化による影響を明らかにするとともに、DNA メチル化を介した転写制御において、より重要な配列部分についても詳細に検討した。

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

1 序論

Uncoupling protein(UCP) 1 はミトコンドリア内膜に局在する 6 回膜貫通型のイオン輸送体である。UCP1 の活性化はミトコンドリア内膜からプロトン(H⁺)を促通拡散(プロトンリーク、脱共役)させる結果、膜内外のプロトン濃度勾配(電氣的ポテンシャル)の解消を促す。それによって、ATP 合成を伴わず、代わりに酸素消費ならびに熱産生を増加させる(Cannon *et al.*, 2004)。このような UCP1 による脱共役を中心とした熱産生は非ふるえ熱産生と呼ばれ、主に哺乳類などの恒温動物において見られる。哺乳類における UCP1 の発現は褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞といった細胞に限局して見られ、これらの細胞は特に褐色脂肪組織や一部の白色脂肪組織内に存在する(Cannon *et al.*, 2004; Kajimura *et al.*, 2014)。また、ヒトやマウスにおいては、UCP1 の発現レベルが脂肪酸や、寒冷環境で増加することが知られている(Puigserver *et al.*, 1998; Barbatelli *et al.*, 2010; Kajimura *et al.*, 2014)。

Ucp1 遺伝子とそのオーソログ遺伝子の発現は哺乳類などの恒温動物だけでなく、変温性の脊椎動物でも見つかっている(Stuart *et al.*, 1999; Jastroch *et al.*, 2005)。*Ucp1* 遺伝子は変温動物であるコイ(*Cyprinus carpio*)においても見つかっており、哺乳類の *Ucp1* 配列を基に同定されている(Jastroch *et al.*, 2005)。哺乳類の UCP1 と同様に、魚類の UCP1 も脂肪酸応答性にプロトン脱共役を誘導し、GDP によって脱共役は阻害される(Jastroch *et al.*, 2005)。しかし、コイにおける *Ucp1* 遺伝子の発現パターンは哺乳類の *Ucp1* 発現パターンとは異なっており、肝臓での高い発現と、腎臓や脳での低い発現が認められている(Jastroch *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2015)。一方で、脂肪組織では発現が確認されていない(Jastroch *et al.*, 2005)。さらに、寒冷刺激に対する応答性について、マウス脂肪組織で見られるような応答性とは異なる。寒冷水温

中で飼育されたコイでは、温水中で飼育された場合と比べて、肝臓における *Ucp1* 遺伝子発現が低いことが報告されている (Jastroch *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2015)。これらの結果は、魚類と哺乳類では *Ucp1* 発現の制御が異なることを示唆している。しかし、この発現制御に関する具体的なメカニズムについては、コイではまだほとんど知られていない。

序文でも述べたように、DNA メチル化は遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域に生じると、一般的にその転写発現を抑制するとされている (Ziller *et al.*, 2013; Brandner *et al.*, 2017)。これまでに、マウスの *Ucp1* 遺伝子発現に対して、核受容体相互作用たんぱく質(RIP140)が、DNA メチル基転移酵素(DNMT1)による *Ucp1* 遺伝子プロモーターおよびエンハンサーの DNA メチル化を介して、抑制的に制御していることが報告されている (Leonardsson *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2005; Kiskins *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2007)。RIP140 はマウス *Ucp1* 遺伝子上流の遠位ならびに近位領域に DNMT1 をリクルートし、DNA メチル化を誘導する (Kiskins *et al.*, 2007)。

本章では、マウスで知られているような *Ucp1* 発現と DNA メチル化の関連が、コイにおいても同様に認められるかどうかについて検討した。コイの *Ucp1* 遺伝子発現が組織特異的パターンを形成している理由を明らかにするために、まず、*Ucp1* 遺伝子の推定制御領域(転写開始点 nt +1 とした nt -2562 ~ nt -2102 ならびに nt -214 ~ nt -12 であり、マウス *Ucp1* 遺伝子制御領域と相同領域を含む)についてコイ各組織の DNA メチル化状態を明らかにした。本研究ではまた、*Ucp1* 遺伝子に対する RIP140 ならびに DNMT1 の関与を知るために *RIP140* と *Dnmt1* の mRNA 発現レベルを測定した。さらに、*Ucp1* 転写発現における DNA メチル化の直接的な影響を調べるために、nt -2634 ~ nt +49 または nt -236 ~ nt +49 の領域を含むルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製して、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、解析した。

2 材料および方法

生体材料

本研究では、6~12 月齢のニシキゴイ(common carp)を 23 検体使用した。これらのコイは市販の飼料で飼育し、水温 22 度の環境下で管理した。コイから、肝臓、脳、骨格筋、腎臓、鱗をそれぞれ採材し RNeasy®Lysis Solution またはエタノールに入れ、-20℃で保存し、それぞれ RNA または DNA 抽出に利用した。なお、23 検体の各組織から核酸抽出したサンプルのうち、十分量の核酸が得られたもの、または十分な解析が可能だったものをそれぞれの実験データとして使用し、各実験の n 数とした。

細胞

ゼブラフィッシュ肝臓由来細胞株(ZF-L)は ATCC より購入した。ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 は京都大学農学研究科の舟場正幸准教授に提供していただいた。

細胞培養

ZF-L の培地は、50% L-15、35% D-MEM(高グルコース)、15% Ham's F12 を作製し、これに非働化した 5%牛胎児血清(FBS)、非働化した 0.5%ニジマス血清、牛インスリン(10μg/ml)、マウス EGF(50ng/ml)、HEPES(15mM)、重炭酸ナトリウム(0.15g/l)を添加したものを増殖培地とした。上記の増殖培地で大気組成下、28℃の環境で ZF-L を培養した。フォルスコリン刺激を行う場合は、ZF-L にフォルスコリン(10μM)を添加後、12 時間培養し、細胞を回収した。

HepG2 では、非働化した 10%FBS と 1%ペニシリンーストレプトマイシン(100U/ml ペニシリンおよび 100μg/ml ストレプトマイシン)を含む D-MEM(高グルコース)を増殖培地とした。上記の増殖培地で 5%CO₂ 下、37℃の環境で HepG2 を培養した。

RNA の抽出及び逆転写による cDNA の作製

各組織の RNA 抽出には Quick gene 800(FUJIFILM Wako Chemicals)と Quick gene RNA tissue kit S(FUJIFILM Wako Chemicals)または ISOGEN(NIPPON GENE)、培養細胞の RNA 抽出には Quick gene RNA cell kit S(FUJIFILM Wako Chemicals)を用いて添付のプロトコールに従い、total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度を吸光度法に基づいて測定した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を作製した。作製した cDNA を 2.5ng/μl となるように滅菌蒸留水で調整した。

定量的 RT-qPCR 法

KAPA SYBR® FAST Universal qPCR kit (KAPA)および Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (タカラバイオ)を用いて、5ng の total RNA に相当する cDNA を鋳型として qPCR を行った。各遺伝子の発現レベルの算出は標準曲線法を用いた。標準曲線法では、各遺伝子に対する特異的プライマーを用いた PCR 増幅産物を段階希釈して標準溶液とし、標準曲線を作製した。補正遺伝子として *Ef-1 α* 遺伝子の発現レベルに対する比の値を各遺伝子の相対的な発現レベルとした。使用したプライマー配列は表 1-1 に示す。

DNA 抽出

各組織から Get *pure*DNA Kit-Cell, Tissue(Dojindo) を用いて、添付マニュアルに従い、DNA を抽出した。抽出された DNA を 25~100μl の滅菌蒸留水で溶解した。抽出した DNA の濃度は吸光度法により測定した。

バイサルファイトシーケンス

CpG のメチル化状態を調べるために、抽出した DNA をバイサルファイト処理し、非メチル化シトシンをウラシルへ変換した。バイサルファイト処理は MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite

Modification Kit version 2.0(タカラバイオ)を用いて、添付マニュアルに従って行った。バイサルファイト処理された DNA を鋳型として、TaKaRa EpiTaq HS(タカラバイオ)を用いて PCR を行った。プライマーはバイサルファイト処理後の標的配列特異的なプライマーを作製し、使用した(表 1-1)。

目的のサイズの PCR 増幅産物が得られたかどうかを確認するために、電気泳動を行った。電気泳動は 1.5%アガロースゲルを用いて、PCR 産物 5 μ l を泳動した。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドにて染色し、UV ライトによって可視化し、目的のサイズの増幅産物を確認した。PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit(日本ジェネティクス)を用いて、添付マニュアルに従って精製し、目的のサイズの DNA 断片を得た。精製した DNA 断片を用いて TA クローニングを行った。TA クローニングで得られた 8~30 個の単コロニーについてそれぞれインサートの配列を解析するためにコロニーPCR ならびにシーケンス解析を行った。得られた配列解析結果を、バイサルファイト未処理の配列と比較して DNA メチル化の程度を算出した。

TA クローニング

クローニングには pGEM®-T Easy Vector system I(Promega) を用いた。ライゲーション反応はキットに付属する T4 DNA Ligase と 2×Rapid Ligation Buffer を用いて行い、形質転換は *E. Coli* JM109 Competent Cell(タカラバイオ)を使用した。コンピテントセル 32 μ l とライゲーション反応液 4 μ l を混合し、氷中で 30 分静置した。42℃で 1 分間インキュベートした後、混合液に滅菌蒸留水 200 μ l 加え、アンピシリン(50 μ g/ml)加 LB 培地に播種し、37℃で一晩培養した。

コロニーPCR ならびにシーケンス解析

TA クローニングで得られた 8~30 個の単コロニーについてそれぞれインサートの配列を解析するためにコロニーPCR ならびにシーケンス解析を行った。コロニーPCR ではプラスミド(pGEM-T Easy Vector)に対するユニバーサルプライマーと MightyAmp™

DNA Polymerase Ver.2(タカラバイオ)を用いて、添付マニュアルに従って PCR 反応液を作製した。滅菌した爪楊枝で釣菌した単コロニーを反応液に加え、PCR を行った。反応条件は初期熱変性として、98℃ 2 分間の後、熱変性 98℃ 10 秒間、アニーリング 55℃ 15 秒間、伸長反応 68℃ 45 秒間のセットを 33 サイクルの後、最終伸長反応 68℃ 3 分間で行った。反応には PCR Thermal Cycler Dye(タカラバイオ)を使用した。PCR 産物は上記と同様の方法で電気泳動を行い、目的のサイズの増幅産物を確認した。目的のサイズのインサートが含まれていると思われる PCR 産物は exonucleaseI(New England Biolabs Japan)と shrimp alkaline phosphatase(タカラバイオ)を用いて精製した(ExoSAP 処理)。ExoSAP 処理産物は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてサイクルシーケンスを行い、BigDye® XTerminator™ Purification Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて精製し、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific)によって配列を解析した。

CpG-free レポーターコンストラクトの作製

コイ *Ucp1* 推定プロモーター領域の転写活性を調べるために、レポーターコンストラクトを作製した。レポータープラスミドには、レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を含み、CpG 配列を含まない CpG-free-luciferase-based reporter vector(pCpGL-basic)(Klug M and Rehli M, 2006)を用いた。コイ *Ucp1* プロモーター領域(nt -2634 ~ nt +49 と nt -256 ~ nt +49)の DNA 配列を PCR により増幅し、pCpGL のルシフェラーゼ遺伝子配列の上流に組み込まれるようにライゲーション反応を行った。ライゲーション反応は T4 DNA Ligase(Promega)と 2×Rapid Ligation Buffer(Promega)を用いて行った。なお、転写開始点を+1とした。各 CpG 配列の転写活性への寄与を知るために、変異導入も行った。変異導入は変異を含むプライマーを用いた PCR 法によって行った。pCpGL を用いたライゲーション反応液は *E. Coli* PIR1Cells(invitrogen)に形質転換した。形質転換した *E. Coli* 25μl とライゲーション反応液 4μl を混合し、氷中で 30 分静置した。その後 42℃で 30 秒間インキュベートした後、混合液に SOC medium

