



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43747">https://hdl.handle.net/11094/43747</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	楠 井 千 賀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 9 9 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、15  $\mu$ M 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 OTR mRNA 量を半定量した。また OTR cDNA 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<sup>del</sup>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 OTR mRNA の発現量が濃度依存的に増加し、無添加群に比べ Aza-C 15  $\mu$ M 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

において OTR 遺伝子の転写が誘導された。

② CpG 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。

③ A、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。