

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580445

研究課題名(和文)プリオン蛋白遺伝子転写制御領域のエピジェネティクス

研究課題名(英文)Epigenetics in the promoter region of prion protein gene

研究代表者

佐伯 圭一 (Saeki, Keiichi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10311630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：PrP遺伝子は、組織特異的な様式で様々なレベルで発現しているが、PrP遺伝子のエピジェネティクスは不明なままである。本研究では、遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしているDNAメチル化に焦点を当てて研究を行なった。PrP遺伝子のプロモーター領域を含むCpGアイランドは、全ての組織において非メチル化にあることを示した。一方でCpGアイランド上流のメチル化は、組織ごとに種々な頻度で起こっていた。これらの結果は、PrP遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子と結論づけるものであり、CpGアイランド上流のメチル化が、組織特異的なPrP遺伝子発現を決定することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the CpG methylation upstream of exon 1 in mouse prion protein gene. We show that the CpG island including promoter region in PrP gene is nonmethylated in all tissues. On the other hand, CpG methylation in upstream region adjacent to the CpG Island has occurred in various proportions.

研究分野：微生物学

キーワード：プリオンタンパク質 プリオン エピジェネティクス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

牛海綿状脳症(BSE)やヒトのクロイツフェルトヤコブ病(CJD)などはプリオン病と呼ばれ、プリオンが病原体になっている。これらの動物やヒトでは、プリオン蛋白の感染型(PrP^{Sc})が神経細胞内に蓄積する。プリオン病の伝達および発症には病原体プリオンの侵入が必須であるが、本来宿主が持っている正常型プリオン蛋白の機能解明なしには本疾患の特徴である神経変性を説明できないと考えられる。

我が国では、BSE や CJD に関する社会不安から厚生労働省および農林水産省の研究事業として、プリオン病の高感度診断技術の開発が進行しているが、早期診断法や PrP^{Sc} の高感度検出法の確立に研究事業の重点が置かれている。また、BSE や CJD のサーベランスに重点が置かれている。このような背景から、我が国では正常プリオンタンパク質(PrP^C)の機能解明やプリオンタンパク質(PrP)の他分野研究への応用利用を目的とする研究事業はほとんど存在しない。これまで申請者は、PrP^Cの機能を明らかにするため、PrP 欠損マウス胎児脳海馬より不死化技術を使用して神経細胞株を樹立した。それらの細胞に PrP を再発現させることにより PrP がアポトーシス抑制に参与していることを明らかにし、PrP^Cの機能解明への研究足がかりを創造してきた(Kawahara. et al., Nature, 400: 225-226, 1999)。その後も PrP 遺伝子欠損細胞株および PrP 遺伝子欠損マウスを研究材料として PrP が細胞内の活性酸素除去に関連してアポトーシスを抑制していることを報告してきた。国内外において PrP^Cの機能について独自の研究材料を樹立し独創的に研究を行ない成果について報告してきた。

申請者はこれまでプリオンによる神経変性を理解するため、PrP の機能に関する研究を行ってきた。研究の過程で PrP は、健常個体においては主に中枢神経組織、中でも神経細胞で強く産生している。また、その他の臓器においての産生は、極めて低いか、ほとんど産生を確認することが困難である。しかしながら、PrP 遺伝子は、程度の差こそあれ、ほとんどの臓器で発現が確認されている。また、PrP 遺伝子はこれまで調べてきた20種類以上の株化された哺乳動物由来培養細胞で発現が確認でき、その機能としてはアポトーシス抑制に参与していることが明らかとなってきた。

最近の海外の報告において、GPI アンカーによって細胞膜に局在する PrP は、転移性胃癌に多く発現が認められ、細胞の接着に参与し、浸潤転移に参与していると言われている(Pan, Y. et al., Faseb J., 2006, 20:1886-1888)。PrP は、胃癌細胞の G1/S を促進し、PrP 遺伝子の導入によって造腫瘍性が増加し、細胞増殖が促進する(Liang et al., Faseb J., 2006, 21:2247-2256)。PrP

は、乳癌細胞株 MCF-7 の TNF 耐性能獲得に参与する(Diarra-Mehrpour M. et al., Cancer, Res., 2004, 64:719-727)といった報告がなされるようになってきている。

PrP 遺伝子発現制御領域の研究において、申請者は過去にラットを用いて PrP 遺伝子構造を決定し各組織における発現を解析した(Saeki K. et al., 1996, Virus Genes 12:15-20)。また、PrP 遺伝子上流域のプロモーター領域を決定した(Saeki K., et al., BBRC. 1996, 219: 47-52)。ウシ PrP 遺伝子プロモーター領域の報告は、品川、石黒らのグループによってされている(Inoue S. et al., 1997, J. Vet. Med. Sci., 59:175-183. Elmonir W. et al., 2010, BBRC., 397:706-710)。2011年の報告では、ヒト PrP 遺伝子転写開始点から上流 101 番目の塩基(C-101G)の遺伝子多型が散発性 CJD リスク要因として報告されている(Sanchez-Juan P et al., 2011, BMC Med. Gent., 22:73-77)。また、extracellular regulated kinase-1(ERK1)が AP-1 の活性化を通して PrP 遺伝子転写活性を調節しているという報告がされている(Cisse Met al., 2011, J Biol. Chem., 29192-29206)しかしながら、これまでのところ PrP 遺伝子転写制御領域のエピジェネティクスに関する報告はなされていない。

