

# 研究題目 病態モデルにおける一酸化窒素依存的な DNA メチル化と遺伝子 発現変化

## 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

一酸化窒素(NO)はタンパク質システインチオール基をS-ニトロシル化修飾し、酵素活性や局在などを変化させる。私たちはNO基質タンパク質の網羅的同定を様々な方法で実施し、これまでに新規候補タンパク質の単離に成功してきた。特に、エピジェネティクスに関わる酵素が複数含まれており、これまで同様の報告が無かったことから解析を進めた。

その結果、DNAメチル基転移酵素(DNMT)はNOによって活性が抑制されることが明らかとなった。次に、NOの標的システイン残基を調べたところ、活性中心のシステインに結合することがわかった。さらに、次世代シーケンサーを用いて、NOによって発現が上昇する遺伝子を特定し、CpGアイランドのメチル化状態をバイサルファイト法から検討した。絞り込んだ遺伝子のある部位が確かに脱メチル化されていることを明らかにした。

そこで、ゲノム全体のNO依存的脱メチル化部位と遺伝子発現に相関性があるのか否かを検討することとした。

#### [1-2]研究の方法・経過

種々のがんモデル細胞にNO供与体を用いて、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、各種細胞を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。発現量に変化する遺伝子について解析したところ、それぞれの細胞毎で認められた。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シングに供し、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複数箇所で見出された。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もあり、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

Okuda K, Nakahara K, Ito A, Kumar A, Nomura R,

Iijima Y, Takasugi N, Adachi K, Shimada Y, Fujio S, Onuma K, Osaki M, Okada F, Ukegawa T, Takeuchi Y, Yasui N, Yamashita A, Marusawa H, **Katagiri T**, Shibata T, Uchida K, Nakamura T, Zhang KYJ, Lipton SA, and **Uehara T**. Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase in epigenetic regulation of tumorigenesis. *Nature Commun.* 2023, 14(1), 621.

[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

これまでの検討から、株化された細胞を使用した際の誘導遺伝子に関しては、その背景となる組織由来の遺伝子が比較的単離されることがわかった。使用した細胞は、ある種がん化していることから、細胞増殖などに限定された遺伝子が誘導される可能性が高いことが予想された。一般に、病態形成においては、正常細胞が形質転換され、全く異なる性質を有するようになるケースが多いため、NOによるエピジェネティックな遺伝子誘導の詳細に迫るためには、正常細胞を用いた検討が必要であると推定された。