

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460409

研究課題名(和文)代謝カスケード調節遺伝子KLF14の転写制御機構・生理機能の解明

研究課題名(英文)KLF14 biology: its physiological roles and transcriptional regulation

## 研究代表者

中林 一彦 (NAKABAYASHI, Kazuhiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長

研究者番号：10415557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：KLF14は代謝関連遺伝子群のマスター制御因子であり、近傍SNPが複数の代謝関連疾患感受性を示す。脂肪組織におけるKLF14の生理機能を明らかにすること、Mest-Klf14インプリント遺伝子クラスターの発現制御機構を解明する体制を整えること、を目的として研究を実施した。ノックアウトマウス解析により、KLF14が肥満誘導時の白色脂肪組織リモデリング制御に関与することを発見した。ゲノム編集技術により、Mest-Klf14クラスターのインプリント制御領域を欠失させたマウス系統の作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：KLF14 has been proposed to act as a master regulator of key metabolic genes in adipose tissue. Cis-regulatory SNPs in the KLF14 locus are associated with susceptibility to multiple metabolic diseases including T2D. We aimed to elucidate physiological functions of KLF14 in the white adipose tissue (WAT), and to establish materials and methods to study molecular mechanisms underlying imprinted gene expression of Mest and Klf14 genes, which are located within a 200kb genomic interval. We revealed that KLF14 involves in controlling obesity-induced inflammation in WAT by analyzing the phenotype of Klf14 knockout mice. We also successfully established mouse lines with a targeted deletion of the germline differentially methylated region at the Mest promoter region, which is expected to play a central role in the regulation of imprinted expression of Klf14.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノムインプリンティング KLF14 白色脂肪組織

## 1. 研究開始当初の背景

多因子疾患とゲノムインプリンティング：インプリント遺伝子（または遺伝子群）の変異・欠失や発現制御機構の破綻が胎児・胎盤の発育異常、成体での代謝・行動異常などを引き起こすことは、これまでに主に希少インプリンティング疾患や遺伝子改変マウスモデルの解析から明らかにされてきた。インプリント遺伝子の異常が希少疾患に限らず、ありふれた（罹患率の高い）疾患にも関与していることを直接・間接的に示す報告が相次いでいる。近年の全ゲノム関連解析で、複数の糖尿病感受性ゲノム領域がインプリント遺伝子クラスター内に同定された（DLK1-MEG3領域内のI型糖尿病感受性多型、KCNQ1遺伝子内、H19遺伝子近傍、KLF14遺伝子上流のII型糖尿病感受性多型）。これらの疾患感受性多型ではparent-of-origin effect（父親か母親のどちらか一方から伝達された場合のみ疾患との関連がみられること）が確認されている。また、マウス脳のトランスクリプトーム解析により全遺伝子の5%程度（non-coding RNAを含む1300遺伝子）が親由来依存的なアレル間発現バイアスを示すことが明らかになった(2)。脳神経系の発達・機能におけるインプリント遺伝子群の重要性が提唱されていたが、この報告はその仮説を後押しし、インプリント発現制御機構の破綻が精神神経疾患に関与する可能性を示唆する。インプリント遺伝子群の発現制御機構・生理機能の解明は、肥満、糖尿病、神経疾患、がんなどの発症機序の解明に直結する可能性を秘めている。

## 2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究成果を進展させると同時に上記のような学術的背景も考慮し、本研究では主に脂肪組織におけるKlf14の生理機能を明らかにすること、Mest-Klf14インプリント遺伝子クラスターの染色体ドメインレベルでの発現制御機構を解明することを研究目標とする。

(1) Klf14生理機能の解明：Klf14-KOマウスおよび野生型コントロール由来の脂肪組織について発現マイクロアレイ解析により発現変動遺伝子群を同定し、それらの機能的特徴を明らかにする。肥満・代謝関連の表現型を解析し、Klf14-KOマウスがメタボリック症候群モデルとして有用であるか否かを評価する。

(2) インプリント発現制御機構解析：Mest-DMR欠損マウス系統を作出・解析し、Mest-DMRが200kb離れたKlf14遺伝子のインプリント発現を制御する体制を整える。

## 3. 研究の方法

### (1) Klf14ノックアウトマウス解析

米国 Knockout Mouse Project より入手した Klf14-KO マウス系統を解析する。KO アレルでは Klf14 の ORF が LacZ に置換されており、LacZ は Klf14 内在性プロモーター依存的に発現する。ガラクトシダーゼアッセイにより胎仔期・新生仔期・成体期における Klf14 の発現プロファイルを作成する。

II 型糖尿病感受性を示す KLF14 遺伝子上流多型 (rs4731702) のリスクアレルは、脂肪組織における KLF14 発現量低下ならびにインスリン抵抗性との関連を示す。そこで、Klf14-KO マウスの糖尿病関連表現型の有無を検討すべく、インスリン負荷試験、経口糖負荷試験を実施する。また体重・脂肪組織重量の変化、脂肪細胞肥大化について検討する。これらの解析は通常食餌ならびに高脂肪食条件下で実施する。

