

miRNA と転写因子に注目した SCOT 遺伝子の肝臓特異的発現抑制機構の解析

田中美早 遠藤俊徳

北海道大学大学院 情報科学研究科 生命人間情報科学専攻 情報生物学研究室

背景

私たちの身体は食べ物からエネルギーを得て生活しており、中心的な役割を担うのが糖であるが、糖が欠乏した状態、つまり空腹時には、脂肪を原料とし肝臓において生成されるケトン体が代替エネルギー源として使用される。肝外組織においてサクシニル-CoA:3 ケト酸 CoA トランスフェラーゼ (SCOT) 遺伝子によりコードされる酵素により分解されることでエネルギーとなる。そのため、SCOT は肝外組織で広く発現しているが、肝臓においては特異的に発現が抑制されていることが知られているが、未だその詳細な機構は明らかにされていない。近年では、マウスを用いた研究により mir-122 による翻訳抑制、H3K27me3 と H3K9ac によるクロマチン構造の変化[1]の関与が示唆されている。また、SCOT 遺伝子の発現にはプロモーター領域に存在する 2 つの GC-BOX にそれぞれ転写因子 Sp-1 が結合することが重要であり、その上流の特定領域が発現抑制に深く関わっているとの報告[2]も存在する。

研究の目的

SCOT 遺伝子は生体内において必須な役割を持ち、肝臓での特異的な発現抑制が知られているがその機構は明らかにされていない。そこで、本研究の目的は先行研究で関与が示唆されていた miRNA と転写因子に着目し、SCOT 遺伝子の肝臓特異的な発現機構の解明をすることとした。

材料・方法

1. SCOT 遺伝子の哺乳類間での保存性の評価

SCOT のアミノ酸及び塩基配列は NCBI より *Homo sapiens*, *Pongo abelii*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Equus caballus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* の生物種について取得した。アライメントには clustalX2 を、系統樹の作成には NJ 法を使用し、Bootstrap 値 1000 回とした。また、Window 解析には JCoDA[3]を使用した。

2. ヒト mir-122 と SCOT 遺伝子の結合についての検討

mir-122 配列は microrna.org より *Homo sapiens*, *Mus musculus* について取得した。Alu 配列は Repeatmasker よりヒトゲノム(GRCh37.73)中より取得した。miRNA 結合予測には Target Scan, Target Spy, mirwalk, miRDB, MicroCosm の 5 種を用いた。アライメントには ClustalX2 を用いた。

3. 遺伝子発現情報を元にした制御部位の同定

SCOT 遺伝子と似た発現パターンを示す遺伝子を抽出するため、NCBI GEO よりヒト 36 組織ごとの発現データセット(GSE2361)を取得し、Bioconductor Genefilter を用いて全組織の発現を元に SCOT 遺伝子と似た 50 遺伝子を抽出した。その後、肝臓における発現値が他の組織の平均の 3 倍以上である 12 遺伝子を用い、Ward 法によりクラスタリングを行った。また、空腹時における遺伝子の発現変動を観察するため、NCBI GEO より、マウスの空腹時間ごとの脳、肝臓、腸、腎臓、筋肉における発現を調べた GSE24504 を取得し、有意水準 5% で T 検定を行った。

結果と考察

1. SCOT 遺伝子の持つ機能は哺乳類において保存

マルチプルアライメントの結果、特に問題のある配列は存在せず、生物種間においてよく保存されていた。また、アミノ酸配列を用いた系統樹より、どのノードにおいても Bootstrap 値が高く、また枝は類似していたため、生物種によって特徴的な進化は起きておらず、また、哺乳類においてはその配列がより良く保存されていた。

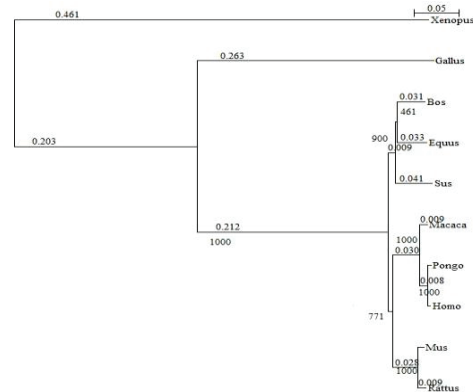


図 1 SCOT アミノ酸配列を用いた進化系統樹

NJ法で作成し、各ノードには1000回サンプリングに基づく Bootstrap 値、各枝にはその枝長を記載した。

細かな違いを見るために Window 解析を行ったが、その遺伝子の機能に及ぼす領域において、遺伝子の機能に影響を及ぼすような配列の変化はなかった。SCOT 遺伝子の配列と機能は哺乳類間においてよく保存されていた。したがって、発現制御機構も類似していると考えられ、類似した発現を示す遺伝子上で共通して存在する制御配列はその遺伝

