



プリオン蛋白質遺伝子のCpGメチル化に関するエピジェネティクス

乌云, 达来

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Date of Publication)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6942号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006942>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

プリオン蛋白質遺伝子の CpG メチル化に関するエピ
ジェネティクス

2017 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

乌云达来

(オヨンダライ)

目次

総緒	1
第 I 章 マウス各組織における PrP 遺伝子上流部の CpG メチル化状態と 遺伝子発現との関係	13
I -1. 緒言	14
I -2. 材料および方法	16
1) 実験動物	16
2) マウス各組織からのゲノム DNA 調製	16
3) ゲノム DNA の Bisulfite 処理	17
4) Bisulfite 処理したゲノム DNA の PCR (Bisulfite-PCR)	18
5) ゲルからの DNA 精製	19
6) シークエンス解析	19
7) CpG メチル化頻度の算出方法	20
8) 組織からの全 RNA の調製	21
9) リアルタイム RT-PCR	22
10) 統計解析	22
I -3. 結果	23
1) C57BL/6CrSlc および BALB/cCrSlc マウスの PrP 遺伝子上流部の 塩基配列	23
2) CpG メチル化頻度の補正	23
3) C57BL/6CrSlc マウス各組織における PrP 遺伝子の CpG メチル化 頻度	24
4) C57BL/6CrSlc マウスから得られた 34 組織中の PrP 遺伝子発現 解析	26
5) PrP 遺伝子メチル化と遺伝子発現の相関性	27
6) C57BL/6CrSlc および BALB/cCrSlc マウス系統間の精巢における 遺伝子メチル化の相違	28

I -4.	考察	30
I -5.	要約	35
I -6.	表	36
I -7.	図	42
第II章	マウス由来株化培養細胞における神経細胞分化に伴う PrP 遺伝子の発現と DNA メチル化状態の変化	52
II -1.	緒言	53
II -2.	材料および方法	55
	1) マウス由来株化培養細胞	55
	2) P19C6 細胞の神経分化誘導	55
	3) DNA methyltransferase インヒビター (RG108) 処理	56
	4) 培養細胞からのゲノム DNA の調製	56
	5) ゲノム DNA の Bisulfite 処理	56
	6) Bisulfite 処理したゲノム DNA の PCR (Bisulfite-PCR)	56
	7) ゲルからの DNA 精製	56
	8) Bisulfite-PCR 産物のシーケンス解析	56
	9) CpG メチル化頻度の算出方法	57
	10) 細胞からの全 RNA の調製	57
	11) リアルタイム RT-PCR	57
	12) コンピテント細胞の調製	57
	13) Bisulfite-PCR 産物のプラスミドベクターへの組み込みおよび大腸菌の形質転換	58
	14) 遺伝子クローニングのチェック	58
	15) シーケンス解析用のプラスミド DNA の精製	59
	16) プラスミドのシーケンス解析	59
	17) 統計解析	59
II -3.	結果	60

1) マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子の CpG メチル化 頻度	60
2) マウス由来株化培養細胞における CpG メチル化パターン	61
3) マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子発現解析	61
4) PrP 遺伝子メチル化と遺伝子発現の相関性	62
5) 神経細胞分化に伴う PrP 遺伝子の発現上昇と CpG メチル化 頻度の低下	62
6) DNA methyltransferase 阻害剤 RG108 による PrP 遺伝子の発現 低下	63
II-4. 考察	65
II-5. 要約	69
II-6. 表	70
II-7. 図	73
第III章 CCAAT エンハンサー結合蛋白質ファミリーが PrP 遺伝子 発現に及ぼす影響	82
III-1. 緒言	83
III-2. 材料および方法	85
1) マウス由来株化培養細胞	85
2) 細胞からの全 RNA の調製	85
3) RT-PCR による C/EBPs cDNA の調製	85
4) ゲルからの DNA 調整	86
5) 6 種類の C/EBPs PCR 産物のプラスミドベクターへの組み込み および大腸菌の形質転換	86
6) 遺伝子クローニングのチェック	86
7) シークエンス解析用のプラスミド DNA の精製	86
8) プラスミドのシークエンス解析	87
9) 6 種類の C/EBPs の哺乳類細胞発現ベクターの作製	87
10) 6 種類の C/EBPs 過発現細胞の作製	87

11) リアルタイム RT-PCR	88
III-3. 結果	89
1) マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子の発現解析	89
2) マウス大脳における C/EBPs、HES-1 および CTCF 遺伝子の 発現解析	89
3) マウス由来株化培養細胞における C/EBPs 遺伝子の発現解析	90
4) マウス由来株化培養細胞における HES-1 および CTCF 遺伝子 発現解析	91
5) PrP 遺伝子と C/EBPs、HES-1 および CTCF の遺伝子発現の 相関関係	92
6) P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞における C/EBPs 過剰発現が PrP 遺伝子発現に及ぼす影響	93
III-4. 考察	95
III-5. 要約	99
III-6. 表	100
III-7. 図	103
総括	110
Abstract	114
謝辞	118
引用文献	119

総緒

プリオン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患は、特定の神経細胞の脱落や中枢神経組織に特徴的な繊維状蛋白質（アミロイド）の蓄積（アミロイドーシス）を起し、蛋白質の異常なフォールディングや細胞内の蛋白質分解機構であるユビキチン-プロテアソーム機構の機能不全が関係している[Jucker and Walker, 2013; Schapira et al., 2014; Smethurst, et al., 2015]。中でもプリオン病は、病原体プリオンを原因とし、伝達性海綿状脳症とも呼ばれる。ヒトや動物において希な疾患（ヒトでは 100 万人あたり 1 人程度）である。現在のところ唯一他の動物への伝達を確認され、認知症、運動機能障害および脳アミロイドーシスによって特徴づけられる致命性神経変性疾患のグループである。プリオン病の代表的な病変特徴は、神経細胞脱落、星状細胞増生、アミロイド斑形成および組織空胞変性であり、長期の潜伏期間後に急速な症状の進行が認められる[Prusiner, 1998]。脳の損傷領域は、それぞれのプリオン病間で異なり、それぞれ異なった臨床徴候や進行症状が現れる。プリオン病の効果的な原因治癒や対処療法は確立されておらず症状の進行や遅延を防止できず致命的であることから、人の健康に深刻な脅威となっている[Colby and Prusiner, 2011]。

ヒトのプリオン病は、原因不明の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, sCJD）、プリオン蛋白質（prion protein, PrP）遺伝子変異が原因の家族性 CJD (familial CJD, fCJD)、Gerstman-Sträussler-Scheinker 病 (GSS) および致死性家族性不眠症 (fatal familial insomnia, FFI)、外部からプリオン感染によるクールー (kuru)、医原性 CJD (iatrogenic CJD, iCJD) および変異型 (variant CJD, vCJD) の 3 種類に分類される[Bechtel and Geschwind, 2013]。ヒツジやヤギのスクレイピー

(scrapie) は、1700 年代から散発的な発生があり、ウシの牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) は、飼料として与えられた肉骨粉を感染源として 1985 ~ 2000 年代初めにかけて世界的に大きな社会問題となった[Ducrot et al., 2008; Hunter, 2003]。

病原体プリオンは、宿主遺伝子がコードする PrP が深く関係し、細胞型プリオン蛋白質 (cellular isoform of the prion protein, PrP^C) と感染型プリオン蛋白質 (scrapie isoform of the prion protein, PrP^{Sc}) の二種類のアイソフォームが存在する[Prusiner, 1998]。PrP^C は、中枢神経組織に多く含まれる可溶性蛋白質であり、 β シート構造の含有が少なく、プロテイナーゼ K による分解を受ける。一方で、PrP^{Sc} は、プリオン病においてのみプロテイナーゼ K 抵抗性蛋白質として確認され、 β シート構造の含有が高く、不溶性繊維物質であるアミロイドの主要な構成成分であり、病原体プリオンの本体と考えられている[Prusiner, 1998]。

アルツハイマー病 (Alzheimer's-disease, AD) と CJD に「共通する発症メカニズム」が存在するという観点からの研究も進んでいる。AD は、ヒトの高齢化における認知症の最も一般的な疾患であり、アミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein, APP) の切断産物であるアミロイド β (A β) オリゴマーの不溶性化蓄積によるシナプス機能障害として特徴付けられている[Selkoe et al., 1996; Zhang et al., 2011]。最近の報告によると、プリオンに汚染された成長ホルモン製剤投与によって CJD を発症した患者 8 人の死後脳を調べた結果、そのうちの 6 人にアルツハイマー病に特徴的な A β 蓄積の病変が認められたと報告されている[Jaunmuktane et al., 2015]。AD 発症への出発点は、 β セクレターゼ (β -secretase) によって APP が分解され A β ペプチドの蓄積にある[Selkoe, 2001]。興味深いことに、PrP^C の過剰発現は、 β セクレターゼによる APP の分解を阻害し、A β 減少を誘導する[Parkin et al., 2007]。また、脂質ラフトに存

在する PrP^C が、Aβ オリゴマーと高い親和性で結合し、Aβ によるシナプス可塑性機能障害を改善することを示唆している[Lauren et al., 2009]。

ハンチントン病 (Huntington's disease) は、huntingtin 遺伝子が原因で起こる神経変性疾患であり、グルタミンをコードする (CAG) 繰り返し配列の伸長による huntingtin の異常凝集にある[MacDonald et al., 1993]。培養細胞を用いた研究において、PrP^C は、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の減少やプロテオソーム系の活性化を通して huntingtin の凝集を阻害することが示唆されている[Lee et al., 2007]。PrP^C の役割と他の神経変性疾患との関係を明らかにし、これら原因蛋白質の凝集が相互にどのように関係し合って病態形成が行われるのか、これからの研究の非常に重要な焦点の一つである。

PrP は、ほぼ 30 年前にゴールデンハムスターより正常な細胞蛋白質として最初に同定され、254 アミノ酸残基からなる[Oesch et al., 1985]。N 末端側の 22 アミノ酸残基のシグナルペプチドが切断後、2カ所の N-型糖鎖修飾を受け、208~209 番目のアミノ酸残基でグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー付加されて細胞表面に輸出される質量 33-35 kDa の細胞膜蛋白質である[Basler et al., 1986; Stahl et al., 1987; Endo et al., 1989]。

PrP 遺伝子 (*Prnp*) を欠損させたノックアウトマウス (*Prnp*^{-/-}マウス) 脳組織内に野生型マウス (*Prnp*^{+/+}マウス) 脳組織を移植した後にプリオンを感染させると、移植部位である野生型脳組織には、神経細胞の脱落および PrP^{Sc} の蓄積が起こるが、近隣の PrP 欠損脳組織が損傷を受けることはない[Brandner et al., 1996]。さらに、PrP 欠損神経細胞周辺の野生型グリア細胞内の PrP^{Sc} 進行性蓄積は、PrP^{Sc} の直接的な *in vitro* 細胞毒性効果と相反し、PrP 欠損神経細胞に細胞死を誘導しない[Mallucci et al., 2002; Mallucci et al., 2003]。以上のことから PrP^C の細胞内発現は、プリオン病進行に無視

できない存在あることが明らかにされた。

ヒト PrP^{Sc} 中のアミノ酸領域 106 ~ 126 は、疎水性領域に存在し、 β シート構造をとり、PrP^C からの PrP^{Sc} への変換に重要な領域として考えられている。プロテイナーゼ K 抵抗性 PrP^{Sc} の N 末端近傍に位置するヒト PrP 106 ~ 126 番目を含むペプチド (PrP106 ~ 126) は、PrP^{Sc} のように溶液中で β シート構造をとり、アミロイド様線維を形成する[Bergstrom et al., 2005; Tagliavini et al., 1993]。また、プロテイナーゼ K に抵抗性を持ち、初代培養ニューロンや脳内投与で細胞死を起こす等、多くの生化学的特徴を示す[Forloni et al., 1993]。

PrP^{Sc} の伝達が神経変性疾患であるプリオン病と深く関連付けられている事実にもかかわらず、多くの報告が PrP^C の神経細胞保護を示唆している[Diarra-Mehrpour et al., 2004; Kim et al., 2004; Kuwahara et al., 1999; Lehmann, 2002; Milhabet and Roucou et al., 2003; Shyu et al., 2005]。PrP^C の過剰発現は、培養細胞および初代神経細胞をアポトーシス刺激から保護する。さらに、PrP^C は、細胞生存を含む細胞内シグナル伝達カスケードを調節する役割を果たすことが示唆されている[Lo et al., 2007]。PrP^C の N 末端領域は、血清欠乏によって誘導される ROS から細胞を保護する役割が報告されている[Haigh et al., 2009]。ストレス誘導性蛋白質 1 (Stress-inducible protein-1, STI1) と呼ばれるヒートショック蛋白質共シャペロン分子 (heat shock protein-organizing protein, HOP) は、PrP^C の中心領域 (アミノ酸残基 113 ~ 128) に結合して細胞から分泌され、神経細胞の生存と分化を促進することが報告されている[Zanata et al., 2002]。

ヒト PrP^C の球状ドメインに位置するアミノ酸残基 144 ~ 154、173 ~ 194、200 ~ 228 は、 α ヘリックス構造をとり、アミノ酸残基 128 ~ 131 と 161 ~ 164 は、 β シート構造をとる[Zahn et al., 2000]。ヒトおよびマウス PrP^C は、110/111 番目または 111/112 番目のペプチド結合で細胞内蛋白質分解による開裂を受け (α -開裂と呼ばれる)、N

末端側の N1 断片と C 末端側の C1 断片を生じる[Chen et al., 1995; Mange et al., 2004; Pan et al., 1992; Shyng et al., 1993]。C1 断片は GPI を介して細胞膜上に繋ぎ止めら、N1 断片は、細胞外に放出される。PrP^C の α -開裂は、プロテインキナーゼ A ではなく、プロテインキナーゼ C 刺激物質によって増幅される[Vincent et al., 2000]。さらに、 α -開裂は、小胞体ではなく大部分がゴルジ体で行われる[Walmsley et al., 2009]。 α -開裂は、PrP^{Sc} の毒性と PrP^C から PrP^{Sc} への変換の両方に重要な PrP106 ~ 126 の領域を分裂させる[Forloni et al., 1993; Gasset et al., 1992; Jobling et al., 1999; Norstrom et al., 2005]。一方で、CJD 患者脳、プリオン感染マウス脳およびプリオン感染培養細胞において、PrP^{Sc} は、プロテイナーゼ K 抵抗性断片として N 末端において 74 ~ 102 番目の範囲で様々なアミノ酸末端を持つ C2 断片を生成する (β -開裂と呼ばれる) [Chen et al., 1995; Dron et al., 2010; Mange et al., 2004; Parchi et al., 2000]。 β -開裂断片である C2 では、PrP^C が PrP^{Sc} に転換される上で必要不可欠な領域であり、神経細胞毒性やアミロイド形成能を有する PrP のコアである 106 ~ 126 番目のアミノ酸領域が保持されている[Forloni et al., 1993; Gasset et al., 1992; Jobling et al., 1999; Norstrom et al., 2005]。

PrP^C が関与する細胞機能および分子経路を解明するために、これまでに世界で 6 系統のノックアウトマウス (Ngsk, Npu, Rcm0, Rikn, Zrch I, Zrch II) が作製されている。1992 年に世界で初めて登場したノックアウトマウス (Zrch I) は、発達や行動に異常を示さない[Bueler et al., 1992]。一方で Npu マウスでは、日内リズム調節異常が報告されている[Tobler et al., 1996]。Ngsk マウスでは、老齢期に小脳プルキンエ細胞の変性脱落、小脳性運動失調が報告されている[Sakaguchi et al., 1996]。

PrP^C の生理的機能はいまだに多くの議論があるが、これまでに言われている機能は、銅イオンとの選択的結合による細胞保護、神経細胞の興奮性調節および神経突起伸長調節などである。PrP51 ~ 90 番目のアミノ酸領域は、8 アミノ酸残基

(PHGGGWGQ) が 4 回から 5 回繰り返す配列 (オクタペプチドリピート) が存在し、この領域で二価の銅イオン (Cu^{2+}) と選択的に結合する [Brown et al., 1997a; Hornshaw et al., 1995a, b]。PrP は、 Cu^{2+} との結合によって立体構造が変化し [Jackson et al., 2001; Miura et al., 1996; Qin et al., 2000; Quaglio et al., 2001; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999; Wong et al., 2000]、組換え PrP のフォールディングにも Cu^{2+} の影響を受けている [Brown et al., 1999; Jones et al., 2004; Qin et al., 2000; Wong et al., 2000]。しかしながら、これら立体構造の変化およびフォールディング時の Cu^{2+} の必要性はあまり理解されていない。

多く研究で最も広く受け入れられている PrP^C の役割として酸化損傷に対する細胞保護機能がある [Brown et al., 1997a, b; Herms et al., 1999; Klamt et al., 2001; Rachidi et al., 2003; White et al., 1999; Wong et al., 2001b]。興味深いことに、抗酸化防御の損失は、プリオン感染細胞や感染脳において主要な役割を果たし、酸化ストレスがプリオン病の発症機序に中心的な役割を果たしていると考えられている [Arlt et al., 2002; Guentchev et al., 2000; Guentchev et al., 2002; Milhavet et al., 2000; Wong et al., 2001a]。 Cu^{2+} (CuSO_4) による細胞毒性や酸化ストレスを調べた報告によると、PrP ノックアウトマウスから得られた初代培養の小脳神経細胞は、野生型神経細胞よりも銅毒性や酸化ストレスに対して脆弱である。また、銅結合 PrP₅₁₋₉₀ ペプチドを作用させても、遮断効果が低いことから、細胞内発現の PrP^C が銅のキレートや恒常性維持として働いていることを示唆している [Brown et al., 1998b]。さらに、PrP ノックアウトマウスから得られた神経細胞は、Cu/Zn スーパーオキシドデスムターゼ活性の低下を認め、脳から精製した PrP^C や大腸菌組換え PrP では、スーパーオキシドデスムターゼ様の活性を認めている [Brown et al., 1997b, 1999]。シグナルペプチドを改変して切断されない PrP は、細胞表面での存在、脂質ラフトでの存在、細胞内輸送および

銅依存的エンドサイトーシスにおいては、野生型 PrP^C と違いはない。しかし、細胞外のフリーラジカル増加、スーパーオキシドデスムターゼ活性やグルタチオンパーオキシダーゼ活性を減少させ、プロテイナーゼ K に抵抗性を示す[Zeng et al., 2003]。

PrP^C は、イオンチャネルや神経細胞の興奮性調節に役割を果たしているという報告がある。PrP^C は、多くの種類のイオンチャネルが集中しているシナプスに局在し、正常なシナプスの発達と機能のために重要である[Kanaani et al., 2005; Moya et al., 2000]。興奮毒性神経細胞死は、N-メチル-D-アスパラギン酸レセプター (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) の活性化が深く関与している[Arundine and Tymianski, 2004]。NMDAR は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸受容体であり、グルタミン酸の結合によって活性化する陽イオン透過性チャンネルを形成している。PrP^C は、グルタミン酸による NMDAR の活性化を阻害することによって興奮毒性を弱め、神経細胞保護に働いていることが示唆されている[Khosravani et al., 2008]。最近の報告によると、PrP^C は銅依存的に NMDAR のシステイン残基をニトロシル化し、神経細胞保護に働くことが報告されている[Gasperini et al., 2015]。

PrP^C の機能のいくつかは、細胞表面上での蛋白質の局在化に関連している。細胞接着分子としての PrP^C の挙動は、神経突起伸長、神経細胞生存および神経分化を含むいくつかの相互に関連し合う過程に参加していることを示唆している[Linden et al., 2008]。PrP^C は、ラミニン、37 kDa ラミニン受容体前駆体/67 kDa ラミニン受容体および神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) を含むいくつかの膜タンパク質と相互作用することが発見されている[Gauczynski et al., 2001; Graner et al., 2000; Rieger et al., 1997; Schmitt-Ulms et al., 2001]。NCAM との相互作用では、PrP^C は、NCAM を脂質ラフトに誘導し、p59^{fyn} 非レセプター型チロシンキナーゼ (p59^{fyn} nonreceptor tyrosine kinase, fyn) の活性化を通して、神経突起伸長を促進する

[Santuccione et al., 2005]。一方で、PrP^Cは、神経突起伸長阻害因子であるコンタクチン関連蛋白質（contactin-associated protein, Caspr）に結合して神経突起伸長を阻害することが報告されている[Devanathan et al., 2010]。この相互作用では、Casprの神経細胞表面での増加をPrP^Cは促し、神経突起伸長促進に関係するセリンプロテアーゼであるリーリン（Reelin）によるCaspr分解を阻害することによるとされる。

細胞接着にPrP^Cが関与する証拠は、プリオン研究の焦点ではなかったゼブラフィッシュで報告されている[Malaga-Trillo et al., 2009]。ゼブラフィッシュの遺伝子には、哺乳類のPrPと構造的に類似しているGPIアンカー型蛋白質PrP-1とPrP-2と呼ばれる2つ遺伝子がコードされている。PrP-1、PrP-2は、時空的発現パターンが異なり、PrP-1は、初期胚発生時に主に細胞-細胞接合部に発現しているのに対し、PrP-2は、発達途上の神経系において、後半で発現の上昇が認められる。PrP-1ノックダウンの結果、受精6時間後に原腸（胚）形成ができなくなり、9時間後には胚発生が停止する。PrP-2ノックダウンでは、正常な胚形成は起こるが、受精7日前後で頭部形成異常が起こり、特に脳や目において奇形形成を示す。

以上のPrP^C機能の研究から、銅イオンとの選択的結合による細胞保護、神経細胞の興奮性調節、神経突起伸長調節、イオンチャネル活性、細胞接着分子としての細胞の配置決定因子としての役割が示唆されている。

PrP遺伝子は、ラット、マウス、ウシおよびヒツジにおいて3つエクソン、またはハムスターおよびヒトにおいて、2つのエクソンから構成されており、最後の単一エクソン（第3または第2エクソン）に完全長の蛋白質翻訳領域がコードされている[Basler et al., 1986; Inoue et al., 1997; Puckett et al., 1991; Saeki et al., 1996a; Westaway et al., 1994a, b]。また、哺乳動物各種においてアミノ酸配列が高度に保存されている。様々な解析手法を用いたPrP遺伝子の発現状況が報告され、胚段階から加齢の過程

で、ほぼすべての器官や組織で発現している[Fournier et al., 1998; Goldmann et al., 1999; Sales et al., 2002]。しかしながら、発現レベルは、年齢や組織によってそれぞれに異なった調節がされており、特に中枢神経系（central nervous system, CNS）に高い発現を認める[Horiuchi et al., 1995; Moudjou et al., 2001; Peralta et al., 2012]。一方で、肝臓などでは非常発現が低い。

PrP 遺伝子エクソン 1 上流には、複数の SP1 結合コンセンサス領域を含むグアニン (G) + シトシン (C) に富む領域が存在し、TATA ボックスは存在しないが、CCAAT ボックスが認められている。これらの配列を含む領域の転写活性解析によると、主要なプロモーター領域は、エクソン 1 から上流 80 ~ 150 bp の配列が重要であることが示唆されている[Baybutt et al., 1997; Inoue et al., 1997; Mahal et al., 2001; Saeki et al., 1996b]。

近年、エピジェネティクス（epigenetics）と呼ばれる DNA 塩基配列の変化を伴わないゲノム機能の遺伝的変化における研究が、表現型の根底にある遺伝子発現調節の重要な学問分野となっている[Bird, 2002]。ゲノム機能の遺伝的変化には、DNA メチル化、ヒストン修飾（ヒストンアセチル化/脱アセチル化、ヒストンメチル化）とマイクロ RNA の変化が含まれる。これらの現象は、初期の細胞分化に非常に重要な役割を果たすばかりか、疾病病因にも深く関与している[Dwivedi et al., 2011; Egger et al., 2004]。DNA のメチル化は、転写因子、エンハンサー結合およびインシュレーターとの結合やクロマチン構築への影響を通して、様々なレベルでの遺伝子発現の制御に関係している[Jones, 2012]。真核生物におけるもっとも一般的な DNA のメチル化は、CpG と呼ばれるシトシン-グアニン (C-G) ジヌクレオチド配列中のシトシン塩基 5'-炭素位置におけるメチル化化学修飾である。CpG は、ゲノム中には比較的稀な配列であるが（1% 程度）、CpG アイランドと呼ばれる高水準に CpG が偏在する

領域がある。CpG アイランドは、C と G を合せた含有量が 50% 以上の少なくとも 200 塩基対の領域で、実際の CpG 出現頻度が確率的に予想される CpG 出現頻度の 0.6 以上と定義されている[Gardiner-Garden and Frommer, 1987; Illingworth and Bird, 2009; Saxonov et al., 2006]。CpG アイランドは、非 CpG アイランドに比べてメチル化が非常に低頻度の傾向にあり、多くの場合、遺伝子プロモーターと関連している。CpG アイランドのすぐ周囲の領域は、「沿岸 shores」と呼ばれ、続いて「棚 shelves」と呼ばれる領域に続く。遺伝子の約 60 ~ 70% は、プロモーター領域を含む CpG アイランドを有し、プロモーター領域は、CpG の密度に応じて分類されている[Saxonov et al., 2006; Weber et al., 2007]。プロモーター領域を含む CpG アイランドのメチル化は、一般的に遺伝子発現と負の相関関係にあるが、いくつかの特定遺伝子では、逆効果を持つものが存在する[Gutierrez-Arcelus et al., 2013; Lam et al., 2012; Weber et al., 2007]。プロモーター領域のメチル化は、生理学的過程の転写調節において重要な役割を有することが示されており、正常な DNA メチル化の変化は、胚形成、細胞分化、老化に関与している [Aoyama et al., 2004; Hashimshony et al., 2003]。一方で異常な DNA メチル化は、癌や糖尿病などの慢性疾患と密接な関係を持っている [Jones, 2002; Leonhardt and Cardoso, 2000; Qiu et al., 2008]。

発癌は、生物個体にとっての必要性を考慮することなく、細胞の制御不能な分裂を引き起こし、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化など複数の正常な細胞分裂調整を不能にする遺伝的変化を必要とする。これまでに多くの研究が、癌の発生過程において、DNA のメチル化修飾を含むエピゲノム変化が非常に重要であることを示している[Nephew and Huang, 2003]。CpG のメチル化が発癌につながる可能性は、少なくとも 3 つの主要なメカニズムに区別される。第 1 に、ゲノムの低メチル化によって癌遺伝子の活性化やゲノム不安定性を向上させる[Sproul and Meehan,

2013]。第2に、癌抑制遺伝子のプロモーター領域に局限した過剰なメチル化による癌抑制遺伝子転写の不活性化である。このメカニズムは、網膜芽細胞腫の *RBI* 遺伝子[Greger et al., 1994]、大腸癌の *MLH1* 遺伝子[Cunningham et al., 1998; Herman et al., 1998]、乳癌の *BRCA1* 遺伝子[Esteller et al., 2000]のプロモーター領域のメチル化によく説明されている。第3に、メチル化 CpG 部位は、C から T への転移のポットスポットであり、自然な加水分解脱アミノ化によって引き起こされる突然変異誘発がある。さらに、メチル化された CpG アイランドは、発癌化学物質の結合や紫外線による突然変異誘発を起こしやすい場所でもある[Jones and Baylin, 2002]。

近年、神経変性疾患における CpG メチル化の変化が注目されるようになった。アルツハイマー病 (AD) は、進行性の認知低下、神経細胞脱落、細胞外のアミロイド β 斑およびタウ蛋白質のリン酸化過剰を特徴とするもっとも一般的な神経変性疾患である[Salminen et al., 2013]。また、*APP* 遺伝子やプレセニリン (presenilin) 遺伝子、*PSEN1* と *PSEN2* の異常が本疾患の発症と関係している。AD においては、側頭葉や海馬領域の広範囲な CpG メチル化の低下が報告されている[Chouliaras et al., 2013; Mastroeni et al., 2010]。パーキンソン病 (PD) は、AD に次ぐ一般的な神経変性疾患であり、黒質のドーパミン作動性ニューロンの進行性脱落により、筋硬直、動作緩慢、振戦および感情不安定を特徴とする[Schapira et al., 2014]。PD の原因はよくわかっていないが、稀なケースの遺伝性 PD では、alpha-synuclein (*SNCA*)、parkin2 (*PARK2*) や Leucine Rich Repeat Kinase 2 (*LRRK2*) ほかにいくつかの遺伝子の変異が認められている[Yang et al., 2009]。PD 患者における *SNCA* 遺伝子発現調節領域の DNA メチル化の変化が報告されているが、結論には至っていない[Lu et al., 2013]。ハンチントン病 (HD) は、舞踏病、筋失調症、認知低下を特徴とする常染色体優性進行性神経変性疾患であり、*HTT* 遺伝子異常が発症と深く関係している[Thomas 2016]。HD におい

では、大脳基底核線条体の adenosine A2A receptor (*ADORA2A*) 遺伝子 5'-非翻訳領域において、DNA メチル化の低下が認められている[Villar-Menendez et al., 2013]。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、脳や脊髄の運動ニューロンの選択的脱落によって引き起こされるが、運動ニューロンの脱落機構については、トキシンや食事因子などの環境因子が疫学的に言われているだけであり、あまりわかっていない[Menke et al., 2016]。非常に稀な遺伝性 ALS において、superoxide dismutase 1 (*SOD1*)、TAR DNA-binding protein (*TARDBP*)、ubiquilin2 (*UBQLN2*)、ほかいくつかの欠損遺伝子の報告はあるが、大部分の孤発性 ALS については不明のままである[Chen et al., 2013]。孤発性 ALS 患者の脊髄において、広範囲の遺伝子メチル化増加が報告されてはいるが、結論には至っていない[Figueroa-Romero et al., 2012]。

これらの背景をもとに、本研究では、プリオン病の伝達および発症と深く関係している PrP 遺伝子発現制御機構に注目し、遺伝子発現制御に深く関係している DNA メチル化状態を明らかにするとともにプロモーター領域への結合が予想される転写因子と PrP 遺伝子発現との関係を明らかにすることを目的とした。

