

エピジェネティック制御機構に基づくヒト腎臓 SGLT2 遺伝子の発現調節機構の解明

武居, 宏明

<https://doi.org/10.15017/1931848>

出版情報 : Kyushu University, 2017, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

【序論】

Sodium-glucose co-transporter 2 (*SGLT2*) は腎近位尿細管上皮細胞に特異的に発現するグルコーストランスポーターであり、糸球体でろ過されたグルコースの再吸収に重要な役割を有している [1]。 *SGLT2* の発現部位や機能に関する報告が多くあがっている一方で、 *SGLT2* 遺伝子の発現調節機構についての報告は未だに少ない。これまでに *SGLT2* の発現調節を担う転写因子の特定を試みた研究についてはいくつか報告がある [2,3]。しかし、転写因子のみでは腎臓特異的に *SGLT2* 遺伝子が発現するメカニズムを十分に解明できていない。従って、ヒト生体内における *SGLT2* 遺伝子の詳細な発現調節機構を解明するために新たな知見が求められる。

ヌクレオソームはクロマチンの基本単位であり、ヌクレオソームを形成する領域では転写調節因子の DNA への結合が阻害され、遺伝子発現が抑制される。近年の研究により、ヌクレオソーム占有状態に組織特異性が認められており、組織特異的な遺伝子発現調節に寄与していると考えられている [4]。そこで本研究では、プロモーター領域のヌクレオソーム占有状態による転写調節機構に着目し、ヒト腎臓における *SGLT2* 遺伝子の発現調節に関与するヌクレオソーム占有状態および転写調節因子の同定とその機能評価について検討を行った。

【方法】

Luciferase assay : *SGLT2* 5'-上流域 (5'-FR) 約 3,000 bp を段階的に組み込んだレポーターベクターおよび hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α) 発現ベクターを HK-2 細胞に導入し、*SGLT2* の転写活性を評価した。

mRNA 発現定量 : 細胞内の RNA を回収し、逆転写反応によって作製した cDNA を用いて定量 PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法により *SGLT2* mRNA 発現量を定量した。

ヌクレオソーム占有解析 : ヌクレオソーム解析手法 nucleosome occupancy and methylome sequencing (NOMe-Seq) および nucleosome-scanning assay (NuSA) を行い、*SGLT2* 5'-FR におけるヌクレオソーム占有状態を解析した。

ヒストンアセチル化の促進 : HK-2 細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin a (TSA) を曝露し、5'-FR のヒストンアセチル化促進による *SGLT2* 発現変動機構を解析した。

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay) : アセチル化ヒストン H3 および HNF1 α を認識する抗体で免疫沈降を行い、定量 PCR により *SGLT2* 5'-FR におけるヒストンアセチル化状態および HNF1 α 結合状態を定量した。

Nascent RNA capturing : ウラシル標識体 5-ethynyl uridine (5-EU) を細胞に曝露し、標識化された RNA を磁気分離法にて回収することで、TSA 処理後に合成された RNA (nascent RNA) 中の HNF1 α による *SGLT2* mRNA 発現変動への影響を評価した。

【結果】

HK-2 細胞における *SGLT2* 5'-FR の転写活性および *SGLT2* mRNA 発現量の定量

Luciferase assay により、HK-2 細胞内の *SGLT2* 遺伝子の転写活性が非常に弱い状態にあることを認めた (Fig. 1a)。ヒト腎組織との比較により、HK-2 細胞の *SGLT2* mRNA 発現量が極めて低いことを明らかとした (Fig. 1b)。

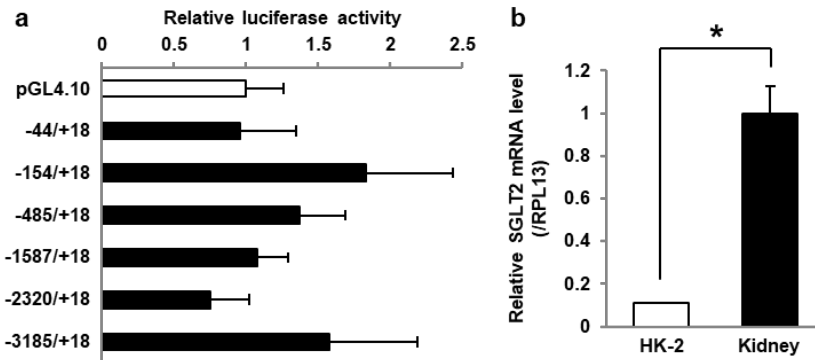


Fig. 1 Analysis of transcriptional activity of *SGLT2* 5'-FR and *SGLT2* mRNA levels in HK-2 cells

