The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DNA Methylation of the Human Oxytocin Receptor Gene Promoter Regulates Tissue-Specific Gene Suppression
Author(s)	楠井, 千賀
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43747
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【102】

氏　　名	楠　井　千　賀（くすい ちか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16899　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	DNA Methylation of the Human Oxytocin Receptor Gene Promoter Regulates Tissue-Specific Gene Suppression （ヒトオキシトシン受容体遺伝子転写調節領域のDNAのメチル化は臓器特異的遺伝子発現抑制を制御する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　村田　雄二 （副査） 教　授　奥山　明彦　　教　授　谷口　直之

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

オキシトシン（OT）は下垂体後葉から分泌されるnonapeptide hormoneで、特異的な受容体であるオキシトシン受容体（OTR）を介して射乳および子宮収縮等の生殖機能を調節している。OTR遺伝子は時期特異的な転写調節と臓器特異的な転写調節の両方を受けているが、臓器特異的な発現調節機構は未解明である。近年、染色体DNA上のメチル化が転写抑制と関連し、発生、癌化などで遺伝子発現を制御している知見が相次いで報告された。OTR遺伝子にはその転写開始点の140bp上流から2338bp下流までの約2.5kbにわたりメチル化の標的となるCpGアイランドが存在する。この部分の生体内でのメチル化の程度とその転写への影響をOTRが発現する代表的臓器である子宮と発現しない代表的臓器である肝臓の間で比較検討した。

【方法】

①肝臓由来細胞株のHepG2に0、1、2.5、5、10、15μMのメチル化抑制物質5'-azacytidine（Aza-C）を添加し48時間培養した。細胞を回収し定法にてtotal RNAを抽出し、RT-PCR法を用いてOTRmRNA量を半定量した。またOTRcDNAをプローブとしPCR Southern法を用いてその特異性を確認した。

②患者同意のもと採取した末梢血単核球、非妊娠子宮筋、妊娠子宮筋、肝臓から染色体DNAを定法により採取した。メチル化感受性制限酵素*Hpa*IIで完全切断の後、翻訳開始点より上流のCpGアイランドの部分を4分割した領域（MT1～4）をそれぞれPCR法で増幅した。

③OTR遺伝子の転写調節領域を含む3種のレポーターベクター（A.−2860/+144−GL3：CpGアイランドを含まない、B.−2860/+1342−GL3：CpGアイランドを含む、C.−2860/+1342^{del}MT2-GL3：CpGアイランド内の肝臓におけるメチル化の最も強い領域を欠損）を構築した。それぞれをSss Iメチラーゼでメチル化しHepG2に一過性導入を行い転写への影響を調べた。

【成績】

①Aza-Cを添加して培養したHepG2細胞ではOTRmRNAの発現量が濃度依存的に増加し、無添加群に比べAza-C 15μM添加群では約9.0倍となった。ゲノムDNAのメチル化の解除により、元来OTR遺伝子の発現が弱い細胞に

おいてOTR遺伝子の転写が誘導された。
②CpGアイランド部分のPCR増幅産物量を臓器別に比較すると、いずれの領域においても肝臓で最も多く、非妊娠子宮筋、妊娠子宮筋では少なかった。MT1～4の領域を比較するとMT2領域で特にその差が有意であった。CpGアイランド領域はOTRを発現する臓器に比べOTRの発現のない臓器で高度にメチル化されていることがわかった。
③A、B、Cそれぞれのルシフェラーゼ活性はコントロールのpGL3を1.0とするとそれぞれ1.7、4.0、3.4でありCpGアイランドを含むB、Cは正の転写活性を認めた。次にそれぞれのベクターをメチル化した場合のルシフェラーゼ活性をメチル化しないものと比較し抑制率を計算すると、CpGアイランドを含まないAでは81.4%であったのに対し、CpGアイランドを含むBでは30.6%まで転写活性が抑制された。このプラスミドより肝臓で最も強くメチル化されているMT2部分を欠失させたCでは68.0%でAとほぼ同じレベルであった。CpGアイランド中のMT2領域におけるメチル化が、OTR遺伝子の転写抑制に重要であった。

【総括】
OTR遺伝子の転写調節領域にはCpGアイランドが存在し、同部のメチル化がその臓器特異的発現の一部を調節していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

ヒトオキシトシン受容体遺伝子の臓器特異的な発現制御機構はこれまで未解明であった。本論文において著者楠井千賀は、その転写調節領域中に存在するメチル化高感受性領域であるCpGアイランドに着目し、詳細な検討に基づき、同部のDNAのメチル化がヒトオキシトシン受容体遺伝子の臓器特異的な発現の一部を調節していることを明らかにした。本論文は十分に新しい知見を含み、学位論文に値するものと認める。