本論文において、第 I 章では、マウス各組織におけるプロモーター領域を含むエクソン 1 上流部の DNA メチル化状態について述べる。第 II 章では、マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子の DNA メチル化状態を明らかにし、神経細胞分化にともなう DNA メチル化状態の変化について述べる。第 III 章では、マウス由来株化培養細胞における転写因子の発現状況と PrP 遺伝子発現との関係について述べる。

第 I 章

マウス各組織における **PrP** 遺伝子上流部の
CpG メチル化状態と遺伝子発現との関係

I -1 緒言

PrP^Cは、GPIを介して細胞表面上に存在する糖蛋白質である[Stahl et al., 1987]。PrP^Cの生理機能は、抗アポトーシス[Kuwahara et al., 1999]、酸化ストレス軽減[Klamt et al., 2001]、細胞接着[Graner et al., 2000]、シグナル伝達[Mattei et al., 2004; Stella et al., 2010]、銅による神経保護[Gasperini et al., 2015]などへの関与が示唆されているが、いまだに結論は出ないままである。

PrP 遺伝子は、マウスでは第2番染色体上に、ヒトでは第20番染色体上にコードされている[Liao et al., 1986; Sparkes et al., 1986]。体組織中のPrP^CやPrP mRNAの分布は、ハムスター[Bendheim et al., 1992]、ラット[Saeki et al., 1996a]、マウス[Ford et al., 2002]、ヒツジ[Horiuchi et al., 1995]、ウシ[Tichopad et al., 2003]など多くの哺乳類で解析されている。これらの研究によりPrP^CやPrP mRNAは、幅広い組織に存在しているが、個々の組織ごとに産生量は異なっている。PrP^Cは、健常個体においては特に中枢神経組織、中でも神経細胞において高く発現している。また、その他の臓器における発現は、極めて低いか、ほとんど発現を確認することは困難である。マウスの研究において、脳におけるPrP 遺伝子の発現は、生後直後から3週令までに4倍に増加し、その後、生涯を通して一定に発現している[Lazarini et al., 1991; Manson et al., 1992]。近年、遺伝子転写の制御に関わるプロモーター領域の解析が、ラット[Saeki et al., 1996 b]、ウシ[Inoue et al., 1997]、マウス[Baybutt and Manson, 1997]、ヒト[Funke-Kaiser et al., 2001]で行われ、主要なプロモーター領域の詳細が明らかにされつつある。PrP 遺伝子の主要なプロモーター活性は、エクソン1上流のGC配列に富む150 bp以内に存在している。しかしながら、遺伝子発現調節に関わる重要な学問領域であるエピジェネティクスは、プリオン研究分野で行われていない。

エピジェネティクスは、遺伝子 DNA の塩基配列変化を伴わない遺伝子発現制御の後天的な変化を対象とする 2000 年以降に発展した学問領域であり、遺伝子 DNA のメチル化は、細胞特有な遺伝子発現に影響するエピゲノム制御の一つである [Chatterjee and Vinson 2012; Jones, 2012; Schübeler, 2015]。DNA メチル化のゲノムワイドな変化は、発生や癌において遺伝子の転写に大いに影響し細胞表現型の変化の主な原因であることが示されている。遺伝子における CpG 配列のシトシンメチル化は代表的な DNA のメチル化であり、特に CpG 配列を多く含む CpG アイランドは遺伝子発現調節に大きな影響を持つとされる。最近、遺伝子 DNA におけるメチル化という小さな変化は、細胞表現型の変化に多大な結果をもたらす可能性があると考えられている [Gammon, 2014]。

そこで本章の研究では、マウス 34 組織に含まれる PrP mRNA を定量するとともに、PrP 遺伝子プロモーター領域を含む約 1 kb に存在する 46 個の CpG 配列のメチル化状態を明らかにすることで PrP 遺伝子発現調節におけるエピジェネティクスに着手した。

I -2 材料および方法

I -2-1) 実験動物

本実験において使用したすべてのマウスは、日本エスエルシー (Hamamatsu, Japan) より購入した。8 週齢の C57BL/6NCrSlc と BALB/cCrSlc マウス雄、雌 5 匹ずつから各組織を採材した。採材した組織は、大脳、小脳、間脳、嗅球、視床、下垂体、延髄、脊髄、心臓、胸腺、腎臓、副腎、肺、肝臓、胆嚢、脾臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、虫垂、盲腸、直腸、膀胱、膵臓、大腿筋、眼球、舌、子宮、卵巣、精巣、精嚢、血液を採材し、上記のすべての組織を実験に使用するまで -80°C にて保存した。使用する実験動物は、最小限に止め、神戸大学実験動物実験実施規則（承認番号 23-06-03）に則って行った。

I -2-2) マウス各組織からのゲノム DNA 調製

PureLink™ Genomic DNA kits (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) を使用し、ゲノムDNAを抽出した。方法は以下の通り行った。 -80°C に保存した各組織からそれぞれ25 mg（脾臓は10 mg）、を無菌状態の1.5 mlのチューブに入れた。180 μl の PureLink™ Genomic Digestion Bufferと20 μl のProteinase K（20 mg/ml）を加えた。バッファー内に組織が完全に沈んでいることを確認しながら、時折ボルテックスし、完全に組織が溶解するまで 55°C でインキュベートした。その後、室温、 $15,000 \times g$ で3分間遠心分離し、上清を新しい1.5 mlのチューブに移した。20 μl のRNase A（20 mg/ml）を加え、ボルテックスを行いよく混ぜ、室温で2分間インキュベートした。その後、200 μl のPureLink™ Genomic Lysis/Binding Bufferを加え、ボルテックスした。さらに200 μl の100 % エタノールを加え5秒間ボルテックスした。その後、溶液をPureLink™

Spin Columnに移した。カラムを室温、 $14,000 \times g$ で2分間遠心し、コレクションチューブを捨て、新しいコレクションチューブにカラムをセットした。カラム内に $500 \mu\text{l}$ のWash Buffer 1を加え、室温、 $13,000 \times g$ で2分間遠心した。コレクションチューブを捨て、新しいコレクションチューブをカラムにセットし、 $500 \mu\text{l}$ のWash Buffer 2をカラムに加えた後、室温、 $15,000 \times g$ で3分間遠心した。コレクションチューブを捨て、カラムに $200 \mu\text{l}$ の精製水を加え、室温で1分間インキュベートした後、室温、 $15,000 \times g$ で1分間遠心し、コレクションチューブ内のゲノムDNA溶液を回収した。もう一度精製水を $100 \mu\text{l}$ 加え、室温、 $15,000 \times g$ で1分半遠心分離し、さらに残りのDNAを回収した。抽出DNAはNANODROP2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、吸光度を測定し、DNA濃度を計測した後、実験に使用するまで -20°C で保存した。

I -2-3) ゲノム DNA の Bisulfite 処理

MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulfite Modification kit (TaKaRa, Ohtsu, Japan) を用いて各組織から調整した DNA を Bisulfite 処理した。方法は以下の通り行った。 $20 \mu\text{l}$ DNA の溶液 ($100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) を 1.5 ml のチューブに移した。この DNA 溶液に 3M NaOH 溶液を $2.2 \mu\text{l}$ を加えて、ピペッティングによりよく混和した。 37°C で 15 分間インキュベートした後、 $220 \mu\text{l}$ の Reagent 1 と Reagent 2 の混合液を入れて、ゆっくりとピペッティングにより混和した。その後、遮光し 80°C 、 45 分間インキュベートした。チューブ上部に結露を生じている場合はチューブを軽く遠心した。反応混合液を付属のコレクションチューブに移し、 $240 \mu\text{l}$ の Reagent 3 を加えて、ピペッティングによりよく混和した。付属のカラム中に全溶液を移し、5回以上ピペッティングした。その後、カラムをコレクションチューブにセットして室温で $13,000 \times g$ で1分間遠心し、コレクションチューブ内の溶液は捨てた。カラムをコレクションチューブに戻し、

300 μ l の Reagent 4 をカラムに加えて、室温で 13,000 \times g、1 分間遠心した。コレクションチューブ内の溶液を捨て、もう一度 300 μ l の Reagent 4 をカラムに加えて、室温で 13,000 \times g、1 分間遠心した。コレクションチューブ内の溶液は捨て、カラムをコレクションチューブに戻し、再び室温で 13,000 \times g、4 分間遠心した。完全にカラムを乾燥させるため、このステップではキャップを開けて行った。新しいコレクションチューブにカラムを移し、カラムのメンブレン上にあらかじめ 70°C で温めた Reagent 5 を 100 μ l 注意深く加えた。溶液がカラムの縁ではなくメンブレンの上に入られていることを確認した。室温で 1 分間インキュベートした後、室温で 13,000 \times g、1 分間遠心した。その後、コレクションチューブ内の溶液を 95°C、20 分間インキュベートした。結露を軽減するためにインキュベーション中に一度遠心した。実験に使用するまで、DNA を含む反応液は、-20°C で保存した。

I -2-4) Bisulfite 処理したゲノム DNA の PCR (Bisulfite-PCR)

PCR 装置は GeneAmp[®] PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。PCR 反応液組成は bisulfite 処理したゲノム DNA 2.5 μ l (25 ng/ μ l) をテンプレートとし、47 μ l の反応混合液 0.25 μ l の TaKaRa EpiTaq HS for bisulfite-treated DNA (5 U/ μ l)、5 μ l の 10 \times EpiTaq PCR buffer (Mg²⁺ free)、5 μ l の 25 mM MgCl₂、6 μ l の dNTP mixture (各 2.5 mM)、30.75 μ l の滅菌蒸留水 30.75 μ l とした。そこに、それぞれ 0.25 μ l のプライマー (100 pmol/ μ l) を混合し、全量を 50 μ l とした。反応条件は、98°C \cdot 10 sec、60°C \cdot 30 sec、72°C \cdot 30 sec、の 40 サイクルとした。プライマーは、マウス PrP 遺伝子配列 (ACCESSION ID AL833794) をもとに、MethPrimer ソフトウェア (<http://www.urogene.org/methprimer/>) を用い bisulfite 前のプライマーと bisulfite 後のプライマーを設定した (表 1)。PCR 終了後、PCR 産物 50 μ l を 1.8% アガロースゲ

ル (Lonza Japan, Tokyo, Japan) にて電気泳動を行うことで増幅した DNA 断片を確認し、目的のサイズの PCR 産物をゲルから精製した。

I -2-5) ゲルからの DNA 精製

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, Tokyo, Japan) を用いて、付属のプロトコールに従い DNA の精製を行った。方法は以下の通り行った。UV 照射下で清潔なカミソリを用いて目的の DNA バンドを切り取り、1.5 ml のチューブに移した。Membrane Binding Solution をゲルスライス 10 mg に対して 10 μ l 添加し、60°C でゲルスライスが完全に溶解するまでインキュベートした。付属のコレクションチューブに SV Minicolumn をセットし、調製したゲル溶解液を SV Minicolumn に移した後、室温で 1 分間インキュベートした。その後、16,000 \times g、1 分間遠心し、SV Minicolumn を取り外し、コレクションチューブ内の溶液を捨てた。SV Minicolumn をコレクションチューブに再度セットし、Membrane Wash Solution 700 μ l を添加し、16,000 \times g、1 分間遠心した。コレクションチューブの中の溶液を捨て、Membrane Wash Solution 500 μ l を再度添加し、16,000 \times g、5 分間遠心した。SV Minicolumn を新しい 1.5 ml のチューブに移し、nuclease-free water 50 μ l を添加し、1 分間室温でインキュベートし、その後 16,000 \times g、1 分間遠心した。SV Minicolumn を捨て、遠心チューブ内に溶出した DNA を回収し、NANODROP2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、吸光度を測定し、濃度を計測した後、実験に用いるまで -20°C で保存した。

I -2-6) シークエンス解析

シークエンス反応は、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) の付属プロトコールに従い、反応装置は GeneAmp[®] PCR System 9700

(Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。反応液組成は、材料および方法 5) にて精製した DNA 1 μ l (25 ~ 30 ng/ μ l) をテンプレートとし、18 μ l の反応混合液、3.5 μ l の 5 \times Sequencing Buffer、1 μ l の BRR-100、13.5 μ l の滅菌蒸留水と混和し、1 μ l (3.2 pmol/ μ l) のプライマー (表 1) を加え、全量を 20 μ l とした。反応条件は、(1) 96°C \cdot 1 min、(2) 25 サイクル (96°C \cdot 10 sec、50°C \cdot 5 sec、60°C \cdot 4 min) とした。反応終了後、反応液を新しい 1.5 ml のチューブに移し、125 mM の EDTA を 5 μ l 加えて混和した。その後、100% エタノールを 60 μ l 加えてよく混和し、暗所室温で 15 分間インキュベートした後、4°C、15,000 \times g で 15 分間遠心した。白色の沈殿物を残して、上清を除き、70% エタノールを 60 μ l 加えて、15,000 \times g で 5 分間遠心した。白色の沈殿を残して、上清を除いて乾燥機で 20 分間乾燥した。よく乾燥させた後、20 μ l の Hi-Di formamide を入れて 95°C で 2 分処理した後、ABI 3130 (神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センターの機械) 装置にてシーケンスを決定した。

I -2-7) CpG メチル化頻度の算出方法

シーケンス波形の生データを用いて、それぞれの CpG 配列におけるシトシンメチル化頻度を算出した (図 1)。算出方法は、Jiang M ら[Jiang M et al., 2010]の方法に従って行った。すなわち、シトシン残基 (C) の蛍光波形低部から頂点までの高さを計測して Ch とし、チミジン残基 (T) の蛍光波形低部から頂点までの高さを計測して Th とした。メチル化頻度 (%) = $\text{Ch}/\text{Ch}+\text{Th} \times 100$ として求めた。また、相補鎖においては、メチル化頻度 (%) = $\text{Gh}/\text{Gh}+\text{Ah} \times 100$ としてメチル化頻度を算出した。さらに、メチル化頻度の補正を行うために、あらかじめマウス由来 RAW264.7 細胞からメチル化されていることを確認した cDNA または、メチル化されていないことを確認した cDNA をプラスミドに組み込みクローニングし、それぞれのプラスミド

を 0:10、1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:10、7:3、8:2、1:9、10:0 の比率で混合してシーケンス解析することで、各組織のメチル化頻度の補正を行った。遺伝子組換え実験は、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行った（承認番号 25-47）。

I -2-8) 組織からの全 RNA の調製

RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用い全 RNA の調整を添付のプロトコールに従って行った。方法は、以下のとおりである。マウス各組織からそれぞれ 30 mg を滅菌した 1.5 ml のチューブに入れ、600 μ l の Buffer RLT Plus を加えて、超音波破碎機 VP050 (TAITEC, Saitama, Japan) を使用し塊がなくなるまで超音波した後、3 分間 10,000 \times g で遠心した。遠心分離後、ピペットで注意深く上清を採取し、2 ml コレクションチューブをセットした gDNA Eliminator スピンカラム中に移した。その後、8,000 \times g で 30 秒間遠心後、gDNA Eliminator スピンカラムを捨て、フロースルー液を採取した。採取したフロースルー液に等量の 70% エタノールを加え、ピペッティングにてよく混和した。試料を 2 ml コレクションチューブ中にセットされた RNeasy スピンカラム中に移した。8,000 \times g で 15 秒間遠心分離した後、フロースルー液を捨て、700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy スピンカラムに添加し、8,000 \times g で 15 秒間遠心分離した。遠心後、フロースルーは捨て、500 μ l の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、8,000 \times g で 15 秒間遠心した。遠心後、フロースルーは捨て、500 μ l の Buffer RPE を RNeasy スピンカラム中に添加し、8,000 \times g で 2 分間遠心分離した。遠心後、RNeasy スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、RNase フリー水を RNeasy スピンカラムに添加して、8,000 \times g で 1 分間遠心を行うことで全 RNA を溶出した。調整した全 RNA は、NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、吸光度を測定し、濃度を計測した。実験に使用するまで全 RNA

は-80°C で保存した。

I -2-9) リアルタイム RT-PCR

One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR kit (TaKaRa) に付属のプロトコールに従い、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa) を用いてリアルタイム RT-PCR を行った。プライマーは、Universal Probe Library (UPL) ソフトウェア (<http://roche-biochem.jp/sis/rtpcr/universal-probelibrary-upl/>) を用いて PrP と 28S rRNA に対する 4 種 2 組のプライマーを作製した (表 2)。反応液組成は PrPcDNA の増幅には、調製した全 RNA 5 μ l (10 ng/ μ l) をテンプレートとして用い、28S rRNA の増幅には、RNA 5 μ l (1 ng/ μ l) 用いた。15 μ l の反応混合液 (12.5 μ l の 2 \times One Step SYBR RT-PCR Buffer 4、1.5 μ l の TaKaRa Ex Taq HS Mix、0.5 μ l の PrimeScript PLUS RTase Mix、0.5 μ l の RNase Free dH₂O) にそれぞれ 2.5 μ l のプライマー (2 pmol/ μ l) を混合し、全量を 25 μ l とした。反応条件は、(1) 逆転写反応 : 42°C \cdot 5 分、95°C \cdot 10 秒、(2) PCR 反応 : 95°C \cdot 5 秒、65°C \cdot 30 秒を 45 サイクル、(3) Dissociation : 95°C \cdot 15 秒、60°C \cdot 30 秒、95°C \cdot 15 秒とした。リアルタイム RT-PCR 終了後、5 μ l の RT-PCR 産物を 3% アガロースゲル (Lonza Japan) にて電気泳動を行うことで増幅した DNA 断片を確認した。各組織における 50 ng 中の PrP mRNA の存在量を内在性コントロール 28S rRNA にて補正し、大脳における PrP 遺伝子の発現を 100 として相対数値化した。

I -2-10) 統計解析

有意差検定は、スチューデント t 検定を用いた。相関分析は、ピアソンの相関係数を用いた。

I -3 結果

I -3-1) C57BL/6CrSlc および BALB/cCrSlc マウスの PrP 遺伝子上流部の塩基配列

C57BL/6CrSlc および BALB/cCrSlc マウスにおける PrP 遺伝子プロモーター領域を含む上流部の塩基配列を決定するために、大脳および肝臓から得られたゲノム DNA を用いて PCR を行い、PCR 増幅産物を直接シーケンス解析することで塩基配列を決定した。図 2 は、C57BL/6CrSlc マウス大脳および肝臓から得られたゲノム DNA をもとに PCR を行い、アガロース電気泳動によって目的増幅産物の確認を行ったものである (図 2, A および B)。プライマーペア nMePrP-1F および nMePrP-1R を用いた PCR によって、予想される 529 bp に単一のバンドを確認した (図 2, A)。プライマーペア nMePrP-2F および nMePrP-2R を用いた PCR によって、予想される 583 bp に単一のバンドを確認した (図 2, B)。ゲルから目的の産物を切り出し精製し、シーケンス反応を行った後、塩基配列決定を行った (図 3)。得られた塩基配列は、Gen bank ACCESSION ID AL833794 と同一の配列が確認され、配列中に含まれる CpG 配列を 1 ~ 46 まで番号を付けた。CpG アイランド解析を行ったところ、図 3 青のボックスで囲まれた範囲 370 bp (-218 ~ +152) が CpG アイランドを示し、CpG 9 ~ CpG 40 までの 32 個の CpG 配列が含まれた。

I -3-2) CpG メチル化頻度の補正

実際にシーケンス波形から計測されたメチル化頻度を補正するために、マウス由来株化培養細胞 RAW264.7 から得られたゲノム DNA を bisulfite 処理し、CpG 1 から CpG 4 までが完全にメチル化されたゲノム DNA と非メチル化状態のゲノム DNA を PCR で増幅し、pMD20 にクローニングした。材料および方法 I -2-3) のとおり

非メチル化 DNA を含むプラスミドとメチル化 DNA を含むプラスミドを 0 : 10、1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1、10 : 0 の割合で混ぜた後、シーケンス解析を行った (図 4)。シーケンス反応に forward primer を用いた時に実際に観察されたメチル化頻度は、それぞれ 0.0 ± 0.0 (期待値 0)、 4.2 ± 5.4 (期待値 10)、 14.7 ± 2.9 (期待値 20)、 25.8 ± 3.7 (期待値 30)、 35.5 ± 2.9 (期待値 40)、 44.9 ± 3.3 (期待値 50)、 52.4 ± 3.3 (期待値 60)、 63.4 ± 3.6 (期待値 70)、 76.4 ± 3.7 (期待値 80)、 87.4 ± 3.2 (期待値 90)、 100.0 ± 0.0 (期待値 100) であった。reverse primer を用いた時に実際に観察されたメチル化頻度は、それぞれ 0.0 ± 0.0 (期待値 0)、 13.3 ± 4.3 (期待値 10)、 28.6 ± 4.2 (期待値 20)、 40.0 ± 3.7 (期待値 30)、 52.3 ± 5.8 (期待値 40)、 61.4 ± 3.7 (期待値 50)、 71.3 ± 4.0 (期待値 60)、 80.2 ± 4.0 (期待値 70)、 89.5 ± 3.4 (期待値 80)、 95.9 ± 4.1 (期待値 90)、 100 ± 0.0 (期待値 100) であった。各組織から算出されたメチル化頻度の実測値 (X) は、シーケンス反応に forward primer を使用した時には、 $Y_f = -0.0019X^2 + 1.1724X + 2.2458$ 式に当てはめ補正值で表した。また、reverse primer を使用した時には $Y_r = 0.0044X^2 + 0.5156X + 1.2904$ の式に当てはめ補正值で表した。

I -3-3) C57BL/6CrSlc マウス各組織における PrP 遺伝子の CpG メチル化頻度

C57BL/6CrSlc マウス雄および雌 2 匹ずつからそれぞれ 34 組織のゲノム DNA を抽出し、bisulfite 処理を行い、Bisulfite-PCR を行った。塩基配列-682 bp から-154 bp を増幅するプライマーペア MePrP-1F および MePrP-1R を使用した時に、目的の 529 bp に単一のバンドを確認した (図 5, A)。また、塩基配列-236 bp から+347 bp を増幅するプライマーペア MePrP-2F および MePrP-2R を使用した時に、目的の 583 bp に単一のバンドを確認した (図 5, B)。ゲルから目的のバンド DNA を切り出し、精製し、

直接シーケンス反応に使用することで塩基配列の決定を行い、個々のメチル化頻度を算出した。

雄と雌のそれぞれ 34 組織から得られた CpG 1 から CpG 46 までのメチル化頻度を表 3、表 4、図 6 に示した。CpG 1 のメチル化頻度の平均は、雄および雌において、それぞれ 53.8%、52.3% であった。もっとも高い頻度のメチル化が、胸腺 (雄 83.2%、雌 90.4%) で認められ、次いで血液 (雄 82.2%、雌 83.2%)、脾臓 (雄 81.4%、雌 81.0%)、肝臓 (雄 77.8%、雌 75.5%) で認められた。もっとも低い頻度のメチル化が、直腸 (雄 22.7%、雌 267.0%) で認められ、次いで盲腸 (雄 36.6%、雌 30.8%)、十二指腸 (雄 39.5%、雌 34.6%)、虫垂 (雄 46.4%、雌 30.8%) で認められた。メチル化頻度において、雄雌間で組織ごとの有意な差は認められなかった ($P < 0.01$)。

CpG 2 のメチル化頻度の平均は、雄および雌において、それぞれ 16.7%、16.7% であり、CpG 1 のメチル化頻度よりも低下した。もっとも高い頻度のメチル化が、胸腺 (雄 48.6%、雌 46.0%) で認められ、次いで脾臓 (雄 42.6%、雌 44.0%)、副腎 (28.1%、32.4%)、肝臓 (27.5%、28.4%) で認められた。大脳 (雄 4.4%、雌 6.1%) と小脳 (雄 7.5%、雌 9.5%) のメチル化頻度は低かった。CpG 2 においても雄雌間で組織ごとの有意な差は認められなかった ($P < 0.01$)。

CpG 3 のメチル化頻度の平均は、雄および雌において、それぞれ 14.0%、13.6% であり、CpG 2 に比べさらなる低下が認められた。心臓のメチル化頻度が最も高く、雄 32.7%、雌 34.4% であったが、CpG 2 のメチル化頻度 (雄 17.1%、雌 22.3%) との逆転が認められた。このように CpG 3 においては、平均値は、CpG 2 よりも低下が認められたが、いくつかの組織においては、CpG 3 の方が CpG 2 と比較して、メチル化頻度の高いものが認められた。嗅球 (雄 6.1%、雌 4.2%)、胸腺 (雄 7.1%、雌 5.2%)、虫垂 (雄 8.3%、雌 7.2%)、子宮 (7.8%) におい低いメチル化が認められ、

精巣のみが非メチル化状態であった。胸腺では、CpG 1、CpG 2 番目において、組織中で最も高いメチル化状態を示したが、CpG 3 においては、嗅球に次いで低いメチル化頻度であった。CpG 3 においても雄雌間で組織ごとの有意な差は認められなかった ($P < 0.01$)。

CpG 4 のメチル化頻度の平均は、雄および雌において、それぞれ 10.8%、11.0% であり、CpG 3 (雄 14.0%、雌 13.6%) に比べると若干の低下が認められた。心臓 (雄 26.7%、雌 26.9%) においてメチル化頻度が最も高く、次いで、副腎 (雄 20.7%、雌 24.0%) であった。精巣のみが、CpG 3 に加えて、CpG 4 においても非メチル化状態が確認された。CpG 4 においても雄雌間で組織ごとの有意な差は認められなかった ($P < 0.01$)。

CpG 5 から CpG 7 では、ほとんどの組織で非メチル化状態を示し、胃、腎臓、副腎、眼球、血液においてのみ低頻度のメチル化が認められた。CpG 8 から CpG 46 のメチル化は、すべての組織において認められなかった。メチル化頻度の平均値は、CpG 1 から CpG 7 へと遺伝子下流に行くに従って低下する傾向を示したが、組織ごとのメチル化状態は、組織特有のメチル化状態にあった。図や表中には示さないが、CpG 1 よりも上流に存在する 6 つの CpG -6 から CpG -1 (塩基場所-1275、-1273、-1271、-1182 および-864) についても雌の脳と肝臓においてのみ調べたが、いずれの CpG も 100% のメチル化を示した。

I -3-4) C57BL/6CrSlc マウスから得られた 34 組織中の PrP 遺伝子発現解析

それぞれの CpG メチル化頻度と PrP 遺伝子発現の相関関係を評価するために、マウス 34 組織中の PrP 遺伝子発現の定量をリアルタイム RT-PCR を用いて行った (表 5 および図 7)。PrP 遺伝子発現量の補正は、28S rRNA を内在性コントロールとして

選択した。マウスゲノム DNA からの PCR 増幅を回避するために、用いたプライマーペアは、PrP cDNA の増幅には、エクソン 1 およびエクソン 2 に位置するプライマーペアを用い、28S rRNA の増幅にはエクソン 5 およびエクソン 6 の位置にするプライマーを設定し用いた (表 2)。PrP 遺伝子転写物の増幅がすべての試料で確認でき、組織間で様々な遺伝子発現状態にあることが認められた。PrP 遺伝子は、大脳 (100) で最も高く、次いで小脳 (79.48 ± 23.74)、間脳 (68.32 ± 19.45)、嗅球 (50.41 ± 19.85)、延髄 (49.03 ± 9.83)、視床 (35.85 ± 8.25)、脊髄 (29.63 ± 9.76) および下垂体 (22.69 ± 5.17) であった。大脳での PrP 遺伝子発現は 28S rRNA の転写物の 0.034% であった。もっとも低い PrP 遺伝子発現は、膵臓 (0.10 ± 0.00) で認められ、次いで血液 (0.14 ± 0.04)、十二指腸 (0.50 ± 0.07)、空腸 (0.71 ± 0.21) と胆嚢 (0.89 ± 0.23) であった。他の組織では、PrP 遺伝子発現の範囲は 1.3 から 19.6 の間で認められた。

I -3-5) PrP 遺伝子メチル化と遺伝子発現の相関性

定量リアルタイム RT-PCR の結果と個々の CpG 部位のメチル化頻度に基づいて、ピアソンの相関分析を行った結果、CpG 2 (-576 bp) のメチル化と PrP 遺伝子発現との間に有意な負の相関を認めた (Pearson's $r = -0.374$, $P = 0.0352$) (表 6)。しかし、他の CpG 部位においては、有意な相関関係は認められなかった。

CpG 2 が位置する配列の重要性を見い出すために転写因子結合配列を検索した結果、CpG 2 (-576 bp, 図 3) は、CACGAG 配列上に存在することがわかった (図 8)。CACGAG 配列には、basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子ファミリーが結合することが知られている [Iso, T et al., 2003]。この CACGAG 配列は、他の CpG 1 および CpG 3 から CpG 46 上には存在しない配列であった。さらに PrP 遺伝子上を検索した結果、エクソン 1 の前後 5 kb 以内に CACGAG 配列は存在しなかった。また、CACGAG 配

列のすぐ下流には、GAGGG 配列 (-569 bp ~ -565 bp) が認められた。この相補配列である CCCTC は、CCCTC 結合因子 (CTCF) が結合することが知られ、CTCF はインシュレーターである[Franco, M et al., 2014]。CCCTC 配列は、図 3 中の PrP 遺伝子プロモーター領域内の-40 bp から-36 bp の位置にも存在が確認された。

I -3-6) C57BL/6CrSlc および BALB/cCrSlc マウス系統間の精巣における遺伝子メチル化の相違

C57BL/6CrSlc マウス各組織の CpG メチル化解析において精巣だけが CpG 3 および CpG4 の非メチル化を示した (表 3、図 6)。そこで、さらに精巣での PrP 遺伝子 CpG メチル化および発現におけるマウス系統間の相違について解析を行うために、BALB/c マウス大脳、小脳および精巣における Bisulfite-PCR および遺伝子発現定量 RT-PCR を行った (図 9、図 10)。BALB/c マウスの大脳、小脳および精巣における 46 箇所の CpG 部位のメチル化頻度は、CpG 5 から CpG 46 が C57BL/6 マウスと同様に完全な非メチル化状態にあることが明らかとなった。CpG 1 から CpG 4 のメチル化頻度において、大脳および小脳の両方においては、C57BL/6 および BALB/c マウス両系統間で有意な差は認められなかった。(図 9, A-D)。一方で、BALB/c マウス精巣において、CpG 1 では、 $42.8 \pm 1.1\%$ を認め ($P = 0.0008$)、C57BL/6 と比較して有意な差を認めた (図 9, A)。さらに、C57BL/6 においては非メチル化状態を示した CpG 3 および CpG 4 において、BALB/c マウス精巣ではそれぞれ $4.2 \pm 0.9\%$ ($P = 5.0 \times 10^{-7}$) および $4.1 \pm 2.0\%$ ($P = 0.0005$) と有意なメチル化を認めた (図 9, C および D)。CpG 2 メチル化においては、両系統間に有意な差は認めなかった ($P = 0.727$) (図 9, B)。