(a) Luciferase activity of a series of reporter constructs containing *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells. Results are expressed as fold increases in pGL4.10. (b) *SGLT2* mRNA levels in HK-2 cells and the human kidney were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to *SGLT2* mRNA levels in the human kidney. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

HK-2 細胞およびヒト腎組織における *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有解析

ヌクレオソーム解析を行ったところ、ヒト腎組織と比較して、HK-2 細胞の *SGLT2* プロモーター領域に高度なヌクレオソーム占有状態が認められた (Fig. 2)。

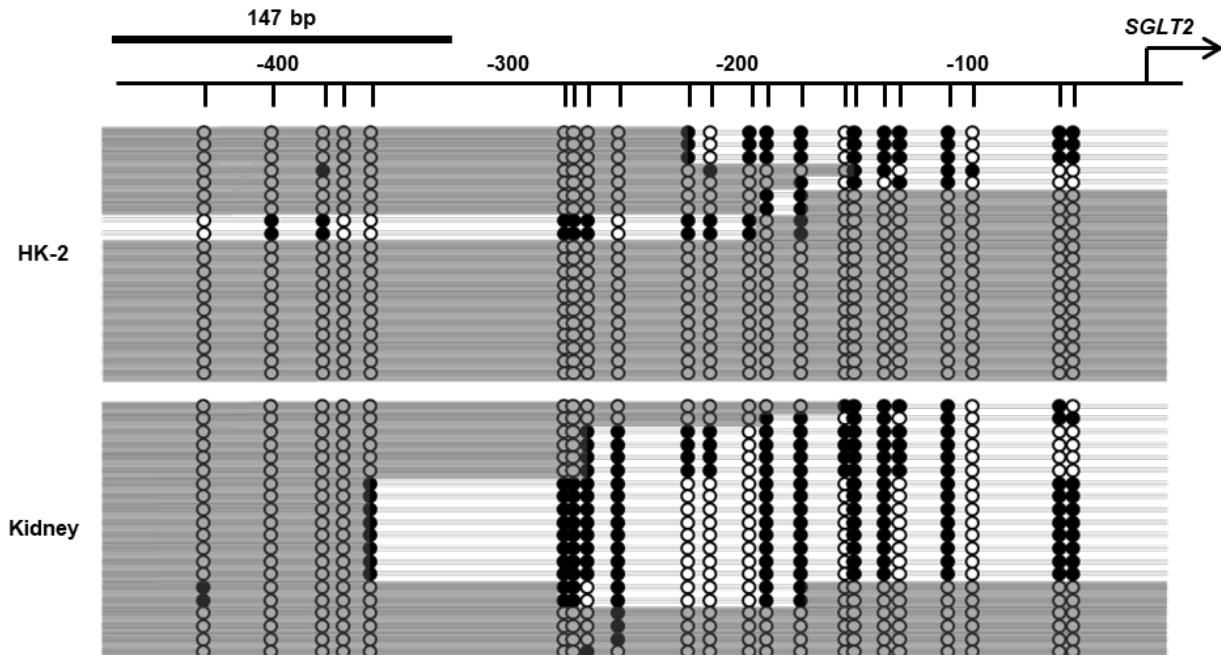


Fig. 2 Analysis of nucleosome occupancy in *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells and the human kidney

NOMe-Seq data of *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells and the human kidney. The arrow indicates the *SGLT2* TSS. Vertical lines indicate GpC sites. White circles represent unmethylated GpC sites and black circles represent methylated GpC sites. Gray bars represent nucleosome occupancy, which is the region of consecutive unmethylated GpC sites over 147 bp.

