

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06942

研究課題名（和文）新たな代謝相関の提案に向けたELOVL2プロモーター領域DNAメチル化制御の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the link between glucose metabolism and gene expression of ELOVL2

研究代表者

山本 健（Yamamoto, Ken）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60274528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、ELOVL2遺伝子発現量はグルコース濃度環境の影響を受けること、そしてその遺伝子発現変化には、プロモーター領域DNAメチル化は寄与していないこと、しかし、新規ノンコーディングRNAであるAS-ELOVL2が、その発現制御に関与する可能性があること、が示され、糖代謝とDHA、EPA合成経路が、AS-ELOVL2を介したELOVL2遺伝子発現制御を介するという新しい代謝のリンクが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エイコサペンタエン酸（EPA）ドコサヘキサエン酸（DHA）は、動脈硬化など様々な生活習慣病に予防的に作用する高度不飽和脂肪酸である。本研究の成果は、糖代謝とDHA、EPA合成経路が、AS-ELOVL2によるELOVL2遺伝子発現制御を介するという、学術的に新しい代謝のリンクを示唆するとともに、生活習慣病の予防を視野に入れた高齢化社会における栄養摂取に対して、新たな提案を可能とする基盤情報を提供している。

研究成果の概要（英文）：According to this study, the expression level of the ELOVL2 gene is affected by the glucose concentration environment. It was shown that the DNA methylation of the promoter region of ELOVL2 does not contribute to the change in gene expression, but that the novel non-coding RNA, may be involved in the regulation of its expression, suggesting a new metabolic link between glucose metabolism and the DHA, EPA synthesis pathway via AS-ELOVL2-mediated regulation of ELOVL2 gene expression.

研究分野：医化学

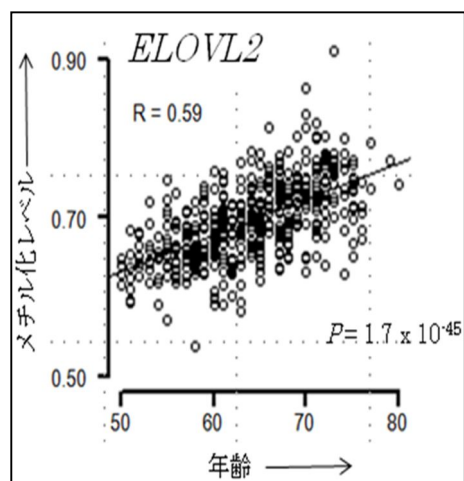
キーワード：ELOVL2 糖代謝 DNA メチレーション DHA EPA ノンコーディングRNA

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

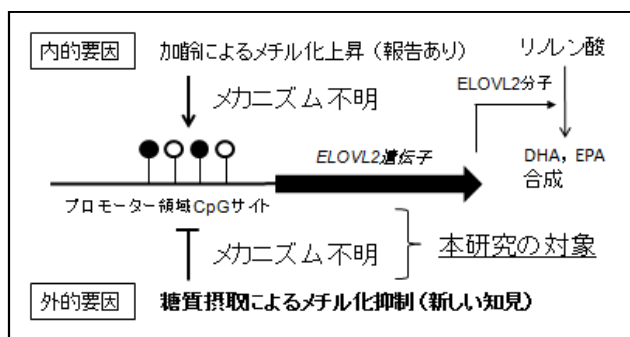
組織特異的な遺伝子発現制御の一端を担う DNA メチル化やヒストン修飾 (エピゲノム) は、細胞分裂後も維持されるクロマチンメモリーとして機能し、細胞の正常な分化・増殖に重要な役割を演じている。ゲノム配列と異なり、エピゲノムは環境因子による変化を許容すると考えられており、これは、個体が環境に適応し、生命活動の恒常性を維持するために不可欠な生体反応の一つと言える。このエピゲノムの生命維持における重要性に鑑みれば、その破綻が疾病発症をもたらすことは強く推測される。しかし、どのような環境因子がどのようにエピゲノムを変化させ、疾病罹患に寄与するかは、多くの疾病では不明であり、解明すべき重要な課題として残されている。

