

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成27年4月23日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学大学院理工学府
職 名 准教授
研究代表者 井上 裕介

下記のとおり平成26年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 14008)

1. 共同研究課題名	エピゲノム解析による HNF4 α を介した代謝制御機構の解明			
2. 共同研究目的	HNF4 α 欠損マウスの肝臓における DNA メチル化解析を行う。			
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 井上 裕介	群馬大学大学院理工学府	准教授	研究総括、研究全般	
(分担研究者) 葉原 正靖	群馬大学大学院理工学府	准教授	人工核酸の合成	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	ゲノム科学リソース分野	氏 名	畑田出穂

6. 共同研究計画

Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α)は肝臓で高発現する核内受容体であり、肝臓の転写制御ネットワークの最上流に位置するマスター様因子である。申請者は、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウス(KO マウス)が血糖値低下や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)などの多くの代謝疾患を示すことを明らかにしてきた。HNF4 α はプロモーター上の結合部位を介して多くの肝臓特異的遺伝子の発現を正に制御しており、実際に HNF4 α 標的遺伝子が KO マウスで発現減少することにより、いくつかの表現型が発症することも明らかにしてきた。しかし、HNF4 α が直接的に標的遺伝子を制御する機構では説明できない遺伝子の発現変化も多くあり、その多くは未解明のままである。以上より、HNF4 α を起点とする肝臓の遺伝子発現ネットワークは非常に複雑であることが予想される。このため、HNF4 α ネットワークの全容解明には KO マウスにおけるエピゲノム解析が必要不可欠であるが、未だ、KO マウスを用いたエピゲノム解析は行われていない。

そこで本研究では、KO マウスで発現が減少するグルカゴン受容体について、エピゲノム解析とプロモーター解析により、新規な HNF4 α ネットワークを同定し、KO マウスでの代謝疾患の発症機構を解明することを目的として、以下の研究を行うことにした。

1. KO マウスで発現変動する遺伝子についての DNA メチル化解析

KO マウス肝臓で発現変動が認められる遺伝子について、バイサルファイトシーケンス法により DNA メチル化を解析する。また、DNA メチル化の変動が見られた遺伝子については、脱メチル化剤による遺伝子発現の変動を検証する。

2. グルカゴン受容体(GCGR)のプロモーター解析

KO マウス肝臓で顕著に発現が減少するマウス GCGR 遺伝子のプロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼアッセイにより、最小プロモーター領域の同定と HNF4 α 依存的な転写活性部位の有無を解析する。また、この細胞株を用いたプロモーター解析の結果が、実際の肝臓においても同様な結果が得られるのかどうかを *in vivo* プロモーターアッセイにより検証する。

7. 共同研究の成果

KO マウス肝臓で顕著に発現変動する遺伝子について、*in silico* でプロモーター領域の CpG アイランドの存在頻度をスクリーニングしたところ、GCGR 遺伝子の転写開始点近傍に高頻度に CpG 部位が存在することが分かった。このため、KO マウスおよびコントロールマウスの肝臓からゲノム DNA を抽出後、バイサルファイトシーケンスを行った。その結果、コントロールマウスと比較して、KO マウス肝臓において GCGR 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が認められた。

さらに、ヒトおよびマウスの肝臓由来細胞株を 5-aza-dC で処理してゲノム DNA の脱メチル化を促進させた。その結果、5-aza-dC 未処理の細胞株では GCGR の発現は非常に低レベルであったが、5-aza-dC 処理した場合には、どちらの細胞株においても GCGR の発現が有意に増加することが明らかになった。以上の結果より、脱分化した肝臓細胞株においては GCGR の発現はプロモーター領域のメチル化により抑制されていることが示唆された。

次に、GCGR の最小プロモーター領域の同定のために、ヒト肝臓細胞株を用いてホタルルシフェラーゼアッセイを用いてプロモーター解析を行った。その結果、プロモーター活性が低レベルであったため、高感度ガウシアルルシフェラーゼとエピソーマルベクターを用いて実験系を改良した。その結果、十分なプロモーター活性が検出可能になり、転写開始点から上流の約 100 塩基に転写活性化領域が認められ、この領域の中には多くの CpG 部位が認められた。しかし、この転写活性化は HNF4 α に非依存性であった。次に、実際の肝臓においても上記の GCGR プロモーターが転写活性化能をもつのかどうかを検証した。ハイドロダイナミック法により約 100 塩基の GCGR プロモーター/ルシフェラーゼレポータープラスミドをマウスに導入し、肝臓のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、約 100 塩基のプロモーター領域はマウス肝臓内においても十分なプロモーター活性をもつことが明らかになった。さらに、プロモーターの上流には HNF4 α 依存的な転写活性化領域も同定されたため、GCGR の発現には CpG 部位を介した最少プロモーター領域と HNF4 α 依存的なエンハンサー領域が重要であることが示唆された。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

該当なし