

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20903

研究課題名(和文) DNAメチル化・脱メチル化による摂食代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) DNA methylation and demethylation in the hypothalamic feeding center

研究代表者

河野 大輔 (Kohno, Daisuke)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：10382904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境要因による肥満発症の分子機序を明らかにするために、視床下部摂食代謝中枢のDNAメチル化修飾の制御酵素とその下流経路の体重調節への関与に注目した。摂食代謝中枢において、DNAメチル化酵素のDNMT3aは、チロシン水酸化酵素の発現を介して体重の制御を行っていることが明らかになった。一方で、DNA脱メチル化に関わる酵素であるTET1が、摂食代謝中枢において体重調節に関与しているか否かは、いまだ十分には明らかにならなかった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) in the hypothalamic feeding center plays indispensable role in energy homeostasis. In this study, we found that tyrosine hydroxylase (TH) expression in the hypothalamus is necessary for the development of obesity in mice lacking DNMT3a in the hypothalamic feeding center.

研究分野：生理学

キーワード：DNAメチル化 視床下部 肥満

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、食事などの環境要因により、肥満者の割合が世界的に急増している。体重は、エネルギー摂取と消費のバランスを反映しているが、視床下部摂食代謝中枢は、食欲や熱産生を制御することにより全身のエネルギーバランスを一定に保つ役割をしている。環境要因に影響を受ける遺伝子発現調節機構に、DNAメチル化修飾がある。そこで我々は、視床下部摂食代謝中枢におけるDNAメチル化修飾の役割に焦点を当てて研究を進めている。我々はこれまでに、視床下部摂食代謝中枢を構成する一領域である視床下部室傍核において、DNAメチル基転移酵素のDNMT3aが体重の正常な調節に必須の役割をしており、欠損させると肥満になることを明らかにしてきた(文献1)。また、視床下部室傍核特異的DNMT3a欠損マウスの視床下部室傍核では、チロシン水酸化酵素(TH)の発現が著しく増加していることやTH遺伝子のDNAメチル化レベルが低下していることを見出している(文献1)。一方で、THの発現増加は肥満の発症の原因であるか結果であるかについては十分には明らかになっていない。そこで本研究では、TH発現の増加が、DNMT3a欠損による肥満において如何に働いているか調べた。

(2) 最近になり、DNA脱メチル化関連酵素のTETが発見され(文献2)、DNAメチル化修飾の制御に重要な役割をしており、様々な生理現象に関与していることが報告されている(文献3)。一方で、視床下部摂食代謝中枢におけるTETの役割はいまだほとんど分かっていない。そこで本研究では、視床下部室傍核において、DNMT3aに加えてTETが如何なる役割を担っているか調べた。

2. 研究の目的

(1) 視床下部室傍核におけるTHは、視床下部室傍核特異的DNMT3a欠損による肥満の発症に必須であるか。

(2) 視床下部室傍核におけるTET1は、体重調節に関与しているか。

3. 研究の方法

(1) 主に視床下部室傍核にCreを発現するSim1-Creマウス(文献4)とTH floxマウス(文献5)、TET1 floxマウス(IMPC)、DNMT3a floxマウス(文献1)を掛け合わせ、視床下部室傍核特異的なTH欠損マウス(TH^{lox/lox}/Sim1-Cre)、TET1欠損マウス(TET1^{lox/lox}/Sim1-Cre)、DNMT3a欠損マウス(DNMT3a^{lox/lox}/Sim1-Cre)、DNMT3a/THダブル欠損マウス(DNMT3a^{lox/lox}/TH^{lox/lox}/Sim1-Cre)、

DNMT3a/TET1ダブル欠損マウス(DNMT3a^{lox/lox}/TET1^{lox/lox}/Sim1-Cre)を作成した。3週齢から25週齢までの体重を普通食条件下で毎週測定した。

Cre依存的な蛍光レポータータンパクを発現させた、視床下部室傍核特異的TH欠損マウス(TH^{lox/lox}/Sim1-Cre/tdTomato)およびコントロールマウス(Sim1-Cre/tdTomato)については、還流固定後、脳の凍結切片を作成し、抗TH抗体を用いた蛍光染色を行った。