250 μ l 加え、37℃で 1 時間振盪培養した。その後、ゼオシン (35 μ g/ml) 加 LB 培地に播種し、37℃で一晩培養した。培養後、得られた単コロニーを滅菌済爪楊枝で釣菌し、TaKaRa Ex Taq HS(タカラバイオ)を用いた PCR 反応液に加え、PCR を行った。その後、電気泳動を行い、目的のサイズが含まれている産物についてシーケンスによって配列を確認した。配列解析の結果、目的の配列が含まれていたコロニーのクローンについて、NucleoBond Xtra Midi Plus(タカラバイオ)を用いてプラスミドの抽出を行った。

レポーターコンストラクトのメチル化

CpG メチル化による転写活性への直接的な影響を調べるために、レポーターコンストラクトのメチル化処理を行った。メチル化処理は SssI Methyltransferase(New England BioLabs Japan)を用いて、処理した。メチル化反応では 37℃12 時間のメチル化処理と、65℃20 時間の不活化処理を行った。メチル化処理の確認は、バイサルファイト処理後、ダイレクトシーケンスを行って確認した(補足図 1-2)。

レポーターアッセイ

ZF-L の場合は 48well-plate に播種し、24 時間後、FuGENE6® Transfection Reagent(Promega)を用いて、コイ *Ucp1* プロモーター領域を含むレポーターコンストラクト(*Ucp1-luc*)と、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の上流にサイトメガロウイルス(CMV)のプロモーター/エンハンサー領域を組み込んだプラスミド(CMV-Renilla-luc)をトランスフェクションした。HepG2 は 48well-plate に播種して 4 時間後に Polyethylenimine Max reagent(Polysciences)を用いて *Ucp1-luc* ならびに CMV-Renilla-luc をトランスフェクションした。トランスフェクションしてから 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ発光量を測定した。ルシフェラーゼ発光量の測定は Dual-luciferase® Reporter 1000 Assay System(Promega) と、Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN® HT(BioTek)を用いてホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定を行った。ホタルルシフェラーゼ活性値を

ウミシイタケルシフェラーゼ活性値で除して補正を行った。

また、ZF-L へのトランスフェクション後のレポーターコンストラクトの DNA メチル化状態に変化がないことは、トランスフェクション後の細胞よりレポーターコンストラクトを抽出し、バイサルファイト処理後、ダイレクトシーケンスによって確認した(補足図 1-2)。

統計分析

データは平均値±標準誤差により示した。組織間の遺伝子発現量またはメチル化レベルの違いは **Tukey** 法によって検定した。また、フォルスコリン添加群ならびに非添加群間における比較は **t** 検定によって検定した。危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。

3 結果

コイ肝臓における *Ucp1* の高発現と上流領域の低メチル化

コイの肝臓、脳、腎臓、骨格筋、鱗において *Ucp1* mRNA 発現量を RT-qPCR によって確認したところ、Tukey 法においては肝臓と脳の間には有意差はなかったものの、その他の組織に対して肝臓は有意に高い *Ucp1* の発現量が確認できた(図 1-1)。

コイ *Ucp1* 遺伝子の転写におけるシトシンメチル化の関連を評価するために、*Ucp1* 転写開始点より上流の CpG ジヌクレオチド配列を調べた。まず、*Ucp1* 転写開始点より上流の約 3kbp の塩基配列を、コイ、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトで比較した(図 1-2A)。マウスでは nt -2530 から nt -2310 の範囲に *Ucp1* 発現を増加するプロテインキナーゼ A 経路の応答配列である cAMP response element(CRE)が報告されている(Kozak *et al.*, 1994; 図 1-2A)。マウス *Ucp1* ではまた、転写開始点より上流の nt -270 までの近位プロモーター領域に CRE 配列を含む(Kozak *et al.*, 1994; 図 1-2A)。これらの領域は、マウスにおいて DNA メチル化による *Ucp1* 転写発現抑制が報告されている範囲でもある(Kiskins *et al.*, 2007; Shore *et al.*, 2010)。コイの *Ucp1* 上流領域とその他の動物種の *Ucp1* 上流領域の比較において、約 3kbp の範囲で相同性の高い配列は確認できなかったものの、コイ *Ucp1* 転写開始点より上流の nt -2565 ~ nt -2561 と nt -2173 ~ nt -2169 または nt -111 ~ nt -107 にはマウス *Ucp1* 上流領域における CRE 配列と類似した配列が含まれていた(Murakami *et al.*, 2015; 図 1-2A)。そこで本研究ではコイ *Ucp1* 上流の遠位領域(nt -2562 ~ nt -2102 であり、7 箇所の CpG を含む)と近位領域(nt -215 ~ nt -12 であり、5 箇所の CpG を含む)を調査対象とした(図 1-2A,B,C)。各組織における *Ucp1* 上流領域の CpG メチル化状態を調べるためにバイサルファイトシーケンスを行った。バイサルファイトシーケンスの結果、遠位領域の 7 箇所の CpG のうち nt -2178、nt -2173 ならびに nt -2103 において、肝臓と腎臓ではその他 3 つの組織と比較してメチル化シトシンの程度が有意に低かった(図 1-3A)。また、肝臓と腎臓において nt -2562、nt -2475、nt -2401 と比較して nt -2178、nt -2173、nt -2103 のメチル化シトシンの程度は低かった(図 1-3A)。近位領域では、5 箇所のいずれの CpG も肝臓においてその他 4 つの組織と比

較してメチル化シトシンの程度が有意に低かった(図 1-3B)。

肝臓におけるメチル化関連遺伝子(*Dnmt1*, *RIP140*)の低発現

マウスにおいて、*Ucp1* プロモーター領域の CpG メチル化を介して *Ucp1* 発現を抑制していること報告されている DNA メチル基転移酵素(DNMT)1 と受容体相互作用タンパク質 (RIP)140(Leonardsson *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2005; Kiskins *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2007)について、コイにおける *Ucp1* 発現制御にも関与しているかを調べるために、コイ *Dnmt1* 遺伝子ならびにコイ *RIP140* 遺伝子の mRNA の発現量を RT-qPCR によって調べた。*RIP140* 遺伝子の mRNA 発現量は肝臓において、脳、腎臓、骨格筋と比較して有意に低かったが、鱗と比較して有意に高かった(図 1-4A)。*Dnmt1* 遺伝子の mRNA 発現量は肝臓において、その他の 4 組織(脳、腎臓、骨格筋、鱗)と比較して有意に低かった(図 1-4B)。

コイ *Ucp1* 推定プロモーター領域の DNA メチル化による基礎転写活性への影響

コイ *Ucp1* 転写発現における DNA メチル化の直接的な影響を知るために、コイ *Ucp1* 推定プロモーター領域の CpG をメチル化したレポーターコンストラクトを作製し、レポーターアッセイ法を実施した。レポーターアッセイは、レポーターコンストラクトとしてコイの *Ucp1* 推定プロモーター領域の遠位から近位を含む全長領域(nt -2634 ~ nt +49)を組み込んだ pCpGL、*Ucp1* 推定プロモーター領域の近位領域(nt -236 ~ nt +49)のみを組み込んだ pCpGL、プロモーター領域を含まない pCpGL をゼブラフィッシュ肝臓由来細胞株 ZF-L にそれぞれトランスフェクトして実施した。また、いずれのレポーターコンストラクトにおいても SssI Methyltransferase による全 CpG メチル化処理または未処理のものを使用し、比較した。その結果、推定プロモーター領域を含まないコンストラクト(図 1-5A の③)に比べて、推定プロモーター領域を含むコンストラクト(図 1-5A の①,②)では高い転写活性を示した。しかし、メチル化処理の有無による転写活性の違いを比較したところ、いずれのレ

ポーターコンストラクトもメチル化処理による転写活性の減少は認められなかった(図 1-5A の①,②)。また、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 で同様の検討を行ったところ、いずれも同様の結果になった(補足図 1-3A)。

そこで、本研究で調査した各 CpG の *Ucp1* 基礎転写活性への寄与を評価するために、各 CpG を GpG に変異導入した推定プロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトを作製し、同様にレポーターアッセイを行った。その結果、ほとんどの CpG→GpG 変異において *Ucp1* 基礎転写活性に影響を与えなかったが、nt -108 のシトシンのグアニン変異においては *Ucp1* 基礎転写活性を減弱させた(図 1-5C)。また、HepG2 でも同様に nt -108 の置換によって *Ucp1* 転写活性の減少が見られた (補足図 1-3B)。

コイ *Ucp1* 推定プロモーター領域のメチル化によるフォルスコリン刺激応答性への影響

マウスではフォルスコリン刺激によるプロテインキナーゼ A 経路の活性化により、細胞内 cAMP 濃度が増加し、CRE を介して *Ucp1* 発現が増加する。また、マウスにおいて、*Ucp1* プロモーターの CRE の DNA メチル化はフォルスコリン応答性を減弱させる。魚類細胞における、フォルスコリン刺激による *Ucp1* 転写活性への影響ならびに、フォルスコリン応答性への DNA メチル化の影響を調べるために、フォルスコリン添加または非添加の ZF-L の *Ucp1* 遺伝子発現ならびに転写活性を調べた。フォルスコリン刺激は、ZF-L に対してフォルスコリン(10 μ M)を添加した培地で維持し、12 時間後に回収した。ZF-L の *Ucp1* 遺伝子発現は RT-qPCR によって調査した。フォルスコリン非添加とフォルスコリン添加時の ZF-L の *Ucp1* mRNA 発現レベルを比較したところ、フォルスコリン添加によって *Ucp1* mRNA は有意に増加した(図 1-6A)。次に、フォルスコリン刺激によるコイ *Ucp1* 推定プロモーター領域の転写活性への影響と、推定プロモーターメチル化によるフォルスコリン応答性への影響を調べるために、フォルスコリン非添加ならびにフォルスコリン添加時の ZF-L を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、推定プロモーター領域の長さ(nt -2634 ~ nt +49 または nt -236 ~ nt +49)およびメチル化の有無にかかわらず、フォルスコリン

刺激はプロモーター活性を増加させなかった(図 1-6B)。

nt -108 を含む領域に結合する推定転写因子

nt -108 の置換による転写活性減弱(図 1-5C)の理由を推察するために、推定転写因子結合データベース (TFBIND)(<http://tfbind.hgc.jp/>)を用いて、nt -108 を含む nt -125 から nt -96 の範囲に対する結合性が、nt -108 の置換によって変化すると推定される転写因子を調べた。その結果、HNF4、COUP、CREB、RFX1 は nt -108 がシトシン(野生型)の場合には結合し、nt -108 がグアニン(置換)の場合には結合しないと推定された。さらに、PAX5、CP2、AP1、ERG1、ERG2、NGFIC、p53 は nt -108 がグアニン(置換)の場合に結合し、nt -108 がシトシン(野生型)の場合に結合しないと推定された。これらの因子が、コイ *Ucp1* 転写制御に関与する可能性が考えられる。