子の発現制御に関与している可能性が高いと考えることが出来る。

2. ヒト mir-122 は SCOT mRNA に結合する可能性が低い
Thorrez et al. 2011 において、*Mus musculus* の mir-122 は SCOT の mRNA 3021-3026 に存在する seed 配列との相補性に基づき結合し、SCOT の翻訳阻害を行うとされていた。しかしながら、*Homo sapiens* においてその部位をペアワイズアライメントにより比較したところ、配列が保存されておらず、さらに、miRNA の結合部位予測においても 5 種のソフトウェア全てで結合の可能性が否定された。*Homo sapiens* において seed 配列とより類似した配列が mRNA 3436-3441 に存在していた。霊長類特異的に存在する Alu 配列は、miRNA が結合する mRNA の 3'非翻訳領域において、互いに対応せず分布している[4]ということが報告されている。SCOT 遺伝子における mRNA 上の分布を調べると、確かに Alu 類似配列が 3008-3324 に存在していた。

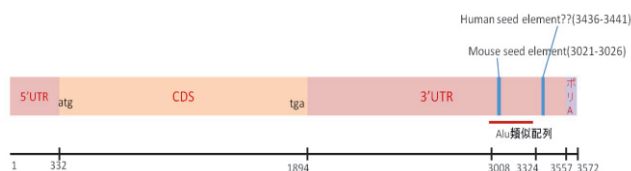


図 2 SCOT mRNA での位置関係

NCBI より取得した NM_000436.3 に対応した位置を示してある。

進化の過程で霊長類特異的に存在する Alu 配列が挿入が起きたことで、発現制御に関与する部位が置換された可能性と先行研究で示唆されていた mir-122 による発現抑制は、SCOT に直接働くのではなく、間接的になされている可能性の二つが考えられる。

3. 類似発現を示す遺伝子上には共通転写制御部位が存在
GSE2361 を元に SCOT と類似した発現を示す遺伝子を抽出し、ヒートマップを作成した。

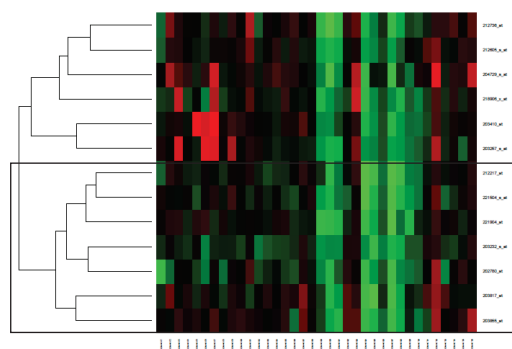


図 3 SCOT 類似発現を示す遺伝子のヒートマップ

枠線部上より、*PREPL*, *ATP6V1H*, *FAMI31A*, *ATXN*, *OXCT1*, *GUCY1B3*, *WDR47* である。SCOT 遺伝子の Gene symbol は *OXCT1* である。

これら 6 遺伝子と SCOT 遺伝子の 3000 塩基配列を

Biomart により取得した後、それら遺伝子上流に共通して存在する制御配列を TRANSFAC により探索した。条件として(1)*Homo sapiens* の 7 遺伝子上流に存在(2)*Mus musculus* と *Homo sapiens* の SCOT 遺伝子上流に存在(3)肝臓での発現の 3 つと定義した。条件を満たす転写因子として C/EBP gamma, RXR-alpha, HNF-4alpha, YY1, AP-1 を得ることが出来た。特に、HNF-4alpha は新糖生及び脂質代謝のマスター遺伝子[4]と知られ、YY1 はミトコンドリアで働く遺伝子の発現制御を担う[5]ことが知られている。また、これら転写因子の空腹時における発現変動を有意水準 5%で検定した結果、肝臓において Yy1 が空腹時に有意に発現が上昇していることが示され、空腹時の遺伝子制御に関与している事が唆された。また、Yy1 は Oct4 と共にヒストンメチル化酵素を誘導すること[6]や Cctf と共に Hnf4-alpha や Pol II の発現に影響を与えること[7]が知られている。以上のことより、SCOT 遺伝子の発現制御モデルを作成した。

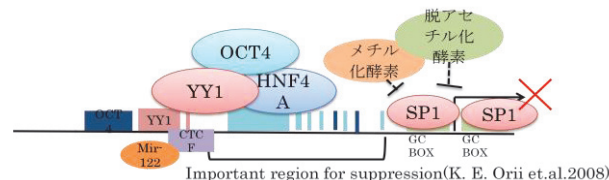


図 4 SCOT 遺伝子の発現制御モデル

SCOT においては SP1 が結合することで転写が活性化される。抑制に働く場合、各転写因子が協調しメチル化酵素や脱アセチル化酵素を誘導し、ヒストン修飾を引き起こすことでクロマチン構造の変化を引き起こす。

結論

SCOT 遺伝子の機能は哺乳類においてよく保存されておりその調節機構も同様である。先行研究において、SCOT 遺伝子の発現抑制には mir-122 の関与が報告されていたが、ヒトにおいてはその結合部位が存在しないことから間接的な関与が示唆された。遺伝子発現情報に基づき、発現制御に関与している可能性の高い転写因子を同定した。

参考文献

- 1) Lieven thorrez et al : Genome Research 21:95-105(2011)
- 2) K. E. Orii et al.: Tohoku J. Exp. Med., 215, 227-236(2008)
- 3) Steinway et al.: BMC Bioinformatics 11, 284 (2010).
- 4) Dietrich et al.: Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 293, G585-90 (2007).
- 5) Perekatt et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 7695-700 (2014)
- 6) Zhao et al.: Cancer Res. (2003)
- 7) Zlatanova, J. & Caiafa, P.: J. Cell Sci. 122, 1275-84 (2009).