

令和元年6月18日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14919

研究課題名（和文）エピゲノム制御を介した生体内エネルギー状態に応じた遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of gene expression depending on energy status by epigenome regulation

研究代表者

井上 順（INOUE, Jun）

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70323962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、生体内エネルギー状態に応じた遺伝子発現の制御機構を理解することである。具体的には摂食時に発現が上昇する遺伝子に関して、転写因子の活性制御だけでは説明のつかない遺伝子に着目し、エピゲノムレベルでの解析を行う。はじめにマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、解析対象にする遺伝子の選別を行った。選別したいくつかの遺伝子領域のヒストン修飾を検討したところ、遺伝子発現パターンとヒストンアセチル化レベルの相関が観察される領域とされない領域に分かれた。今後さらに、エピゲノムレベルでの制御を解析していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノム制御は、発生やリプログラミング、がん等の疾患発症に関与することが明らかになりつつある。本研究は、劇的に遺伝子発現が変動することが知られている絶食・再摂食に着目し、生体のエネルギー状態の変動がおよぼす遺伝子発現の変化に、エピゲノム制御が関与するかどうかを明らかにすることを目指した。その結果、転写因子の活性化だけでは説明のつかない発現変動をうける遺伝子を見出した。これはエピゲノムレベルで生体内エネルギー制御を行っている可能性を示す結果であり、今後のさらなる解析により、制御の実体を明らかにすることで、生体のエネルギー代謝制御機構の理解につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to understand the mechanism of regulation of gene expression depending on energy status. Comprehensive gene expression analysis was performed using a microarray experiment to select the genes to be analyzed in this study. Then, I examined the histone modification of several selected genes and found that these genes could be divided into two groups.

研究分野：食品生化学

キーワード：エピゲノム マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は栄養を摂取することで生命を維持しているが、エネルギー状態に応じて種々の遺伝子発現を変動させることにより、その恒常性を維持することができる。

近年の研究により、メタボリックシグナルとして空腹時には AMP や NAD⁺ が、摂食時にはアセチル CoA が機能することが示されている。これらのメタボリックシグナルは、細胞のエネルギー状態を転写因子に伝達することで、特異的な代謝プログラムへと変換する機能を持つ。空腹時の NAD⁺ や摂食時のアセチル CoA の上昇は、エピジェネティックな制御を介して遺伝子発現を調節する可能性が指摘されている。

転写因子である SREBP-1c の遺伝子発現は再摂食後に発現が上昇し、長時間にわたってその発現が持続することを見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内エネルギー状態に応じた遺伝子発現の制御機構を理解することであり、特に、エピゲノムレベルでの制御の可能性を検討する。具体的には、摂食時に発現が上昇する遺伝子に関して、転写因子の活性制御だけでは説明のつかない遺伝子に着目し、ヒストンアセチル化やメチル化等のヒストンコードや DNA メチル化状態について解析を行う。はじめにマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、その結果を用いてエピゲノムレベルでの解析を進める。また、摂食時に発現が変動する遺伝子の発現制御機構について分子レベルで解析を行う。

3. 研究の方法

実験 1：絶食・再摂食時の遺伝子発現変動の網羅的解析

絶食・再摂で発現が顕著に変化する遺伝子の探索を行うために、オス 7 週齢 C57BL/6J を自由摂食群、24 時間絶食群、24 時間再摂食群 (24 時間絶食後、24 時間再摂食させた群)、48 時間再摂食群 (24 時間絶食後、48 時間再摂食させた群) の 4 群に分けて検討を行った。肝臓から RNA を精製し、マイクロアレイにて遺伝子発現変動を網羅的に解析した。また、再摂食時の遺伝子発現変動のパターンによって遺伝子を分類した。

実験 2：再摂食時に発現が亢進する Triokinase 遺伝子のプロモーター量域の解析

ルシフェラーゼレポーター遺伝子の 5' 上流に Triokinase のプロモーター領域 3.0kbp を挿入したプラスミド (pLuc-Tk3.0) を作製した。Triokinase のプロモーター内にコンセンサス配列が存在し、摂食応答に関与する転写因子を探索した (探索ツールである VISTA を使用)。その中で LXR、HNF-4、USF1 に着目し、pLuc-Tk3.0 とともにヒト肝がん由来細胞である Huh-7 細胞にトランスフェクションし、48 時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。

実験 3：HNF-4 による Triokinase 遺伝子発現調節の解析

Triokinase 遺伝子発現制御における転写因子 HNF-4 の関与を解析することを目的として、HNF-4 阻害剤である BI6015 を用いた。Huh-7 細胞に 1 μ M BI6015 を 48 時間処理し、Triokinase 遺伝子発現をリアルタイム PCR により測定した。

4. 研究成果

実験 1：絶食・再摂食時の遺伝子発現変動の網羅的解析

再摂食時に発現が上昇した遺伝子には SREBP-1c の標的遺伝子が、一方で発現減少した遺伝子の中には CREB や PPAR の標的遺伝子がそれぞれ含まれており、これまでに報告されている絶食・再摂時に観察される転写因子の活性上昇が確認された。また、再摂食時に発現が上昇した遺伝子を分類したところ、2 つのパターンに分けられた。一つは、24 時間絶食群と比較して、