4 考察

UCP1 はマウスやヒトをはじめとする恒温動物において発現組織が限局しており、組織特異的な発現パターンがある。そのほとんどは褐色脂肪に限局して分布しており、マウスの *Ucp1* 遺伝子発現の組織特異的なパターンは、*Ucp1* プロモーター領域の DNA メチル化パターンを介して直接制御されていることが報告されている (Kiskins *et al.*, 2007; Shore *et al.*, 2010)。本章で対象としているコイ *Ucp1* では、発現組織の種類がマウスと大きく異なり、肝臓で特に高い遺伝子発現が認められ、マウスと同様に特徴的な組織特異的な発現パターンを示す (Jastroch *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2015)。そこで、本章ではコイにおける組織特異的な *Ucp1* 発現パターンについてもマウスと同様に *Ucp1* プロモーター領域の DNA メチル化パターンが直接制御しているのではないかと考えた。まず、調査する遺伝子発現制御領域の選定をするために、コイ *Ucp1* 推定転写開始点より上流の塩基配列とマウスを含む他の動物種で比較を行ったところ、動物種間で約 3kbp で高い相同性は見られなかった。しかし、マウスで DNA メチル化と *Ucp1* 発現の関与が報告されているプロテインキナーゼ A 経路の応答配列 (CRE) に類似した推定応答配列が、コイ *Ucp1* 上流領域においても含まれていた。したがって本章ではこれらを含む遠位領域 (nt -2562 ~ nt -2102) と近位領域 (nt -215 ~ nt -12) の 2 領域を調査することとした。次に、バイサルファイトシーケンスの結果、コイ *Ucp1* 遺伝子上流の遠位領域と近位領域では、いくつかの CpG のメチル化状態が組織ごとに異なることを示した。特に、遠位領域では肝臓と腎臓で低メチル化を示し、近位領域では発現組織である肝臓においてのみ低メチル化を示した。これらの結果は、コイの肝臓における *Ucp1* 推定制御領域の低メチル化がコイ *Ucp1* mRNA の高発現を導いている可能性を示唆している。我々の結果と同様に、魚類では *Ucp1* 以外にも他のいくつかの遺伝子でプロモーターならびにエンハンサー領域の DNA メチル化と mRNA 発現との負の相関が報告されている。例えば、Grass carp virus (GCRV) に感染した魚類の脾臓において、component 3 (C3) や kininogen-1 (KNG1) の mRNA 発現は高く、それらの遺伝子プロモーターおよびエンハンサー領域での DNA メチル化の程度は低いと報告されている (Shang *et al.*, 2015; Shang *et*

al., 2016; Xiong *et al.*, 2018)。また、GCRV 感染における感受性および耐性についても同様の相関が魚類において示されている(Shang *et al.*, 2014;)。このことから、コイにおいても哺乳類と同様に制御領域の DNA メチル化がその遺伝子発現を抑制制御すると考えられる。本研究では、コイの肝臓では *Ucp1* 発現が最も高く、その制御領域では低メチル化状態が認められた一方で、脳においては *Ucp1* 発現が比較的高いものの、その制御領域では高メチル化状態が認められた。このことは、組織ごとの *Ucp1* の発現レベルの制御が、DNA メチル化状態の差だけではないことも示唆している。

また、*Ucp1* 発現が比較的高い肝臓においては *RIP140* と *Dnmt1* の発現が低く、一方で *Ucp1* 発現が比較的低い骨格筋においては *RIP140* と *Dnmt1* の発現が高かった。マウスの脂肪組織において、*RIP140* は *Dnmt1* を介して *Ucp1* エンハンサーならびにプロモーター領域の DNA メチル化に関与することが報告されている(Leonardsson *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2005; Kiskins *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2007)。コイの肝臓や骨格筋における *Ucp1* 発現についても、同様のメカニズムで制御されており、肝臓における *Ucp1* 制御領域の低メチル化状態の形成に、*RIP140* と *Dnmt1* の低発現が関与していることが考えられる。しかしながら、鱗では *Ucp1* 発現ならびに *RIP140* 発現がどちらも最も低く、*Dnmt1* 発現が骨格筋、腎臓、脳よりも低かった。*DNMT1* は相互作用するタンパク質や核酸との結合を介して、翻訳後修飾としてアロステリックな調節を受けることが知られている(Jeltsch *et al.*, 2016)。さらに、*DNMT1* 活性はクロマチンの状態変化によっても制御される(Van der wijst *et al.*, 2015)。このことから、コイ *Ucp1* エンハンサーならびにプロモーター領域における DNA メチル化は、*RIP140* ならびに *Dnmt1* mRNA 発現だけでなく、これらの組織依存的な活性制御やその他の因子が関与していることも考えられ、今後の検討課題である。

コイ *Ucp1* 推定プロモーター領域を含むレポーターベクターのトランスフェクションによる転写活性の検討では、CpG のメチル化によって *Ucp1* 転写を抑制しなかった。DNA メチル化は 2 つのメカニズムを介して転写制御を行う。1 つは、遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域の転写因子結合領域に含まれるシトシンのメチル化が直接転写因子の結合を阻害する。もう 1 つは、MeCP などのメ

チル化 CpG 結合タンパク質がメチル化シトシンに結合することで、クロマチンリモデリングを引き起こし、結果としてクロマチンを転写不活性状態に導く。本章で用いたレポーターアッセイ法では、DNA メチル化によって引き起こされるクロマチンリモデリングの変化については検討できない。また、マウスにおいてエピジェネティックな *Ucp1* 遺伝子発現制御には DNA メチル化のみならずクロマチンリモデリングも並行して関与することが報告されている (Shore *et al.*, 2010)。ことを考慮すると、骨格筋や鱗での DNA の高メチル化に関連する *Ucp1* の低発現はクロマチンリモデリングを介して成り立つ可能性が考えられ、今後の研究課題である。

また、本テーマである DNA メチル化制御とは直接関与しないものの、*Ucp1* 遺伝子の転写開始点より上流の nt -108 に位置するシトシンのグアニンへの変異によって *Ucp1* の転写活性が減少するという結果を得た。この結果は、nt -108 の変異が転写因子の結合性の変化を引き起こし、結果として *Ucp1* の基礎転写活性を減少させたことが考えられる。そこで、web 上の転写因子結合データベース (TFBIND) (<http://tfbind.hgc.jp/>) を利用したところ、nt -125 から nt -96 の範囲について、nt -108 の変異によって結合性が変化すると推定されるいくつかの転写因子の候補が見つかった。さらに、nt -108 周辺の配列 (5'-TGTCG-3') はプロテインキナーゼ A 経路の応答配列であり、CREB の結合配列である CRE のコア配列 (5'-TGACG-3') と相溶性が高い。したがって、コイにおいては、nt -108 を含む領域が *Ucp1* 遺伝子発現制御において基礎転写活性に重要な制御配列である可能性が考えられる。

本研究内容は以下に公表した。

Hayashi K, Funaba M, Murakami M. Tissue-dependent DNA methylation of carp uncoupling protein 1 promoter. *Physiol Genomics* 51: 623-629, 2019.

5 図表

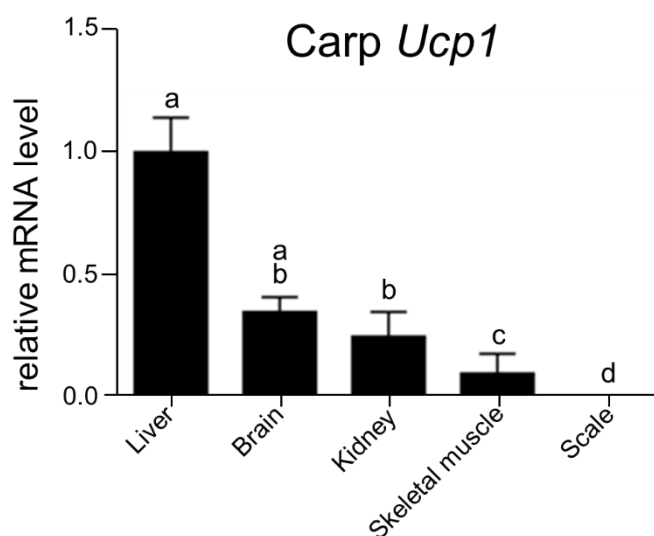


図 1-1 コイ各組織における *Ucp1* の mRNA 発現量

コイの *Ucp1* mRNA 発現量を各組織において測定した。*Ucp1* の発現量は RT-qPCR によって測定し、*EF-1 α* の発現量に対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、肝臓における発現レベルを 1 とした。データは平均値±標準誤差で示す。n=10-20 で、Tukey 法によって検定を行った。図中の異なるアルファベット間で有意差があったことを示す(P < 0.05)

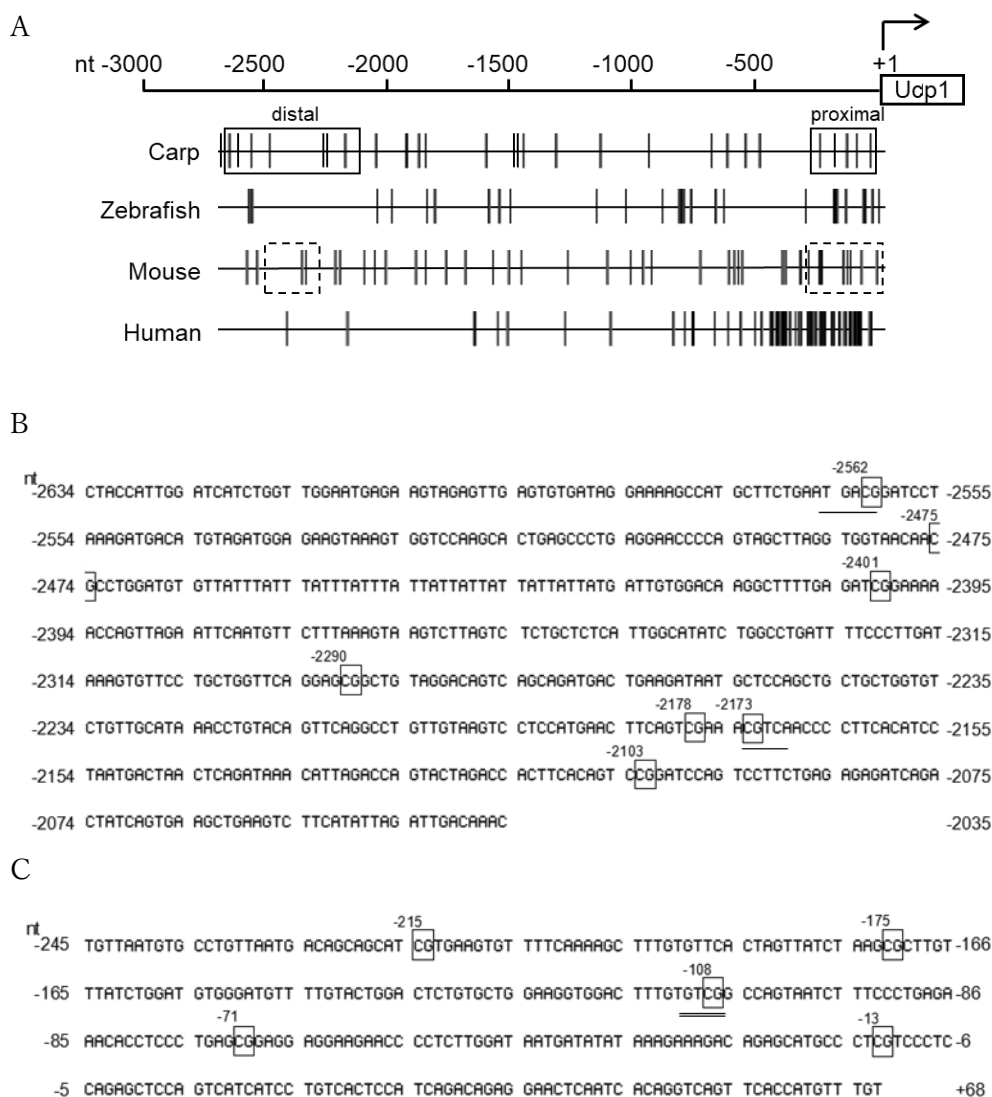


図 1-2 各動物種における *Ucp1* 上流領域の CpG 位置の模式図(A)および、調査対象としたコイ *Ucp1* 上流領域の塩基配列(B,C)

A: 数字は *Ucp1* の転写開始点を+1としたときの位置を表す。図中の縦線は CpG を表す。実線の四角は本研究で調査対象とした二つの領域を表し、破線の四角はメチル化によって *Ucp1* 発現を抑制することがマウスで報告されている CRE が含まれる領域である (Kozak *et al.*, 1994; Kiskins *et al.*, 2007; Shore *et al.*, 2010)。

B,C: A における distal(B)と proximal(C)の塩基配列を示す。CpG はそれぞれ 7 箇所と 5 箇所あった。各動物種の比較によって、CpG の位置、ならびに塩基配列に相同性はなかった。マウスでプロテインキナーゼ A 経路の応答配列として報告されている CRE と同様かまたは類似する配列が、コイにおいても *Ucp1* 転写開始点から類似した距離