BALB/c において、PrP 遺伝子発現を大脳、小脳、および精巣において調べたところ、C57BL/6 および BALB/c マウス系統間で有意な差は認めなかった。(図 10)。以

上のことから、精巢の CpG 1、CpG 3 および CpG 4 のメチル化の違いは PrP 遺伝子の発現に影響がないことが示唆され、CpG 2 に系統間でメチル化の違いが認められなかったことが、PrP 遺伝子発現を系統間で同等にしていることを強く示唆した。

I -4 考察

本章の研究は、マウスをモデルとして 34 組織の PrP 遺伝子発現量と遺伝子発現の調節と深く関与しているプロモーター領域を含む遺伝子上流部における CpG メチル化との相関性を初めて評価したものである。

リアルタイム定量的 RT-PCR を使用して C57BL/6CrSlc マウスにおいて、これまでに報告のない組織を含め 34 の異なる組織において PrP 遺伝子の発現状態を定量化した。Sheep [Wang et al., 2011]、bovine [Tichopad et al., 2003] の mRNA 量をリアルタイム定量的 RT-PCR で解析した結果では、中枢神経組織の発現が他の組織と比べて高い。今回の結果においても、中枢神経組織の PrP 遺伝子発現がもっとも高い状態にあり、PrP 遺伝子の発現は中枢神経組織において優勢的に高い発現状態にあることを確認した (表 5 および図 7)。

CpG 配列のメチル化状態の解析は、マウス PrP のプロモーター領域とその周辺 (エクソン 1 を含む上流域 749 bp、下流域 280 bp) の領域に注目した。組織ごとに特有な PrP 遺伝子発現を生み出す機構を理解するため、選択した配列中に含まれる 46 箇所の CpG 配列についてメチル化状態を詳細に解析した (図 3 および図 6)。メチル化状態の解析には、Bisulfite-PCR 産物を直接シーケンス解析に用いる手法を採用した。この手法は、ゲノム DNA を bisulfite 処理後、PCR を用い、得られた増幅産物を精製し、直接シーケンス解析に用いる方法である。シーケンス波形からの CpG メチル化頻度の算出には、Jiang らの方法を用いた [Jiang et al., 2010]。これらの手法を採用することで、PCR 産物のプラスミドへのクローニングに伴うシーケンス結果の偏りを回避した。Jiang らは、シーケンス波形からメチル化頻度を計算する際に、プロセスデータを使用しているが、本研究では、生データ (Raw data) をもと

にメチル化頻度を求めた(図 1)。理由として、シーケンスのプロセステーダーは、塩基配列を読み取ることに重点が置かれ、ソフトウェアが波形を同じ波形高になるように調節しているため、必ずしも真実を反映していないと考えたためである。また、今回の実験からシーケンス解析において、センス鎖を解読するのか、アンチセンス鎖を解読するのかによって、予想されるメチル化頻度に違いを生じ、補正が必要となることが明らかとなった(図 4)。このことは、A、C、T、G の蛍光強度を波形に表す際に生じていると考えられた。すなわち、メチル化頻度を算出する際に、センス鎖では、メチル化頻度 (%) = $Ch/(Ch+Th)$ を用い、アンチセンス鎖では、メチル化頻度 (%) = $Gh/(Gh+Ah)$ を用いているからである(図 1)。

マウス PrP 遺伝子に含まれる 46 箇所の CpG 配列におけるメチル化状態を調べた結果、CpG アイランド (CpG 9 から CpG 40) を含む CpG 8 から CpG 46 において、非メチル化状態を示した(図 6)。この領域には、マウスやラットのプロモーター解析による報告から、CpG 20 から CpG 24 の領域にプロモーターの存在が示唆されている [Baybutt and Manson, 1997; Saeki et al., 1996b]。一般的に、プロモーター領域に存在する CpG 配列のシトシンメチル化は、転写活性がサイレントな遺伝子との相関性を持つエピジェネティックなマークであり、遺伝子発現が ON 状態の CpG アイランドはメチル化されていない [Imamura et al., 2001]。また、細胞特異的な発現を示す遺伝子は、多くの細胞で遺伝子がメチル化されており不活性状態が保たれる一方で、ハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域が存在する CpG アイランドはほとんどの組織や細胞で非メチル化状態にある [Caiafa and Zampieri, 2005; Vinson and Chatterjee, 2012]。本章で明らかになった結果から、PrP 遺伝子プロモーター領域を含む、CpG アイランドは、調べたすべての組織で非メチル化状態であったことから PrP 遺伝子は典型的なハウスキーピング遺伝子の一つであることを証明した(図 6)。

これまでの他の遺伝子によるエンハンサー領域解析によって、エンハンサー領域は、CpG の存在頻度が低い傾向にあり、おそらく ten-eleven translocation (TET) などの蛋白質の存在のために、不完全なメチル化が起こるとされる [Jones, 2012; Stadler et al., 2011]。これらの不完全なメチル化が起こる領域は、組織や細胞ごとに様々なメチル化状態にあり、メチル化可変領域 (Differentially methylated regions, DMRs) と呼ばれている。本章の結果は、CpG 1 から CpG 7 までの領域 (-579 bp ~ -279 bp) において、組織ごとに異なった様々なメチル化状態にあることを明らかにし (図 6)、染色体上の一つのメチル化可変領域であることを強く示唆した。各組織における PrP 遺伝子発現の定量化を行い、遺伝子メチル化との相関性を調べた結果、CpG 2 (-576 bp) が PrP 遺伝子発現と負の相関関係にあることが明らかとなった (表 6)。また、C57BL/6 および BALB/c マウス精巣における DNA メチル化解析から、両系統間で PrP 遺伝子発現量に違いを認めないことと、CpG 1、CpG 3 および CpG 4 には両系統間でメチル化の違いが存在するが、CpG 2 のメチル化には有意な差がないことが示され、CpG 2 のメチル化が PrP 遺伝子発現に影響することが示唆された (図 9 および図 10)。PrP 遺伝子プロモーター領域を含む CpG アイランドは、完全な非メチル化状態にあり、そのすぐ上流領域にメチル化可変領域と遺伝子発現に負の相関性を示す場所が存在したことから、CpG 2 を含む領域が PrP 遺伝子のエンハンサー領域であることが予想された (表 6 および図 6)。

興味深いことに、CpG 1 から CpG 46 において、CpG 2 が存在する場所のみに N-box と呼ばれる配列 CACGAG が存在した (図 3)。N-box には、bHLH ファミリーの HES-1 (mouse homologue of *Drosophila hairy* and *Enhancer of split 1* protein) などの転写リプレッサー因子が結合することが知られている [Iso et al., 2003]。HES-1 は、胎児期の中枢神経系 (CNS) の発達に大きな役割を果たし、神経幹細胞および神経前駆細胞の

維持に大きな影響を及ぼしている[Kageyama, R et al., 2008]。HES-1 遺伝子 (*Hes1*) の発現は、マウス胚性神経上皮細胞と神経前駆体で高い発現を示し、成体の中枢神経系における発現は非常に低いレベルまで減少している[Sasai et al., 1992]。一方で、マウス胚における PrP 遺伝子の発現は、神経分化が終了した中枢神経細胞や末梢神経細胞で確認され、生後から 3 週令までに急速に遺伝子発現は上昇し、その後は、生涯を通じて発現レベルが維持される[Lazarini et al., 1991; Manson et al., 1992]。このように PrP 遺伝子発現は、神経系における胎児期および成体期の段階での HES-1 遺伝子の発現と逆相関の発現パターンである。本章の結果では、N-box が位置する CpG 2 サイトのメチル化と PrP 遺伝子発現が負の相関関係にあることを示したが、リプレッサー領域のメチル化と負の相関性があることを説明するには、さらなる研究が必要である。N-box に結合する未知のエンハンサー因子が HES-1 などのリプレッサー効果から避難しているのかもしれない。

Neuro-2a 細胞において、HES-1 を人工的に過剰発現させると PrP 遺伝子の発現を著しく減少させることが報告されている[Wright et al., 2009]。一方で、最近の報告では、HES-1 は、*ADAMTS5*、*MMP13*、*IL6*、*Il1rl1* などの遺伝子発現の誘導によって、本来のリプレッサーの働きからエンハンサーに切り替わることが報告されている[Sugita et al., 2015]。これらのことから分化後の神経細胞においては、HES-1 のような本来リプレッサー因子がエンハンサーとして働き PrP 遺伝子の発現を高めているのかもしれない。

また、N-box 配列 (-578 bp から -573 bp) のすぐ下流の -569 bp から -565 bp には、CCCTC 配列の存在が認められた。CCCTC 結合因子 (CTCF) は、インシュレーターと呼ばれ、エンハンサー (またはリプレッサー) とプロモーターとの相互作用を妨害する因子として知られている[Gaszner and Felsenfeld, 2006]。さらに、CTCF は遺伝

子転写の抑制または活性化に寄与し、クロマチン構成およびリモデリングに参加している因子である [Franco et al., 2014]。今後、PrP 遺伝子上流部に存在する CACGAGATTGAGGG 配列にどのような転写因子が結合するのかを明らかにする必要があるが、CpG 2 サイトのメチル化は、PrP 遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしている可能性がある。

マウス [Baybutt et al., 1997]、ウシ [Elmonir et al., 2010] の PrP 遺伝子プロモーター解析の報告によると、イントロン 1 に転写活性に影響をおよぼすエンハンサーと考えられる領域を認めている。パーキンソン病の主な危険遺伝子であるヒト α -シヌクレイン遺伝子のメチル化に関する報告では、イントロン 1 のメチル化によって遺伝子発現を調節し、パーキンソン病患者において患部のメチル化頻度が変化することが報告されている [Jowaed et al., 2010]。さらに次世代シーケンサーの登場によって、パーキンソン病特有のヒト α -シヌクレイン遺伝子メチル化が明らかにされつつある [de Boni et al., 2011]。本実験では、マウス PrP 遺伝子イントロン 1 の上流域 280 bp 中の 13 個の CpG 配列のメチル化を調べたが、すべてが非メチル化状態を示した。さらに範囲を遺伝子下流域に広げて、CpG 配列メチル化状態の解析や、プリオン病状態にある中枢神経組織において、本章の研究で明らかにしたメチル化可変領域におけるメチル化状態の変化について興味を持たれる点である。

以上のことから、第 I 章では、マウスを研究材料として、異なる 34 組織の PrP 遺伝子発現状態および遺伝子上流部のメチル化状態を明らかにした。また、遺伝子発現と CpG メチル化の相関解析から、-576 bp に位置する CpG 2 のメチル化が PrP 遺伝子発現に重要な調節領域であることが示唆された。同様な現象がヒトやウシで認められるのかは、今後の研究に委ねられるが、本章の研究成果は、プリオン病の病態機構の解明や遺伝子を標的とした治療法の開発に貢献する成果と考えられる。

I -5 要約

細胞型 PrP (PrP^C) は、GPI アンカーを介して細胞表面に存在する糖蛋白質であり、プリオン病の伝達や進行にきわめて重要な役割を果たしている。マウス PrP 遺伝子は、第二染色体上の長腕上に存在し、3つのエクソンと2つのイントロンから構成されている。PrP mRNA は、組織中に普遍的に存在していると考えられているが、PrP 遺伝子メチル化を含むエピジェネティクス分野の研究報告はない。そこで本章では、マウス PrP 遺伝子プロモーター領域とその周辺（エクソン 1 を含む上流域 749 bp および下流域 280 bp の 1029 bp 領域）の CpG メチル化状態を異なる 34 組織において明らかにすることを目的とした。

マウス PrP 遺伝子のプロモーター領域を含む CpG アイランド(-218 bp ~ +152 bp) は、調べたすべての組織において完全に非メチル化状態であり、PrP 遺伝子は典型的なハウスキーピング遺伝子であることを明らかにした。一方、CpG アイランドに隣接する領域 (-599 bp ~ -279 bp) の CpG メチル化状態は、組織ごとにさまざまな状態にあり、メチル化可変領域であることを強く示唆した。さらに興味深いことに、CpG 2 (-576 bp) のメチル化が PrP 遺伝子発現と負の相関関係にあることを明らかにした (Pearson's $r = -0.374$, $P = 0.035$)。以上のことから、PrP 遺伝子は、典型的なハウスキーピング遺伝子であり、メチル化可変領域に存在する CpG のメチル化が組織特有な遺伝子発現調節に重要であることを示唆した。これらの研究成果は、プリオン研究分野におけるエピジェネティクスに貢献する成果と考えられる。

I -6 表

表1 PCRに使用したプライマー

Gene symbol	Primer name	Size of product	Sequence	Sequence ID
<i>Prnp</i>	nMePrP-1F	529 bp	5'-GTGGGAGCTGTTAAATGCAGTG-3'	AL833794
	nMePrP-1R		5'-CCCCAGTGTCAGCACTCCCTGA-3'	
<i>Prnp</i>	nMePrP-2F	583 bp	5'-GGAGCATTGGGTACTGGATCAG-3'	AL833794
	nMePrP-2R		5'-CCAAGGACAGTCAAAAAGATGCCA-3'	
<i>Prnp</i>	MePrP-1F	529 bp	5'-GTGGGAGTTGTTAAATGTAGTG-3'	AL833794
	MePrP-1R		5'-CCCCAATATCAACACTCCCTAA-3'	
<i>Prnp</i>	MePrP-2F	583 bp	5'-GGAGTATTGGGTATTGGATTAG-3'	AL833794
	MePrP-2R		5'-CCAAAAACAATCAAAAAATACCA-3'	
<i>Prnp</i>	MePrP-3F	612 bp	5'-ATTGAATTATTTTAGTTAAAGGTG-3'	AL833794
	MePrP-3R		5'-CTTAAACTCTCAAAAACTAACATC-3'	

表 2 リアルタイム RT-PCRに使用したプライマー

Gene symbol	Primer name	Size of product	Sequence	Sequence ID
<i>Prnp</i>	PrP-F	71 bp	5'-TCCAATTTAGGAGAGCCAAGC-3'	NM_011170
	PrP-R		5'-GCCGACATCAGTCCACATAG-3'	
28S rRNA	28S-F	120 bp	5'-AGCCAAGCACATACACCAAAA-3'	NR_003279
	28S-R		5'-GGGTTTAGACCGTCGTGAGA-3'	

表3 雄マウスの各組織におけるメチル化頻度

Mouse tissue	CpG position							
	1	2	3	4	5	6	7	8-46
Cerebrum	41.1±1.9	4.4±4.2	9.5±2.3	5.4±1.6	—	—	—	—
Cerebellum	71.2±1.5	7.5±3.9	15.4±2.4	10.6±1.8	—	—	—	—
Diencephalon	55.4±2.7	7.1±5.1	7.1±3.9	6.0±2.2	—	—	—	—
Olfactory bulb	51.9±2.2	10.7±1.1	6.1±2.1	5.5±1.0	—	—	—	—
Thalamus	54.9±2.3	11.5±0.8	9.9±1.3	9.0±1.5	—	—	—	—
Pituitary gland	56.0±3.3	13.7±1.9	12.8±3.2	9.4±1.9	—	—	—	—
Medulla oblongata	54.3±2.3	12.5±3.7	15.1±3.6	7.6±3.7	—	—	—	—
Spinal cord	42.8±4.6	10.6±4.4	13.9±3.3	7.1±5.4	—	—	—	—
Duodenum	39.5±2.4	12.0±2.3	12.9±2.5	9.2±1.7	—	—	—	—
Jejunum	41.5±6.8	11.0±0.9	13.3±8.1	8.0±5.7	—	—	—	—
Ileum	37.2±2.6	11.5±2.4	13.2±1.6	10.5±2.0	—	—	—	—
Colon	30.7±5.9	9.8±1.8	11.3±2.7	9.1±1.6	—	—	—	—
Appendix	46.4±10.7	18.9±4.7	8.3±0.9	9.6±1.8	—	—	—	—
Cecum	36.6±14.1	13.4±6.6	8.9±1.8	9.5±1.8	—	—	—	—
Rectum	22.7±2.4	6.3±2.6	6.9±1.8	6.9±1.8	—	—	—	—
Gastric	45.3±7.4	11.6±3.8	22.0±2.3	16.4±1.6	0.8±1.9	1.9±3.0	—	—
Heart	57.9±2.5	17.1±3.1	32.7±4.9	26.7±3.5	—	—	—	—
Thymus	83.2±4.5	48.6±3.4	7.1±3.7	10.0±1.8	—	—	—	—
Kidney	55.2±11.9	15.4±3.3	14.4±3.6	12.5±4.4	—	2.5±3.0	—	—
Adrenal gland	58.2±3.7	28.1±2.1	27.6±3.1	20.7±3.1	1.2±2.6	2.3±2.6	—	—
Lung	65.4±1.6	19.3±3.5	21.2±2.8	13.8±1.6	—	—	—	—
Spleen	81.4±1.6	42.6±2.7	11.4±2.4	12.2±1.6	—	—	—	—
Liver	77.8±2.3	27.5±1.4	12.5±2.2	10.1±2.2	—	—	—	—
Gallbladder	65.6±1.5	23.1±3.8	21.1±2.0	15.6±2.7	—	—	—	—
Pancreas	63.6±2.9	18.2±1.9	18.1±2.0	10.7±1.7	—	—	—	—
Thigh muscle	45.4±2.2	12.5±3.4	29.9±5.2	21.0±3.8	—	—	—	—
Bladder	56.1±7.1	17.3±3.5	12.2±2.9	11.1±1.7	—	—	—	—
Eyeball	64.3±2.5	12.6±2.2	21.0±2.3	16.0±1.7	2.8±3.1	4.9±3.5	1.2±2.0	—
Glossa	45.2±4.5	11.9±2.4	23.4±4.8	16.8±5.0	—	—	—	—
Blood	82.2±1.2	42.2±4.8	12.4±6.8	11.1±3.8	4.2±10.4	3.8±4.2	2.4±5.9	—
Seminal vesicle	54.2±6.0	9.5±1.5	9.1±1.3	7.6±1.3	—	—	—	—
Testis	38.9±3.2	16.9±2.7	—	—	—	—	—	—
Average	53.8±4.1	16.7±3.0	14.0±2.8	10.8±2.3	0.3±0.5	0.5±0.5	0.1±0.2	—

表 4 雄マウスの各組織におけるメチル化頻度

Mouse tissue	Number of CpG position							
	1	2	3	4	5	6	7	8-46
Cerebrum	47.3±6.2	6.1±2.9	7.2±2.1	6.4±1.6	—	—	—	—
Cerebellum	72.4±2.5	9.5±0.9	14.8±3.7	12.3±3.6	—	—	—	—
Diencephalon	55.5±5.5	11.1±1.9	7.2±2.3	5.7±1.9	—	—	—	—
Olfactory bulb	51.8±2.7	10.5±2.1	4.2±2.4	4.7±2.3	—	—	—	—
Thalamus	55.9±2.2	11.8±1.6	10.9±3.9	9.0±3.9	—	—	—	—
Pituitary gland	49.4±11.0	15.1±2.1	8.2±3.5	6.5±2.3	—	—	—	—
Medulla oblongata	44.3±9.2	8.1±1.9	9.5±5.0	6.9±3.7	—	—	—	—
Spinal cord	45.0±3.0	9.6±2.4	13.2±6.8	8.3±5.5	—	—	—	—
Duodenum	34.6±6.3	10.7±1.6	14.5±4.6	10.0±2.1	—	—	—	—
Jejunum	38.0±2.3	11.9±2.1	16.0±2.5	12.3±1.48	—	—	—	—
Ileum	40.9±6.3	13.3±1.7	14.7±2.0	10.9±1.5	—	—	—	—
Colon	27.2±4.2	9.7±1.7	9.9±2.4	10.0±5.3	—	—	—	—
Appendix	30.8±9.1	11.2±3.4	7.2±3.7	7.8±3.7	—	—	—	—
Cecum	30.8±5.9	9.9±2.3	8.3±3.4	9.1±2.1	—	—	—	—
Rectum	27.0±2.9	9.0±2.0	7.1±1.5	7.5±1.9	—	—	—	—
Gastric	39.9±17.0	14.0±13.3	15.5±4.7	12.5±4.1	0.7±1.7	0.8±1.9	—	—
Heart	62.0±6.8	22.3±2.3	34.4±5.6	26.9±2.4	—	—	—	—
Thymus	90.4±6.1	46.0±2.5	5.2±2.1	7.9±1.1	—	—	—	—
Kidney	59.1±2.6	15.6±3.5	13.7±2.8	12.2±2.7	—	—	—	—
Adrenal gland	57.4±4.3	32.4±2.7	27.8±5.5	24.0±3.7	—	0.9±2.1	—	—
Lung	63.0±3.4	17.9±1.4	21.7±4.9	16.1±4.3	—	—	—	—
Spleen	81.0±3.8	44.0±1.8	9.5±0.7	10.3±3.1	—	—	—	—
Liver	75.5±1.8	28.4±2.5	10.8±4.0	8.9±0.7	—	—	—	—
Gallbladder	63.9±3.2	19.0±4.7	21.6±2.9	17.6±2.3	—	—	—	—
Pancreas	67.0±3.0	18.3±1.9	22.2±5.2	12.0±2.6	—	—	—	—
Thigh muscle	45.1±4.0	8.3±0.7	21.3±3.8	14.9±3.9	—	—	—	—
Bladder	48.5±4.5	15.2±4.5	14.2±3.5	11.0±2.1	—	—	—	—
Eyeball	63.1±6.3	10.6±1.5	18.8±3.8	11.8±3.1	—	2.0±3.4	—	—
Glossa	39.6±2.6	10.1±1.7	17.0±4.4	11.4±0.9	—	—	—	—
Blood	83.2±0.7	44.8±3.9	9.0±5.1	9.4±2.7	3.0±6.7	7.7±8.3	2.3±5.2	—
Uterus	38.0±4.4	14.6±1.8	7.8±2.4	7.4±2.7	—	—	—	—
Ovary	45.9±3.1	16.0±2.2	12.8±2.2	10.7±1.9	—	—	—	—
Average	52.3±4.9	16.7±2.6	13.6±3.5	11.0±2.7	0.1±0.2	0.3±0.5	0.1±0.2	—

表 5 マウス各組織におけるPrP遺伝子発現

Cell Line	Gene Expression
Cerebrum	100
Cerebellum	79.5±17.7
Diencephalon	68.3±19.4
Olfactory bulb	50.4±19.8
Medulla oblongata	49.0±9.8
Thalamus	35.8±8.3
Spinal cord	29.6±9.8
Pituitary gland	22.7±5.2
Eyeball	19.6±8.1
Kidney	17.0±3.3
Lung	14.9±3.6
Gastric	10.8±4.4
Colon	9.9±1.7
Thigh muscle	9.5±4.3
Appendix	8.7±2.6
Heart	8.4±1.5
Adrenal gland	7.4±0.4
Ovary	7.2±2.0
Bladder	5.2±3.4
Spleen	5.2±1.5
Rectum	5.1±0.3
Glossa	4.4±1.1
Seminal vesicle	4.3±1.9
Liver	4.2±2.0
Cecum	4.2±0.2
Testis	4.0±1.8
Uterus	3.3±0.4
Thymus	2.7±0.6
Ileum	1.3±0.1
Gallbladder	0.9±0.2
Jejunum	0.7±0.2
Duodenum	0.5±0.1
Blood	0.14±0.04
Pancreas	0.10±0.003

C57BL/6 マウス大脳における PrP 遺伝子発現量を 100 とし、相対発現量で示した。

表 6 PrP遺伝子のメチル化と発現の相関関係

	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7
Pearson's (<i>r</i> -values)	0.064	-0.374	-0.264	-0.285	-0.142	-0.142	-0.114
<i>P</i> -value	0.730	0.035	0.145	0.115	0.437	0.437	0.535

Pearson's *r*-values $\geq \pm 0.3$ および *P*-values ≤ 0.05 の場合に有意な相関関係があるとみなす。有意な負の相関関係が認められた CpG 2 の値を太字体と斜体で示す。

I -7 図

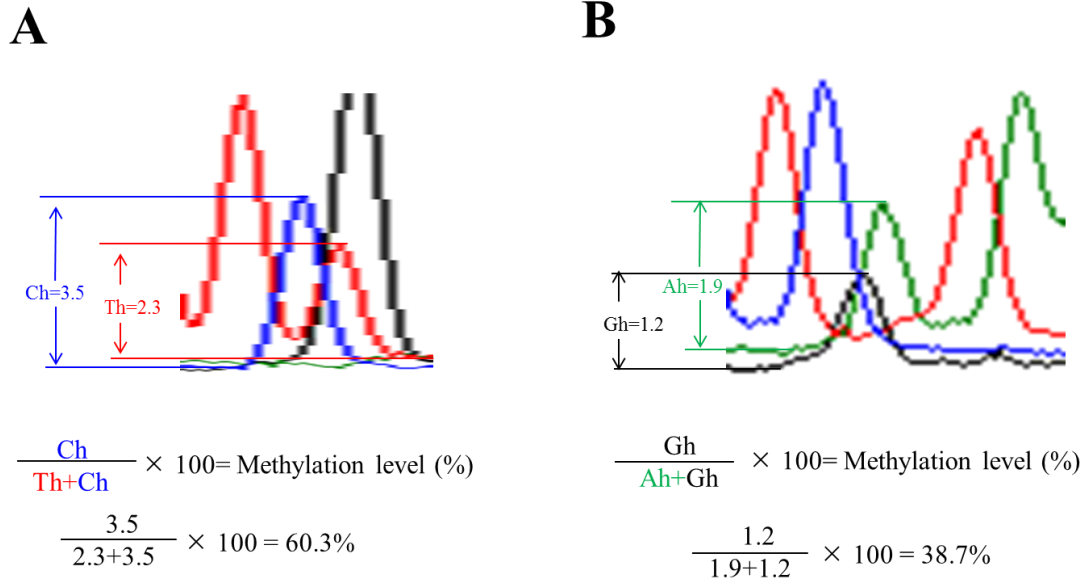


図1 シークエンス蛍光波形（生データ）を元にした CpG メチル化頻度の算出方法。それぞれの蛍光波形底部から頂点までの波形高を Ch、Th、Ah、Gh とした。表中の計算式に当てはめ、補正前の CpG メチル化頻度を算出した。

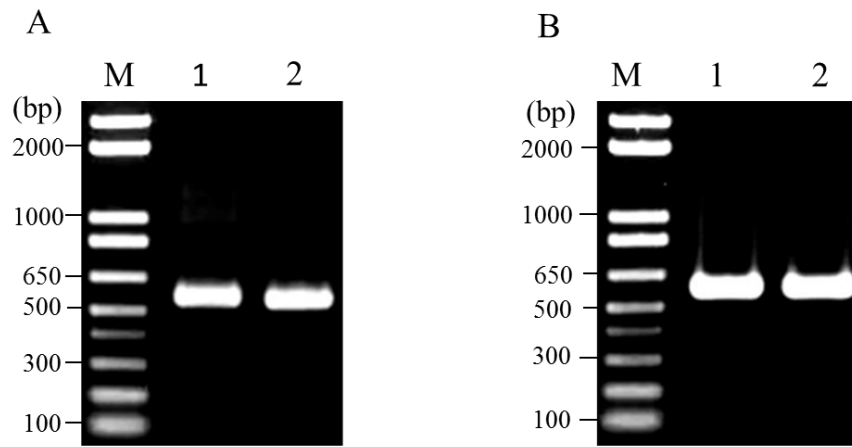


図 2 Bisulphite 処理前のゲノム DNA を用いた PCR 産物の電気泳動像
 A: nMePrP-1F および nMePrP-1R プライマーを用いた PCR 産物像。
 B: nMePrP-2F および nMePrP-2R プライマーを用いた PCR 産物像。
 M は DNA サイズマーカーを示す。マーカーサイズを左に bp で示す。
 1 はマウス大脳ゲノム DNA 増幅産物。 2 は肝臓の DNA 増幅産物。
 それぞれ目的の 529 bp および 583 bp の産物を得て、シーケンス解析に用いた。

