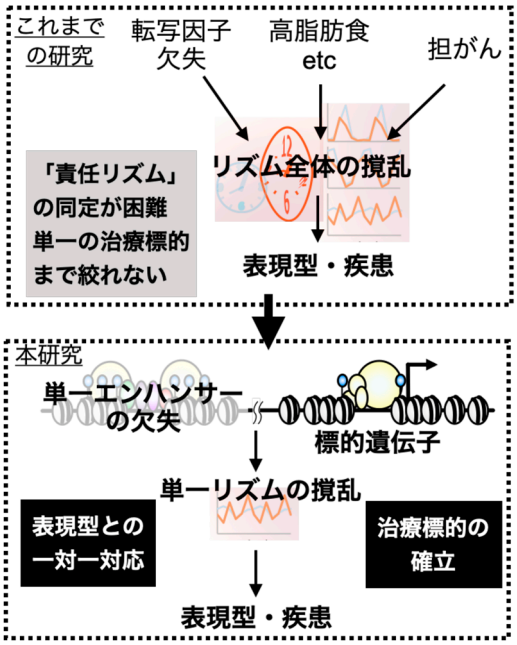
134　肝臓の恒常性を制御する新規非コードDNA領域の研究	河岡　慎平

【目的】多数の遺伝子の発現リズムにより形成される概日リズムは、肝臓の恒常性を支える重要な機構の一つである。肝臓においては、少なくとも 10%の遺伝子がリズミカルに発現する。概日リズム遺伝子が適切な時刻に適切な量で発現することは、肝臓が食事等の時刻依存的なイベントに効率よく適応し、恒常性を保つことに重要であると考えられている。概日リズムの破綻は、肝臓の恒常性の破綻、ひいては肝疾患を招く直接の要因となりうる。実際、肝疾患など、肝臓の恒常性が破綻した状態では、概日リズム遺伝子の発現パターンの撹乱が認められることが多い。我々も、担がん個体の肝臓において概日リズムが破綻し、さまざまな生理的異常が生じることを発見している。しかし、現時点では、「どの」遺伝子の「どのような」パターンの撹乱が肝臓の恒常性を破綻させるのか、という問題を解決することが難しい。概日リズムに実験的に介入する場合、転写因子の欠失や高脂肪食などによるストレスの負荷を用いることが常法である。この場合、多数の概日リズム遺伝子の発現パターンが異常となるため、個々の発現パターンと表現型・疾患とを一対一に対応させられない。以上から、概日リズムの破綻を伴う疾患の直接の原因となる単一遺伝子のリズム（責任リズム）を同定することは容易ではなく、責任リズムに基づく治療標的を同定することも困難であった。そこで、本研究では、単一遺伝子のリズミックな発現変動が肝臓の恒常性を制御するメカニズムを明らかにすることを目指した。

【方法】本研究の目的を達成するために、エンハンサー欠損法を用いた。エンハンサーとは、標的遺伝子がいつ・どこで・どのくらい発現するかを規定する非コード DNA 領域の総称である。マウスやヒトのゲノムには 10 万種類以上のエンハンサーが存在するとされ、適時・適所での遺伝子発現を可能にしている。本研究では、エピゲノム解析によって、単一の遺伝子のリズミカルな発現に必要なエンハンサーをリストアップし、ゲノム編集によって当該エンハンサーを欠失させることで、単一の遺伝子のリズムのみを喪失させることを試みた。

【結果】肝臓における単一遺伝子のリズミカルな発現に必要なエンハンサーを同定し、本エンハンサーを欠失させた新規マウス系統を確立した。さらに、本マウスを分析することによって、本リズムが肝臓の恒常性維持に重要であることを発見した。以上を要するに、肝臓の恒常性維持に必要な新しいエンハンサーを同定し、その機能を明らかにした。

