

論文の内容の要旨

論文題目

「Hepatocyte Nuclear Factor 1 α/β と DNA メチル化によるトランスポーターの発現制御」

氏名 菊地 良太

【背景・目的】

尿細管上皮細胞を介した物質輸送は糸球体濾過とともに生体異物・内因性物質の尿中排泄・再吸収に重要な役割を果たしている。Organic Anion Transporter 3 (OAT3/SLC22A8)および Urate Transporter 1 (URAT1/SLC22A12)は腎臓近位尿細管に特異的に発現し、それぞれ多様なアニオン性医薬品の血液中から上皮細胞内への取り込み、管腔からの尿酸の再吸収を司っている。これらのトランスポーターの発現・機能変動は、基質化合物の体内動態に影響を及ぼす。しかし肝臓に発現するトランスポーターと比較して、腎臓におけるトランスポーターの発現制御機構については殆ど明らかにされていない。

hOAT3 と hURAT1 のプロモーター領域について転写因子結合部位の *in silico* 予測を行ったところ、Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1)の認識配列と相同性の高い配列が存在することが明らかになった。HNF1 は、HNF1 α と HNF1 β の二つの isoform 間で homo-あるいは heterodimer を形成し、薬物トランスポーターを含む多くの肝臓特異的遺伝子の転写を正に制御している。HNF1 は腎臓のほか、OAT3 や URAT の非発現臓器である肝臓・小腸・膵臓などにも発現しており、HNF1 だけでは OAT3 と URAT1 の組織選択的な発現を説明することはできない。本研究では HNF1 による組織特異的発現制御を可能にするメカニズムとして、DNA メチル化を基盤とする遺伝子発現のエピジェネティック制御を仮定した。遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化は、近傍のクロマチン領域を凝集させ遺伝子発現を負に制御する。近年、DNA メチル化が遺伝子の組織特異的発現を制御する例が多く報告されていることから、トランスポーターの組織特異的発現がエピジェネティックなレベルで

制御されている可能性がある。

本研究では、OAT3 及び URAT1 の腎臓特異的発現制御における HNF1 と DNA メチル化の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

1. HNF1 α / β と DNA メチル化による hOAT3 の発現制御

hOAT3、mOat3、rOat3 のプロモーター領域の in silico 解析

Mat Inspector を用いて hOAT3 の転写開始点上流約 300 bp の配列に存在する転写因子結合サイトを検索した。その結果、上流-32/-27 の位置に TATA motif、-65/-53 の位置に HNF1 motif が存在し、これらは mOat3、rOat3 のプロモーター領域においても保存されていることが明らかとなった。

hOAT3 promoter 活性の解析

hOAT3 の minimal promoter を決定するため、種々 deleted promoter construct を作成し 3 種類のヒト由来細胞株 (HepG2、Caco-2、HEK293) を用いて Luciferase assay を行った。その結果 hOAT3 の 5' 調節領域の -308/+6 の領域が minimal promoter として機能することが明らかとなった。

HepG2、Caco-2、HEK293 における HNF1 α / β の発現

Real-time PCR 法及び Western blot 法により、HepG2 には主に HNF1 α が、Caco-2 には HNF1 α と HNF1 β の両方が発現していることが明らかとなった。一方で、HEK293 ではどちらの発現も検出限界以下であった。

HNF1 による hOAT3 の転写活性化

Site-directed mutagenesis 法により hOAT3 promoter の HNF1 motif に変異を導入し、転写活性に及ぼす影響を検討した。HNF1 motif の変異により、内因性に HNF1 α / β を発現する HepG2 及び Caco-2 においては転写活性が約 50%に減少した一方で、HNF1 α / β を欠く HEK293 においては活性に変化は無かった。さらに HNF1 α 及び HNF1 β の発現ベクターを作成し、HEK293 を用いて hOAT3 promoter 活性に対する HNF1 α / β の強制発現の影響を検討したところ、wild type promoter では HNF1 α / β の発現により転写活性が顕著に上昇したが、HNF1-mutated promoter では変化は見られなかった (Fig. 1)。これらの結果から、hOAT3 の転写は HNF1 により正に制御されていることが明らかとなった。

hOAT3 promoter への HNF1 の結合

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)の結果、hOAT3 プロモーター領域の HNF1 motif

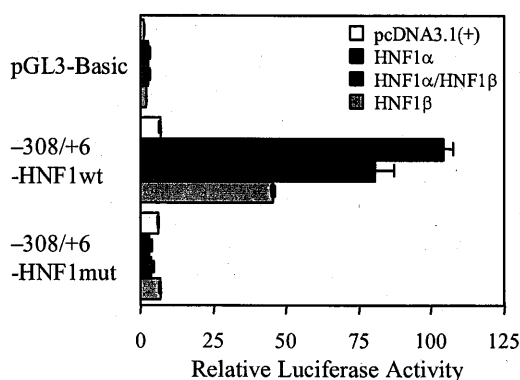


Fig. 1. Transactivation of hOAT3 promoter by HNF1 α / β

には HNF1 α /HNF1 α homodimer 及び HNF1 α /HNF1 β heterodimer が結合することが明らかとなった。

DNA メチル化による hOAT3 の転写制御

hOAT3 minimal promoter を in vitro でメチル化し、Luciferase assay により DNA メチル化が転写活性に及ぼす影響を検討した。いずれの細胞種においても in vitro メチル化により hOAT3 の転写活性が大幅に減少したことから、hOAT3 の発現は DNA メチル化により転写レベルで負に制御されることが示唆された。さらに HEK293 に HNF1 α / β を一過性に発現させ、DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC) で処理し、RT-PCR 法により hOAT3 の発現を検討した (Fig. 2)。HNF1 α 単独あるいは HNF1 α と HNF1 β の両者を強制発現させ、DNA を脱メチル化することにより、hOAT3 の発現が転写誘導されることが明らかとなった。これらの結果から、hOAT3 の転写には HNF1 α / β の発現と DNA 脱メチル化の協調作用が必要であることが示唆された。