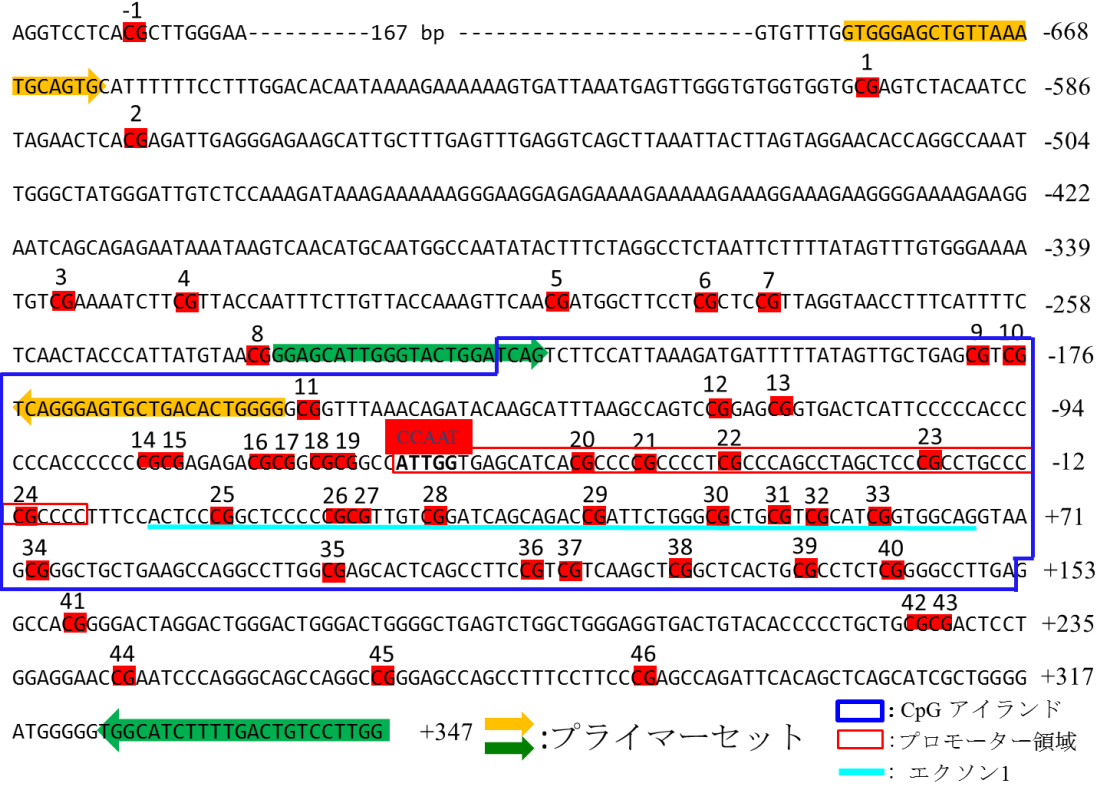


図3 PrP 遺伝子 CpG メチル化解析を行った領域の塩基配列。CpG 配列を赤色で示し、上流から番号を付した。黄色と緑色の矢印は、プライマー設計部位。CpG アイランドは青で囲った。PrP 遺伝子エクソン1は、水色のアンダーラインで示しめした。推定される PrP 遺伝子プロモーター領域は、赤のボックスで示した。右隅の数字は、転写開始点を基準とした塩基距離を付した。

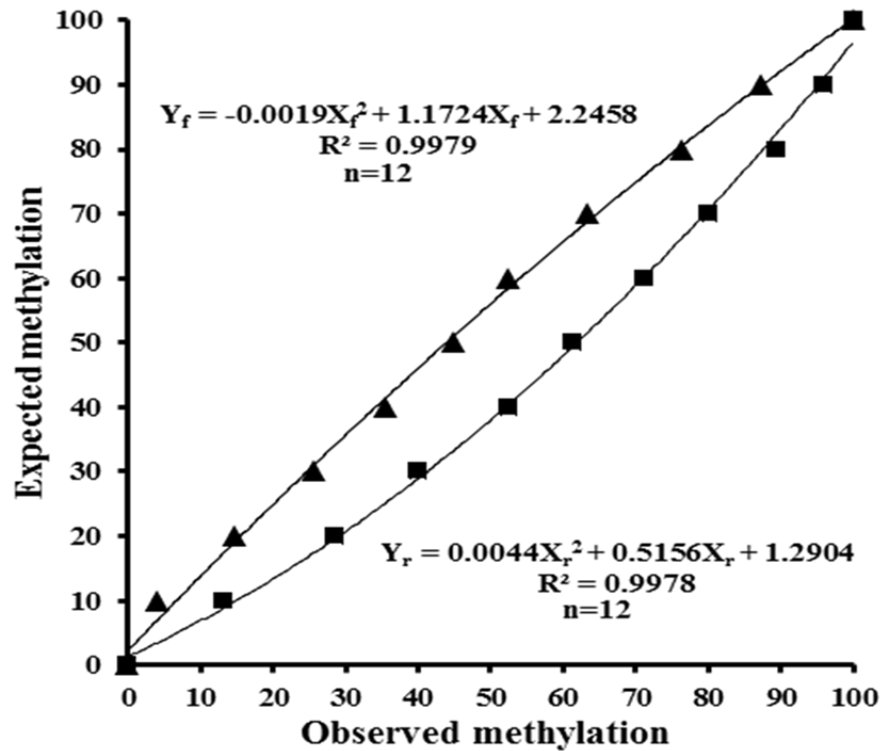


図4 メチル化頻度の実測値 (observed methylation) と補正值 (expected methylation) の関係曲線。材料および方法に記述した2種類のリファレンス遺伝子をプラスミドにクローニングし、それぞれのプラスミドを比率で混合し、シーケンス解析を行った。シーケンス反応にフォワードプライマーを用いた場合のプロットを▲、リバースプライマーを用いた場合のプロットを■で示した。それぞれのプロットは12回の実験結果の平均値で行った。得られた近似曲線式をそれぞれ図中に示した。これらの式に当てはめ、目的 CpG 部位のメチル化頻度の実測値を補正した。

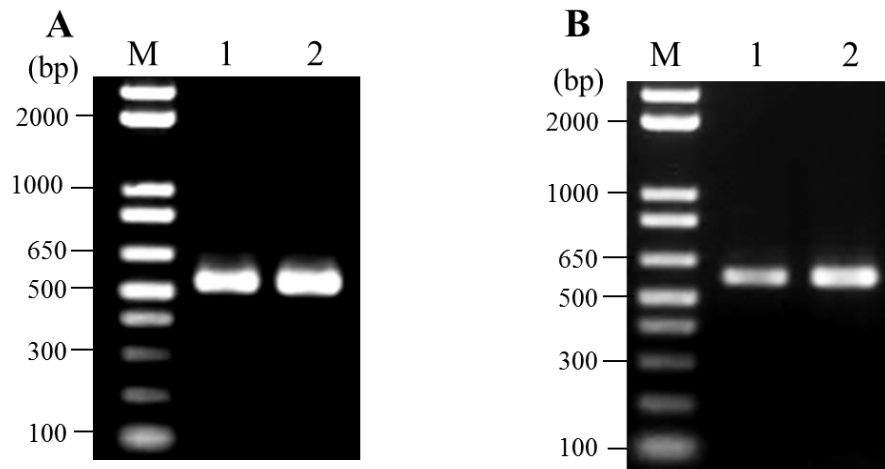


図 5 Bisulphite 処理前のゲノム DNA を用いた PCR 産物の電気泳動像
 A: MePrP-1F および MePrP-1R プライマーを用いた PCR 産物像。
 B: MePrP-2F および MePrP-2R プライマーを用いた PCR 産物像。
 M は DNA サイズマーカーを示す。マーカーサイズを左に bp で示す。
 1 はマウス大脳ゲノム DNA 増幅産物。 2 は肝臓の DNA 増幅産物。
 それぞれ目的の 529 bp および 583 bp の産物を得て、シーケンス解析に用いた。

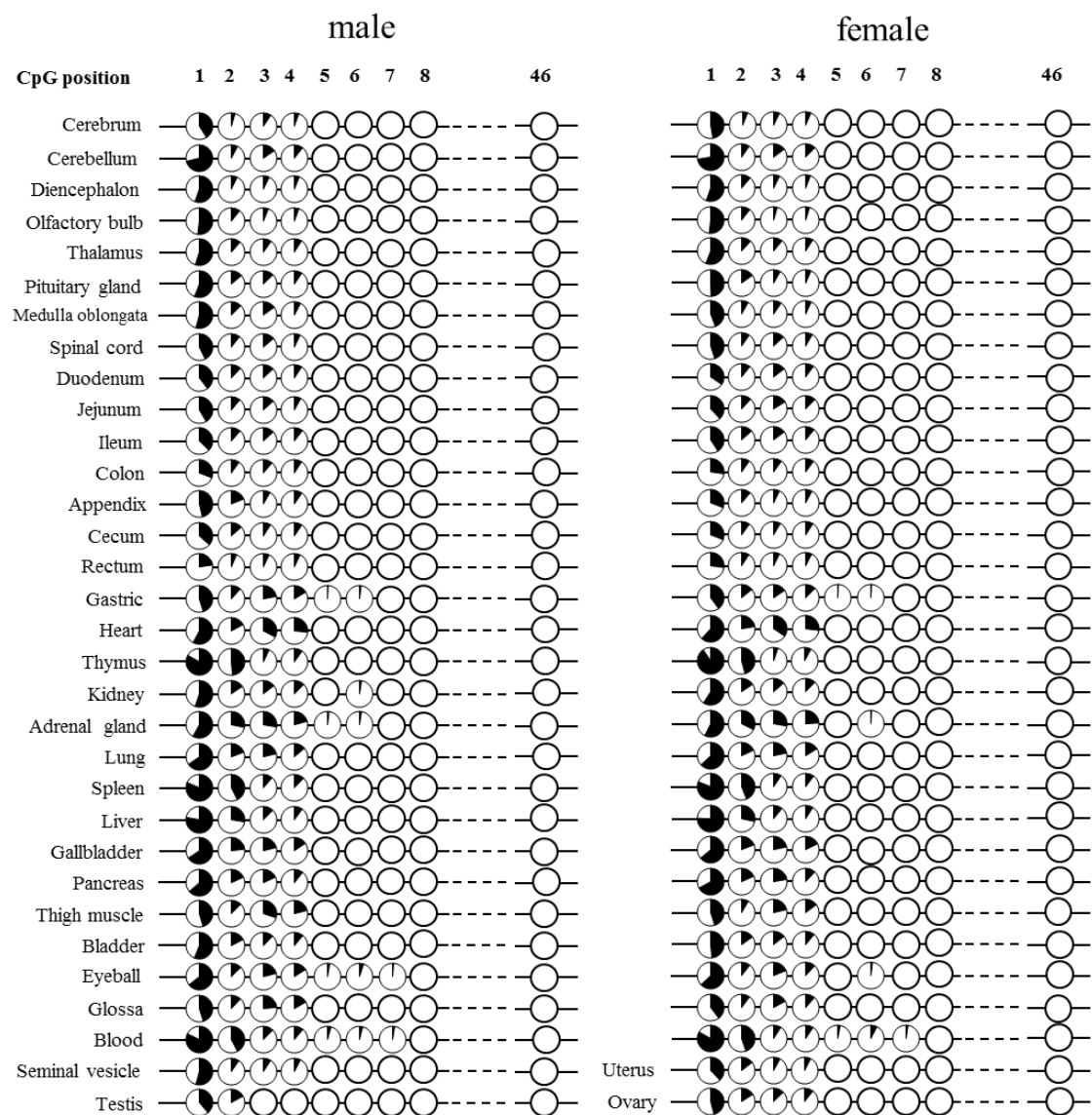


図 6 雄および雌マウス各組織における CpG メチル化頻度

円グラフはそれぞれの CpG 部位にいけるメチル化状態を示し、それぞれ 2 匹のマウスから 6 回の解析で得たメチル化頻度 (%) の平均値を黒で示す。

CpG 9 から CpG 45 までは、非メチル化状態であり点線で略して示す。

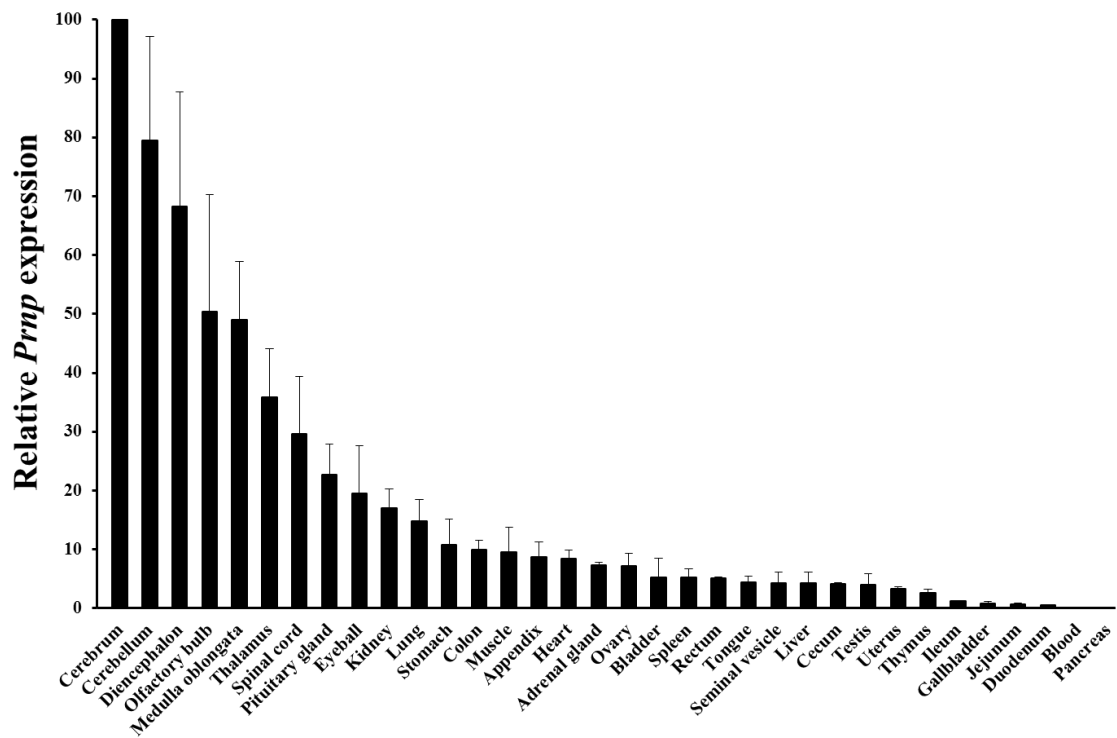


図7 C57BL/6 マウス各組織における PrP 遺伝子発現

大脳 PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の各組織の相対発現量を示した。

データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差で示した。

卵巣と子宮を除くデータは、雄から得られた。

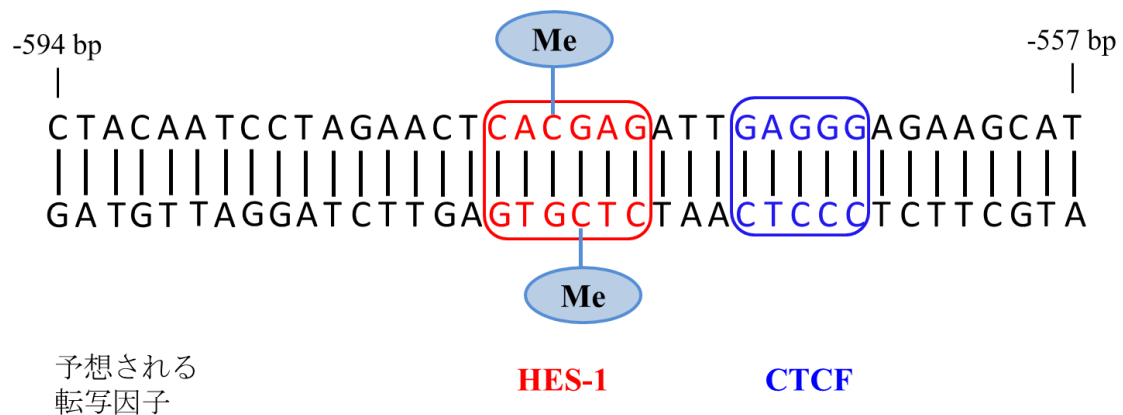


図 8 CpG 2 (-576 bp) 周辺に結合が予想される転写因子。

CpG 2 (-576 bp) を含む-594 bp から-557 bp までの塩基配列を示す。

赤のボックスで示す CACGAG 配列は、N-box と呼ばれ、HES-1 が結合することが知られている。

青のボックスで示す CTCCC 配列は、CTCF が結合することが知られている。

Me は、メチル化部位を示す。

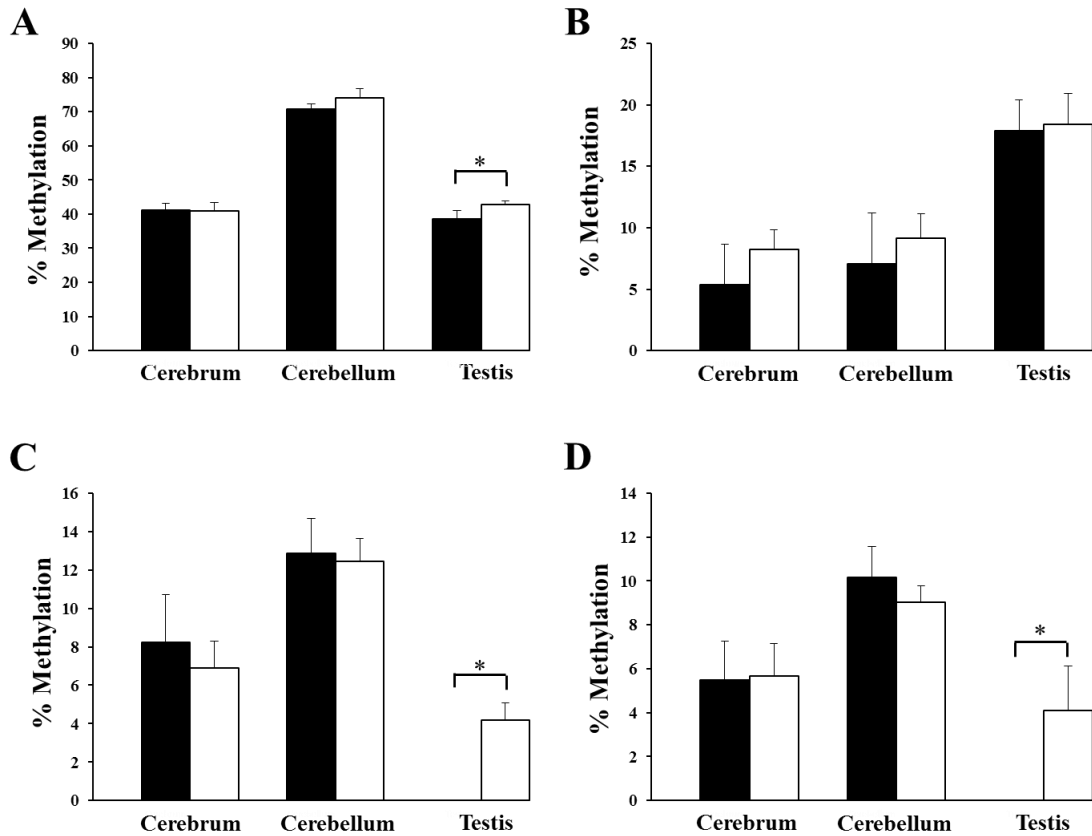


図 9 BALB/c マウス大脳、小脳および精巣における PrP 遺伝子メチル化頻度の C57BL/6 マウスとの比較。黒および白の棒グラフは、それぞれ C57BL/6 および BALB/c 各組織における 6 回の異なる実験から得られた CpG メチル化頻度 A、B、C および D は、それぞれ CpG 1、CpG 2、CpG 3 および CpG 4 のメチル化頻度。データは平均値±標準偏差。*は比較間において有意な差を認めた ($P < 0.01$)。

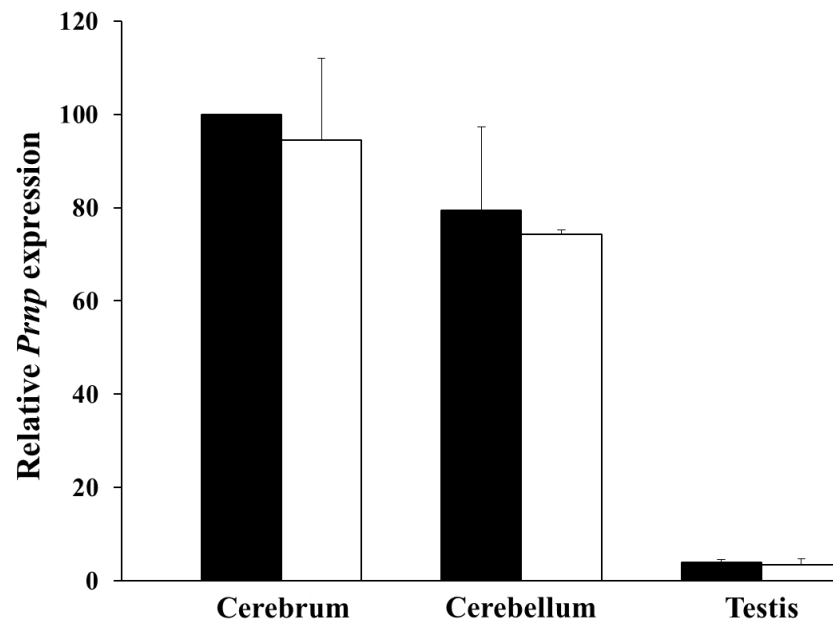


図 10 BALB/c マウス大脳、小脳および精巣における PrP 遺伝子発現量の C57BL/6 マウスとの比較。黒および白の棒グラフは、それぞれ C57BL/6 および BALB/c 雄各組織における 3 回の異なる実験から得られた相対的な PrP 遺伝子発現量を示し、C57BL/6 大脳を 100 とした。データは平均値±標準偏差。系統間で発現に有意な差は認めなかった ($P > 0.05$)。

第Ⅱ章

マウス由来株化培養細胞における神経細胞分化に伴う

PrP 遺伝子の発現と **DNA** メチル化状態の変化

II-1 緒言

病原体プリオンの複製と神経毒性については不明な点が多く残されており、個々の神経細胞における PrP 遺伝子発現、PrP アミノ酸配列および PrP の生理学的機能が、プリオン病の伝達や進行と複雑に相互関係を持っている[Biasini et al., 2012]。PrP 遺伝子ノックアウトマウスは、プリオンの本体と考えられている感染型 PrP (PrP^{Sc}) の複製を完全に拒絶し、神経変性作用から回避し、プリオン病を起こさない[Brandner et al., 1996; Bueler et al., 1993]。トランスジェニックマウスにおける細胞型 PrP (PrP^C) の発現増加は、プリオン感染に対する感受性を増大し、潜伏期間の短縮を起こし、PrP^{Sc} の毒性に対する細胞耐性を低下させる[Brown, 1998a; Fischer et al., 1996]。コンディショナルノックアウトマウスの研究において、PrP 遺伝子の部分的発現の欠如は、神経変性の進行を停止させることが示されている[Mallucci et al., 2003]。以上のように PrP 遺伝子発現調節機構を理解することは、プリオン病における神経変性機構の理解に重要である。

PrP 遺伝子発現調節機構を明らかにするために、プロモーター解析がマウス [Baybutt and Manson, 1997]、ラット [Saeki et al., 1996b]、ウシ [Inoue et al., 1997]、ヒト [Mahal et al., 2001]において報告されている。また、PrP 遺伝子発現を増強する転写因子として、重金属依存性転写因子 (MTF-1)、Sp1、Sp3、p53 および銅シャペロン Antioxidant-1 (Atox-1) が報告されている[Bellingham et al., 2009; Vincent et al., 2009; Wright et al., 2009]。一方で、PrP 遺伝子発現の抑制因子として、Yin Yang-1 (YY1)、HES-1、フォークヘッドボックス O3a (Foxo3a) が報告されている[Burgess et al., 2009; Liu et al., 2013; Wright et al., 2009]。しかしながら、個々の組織や細胞における PrP 遺伝子発現に多いに影響をおよぼしていると考えられるエピジェネティクス分野につ

いての理解は不十分なまま残されている。

遺伝子転写の影響には、エピジェネティックな機構が働き、転写制御のためにクロマチン構成因子、転写因子、転写抑制因子（リプレサー）、活性化因子（エンハンサーおよびサイレンサー）が複雑に相互作用している[Goldberg et al., 2007; Link et al., 2010]。また、DNA メチル化、ヒストン修飾、非コードマイクロ RNA（miRNA）なども、遺伝子発現を調節するための後天的な遺伝子発現調節の環境因子「エピゲノム」として働いている。さらに複数の環境要因が、エピジェネティックパターンの変更、特定の DNA メチル化の過程において仲介機構として働き、遺伝子発現を調節し、最終的に細胞表現型に影響を与えている[Mathers et al., 2010]。

そこで本章では、細胞レベルでの PrP 遺伝子発現と CpG メチル化を明らかにするため、6 種類（Neuro-2a、C-1300、WEHI-231、HePa1-6、RAW264.7 および P19C6）のマウス由来株化培養細胞を用いて、PrP 遺伝子発現状況と DNA メチル化状態について解析を行い、また P19C6 については、細胞神経細胞分化過程における PrP 遺伝子発現と CpG メチル化の変化について解析を行った。さらに DNA methyltransferase 阻害剤 RG108 を用いて、遺伝子脱メチル化を誘導し、PrP 遺伝子発現への影響を調べた。

II-2 材料および方法

II-2-1) マウス由来株化培養細胞

C-1300 細胞 (A/J マウス由来神経芽細胞)、P19C6 細胞 (C3H マウス由来胚性腫瘍細胞) は理化学研究所バイオリソースセンターから購入した。HePa 1-6 細胞 (C57L マウス由来肝癌細胞) は、大阪大学・松浦善治先生から分与された。Neuro-2a (マウス由来神経芽細胞)、WEHI-231 細胞 (BALB/c マウス B 細胞リンパ腫細胞)、RAW264.7 細胞 (BALB/c マウス由来マクロファージ様細胞) は日生研・竹山夏実先生から分与された。

C-1300 細胞の継代培養には、5% ウシ胎児血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, U.S.A.) 添加 RPMI1640 (Nacalai, Tesque, Kyoto, Japan) を用いた。P19C6 細胞の継代培養には 15% FBS 添加 DMEM (Nacalai) を用いた。Neuro-2a 細胞、HePa 1-6 細胞および RAW264.7 細胞の継代培養には 10% FBS 添加 DMEM (Nacalai) を用いた。WEHI-231 細胞の継代培養液には 10% FBS 添加 RPMI1640 (Nacalai) を用いた、すべての細胞は、5% CO₂ 下 37°C で培養を行った。

II-2-2) P19C6 細胞の神経分化誘導

P19C6 細胞を神経に分化誘導するために、90mm (Koryo Chemical, Nara, Japan) の細菌培養用 dish を使い、 3×10^5 の細胞を入れ、培養液として 1×10^{-6} M のレチノイン酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を含む 10% FBS 添加 α MEM (Nacalai) で培養を行った。4 日間の培養後に PBS (-) で 1 回洗い、0.05% -Trypsin/EDTA (Nacalai) で処理し、凝集体のまま回収した。 4×10^5 細胞をポリ-L-リジンでコーティングされた 60 mm dish (IWAKI, Shizuoka, Japan) に 1×10^5 N2 無血清培地 (100 \times N-2 Supplement,

Thermo Fisher Scientific) および 1 $\mu\text{g/ml}$ フィブロネクチン (Bovine Plasma Fibronectin, Thermo Fisher Scientific) を含む DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) 培地にて培養した。次いで、48 時間ごとに培地交換を行い 1 週間培養され神経細胞に分化させた。

II -2-3) DNA methyltransferase インヒビター (RG108) 処理

4×10^5 細胞の Neuro-2a および P19C6 細胞は、100 mm dish にて、100 μM の RG108 (Abcam plc, Cambridge, U.K.) を含む培養液にて 48 時間培養後、DNA と RNA を抽出した。

II -2-4) 培養細胞からのゲノム DNA の調製

100 mm dish に培養した細胞を第 I 章 I -2-2) に記述の方法に従って行った。

II -2-5) ゲノム DNA の Bisulfite 処理

第 I 章 I -2-3) に記述の方法に従って行った。

II -2-6) Bisulfite 処理したゲノム DNA の PCR (Bisulfite-PCR)

第 I 章 I -2-4) に記述の方法に従って行った。

II -2-7) ゲルからの DNA 精製

第 I 章 I -2-5) に記述の方法に従って行った。

II -2-8) Bisulfite-PCR 産物のシーケンス解析

第 I 章 I-2-6) に記述の方法に従って行った。

II-2-9) CpG メチル化頻度の算出方法

第 I 章 I -2-7) に記述の方法に従って行った。

II-2-10) 細胞からの全 RNA の調製

100 mm dish に培養した細胞を第 I 章 I -2-8) に記述の方法に従って行った。

II-2-11) リアルタイム RT-PCR

第 I 章 I -2-9) に記述の方法に従って行った。

II-2-12) コンピテント細胞の調製

トランスフォーメーションバッファー (TB) は、滅菌超純水 475 ml に PIPES 1.5 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.1 g、KCl 9.3 g を加え、KOH で pH を 6.7 に調製し、全量を 500 ml にメスアップ後、滅菌処理を行い作製した。SOB 培地は、Bacto™ Tryptone 5 g、Yeast Extract 1.25 g、5 M NaCl 0.5 ml、2 M KCl 0.3125 ml を加え、250 ml にメスアップ後、滅菌処理を行い、別に滅菌した 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.25 ml、1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25 ml を加えて作製した。XL-10 Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) を 250 ml の SOB 培地に 50 μl 加え、17°C で 26 時間振盪培養した。その後、氷上で 10 分間静置し、2,000 \times g、4°C で 10 分間遠心した。遠心後上清は捨て、TB を 10 ml 加え、細胞を懸濁し、氷上で 10 分間静置の後 2,000 \times g、4°C で 10 分間遠心した。再び上清を捨て、TB を 10 ml 加えた。その後最終濃度で 7% となるよう DMSO を加え、500 μl ずつ 1.5 ml のチューブに入れ、直ちに液体窒素で凍結した。使用するまで -80°C で保存した。

II-2-13) Bisulfite-PCR 産物のプラスミドベクターへの組み込みおよび大腸菌の形質転換

ゲルから精製した各 DNA (10 ng/ μ l) 2 μ l を T-Vector pMD20 (TaKaRa) 0.5 μ l、Ligation Mix (TaKaRa) 5 μ l、滅菌精製水 2.5 μ l とよく混和し、16°C で 1 時間静置した。コンピテント細胞 100 μ l に上記の反応液を加え、氷中で 2 分間静置し、その後 37°C のウォーターバスで 3 分間静置し、その後氷中で 5 分間静置した。その後、20 ng/ μ l の X-GAL 20 μ l と 0.2 M IPTG 50 μ l 塗布した LB 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。翌日、白色のコロニーをピックアップし、2 ml の LB 培地を入れた小試験管中で振盪培養した。12 時間後、1.5 ml のチューブに移し、10,000 \times g で 5 分間遠心し、上清を捨て、遺伝子クローニングのチェックを行った。

II-2-14) 遺伝子クローニングのチェック

プラスミドに目的のインサート DNA が導入されたかどうかを確認するため、インサートチェックを行った。まず、GTE buffer (A 液)、0.2 N NaOH/1% SDS (B 液)、5 M KOAc (C 液) の 3 種類の溶液試薬を調製した。A 液は、50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0) をろ過滅菌し作製し、使用まで 4°C で保存した。C 液は、KOAc を 98.14 g、CH₃COOH を 23 ml 滅菌超純水に加え全量を 200 ml とし、オートクレーブ後、使用するまで 4°C で保存した。