本研究の概念図



134. 肝臓の恒常性を制御する新規非コードDNA領域の研究

河岡　慎平

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 臓器連関研究チーム

Key words：概日リズム，肝臓，エンハンサー遺伝学，マルチオミクス，代謝

緒　言

概日時計は、睡眠や覚醒、ホルモン分泌、代謝制御など、約 24 時間（概ね一日）の周期をもつ生理現象を支える分子機構である。動物の場合、生殖細胞をのぞく全ての細胞に概日リズムが備わっている。その分子実体はリズミックに発現する約 20 個の時計遺伝子（例：転写因子 PERIOD）がつくりだす転写ネットワークであり、転写因子により制御される 1,000 をこえる下流遺伝子の発現リズムが含まれる［1］。

生体の恒常性の維持や疾患における概日時計の重要性に疑いの余地はない。たとえば、PERIOD の欠損により概日時計全体を破壊すると、寿命が短縮し、がんの発生率が上がる。また、さまざまな疾患の病態において、概日時計の異常が観察される。いずれの場合も、細胞レベルでは、時計転写因子自体のリズムならびに多数の下流遺伝子の発現リズムが異常となる（リズムの乱れや完全な喪失が検出される）。我々の研究室でも、遠隔にあるがんが、肝臓の概日リズムを乱し、様々な病態を引き起こすことを明らかにしている［2］。

本研究領域の重大な課題として、多数の下流遺伝子の発現リズムの乱れをともなう病態について、「どの」遺伝子のリズムの乱れが病態の原因なのかを判断することは困難である。発現リズムが転写因子により一括制御されているために、一つの遺伝子の発現リズムのみを特異的に操作することが難しく、一つのリズムと表現型を対応させられないからだ。これは、概日時計破綻による病態生理のメカニズムを詳細に理解し、その病態を制御しようとすることの大きな妨げとなる。この問題は、疾患だけでなく、概日時計による制御を受ける生命現象をあつかう全ての分野に共通の問題であった。

エンハンサーは、標的遺伝子がいつ・どこで・どのくらい発現するかを規定する非コード DNA 領域の総称である［3〜5］。マウスやヒトのゲノムには 10 万以上のエンハンサーが存在するとされる。一つの遺伝子に対して複数のエンハンサーが存在することも珍しくない。一群のエンハンサーの活性に概日リズムがあることも分かっている。エンハンサーは、適時・適所の遺伝子発現を可能にする重要な非コードDNA配列であると言える。

一方で、エンハンサーの生理機能解析は容易ではない。エンハンサーは、標的遺伝子から遠く離れた位置にコードされていることが多く、標的遺伝子を完全に予測することは難しい。機能的に重複したエンハンサーが解析を妨げることもある。以上の理由から、個体における生理機能が明らかにされたエンハンサーの数は全体の 1%にも満たない。

本研究は、単一の遺伝子の発現リズムに必要なエンハンサーの機能解析、という視点に立ち、概日リズムの確立をとおして肝臓の恒常性維持に貢献するエンハンサーの機能を明らかにするものである。

方法および結果

1. 概日リズムを制御するエンハンサーの探索

まず、概日リズムを制御する可能性のあるエンハンサー領域を探索した。エンハンサーの活性マーカーである修飾ヒストン H3K27ac の ChIP-seq データを、Gene Expression Omnibus（GEO）データベースなどで探索した。適切なデータセットからfastqファイルをダウンロードした。得られたfastqデータをマウスゲノム(mm9)に対してbowtie2等を用いてマッピングし、samtools を用いて sam ファイルを bam ファイルへと変換した。以上のデータを MACS14

による peak calling に供して、H3K27ac のピーク座標および wig ファイルを得た。wig ファイルを UCSC genome browser にアップロードし、エンハンサーの探索などを行った。このほか、すでに wig フォーマットが登録されている ChIP-seq データや、概日リズムの制御に重要な転写因子（Nr1d1 など）の ChIP-seq データについても同様の解析を行い、H3K27ac のデータと照合しながら解析した。その結果、興味のある遺伝子について、その活性がリズミカルである（一日の時刻によって活性が変動する）エンハンサー候補領域を同定することができた。