の範囲に見つかった。CREのコア配列と一致した配列を下線で、類似した配列を二重下線で示す。

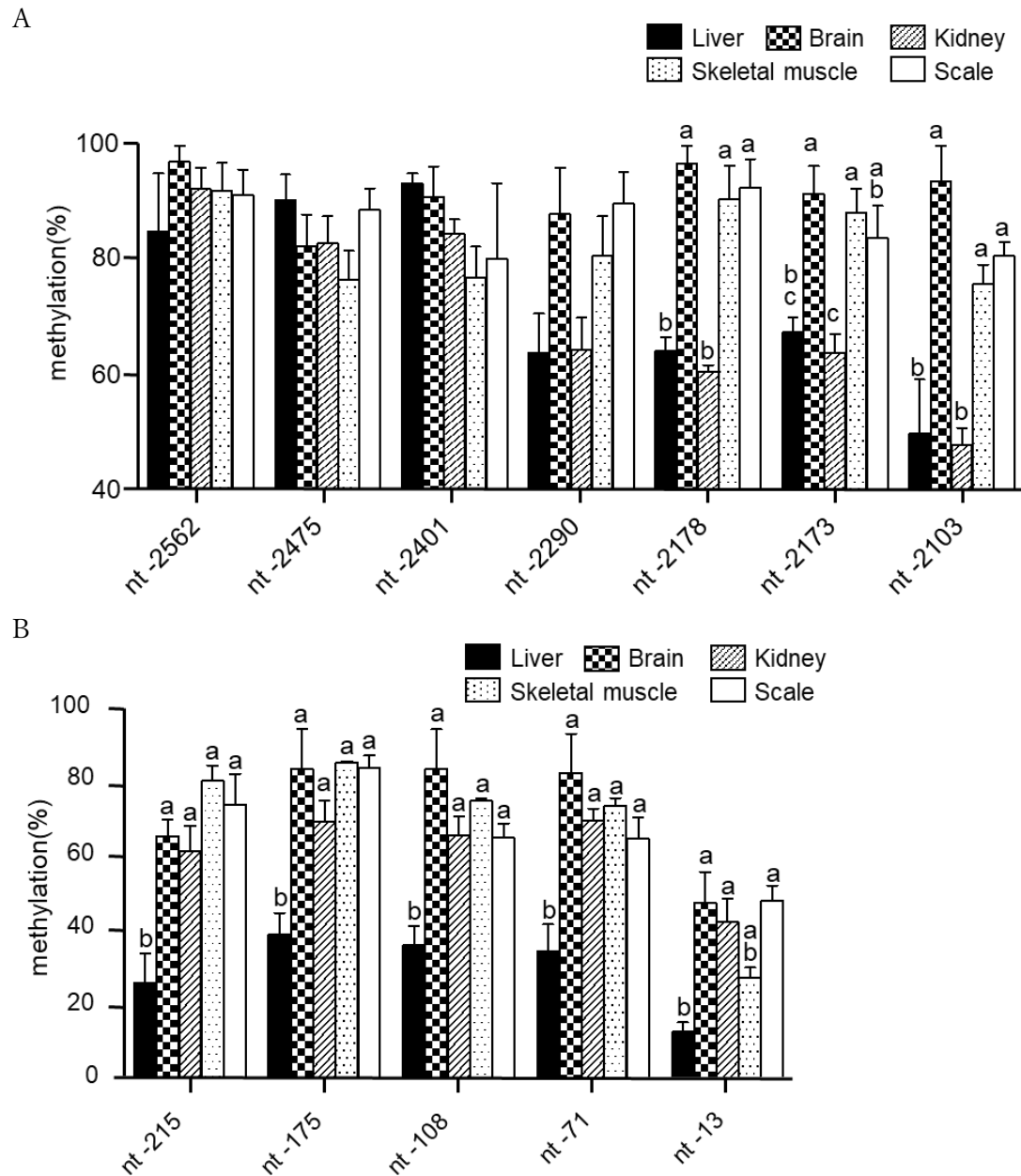


図 1-3 コイ各組織における *Ucp1* 転写開始点より上流の遠位領域(A)と近位領域(B)の DNA メチル化の程度

縦軸は非メチル化 CpG とメチル化 CpG の合計に対するメチル化 CpG の割合を表す。横軸は各 CpG の位置を表す。データは平均値±標準誤差で示す。n=3-7 で、各位置の CpG ごとに組織間で Tukey 法により検定を行った。図中の異なるアルファベット間で有意差があったことを示す(P < 0.05)

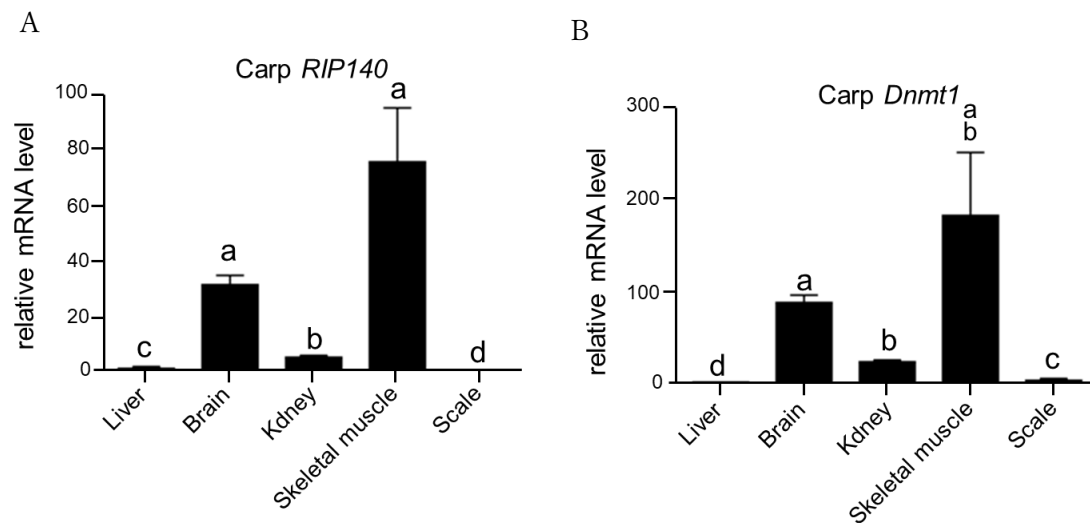


図 1-4 コイ各組織における *RIP140*(A)と *Dnmt1*(B)の発現量

コイの *RIP140* と *Dnmt1* の発現量を各組織において測定した。各遺伝子の発現量は RT-qPCR によって測定し、*EF-1 α* の発現量に対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、肝臓における発現レベルを 1 とした。データは平均値±標準誤差で示す。n=10・20 で、Tukey 法により検定を行った。図中の異なるアルファベット間で有意差があったことを示す(P < 0.05)

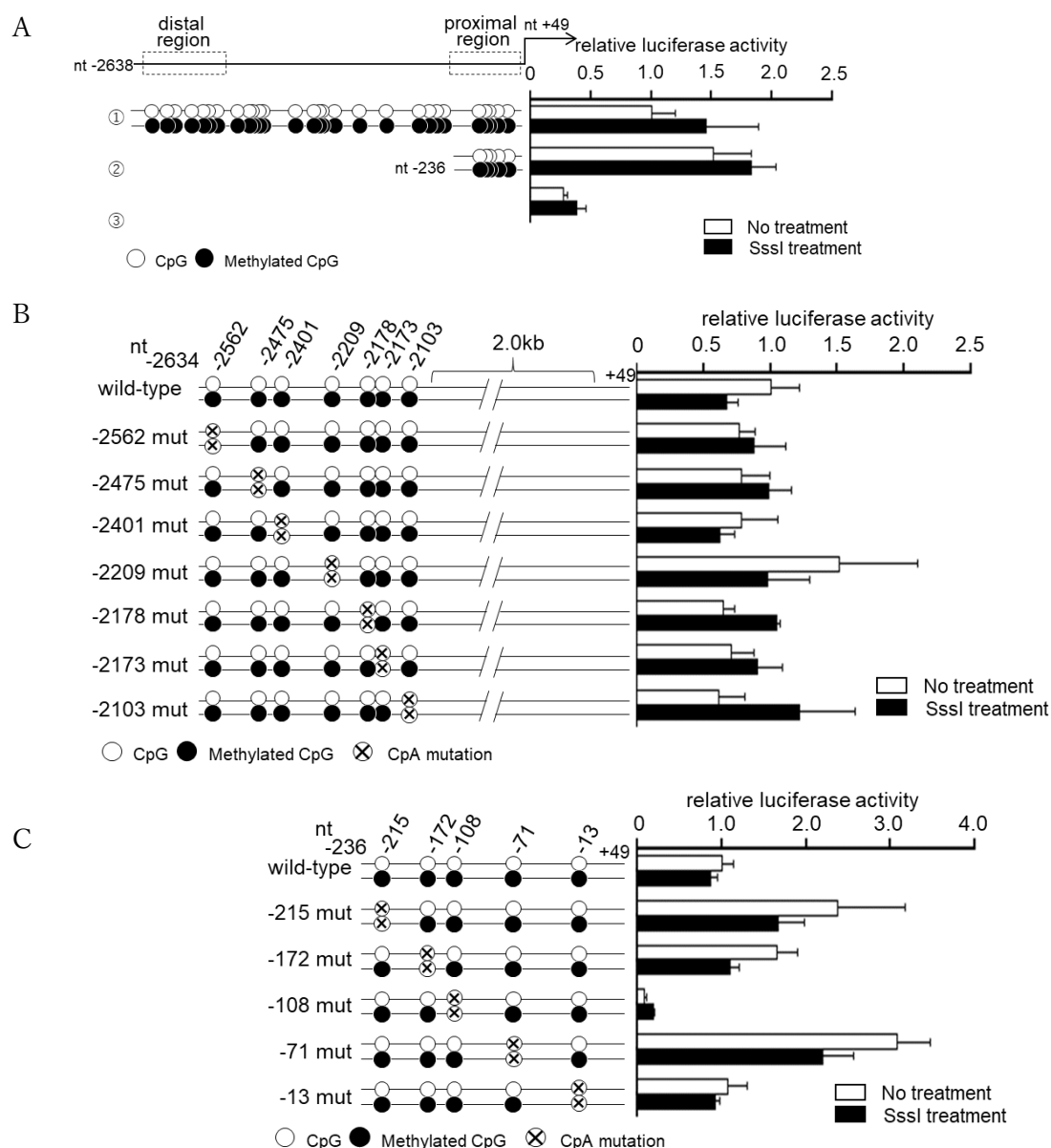


図 1-5 CpG メチル化による転写活性への直接的な影響

SssI 処理によって CpG 配列をメチル化したレポーターコンストラクトを用いて、レポーターアッセイを行った。

レポータープラスミドには CpG-free luciferase based

reporter(pCpGL)を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子上流に目的の配列を組み込んだ。

A: コイ *Ucp1* 上流の①nt -2638 ~ nt +49 または②nt -263 ~ nt +49 を組み込んだ pCpGL または、③プロモーターを組み込んでいない pCpGL を用いた。

B: nt -2638 ~ nt +49 において、遠位領域(nt -2562 ~ nt- 2102)に含ま

れる CpG をそれぞれ 1 箇所ずつ GpG へ変異導入した。

C:nt -263~ nt +49 において、含まれる CpG をそれぞれ 1 箇所ずつ GpG へ変異導入した。

ZF-L に該当するレポータープラスミドと CMV-Renilla-luc をトランスフェクションした後、24 時間培養した。データは平均値±標準誤差で示し、n=3 である。