2. 研究の目的

申請者は、本研究準備段階において、ヒト由来各種腫瘍細胞(肺がん、胃がん、乳がん、子宮頸がん、髄膜腫など約20株)およびマウス各種臓器を用いて、リアルタイム RT-PCR によって PrP 遺伝子発現レベルの解析を進めていた。すべての腫瘍細胞で PrP 遺伝子は発現しているが、発現レベルに違いがあることが明らかとなっている。また、マウス脳発生段階によって PrP 遺伝子発現レベルは変化し、生後まもなくまでは、発現レベルが極めて低いことが明らかとなる。そこで本研究では、これまで蓄積してきた研究を踏まえて、PrP 遺伝子転写制御領域を標的としたエピジェネティクスに着手することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス各臓器およびマウス由来株化細胞を用いた遺伝子発現量の定量化

8週令 C57B/6 および Balb/c マウス各臓器(大脳、小脳、間脳、延髄、視床、視床下部、下垂体、嗅球、眼球、舌、脊椎、皮膚、胸腺、脾臓、肺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、食道、胃、小腸、大腸、盲腸、膀胱、精巣、卵巣、精嚢、子宮等)およびマウス由来各種株化培養細胞(肺がん、胃がん、腎臓がん、乳がん、肝臓がん、骨髄腫、神経芽腫等)から全 RNA

を抽出した後、逆転写を行ない、cDNA を調整した。得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行なった。リアルタイム PCR は、PrP 遺伝子 (*Prnp*)、*Pgk1*、*PbgdP*、*Gapdh*、*rRNA28s* に対する cDNA を標的としたマウス特異的プライマーを作製し、サイバークリーン蛍光を指標に PrP 遺伝子発現レベルの定量化を行なった。

(2) マウス各臓器およびマウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子転写制御領域のメチル化頻度解析

マウス各臓器およびマウス由来各種株化培養細胞から DNA を抽出した後、バイサルファイト処理による塩基置換を行なった。解析領域は PrP 遺伝子のエクソン 1 を含む上流域 749 bp および下流域 280 bp (イントロン 1 の一部) とした。この領域は、すでに本研究前段階の塩基配列解析により CpG アイランドを含んでいることがわかっている。CpG 配列を上流から 1-46 番の番号を付した。特異的なプライマーを設計し PCR を行なった。PCR 産物は直接またはベクターに組み込んだ後、塩基配列を決定を行なった。元々の遺伝子配列とバイサルファイト後の遺伝子配列を比較し、CpG メチル化部位を特定し、メチル化頻度 (%) とメチル化パターンを決定 (Bisulfite Sequencing PCR 法) した。また、バイサルファイト PCR については、特定領域の DNA メチル化を一塩基単位で解析するため、DNA メチル化部位特異的プライマーを設計し、リアルタイム PCR を用いて Methylation Specific PCR を行なった。

4. 研究成果

(1) マウス各組織における PrP 発現レベルと PrP 遺伝子発現制御領域のメチル化に関する研究成果

研究の主な成果

マウス各組織 (34 組織) の PrP 遺伝子発現レベルを明らかにした。PrP 遺伝子プロモーターと考えられる領域についてマウス各組織における詳細なメチル化パターンを明らかにした。C57BL マウス各組織 (34 組織) から DNA を抽出し、メチル化頻度を調べた。9-43 番目の CpG 配列は、CpG アイランドに属した。マウスで推定されるプロモーター領域には、13-23 番目の CpG 配列が含まれた。1 および 2 番目の CpG 配列では、すべての検体においてメチル化が認められた。3 および 4 番目では、精巢のみが非メチル化状態であった。5-7 番目では、一部の組織に低い頻度のメチル化が認められたが、ほとんどの組織は非メチル化状態であった。8-46 番目では、すべての組織で非メチル化状態であった。

(2) マウス由来株化培養細胞における

PrP 遺伝子発現レベルと PrP 遺伝子発現制御領域のメチル化に関する研究成果

研究の主な成果

マウス由来株化培養細胞を用いたプリオン蛋白遺伝子の発現と DNA メチル化状態の解析した。8 種類のマウス由来株化細胞を用いて、定量 RT-PCR および Bisulfite Sequencing PCR 法によって、遺伝子発現量およびメチル化状態を調べた。PrP 遺伝子発現は、調べたすべての細胞株で認められ、神経芽細胞株 C-1300 で一番高い発現を示したが、大脳の発現と比較すると約 17% であった。マクロファージ由来細胞株 RAW264.7 の発現が一番低く、C-1300 の約 3% であった。

