

研究題目 一酸化窒素によるゲノム DNA CpG メチル化調節と遺伝子発現への影響

研究組織

研究代表者：上原 孝（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

共同研究者：片桐豊雅（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

生体内ガス状分子の一つとして知られている一酸化窒素（NO）はアルギニンを基質としてNO合成酵素を介して産生される。生理的条件下では、一過性に適量産生され、神経伝達や血圧調節などに深く関与している。一方、炎症時や神経変性疾患などでは、持続的かつ多量のNOが産生され、病態形成を招くことも報告されている。これまで、私たちはNOの生体内標的の同定を検討してきた。その候補因子として数種のエピゲノム調節酵素の単離に成功した。そこで、これらの刺激（ストレス）による遺伝子発現への影響を調べたところ、発現レベルが上昇あるいは下降するものがそれぞれ存在することがわかった。そこで、今回はNO刺激によって発現レベルが変化する遺伝子の同定とゲノムレベルにおけるDNAメチル化/脱メチル化状態を調べることを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

ヒト胃がんモデル細胞をはじめとする各種株化がん細胞にNOドナーを作用させ、トータルRNAおよびゲノムDNAを回収した。トータルRNAからmRNAを精製し、RNA-seq解析に供した。一方、DNAは約200bpに断片化し、このサンプルにアダプターをライゲーションした。その後、バイサルファイト変換を行い、ライブラリー作成用のプライマーを用いてPCRを行った。精製後、次世代シーケンサーで解析した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本研究を開始する以前は、ストレス負荷によって脱メチル化される部位が検出されると推定していた。しかしながら、数回に渡って試行した限り、明確な部位は特定することができな

かった。そこで、改めて、ストレスの強度を上げてみたが、それによって細胞生存率が低下することがわかり、より詳細な条件検討が必要であることがわかった。そこで、今年度はまず最適な細胞の選定とストレス強度に関して予備検討を種々行なった。その結果、NO濃度と処理時間が定まり、サンプル調製後に解析に供した。興味深いことに、細胞種間ではハウスキーピング様の遺伝子の発現はほとんど変化せず、臓器特異的な遺伝子に変化が観察された。さらには、中心的に進めているHeLa細胞においては、再現性を得るために、n=3で試行して、現在詳細な解析を行っているところである。加えて、同条件で刺激した細胞からゲノムDNAを調製し、ターゲットバイサルファイトシーケンスに供し、メチル化・脱メチル化状態を検討しており、現在、データ解析を依頼しているところである。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまで、ゲノムDNAメチル化変化を解析してきたが、ゲノムワイドに変化する部位の特定には至らなかった。詳細な条件検討が必要であることが示唆されたことから、まずは、発現レベルが変化する遺伝子を探索することを目指した。その結果、HeLa細胞にNO処理することで、およそ1200種の遺伝子発現レベルが上昇することがわかった。現在、この遺伝子上流を重要ターゲットとし、DNAメチル化を解析している。この2つの情報をリンクさせることにより、酸化ストレスの遺伝子発現への影響を分子レベルで明らかにすることが可能になると考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし（リバイス中）

[3-2]学会発表
なし

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今回、HeLa 細胞において NO によって発現が上昇する遺伝子を特定することに成功した。現在、初期的に DNA 脱メチル化部位の網羅的解析を行なっているが、両者が一致するか否かは不明である。まずは、ゲノムにおいてどのくらいの脱メチル化が観察されるかを検討する必要がある。また、タイムコースが必ずしも一致しない可能性も考えられるため、網羅的な解析だけに依存した研究は適さないこともある。従って、個々の遺伝子に関して、発現レベルを qPCR で確認し、バイサルファイトシーケンス法から遺伝子上流の DNA メチル化状態を探るようなアプローチが必要であると考え。これまでに実施してきた研究を介して、コスト面を無視すれば、再現性を担保するためにも、刺激後各時間および濃度依存性を最低 $n=3$ のサンプルを用意し、アッセイすることが重要と思われる。