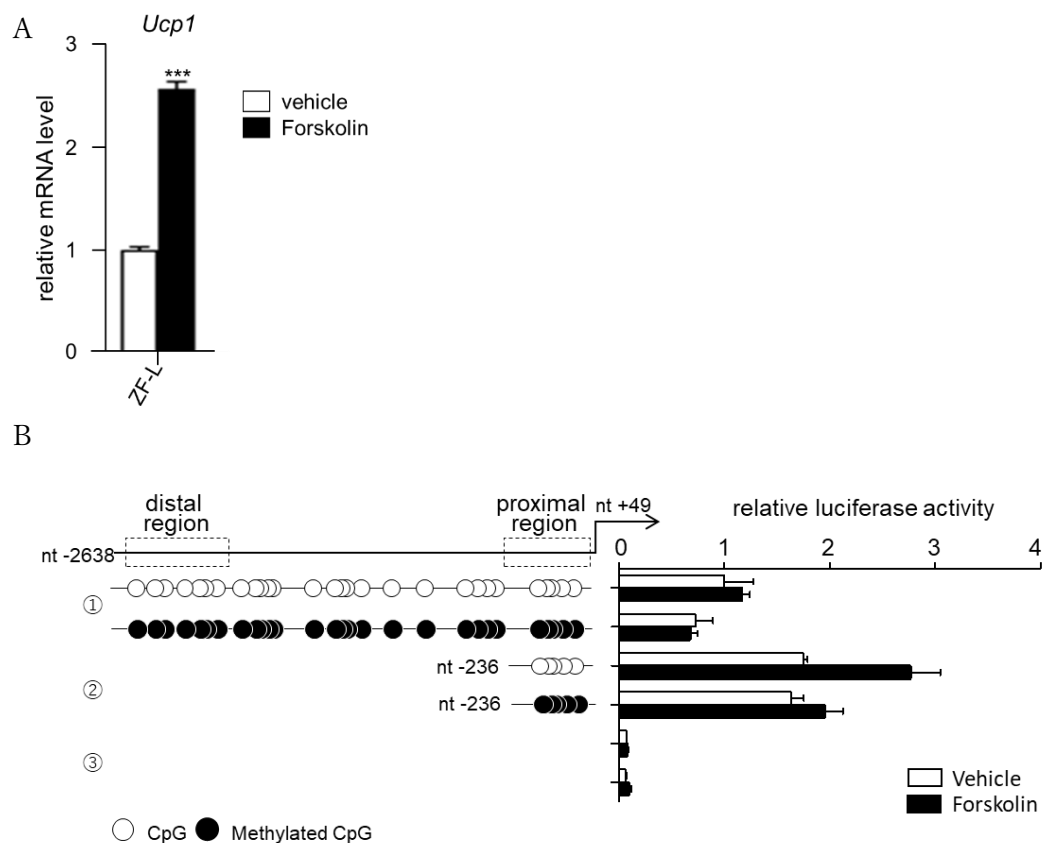


図 1-6 ZF-L における *Ucp1* 発現ならびに転写に対するフォルスコリンの影響

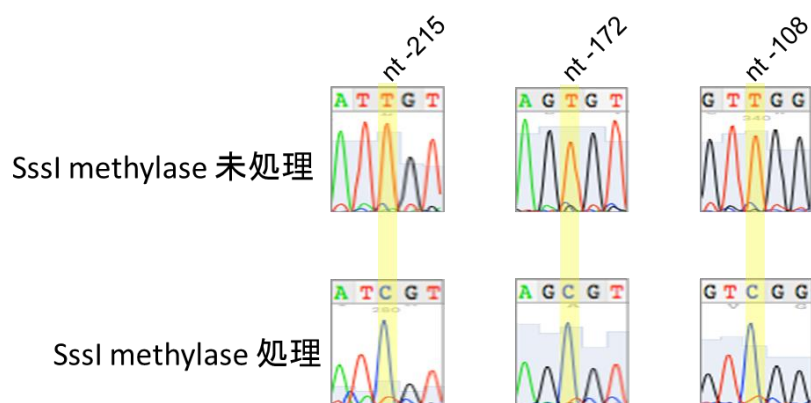
A: フォルスコリン刺激による *Ucp1* 発現量を ZF-L にて測定した。フォルスコリン(10 μ M)を添加培地または非添加培地にて 12 時間培養した。*Ucp1* 発現の測定は RT-qPCR によって測定し *EF-1 α* の発現量に対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。フォルスコリン非添加時における *Ucp1* 発現レベルを 1 とした。データは平均値 \pm 標準誤差で示す。n=3 で、t 検定を行った。***P<0.01

B: pCpGL にコイ *Ucp1* 推定プロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトを SssI methyltransferase によって処理または未処理し、CMV-Renilla-luc とともに ZF-L にトランスフェクションした後、24 時間培養した。その後フォルスコリン(10 μ M)添加培地または非添加培地にて 12 時間培養した。データは平均値 \pm 標準誤差で示し、n=3 である。なお、用いたコンストラクトは、コイ *Ucp1* 上流の①nt -2638 ~ nt +49 または②nt -263 ~ nt +49 を組み込んだ CpGL または、③プロモーターを組み込んでいない pCpGL である。

表 1-1 使用したプライマー

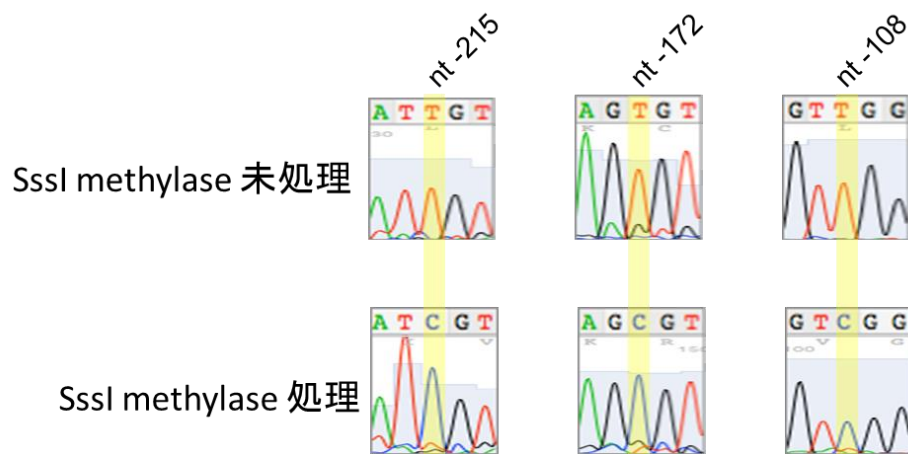
Gene or target region	5'-primer	3'-primer
RT-qPCR 用プライマー		
carp <i>Ucp1</i>	5'-cgccttctacaaaggtttcg-3'	5'-cgaatgacacgaacatcacc-3'
carp <i>Ef-1α</i>	5'-atgcggtggaatcgacaa-3'	5'-cagagagcaatgtcaatggtg-3'
carp <i>Dnmt1</i>	5'-tgccagaggatgtcaaggag-3'	5'-tcctgcagtaacctgagcttttc-3'
carp <i>RIP140</i>	5'-tccgactattccctgaatgc-3'	5'-cagcaattctgtccacaagg-3'
zebrafish <i>Ucp1</i>	5'-gggacccacagctttctaca-3'	5'-gacacgaacatcaccacgtt-3'
zebrafish <i>Ef-1α</i>	carp <i>Ef-1α</i> と同一	carp <i>Ef-1α</i> と同一
コロニーチェック用プライマー		
pCpGL	5'-taatacgactcactataggg-3'	5'-atttaggtgacactatagaa-3'
バイサルファイトシーケンス用プライマー		
carp <i>Ucp1</i> nt -2606 to nt -2078	5'-gaagtagagttgagtgtgataggaa-3'	5'-aatctctctcaaaaaaactaaatc-3'
carp <i>Ucp1</i> nt -245 to nt +68	5'-tgттаатgtgtttgттаатgatag-3'	5'-acaaacataataaactaacctataa-3'

6 補足



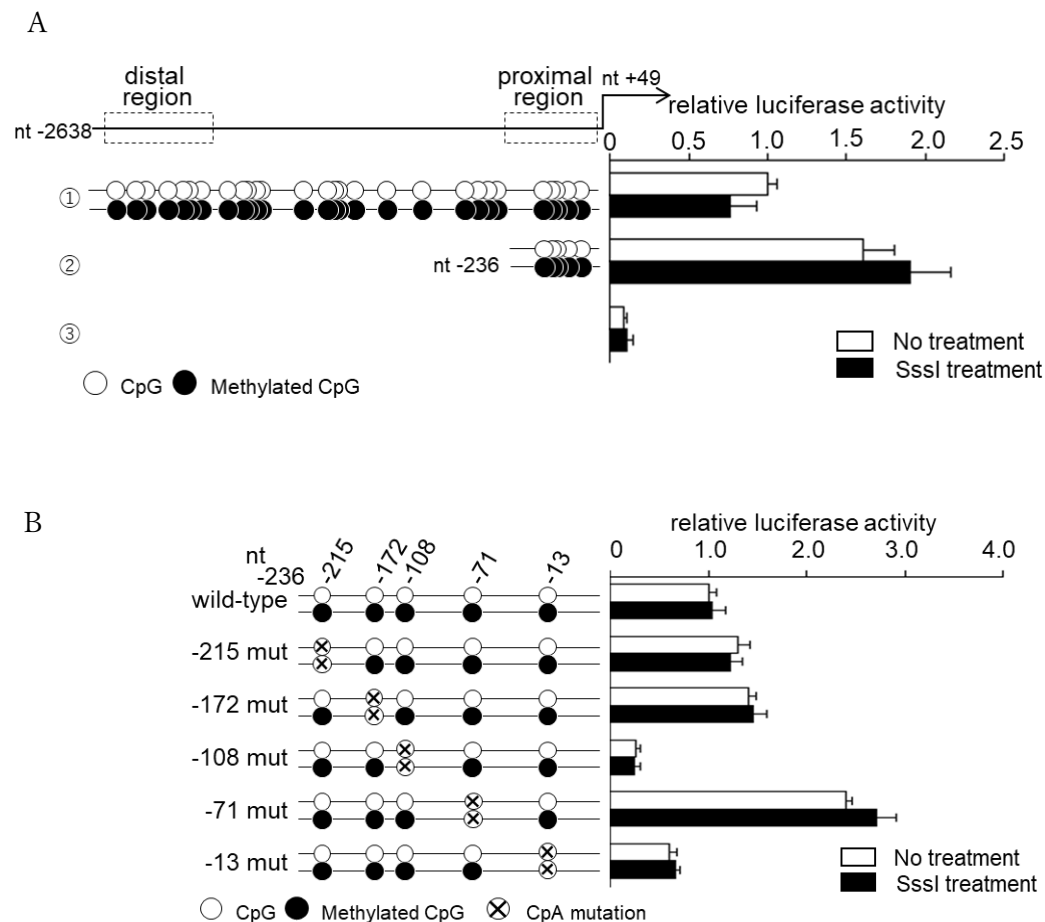
補足図 1-1 SssI methyltransferase 処理の有無によるメチル化状態の確認(代表例)

コイ *Ucp1* 推定プロモーター配列を含む pCpGL レポーターコンストラクトを SssI methyltransferase 処理した後、バイサルファイト処理し、ダイレクトシーケンスによって対象のシトシンがメチル化されていることを確認した。



補足図 1-2 トランスフェクション後のコンストラクトのメチル化状態(代表例)

ZF-L にトランスフェクション後、pCpGL レポーターコンストラクトを抽出し、バイサルファイト処理したのち、ダイレクトシーケンスによってトランスフェクション後もメチル化状態に変化がないことを確認した。



補足図 1-3 HepG2 における転写活性への影響

SssI 処理によって CpG 配列をメチル化したレポーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイについて、HepG2 においても確認した。

pCpGL のルシフェラーゼ遺伝子上流に目的の配列を組み込んだ。

A: コイ *Ucp1* 上流の①nt -2638 ~ nt +49 または②nt -263 ~ nt +49 を組み込んだ CpGL または、③プロモーターを組み込んでいない pCpGL を用いた。

B: nt -263 ~ nt +68 において、含まれる CpG をそれぞれ 1 箇所ずつ CpG へ変異導入した。

HepG2 に該当するレポータープラスミドと CMV-Renilla-luc をトランスフェクションした後、24 時間培養した。データは平均値 ± 標準誤差で示し、n=3 である。

