

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790066

研究課題名（和文） DNA メチル化と血管内皮細胞特異的遺伝子発現

研究課題名（英文） DNA methylation and endothelial cell-specific gene expression

研究代表者

岡田 欣晃（OKADA YOSHIAKI）

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50444500

研究成果の概要（和文）：Robo4 プロモーターの転写開始点付近は組織特異的な DNA メチル化修飾を受けており、Robo4 を発現する血管内皮細胞では非メチル化、発現しない非血管内皮細胞では高メチル化されている。今回、DNA メチル化酵素阻害剤、メチル化プラスミドを用いたレポーター遺伝子アッセイ、およびメチル化サイトに変異を導入したプロモーターの組織特異性の評価から、プロモーターの転写開始点上流 11 個の CpG 配列のメチル化修飾が、Robo4 遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現に寄与していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The CpG sites in the Robo4 proximal promoter is specifically non-methylated in endothelial cells (ECs) but not non-ECs. In this study we performed assays using DNA methyltransferase inhibitor, methylated reporter plasmids, and ES cell lines containing mutant promoters, and demonstrated that cell-type-specific DNA methylation of the 11 CpG sites in the proximal promoter regulates EC-specific Robo4 gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：エピジェネティクス、DNA メチル化、遺伝子発現制御、血管内皮細胞、Robo4 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

生物を構成するひとつひとつの細胞は、全ての遺伝子がコードされた同じゲノム配列を持っている。しかし、いくつかの遺伝子は、特定の細胞にのみ特異的に発現し、他の細胞には発現しない。この組織特異的な遺伝子発現が生み出されるメカニズムの詳細は未だ

不明である。我々は、組織特異的遺伝子発現のうち、血管内皮細胞特異的に遺伝子が発現するメカニズムを明らかにするために、2002年に血管内皮細胞特異的遺伝子としてクローニングされた Robo4 遺伝子の発現制御メカニズムの解析を行ってき。これまでに、SP1、GABP などの転写因子が Robo4 遺伝子の発現に

必須であることを証明した。しかし、これらの因子は血管内皮細胞に特異的に発現する転写因子ではなかったため、これら因子のみで血管内皮細胞特異的な遺伝子発現が生み出されるメカニズムを説明することはできなかった。

そこで我々は発想を転換し、転写因子を介さない遺伝子発現制御メカニズムであるエピジェネティクスが血管内皮細胞特異性を生み出す可能性を考えた。エピジェネティクスと Robo4 遺伝子発現との関連を調べるにあたり、まずプロモーターの DNA メチル化状態の解析を行った。その結果、プロモーターの DNA メチル化パターンは、Robo4 遺伝子を発現する血管内皮細胞と、発現しない非血管内皮細胞で大きく異なり、特に転写開始点上流 11 個のメチル化サイト (CpG 配列) が、血管内皮細胞では全くメチル化されていないのに対し、非血管内皮細胞では高メチル化されているという組織特異的なパターンをとることが明らかになった。この結果から、DNA メチル化が Robo4 遺伝子の発現を抑制し組織特異性が生み出されることが示唆されたため、さらに詳細な解析を行った。

2. 研究の目的

血管内皮細胞と非血管内皮細胞における Robo4 プロモーターの DNA メチル化パターンの相違が、プロモーターの組織特異性を生み出すのかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞と非血管内皮細胞中のゲノムを DNA メチル化酵素阻害剤 (5-アザデオキシシチジン) で脱メチル化した時の Robo4 遺伝子発現の変動をリアルタイム PCR により評価する。

(2) DNA メチル化酵素 (SssI) を用いたレポータージーンアッセイによりプロモーターの転写開始点付近のメチル化がプロモーター活性に与える影響を評価する。

(3) 血管内皮細胞と非血管内皮細胞において相違がみられる 11 個の CpG 配列を、メチル化を受けない CpT に変換した変異プロモーターが血管内皮細胞特異性を維持するかを *in vitro* ES 細胞分化系で評価する。また、組織特異性が変化したプロモーターを用いてトランスジェニックマウスを作製する。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞と非血管内皮細胞を 5-アザデオキシシチジンで処理し、Robo4 遺伝子の発現変動を解析したところ、血管内皮細胞ではその発現に変化はなかったが (図 1 A)、3 種の非血管内皮細胞すべてにおいて、Robo4

遺伝子の発現の上昇が見られた (図 1 B-D)。これらの結果から、ゲノム中の Robo4 プロモーターの脱メチル化が Robo4 遺伝子の発現を促進することが示唆された。