II-2-13) で得た大腸菌に A 液 100 μ l を加え、ボルテックスにて懸濁した。続いて B 液 200 μ l を加え、転倒混和し、さらに C 液 150 μ l を加え転倒混和後、10,000 \times g で 5 分間遠心した。上清にイソプロピルアルコール 450 μ l を加え転倒混和し、室温で 10 分間静置し、10,000 \times g で 10 分間遠心した。その後上清を取り除き、沈殿物

に滅菌超純水 100 μl を加えた。10 μl を 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行い、DNA バンドの位置から目的遺伝子の組み込まれたプラスミドを選択し、シーケンス解析を行った。

II-2-15) シーケンス解析用のプラスミド DNA の精製

II-2-14) に記述の方法で得たプラスミドを持つ大腸菌を PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、キット添付の方法に従いプラスミド DNA の調製を行った。プラスミド DNA の濃度は、NANODROP2000 (Thermo Fisher Scientific) によって測定した。シーケンス解析に使用するまで -20°C で保存した。

II-2-16) プラスミドのシーケンス解析

プラスミド DNA (100 ~ 120 $\text{ng}/\mu\text{l}$) をテンプレートとし、プライマーは M13f (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')、M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') (3.2 $\text{pmol}/\mu\text{l}$) を使用した。シーケンス解析は、I-2-6) の記述に従って行った。

II-2-17) 統計解析

有意差検定は、スチューデント t 検定を用いた。相関分析は、ピアソンの相関係数を用いた。

II-3 結果

II-3-1) マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子の CpG メチル化頻度

6種類のマウス由来株化培養細胞について、図3中の46箇所のCpGメチル化状態を調べた(表7および図11)。CpG1は、神経芽細胞 Neuro-2a および C-1300 において非メチル化状態にあったが、P19C6細胞において71.0%の最も高いメチル化頻度を認めた。他の細胞株のメチル化頻度は、48.9%から61.4%の間であった。CpG2は、Neuro-2a細胞およびC-1300細胞においてCpG1同様に非メチル化状態であった。HePa 1-6細胞において78.9%の最も高いメチル化頻度を示し、他の細胞株では28.3%から62.5%のメチル化状態であった。CpG3は、Neuro-2a細胞およびC-1300細胞では非メチル化状態であり、P19C6細胞において49.7%の最も高いメチル化頻度を認めた。他の細胞株では、15.3%から41.7%の間であった。CpG4は、Neuro-2a細胞およびC-1300細胞では非メチル化状態であり、P19C6細胞において50.2%の最も高いメチル化頻度が観察された。他の細胞株では、16.5%から35.8%の間であった。CpG5は、P19C6細胞およびRAW264.7細胞においてのみ、それぞれ22.2%と4.2%のメチル化が観察された。CpG6からCpG8では、P19C6細胞のみ、それぞれ12.1%、11.8%、6.0%のメチル化頻度を示した。CpG9からCpG46は、すべての細胞でメチル化が観察されなかった。以上のことから、神経芽細胞である Neuro-2a や C-1300 では、PrP 遺伝子上流部は、調べたすべての CpG 部位が非メチル化状態にあることが示された。また、第I章のマウス各組織の結果に続いて、マウス由来株化培養細胞においても CpG アイランドに位置する CpG 9 から CpG 40 (図3) は、非メチル化状態にあることが観察され、PrP 遺伝子は典型的なハウスキーピング遺伝子であることを再確認した。さらに、CpG 1 から CpG 8 は、第I章のマウス各組織の結果に加え

細胞種ごとに様々なメチル化状態にあり、CpG アイランドに隣接するこの領域がメチル化可変領域であることを強く示唆した。

II-3-2) マウス由来株化培養細胞における CpG メチル化パターン

メチル化可変領域の示した CpG 部位のメチル化パターンを調べるために、それぞれの Bisulfite-PCR 産物のクローニングとシーケンス解析を行った (図 12 および図 17, A)。Neuro-2 および C-1300 では、クローニング後も CpG 1 から CpG 8 は非メチル化状態であることが確認された (図 12, A および図 12, B)。WEHI-231 では、CpG 1 がメチル化されているパターンとすべてが非メチル化パターンの 2 種類がクローニングされた (図 12, C)。HePa1-6 では、CpG 1 と CpG 4 がメチル化、パターン、CpG 1 のみがメチル化、CpG 2 のみがメチル化の 3 種類が観察された (図 12, D)。RAW264.7 では、CpG 1 から CpG 4 までがメチル化、CpG 1 と 2 番目がメチル化、CpG 2 と CpG 3 がメチル化、すべてが非メチル化状態の 4 種類が観察された (図 12, E)。P19C6 では、さらに様々なメチル化パターンを示す遺伝子がクローニングされた (図 17, A)。以上のように、メチル化可変領域では、ランダムなメチル化が起こっているように思われたが、それぞれの細胞において PrP 遺伝子上では、細胞特有のメチル化が可変的に起こっていることが予想された。これらの細胞特有のメチル化パターンが PrP 遺伝子の発現に影響を与えている可能性がある。

II-3-3) マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子発現解析

株化培養細胞における CpG メチル化頻度と遺伝子発現の相関関係を調べるために、各細胞株の PrP mRNA を定量的リアルタイム RT-PCR を用いて解析を行った (表 8 および図 13)。PrP 転写産物は、すべての細胞試料から検出され、細胞ごとに PrP 遺

伝子発現が異なっていることが明らかとなった。Neuro-2a 細胞の PrP 遺伝子発現が一番高く 9.3 ± 2.6 であったが、大脳の発現 (100) と比較すると約 10 分の 1 であった。次に C-1300 において高く 7.3 ± 2.2 であった。WEHI-231、HePa1-6、RAW264.7、P19C6 細胞では、さらに低くそれぞれ 1.6 ± 1.5 、 0.7 ± 0.3 、 0.5 ± 0.6 、 0.5 ± 0.3 であった。

II-3-4) PrP 遺伝子メチル化と遺伝子発現の相関性

定量的リアルタイム RT-PCR の結果と個々の CpG 部位のメチル化頻度に基づいて、ピアソンの相関分析を行った結果、CpG 1 から CpG 4 においてメチル化と PrP 遺伝子発現との間に有意な負の相関 ($r > -0.3$ および $P < 0.05$) を認めた (表 9)。しかし、他の CpG 部位に他の CpG 部位においては、有意な相関関係は認められなかった。これらの結果から、CpG 1 から CpG 4 のメチル化が PrP 遺伝子発現に影響していることが示唆された。

II-3-5) 神経細胞分化に伴う PrP 遺伝子の発現上昇と CpG メチル化頻度の低下

神経分化に伴う PrP 遺伝子の発現と CpG メチル化の変化を明らかにするために、P19C6 細胞の神経細胞分化前後において調べた。P19C6 細胞は、多能性胚性癌腫細胞である P19 細胞からサブクローニングされた細胞株であり、神経発生モデルとして使われている [Gao, X et al., 2001; Jones-Villeneuve, EM et al., 1982]。P19C6 細胞は、Gao らの方法に従って神経細胞に分化させたところ、多数の神経様突起の伸長が認められた (図 14, B)。神経分化後の細胞において、PrP 遺伝子の発現は、分化前と比較して約 26 倍の発現上昇が認められた (図 15)。

神経細胞分化後のメチル化状態を調べた結果、CpG 1 から CpG 8 までのすべての

部位で分化前の細胞と比較して有意なメチル化低下 ($P < 0.01$) が認められた (図 16)。CpG 8 のメチル化は、分化後には非メチル化状態であることが観察された。それぞれ有意なメチル化の低下が認められた CpG において、分化前後でのメチル化頻度の変化は、それぞれ CpG 1 (70.9% から 61.2% に減少)、CpG 2 (62.5% から 23.7%)、CpG 3 (50.2% から 18.8%)、CpG 5 (22.2% から 9.6%)、CpG 6 (12.1% から 8.1%)、CpG 7 (11.8% から 5.7%)、CpG 8 (6.0% から 0%) に変化した。中でも CpG 2、CpG 3、CpG 4、CpG 7 および CpG 8 は、50% 以上の減少が観察された。CpG 9 から CpG 46 までは、分化後においても非メチル化状態のまま変化は認められなかった。

P19C6 細胞の神経分化後のメチル化パターンに変化があるのかを調べるために、神経分化後の Bisulfite-PCR 産物をクローニングし、シーケンス解析を行った (図 17, B)。分化後において、分化前では観察されなかった CpG 1 だけのメチル化遺伝子が観察された。また、すべての CpG が非メチル化状態を示す遺伝子も観察され、分化後のメチル化低下とメチル化パターン変化が起こっていることが明らかとなった。これらの結果は、神経細胞分化に伴う細胞表現形の変化に PrP 遺伝子メチル化可変領域の低下を伴い、それに伴って PrP 遺伝子の発現が上昇していることを示唆した。

II-3-6) DNA methyltransferase 阻害剤 RG108 による PrP 遺伝子の発現低下

遺伝子脱メチル化と PrP 遺伝子発現の関係を調べるために、P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞を DNA methyltransferase (DNA メチル化転移酵素) 阻害剤の一つである RG108 で処理し、処理前後における PrP 遺伝子発現とメチル化の変化について解析した (図 18 および図 19)。RG108 で 48 時間処理した細胞において、Neuro-2a 細胞における PrP 遺伝子発現には有意な差を認めなかったが、P19C6 細胞においては PrP 遺伝子発現が約 2.4 倍上昇した (図 18)。

RG108 処理後の P19C6 細胞におけるメチル化頻度を解析したところ、RG108 処理前後において CpG 1、CpG 2、CpG 3、CpG 5、CpG 8 において有意なメチル化の低下が観察された (図 19)。RG108 処理によるそれぞれの CpG 部位におけるメチル化頻度の低下は、CpG 1 (70.9% から 64.0% に減少)、CpG 2 (62.5% から 55.8%)、CpG 3 (50.2% から 39.5%)、CpG 4 (49.5% から 47.0%)、CpG 5 (22.2% から 18.1%)、CpG 8 (6.0% から 3.8%) であった。CpG 9 から CpG 46 までのメチル化状態は、処理前後において非メチル化状態に変化は認められなかった。また、処理前後で PrP 遺伝子の発現に有意な違いを認めなかった Neuro-2a 細胞においては、CpG 1 から CpG 46 の非メチル化状態に変化は観察されなかった。以上の結果から、CpG 1、CpG 2、CpG 3、CpG 5 および CpG 8 のメチル化の低下が PrP 遺伝子発現の上昇に関与していると考えられた。

本章におけるすべての結果から、CpG 1、CpG 2、CpG 3 のメチル化が PrP 遺伝子の発現に関与している可能性があり、第 I 章の結果と合わせて考えると、CpG 部位の中でも CpG 2 のメチル化が PrP 遺伝子の発現への深い関与を示唆した。

II-4 考察

第 I 章では、マウス各組織における PrP 遺伝子発現とメチル化状態を解析し、CpG 1 から CpG 7 が組織特有な様々なメチル化状態にあり、これら CpG を含む領域がメチル化可変領域であることを提唱し、特に CpG 2 (-567 bp) のメチル化が遺伝子発現と負の相関関係にあることを明らかにした (表 6 および図 3)。組織は、様々な表現形を持った細胞の集団から構成されていることから、本章では、マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子発現とメチル化状態を解析し、発現とメチル化の関係を明らかにすることを目的とした。さらに、神経分化や DNA メチル化転移酵素阻害剤の影響下における PrP 遺伝子の発現とメチル化の変化についても解析を行った。

解析した領域には、PrP 遺伝子プロモーター、エクソン 1、イントロン 1 の上流域の一部を含む -599 bp から +286 であり、合計 46 箇所の CpG 部位が含まれている (図 3)。PrP 遺伝子エクソン 1 およびプロモーター領域は、それぞれ +1 bp から +67 bp (CpG 25 から CpG 33) および -62 bp から -6 bp (CpG 20 から CpG 24) である [Baybutt and Manson, 1997]。CpG アイランドは、-218 bp から +152 bp に存在し、32 箇所の CpG (CpG 9 から CpG 40) 部位を含む。ハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域を含む CpG アイランドは、ほとんどの組織や細胞で非メチル化状態である [Caiafa and Zampieri, 2005; Vinson and Chatterjee 2012]。このことは第 I 章でも述べた。第 I 章では調べたすべてのマウス組織において CpG アイランドが非メチル化状態にあることを明らかにしたが、本章のマウス由来株化培養細胞を用いた研究においても、CpG アイランドはすべての細胞株において非メチル化状態であり、PrP 遺伝子は典型的なハウスキーピング遺伝子の一つであることを株化培養細胞においても実証した (表 7 および図 11)。

近年、次世代シーケンサーの登場によって、マウス多能性胚性幹細胞や神経前駆細胞におけるゲノム全体のメチル化状態の網羅的な研究が報告されている[Stadler et al., 2011]。メチロームと呼ばれるこれらの解析によって、細胞多能性や細胞表現形に影響する遺伝子領域のメチル化状態が明らかにされつつある。これら多くの遺伝子には、細胞表現形に関連した様々なメチル化状態を示す領域が明らかとなり、メチル化可変領域 (differentially methylated region) と呼ばれるようになった。多能性胚性幹細胞におけるメチル化可変領域は、ランダムに存在するのではなく遺伝子上に限局して集中し、低メチル化状態 (10~50%) であり、ゲノム CpG 全体の約 4% と報告されている。さらに、多くの遺伝子のエンハンサー領域がメチル化可変領域に存在することが明らかにされつつある[Jones, 2012; Rakyan et al., 2008; Stadler et al., 2011]。PrP 遺伝子プロモーター上流部のエンハンサー領域については不明であるが、本研究により、CpG アイランドに隣接した上流部-599 bp から-238 bp (CpG 1 から CpG 8) の領域がメチル化可変領域であること (表 7 および図 11)、また、PrP 遺伝子発現と負の相関関係にある CpG 部位を含んでいたことから (表 9)、PrP 遺伝子の発現を細胞特有な状態にするエンハンサー領域を含んでいる可能性がある。

第 I 章のマウス各組織の解析では、CpG 2 が N ボックス配列 (CACGAG) 上に存在し、すぐ下流に CTCF インシュレーターエレメント (CCCTC) が存在する CACGAGATTGAGGG が、PrP 遺伝子発現調節に重要であろうことを述べたが、本章の研究からは、CpG 1、CpG 2、CpG 3 のメチル化が PrP 遺伝子発現に影響することを示唆した (表 9、図 16 および図 19)。腫瘍細胞では異常な CpG メチル化がプロモーターやエンハンサー領域に引き起こされることがある[Aran and Hellman, 2013; Jones, 2012; Ong and Corces, 2012]。株化培養細胞における PrP 遺伝子発現調節において、どの CpG 部位が最も重要な役割を果たすのかをより正確に限局して定義するた

めには、より多様な細胞株を解析する必要があるかもしれない。あるいは、PrP 遺伝子エンハンサー領域を明らかにした上で、細胞種ごとに分類してメチル化調節と遺伝子発現を解析していく必要があるかもしれない。

本章では、P19C6 細胞の神経分化に伴って PrP 遺伝子発現が約 26 倍に上昇し、CpG メチル化状態が可変することを明らかにした (図 15 および図 16)。P19C6 細胞は、多能性マウス胚性癌細胞である P19 細胞よりサブクローニングされ、レチノイン酸刺激により神経発生の *in vitro* モデル系として使用されている。[Gao et al., 2001; Jones-Villeneuve et al., 1982]。P19C6 細胞の神経分化後の遺伝子変動の報告では、神経分化マーカーである MAP2 や $\beta 3$ チューブリンが上昇し、胚性幹細胞マーカーである Nanog や Oct4 遺伝子の減少が報告されている [Tabe et al., 2016]。PrP 遺伝子は、胚発生の初期段階から発現し、細胞の多能性および神経発生に関係しているとする報告がある [Lee and Baskakov, 2014; Miranda et al., 2011; Peralta et al., 2011; Shi et al., 2016]。胚性幹細胞を用いた研究では、PrP 遺伝子は、神経分化に伴って Nanog 遺伝子の発現が減少し、その減少と逆相関するように PrP 遺伝子発現は上昇する [Miranda et al., 2011]。本章で明らかにした神経細胞分化に伴う PrP 遺伝子発現上昇と CpG メチル化の減少は、神経分化における PrP 遺伝子発現調節機構の一端を明らかにした成果であると考えられる。

PrP 遺伝子 CpG 脱メチル化が及ぼす遺伝子発現への影響を明らかにするために、本章では、DNA メチル化転移酵素阻害剤の一つである RG108 を用いて、PrP 遺伝子発現への影響を調べた (図 18 および図 19)。P19C6 および Neuro-2a 細胞を RG108 で処理した結果、RG108 処理後に P19C6 細胞において PrP 遺伝子発現が約 2.4 倍の増加を認めたが、Neuro-2a 細胞では PrP 遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。P19C6 細胞においては、CpG 1、CpG 2、CpG 3、CpG 5 および CpG 8 で有意な脱メチル化

が起こっていた、一方、Neuro-2a 細胞は、処理後においても CpG 1 から CpG 46 の非メチル化状態に変化はなく、CpG 脱メチル化の影響を受けないことが PrP 遺伝子発現に変化を及ぼさなかったと考えられる。以上のことから、メチル化可変領域に含まれる CpG の脱メチル化が、PrP 遺伝子上昇を引き起こしたと示唆された。Cabral AL らは、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一つである Trichostain A によって、ラット由来 PC-12 および C6 細胞を処理した結果、PrP 遺伝子の発現および PrP^C 産生を増加させ、PrP 遺伝子発現調節はクロマチン構造に依存することを示した[Cabral et al., 2002]。CpG メチル化とヒストン修飾とのクロストーク制御は遺伝子発現パターンの決定に関与しているが、プロモーターおよびエンハンサー領域における DNA メチル化制御機構はほとんど不明であるのが現状である[Calo and Wysocka, 2013; Cedar and Bergman 2009]。一般的に、エンハンサー/リプレッサー領域はプロモーターから様々な距離に位置し、メチル化可変領域に存在する傾向にあるが、エンハンサー/リプレッサーでの可変的な DNA メチル化制御は依然として解明が必要な分野である[Calo and Wysocka, 2013; Cedar and Bergman, 2009; Jones, 2012]。

本章では、マウス由来株化培養細胞を用いて、PrP 遺伝子 CpG メチル化と PrP 遺伝子発現のエピジェネティックな関係の一端を明らかにした。PrP 遺伝子調節領域における DNA 結合転写因子およびヒストン修飾は依然として不明なままであるが、本研究は、PrP 遺伝子のエピジェネティクスに関する新たな情報を提供し、PrP^C の生理学的役割およびプリオン病の分子病態機構の解明に貢献すると考えられる。

II-5 要約

PrP 遺伝子発現制御機構の解明は、プリオン病の伝達や発症機構を理解する上で重要である。本章では、6種類のマウス由来株化培養細胞を用いて PrP 遺伝子プロモーター領域を含む CpG メチル化状態を明らかにし、PrP 遺伝子プロモーター上流部には、メチル化可変領域が存在することを明らかにした。PrP 遺伝子発現と CpG 1 (-599 bp) から CpG 4 (-326 bp) までのメチル化が負の相関関係にあることを示した。また、神経細胞分化および DNA メチル化転移酵素阻害剤によってメチル化可変領域の CpG メチル化の減少を引き起こし、このことが PrP 遺伝子発現上昇を引き起こすことを示唆した。これらの知見は、神経分化において PrP 遺伝子発現調節に CpG メチル化が関与していることを示唆し、発現制御機構の一端を解明したと考えられる。

II-6 表

表 7 マウス由来株化培養細胞におけるPrP遺伝子メチル化頻度

Cell	CpG position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-46
Neuro-2a	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C-1300	—	—	—	—	—	—	—	—	—
WEHI-231	48.9±3.0	28.3±4.4	15.3±2.1	16.5±1.1	—	—	—	—	—
HePa1-6	61.4±2.6	78.9±3.2	41.7±4.5	35.8±5.2	—	—	—	—	—
RAW264.7	49.7±3.4	34.7±3.3	34.6±7.5	23.5±6.2	4.2±1.0	—	—	—	—
P19C6	71.0±2.6	62.5±4.8	49.7±3.4	50.2±3.3	22.2±0.8	12.1±0.3	11.8±0.5	6.0±0.6	—

表 8 株化培養細胞における PrP 遺伝子発現量

Cell line	Gene Expression
Neuro-2a	9.3±2.6
C-1300	7.3±2.2
WEHI-231	1.6±1.5
HePa1-6	0.7±0.3
RAW264.7	0.5±0.6
P19C6	0.5±0.3

C57BL/6 マウス大脳における PrP 遺伝子発現量を 100 とし、相対発現量で示した。

表9 株化培養細胞におけるPrP遺伝子CpGメチル化と発現の相関関係

	CpG position							
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	5	6	7	8
Pearson's <i>r</i> -values	<i>-0.963</i>	<i>-0.837</i>	<i>-0.882</i>	<i>-0.848</i>	-0.428	-0.354	-0.354	-0.354
<i>P</i> -value	<i>0.002</i>	<i>0.038</i>	<i>0.020</i>	<i>0.033</i>	0.398	0.491	0.491	0.491

Pearson's *r*-values $\geq \pm 0.3$ および *P*-values ≤ 0.05 の場合に有意な相関関係があるとみなす。

有意な負の相関関係が認められた CpG 1、CpG 2、CpG 3 および CpG 4 の値を太字体と斜体で示す。

II-7 図

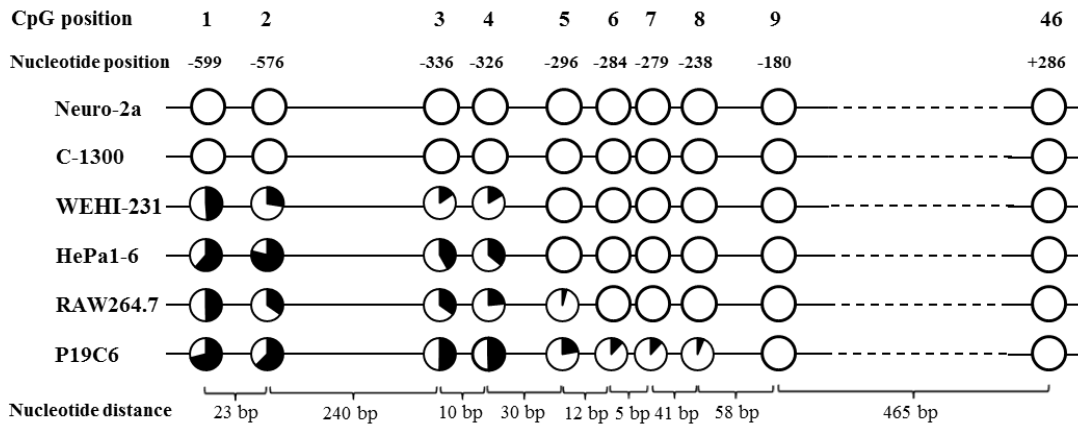


図 11 各マウス由来株化培養細胞における CpG メチル化頻度

円グラフはそれぞれの CpG 部位におけるメチル化状態を示し、8 回の解析から得られたメチル化頻度 (%) の平均値を黒で示した。CpG 10 から CpG 45 までは、非メチル化状態であり点線で示し省略した。それぞれの CpG 部位の塩基位置を上に表示した。それぞれの CpG 距離を bp で下に表示した。

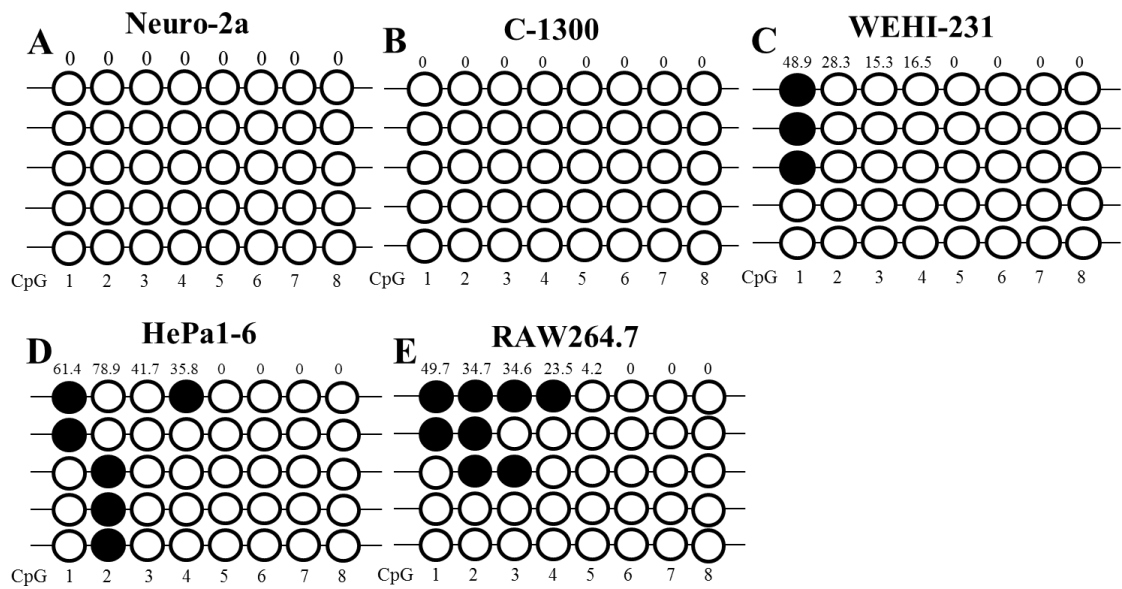


図 12 各株化培養細胞における CpG メチル化パターン

Bisulphite -PCR 産物のプラスミドへのクローニングを行い、それぞれ 5 個のプラスミドのシーケンス解析を行った。●および○は、それぞれメチル化および非メチル化状態を示す。上の数字は、メチル化頻度解析から得られた頻度 (%) を示す。CpG 9 から CpG 46 は、すべての試料で非メチル化状態であったので省略した。

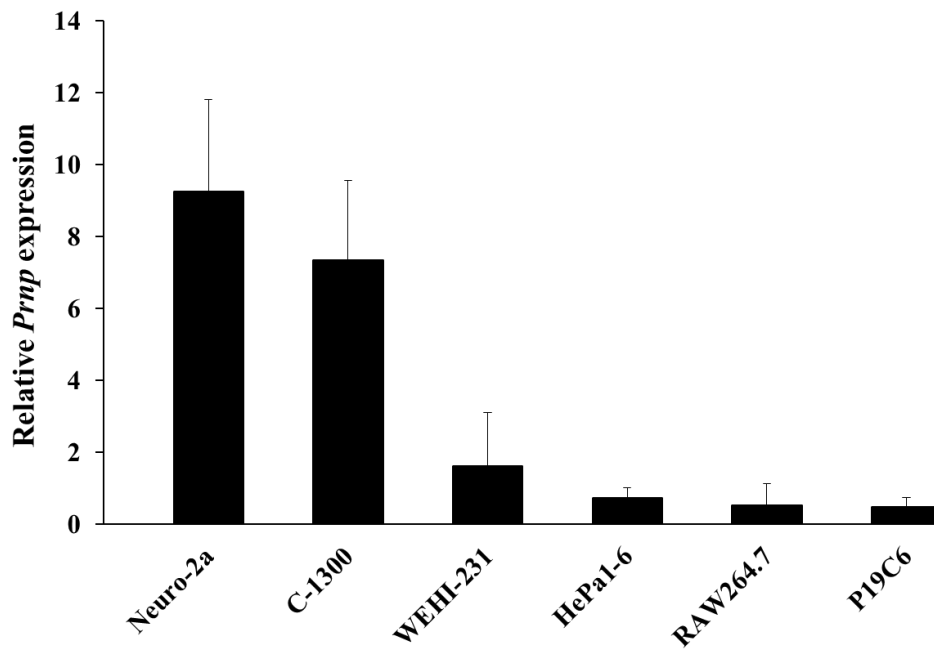


図 13 各株化培養細胞における PrP 遺伝子発現

大脳 PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。

データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差で示した。

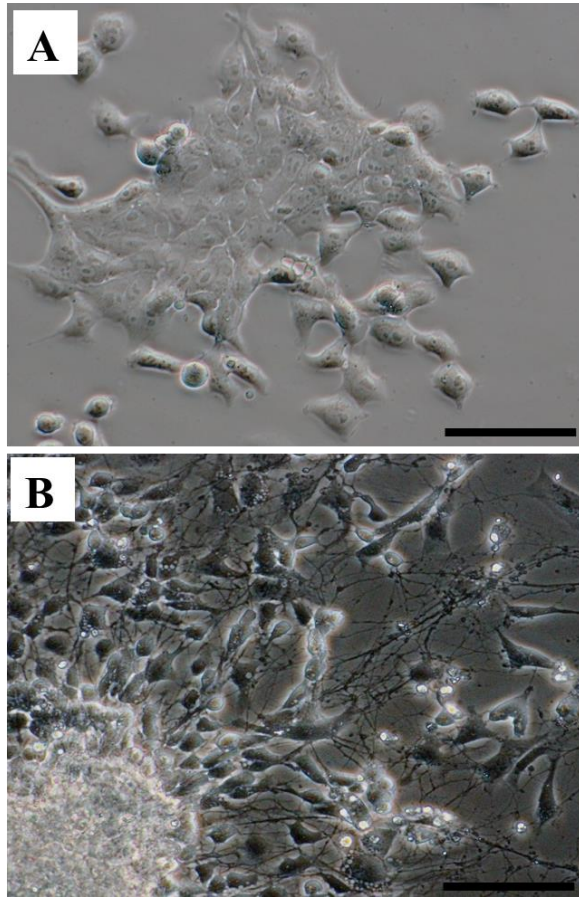


図 14 神経細胞分化前 (A) 後 (B) における P19C6 細胞の位相差顕微鏡像
スケールバー (100 μm)