モデル動物と異なり、ヒトは様々な環境に様々な程度で暴露されており、環境がエピゲノムに与える影響を捕捉するためには、臨床情報や詳細な生活習慣アンケートを備えた一定規模のヒト由来試料が必要となる。申請者らは加齢による DNA メチル化変化の可能性に着目し、九州大学福岡コホートならびに北名古屋コホートに参加している 480 名の一般住民集団より得た末梢血由来 DNA 検体を用い、45 万 DNA メチル化サイトのメチル化レベルと加齢との関連を解析して、補正後も有意となる加齢に伴う DNA メチル化変化を 10 サイト 7 遺伝子領域に同定した。図に、一例として ELOVL2 遺伝子プロモーター領域に位置する CpG サイトのメチル化レベル (縦軸) と年齢 (横軸) との相関図を示す (個々のドットは被験者を示す)。



性、BMI にて補正した一般化線形モデル解析では、 $P=1.7 \times 10^{-45}$ の有意な相関が得られた。

さらに我々は、「内的要因」である加齢に影響を受けるこれらのメチル化変化と相互作用する「外的要因」を統計学的に探索した。その結果、ELOVL2 領域の加齢によるメチル化変化が、被験者の糖質摂取量と相互作用し、糖質摂取量が多いヒトはメチル化変化が抑えられることを見出した ($P=1.6 \times 10^{-6}$)。これらの結果は、図に示したように、ELOVL2 の発現が加齢と糖代謝によって制御されている可能性を示している。



2. 研究の目的

上記の背景と既に得られている結果から、我々は、ELOVL2 の遺伝子発現制御を介して、DHA および EPA の生合成に糖代謝が関与するのではないかと、との問いにたどり着いた。この問いを解決することは、加齢に伴う ELOVL2 プロモーター領域 DNA メチル化変化の生理的意義を明らかにするのはもちろんのこと、これまで知られていない、糖代謝と DHA, EPA 生合成の直接的な代謝関連の発見につながる。

本研究ではこの知見に立脚し、糖質代謝と ELOVL2 プロモーター領域 DNA メチル化の関連について、その分子生物学的メカニズムを解明する。

[独自性と創造性]

近年の急速な集団エピゲノム解析によって、加齢や喫煙、疾患と関連する DNA メチル化サイトが同定されている。しかしながら、その殆どは、表現型と関連する「バイオマーカー」としての位置づけから研究が進められている。我々は、糖質摂取量と加齢に伴う ELOVL2 プロモーター領域 DNA メチル化変化との相互作用という独自の基盤データを出発点とし、本研究を進めることによりこのメチル化変化の生理的意義が解明できる点が特色である。

さらに、これまで、DHA, EPA の生合成に直接糖質代謝が関与することは知られていない。本研究のもっとも創造的な点は、糖質代謝が ELOVL2 の発現制御を介して、これらの高度不飽和脂肪酸の生合成に関与することを分子生物学的に解明しようとする点である。これが明らか

になれば、代謝相関についての新しい発見となる。

3. 研究の方法

(1) 研究計画の概要と役割分担

研究は培養細胞およびマウス個体を用いた二つの実験に大別される。培養細胞においては、異なる糖濃度環境下での ELOVL2 プロモーター領域 DNA メチル化レベル変化、それに伴う ELOVL2 遺伝子発現レベルの変化を検討する。それに合わせ、DNA メチル化・脱メチル化に關与する遺伝子群の発現変化を RNA-Seq により検討する。培養細胞実験系は山本と原田が実施する。

マウス個体においては、生後より異なる糖質摂取量環境下で飼育した際の ELOVL2 プロモーター領域 DNA メチル化レベル変化、それに伴う ELOVL2 遺伝子発現レベルの変化、を一定期間後に種々の臓器にて検討する。同時に血中 DHA, EPA 濃度変化を検討する。これと加齢を加味し、ヒトで観察された相互作用を検討する。動物実験系は主として山本が担当する。