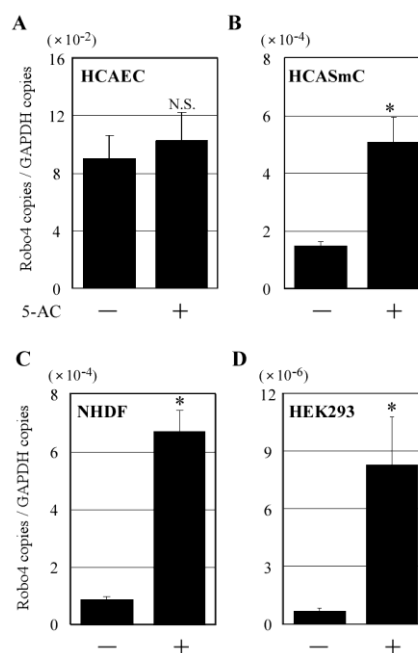


図 1 5-AC 処理が各細胞の Robo4 遺伝子の発現に及ぼす影響

(2) Robo4 プロモーターの転写開始点上流 14 個の CpG 配列を SssI でメチル化したプロモーターもしくは、全くメチル化していないプロモーターを含むレポータープラスミドを血管内皮細胞に導入し、両プロモーターの活性を比較した。その結果、メチル化したプロモーターは、バックグラウンドレベルの活性しか持たないことが明らかになった (図 2)。この結果から、Robo4 プロモーターの転写開始点付近のメチル化は Robo4 プロモーター活性を抑制することが明らかになった。

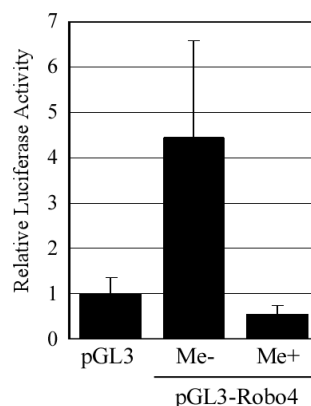


図 2 転写開始点付近の DNA メチル化が Robo4 プロモーター活性に及ぼす影響の評価

(3) Robo4 プロモーターの転写開始点上流 1~11 個の CpG 配列に変異を導入した非メチル化プロモーターを作製した。得られた変異プロモーターに LacZ 遺伝子を連結した配列 1 コピーを、マウス ES 細胞の Hprt 遺伝子上流に相同組み換えにより挿入した。得られた ES 細胞を *in vitro* で胚様体へと分化させたところ、1~7 個の CpG 配列への変異導入ではプロモーターの組織特異性に変化がなかったものの、11 個の CpG 配列への変異導入でプロモーターの組織特異性が失われ、LacZ 遺伝子が非血管内皮細胞にも発現するようになった (図 3)。この結果から、Robo4 プロモーターの転写開始点付近の DNA メチル化が血管内皮細胞特異的な遺伝子発現制御を担っていることが明らかになった。

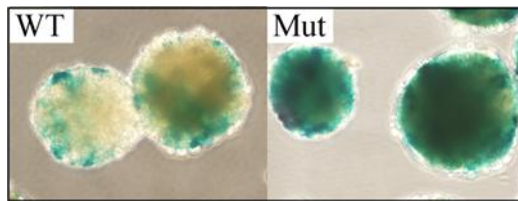


図 3 メチル化サイトへの変異はプロモーターの組織特異性を破壊する

以上(1)~(3)の結果から、Robo4 プロモーターの DNA メチル化が、非血管内皮細胞におけるプロモーター活性抑制を誘導し、血管内皮細胞特異的に Robo4 遺伝子を発現させることが明らかになった。

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 4 件)

- ① Okada Y, Yonekura M, Watanabe M, Nakai T, Wakimura A, Shimizu M, Kamikawa Y, Kitayama M, Kitajima K, Aird WC, Doi T. Embryonic stem cell differentiation system for evaluating gene functions involved in physiological megakaryocytic differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 419, 2012, 477-481
- ② Okada Y, Nobori H, Shimizu M, Watanabe M, Yonekura M, Nakai T, Kamikawa Y, Wakimura A, Funahashi N, Naruse H, Watanabe A, Yamasaki D, Fukada S, Yasui K, Matsumoto K, Sato T, Kitajima K, Nakano T, Aird WC, Doi T, Multiple ETS Family Proteins Regulate PF4 Gene Expression by Binding to the Same ETS