2. ゲノム編集法によるエンハンサーの欠損

得られた候補領域について、ゲノム編集法による欠損を行った。エンハンサー周辺の配列を精査し、エンハンサーの両端に二つずつ、ガイド RNA（gRNA）をデザインした。gRNA を外注にて合成し、マウスの受精卵にインジェクションした。得られたファウンダー個体（F0 個体とする） の尾部から DNA を抽出し、ジェノタイピングを行うことで、当該領域の欠失アリルをもつ F0 を選抜した。得られた F0 個体を野生型と交配し、アリルを純化したのち（F1 個体）、F1 同士の掛け合わせによってホモ欠損個体（F2 以降）を得た。図 1 には、ジェノタイピングの代表例を示す。欠損領域の両側と内側にプライマーをデザインし、欠損があった場合にのみ短い増幅産物が得られるようにした。また、欠損領域内にもプライマーをデザインした。欠損特異的な産物のみが得られ、欠損領域に由来する増副産物が得られないものがホモ個体である。ホモ個体の DNA に関してはシークエンスを行い、欠損の状態を精査した。以上の結果によって、当該エンハンサー領域を完全に欠損させた新しいマウス系統を得ることができた。

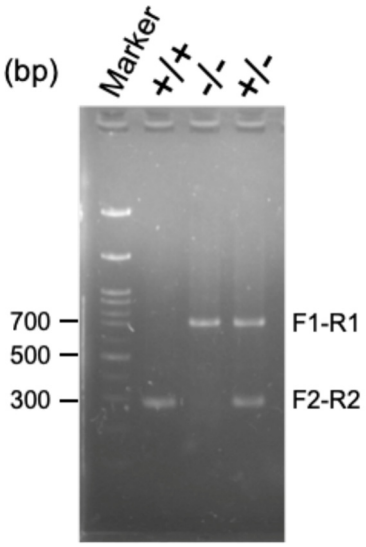


図 1. エンハンサー欠失マウスの確立
エンハンサー欠失マウスの尾部から抽出した DNA に対してゲノミック PCR を行った。F1-R1 は欠失アリルを、F2-R2 は欠失領域内を増幅する。

3. エンハンサー欠損個体の遺伝子発現解析

繰り返しになるが、エンハンサーは標的遺伝子とは離れた位置にある。そのため、あるエンハンサーの標的遺伝子を正確に同定することは難しい。少なくとも、当該エンハンサーと標的候補の活性が相関しており、エンハンサーの欠損によって標的候補の遺伝子発現が変化する必要がある。そこで、エンハンサー欠損マウスの肝臓を様々な時刻でサンプリングし、リアルタイム PCR 解析を行った。本標的候補遺伝子には明瞭な発現リズムがあるが、エンハンサーの欠損によって、そのリズムが完全に喪失することがわかった（図 2)。データは割愛するが、タンパク質レベルでも同様の結果が得られた。本エンハンサーに結合する転写因子群の発現は全くの正常であった。つまり、上流の転写因子の機能を阻害することなく、一つの遺伝子のリズムのみを破綻させることができた。以上のことから、エンハンサーの欠損によって標的遺伝子の発現リズムを破綻させる、という当初の目標を達成した。このようなマウスは 2021 年 3 月現在でも報告がなく、新規性の高い結果であると考えた。