4. 研究成果

(1) 視床下部室傍核特異的DNMT3a欠損マウス(DNMT3a^{lox/lox}/Sim1-Cre)は、以前に報告した時(文献1)と同様に体重増加の表現型を呈した。視床下部室傍核特異的TH欠損マウス(TH^{lox/lox}/Sim1-Cre)は、コントロール(TH^{lox/lox})と比較して体重の変化を呈さなかった。視床下部室傍核特異的TH/DNMT3aダブル欠損マウス(DNMT3a^{lox/lox}/TH^{lox/lox}/Sim1-Cre)は、コントロール(DNMT3a^{lox/lox}/TH^{lox/lox})と比較して体重の違いを呈さず、DNMT3aの欠損による肥満の発症がTHも欠損させることで抑えられた。したがって、THの発現が、DNMT3a欠損による肥満の発症に必須の役割をしていることが明らかになった。

(2) 一方で、視床下部室傍核特異的DNMT3a/TET1ダブル欠損マウス(DNMT3a^{lox/lox}/TET1^{lox/lox}/Sim1-Cre)は、DNMT3a単独欠損マウスに類似して肥満を発症した。したがって、TET1による脱メチル化作用は、DNMT3a欠損による肥満の発症に必須ではないことが明らかになった。また、視床下部室傍核特異的TET1欠損マウス(TET1^{lox/lox}/Sim1-Cre)は、コントロール(TET1^{lox/lox})と比較して体重の変化を示さなかった。したがって、視床下部室傍核のTET1の体重調節における関与は明らかではなかった。TETにはTET1以外にも、TET2やTET3が存在しているため、これらが代償的に働いている可能性も考えられる。

(3) (1)において、視床下部室傍核のTHの発現がDNMT3a欠損による肥満の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになったため、次に、視床下部室傍核THニューロンについて調べた。視床下部室傍核やその近傍には複数のTHニューロン群が存在することが知られており、それぞれのニューロン群が異なる性質や役割を持っている可能性があることが報告されている(文献6)。そこで本研究で用いた視床下部室傍核特異的TH欠損マウスにおけるTHの分布を抗TH抗体を用いた免疫組織学により調べた。視床下部室傍核特異的TH欠損マウスにおいては、室傍核内側大細胞性領域のTHニュー

ロン群の TH が特異的に欠損していたが、室傍核後部や不確帯、脳室周囲核、腹側被蓋野の TH 分布は変化していなかった。これらのことから、視床下部室傍核内側大細胞性領域の TH の発現が、DNMT3a 欠損による肥満の発症に必須の役割を果たしていると考えられる。

視床下部室傍核内側大細胞性領域の TH ニューロンにおいて起こる、DNMT3a による TH 遺伝子の DNA メチル化修飾を介した発現の調節が、体重の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。一般的に、DNA メチル化修飾は胎児期などの生涯のうちの早い時期により活発に作られ、その後、多くは長期に渡って維持されると考えられている。したがって、視床下部室傍核内側大細胞性領域の TH ニューロンの DNA メチル化修飾も、胎児期などの早い時期に環境要因の影響を受けながら DNMT3a により作られ、成長後の肥満のなりやすさを決定している可能性がある。

<引用文献>

- 1 . Kohno D, Lee S, Harper MJ, Kim KW, Sone H, Sasaki T, Kitamura T, Fan G, Elmquist JK. Dnmt3a in Sim1 neurons is necessary for normal energy homeostasis. *J Neurosci.* 2014 Nov 12;34(46):15288-96.
- 2 . Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009 May 15;324(5929):930-5.
- 3 . Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 2017 May 30.
- 4 . Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell.* 2005 Nov 4;123(3):493-505.
- 5 . Tokuoka H, Muramatsu S,

Sumi-Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D, Ichinose H. Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. *J Biol Chem.* 2011 Dec 16;286(50):43549-58.

- 6 . Romanov RA, Zeisel A, Bakker J, Girach F, Hellysaz A, Tomer R, Alpár A, Mulder J, Clotman F, Keimpema E, Hsueh B, Crow AK, Martens H, Schwindling C, Calvigioni D, Bains JS, Máté Z, Szabó G, Yanagawa Y, Zhang MD, Rendeiro A, Farlik M, Uhlén M, Wulff P, Bock C, Broberger C, Deisseroth K, Hökfelt T, Linnarsson S, Horvath TL, Harkany T. Molecular interrogation of hypothalamic organization reveals distinct dopamine neuronal subtypes. *Nat Neurosci.* 2017 Feb;20(2):176-188.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://asr1du.dept.med.gunma-u.ac.jp/dk/ohno/daisuke_kohno.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 大輔 (KOHNO, Daisuke)
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教
研究者番号：10382904