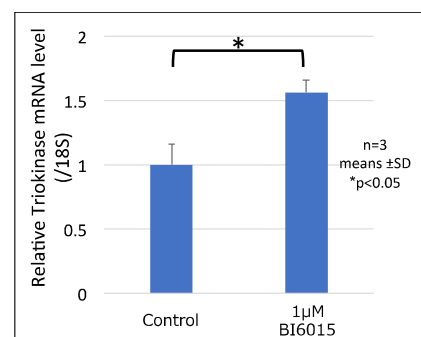
24 時間再摂食群で遺伝子発現が上昇し、48 時間再摂食群で変化がなくなった一過性のもので、もう一つは発現が 24 時間再摂食群、48 時間再摂食群で持続的に発現が上昇したものである。一方、再摂食時に発現が低下した遺伝子の場合でも同様に 2 つのパターンに分けられた。

実験 2：再摂食時に発現が亢進する Triokinase 遺伝子のプロモーター量域の解析

再摂食時に発現が上昇する新規遺伝子として、フルクトース代謝に関与する Triokinase 遺伝子を見出した。Triokinase 遺伝子プロモーター 3.0kb を用いたレポーターアッセイを行ったが、LXR、HNF-4、USF1 の転写因子によるプロモーター活性の変動は見られなかった。

実験 3：HNF-4 による Triokinase 遺伝子発現調節の解析

転写因子 HNF-4 の阻害剤である BI6015 処理により、Triokinase 遺伝子発現は有意に増加することが明らかになった (右図)。この結果により、HNF-4 が



Triokinase 遺伝子発現を抑制している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Iwase M, Watanabe K, Shimizu M, Suzuki T, Yamamoto Y, *Inoue J, and *Sato R (2019) Chrysin reduces the activity and protein level of mature forms of sterol regulatory element-binding proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* in press (査読あり)

*Inoue J, Miyata S, Shimizu M, and *Sato R (2018) Isoxanthohumol stimulates ubiquitin-proteasome-dependent degradation of precursor forms of sterol regulatory element-binding proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* 82: 1591-1598. (査読あり)

Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, Murata S, Shimizu M, Inoue J, Mori K, and *Sato R (2018) The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. *J Biol Chem* 293: 10322-10332. (査読あり)

Kuboyama A, Sasaki T, Shimizu M, Inoue J, and *Sato R (2018) The expression of Transmembrane Protein 100 is regulated by alterations in calcium signaling rather than endoplasmic reticulum stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 82: 1377-1383. (査読あり)

Maruyama R, Shimizu M, Hashidume T, Inoue J, Itoh N, and *Sato R (2018) FGF21 Alleviates Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress under Physiological Conditions. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 64: 200-208. (査読あり)

Sasaki T, Mita M, Ikari N, Kuboyama A, Hashimoto S, Kaneko T, Ishiguro M, Shimizu M, Inoue J, and *Sato R (2017) Identification of key amino acid residues in the hTGR5-nomilin interaction and construction of its binding model. *PLoS ONE* 12: e0179226. (査読あり)

*Inoue J, Ikeda S, Kanayama T, and *Sato R (2017) The flavonoid derivative 4'-nitro-6-hydroxyflavone suppresses the activity of HNF4 α and stimulates the degradation of HNF4 α protein through the activation of AMPK. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 1548-1552. (査読あり)

Kuan Y-C, Hashidume T, Shibata T, Uchida K, Shimizu M, Inoue J, and *Sato R (2017) Heat Shock Protein 90 Modulates Lipid Homeostasis by Regulating the Stability and Function of Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *J Biol Chem* 292: 3016-3028. (査読あり)

*Inoue J, Ihara Y, Tsukamoto D, Yasumoto K, Hashidume T, Kamimura K, Hirano S, Shimizu M, Kominami R, and Sato R (2017) BCL11B gene heterozygosity causes weight loss accompanied by increased energy consumption, but not defective adipogenesis, in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 922-930. (査読あり)

*Inoue J, Ikeda S, Kanayama T, and *Sato R (2017) The flavonoid derivative 4'-nitro-6-hydroxyflavone suppresses the activity of HNF4 and stimulates the degradation of HNF4 protein through the activation of AMPK. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 1548-1552. (査読あり)

[学会発表](計6件)

渡邊 杏子、岩瀬 将盛、鈴木 司、山本 祐司、井上 順

<エビゲノム制御による摂食応答遺伝子の発現変動メカニズムの解析>
第73回日本栄養・食糧学会大会 / 静岡 2019年5月

渡邊 杏子、岩瀬 将盛、鈴木 司、山本 祐司、井上 順

<再摂食時に発現が変動する遺伝子の網羅的解析>
日本農芸化学会 2019年度大会 / 東京 2019年3月

井上 順、宮田 慎吾、正路 健太、鈴木 司、山本 祐司、清水 誠、佐藤 隆一郎

<スルフォラファンは転写因子 SREBP 前駆体の分解促進を介して食事誘導性肥満や脂肪肝を改善する>
日本農芸化学会 2019年度大会 / 東京 2019年3月

井上 順

<機能性をもつ食品成分の探索と作用メカニズムの解明>

日本農芸化学会 2019 年度大会 / 東京 シンポジウム 平成 31 年 3 月

井上 順

<機能性をもつ食品成分の探索 ~基礎研究との両立~>

栄養学若手研究者の集い 第 52 回サマーセミナー / 筑波 シンポジウム 平成 30 年 8 月

井上 順

<転写制御を介した食品成分の抗メタボリックシンドローム作用>

フォーラム 2017 : 衛生薬学・環境トキシコロジー / 仙台 シンポジウム 平成 29 年 9 月

〔その他〕

ホームページ等

http://dbs.nodai.ac.jp/html/100001182_ja.html

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。