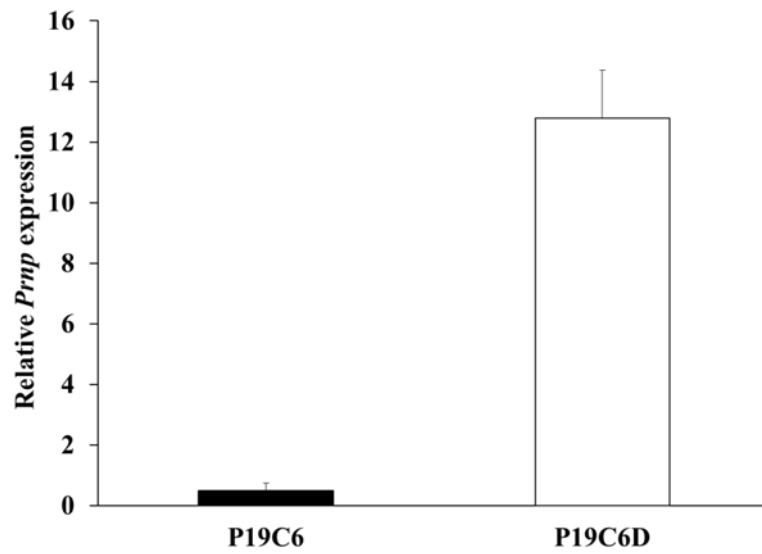


図 15 P19C6 細胞神経分化前 (P19C6) 後 (P19C6D) における PrP 遺伝子発現
大脳 PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。
データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差で示した。

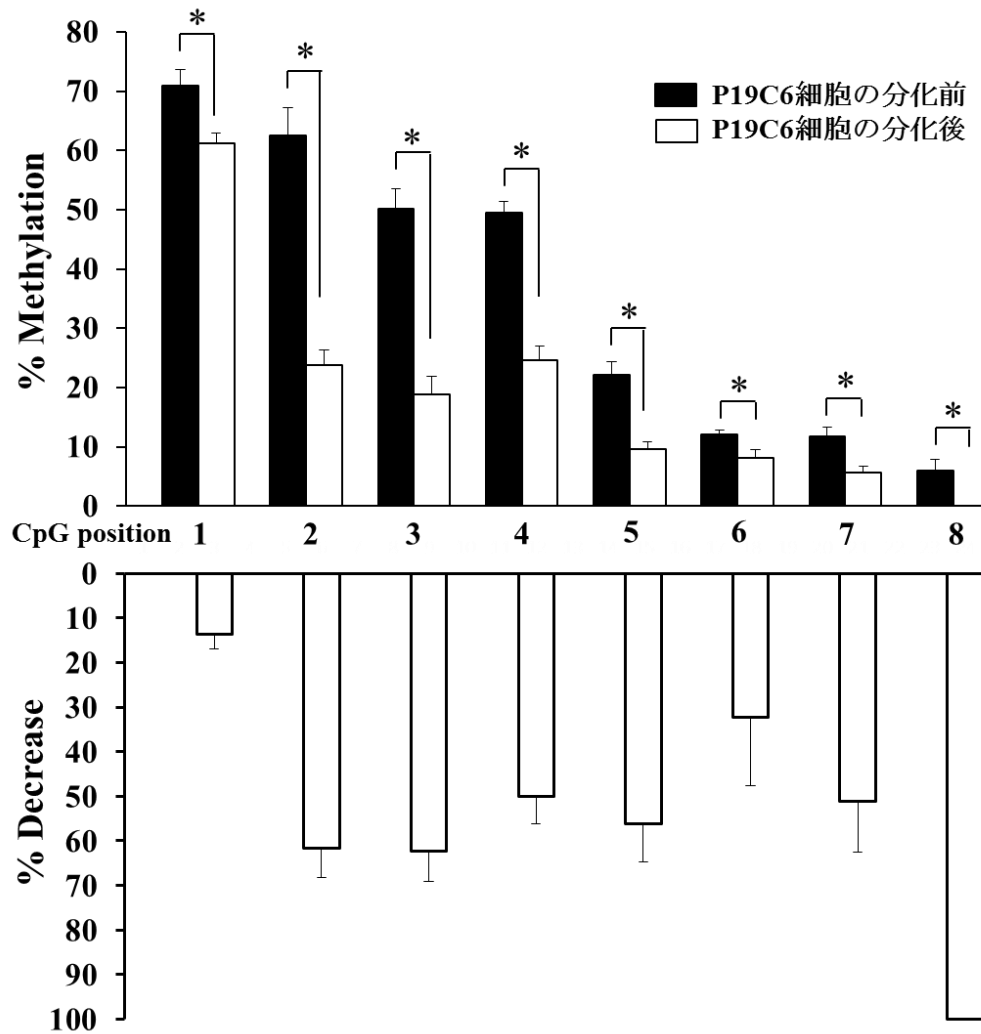


図 16 P19C6 細胞神経分化前後における CpG メチル化状態の変化
 メチル化頻度データは、異なる 8 回の実験から得られた平均値±標準偏差で示した。
 *は比較間において有意な差を認めた ($P < 0.01$)。
 % Decrease は、分化前と比較した分化後のメチル化減少割合。

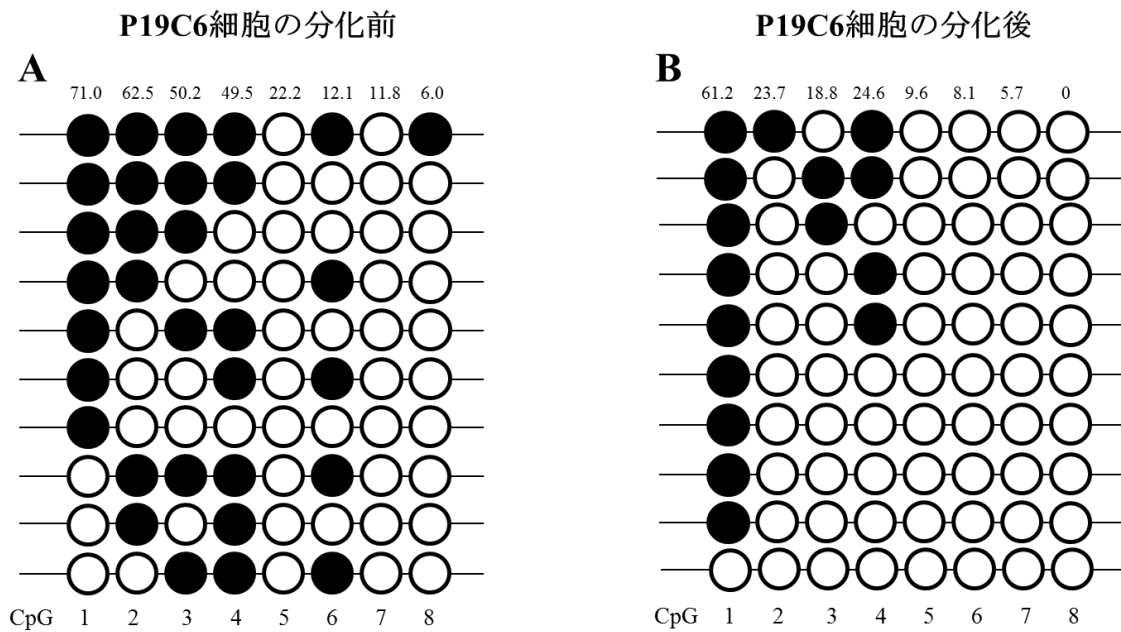


図 17 P19C6 細胞における分化前 (A) 後 (B) の CpG メチル化パターン変化
 Bisulphite -PCR 産物のプラスミドへのクローニングを行い、それぞれ 10 個のプラスミドのシーケンス解析を行った。●および○は、それぞれメチル化および非メチル化状態を示す。上の数字は、メチル化頻度解析から得られた頻度 (%) を示す。CpG 9 から CpG 46 は、すべての試料で非メチル化状態であったので省略した。

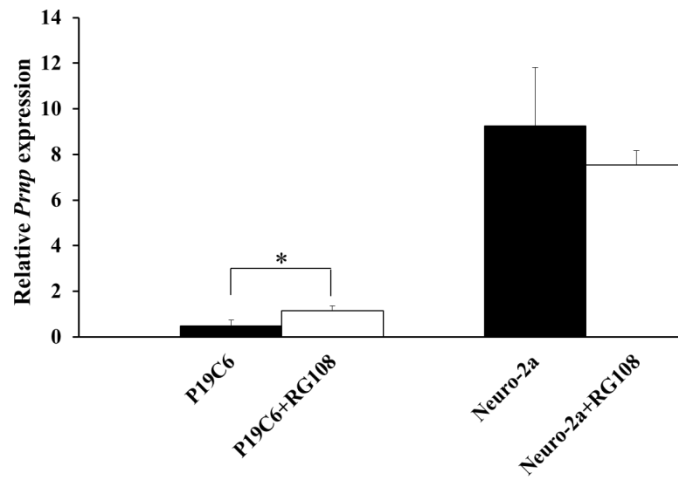


図 18 P19C6 および Neuro-2a 細胞における PrP 遺伝子発現に対する RG108 の効果
RG108 未処理細胞 (P19C6 および Neuro-2a)。

RG108 処理細胞 (P19C6+RG108 および Neuro-2a+RG108)

大脳 PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。

データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差で示した。

*は比較間において有意な差を認めた ($P < 0.01$)。

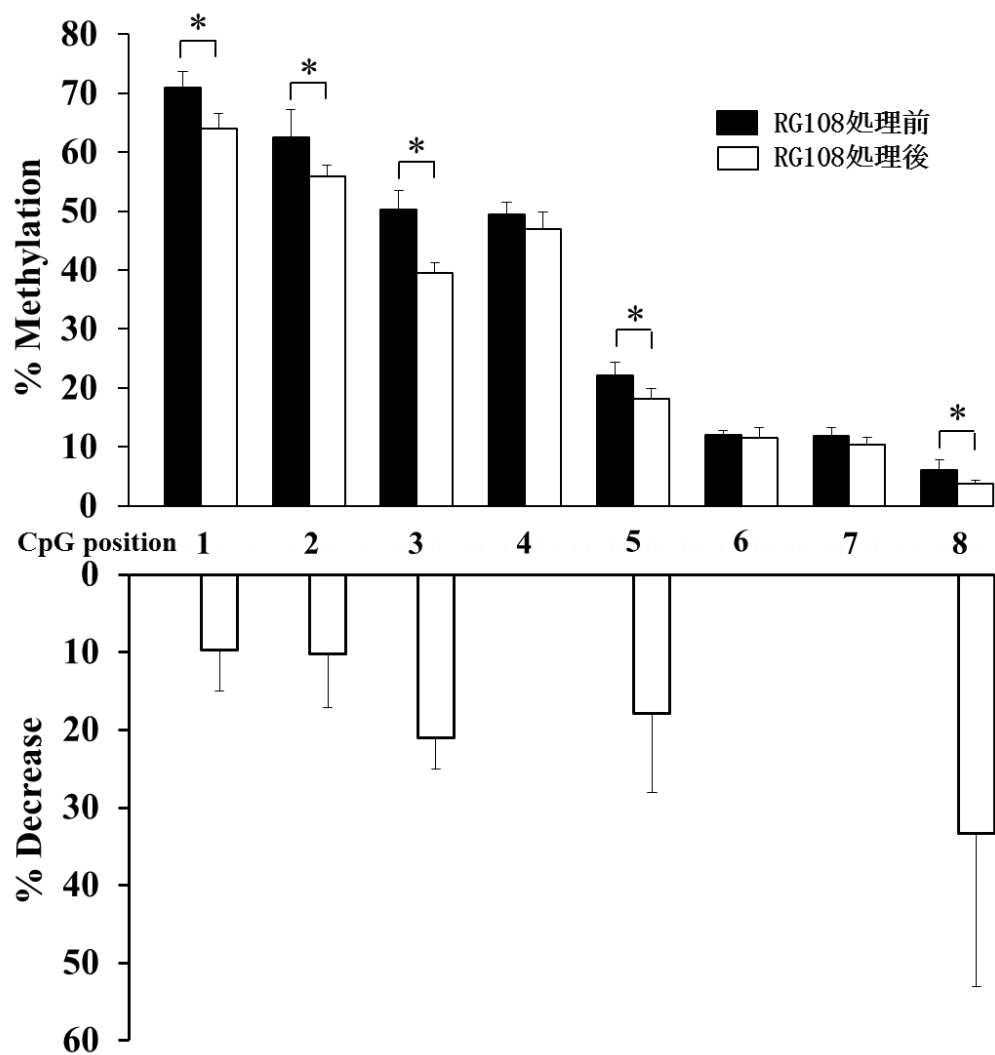


図 19 P19C6 における PrP 遺伝子 CpG メチル化に対する RG108 の効果
 メチル化頻度データは、異なる 8 回の実験から得られた平均値±標準偏差で示した。
 *は比較間において有意な差を認めた ($P < 0.01$)。
 % Decrease は、分化前と比較した分化後のメチル化減少割合。

第Ⅲ章

CCAAT エンハンサー結合蛋白質ファミリーが PrP 遺伝子発現 に及ぼす影響

III-1 諸言

ハムスター[Basler et al., 1986]、ヒト[Puckett et al., 1991]、マウス[Westaway et al., 1994]、およびラット[Saeki et al., 1996a]の PrP 遺伝子エクソン 1 より上流は、GC 含有量が高く、逆方向の CCAAT ボックス (ATTGG) が存在するが、TATA ボックスは存在しない。一方で、ヒツジ[Westaway et al., 1994]およびウシ[Inoue et al., 1996]の PrP 遺伝子には、CCAAT ボックスも TATA ボックスも存在せず、GC 含有が高いことが明らかとなっている。これら 5'非転写領域の解析では、強力なプロモーター活性を有する領域の存在がラット[Saeki et al., 1996b]、ウシ[Inoue et al., 1997]、マウス[Baybutt and Manson, 1997]およびヒト[Mahal et al., 2001]で示され、約 80 ~ 150bp の配列がプロモーター活性には重要である。また。ラット、マウスおよびヒトでは、転写開始点から約 80 bp 以内に存在する CCAAT ボックス (ATTGG) と Sp1 結合が予想される配列 (CCCGCC) を含む領域がプロモーター活性に重要であることが示唆されている。

CCAAT ボックスは、CAAT ボックスまたは CAT ボックスとも呼ばれ、プロモーター領域に存在する CCAAT ボックスには、RNA polymerase II が作用し 60 bp から 80 bp 下流から転写が始まることが知られている[Dolfini et al., 2009]。また、真核生物、特に後生動物 (*metazoa*) では、プロモーター領域の CCAAT ボックスに直接結合する CCAAT binding factor (または nuclear factor Y) は、高度に保存され RNA polymerase II による転写を助けている。

Moloney murine sarcoma virus long terminal repeat や herpesvirus thymidine kinase 遺伝子の転写に関わる CCAAT ボックスの研究から、CCAAT ボックスに選択的に作用する蛋白質が単離され、後に CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) と呼ばれる転写

エンハンサーがラット肝臓の核抽出物から発見された [Barbara et al., 1986; Landschulz et al., 1988]。エンハンサーが結合する遺伝子領域は、RNA polymerase II が転写を開始する場所から離れて存在し、転写をポジティブに調節している。現在では、6種類の C/EBP が発見され、ファミリーを形成し CCAAT /エンハンサー結合蛋白質ファミリー (CCAAT/enhancer-binding proteins 以下 C/EBPs) と呼ばれている [Ramji and Foka, 2002]。C/EBPs 転写調節因子は、細胞の分化や種々な組織の機能にとって重要な転写因子ファミリーを構成し、ギリシャ文字で指定された 6 つのアイソフォームで構成され、それぞれ C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ および C/EBP ζ が発見年代順に登録されている [Cao et al., 1991]。C/EBPs は、2 量体を形成し、DNA 結合に関与する C 末端側の basic-leucine zipper ドメインがファミリー間で高度に保存されている [Ramji and Foka, 2002]。C/EBPs が結合する共通塩基配列 (コンセンサスシーケンス) は、(A/G)TTGCG(C/T)AA(C/T)として報告され、ATTGC パリンドロームまたは、パリンドローム様の配列形式をとっている [Osada et al., 1996]。しかしながら、C/EBPs と PrP 遺伝子発現との関係については不明なままである。

そこで、本章では、C/EBPs 転写因子と PrP 遺伝子発現との関係について明らかにすることを目的とし、マウス由来株化培養細胞における C/EBPs 遺伝子発現を調べ、PrP 遺伝子発現との関連性を調べるとともに、発現ベクターを用いて C/EBPs 転写因子を強制発現させ、PrP 遺伝子発現変動について解析を行った。

III-2 材料および方法

III-2-1) マウス由来株化培養細胞

Neuro-2a 細胞、C-1300 細胞、WEHI-231 細胞、HePa1-6 細胞、RAW264.7 細胞、P19C6 細胞は、第 II 章の材料および方法の II-2-1) に従って培養維持した。STO 細胞 (SIM マウス由来線維芽細胞)、は理化学研究所バイオリソースセンターから購入した。NMuLi 細胞 (マウス由来肝癌細胞) は、大阪大学・松浦善治先生から分与された。X63Ag8.653 細胞 (BALB/c マウス由来骨髓腫細胞) は、日生研の竹山夏実先生から分与された。STO 細胞の継代培養には、10% FBS および 0.1 mM, NEAA (100 × MEM Non-Essential Amino Acids, Thermo Fisher Scientific) 添加 DMEM (Nacalai) を用いた、NMuLi 細胞の継代培養には 10% FBS 添加 DMEM を用いた、X63Ag8.653 細胞の継代培養には、10% FBS 添加 RPMI1640 を用いた、すべての細胞は、5% CO₂ 下 37°C で培養を行った。

III-2-2) 細胞からの全 RNA の調製

100 mm dish に培養した細胞を第 I 章 I-2-8) に記述の方法に従って行った。

III-2-3) RT-PCR による C/EBPs cDNA の調製

肝臓から得た全 RNA を用いて、RT-PCR により、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP ϵ 、C/EBP δ および C/EBP ζ の全翻訳領域を増幅した。全 RNA 1 μ g と 10 pmol の Oligo dT15 (Promega) プライマーを含む H₂O にて全量を 10 μ l とし、65°C 5 分間加温後、RT-PCR (TOYOBO, Osaka, Japan) の反応混合液 (5 × buffer 4 μ l、10 mM dNTP mixture 4 μ l、RNase Inhibitor 0.5 μ l、RTace 1.5 μ l) を加え、42°C 60 分間、95°C 5 分間処理した。

逆転写反応後、1 μ l をとり、Taq ポリメラーゼ (5 U/ μ l) 0.25 μ l、10 \times Buffer 5 μ l、2.5mM dNTP Mixture 4 μ l、各 10 μ M プライマー0.5 μ l を混合し、滅菌超純水で全量を 50 μ l とした。PCR 反応条件は、94°C \cdot 10 sec、55°C \cdot 30 sec、72°C \cdot 1min 30 sec、30 サイクルとした。ただし、C/EBP ζ のみ伸長時間を 3min 30 sec とした。用いたプライマーを表 10 に示す。プライマーの両側に *Eco* RI 制限酵素サイトを導入し、5 末端に Kozak 配列を組み込んだ。ただし、C/EBP ζ のみ *Sal* I 制限酵素サイトを導入した。PCR 終了後、PCR 産物 50 μ l を 1.0% アガロースゲル (Lonza Japan) にて電気泳動後、ゲルをエチジウムブロミドで染色し、増幅した DNA 断片を確認し、目的のサイズの PCR 産物をゲルから精製した。

III-2-4) ゲルからの DNA 調整

PCR 産物のゲルからの精製は、第 I 章 I -2-5) に記述の方法に従って行った。

III-2-5) 6 種類の C/EBPs PCR 産物のプラスミドベクターへの組み込みおよび大腸菌の形質転換

PCR 産物の T-vector への組み込みおよび大腸菌の形質転換は、第 II 章 II -2-13) に記述の方法に従って行った。

III-2-6) 遺伝子クローニングのチェック

プラスミドベクターに組み込まれた目的遺伝子のチェックは、第 II 章 II -2-14) に記述の方法に従って行った。

III-2-7) シーケンス解析用のプラスミド DNA の精製

シーケンス解析用のプラスミド DNA の精製は、第 II 章 II -2-15) に記述の方法に従って行った。

III-2-8) プラスミドのシーケンス解析

プラスミド DNA (100 ~ 120 ng/μl) をテンプレートとし、プライマーは M13f、M13r (3.2 pmol/μl) を使用した。シーケンス解析は、I -2-6) の記述に従って行った。

III-2-9) 6 種類の C/EBPs の哺乳類細胞発現ベクターの作製

上記により得た cDNA を制限酵素 (*Eco* RI または *Sal* I) にてプラスミドから切り出し、ゲル精製を行い、発現ベクター pIRES2-EGFP (BD biosciences, Tokyo, Japan) に組み込んだ。C/EBP ζ 以外は *Eco* RI (Wako, Osaka, Japan) サイトに組み込み、C/EBP ζ は、*Xho* I (Wako) サイトに組み込んだ。目的の cDNA を持った発現ベクターをシーケンス解析により確認した。シーケンス解析は、プラスミド DNA (100 ~ 120 ng/μl) をテンプレートとし、プライマーは pIRES2-EGFP_P5' (5'-GTAGGCGTGTACGGTGGGAG-3')、pIRES2-EGFP_P3' (5'-AACGCACACCGGCCTTATTC-3') (3.2 pmol/μl) を使用した。

III-2-10) 6 種類の C/EBPs 過発現細胞の作製

培養細胞への遺伝子導入は Polyethylenimine (PEI, Polysciences, Illinois, USA) を利用した。まず、 4×10^5 細胞の Neuro-2a および P19C6 細胞を 100 mm dish にて、12 時間培養した。Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 200 μl に各発現ベクター 5 μg、PEI 15 μg の混合液を作製し、15 分間静置した。次に細胞の培養液を取り除き、新たに FBS を含まない培養液を 10 ml 加え、上記の混合液を加えて 37°C で 6 時間培養し

た。その後、培養液を取り除き、新たに FBS を含む培養液を加え、24 時間培養を行った。その後、蛍光顕微鏡にて細胞の EGFP 蛍光を確認した後、500 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の G418 が入った培養液を入れ 37°C で培養した。48 時間ごとに培養液の交換を行い、G418 抵抗性の細胞を得た。

III-2-12) リアルタイム RT-PCR

表 11 に示すプライマーを用いて C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 、C/EBP ζ 、HES-1 および CTCF 遺伝子の発現定量を行った。リアルタイム RT-PCR は、第 I の I -2-9) に記述の方法に従って行った。

III-3 結果

III-3-1) マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子の発現解析

第II章で調べた6種類のマウス由来株化培養細胞 (Neuro-2a、C-1300、WEHI-231、HePa1-6、RAW264.7 および P19C6) に加えて (図 13 および図 15)、STO 細胞、NMuLi 細胞および X63Ag8.653 細胞における PrP 遺伝子発現量を調べた (図 20)。大脳における PrP 遺伝子発現量を 100 とした相対的発現量としてそれぞれの細胞株における PrP 遺伝子発現を示した。調べた細胞の中で、神経分化誘導後の P19C6 細胞 (P19C6D) で PrP 遺伝子発現が一番高く 12.8 ± 1.6 であった。次に Neuro-2a 細胞の 9.3 ± 2.6 、C-1300 細胞の 7.3 ± 2.2 であった。STO 細胞および NMuLi 細胞では、それぞれ 5.5 ± 2.0 および 5.0 ± 1.9 であり、WEHI-231 細胞の 1.6 ± 1.5 よりは高かった。X63Ag8.653 細胞では、 1.0 ± 0.6 であり、HePa1-6、RAW264.7、P19C6 細胞では、さらに低くそれぞれ 0.7 ± 0.3 、 0.5 ± 0.6 、 0.5 ± 0.3 であった。以上のように PrP 遺伝子の発現は、調べたすべての細胞株において認められたが、組織の中で最も高い発現を示した大脳よりはいずれも細胞株においても発現は低く、また、細胞株固有な発現レベルにあると考えられた。

III-3-2) マウス大脳における C/EBPs、HES-1 および CTCF 遺伝子の発現解析

マウス大脳における目的の転写因子遺伝子の発現量と PrP 遺伝子発現量の関係を知るため、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて解析を行った (図 21)。大脳における PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合、C/EBP α ~ ζ 、HES-1 および CTCF 遺伝子の発現はそれぞれ 112 ± 43.8 、 85.6 ± 54.6 、 118 ± 25.7 、 97 ± 43.7 、 63.5 ± 50.5 、 63.5 ± 44.6 、

6.5±3.2 および 108.9±42.4 であった。HES-1 遺伝子発現量は、ほかの遺伝子発現量と比較すると有意に低い発現レベルであった。

III-3-3) マウス由来株化培養細胞における C/EBPs 遺伝子の発現解析

9種のマウス由来株化培養細胞および P19C6 細胞については神経分化処理前後の細胞から全 RNA を調製し、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて、C/EBP α ~ ζ の mRNA 量の定量を行った (図 22)。マウス脳における目的の遺伝子発現量を 100 として、それぞれの遺伝子発現量を相対的数値として表した。

C/EBP α 転写産物は、細胞ごとに量が異なり、RAW264.7 細胞において発現が最も高く 250.4±188.4 であった (図 22, A)。次に WEHI-231 細胞において高く 145.9±75.2 であった。C-1300、STO、NMuLi、X63Ag8.653、HePa1-6 および P19C6 細胞では、それぞれ 10.1±4.2、35.3±9.1、6.1±1.2、3.5±2.1、81.9±21.1 および 18.3±6.0 であった。Neuro-2a 細胞では検出限界以下であった。P19C6 細胞においては神経分化後に発現上昇が認められ (P19C6D)、約 3.2 倍となった (57.58±9.5)。

C/EBP β 転写産物量は、細胞ごとに量が異なり、WEHI-231 細胞において最も高く 1401.7±757.4 であった (図 22, B)。次に NMuLi 細胞で 1123.3±716.1 であった。Neuro-2a、STO、X63Ag8.653、HePa1-6、RAW264.7 および P19C6 細胞では、それぞれ 743.4±260.2、297.9±36.8、212.3±118.4、245.5±67.1、618.5±660.9 および 90.3±31.2 であった。C-1300 細胞では検出限界以下であった。P19C6 細胞においては神経分化後に発現上昇が認められ (P19C6D)、約 3.1 倍となった (280.6±63.4)。

C/EBP γ 転写産物は、すべての細胞試料から検出され、C-1300 細胞において最も高く 173.5±46.5 であった (図 22, C)。次に Neuro-2a 細胞で 122.9±76.7 であった。STO、NMuLi、WEHI-231、X63Ag8.653、RAW264.7、P19C6 細胞では、それぞれ 104.4±33.8、

72.3±8.0、97.8±29.2、58.0±3.9、81.6±70.0 および 50.2±22.4 であった。HePa1-6 細胞が最も低く 44.4±9.9 であった。P19C6 細胞においては神経分化後に発現上昇が認められ (P19C6D)、約 3.1 倍となった (155.3±17.4)。

C/EBP δ 転写産物は、細胞ごとに量が異なり、WEHI-231 細胞において最も高く 1040±651.5 であった (図 22, D)。次に NMuLi 細胞で 433.2±116.9 であった。Neuro-2a、C-1300、STO、HePa1-6、RAW264.7 および P19C6 細胞では、それぞれ 112.1±50.3、45.9±19.3、230.5±112.9、56.1±29.4、335.8±279.1 および 126.8±61.9 であった。X63Ag8.653 細胞では、最も低く 1.7±0.7 であった。P19C6 細胞においては神経分化前後において有意な差は認められなかった (P19C6D) (50.49±16.4) ($p > 0.05$)。

C/EBP ϵ 転写産物は、細胞ごとに量が異なり、C-1300 細胞において最も高く 1399.1±398.5 であった (図 22, E)。次に RAW264.7 細胞で 903.8±576.3 であった。Neuro-2a、STO、NMuLi、WEHI-231、X63Ag8.653 および P19C6 細胞では、それぞれ 29.6±27.1、68.7±87.1、25.9±26.3、521.9±151.9、419.2±102.5、429.4±154.3 であった。HePa1-6 細胞では、最も低く 21.9±24.7 であった。P19C6 細胞においては神経分化後に著しい発現の低下が認められ、約 97% 減少した (P19C6D) (12.1±5.0)。

C/EBP ζ 転写産物は、すべての細胞試料から検出され、RAW264.7 細胞において最も高く 333.0±172.3 であった (図 22, F)。次に X63Ag8.653 細胞で 231.6±91.5 であった。Neuro-2a、C-1300、STO、NMuLi、HePa1-6 および P19C6 細胞では、それぞれ 163.2±25.9、198.4±79.4、171.3±46.8、119.0±37.5、118.1±46.2、180.6±98.6 であった。WEHI-231 細胞では、最も低く 97.6±39.9 であった。P19C6 細胞においては神経分化前後において有意な差は認められなかった (P19C6D) (219.1±16.3) ($P > 0.05$)。

III-3-4) マウス由来株化培養細胞における HES-1 および CTCF 遺伝子発現解析

第 I 章と第 II 章では、CpG 2 のメチル化が PrP 遺伝子発現に負の相関関係にあり、CpG 2 サイトが N-box 上に存在し、すぐ下流 CTCF 結合配列が存在することを述べた。そこで、N-box に結合が予想される HES-1 と CTCF の遺伝子発現と PrP 遺伝子発現の関係をj知るために、マウス由来株化培養細胞株および細胞神経分化後の P19C6 細胞 (P19C6D) における HES-1 および CTCF 遺伝子発現量を定量的リアルタイム RT-PCR を用いて解析を行った (図 23)。

HES-1 転写産物は、マウス大脳での発現量を 100 として相対的発現量として表した (図 23, A)。HePa1-6 細胞において一番高く 431.7 ± 161.7 であった。次に P19C6 細胞の 315.6 ± 168.9 であった。C-1300、STO、NMuLi および X63Ag8.653 細胞では、それぞれ 18.6 ± 6.4 、 61.4 ± 22.5 、 214.4 ± 82.1 、 76.2 ± 28.6 であった。Neuro-2a および RAW264.7 細胞では、他の細胞と比較して著しく低く、それぞれ 0.4 ± 0.1 および 0.02 ± 0.007 であった。WEHI-231 細胞では検出限界以下であった。神経分化前後の P19C6 細胞において有意な差は認められなかった。