Klf14-KO マウスおよび野生型コントロール由来の脂肪組織について発現マイクロアレイ解析により発現変動遺伝子群を同定し、Gene Ontology 解析やプロモーター配列解析によりそれらの機能的特徴を明らかにする。

### (2) Mest-DMR 欠失マウス系統作出

父性発現遺伝子 Mest のプロモーター領域 CpG アイランドは germline DMR であり、母方アレルがメチル化されている。母性発現遺伝子 Klf14 は Mest-DMR から約 200kb の距離に位置している。Mest-DMR (3kb 領域) を標的とするジーンターゲットングにより Mest-DMR 欠損 ES 細胞クローンを取得する。

## 4. 研究成果

### (1) 白色脂肪組織における KLF14 の生理機能解明

高脂肪食負荷（投与期間 8 週間）後の Klf14-/- 個体群並びにコントロール (Klf14+/+) 群由来の組織を対象とした発現アレイ解析から、Klf14-/-マウス由来白色脂肪組織で炎症関連遺伝子群、細胞周期関連遺伝子群の発現が高頻度に低下していることを見出した(図1)。KLF14 が肥満誘導時の白色脂肪組織リモデリングに関与しており、KLF14 ノックアウトマウスでは肥満誘導時の白色脂肪前駆細胞の増殖能が低下している可能性が考えられた。そこで、Klf14-/+ 個体（母方アレル Klf14 が欠失しており、父方アレル Klf14 は発現しない）並びにコントロール (Klf14+/+) 群に対してより長期間の高脂肪食負荷実験（投与期間 24 週間）を実施した。それらの個体の白色脂肪組織の解析を継続し、Klf14-/+ 個体由来の脂肪組織では、コントロールと比較して脂肪細胞サイズ分布が異なること、具体的には小型細胞（前駆細胞）が減少し、成熟細胞が肥大化していることを見出した。KLF14 ノックアウトマウ

スにおいては、高脂肪食負荷時の白色脂肪組織における脂肪蓄積能が低下している可能性が考えられる。

## (2) Mest-DMR ノックアウトマウスの解析

Crispr-Cas9 システムによる受精卵ゲノム改変により、Mest-DMR 欠失系統を 2 系統、Mest-DMR 逆位系統を 1 系統樹立した。Mest-Klf14 のクロマチン相互作用を野生型マウス・Mest-DMR ノックアウトマウスで解析するに際し、マウス ES 細胞をモデルに 4C-seq 法 (遠距離クロマチン相互作用を検出する方法の一つ) の実験プロトコール・データ解析プロトコールを整備した。

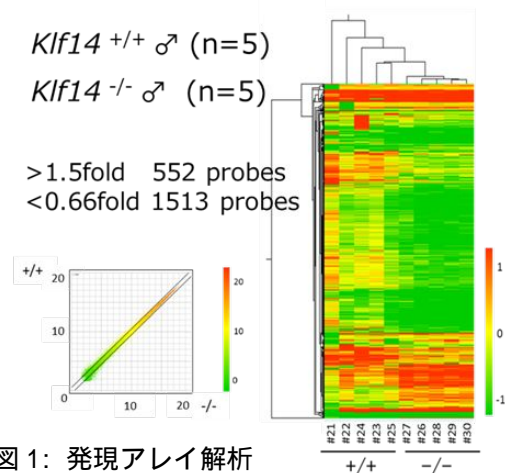


図 1: 発現アレイ解析

## 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 57 件) 全て査読あり

Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, Akamatsu W, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H (2016) Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom* (Kyoto). Dec 21. doi: 10.1111/cga.12206.

Sánchez-Delgado M, Court F, Vidal E, Medrano J, Monteagudo-Sánchez A, Martín-Trujillo A, Tayama C, Arnaud P, Iglesias-Platas I, Kondova I, Bontrop R, Poo-Llanillo ME, Marques-Bonet T, Nakabayashi K, Simón C, Monk D (2016) Human oocyte-derived methylation differences persist in the placenta revealing widespread transient imprinting. *PLoS Genet*. 12:e1006427. doi: 10.1371/journal.pgen.1006427.

Kagami M, Matsubara K, Nakabayashi K, Nakamura A, Sano S, Okamura K, Hata K, Fukami M, Ogata T (2017) Genomewide allelic methylation analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome. *Genet. Med*. 19:476-482. doi: 10.1038/gim.2016.123.

Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K,

Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, and Hatada I (2016) Targeted manipulation of DNA methylation in vivo using CRISPR/Cas9 and a repeating peptide array-based amplification. *Nat Biotechnol*. 34:1060-1065. doi: 10.1038/nbt.3658.

Sano S, Matsubara K, Nagasaki K, Kikuchi T, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Kagami M, Ogata T (2016) Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with multilocus methylation defects: a female-dominant phenomenon? *J. Hum. Genet*. 61:765-769. doi: 10.1038/jhg.2016.45.

Morita S, Nakabayashi K, Kawai T, Hayashi K, Horii T, Kimura M, Kamei Y, Ogawa Y, Hata K, Hatada I (2016) Gene expression profiling of white adipose tissue reveals paternal transmission of proneness to obesity. *Sci. Rep*. 6:21693. doi: 10.1038/srep21693.