TSA 処理による *SGLT2* 発現および *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有状態への影響評価

ヒストンアセチル化促進剤 TSA を HK-2 細胞に処理した結果、HK-2 細胞内の *SGLT2* mRNA 発現量の増加、*SGLT2* プロモーター領域へのヒストン H3 のアセチル化の促進に伴うヌクレオソーム占有率の減少が認められた (Fig. 3)。

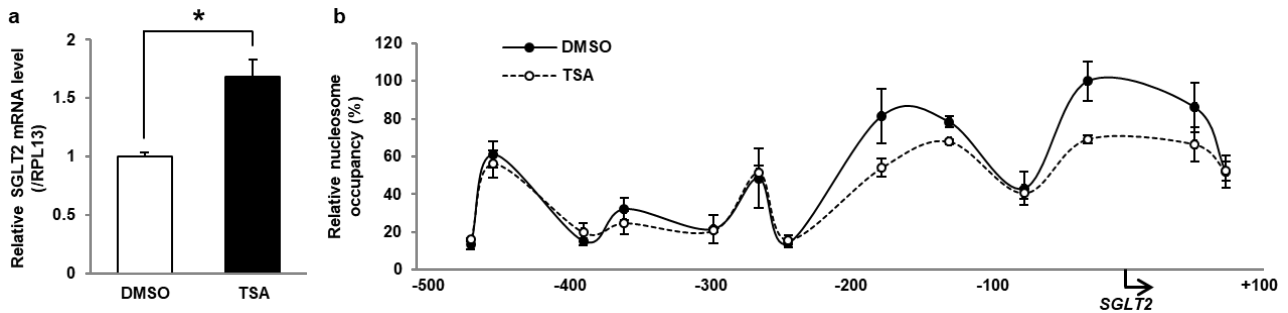


Fig. 3 Influence of the TSA treatment on *SGLT2* expression and histone acetylation in *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells

HK-2 cells were treated with DMSO or TSA for 24 hours. (a) *SGLT2* mRNA levels were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to *SGLT2* mRNA levels in DMSO-treated cells (control). Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$. (b) NuSA data of 5'-FR in DMSO- (black circles) or TSA-treated cells (white circles). Relative nucleosome occupancy is expressed relative to the level of nucleosome occupancy in each sample without the MNase treatment and indicated by the midpoints of each amplicon.

プロモーター領域への HNF1 α 結合による *SGLT2* の転写活性への影響評価

In silico 解析により、*SGLT2* 転写開始点より -51 ~ -37 bp の範囲において HNF1 α の結合が推定された。TSA 処理によって、HK-2 細胞における HNF1 α 結合予測サイト周辺への HNF1 α 結合頻度の増加が認められた (Fig. 4a)。HNF1 α を発現させた HK-2 細胞における luciferase assay の結果より、HNF1 α 結合予測サイトを含むレポーターベクターでは HNF1 α による転写活性の増加が認められ、同サイトを欠失させたレポーターベクターでは HNF1 α によって増加した活性の消失を認めた (Fig. 4b)。また、total および nascent RNA を用いた定量 PCR により、TSA 処理条件下では HNF1 α による *SGLT2* mRNA 発現量の増加が認められ、その増加率は、total RNA と比べ、TSA 処理後に合成された nascent RNA でより高いことを明らかとした (Fig. 4c)。