Binding Site, *PLoS ONE*, 査読有, Vol. 9, 2011, e24837

- ③ Okada Y, Takano TY, Kobayashi N, Hayashi A, Yonekura M, Nishiyama Y, Abe T, Yoshida T, Yamamoto TA, Seino S, Doi T, New Protein Purification System Using Gold-Magnetic Beads and a Novel Peptide Tag, "the Methionine Tag", *Bioconjugate Chemistry*, 査読有, Vol. 22, 2011, 887-893
- ④ Liu J, Yuan L, Molema G, Regan E, Janes L, Beeler D, Spokes KC, Okada Y, Minami T, Oettgen P, Aird WC, Vascular bed specific regulation of the von Willebrand factor promoter in the heart and skeletal muscle, *Blood*, 査読有, Vol. 117, 2011, 342-361

[学会発表] (計 12 件)

- ① 岡田欣晃、西山侑児、鈴木綾乃、酒井美貴、舟橋伸昭、加納義浩、成瀬啓樹、William Aird、土井健史、DNA メチル化による Robo4 遺伝子の組織特異的発現の制御、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011. 10. 22、神戸学院大学
- ② Seino S, Okada Y, Takano TY, Doi T, Koga Y, Takashi Nakagawa T, Yamamoto TA, Protein purification system using magnetic beads modified with gold nanoparticles, 第 35 回日本磁気学会学術講演会 (日本磁気学会国際シンポジウム)、2011. 9. 28、朱鷺メッセ
- ③ 岡田欣晃、舟橋伸昭、加納義浩、西山侑児、成瀬啓樹、鈴木綾乃、William Aird、土井健史、DNA メチル化は Robo4 遺伝子を血管内皮細胞特異的に発現させる、第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会、2011. 5. 19、KKR ホテル熊本
- ④ 鈴木綾乃、成瀬啓樹、舟橋伸昭、西山侑児、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的に発現する Robo4 遺伝子の発現は血管平滑筋細胞の共存により抑制される、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、ツインメッセ静岡
- ⑤ 西山侑児、舟橋伸昭、成瀬啓樹、鈴木綾乃、岡田欣晃、土井健史、Robo4 遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現を担うエピジェネティックな遺伝子発現制御メカニズム、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、ツインメッセ静岡

- ⑥ 志水美己子, 神川悠子, 仲井友子, 渡邊美穂, 米倉正哲, 岡田欣晃, 土井健史、血小板第4因子遺伝子の-51 ETS サイトを介した発現制御メカニズムについて、日本薬学会第131年会、2011.3.30、ツインメッセ静岡
- ⑦ Seino S, Koga Y, Mukai Y, Okada Y, Nakagawa T, Yamamoto TA., Doi T, Nakagawa Shinsaku, Gold/Iron-oxide composite nanoparticles as new type of magnetic nanocarrier for in-vivo and in-vitro applications, Pacifichem2010, 2010.12.17, ホノルル
- ⑧ 米倉正哲, 渡邊美穂, 仲井友子, 志水美己子, 神川悠子, 岡田欣晃, 土井健史、血小板系列特異的に特定の遺伝子を発現できるES細胞分化系の構築、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12.10、神戸ポートアイランド
- ⑨ 仲井友子、渡邊美穂、米倉正哲、志水美己子、神川悠子、岡田欣晃、土井健史、血小板分化における野生型および変異型RUNX1の機能について、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12.10、神戸ポートアイランド
- ⑩ 成瀬啓樹、蔣 志侠、舟橋伸昭、志水美己子、鈴木綾乃、西山侑児、William Aird、岡田欣晃、土井健史、血管新生関連因子Robo4の発現制御メカニズムの解析、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12.9、神戸ポートアイランド
- ⑪ 清野智史、澤 祐司、中川 貴、古賀雄一、岡田欣晃、土井健史、中川晋作、山本孝夫、金/酸化鉄磁性複合ナノ粒子を用いたタンパク質の精製、第34回日本磁気学会学術講演会、2010.9.4、つくば国際会議場
- ⑫ 岡田欣晃、Robo4 遺伝子が血管内皮細胞特異的に発現するメカニズムとは?、第11回Pharmaco-Hematologyシンポジウム、2010.6.19、日本薬学会会長井記念ホール

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l>

=ja&u=1330&a2=0000008&o=affiliation&sm=affiliation&sl=ja&sp=1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 欣晃 (OKADA YOSHIAKI)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50444500