(2) 具体的な研究計画と到達目標

課題 到達目標は、培養細胞において糖濃度が ELOVL2 プロモーターDNA メチル化レベルおよび遺伝子発現レベルに影響を与えるかを明らかにすることである。予備実験から、ELOVL2 を発現している細胞として肝細胞癌由来 HepG2 および乳癌由来 MCF7 が利用可能である。培養液中の糖濃度を高濃度、通常濃度、ピルビン酸のみに分け、三群間での DNA メチル化レベルの差、および糖濃度を变化させた時の経時的な DNA メチル化レベルの変化を詳細に検討するとともに、ELOVL2 の発現変化を解析する。DNA メチル化レベルはパイロシーケンスにて、遺伝子発現は TaqMan 法にてデータを取得する。

課題 到達目標は、培養細胞における糖濃度変化が DNA メチル化レベルに影響を与えることが知られる遺伝子群の発現に影響を与えるかを明らかにすることである。課題 にて明らかにされる ELOVL2 の DNA メチル化レベルに影響を与える培養条件下で、RNA を抽出し、RNA-Seq によって網羅的に遺伝子発現データを取得する。これを用い、DNA メチル化酵素・脱メチル化酵素群、これらをヌクレオソーム上にリクルートするヒストン修飾を担う酵素遺伝子群（ヒストン H3-K9 メチル化酵素群など）などに着目し発現変化を検討する。

課題 到達目標は、マウスを用い加齢に伴う ELOVL2 プロモーター領域の DNA メチル化変化をきたす臓器を同定することである。DNA メチル化変化には臓器特異性が存在することが予想される。ヒトでは体系的に多くの臓器を解析することが不可能であり、マウス個体を用いて経時的に追跡する。ヒトとマウス間で、ヒトで同定された CpG サイトは保存されており、予備実験から、雌雄間の差無く 3 週齢と 12 ヶ月齢の個体で、尾部由来 DNA の当該メチル化レベルにヒトと同様の差があることを明らかにしており、本課題ではこれを全臓器で検討する。具体的には、1, 3, 6, 9, 12 ヶ月の月齢で臓器を採取し、パイロシーケンスにて当該 CpG サイトのメチル化レベル変化、ELOVL2 の発現変化を検討する。

課題 到達目標は、マウスを用い、糖質過剰餌および制限餌が加齢に伴う ELOVL2 プロモーター領域の DNA メチル化変化、ELOVL2 発現変化、DHA, EPA 血中濃度変化、に影響を与えるかを明らかにすることである。計画段階では、課題 のスケジュールにてそれぞれの項目のデータを取得する。

課題 および が順調に進めば、グルコースおよび解糖系の中間産物が、直接 DNA メチル化・脱メチル化に關連する酵素をアロステリック制御する可能性も視野に入れ、酵素化学的な検討を原田研究分担者が進める。

4. 研究成果

本研究の核心は、ELOVL2 の遺伝子発現制御を介して、ドコサヘキサエン酸 (DHA) およびエイコサペンタエン酸 (EPA) の生合成に糖代謝が關与するのではないかと、との問いを解決することである。

2018 年度は、肝臓がん由来培養細胞 HepG2 を用い、異なるグルコース濃度下での ELOVL2 遺伝子発現の変化を明らかにし、さらに、その発現変化とプロモーター領域 DNA メチル化レベルとの関連を検討した。

(1) ELOVL2 遺伝子発現の変化：HepG2 を低濃度グルコースにて一定期間培養後、0mM、2.6mM、5.6mM、11.2mM、25.6mM のグルコース濃度となるよう培地を調整し、一定期間培養後の ELOVL2 遺伝子発現を定量 PCR にて検討したところ、グルコース濃度に応じた発現の上昇を認めた。