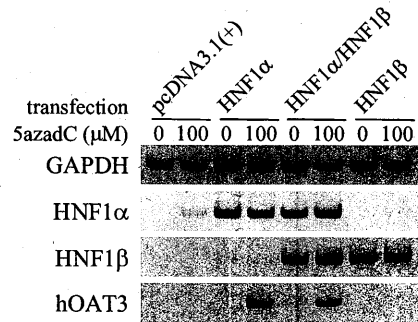


Fig. 2. Reactivation of hOAT3 expression

2. HNF1 α / β と DNA メチル化による hURAT1/mUrat1 の組織特異的発現制御

HNF1 による URAT1 promoter の活性化

hURAT1 の minimal promoter 活性に必要な cis-element は転写開始点上流-253/-39 の領域に存在することが報告されている。この領域内の種間で保存された HNF1 motif の重要性を検討するため、hURAT1/mUrat1 minimal promoter construct を作成し Luciferase assay を行った。hURAT1 promoter は HepG2、Caco-2 においては有意な promoter 活性を示したが、HNF1 motif に変異を導入することで活性は失われた。一方で、HEK293 では hURAT1 promoter は有意な活性を示さなかったが、HNF1 α / β を強制発現させることで活性が顕著に上昇した。また mUrat1 promoter も HNF1 α / β の強制発現により活性が上昇した。これらの結果から、hURAT1/mUrat1 の minimal promoter 活性は HNF1 に大きく依存していることが明らかとなった。

hURAT1 promoter と HNF1 の相互作用

hURAT1 の HNF1 motif を probe とした EMSA の結果、HNF1 α /HNF1 α homodimer、HNF1 α /HNF1 β heterodimer、HNF1 β /HNF1 β homodimer のいずれも HNF1 motif に結合可能であることが示された。

HNF1 α -null マウスにおける mUrat1 の発現量低下

Real-time PCR 法により、HNF1 α -null マウス腎臓においては wild type と比較して mUrat1 の発現が顕著に減少していることが明らかとなった。

URAT1 発現のエピジェネティック制御

Luciferase assay により、hURAT1/mUrat1 の転写活性はプロモーター領域の DNA メチル化に

より顕著に低下することが示された。mUrat1 の組織特異的発現制御における DNA メチル化の関与を明らかにするため、マウス肝臓、腎臓皮質、及び腎臓髄質より genome DNA を抽出し、bisulfite sequencing 法によりプロモーター領域の DNA メチル化プロファイルを決定した。その結果、肝臓および腎臓髄質においてプロモーター領域は高メチル化状態である一方で、腎臓皮質では低メチル化状態であった (Fig. 3)。このメチル化プロファイルは腎臓皮質内の近位尿細管に特異的に発現する mUrat1 の組織分布と一致していた。

【考察・結論】

本研究の結果、OAT3、URAT1 の転写制御にはジェネティックな因子 (HNF1 α/β) とエピジェネティックな因子 (DNA メチル化) が関与していることが示唆された。OAT3、URAT1 はともに腎臓皮質近位尿細管に特異的に発現

するが、先に述べたように HNF1 α/β は腎臓以外にも肝臓・小腸・膵臓等に発現している。この組織分布の不一致は、トランスポーター発現のエピジェネティック制御により説明される。HNF1 motif 自身は DNA メチル化の標的配列である CpG dinucleotide を含まないが、近傍のプロモーター領域のメチル化によりクロマチンが凝集することで HNF1 の結合が妨げられ、DNA メチル化依存的な遺伝子サイレンシングが起きている可能性がある。この HNF1 と DNA メチル化の協調作用により、OAT3、URAT1 の組織特異的発現が確立していることが示唆された。

【参考文献】

Kikuchi R, Kusunohara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez FJ, Sugiyama Y: Regulation of the Expression of Human Organic Anion Transporter 3 by Hepatocyte Nuclear Factor 1 α/β and DNA Methylation. *Mol Pharmacol* 70: 887-896, 2006

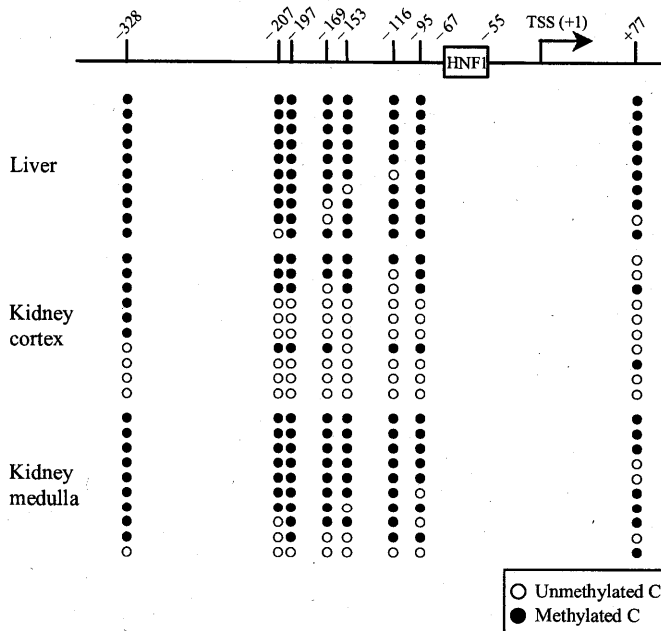


Fig. 3. DNA methylation profile of the mUrat1 promoter