すべての細胞株において、9-46 番目の CpG は、非メチル化状態であった。このことは、すべての組織や細胞において、PrP 遺伝子が発現している結果と一致する。さらに、C-1300 は、上流 1-8 番目の CpG においても非メチル化状態であった。一方で胚由来の神経細胞分化能を有する P19C6 では 1-8 番目においてもメチル化が認められ、PrP 遺伝子発現は、C-1300 の 6% であった。1-8 番目のメチル化状態は、細胞株ごとに様々であったが、P19C6 および同じく胚由来の線維芽細胞株 STO (C-1300 の発現と比較して 87%) において高いメチル化が認められた。以上より発現量の違いは、非メチル化領域に結合する転写制御因子の組み合わせが細胞種ごとに異なることが原因と推察された。

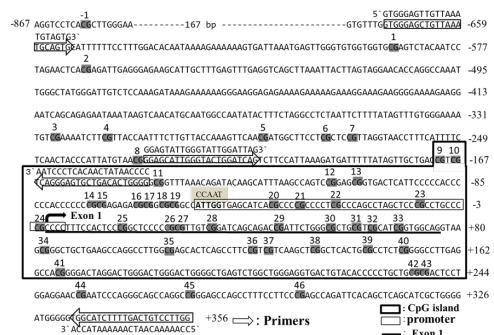


図 1. PrP 遺伝子エクソン 1 上流部の塩基配列解析領域に含まれる CpG 配列を上流から 1 46 と番号を付した。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

PrP 遺伝子プロモーター領域だけでなく CpG アイランドを含む 8-46 番目の CpG 配列では、すべての検体で非メチル化状態であった。このことは、PrP 遺伝子発現が ON 状態を示唆し、すべての組織や株化培養細胞で遺伝子発現しているとするとする見解を強く支持す

る結果となった。一方、1-7 番目のメチル化状態は組織や株化培養細胞によって様々な頻度 (%) を示したことから、これらの CpG 配列のメチル化が、PrP 遺伝子発現レベルの制御に関与していると考えられ、PrP 転写制御に関する新たな知見を提供した。

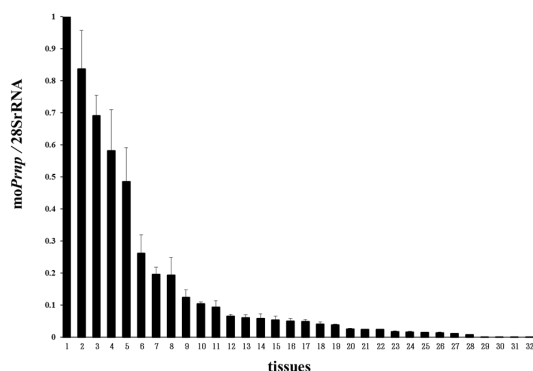


図 2. マウス各組織における PrP 遺伝子発現レベル

- 1.Cerebrum 2.Cerebellum 3.Diencephalon
- 4.Thalamus 5.Olfactory bulb 6.Medulla oblongata
- 7.Spinal cord 8.Uterus 9.Kidney
- 10.Lung 11.Eyeball 12.Adrenal gland
- 13.Colon 14.Appendix 15.Cecum 16.Thigh muscle
- 17.Stomach 18.Rectum 19.Heart
- 20.Ovaria 21.Glossa 22.Seminal vesicle
- 23.Spleen 24.Thymus 25.Bladder 26.Liver
- 27.Testis 28.Ileum 29.Jejunum 30.Duodenum
- 31.Gallbladder 32.Pancreas

今後の展望

今回得られた知見より、PrP 遺伝子発現制御領域のメチル化状態が明らかになったことから、これらの領域に関与してくるであろう転写制御因子に関する研究に現在着手している。また、PrP の本来持っている生理活性を明らかにするため、PrP の翻訳後修飾の研究に着手した。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

烏雲 達来、竹山 夏実、黒川 拓郎、土井 雄悟、松尾 栄子、河野 潤一、佐伯 圭一、マウス由来株化培養細胞におけるプリオン蛋白遺伝子の発現と DNA メチル化状態、2014.9、第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道)

佐伯 圭一、烏雲 達来、松尾 栄子、河野 潤一、日下部 美保、日下部 守昭、

Stromal tenascin C regulates a prion protein gene expression in tumor tissues., 2013.10、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県)

烏雲 達来、竹山 夏実、黒川 拓郎、土井 雄悟、松尾 栄子、河野 潤一、佐伯 圭一、マウスプリオン蛋白遺伝子発現制御領域のメチル化に関する研究、2013.9、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜県)

烏雲 達来、中山 翔、松尾 栄子、河野 潤一、山崎 智広、中田 大介、金聖大、紅林 淳一、磯西 成治、日下部 守昭、佐伯 圭一、テネイシン C 欠損がおよぼすプリオン蛋白遺伝子発現への影響、2012.9、第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学(岩手県)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
佐伯 圭一(SAEKI, Keiichi)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10311630

(2)研究分担者
河野 潤一(KAWANO, Junichi)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：40127361

(3)連携研究者

松尾 栄子 (MATSUO, Eiko)
神戸大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：40620878

竹山 夏実 (TAKEYAMA, Natsumi)
(財)日本生物科学研究所・研究員
研究者番号 20414089