CTCF 転写産物は、マウス大脳での発現量を 100 として相対的発現量として表した (図 23, B)。Neuro-2a 細胞が一番高く 92.9 ± 26.7 であった。次に C-1300 細胞において高く 76.4 ± 24.2 であった。STO、NMuLi、WEHI-231、X63Ag8.653、HePa1-6 および P19C6 細胞では、それぞれ 21.4 ± 10.6 、 51.6 ± 10.7 、 52.3 ± 18.4 、 55.3 ± 33.2 、 57.9 ± 7.3 、 71.6 ± 19.8 であった。RAW264.7 細胞において最も低く 19.4 ± 5.9 であった。CTCF 転写産物は、すべての細胞において確認された。神経分化前後の P19C6 細胞において有意な差は認められなかった。

III-3-5) PrP 遺伝子と C/EBPs、HES-1 および CTCF の遺伝子発現の相関関係

図 20、図 22 および図 23 において示した PrP 遺伝子の発現と C/EBP ファミリー、

HES-1 および CTCF の遺伝子発現の結果に基づいて、ピアソンの相関分析を行った (表 12)。表 12 に示すように、C/EBP γ 遺伝子発現と PrP 遺伝子発現との間に有意な正の相関 ($r > 0.3$ および $P < 0.05$) を認めた。しかし、PrP 遺伝子発現と他の遺伝子発現との間には、有意な相関関係は認められなかった。以上のことから、調べた株化培養細胞において C/EBP γ 遺伝子発現が PrP 遺伝子発現に正の影響を及ぼしていることが示唆された。

III-3-6) P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞における C/EBPs 過剰発現が PrP 遺伝子発現に及ぼす影響

III-3-5 の結果を受けて、どの C/EBPs が PrP 遺伝子発現に影響があるのかを調べるために、P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞に C/EBP $\alpha \sim \zeta$ をそれぞれ過剰発現させた細胞を作製し、PrP 遺伝子発現変化を調べた。C/EBP $\alpha \sim \zeta$ 発現ベクターおよび発現ベクター作製に用いたインサートを含まない pIRES2-EGFP ベクターをそれぞれの細胞に遺伝子導入し、24 時間後に G418 を用いて選択培養を行った。選択培養後 14 日目に GFP の共発現を確認した (図 24)。選択後のそれぞれの細胞から全 RNA を調製し、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて、PrP mRNA の定量を行った (図 25)。大脳における PrP 遺伝子発現量を 100 とした相対的発現量としてそれぞれの細胞株における PrP 遺伝子発現を示した。

P19C6 細胞において、C/EBP $\alpha \sim \zeta$ を過剰発現および空ベクター (Vector) である pIRES2-EGF 導入細胞における PrP 遺伝子発現は、それぞれ C/EBP α (1.6 ± 0.5)、C/EBP β (1.2 ± 0.4)、C/EBP γ (4.1 ± 0.7)、C/EBP δ (2.7 ± 0.3)、C/EBP ϵ (1.3 ± 0.3)、C/EBP ζ (3.7 ± 0.3) および Vector (2.6 ± 0.3) であった (図 25, A)。有意差検定の結

果、空ベクターと比較すると C/EBP α 、C/EBP β および C/EBP ϵ において有意な低下が認められ、C/EBP γ および C/EBP ζ において有意な上昇が認められた。

Neuro-2a 細胞において、C/EBP α ~ ζ を過発現および空ベクター (Vector) である pIRES2-EGF 導入細胞における PrP 遺伝子発現は、それぞれ C/EBP α (8.9 ± 6.5)、C/EBP β (8.9 ± 2.5)、C/EBP γ (24.6 ± 1.6)、C/EBP δ (11.6 ± 2.4)、C/EBP ϵ (14.1 ± 6.2)、C/EBP ζ (21.2 ± 5.1) および Vector (13.4 ± 2.0) であった (図 25, B)。有意差検定の結果、空ベクターと比較すると C/EBP γ においてのみ有意な上昇が認められた。

以上のことから、表 12 において PrP 遺伝子発現と正の相関性が認められた C/EBP γ の過発現は、P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞において PrP 遺伝子発現を上昇させ、PrP 遺伝子発現へ正の関与が強く示唆された。一方で P19C6 細胞において、C/EBP ζ の過発現は PrP 遺伝子を上昇させ、C/EBP α 、C/EBP β および C/EBP ϵ 過発現によって PrP 遺伝子発現の低下が認められたことから、さらなる研究が必要と考えられる。

III-4 考察

マウス PrP 遺伝子プロモーター解析によると、転写開始点から約 80 bp 上流に存在する CCAAT の相補配列 (ATTGG) がプロモーター活性に重要であると報告されている [Baybutt and Manson, 1997]。しかしながら、PrP 遺伝子発現に影響を及ぼすエンハンサー因子については不明なままである。そこで、本章では、CCAAT 転写複合体への調節因子として知られている C/EBP ファミリーと PrP 遺伝子発現影響について解析を行った。また、第 I 章で PrP 遺伝子発現と遺伝子メチル化の解析において負の関係が示唆された N-box 配列 (CACGAG) および CCCTC 配列 (GAGGG) に結合が予想される転写調節因子である HES-1 および CTCF についても解析を行った。

マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子発現と C/EBPs 遺伝子、HES-1 遺伝子および CTCF 遺伝子発現との相関性を調べたところ、C/EBP γ 遺伝子の発現が PrP 遺伝子発現と正の相関関係にあることが明らかとなった (表 12)。C/EBPs 転写調節因子と PrP 遺伝子発現との関係をさらに明らかにするために、C/EBPs の過発現が PrP 遺伝子の発現にどのように影響を及ぼすのかを調べた (図 25)。P19C6 細胞において、C/EBP α ~ ζ 発現ベクターおよび空ベクターの導入を行ったところ、空ベクターとの比較において C/EBP α 、C/EBP β および C/EBP ϵ において PrP 遺伝子発現の有意な低下が認められ、C/EBP γ および C/EBP ζ において有意な上昇を認めた (図 25, A)。また、Neuro-2a 細胞において、C/EBP γ においてのみ PrP 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。以上のことから、C/EBP γ の過発現は、両細胞において PrP 遺伝子の発現上昇を引き起こすことが示された。P19C6 細胞は、多能性胚性癌腫細胞である P19 細胞からサブクローニングされた細胞株であり、神経発生モデルとして使われている [Gao et al., 2001; Jones-Villeneuve et al., 1982]。C/EBPs は、神経細胞、アストロ細胞や

ミクログリア細胞の発生や分化に深く関わっている転写調節因子である [Pulido-Salgado et al., 2015]。また、PrP 遺伝子は、胚発生の初期段階から発現し、細胞の多能性および神経発生と関係している [Lee and Baskakov, 2014; Miranda et al., 2011; Peralta et al., 2011; Shi et al., 2016]。P19C6 細胞において、C/EBP γ 過発現以外の C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP ϵ 、C/EBP ζ 過発現においても発現の低下や上昇が認められたが、これら C/EBPs の過発現によって P19C6 細胞が持つ多能性へ影響を及ぼし、結果として PrP 遺伝子発現に影響を及ぼしたのかもしれない。また、C/EBP γ が、様々は細胞種において共通して PrP 遺伝子発現上昇を引き起こすのかを明らかにしていく必要がある。

C/EBP γ は、組織において普遍的に発現する転写因子であり、免疫グロブリン重鎖遺伝子プロモーターおよびエンハンサー中のシス調節部位に対する親和性によって最初に同定された分子である [Roman et al., 1990]。C/EBP γ は、構造的に DNA 結合およびホモ/ヘテロ二量体化に必要とされるロイシンジッパードメインおよび塩基性領域は保持しているが、他の C/EBPs とは異なりトランス活性化ドメインがないことを特徴としている [Cooper et al., 1995; Thomassin et al., 1992]。このことから、C/EBP γ 単独ではトランス活性化がなく、他の C/EBPs に対して優勢阻害 (dominant negative) 分子として見なされてきた [Cooper, C et al., 1995; Parkin, SE et al., 2002]。一方で、C/EBP β の活性を増強する因子としての報告もある [Gao et al., 2002]。C/EBP γ ノックアウトマウスは、出生後 48 時間以内に高い死亡率を示し、ナチュラルキラー細胞の機能的成熟に重要な役割を果たすことが示されている [Kaisho et al., 1999]。中枢神経における C/EBP γ の役割は不明な点が多いが、神経炎症における炎症促進因子である C/EBP β のリプレッサーとしての役割が示唆され、神経損傷によつての発現上昇が認められている [Lopez de Heredia and Magoulas, 2013]。しかしながら、プリオン病を含

む他の神経変性疾患と C/EBP γ の関係は不明なままである。

神経変性疾患と C/EBPs の関係についていくつかの報告がある。C/EBP α は、ミクログリア細胞増殖反応の調節因子として、変異型 CJD やアルツハイマー病の疾患進行への関与が示唆されている[Gomez-Nicola et al., 2013]。C/EBP β は、細胞増殖、分化および生存のような多様な中枢神経系機能に関与している[Peña-Altamira et al., 2014]。アルツハイマー病、多発性硬化症などの特定の病理への関与が示唆されている[Carro et al., 2010; Strohmeyer et al., 2014]。C/EBP δ は、細胞分化や免疫応答に広く機能することが知られている[Cardinaux and Magistretti, 1996; Wu et al., 1996; Zannetti et al., 2010]。また、長期記憶の強化において役割を持ち、グリア細胞のグリコーゲン代謝関連酵素の発現を調節への関与が示唆されている[Arguello et al., 2013; Cardinaux and Magistretti, 1996]。一方で、C/EBP δ の欠損は、プリオン病やアルツハイマーモデルマウスに明確な臨床症状への影響を示さないが、アミロイド β プラークを有意に増加させる[Lutzenberger et al., 2015]。しかしながら、C/EBP γ 、C/EBP ϵ および C/EBP ζ と神経変性疾患への関与は不明なままである。

本章の研究において、マウス由来株化培養細胞における PrP 遺伝子発現と C/EBP γ 遺伝子発現が正の相関関係にあることを明らかにした。また、C/EBP γ の過発現が P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞の両方において、PrP 遺伝子の発現上昇を引き起こした。C/EBPs が結合する共通塩基配列は、(A/G)TTGCG(C/T)AA (C/T)として報告され、ATTGC パリンドロームまたは、パリンドローム様の配列形式をとっていることが知られている[Osada et al., 1996]。興味深いことに、ATTGC 配列を検索したところ、第 I 章において注目した N-box および CCCTC 配列に続く、すぐ下流に ATTGC が存在することが明らかとなった (図 26)。また、この領域は T を境としたパリンドローム構造をとっていることも明らかとなった。今後、これらの配列に実際にどのよ

うな転写調節因子が結合するのかを明らかにする研究が必要とされるが、本研究において、PrP 遺伝子発現調節に重要な役割を果たす遺伝子領域が明らかとなった可能性がある。

III-5 要約

PrP 遺伝子のプロモーター領域は、GC 配列に富み CCAAT-box とそれに続く SP1 結合領域が転写活性に重要であることが報告されている。第 I および II 章の研究結果からメチル化可変領域 (-599 bp ~ -238 bp)、特に N-box が位置する CpG 2 (-576 bp) のメチル化が PrP 遺伝子発現に負の影響を及ぼしていることを示した。本章の研究では、マウス由来株化培養細胞を用いて、CCAAT 配列に影響を及ぼすと予想される C/EBPs の遺伝子発現と PrP 遺伝子発現の関係を明らかにすることを目的とした。

培養細胞における PrP 遺伝子発現と C/EBPs 遺伝子発現を解析したところ、C/EBP γ 遺伝子の発現に正の相関関係にあることを認めた。そこで、C/EBPs の過発現細胞系を P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞において構築し、どの C/EBPs が PrP 遺伝子発現に影響を及ぼすのかを解析した。その結果、両細胞において、C/EBP γ の過発現が PrP 遺伝子の発現上昇を引き起こすことが観察された。興味深いことに、CpG 2 (-576 bp) が位置するすぐ下流にはインシュレーター配列である CCCTC 配列が存在し、さらにすぐ下流には、C/EBPs 結合共通配列様の ATTGC を含むパリンδροーム構造が認められた。今後、これらの配列に実際にどのような転写調節因子が結合するのかを明らかにする研究が必要とされるが、PrP 遺伝子発現調節に重要な役割を果たす遺伝子領域が明らかとなった可能性がある。

Ⅲ-6 表

表10 発現ベクター作製用PCRプライマー

Gene symbol	Primer name	Size of product	Sequence	Sequence ID
C/EBP α	C/EBP α -F	1080bp	5'-CGGAATTCGCCACCATGGAGTCGGCCGACTTCTAC -3'	NM_007678
	C/EBP α -R		5'-CAGAAATTCACGCGCAGTTGCCCATGGCCT-3'	
C/EBP β	C/EBP β -F	891bp	5'-CGGAATTCGCCACCATGCACCGCCTGCTGGCCTG-3'	NM_009883
	C/EBP β -R		5'-ATGAATTCTAGCAGTGGCCCGCCGAGGCCA-3'	
C/EBP γ	C/EBP γ -F	453bp	5'-CGGAATTCGCCACCATGAGCAAGCTGTCGCAGCCA -3'	NM_009884
	C/EBP γ -R		5'-ATGAATTCTACTGCCCTGGGTTATCAGAATTTG-3'	
C/EBP δ	C/EBP δ -F	807bp	5'-CGGAATTCGCCGCCATGAGCGCCGCGCTTTTCAGC-3'	NM_007679
	C/EBP δ -R		5'-TTGAATTCCTACCGGCAGTCGGCCGCGGTG-3'	
C/EBP ϵ	C/EBP ϵ -F	846bp	5'-CGGAATTCGCCGCCATGTCCCACGGGACCTACTAT-3'	BC108954
	C/EBP ϵ -R		5'-GAGAATTCAGCTGCAGCCCCGACACCCTTGA-3'	
C/EBP ζ	C/EBP ζ -F	3159bp	5'-CGGTCGACGCCCCATGTCCGGCCGACCAGGAACCT-3'	NM_001024806
	C/EBP ζ -R		5'-CTGTCGACTCACTTCCTCTGCCGTTTGGGTTTC-3'	

表11. リアルタイム RT-PCRに使用したプライマー

Gene symbol	Primer name	Size of product	Sequence	Sequence ID	Reference
C/EBP α	CCAAT- α -F	124 bp	5'- CAAGAACAGCAACGAGTACCG-3'	-	Miyano, Y et al., 2014
	CCAAT- α -R		5'-GTCACTGGTCAACTCCAGCAC-3'		
C/EBP β	CCAAT- β -F	122bp	5'- GTTTCGGGACTTGATGCAAT-3'	-	Miyano, Y et al., 2014
	CCAAT- β -R		5'-CCCGCAGGAACATCTTTAAGT-3'		
C/EBP γ	CCAAT- γ -F	126bp	5'- GAGAATGAACGGTTGGAAGC-3'	-	Miyano, Y et al., 2014
	CCAAT- γ -R		5'-TGTAGTTTCCGTGCTGATGG-3'		
C/EBP δ	CCAAT- δ -F	101bp	5'- ATCGACTTCAGCGCCTACAT-3'	-	Miyano, Y et al., 2014
	CCAAT- δ -R		5'-GCTTTGTGGTTGCTGTTGAA-3'		
C/EBP ϵ	CCAAT- ϵ -F	102bp	5'- CGCATTATGGAGACTCAGCA-3'	-	Miyano, Y et al., 2014
	CCAAT- ϵ -R		5'-GCGCAGAGTGTCTAGCTCCT-3'		
C/EBP ζ	CCAAT- ζ -F	140bp	5'- AATCCAGGATGATGCTGTCC-3'	-	Miyano, Y et al., 2014
	CCAAT- ζ -R		5'-TGCTGGCAGAAGGTCGTG-3'		
Hes1	HES-1-F	90bp	5'- TGCCAGCTGATATAATGGAGAA-3'	NM_013672	this study
	HES-1-R		5'-CCATGATAGGCTTTGATGACTTT-3'		
Ctcf	CTCF-F	101bp	5'- AGAGACCACAAAATGCCATC-3'	NM_181322	this study
	CTCF-R		5'-GCACTTGTGAGGACGAGTACC-3'		

表12. 転写因子およびPrP遺伝子発現の相関解析

	C/EBP α	C/EBP β	C/EBPγ	C/EBP δ	C/EBP ϵ	C/EBP ζ	HES-1	CTCF
Pearson's (<i>r</i> -values)	-0.355	0.102	0.808	-0.279	-0.230	0.003	-0.032	0.115
<i>P</i> -value	0.314	0.778	0.005	0.436	0.522	0.994	0.929	0.752

Pearson's *r*-values $\geq \pm 0.3$ および *P*-values ≤ 0.05 の場合に有意な相関関係があるとみなす。

有意な相関関係が認められた C/EBP γ を太字体と斜体で示す。

Ⅲ-7 図

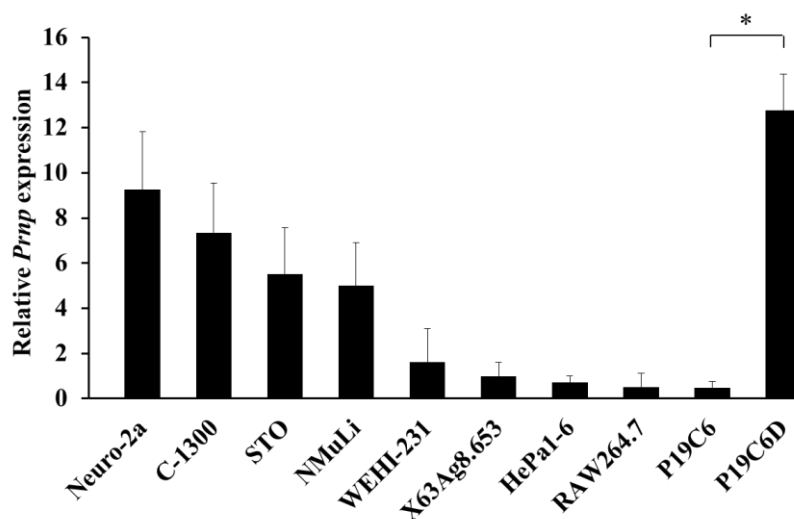


図 20 各株化培養細胞における PrP 遺伝子発現

大脳 PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。

データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値±標準偏差で示した。

P19C6 細胞において、神経分化誘導前後に PrP 遺伝子発現の有意な差を認められた (*)

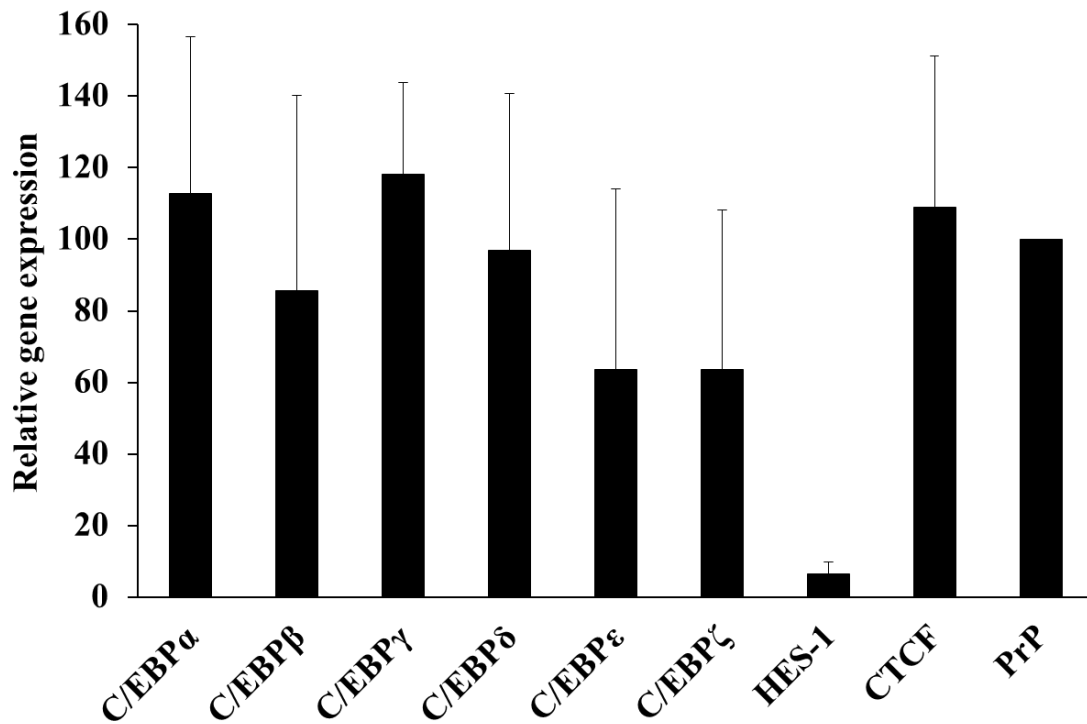


図 21 マウス大脳における C/EBPs、HES-1 および CTCF 遺伝子発現
 大脳の PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。
 データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値±標準偏差で示した。

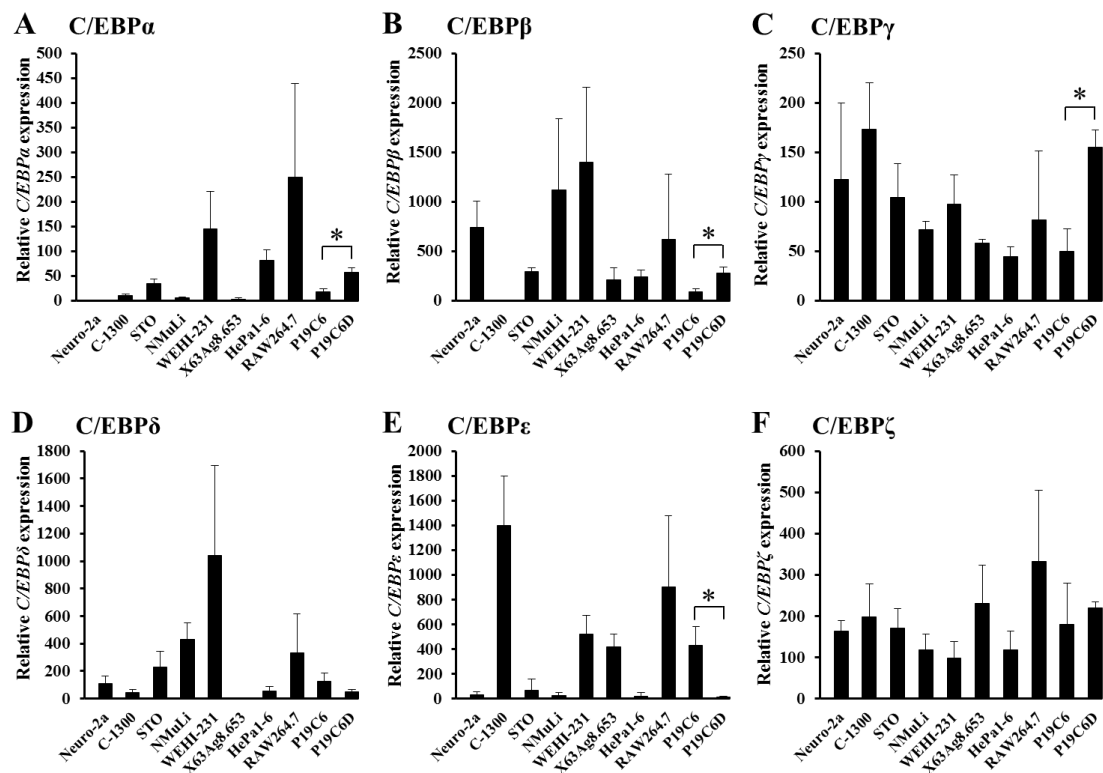


図 22 各マウス由来株化培養細胞における C/EBPs 遺伝子発現

A : C/EBP α 遺伝子発現 ; B : C/EBP β 遺伝子発現 ; C : C/EBP γ 遺伝子発現 ; D : C/EBP δ 遺伝子発現 ; E : C/EBP ϵ 遺伝子発現 ; F : C/EBP ζ 遺伝子発現。

大脳における各遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。

データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差で示した。

P19C6 細胞において、神経分化誘導前後に遺伝子発現の有意な差を認めた (*)

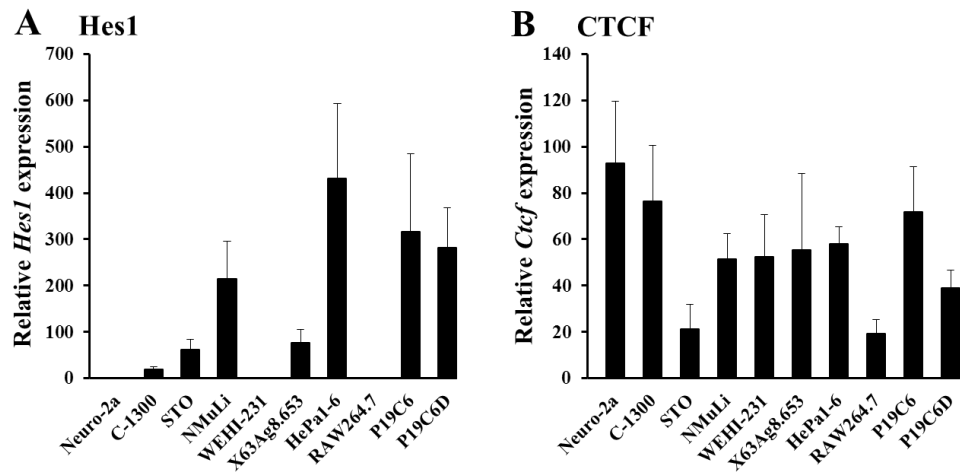


図 23 各マウス由来株化培養細胞における HES-1 および CTCF 遺伝子発現
 大腦における HES-1 および CTCF の遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を
 示した。A : HES1 遺伝子発現 ; B : CTCF 遺伝子発現。
 データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値±標準偏差で示した。

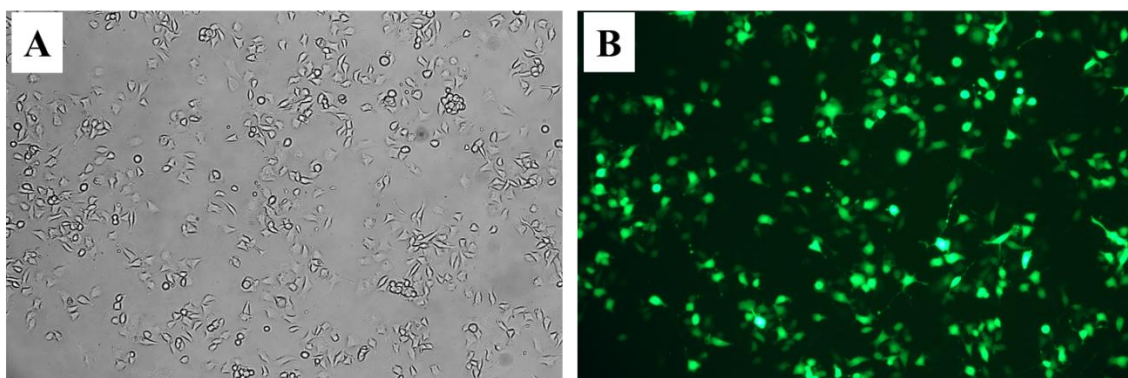


図 24 C/EBP α 過発現細胞

Neuro-2a 細胞を用いて C/EBP ϵ 発現ベクター導入後、24 時間目より G418 によって選択培養を行った。写真は、選択培養後 14 日目の GFP 共発現細胞像を示す。A：明視野顕微鏡下；B：蛍光顕微鏡下

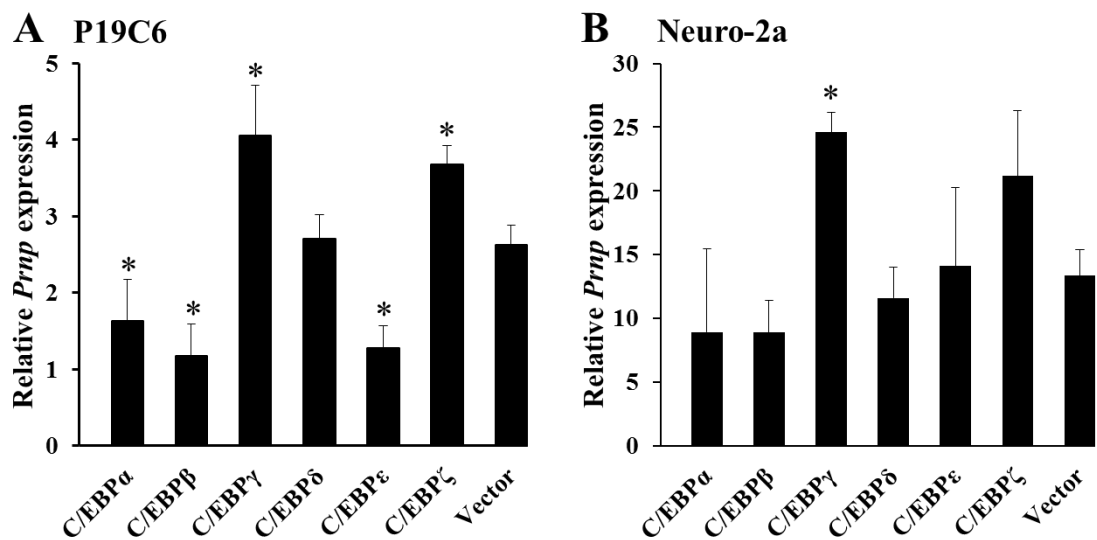


図 25 P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞における C/EBPs 過発現が PrP 遺伝子発現に及ぼす影響

