

研究題目

一酸化窒素によるゲノム DNACpG 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合成酵素をから産生される。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。最近では、SARS-CoV-2感染により、サイトカインストームが惹起され、それに伴って大量のNOが産生されることが報告され、感染直後ばかりでなく遅延性病態形成への関与の可能性が指摘されている。

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、昨年に引き続き、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

種々のがんモデル細胞にNO供与体を作用させ、RNAおよび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

昨年までの研究から、NOドナーの濃度と処理時間についての詳細な解析を実施し、条件を決定した。まず、HeLa細胞を100 μM GSNOで24時間刺激した。この細胞からサンプルを調製し、RNA-seq解析に供した。n=3で試行して、発現量に変化する遺伝子について解析したところ、173種で有意に変化が認められた。その中から遺伝子発現が上昇した任意の遺伝子4種に関して、RT-qPCRを行ったところ、同様の結果を確認できた。

さらに、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た。その結果、10リード以上解析できたメチル化シトシンは25,805,689箇所検出された。この内、NOドナー刺激やNO合成酵素強制発現によって脱メチル化された部位は505039箇所であり、全体の2%以下であることが判明した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

NOによる遺伝子発現変化にエピゲノム調節酵素活性制御に起因したDNA脱メチル化が関与している可能性を示すことに成功した。特に、ゲノム全体にわたって脱メチル化が惹起されるのではなく、CpGの一部において感受性を示す部位が存在していることが明らかとなった。さらに、発現が変化する遺伝子は限局的であり、細胞毎にその対象が変わることもわかった。

【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

今後の課題、その他等

NO 刺激に伴う， 1) エピゲノム調節酵素の参加修飾， 2) ヒト病態サンプルでの検出， 3) 酵素活性への影響， 4) 発現変化遺伝子の特定， 5) ゲノム DNA メチル化部位の変化 について解析を終えた．この成果から，ニトロソ化ストレスによるエピジェネティックな遺伝子発現変化を分子レベルで証明することができた．今後は，NO が関係する病態毎の遺伝子変化を明らかにすることで，発症との因果関係を調べることが重要と思われる．さらには，脱メチル化部位に特異的に結合する転写因子からのアプローチを加えることで，より詳細な遺伝子発現機構が理解されると推定される．