(2) ELOVL2 遺伝子プロモーター領域 DNA メチル化レベルの変化：上記の条件下でゲノム DNA を抽出し、パイロセファイト処理後、パイロシーケンスを用いてメチル化レベルを定量したとこ

る、グルコース濃度に応じたメチル化レベル変化は認めなかった。

以上の結果から、少なくとも HepG2 細胞においては、ELOVL2 遺伝子発現量はグルコース濃度環境の影響を受けること、そしてその遺伝子発現変化には、プロモーター領域 DNA メチル化は寄与していないこと、などが明らかとなった。よって、グルコース濃度変化に対する ELOVL2 遺伝子発現応答のメカニズムを解明するには、シスではなくトランス因子の検討が今後必要となることが示された。

(3) 以上の結果を受け、2019 年度は、あらたに、ELOVL2 遺伝子発現に影響を与える可能性のある、新規ノンコーディング RNA、AS-ELOVL2 に着目し研究を進めた。AS-ELOVL2 は、ゲノム上、ELOVL2 遺伝子座の近傍に逆向きに位置しており、一部の領域が ELOVL2 遺伝子と重なっている。このことから、AS-ELOVL2 は ELOVL2 の転写産物量をアンチセンスとして制御している可能性がある。AS-ELOVL2 の機能は全く未知であり、我々は、まず遺伝子発現の臓器特異性の有無を検討し、特に脳神経系に強く発現していることを見出した。

続けて、この AS-ELOVL2 の発現が、1) 糖代謝に影響を受けるか、2) ELOVL2 の発現量に影響を与えるか、を 2020 年度に検討し、1) においては、培養液中グルコース濃度に依存して発現が増加する傾向があること、2) においては、AS の働きにより、ELOVL2 の発現量を低下させる傾向があること、などを見出したが、統計学的な有意差は示さなかった。

以上をまとめると、ELOVL2 遺伝子発現量はグルコース濃度環境の影響を受けること、そしてその遺伝子発現変化には、プロモーター領域 DNA メチル化は寄与していないこと、しかし、新規ノンコーディング RNA である AS-ELOVL2 が、その発現制御に関与する可能性があること、が示され、糖代謝と DHA, EPA 合成経路が、AS-ELOVL2 を介した ELOVL2 遺伝子発現制御を介するという新しい代謝のリンクが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Konishi KI, Mizuochi T, Yanagi T, Watanabe Y, Ohkubo K, Ohga S, Maruyama H, Takeuchi I, Sekine Y, Masuda K, Kikuchi N, Yotsumoto Y, Ohtsuka Y, Tanaka H, Kudo T, Noguchi A, Fuwa K, Mushiaka S, Ida S, Fujishiro J, Yamashita Y, Taguchi T, Yamamoto K	4. 巻 214
2. 論文標題 Clinical Features, Molecular Genetics, and Long-Term Outcome in Congenital Chloride Diarrhea: A Nationwide Study in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr.	6. 最初と最後の頁 151-157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpeds.2019.07.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatochi M, Kanai M, Nakayama A, Hishida A, Kawamura Y, Ichihara S, Akiyama M, Ikezaki H, Furusyo N, Shimizu S, Yamamoto K, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Genome-wide meta-analysis identifies multiple novel loci associated with serum uric acid levels in Japanese individuals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0339-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Spracklen CN, Horikoshi M, Kim YJ, et al.	4. 巻 582
2. 論文標題 Identification of type 2 diabetes loci in 433,540 East Asian individuals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 240-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2263-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masahiro Nakatochi, Sahoko Ichihara, Ken Yamamoto, Tatsuaki Matsubara, Mitsuhiro Yokota
2. 発表標題 Exploration of DNA methylation sites associated with adiponectin levels based on a gene co-expression network and DNA methylation data analysis.
3. 学会等名 American Society of Human Genetics, 2018 Annual Meeting
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米大学医学部医化学講座
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/ikagaku/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 二郎 (Harada Jiro) (10373094)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
	米国	University of Massachusetts	Stanford University	
英国	University Oxford	University of Manchester		