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

1 序論

ヘプシジンは、25 個のアミノ酸からなる抗菌性ペプチドであり、腸からの鉄吸収やマクロファージからの鉄の放出の阻害を介して、血清鉄量を調整する役割をもつ、鉄代謝系において重要なホルモンである (Lee *et al.*, 2009)。 *Hepcidin* の発現には組織特異性があり、主に肝臓で高発現している (Park *et al.*, 2001; Pigeon *et al.*, 2001)。一方で、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 や Huh7、マウス肝癌由来細胞株である Hepa1-6 といった細胞株ではほとんど発現していないことが報告されている (Kanamori *et al.*, 2014; Sharp *et al.*, 2018)。また、健常なヒトの肝臓と比べて、肝癌患者においては肝臓での *Hepcidin* mRNA の発現レベルが低いことも報告されている (Kijima *et al.*, 2008)。 *Hepcidin* の発現は transforming growth factor- β (TGF- β)ファミリーに属する、bone morphogenetic protein(BMP)による転写制御を受ける。BMP 刺激による *Hepcidin* 転写活性経路は、BMP が I 型受容体と II 型受容体に結合して複合体を形成することで始まる。I 型受容体には ALK1~7 が同定されており、II 型受容体には T β R-II、BMPRII、ACTRIIA、ACTRIIB が知られている。I 型受容体と II 型受容体は細胞内にセリン・スレオニンキナーゼの領域を含んでおり、BMP がこれらの受容体に結合すると、II 型受容体が I 型受容体をリン酸化することにより I 型受容体セリン・スレオニンキナーゼを活性化させる。I 型受容体キナーゼの活性化は、receptor-regulated Smad(R-Smad)の 1 つである Smad1/5/8 の C 末端のセリンをリン酸化する。リン酸化した Smad1/5/8 は common Smad(Co-Smad)に分類される Smad4 と複合体を形成して核内に移行する。核内移行したリン酸化 Smad1/5/8 と Smad4 の複合体は遺伝子発現制御領域に存在する BMP-response element(BMP-RE)に結合し、標的遺伝子の転写を活性化する (図 2-1; Miyazono *et al.*, 2010; Massagué *et*

al., 2012)。BMP-RE はマウスの *Hepcidin* プロモーター領域内において、BMP-RE1(nt -155~ nt -150)と BMP-RE2(nt -1678 ~ nt -1673)の 2 つが同定されており、これら BMP-RE の変異導入は BMP 刺激、ならびに構成的に Smad1/5/8 をリン酸化する ALK3(QD)受容体の応答性を減弱する(Truksa *et al.*, 2007; Kanamori *et al.*, 2017)。Hepa1-6 や HepG2 では直接の転写活性を導くリン酸化 Smad1/5/8 が正常肝細胞と同程度に存在しているにもかかわらず、*Hepcidin* mRNA がほとんど発現していないことが報告されている(Kanamori *et al.*, 2014)。また、肝癌由来細胞株における応答配列の変異は確認されていない。このことは、転写因子の存在下にあっても、塩基配列の変異を伴わず転写を制御しうるエピジェネティックな制御が関連している可能性を示唆する。実際に、ヒト肝癌由来細胞株である Huh7 において、*Hepcidin* プロモーターの近位領域で DNA のメチル化頻度が高いことが報告されており(Sharp *et al.*, 2018)、ヒト *Hepcidin* mRNA の発現を抑制していることが考えられる。一方で HepG2 においては、*Hepcidin* mRNA 発現レベルが低いにも関わらず、近位領域において低いメチル化状態であることも報告されている(Sharp *et al.*, 2018)。

本章では、マウス *Hepcidin* の組織ならびに細胞種特異的な発現パターンについて、*Hepcidin* プロモーターの DNA メチル化に注目し、その関連を明らかにした。まず、*Hepcidin* 遺伝子の開始コドン を nt +1 として、上流の nt -2235 ~ nt -102 の範囲の 29 箇所の CpG について、マウス各組織ならびに Hepa1-6 細胞株の DNA メチル化状態を明らかにした。次に、既知のマウス *Hepcidin* プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製し、レポータージーンアッセイを実施することで、*Hepcidin* プロモーター領域のメチル化が *Hepcidin* 転写活性を抑制することを明らかにした。さらに本研究では特定の配列のみをメチル化する酵素、ならびに Smad1/5/8 を構成的にリン酸化する ALK3(QD)受容体の強制発現ベクターを用いて、メチル化によって *Hepcidin* 遺伝子発現に影響を与える重要な配列を特定した。

2 材料および方法

生体材料

6 週齢の健常 ICR マウス 4 匹(雄 2 匹、雌 2 匹)と 6 週齢の健常 C57/BL6 マウス 5 匹(雄 3 匹、雌 2 匹)と 8 週齢の健常 DDY マウス 3 匹(雄 3 匹)を日本エスエルシー株式会社より購入した。ICR マウスと C57/BL6 マウスの肝臓、白色脂肪、骨格筋より RNA を抽出し、DDY マウスの同組織より DNA を抽出した。また、本研究に供するための生体の管理及び実験は京都大学の動物管理委員会(27-43、27-72)に準拠した。

細胞

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2、マウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 は京都大学農学研究科の舟場正幸准教授に提供していただいた。

細胞培養

HepG2 の培養は第 1 章と同様の方法で行った。また、Hepa1-6 の培養も HepG2 と同様の方法で行った。

RNA の抽出及び逆転写による cDNA の作製

RNA の抽出ならびに qPCR のための短鎖 cDNA の作製は第 1 章と同様の方法で行った。また、過剰発現用プラスミドを作製するための長鎖 cDNA の作製は、抽出した total RNA から、SSIII SuperScriptTMIII First-strand Synthesis System for RT-PCR(Thermo Fisher Scientific)を用いて、添付のマニュアルに従って行った。

定量的 RT-qPCR 法

定量的 qPCR ならびに標準曲線法は第 1 章と同様の方法で行った。補正遺伝子として *Gapdh* 遺伝子の発現レベルに対する比の値を各遺伝子の相対的な発現レベルとした。使用したプライマー配列

は表 2-1 に示す。

DNA 抽出

各組織、ならびに細胞からの DNA 抽出は第 1 章と同様の方法で行った。

バイサルファイトシーケンス

バイサルファイトシーケンスは第 1 章と同様の方法で行った。使用したプライマー配列は表 2-1 に示す。

CpG-free レポーターコンストラクトの作製

マウス *Hepcidin* プロモーター領域の転写活性を調べるために、レポーターコンストラクトを作製した。レポーターコンストラクトには、第 1 章と同様にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を含み、CpG 配列を含まない pCpGL を用いた。マウス *Hepcidin* プロモーター領域(full; nt-2018 ~ nt-35, middle del; nt-2018 ~ nt-35 であり nt -1474 ~ nt -685 を欠失させたもの, distal; nt-2018 ~ nt -1448, middle; nt -1380 ~ nt -740, proximal; nt -565 ~ nt -35)の DNA 配列を PCR により増幅し、pCpGL のルシフェラーゼ遺伝子配列の上流に組み込むようにライゲーション反応を行った。なお、開始コドンをも +1 とした。また、重要な CpG 配列を特定するために、変異導入も行った。変異導入は変異を含むプライマーを用いた PCR によって行った。ライゲーション反応以降のクローニング並びにプラスミド抽出の操作は第 1 章と同様の方法で行った。

レポーターコンストラクトのメチル化

CpG メチル化による転写活性への影響を調べるために、レポーターコンストラクトのメチル化処理を行った。SssI Methyltransferase(New England BioLabs Japan)を用いて全 CpG をメチル化した。メチル化反応は第 1 章と同様の方法で行った。さらに、特定の CpG のメチル化の影響を調べるために 5'-GCGC-3'配列の中央の CpG のみをメチル化する HhaI

Methyltransferase(New England BioLabs Japan)を用いてメチル化処理を行った。HhaI Methyltransferase によるメチル化反応は、37℃12 時間のメチル化処理と、65℃40 分間の不活化処理を行った。メチル化処理の確認は、バイサルファイト処理後、ダイレクトシーケンスを行って確認した(補足図 2-1,2-2)。

構成的活性型 ALK3(QD)受容体の過剰発現のためのプラスミドは pcDNA3 に ALK3(QD)の CDS 領域を組み込んだものを使用した。

レポーターアッセイ

HepG2 のレポーターアッセイは *Hepcidin* プロモーター領域を含むレポーターコンストラクト(*Hepcidin-luc*)と CMV-Renilla-luc を用いて第 1 章と同様の方法で行った。また、ALK3(QD)を共発現させる場合は、*Hepcidin-luc* と CMV-Renilla-luc に加えて ALK3(QD)を組み込んだ pcDNA3 あるいは何も組み込んでいない pcDNA3 を *Hepcidin-luc* と同量トランスフェクションした。なお、HepG2 へのトランスフェクション後のレポーターコンストラクトの DNA メチル化状態に変化がないことは、トランスフェクション後の細胞よりレポーターコンストラクトを抽出し、バイサルファイト処理後、ダイレクトシーケンスによって確認した(補足図 2-3)。

統計分析

データは平均値±標準誤差により示した。組織間の遺伝子発現量またはメチル化レベルの違いは Tukey 法によって検定した。危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。

3 結果

マウス肝臓における *Hepcidin* の高発現とプロモーター領域における低メチル化

マウス *Hepcidin* プロモーター領域の DNA メチル化による基礎転写活性への影響

マウス *Hepcidin* プロモーター領域における BMP-RE の DNA メチル化による ALK3 応答性への影響

4 考察

Hepcidin の転写制御に関する研究はこれまでも盛んに行われており、肝臓に限局した発現があることも広く知られていることから、*Hepcidin* も第 1 章で注目した *Ucp1* と同様に典型的な組織特異性的発現のある遺伝子といえる。本章においてもマウスの組織ごとの *Hepcidin* mRNA 発現レベルを確認したところ、既報(Park *et al.*, 2001; Pigeon *et al.*, 2001)と同様に肝臓でのみ高い発現を確認することができた。

5 図表

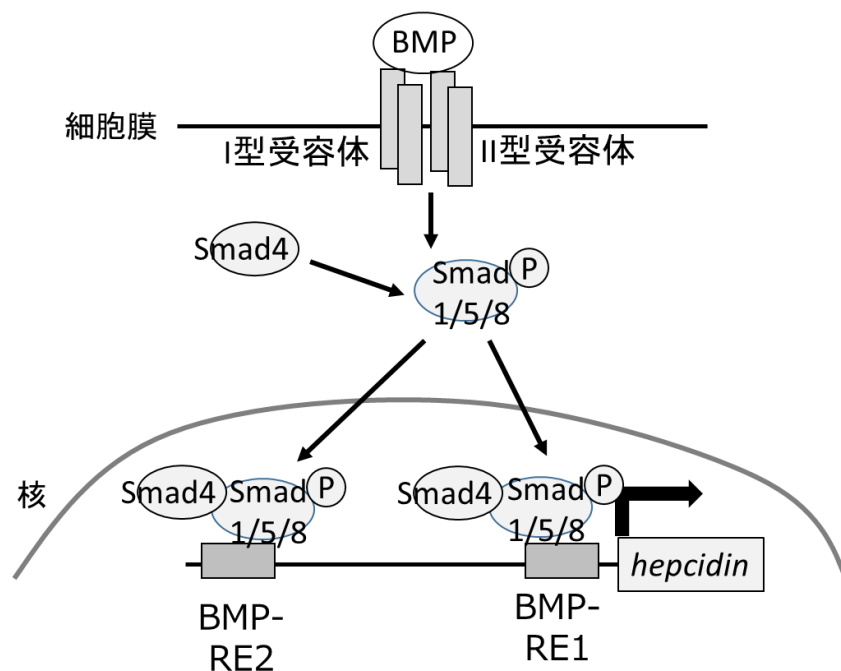


図 2-1 BMP シグナル伝達経路を介した *Hepcidin* 転写活性化の概要
 BMP が細胞膜に存在する I 型受容体と II 型受容体に結合する。I 型受容体には ALK1~7 が含まれ、II 型受容体には $T\beta R-II$ 、BMPRII、ActRIIA、ActRIIB が含まれる。BMP の結合により活性化した II 型受容体は I 型受容体をリン酸化し、I 型受容体セリン・スレオニンキナーゼを活性化する。I 型受容体キナーゼは Smad1/5/8 をリン酸化し、リン酸化 Smad1/5/8 は Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、*Hepcidin* 転写を活性化する。

図 2-2 マウス各組織ならびに細胞株における *Hepcidin* の発現量

図 2-3 マウスにおける *Hepcidin* 上流領域の CpG 位置の模式図(A)
および、DNA メチル化の程度(B)