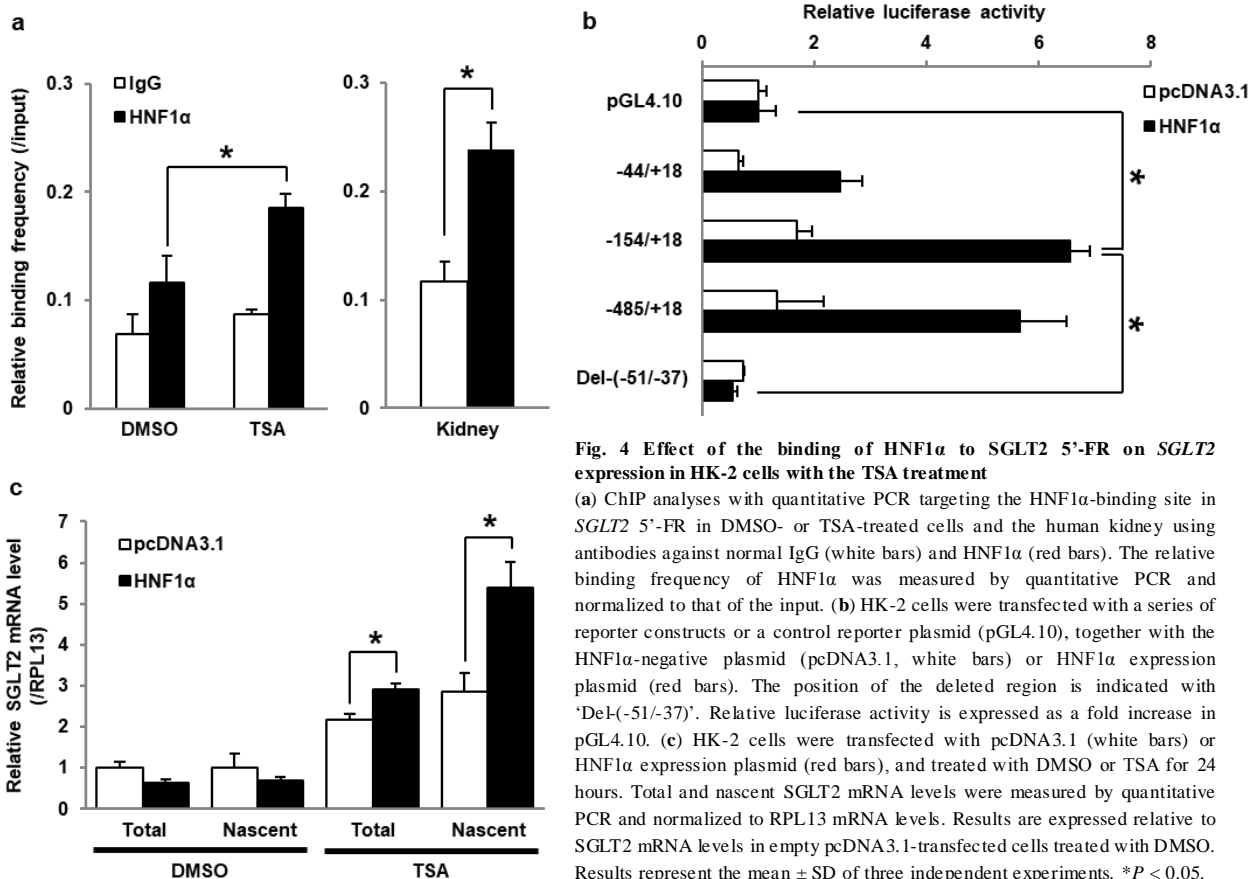


Fig. 4 Effect of the binding of HNF1 α to *SGLT2* 5'-FR on *SGLT2* expression in HK-2 cells with the TSA treatment

(a) ChIP analyses with quantitative PCR targeting the HNF1 α -binding site in *SGLT2* 5'-FR in DMSO- or TSA-treated cells and the human kidney using antibodies against normal IgG (white bars) and HNF1 α (red bars). The relative binding frequency of HNF1 α was measured by quantitative PCR and normalized to that of the input. (b) HK-2 cells were transfected with a series of reporter constructs or a control reporter plasmid (pGL4.10), together with the HNF1 α -negative plasmid (pcDNA3.1, white bars) or HNF1 α expression plasmid (red bars). The position of the deleted region is indicated with 'Del(-51/-37)'. Relative luciferase activity is expressed as a fold increase in pGL4.10. (c) HK-2 cells were transfected with pcDNA3.1 (white bars) or HNF1 α expression plasmid (red bars), and treated with DMSO or TSA for 24 hours. Total and nascent *SGLT2* mRNA levels were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to *SGLT2* mRNA levels in empty pcDNA3.1-transfected cells treated with DMSO. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