Maupetit-Méhouas S, Montibus B, Nury D, Tayama C, Wassef M, Kota SK, Fogli A, Cerqueira Campos F, Hata K, Feil R, Magueron R, Nakabayashi K, Court F, Arnaud P (2016) Imprinting control regions (ICRs) are marked by mono-allelic bivalent chromatin when transcriptionally inactive. *Nucleic Acids Res*. 44:621-635. doi: 10.1093/nar/gkv960.

Sanchez-Delgado M, Martín-Trujillo A, Tayama C, Vidal E, Esteller M, Iglesias-Platas I, Deo N, Barney O, Maclean K, Hata K, Nakabayashi K, Fisher R, Monk D (2015) Absence of maternal methylation in biparental hydatidiform moles with NLRP7 maternal-effect mutations reveals widespread placenta-specific imprinting. *PLoS Genet*. 11:e1005644. doi: 10.1371/journal.pgen.1005644.

Matsubara K, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Ogata T, Yamazawa K (2015) Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions. *Clin Epigenetics*. 7:90. doi: 10.1186/s13148-015-0124-y.

Miyata K, Miyata T, Nakabayashi K, Okamura K, Naito M, Kawai T, Takada S, Kato K, Miyamoto S, Hata K, Asahara H (2015) DNA methylation analysis of human myoblasts during in vitro myogenic differentiation: de novo methylation of promoters of muscle-related genes and its involvement in transcriptional down-regulation. *Hum. Mol. Genet*. 24:410-423. doi: 10.1093/hmg/ddu457.

Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A (2014) The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat. Commun*. 5:5464. doi: 10.1038/ncomms6464.

Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T (2014) Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat*.

*Commun.* 5:4320. doi: 10.1038/ncomms5320.

Romanelli V, Nakabayashi K, Vizoso M, Moran S, Iglesias-Platas I, Sugahara N, Simón C, Hata K, Esteller M, Court F, Monk D (2014) Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. *Epigenetics* 9:783-790. doi: 10.4161/epi.28323.

Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D (2014) Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res.* 24:554-569. doi: 10.1101/gr.164913.113.

〔学会発表〕(計 25 件)

富川順子, 岡村浩司, 阿久津 英憲, 田中智, 秦健一郎, 中林一彦: クロマチン高次構造に基づいた細胞系列特異的エンハンサーの同定 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30 横浜

中林一彦: 成育・周産期関連疾患解明のためのエピゲノム解析 金沢大学・学際科学実験センターセミナー, 2016.11.18 金沢

原聡史, 斎藤剛志, 岡村浩司, 林恵子, 伊藤充輝, 秦健一郎, Anne C. Ferguson-Smith, 中林一彦, 高田修治: マウス Dlk1-Dio3 領域における新規制御領域の探索 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 2016.5.19 大阪

父性遺伝する食事誘導性肥満におけるインプリント遺伝子の解析と新規金プリント遺伝子の探索について: 森田純代, 中林一彦, 河合智子, 林恵子, 堀井拓郎, 木村美香, 亀井康富, 小川佳宏, 秦健一郎, 畑田出穂 第 10 回日本エピジェネティクス研究会 2016.5.19 大阪

Tayama C, Takahashi R, Tomikawa J, Okita H, Hata K, Okamura T, Nakabayashi K. KLF14 involves in controlling inflammation in the white adipose tissue. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.5, Kyoto

Tayama C, Takahashi R, Tomikawa J, Okita H, Hata K, Okamura T, Nakabayashi K. KLF14 involves in controlling inflammation in the white adipose tissue. American Society of Human Genetics Annual Meeting. 2015.10.8 Baltimore

中林一彦: 次世代シーケンサーを用いた遺伝子・ゲノム診断 第 25 回日本サイトメトリ学会学術集会 2015.7.12 東京

中林一彦: ヒトインプリントーム解析から見えてきたヒト(霊長類)特異的エピゲノム進化 霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖

細胞・エピゲノム研究集会 2014.8.27 犬山

⑨田山千春、矢延(高梨)理絵子、富川順子、高田修司、津村秀樹、大喜多肇、秦健一郎、岡村匡史、中林一彦: 転写因子 KLF14 の脂肪細胞における炎症制御への関与 第 37 回日本分子生物学会 2014.11.26

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.researchgate.net/profile/Kazuhiko\\_Nakabayashi](https://www.researchgate.net/profile/Kazuhiko_Nakabayashi)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中林一彦 (NAKABAYASHI, Kazuhiko)

国立成育医療研究センター・研究所・室長  
研究者番号: 10415557

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

高田修治 (TAKADA, Shuji)

国立成育医療研究センター・研究所・部長  
研究者番号: 20382856

富川順子 (TOMIKAWA, Junko)

国立成育医療研究センター・研究所・  
研究員

研究者番号: 80534990

田山千春 (TAYAMA, Chiharu)

国立成育医療研究センター・研究所・  
研究員

研究者番号: 60774445

### (4) 研究協力者

菅原直子 (SUGAHARA, Naoko)

国立成育医療研究センター・研究所・  
研究補助員