図 2-4 SssI methyltransferase 処理による基礎転写活性への影響

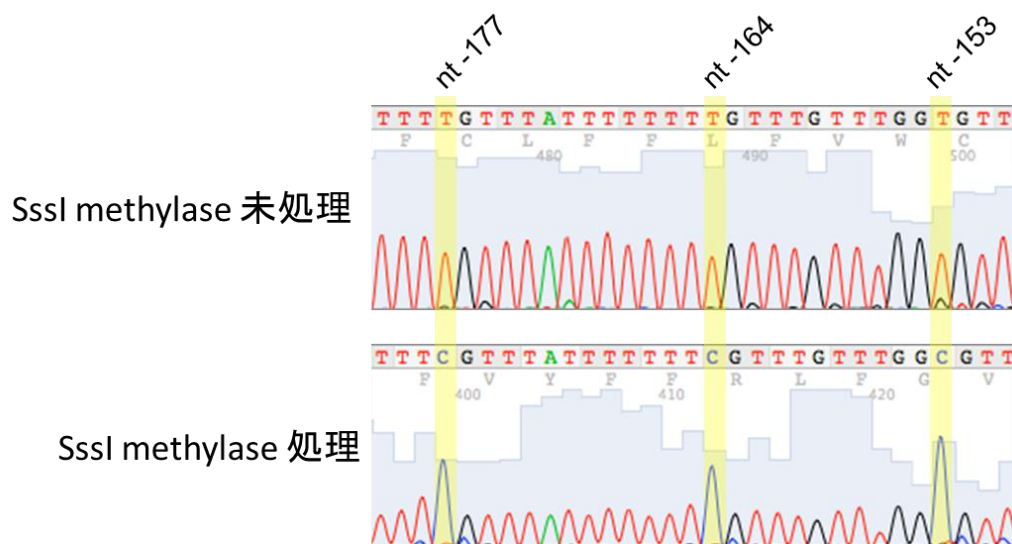
図 2-5 HhaI methyltransferase 処理による基礎転写活性への影響

図 2-6 HhaI methyltransferase 処理による BMP 経路への影響

表 2-1 使用したプライマー

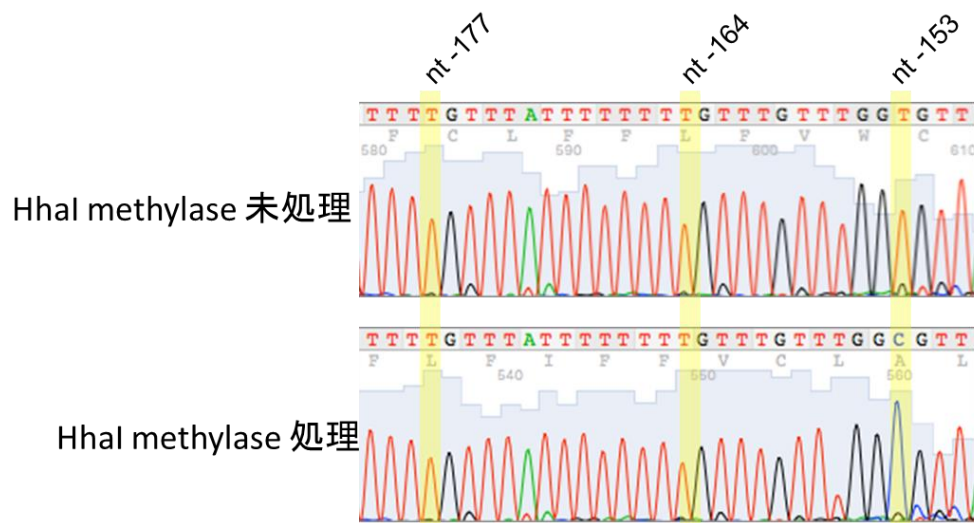
Gene or target region	5'-primer	3'-primer
RT-qPCR 用プライマー		
mouse <i>Hepcidin</i>	5'-tgctctctgctcctcctcct-3'	5'-gcagaaaatgcagatggggaagt-3'
mosue <i>Gapdh</i>	5'-cgtgttctacccccaatgt-3'	5'-tgtcatcatacttggcagggttct-3'
バイサルファイトシーケンス用プライマー		
mosue <i>Hepcidin</i> nt -2259 to nt-1963	5'-gggaaggaggaggttttgggga-3'	5'-cctaaaaaccctacccaaccccat-3'
mosue <i>Hepcidin</i> nt -1722 to nt -1431	5'-aagagagggtagatggttagaaag-3'	5'-actaataaaccatctctccaac-3'
mosue <i>Hepcidin</i> nt -1372 to nt -1025	5'-ggttttataaatttttgaatggg-3'	5'-tatataatactctttctattacctaaac-3'
mosue <i>Hepcidin</i> nt -871 to nt -540	5'-gttaagtgttatataatattgtg-3'	5'-atcatattaaattccccttctacctc-3'
mosue <i>Hepcidin</i> nt -565 to nt -1	5'-gaggtagaaggggaatttaatatgat-3'	5'-cataccttctattctactataacaatc-3'
コロニーチェック用プライマー		
pCpGL	第 1 章と同一	第 1 章と同一

6 補足



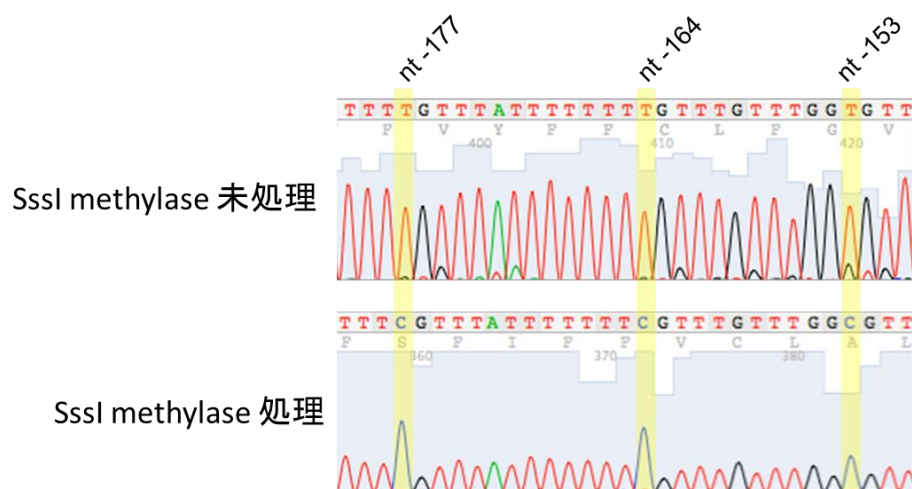
補足図 2-1 SssI methyltransferase 処理の有無によるメチル化状態の確認(代表例)

マウス *Hepcidin* プロモーター領域を含む pCpGL レポーターを SssI methyltransferase 処理した後、バイサルファイト処理し、ダイレクトシーケンスによって対象のシトシンがメチル化されていることを確認した。



補足図 2-2 HhaI methyltransferase 処理の有無によるメチル化状態の比較(代表例)

マウス *Hepcidin* プロモーター領域を含む pCpGL レポーターを HhaI methyltransferase 処理した後、バイサルファイト処理し、ダイレクトシーケンスによって対象のシトシンのみがメチル化されていることを確認した。図中では、nt -153 のみが HhaI の対象となるシトシンである。



補足図 2-3 トランスフェクション後のコンストラクトのメチル化状態
(代表例)

HepG2 にトランスフェクション後、pCpGL レポーターを抽出し、バイサルファイト処理したのち、ダイレクトシーケンスによってトランスフェクション後もメチル化状態に変化がないことを確認した。

総括

DNA メチル化はエピジェネティクス分野に含まれ、後天的な遺伝情報の修飾を介して遺伝子発現調節に重要な役割を持つメカニズムである。DNA メチル化は CpG 配列のうちシトシン塩基にメチル基が付加される化学修飾である。プロモーターやエンハンサー領域の DNA メチル化は一般的にその遺伝子発現を抑制する。その性質上、DNA メチル化を含むエピジェネティクスは、遺伝子発現を直接制御する転写因子の有無、活性や塩基配列そのものの違いだけでは説明できない遺伝子発現、表現型の差異についても説明しうる。したがって、DNA メチル化の状態は時期特異的、組織特異的なパターンが認められ、組織ごとの遺伝子発現に強く関連していることも多い。本研究では、DNA メチル化との関連がまだ明らかにされていない組織特異的な遺伝子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 メチル化との関連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、特に特徴的な組織特異的遺伝子発現を示したコイ *Ucp1* 遺伝子とマウス *Hepcidin* 遺伝子を対象に、DNA メチル化と遺伝子発現への関与の解明を試みた。

第 1 章ではコイ *Ucp1* 遺伝子発現制御と DNA メチル化の関連について検討した。コイ *Ucp1* の mRNA 発現レベルとその推定プロモーター領域のメチル化状態の比較から、マウスと同様に高発現組織(コイにおいては肝臓)における低メチル化状態が形成されていることが分かった。しかし一方で、メチル化した推定プロモーター領域を用いたレポーターアッセイ法により、マウスとは異なり、*Ucp1* 推定プロモーター領域のメチル化が *Ucp1* 転写を直接抑制しないことを明らかにした。さらに、変異導入した *Ucp1* 推定プロモーター領域を用いたレポーターアッセイ法により、転写開始点より上流の nt -108 におけるシトシンを含む領域を、コイ *Ucp1* 遺伝子発現における新たな転写制御サイトの候補として見出すことができた。

魚類における UCP1 は哺乳類のような熱産生機能としての意義は明らかにされていないものの、哺乳類と同様に脂肪酸応答性にプロトンの脱共役を促進することが報告されていることから、哺乳類と同様にエネルギー代謝・脂質代謝としての機能的意義を持つことが考えられる。このことから、魚類 *Ucp1* 制御機構の解明は変温動物における熱

産生についてのみならず、魚類の養殖分野において哺乳類と同様に生産性や増体コントロールなどにも期待できると考えられ、本成果はその基礎的知見となりうる。

第 2 章は *Hepcidin* 遺伝子発現と DNA メチル化の影響について検討した。バイサルファイト法により、マウスにおいて *Hepcidin* 高発現組織である肝臓において、*Hepcidin* のプロモーター領域では特異的な低メチル化状態が形成されていることを明らかにした。そして、これらのメチル化が *Hepcidin* 転写活性を抑制することを、レポーターアッセイ法によって示した。さらにプロモーター領域の DNA メチル化による *Hepcidin* 転写活性の抑制には、特に Smad1/5/8 の結合配列である BMP-RE におけるメチル化が重要な要因であることを明らかにした。また、マウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 細胞ではマウス正常肝臓と異なり、*Hepcidin* プロモーター領域が高度にメチル化されていることも明らかにした。本研究成果は *Hepcidin* 遺伝子発現における DNA メチル化の関与を明らかにしたのみならず、肝癌における癌化の進行と鉄代謝の関連研究の発展にも寄与することが期待できる。

第 1 章および第 2 章の二つの遺伝子におけるメチル化解析の結果を通して、本研究は、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な発現を示す複数の遺伝子について、本研究のテーマである、DNA メチル化による遺伝子発現制御の関与を明らかにしたものであり、DNA メチル化を中心としたエピジェネティクス分野の研究発展において基礎的知見となり得るものと考えられる。

引用論文

Andrew J. Sharp, Elisavet Stathaki, Eugenia Migliavacca, Manisha Brahmachary, Stephen B. Montgomery, Yann Dupre, and Stylianos E. Antonarakis, DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Research* 21: 1592-1600, 2011.

Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1244-E1253, 2010.

Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Transcriptional addiction in cancer. *Cell* 168: 629-643, 2017.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004.

Christian M, Kiskins E, Debevec D, Leonardsson G, White R, Parker MG. RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* 25: 9383-9391, 2005.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-93, 2005.

Jastroch M, Wuertz S, Kloas W, Klingenspor M. Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics* 22: 150-156, 2005.

Jeltsch A, Jurkowska RZ. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res* 44: 8556-8575, 2016.

