

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 29 年 4 月 27 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28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 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 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

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

肝臓の遺伝子発現制御ネットワークは、主に数種類の転写因子(liver-enriched transcription factors)によって複雑に制御されており、最も重要な因子が核内受容体 HNF4 α である。我々は、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウス(KO マウス)が多くの代謝疾患を引き起こすこと、そしてその原因となる HNF4 α の標的遺伝子を数多く同定してきた。しかしながら、KO マウスの血糖値低下や NASH などの多くの表現型の発症機構は未解明であり、HNF4 α を起点とする転写制御カスケードの全容解明には至っていない。

KO マウスの血糖値低下はグルカゴン受容体(GCGR)の顕著な発現低下が原因であることまでは分かっているが、HNF4 α が直接的に GCGR を制御しているかどうかは明確ではなかった。昨年度までのヒト肝癌細胞株を用いた解析により、GCGR の mRNA 発現は HNF4 α の過剰発現と DNA 脱メチル化剤により誘導されることが明らかになった。さらに、GCGR のプロモーター活性は HNF4 α により誘導されることも分かった。またこのプロモーター領域にはバイサルファイトシーケンスによる DNA メチル化解析で変化が認められた領域があったが、変化が小さいため、遺伝子発現に影響を及ぼすには十分ではないことも示唆された。従って、GCGR の発現はプロモーター領域の HNF4 α 結合配列と DNA メチル化により転写レベルで制御されていることが示唆される。

そこで、本研究では、GCGR 遺伝子の発現制御解析により、KO マウスでの低血糖発症機構の解明を目指して、以下の解析を行った。

1. GCGR のプロモーター解析

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、HNF4 α 依存的な GCGR の転写活性化機構を解析する。

2. GCGR のプロモーター中の HNF4 α 結合配列の同定

ゲルシフトアッセイと ChIP アッセイにより、GCGR のプロモーター中の HNF4 α 結合領域を同定する。

7. 共同研究の成果

マウス GCGR 遺伝子の発現制御機構の解明のために以下の解析を行った。

マウス GCGR 遺伝子の遠位プロモーター領域約 2kb をクローニングし、NanoLuc ベクターに組み込み、HepG2 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、遠位プロモーターの転写開始点から-636 までの領域では HNF4 α による転写活性が認められなかったが、-636 より上流では複数の領域が HNF4 α 依存的に転写活性化されることが認められた。一方、近位プロモーターについても同様にルシフェラーゼアッセイを行ったが、HNF4 α による転写活性が認められなかった。このため、以降では遠位プロモーター領域についての解析を行った。

そこで、転写因子結合データベースにより、-636 から-1984 までの遠位プロモーター中の HNF4 α 結合を検索したところ、多くの HNF4 α 結合部位が予測された。そこで、プロモーターアッセイのデータに基づき、7 種類の HNF4 α 結合予測部位の競合プローブを作成して、既知の HNF4 α 結合配列に対して結合を阻害するかどうかをゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、3 種類の競合プローブに HNF4 α が結合することが判明したが、いずれも既知の HNF4 α 結合配列よりも結合能が弱いことが分かった。このため、GCGR の遠位プロモーターには複数の HNF4 α 結合部位があり、これらの結合部位が協同的に相互作用して GCGR が転写活性化することが示唆された。

このため、これら 3 種類の HNF4 α 結合部位に変異を導入してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、遠位プロモーターの-487~-502 領域の変異体が HNF4 α による転写活性化を約 40%抑制するが、他の 2 種類の変異体では転写抑制は認められなかった。このため、ChIP アッセイにより、-487/-502 領域と HNF4 α の結合能を解析したところ、正常マウス肝臓においては-487/-502 領域への HNF4 α の結合が確認できたが、KO マウス肝臓ではこの結合能が 45%低下していることが明らかになった。しかし、転写活性化能はまだ残存していたため、未同定の HNF4 α 結合部位が GCGR の転写活性化に関与すると推測される。

さらに、GCGR の遠位プロモーターの転写開始点近傍には CpG アイランドが存在するため、バイサルファイトシーケンスにより、KO マウスと正常マウスにおける DNA メチル化解析を再度行った。しかし、この領域内での KO マウスと正常マウス間でのメチル化の差は認められなかった。

以上の結果より、肝臓の GCGR 遺伝子は転写開始点近傍以外の DNA のメチル化、遠位プロモーターの-487/-502 領域への HNF4 α の直接的な結合により転写活性化することが明らかになった。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

吉田 稜、松田 強志、神成 真名、Frank J. Gonzalez、井上 裕介「肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの血糖値低下機構の解析」第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 29 日 パシフィコ横浜