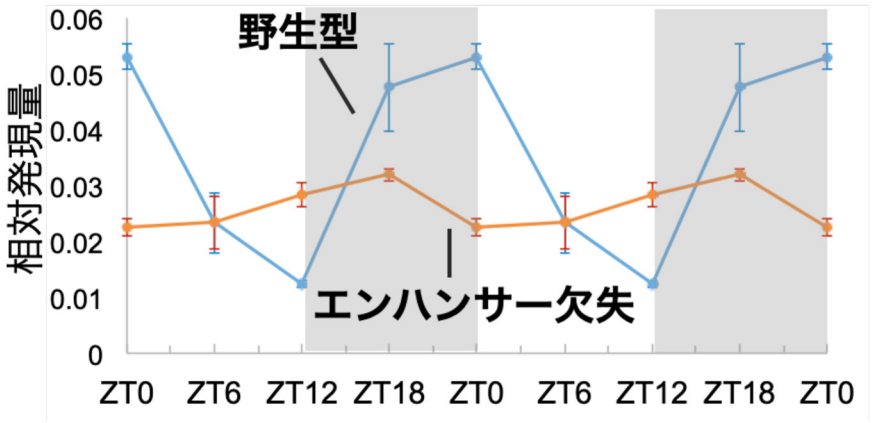


図 2. エンハンサー欠失によるリズムの喪失

野生型およびエンハンサー欠失マウスの肝臓を、表記の時刻（ZT：zeitgeber time）でサンプリングし、total RNA を抽出、qPCR に供した。ZT0 はマウス舎の電気がつく時刻、ZT12 は電気が消える時刻である。

4. エンハンサー欠損個体の表現型解析

本エンハンサー欠損マウスでは、肝臓における特定の遺伝子のリズムが喪失している。このマウスを分析し、表現型を見つけることができれば、ある一つのリズムが制御する肝臓の恒常性維持機構を発見することができると考えた。そこで、一般的な表現型解析や、肝臓・血液に対するマルチオミクス解析、生化学解析などを実施した。解析の結果をすべて記すことはできないが、本項では、結果の一部を紹介し、本エンハンサーが肝臓の恒常性維持に重要であることを示したい。特筆すべきこととして、本エンハンサー欠損マウスでは、肝臓および血液のレベルで、代謝の異常が生じていた。代謝の異常は多岐に渡っており、本エンハンサーが肝臓の代謝の恒常性維持に必要であることが示唆された。実際、エンハンサー欠損マウスでは酸化ストレスが亢進するという結果を得ることもできた。以上のことから、本エンハンサーによる特定の遺伝子の発現リズム制御が、肝臓の代謝、ひいては肝臓の恒常性に必要であることが明らかとなった。

考　察

本研究では、特定の遺伝子のリズミカルな発現に必要な新規非コード DNA 領域（エンハンサー）を発見し、ゲノム編集による欠損法によってその肝臓恒常性維持における機能を明らかにした。本研究は、転写因子への介入を行わずに単一の遺伝子のリズムのみを欠損させたという点でユニークである。これまで多数の遺伝子のリズムの総体として捉えられてきた概日リズムの生理的・病態生理的な機能を、「単一リズムレベル」で解明できるようになる。また、先に述べたとおり、エンハンサーの機能解析はゲノム科学分野の重要な未解決課題の一つである。我々の最近の報告と合わせて（免疫寛容に関与するエンハンサーの同定）[6]、新規エンハンサーの同定および機能解析という側面から、ゲノム科学分野にもインパクトをもたらす研究であると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の北條広朗研究員（当時）および小西理予研究員である。本研究には多くの共同研究者に関わっていただいているが、この謝辞には、記載したデータの取得に主に関わった共同研究者のみを記した。

文　献

1) Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nat Rev Genet. 2017 Mar;18(3):164–79. PMID: 27990019

2) Hojo H, Enya S, Arai M, Suzuki Y, et al. Remote reprogramming of hepatic circadian transcriptome by breast cancer. Oncotarget. 2017 May;8(21):34128–40. PMID: 28388556

3) Calo E, Wysocka J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? Mol Cell. 2013 Mar;49(5):825–37. PMID: 23473601

4) Schoenfelder S, Fraser P. Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. Nat Rev Genet. 2019 Aug;20(8):437–55. PMID: 31086298

5) Vernimmen D, Bickmore WA. The Hierarchy of Transcriptional Activation: From Enhancer to Promoter. Trends Genet. 2015 Dec;31(12):696–708. PMID: 26599498

6) Hojo MA, Masuda K, Hojo H, Nagahata Y, et al. Identification of a genomic enhancer that enforces proper apoptosis induction in thymic negative selection. Nat Commun. 2019 Jun 13;10(1):2603. PMID: 31197149