Kajimura S, Saito M. A new era in brown adipose tissue biology:

molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu Rev Physiol* 76: 225-249, 2014.

Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. Hepcidin expression in liver cells: evaluation of mRNA levels and transcriptional regulation. *Gene* 546(1): 50-55, 2014.

Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. The regulation of Hepcidin expression by serum treatment: Requirements of the BMP response element and STAT- and AP-1-binding sites. *Gene* 551(2): 119-126, 2014.

Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. Identification of novel bone morphogenetic protein-responsive elements in a Hepcidin promoter. *FEBS Letters* 591(23): 3895-3905, 2017.

Kato j, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa G, Takada K, Takimoto R, Sato Y, Fujikawa K, Takahashi M, Takayama T, Ikeda T, Niitsu Y. Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 61: 8697–8702, 2001.

Kijima H, Sawada T, Tomosugi N, Kubota K. Expression of Hepcidin mRNA is uniformly suppressed in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer* 8: 167, 2008.

Kiskins E, Hallberg M, Christian M, Olofsson M, Dilworth SM, White R, Parker MG. RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J* 26: 4831-4840, 2007.

Klug M, Rehli M. Functional analysis of promoter CpG methylation using a CpG-free luciferase reporter vector. *Epigenetics* 1: 127-130, 2006.

Kozak UC, Kopecky J, Teisinger J, Enerbäck S, Boyer B, Kozak LP.

An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol Cell Biol* 14: 59-67, 1994.

Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, So PW, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, White R, Parker MG. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8437-8442, 2004.

Lee PL, Beutler E. Regulation of Hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol* 4: 489-515, 2009.

Lei H, Suk P. Oh, Okano M, Ruth Jüttermann, Kendrick A. Goss, Rudolf Jaenisch and En Li, Denovo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122: 3195-3205, 1996.

Maier H, Colbert J, Fitzsimmons D, Clark DR, Hagman J. Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. *Mol Cell Biol* 23: 1946-1960, 2003.

Martina P, Anne C, Ferguson-Smith. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *Journal of Pathology* 195: 97-110, 2001.

Massagué J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:616-630, 2012.

Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 2010 147:35-51.

Murakami M, Ohi M, Ishikawa S, Shirai M, Horiguchi H, Nishino Y, Funaba M. Adaptive expression of uncoupling protein 1 in the carp liver and kidney in response to changes in ambient temperature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 185: 142-149, 2015.

Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T,

Kikuchi H, Yoshida H, Tanaka A, Suyama M, Arima T, Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *Pros genet* 10: e1004868, 2014.

Park CH, Valore EV, Warning AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *JBiol Chem* 276 7806-10, 2001.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811-9, 2001.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998.

Puri V, Chakladar A, Virbasius JV, Konda S, Powelka AM, Chouinard M, Hagan GN, Perugini R, Czech MP. RNAi-based gene silencing in primary mouse and human adipose tissues. *J Lipid Res* 48: 465-471, 2007.

Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 1839: 1362-1372, 2014.

Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517: 321-326, 2015.

Shang X, Su J, Wan Q, Su J. CpA/CpG methylation of CiMDA5 possesses tight association with the resistance against GCRV and negatively regulates mRNA expression in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Dev Comp Immunol* 48: 86-94, 2015.

Shang X, Wan Q, Su J, Su J. DNA methylation of CiRIG-I gene notably relates to the resistance against GCRV and negatively-regulates

mRNA expression in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Immunobiology 221: 23-30, 2016.

Shang X, Su J, Wan Q, Su J, Feng X. CpG methylation in the 5'-flanking region of LGP2 gene lacks association with resistance/susceptibility to GCRV but contributes to the differential expression between muscle and spleen tissues in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Fish Shellfish Immunol 40: 154-163, 2014.

Sharp PA, Clarkson R, Hussain A, Weeks RJ, Morison IM. DNA methylation of hepatic iron sensing genes and the regulation of Hepcidin expression. PLoS ONE 13(5): e0197863, 2018.

Shore A, Karamitri P, Kemp J, Speakman R, Lomax MA. Role of Ucp1 enhancer methylation and chromatin remodelling in the control of Ucp1 expression in murine adipose tissue. Diabetologia 53: 1164-1173, 2010.

Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. Biochim Biophys Acta 1413: 50-54, 1999.

Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. Dev Cell 1: 749-758, 2001.

Tremblay K, Duran K, Bartolomei M. A 5' 2 kb region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. Mol Cell Biol 17: 4322-4329, 1997

Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. Different regulatory elements are required for response of Hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. Br J Haematol 139: 138-47, 2007.

Van der Wijst MG, Venkiteswaran M, Chen H, Xu GL, Plösch T, Rots

MG. Local chromatin microenvironment determines DNMT activity: from DNA methyltransferase to DNA demethylase or DNA dehydroxymethylase. *Epigenetics* 10: 671-676, 2015.

Xiong L, He L, Luo L, Li Y, Liao L, Huang R, Zhu Z, Wang Y. Global and complement gene-specific DNA methylation in grass carp after grass carp reovirus (GCRV) infection. *Int J Mol Sci* 19: E1110, 2018.

Ziller MJ, Gu H, Müller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, De Jager PL, Rosen ED, Bennett DA, Bernstein BE, Gnirke A, Meissner A. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500: 477-481, 2013.

General overview

In recent years, it has been reported that acquired genetic modifications, called epigenetics, play an important role in the regulation of gene transcription. The molecular mechanisms of epigenetics include DNA methylation and modification of histone proteins. DNA methylation is the main type of epigenetic modification in the mammalian genome, with the transfer of a methyl group onto the C5 position of cytosine in a CpG dinucleotide to form 5-methylcytosine. When the promoter of a gene is methylated, transcription is generally suppressed. DNA methylation regulates gene expression by inhibiting the binding of transcription factor(s) to DNA (enhancers and promoter regions) or by recruiting proteins involved in gene repression. Unique DNA methylation patterns are involved in the development and differentiation of cells and regulate tissue-specific gene transcription. There are also other epigenetic mechanisms such as histone modifications (chromatin remodeling) and noncoding RNAs.

In this study, we investigated the role of DNA methylation on tissue-specific gene expression of the carp uncoupling protein 1 (*Ucp1*) gene and mouse *Hepcidin* gene.

Chapter 1 shows the relationship between carp tissue-specific *Ucp1* gene expression and DNA methylation of its promoter region, and Chapter 2 shows the relationship between the expression of the mouse *Hepcidin* gene and DNA methylation of its promoter region.

Chapter 1

First, we examined the level of *Ucp1* mRNA expression by using RT-qPCR in different tissues from carp: liver, kidney, brain, skeletal muscle, and scales. *Ucp1* was expressed at the highest level in the liver among the tissues tested. *Ucp1* was expressed at a higher level in the kidney and brain than in skeletal muscle and scales, as reported previously. Next, to evaluate the role of cytosine methylation in carp *Ucp1* expression, we examined the methylation status of each CpG of the distal (7 CpGs in nucleotide [nt] -2562 to nt -2102) and proximal (5 CpGs in nt -215 to nt -12) regions located upstream of the carp *Ucp1* gene using bisulfite sequencing. DNA methylation of nt -2178, nt -2173, and nt -2103 was lower in the liver and kidney than in the brain, skeletal muscle, and scales. DNA methylation of all CpGs of the proximal region was lower in

the liver than in other tissues. These results suggest that hypomethylation of the upstream region of the *Ucp1* gene in the liver leads to its high expression in this tissue, and hypermethylation of this region in skeletal muscle and scales leads to the low expression of the *Ucp1* gene in these tissues.

Previous studies showed that RIP140 protein negatively regulates mammalian *Ucp1* gene expression through DNA methylation of its enhancer and promoter regions by the DNA methyltransferase DNMT1. To explore the involvement of RIP140/Dnmt1 in carp *Ucp1* expression, we examined the levels of RIP140 and Dnmt1 expression. RIP140 was expressed at a higher level in the brain and skeletal muscle than in the kidney, liver, and scales. A similar expression pattern was detected for carp Dnmt1. In mouse adipocytes, RIP140 has been shown to increase DNA methylation of the *Ucp1* enhancer and promoter by binding to Dnmt1, leading to transcriptional repression. Similar mechanisms may be applicable to carp *Ucp1* in the liver and skeletal muscle.

We hypothesized that the high expression of carp *Ucp1* in the liver was associated with hypomethylation in its upstream region in this tissue. To investigate the effects of CpG methylation of the carp *Ucp1* upstream region, we performed a transcriptional activation assay using zebrafish liver-derived cells (ZF-L) transfected with a CpG-free luciferase-based reporter (pCpGL) containing the estimated promoter region of carp *Ucp1* treated with methylase. As a result, methylation of the distal and proximal regions of the carp *Ucp1* gene did not affect *Ucp1* transcription. The present results reveal that the DNA methylation status of the upstream region of the carp *Ucp1* gene is different among different tissues, but suggest that DNA methylation does not directly repress *Ucp1* transcription. Considering that the reporter assay used cannot evaluate the modulation of chromatin-remodeling resulting from DNA methylation, the lower expression of *Ucp1* related to hypermethylation in skeletal muscle and scales may be achieved through chromatin remodeling.

In addition, unexpectedly, mutation of cytidylic acid to guanylic acid at nt -108 in the upstream region of *Ucp1* decreased *Ucp1* promoter activity. We are searching for putative transcription factors binding to the upstream region ranging from nt -125 to nt -96.

Chapter 2

First, we examined the level of *Hepcidin* gene expression in several mouse

tissues and a murine liver cancer-derived cell line (Hepa1-6) using RT-qPCR. *Hepcidin* expression is known to be tissue-restricted, mainly to the liver. Then, we explored the DNA methylation status of the murine *Hepcidin* promoter in the liver, adipose tissue, skeletal muscle, and Hepa1-6 cells. DNA methylation of nt -1608 to nt -1454 and nt -678 to nt -102 in the *Hepcidin* promoter was lower in the liver than in the other tissues and Hepa1-6 cells. Therefore, we hypothesized that hypomethylation of these regions in the liver leads to the high expression of *Hepcidin* in the mouse. To evaluate the effect of DNA methylation of these regions in murine *Hepcidin* expression, we examined transcriptional activity using HepG2 cells transfected with pCpGL containing the murine *Hepcidin* promoter region treated with methylase. The luciferase-based reporter assays revealed that methylation of the distal (nt -2018 to nt -1448) or proximal (nt -565 to nt -35) region of the murine *Hepcidin* promoter inhibited *Hepcidin* transcription. *Hepcidin* expression is known to be increased through the BMP-response element (BMP-RE: 5'-GGCGCC-3'), which is located in the distal (BMP-RE2) and proximal (BMP-RE1) regions of the *Hepcidin* promoter. Further, we performed a luciferase-based reporter assay using pCpGL containing the murine *Hepcidin* promoter region treated with *Hha*I methylase, which methylates a particular sequence (5'-GCGC-3'). As a result, we found that BMP-RE1 or BMP-RE2 methylation significantly reduced the basal transcription of *Hepcidin*. BMP stimulation increases *Hepcidin* expression via the activation of the ALK3 receptor; thus, we carried out a reporter assay using HepG2 cells overexpressing constitutively activated ALK3(QD). DNA methylation of BMP-RE1 or BMP-RE2 did not enhance *Hepcidin* transcription through the activation of the BMP signaling pathway by overexpression of ALK3(QD).

Taken together, the association between the patterns of DNA methylation and gene expression varies among animal species and cell types. Chapter 1 showed that the DNA methylation patterns at the regulatory regions of the carp *Ucp1* gene were similar to those of the mouse gene, whereas the expression of the carp *Ucp1* gene was different from that of the mouse gene. In chapter 2, we revealed the details of the direct effects of DNA methylation on the gene expression of murine *Hepcidin*.

謝辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学生理学第二研究室、折戸謙介教授、麻布大学基礎生物学的研究室、佐原弘益教授、京都大学大学院動物栄養科学研究室、舟場正幸准教授ならびに麻布大学分子生物学的研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院動物栄養科学研究室、舟場正幸准教授ならびに麻布大学分子生物学的研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり多大なるご指導とご協力を頂いた麻布大学分子生物学的研究室内の皆様に厚く御礼を申し上げます。