ヒト腎臓、肝臓および小腸におけるヌクレオソーム占有状態の解析

転写因子では説明できない *SGLT2* 発現の臓器差のメカニズムを明らかにするため、ヒト腎臓、肝臓および小腸検体における *SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有状態の解析を行った。ヒト腎臓と比べ、肝臓および小腸検体では同領域に極めて高度なヌクレオソーム占有状態が認められた (Fig. 5)。

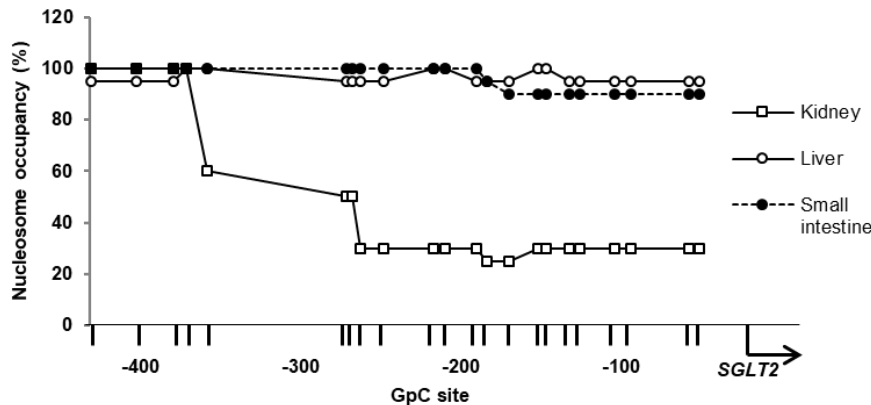


Fig. 5 Analysis of nucleosome occupancy in human kidney, liver, and small intestine tissues

NOMe-Seq data of *SGLT2* 5'-FR in human kidney (white squares), liver (white circles), and small intestine (black circles). Graph represents the proportion of nucleosome-occupied GpC sites in 5'-FR in the three tissues. The arrow indicates the *SGLT2* TSS. Vertical lines indicate GpC sites.

【考察】

Luciferase assay、mRNA 発現定量、ヌクレオソーム解析により、HK-2 細胞における *SGLT2* 遺伝子発現の抑制にプロモーター領域の高度なヌクレオソーム占有状態の寄与が示唆された。TSA 処理の結果により、*SGLT2* mRNA 発現量の増加、プロモーター領域のヌクレオソーム占有率の低下および HNF1 α 結合頻度の増加が認められた。また、HNF1 α を一過性に発現させた HK-2 細胞を用いた検討より、TSA 処理後に HNF1 α による *SGLT2* mRNA 発現量の増加が認められた。以上より、プロモーター領域のヌクレオソーム占有状態が HNF1 α の結合の制御に非常に重要な機能を有しており、同機構を介して *SGLT2* 遺伝子の発現を制御していると考えられる。

SGLT2 は腎臓特異的に発現が認められている一方で、HNF1 α は腎臓のみならず、肝臓や小腸など様々な組織に発現することが知られている。ヒト腎臓、肝臓および小腸検体を用いたヌクレオソーム解析の結果から、組織間で異なるヌクレオソーム占有状態が、プロモーター領域への組織特異的な HNF1 α 結合状態を制御することで、ヒト腎臓における組織特異的な *SGLT2* 遺伝子発現に寄与しているのではないかと考えられる。

本研究結果は、ヒト腎臓における *SGLT2* 遺伝子の発現はプロモーター領域のヌクレオソーム占有状態および HNF1 α 結合頻度によって調節を受けることを示唆している。また、本研究はヒト生体内で *SGLT2* 遺伝子がエピジェネティック制御を受けることを解明した初の報告であり、*SGLT2* 発現の腎臓特異性にヌクレオソーム占有状態が寄与する可能性を提示するものである。

【参考文献】

- 1) Wright EM. (2001) Am J Physiol Ren Physiol 280:F10–F18.
- 2) Pontoglio M, et al. (2000) EMBO Rep 1:359–65.
- 3) Freitas HS, et al. (2008) Endocrinology 149:717–724.
- 4) Tsui K, et al. (2011) Mol Cell Biol 31:4348–4355.