大脳における PrP 遺伝子発現量を 100 とした場合の相対発現量を示した。

データは、異なる 3 回の実験から得られた平均値±標準偏差で示した。

Vector は、遺伝子発現に用いた空ベクターである pIRES2-EGFP。

A : P19C6 細胞 ; B ; Neuro-2a 細胞

各 C/EBPs の発現と PrP 遺伝子発現との比較において有意な差を認めた場所に * を付す。* $P < 0.05$

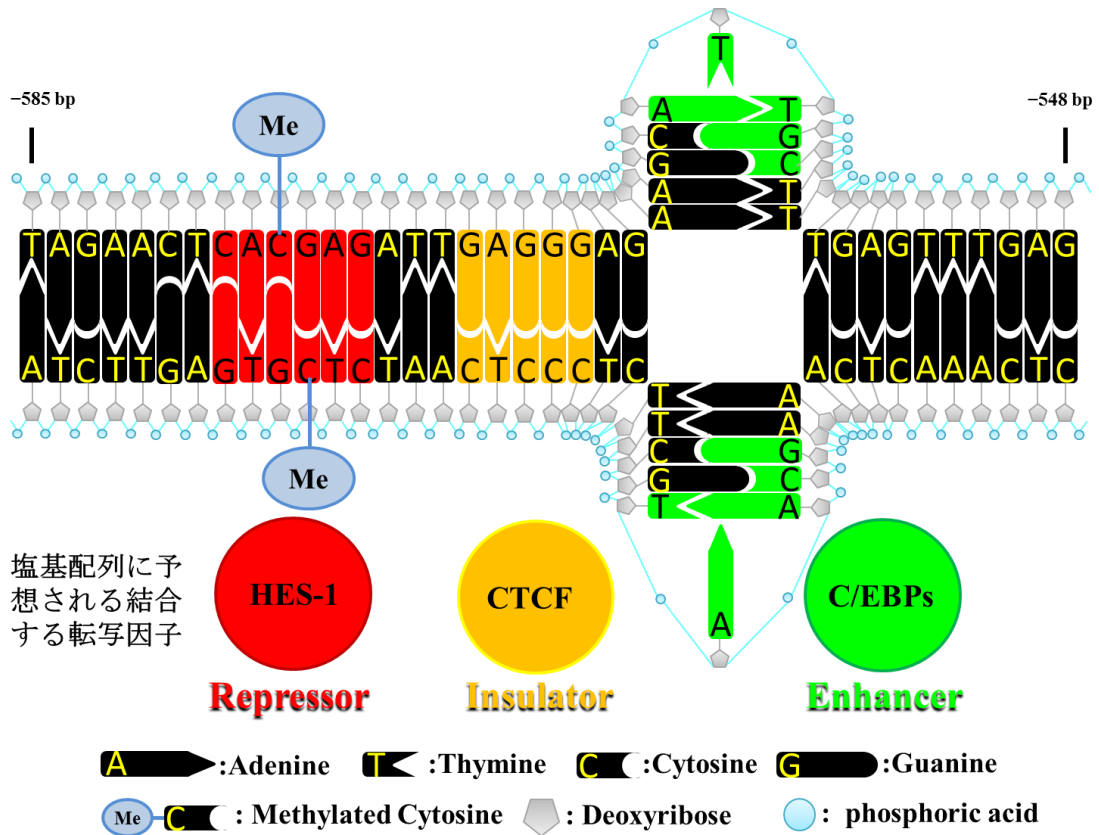


図 26 CpG 2 (-576 bp) 周辺に結合が予想される転写因子
 CpG 2 (-576 bp) を含む-585 bp から-548 bp の塩基配列を示す。
 CACGAG : HES-1 結合共通配列 ; CTCCC : CTCF 結合共通配列 ; ATTGC : C/EBPs
 結合共通配列。

総括

細胞型プリオン蛋白質 (PrP^{C}) は、哺乳動物間で高度に保存された糖蛋白質であり、GPI アンカーを介して細胞膜存在している[Stahl et al., 1987]。マウス PrP 遺伝子は、3つのエクソンから構成され、中枢神経系で高い発現が認められている[Saeki et al., 1996a; Westaway et al., 1994b]。マウス PrP 遺伝子を欠損させると、発生や発達には明確な障害を示さないが、スクレイピー感染から完全に回避する[Brandner et al., 1996]。PrP^Cの発現は、プリオン病の伝達に必須であるが、PrP^Cの生理機能については、いまだに多くの議論が残されている[Biasini et al., 2012; Linden et al., 2008]。マウス PrP 遺伝子プロモーター活性は、転写開始点から約 80 bp 上流に位置する ATTGG 配列 (CCAAT 配列の相補) とそれに続く SP1 結合予想領域が重要である[Baybutt and Manson, 1997]。しかしながら、本疾患の伝達や発症に非常に重要な PrP 遺伝子発現調節機構については、それ以上のことは不明である。PrP 遺伝子発現調節機構が解明されれば、致死性神経変性疾患であるプリオン病の発症がコントロールでき、プリオン病の治療つなぐと考えられる。そこで本研究では PrP 遺伝子発現制御に深く関与しているエピゲノム制御に注目し、PrP 遺伝子発現に関与している DNA メチル化について明らかにすることを目的とするとともに、エンハンサー因子について解析を行った。

第 I 章では、マウス 34 組織に含まれる PrP mRNA をリアルタイム RT-PCR で定量するとともに、PrP 遺伝子プロモーター領域を含む約 1 kb に存在する 46 個の CpG 配列のメチル化状態を Bisulfite シークエンスシンク PCR 法で明らかにした。マウス PrP 遺伝子プロモーター領域を含む CpG アイランド (CpG 9 ~ CpG 40, -218 bp ~ +152 bp) は、調べたすべての組織において完全に非メチル化状態であり、PrP 遺伝子は典

型的なハウスキーピング遺伝子であることを明らかにした。一方、CpG アイランドに隣接する領域 (CpG 1 ~ CpG 7、-599 bp ~ -279 bp) の CpG メチル化は、組織ごとに特有な状態にあり、マウスゲノムにおいてメチル化可変領域であることを強く示唆した。さらに興味深いことに、CpG 2 (-576 bp) のメチル化が PrP 遺伝子発現と負の相関関係にあることを明らかにした (Pearson's $r = -0.374$, $P = 0.035$)。以上のことから、PrP 遺伝子は、典型的なハウスキーピング遺伝子であり、メチル化可変領域に存在する CpG のメチル化、特に CpG 2 (-576 bp) のメチル化が組織特有な遺伝子発現調節に重要であることを示唆した。

第II章では、6種類のマウス由来株化培養細胞を材料とし、PrP 遺伝子プロモーター領域を含む CpG メチル化状態を明らかにした。株化培養細胞においても PrP 遺伝子プロモーター領域を含む CpG アイランド (CpG 9 ~ CpG 40、-218 bp ~ +152 bp) は、調べたすべての株化培養細胞において完全に非メチル化状態であることを明らかにした。一方、CpG アイランドに隣接する領域 (CpG 1 ~ CpG 8、-599 bp ~ -238 bp) の CpG メチル化は、細胞ごとに特有な状態にあり、PrP 遺伝子プロモーター上流部には、メチル化可変領域が存在することを明らかにした。PrP 遺伝子発現との相関分析の結果、CpG 1 (-599 bp) から CpG 4 (-326 bp) までのメチル化が負の相関関係にあることを示した。また、神経細胞分化および DNA メチル化転移酵素阻害剤によってメチル化可変領域の CpG メチル化の減少を引き起こし、このことが PrP 遺伝子発現上昇を引き起こすことを示唆した。これらの知見は、神経分化において PrP 遺伝子発現調節に CpG メチル化が関与していることを示唆し、発現制御機構の一端の解明と考えられる。

第III章では、9種類のマウス由来株化培養細胞を用いて、CCAAT 配列に影響を及ぼすと予想される C/EBPs の遺伝子発現と PrP 遺伝子発現の関係を明らかにすること

を目的とした。培養細胞における PrP 遺伝子発現と C/EBPs 遺伝子発現との相関性を解析したところ、C/EBP γ 遺伝子発現が PrP 遺伝子発現と正の相関関係にあることを認めた。そこで、C/EBPs の過発現細胞系を P19C6 細胞および Neuro-2a 細胞において構築し、どの C/EBPs が PrP 遺伝子発現に影響を及ぼすのかを解析した。その結果、両細胞において、C/EBP γ の過発現が PrP 遺伝子の発現上昇を引き起こすことが観察された。興味深いことに、CpG 2 (-576 bp) が位置するすぐ下流にはインシュレーター配列である CCCTC 配列が存在し、さらにすぐ下流には、C/EBPs 結合共通配列様の ATTGC を含むパリンδροーム構造が認められた。今後、これらの配列に実際にどのような転写調節因子が結合するのかを明らかにする研究が必要とされるが、PrP 遺伝子発現調節に重要な役割を果たす遺伝子領域を明らかにした研究成果と考えられる (図 27)。

以上のように、PrP 遺伝子発現調節に重要な領域を DNA メチル化の解析から明らかにし、また、転写因子 C/EBP γ が PrP 遺伝子の発現調節に関与していることを示唆する成果が得られた。これらの研究成果は、プリオン研究分野におけるエピジェネティクスに新しい知見を提供すると共に、プリオン病の診断および発症機構の解明に貢献する成果と考えられる。

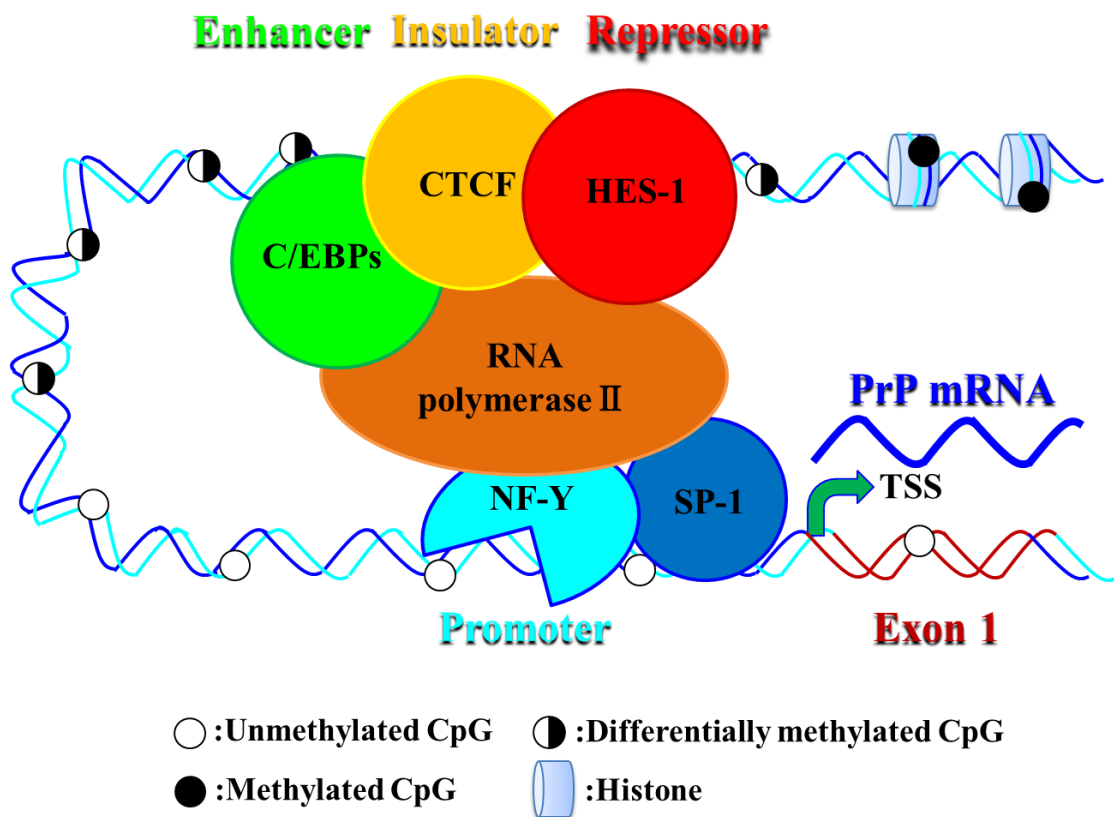


図 27 予想される PrP 遺伝子発現調節モデル

TSS (Transcript Start Site) は、PrP 遺伝子転写開始点を示す。

ABSTRACT

The cellular isoform of the prion protein (PrP^C) is a ubiquitous glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface N-linked glycoprotein and plays critical roles in the development of prion disorders [Stahl et al., 1987]. The physiological roles of PrP^C remain elusive, but several reports have proposed some functions including reduction of oxidative stress [Klamt et al., 2001], cell adhesion [Graner et al., 2000] and copper cooperative neuroprotection [Gasperini et al., 2015]. Although the prion protein gene (*Prnp*) is predominately expressed in the central nervous system (CNS) by all known mammals, the pattern of gene activation is still poorly understood. The distribution of PrP mRNA in various tissues has been analyzed in many mammals, including hamsters [Bendheim et al., 1992], sheep [Horiuchi et al., 1995], mice [Ford et al., 2002] and cows [Tichopad et al., 2005]. The mouse *Prnp* localized on chromosome 2 consists of three exons, with the third exon encoding the entire open reading frame [Westaway et al., 1994]. In mouse and rat *Prnp*, the region upstream of the first exon consists of high GC content including CCAAT box and three SP1 binding sites that have been shown to regulate the core promoter activity [Baybutt and Manson, 1997, Saeki et al., 1996b]. However, there has been no epigenetic study including an investigation of DNA methylation on *Prnp*.

DNA methylation on the cytosine of CpG dinucleotides is an epigenetic modification that plays an important role in embryonic development, tumorigenesis, aging and other neurodegenerative disorders [Gopalakrishnan et al., 2008, Hannum et al., 2013, Ammal Kaidery et al., 2013, Sanchez-Mut and Graff, 2015]. A large number of vertebrate genes have been analyzed with respect to CpG frequency, the length of CpG islands (CGIs) and the

presence of DNA methylation on housekeeping genes and tissue-specific genes [Jones, 2012]. In addition, CpG methylation is an epigenetic mark generally considered to induce transcriptional gene silencing by inhibiting the association of DNA binding factors [Bird, 2007].

In chapter I and II, to clarify the effect of CpG methylation on *Prnp* expression, I investigated the correlation between the CpG methylation and *Prnp* expression in mouse tissues and mouse-derived cell lines. In chapter III, to clarify the effect of transcription factors such as CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) on *Prnp* expression, I investigated the correlation between the transcription factors and *Prnp* expression in mouse-derived cell lines.

In chapter I, to investigate CpG site methylation in mouse tissues, the bisulfite sequencing PCR was performed to analyze the *Prnp* regions between -682 bp and +347 bp from the transcriptional start site. The targeted region contained a total of 46 CpG sites numbered CpG 1 to CpG 46, and the CGI spanned between -218 bp and +152 bp contained 32 CpG sites (CpGs 9 to 40). The *Prnp* first exon and putative core promoter region are localized in the regions from +1 bp to +67 bp (CpGs 25 to 33) and -62 bp to -6 bp (CpGs 20 to 24), respectively. I demonstrated that the CGI including the *Prnp* core promoter region was completely unmethylated in all tested tissues. On the other hand, CpG methylation in the CGI shore region (positioned at -599 bp to -238 bp) occurred in various tissue- and site-specific proportions. Interestingly, the correlation analysis between CpG methylation status and PrP mRNA levels showed that CpG 2 (-576 bp) methylation was negatively correlated with the PrP mRNA level (Pearson's $r = -0.374$, $P = 0.035$). These results suggest that *Prnp* is a typical housekeeping gene and various methylation frequencies of the CGI

shore region are likely to affect *Prnp* expression in a tissue-specific manner.

In chapter II, to investigate CpG site methylation in mouse-derived cell lines, the bisulfite sequencing PCR was also performed to analyze the *Prnp* regions between -682 bp and +347 bp from the transcriptional start site. The methylation analysis of the 46 CpG sites showed that CpGs 9 to 46 (-180 bp to +286 bp) were completely unmethylated in all cell lines, whereas CpGs 1 to 8 (-599 bp to -238 bp) were differentially methylated depending on the cultured cells. Methylation was completely absent in CGI (CpGs 9 to 40) including the putative core promoter region (CpGs 20 to 24) in all cell lines in addition to the results from mouse tissues in chapter I, concluding that *Prnp* is a typical house-keeping gene. To explore the involvement of DNA methylation in *Prnp* transcriptional regulation during neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19C6 cells. When P19C6 cells were differentiated into neuronal cells, the expression level of *Prnp* increased 26-fold in comparison with undifferentiated cells, while CpG methylation was significantly demethylated at the nucleotide region between -599 bp and -238 bp. In addition, when P19C6 cells were applied in a DNA methyltransferase inhibitor, RG108, *Prnp* transcripts also increased 2.4-fold in relation to the decreased methylation statuses. These findings should help to elucidate the DNA methylation-mediated regulation of *Prnp* expression during neuronal differentiation.

In chapter III, to investigate the effect of the transcription factors, C/EBP α ~ ζ , HES-1 and CTCF on *Prnp* expression, the quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) and over-expression experiments were performed by using mouse-derived cell lines. The correlation analysis based on the qRT-PCR results for PrP, C/EBP α ~ ζ , HES-1 and CTCF mRNAs, revealed that a significant positive correlation between PrP and C/EBP γ mRNA

levels (Pearson's $r = -0.808$, $P = 0.005$). On the other hand, there were no significant correlations between the mRNA levels of PrP and other transcription factors ($P > 0.05$). When C/EBP γ was over-expressed in both P19C6 and Neuro-2a cells, PrP mRNA levels were induced increases, suggesting that C/EBP γ played as an enhancer factor on *Prnp* expression. These findings should help to elucidate the regulation of *Prnp* expression.

Although DNA-binding factors and histone modifications in the *Prnp*-regulatory region must still be identified, these findings provide novel information for the epigenetics of the *Prnp* gene and could contribute to elucidating the physiological roles of PrPC and the molecular pathogenesis of prion diseases.

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の実施の機会をあたえて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導戴いた神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻感染症制御学教育研究分野の佐伯圭一准教授に深甚なる謝意を表します。懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました同専攻の河野潤一教授、北川浩教授並びに松尾栄子助教に深謝の意を表します。また、実験遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言戴いた日本生物科学研究所の竹山夏実先生並びに感染症制御学教育研究分野の学生各位に心より御礼申し上げます。最後に、山岡育英会、兵庫県私費外国人留学生奨学金並びに文部科学省外国人留学生学習奨励費による研究・教育支援に心より感謝申し上げます。

引用文献

- Aoyama, T., Okamoto, T., Nagayama, S., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nakayama, T., Nakamura, T. and Toguchida, J. (2004). Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator Sp3. *The Journal of biological chemistry* 279, 28789-28797.
- Aran, D. and Hellman, A. (2013). DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell* 154, 11-13.
- Arguello, A.A., Ye, X., Bozdagi, O., Pollonini, G., Tronel, S., Bambah-Mukku, D., Huntley, G.W., Platano, D. and Alberini, C.M. (2013). CCAAT enhancer binding protein delta plays an essential role in memory consolidation and reconsolidation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 3646-3658.
- Arlt, S., Kontush, A., Zerr, I., Buhmann, C., Jacobi, C., Schroter, A., Poser, S. and Beisiegel, U. (2002). Increased lipid peroxidation in cerebrospinal fluid and plasma from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiology of disease* 10, 150-156.
- Arundine, M. and Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 61, 657-668.
- Barbara, L., Mazzella, G., Baraldini, M., Gasbarrini, G., Giungi, F., Malavolti, M., Mastroroberto, L., Miglio, F., Roda, E., Raise, E., Rizzetto, M. and Saracco, G. (1986). A randomised controlled trial with human lymphoblastoid interferon vs no treatment in chronic hepatitis B virus infection. Preliminary results. *Journal of hepatology* 3 *Suppl* 2, S235-238.

- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* *46*, 417-428.
- Baybutt, H. and Manson, J. (1997). Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene* *184*, 125-131.
- Bechtel, K. and Geschwind, M.D. (2013). Ethics in prion disease. *Progress in neurobiology* *110*, 29-44.
- Bellingham, S.A., Coleman, L.A., Masters, C.L., Camakaris, J. and Hill, A.F. (2009). Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry* *284*, 1291-1301.
- Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kacsak, R.J., Cashman, N.R. and Bolton, D.C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* *42*, 149-156.
- Bergstrom, A.L., Cordes, H., Zsuzger, N., Heegaard, P.M., Laursen, H. and Chabry, J. (2005). Amidation and structure relaxation abolish the neurotoxicity of the prion peptide PrP106-126 in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry* *280*, 23114-23121.
- Biasini, E., Turnbaugh, J.A., Unterberger, U. and Harris, D.A. (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends in neurosciences* *35*, 92-103.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* *16*, 6-21.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* *379*, 339-343.

- Brown, D.R. (1998). Prion protein-overexpressing cells show altered response to a neurotoxic prion protein peptide. *Journal of neuroscience research* 54, 331-340.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.
- Brown, D.R., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A. (1998). Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *Journal of neurochemistry* 70, 1686-1693.
- Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Experimental neurology* 146, 104-112.
- Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J. and Jones, I.M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *The Biochemical journal* 344 Pt 1, 1-5.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M. and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Burgess, S.T., Shen, C., Ferguson, L.A., O'Neill, G.T., Docherty, K., Hunter, N. and Goldmann, W. (2009). Identification of adjacent binding sites for the YY1 and E4BP4 transcription factors in the ovine PrP (Prion) gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 284, 6716-6724.

- Cabral, A.L., Lee, K.S. and Martins, V.R. (2002). Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *The Journal of biological chemistry* *277*, 5675-5682.
- Caiafa, P. and Zampieri, M. (2005). DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *Journal of cellular biochemistry* *94*, 257-265.
- Calo, E. and Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Molecular cell* *49*, 825-837.
- Cao, Z., Umek, R.M. and McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & development* *5*, 1538-1552.
- Cardinaux, J.R. and Magistretti, P.J. (1996). Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* *16*, 919-929.
- Carro, M.S., Lim, W.K., Alvarez, M.J., Bollo, R.J., Zhao, X., Snyder, E.Y., Sulman, E.P., Anne, S.L., Doetsch, F., Colman, H., Lasorella, A., Aldape, K., Califano, A. and Iavarone, A. (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* *463*, 318-325.
- Cedar, H. and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics* *10*, 295-304.

- Chatterjee, R. and Vinson, C. (2012). CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 763-770.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. and Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Molecular neurodegeneration* 8, 28.
- Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P. and Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *The Journal of biological chemistry* 270, 19173-19180.
- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W., Coleman, P.D., Rutten, B.P. and van den Hove, D.L. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of aging* 34, 2091-2099.
- Colby, D.W. and Prusiner, S.B. (2011). Prions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a006833.
- Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N. and Calame, K. (1995). Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic acids research* 23, 4371-4377.
- Cunningham, J.M., Christensen, E.R., Tester, D.J., Kim, C.Y., Roche, P.C., Burgart, L.J. and Thibodeau, S.N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer research* 58, 3455-3460.
- de Boni, L., Tierling, S., Roeber, S., Walter, J., Giese, A. and Kretzschmar, H.A. (2011). Next-generation sequencing reveals regional differences of the alpha-synuclein

- methylation state independent of Lewy body disease. *Neuromolecular medicine* 13, 310-320.
- Devanathan, V., Jakovcevski, I., Santuccione, A., Li, S., Lee, H.J., Peles, E., Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V. and Schachner, M. (2010). Cellular form of prion protein inhibits Reelin-mediated shedding of Caspr from the neuronal cell surface to potentiate Caspr-mediated inhibition of neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 9292-9305.
- Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Pietu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D. and Chouaib, S. (2004). Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer research* 64, 719-727.
- Dolfini, D., Zambelli, F., Pavese, G. and Mantovani, R. (2009). A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 4127-4137.
- Dron, M., Moudjou, M., Chapuis, J., Salamat, M.K., Bernard, J., Cronier, S., Langevin, C. and Laude, H. (2010). Endogenous proteolytic cleavage of disease-associated prion protein to produce C2 fragments is strongly cell- and tissue-dependent. *The Journal of biological chemistry* 285, 10252-10264.
- Ducrot, C., Arnold, M., de Koeijer, A., Heim, D. and Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Veterinary research* 39, 15.
- Dwivedi, R.S., Herman, J.G., McCaffrey, T.A. and Raj, D.S. (2011). Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease. *Kidney international* 79, 23-32.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.

- Elmonir, W., Inoshima, Y., Elbassiouny, A. and Ishiguro, N. (2010). Intron 1 mediated regulation of bovine prion protein gene expression: Role of donor splicing sites, sequences with potential enhancer and suppressor activities. *Biochemical and biophysical research communications* 397, 706-710.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B. and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28, 8380-8388.
- Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., Gabrielson, E., Schutte, M., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 564-569.
- Figuroa-Romero, C., Hur, J., Bender, D.E., Delaney, C.E., Cataldo, M.D., Smith, A.L., Yung, R., Ruden, D.M., Callaghan, B.C. and Feldman, E.L. (2012). Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PloS one* 7, e52672.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *The EMBO journal* 15, 1255-1264.
- Ford, M.J., Burton, L.J., Morris, R.J. and Hall, S.M. (2002). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113, 177-192.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. and Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-546.

- Fournier, J.G., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T., Robain, O., Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Dormont, D. and Brown, P. (1998). Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. *Cell and tissue research* 292, 77-84.
- Franco, M.M., Prickett, A.R. and Oakey, R.J. (2014). The role of CCCTC-binding factor (CTCF) in genomic imprinting, development, and reproduction. *Biology of reproduction* 91, 125.
- Funke-Kaiser, H., Theis, S., Behrouzi, T., Thomas, A., Scheuch, K., Zollmann, F.S., Paterka, M., Paul, M. and Orzechowski, H.D. (2001). Functional characterization of the human prion protein promoter in neuronal and endothelial cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 79, 529-535.
- Gammon, K. (2014). Gene therapy: editorial control. *Nature* 515, S11-13.
- Gao, H., Parkin, S., Johnson, P.F. and Schwartz, R.C. (2002). C/EBP gamma has a stimulatory role on the IL-6 and IL-8 promoters. *The Journal of biological chemistry* 277, 38827-38837.
- Gao, X., Bian, W., Yang, J., Tang, K., Kitani, H., Atsumi, T. and Jing, N. (2001). A role of N-cadherin in neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 284, 1098-1103.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* 196, 261-282.
- Gasperini, L., Meneghetti, E., Pastore, B., Benetti, F. and Legname, G. (2015). Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation. *Antioxidants & redox signaling* 22, 772-784.

- Gasset, M., Baldwin, M.A., Lloyd, D.H., Gabriel, J.M., Holtzman, D.M., Cohen, F., Fletterick, R. and Prusiner, S.B. (1992). Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10940-10944.
- Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature reviews Genetics* 7, 703-713.
- Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *The EMBO journal* 20, 5863-5875.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D. and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-638.
- Goldmann, W., O'Neill, G., Cheung, F., Charleson, F., Ford, P. and Hunter, N. (1999). PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *The Journal of general virology* 80 (Pt 8), 2275-2283.
- Gomez-Nicola, D., Fransen, N.L., Suzzi, S. and Perry, V.H. (2013). Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 2481-2493.
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R. and Brentani, R.R. (2000). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain research Molecular brain research* 76, 85-92.

- Greger, V., Debus, N., Lohmann, D., Hopping, W., Passarge, E. and Horsthemke, B. (1994). Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Human genetics* 94, 491-496.
- Guentchev, M., Siedlak, S.L., Jarius, C., Tagliavini, F., Castellani, R.J., Perry, G., Smith, M.A. and Budka, H. (2002). Oxidative damage to nucleic acids in human prion disease. *Neurobiology of disease* 9, 275-281.
- Guentchev, M., Voigtlander, T., Haberler, C., Groschup, M.H. and Budka, H. (2000). Evidence for oxidative stress in experimental prion disease. *Neurobiology of disease* 7, 270-273.
- Gutierrez-Arcelus, M., Lappalainen, T., Montgomery, S.B., Buil, A., Ongen, H., Yurovsky, A., Bryois, J., Giger, T., Romano, L., Planchon, A., Falconnet, E., Bielser, D., Gagnebin, M., Padiou, I., Borel, C., Letourneau, A., Makrythanasis, P., Guipponi, M., Gehrig, C., Antonarakis, S.E. and Dermitzakis, E.T. (2013). Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation. *eLife* 2, e00523.
- Haigh, C.L., Drew, S.C., Boland, M.P., Masters, C.L., Barnham, K.J., Lawson, V.A. and Collins, S.J. (2009). Dominant roles of the polybasic proline motif and copper in the PrP23-89-mediated stress protection response. *Journal of cell science* 122, 1518-1528.
- Hashimshony, T., Zhang, J., Keshet, I., Bustin, M. and Cedar, H. (2003). The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nature genetics* 34, 187-192.
- Herman, J.G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J.R., Ahuja, N., Issa, J.P., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., Kane, M.F., Kolodner, R.D., Vogelstein, B., Kunkel, T.A. and Baylin, S.B. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1

- promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6870-6875.
- Herns, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N. and Kretzschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 8866-8875.
- Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N. and Shinagawa, M. (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *The Journal of general virology* 76 (Pt 10), 2583-2587.
- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R. and Candy, J.M. (1995a). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and biophysical research communications* 207, 621-629.
- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., Candy, J.M. and Lakey, J.H. (1995b). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 214, 993-999.
- Hunter, N. (2003). Scrapie and experimental BSE in sheep. *British medical bulletin* 66, 171-183.
- Illingworth, R.S. and Bird, A.P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters* 583, 1713-1720.
- Imamura, T., Ohgane, J., Ito, S., Ogawa, T., Hattori, N., Tanaka, S. and Shiota, K. (2001). CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics* 76, 117-125.

Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Shinagawa, M. (1997).

Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *The Journal of veterinary medical science* 59, 175-183.

Iso, T., Kedes, L. and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of cellular physiology* 194, 237-255.

Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R. and Collinge, J. (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8531-8535.

Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J.D., Nicoll, A.J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A.S., et al. Rudge, P., Collinge, J. and Brandner, S. (2015). Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 525, 247-250.

Jiang, M., Zhang, Y., Fei, J., Chang, X., Fan, W., Qian, X., Zhang, T. and Lu, D. (2010). Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 282-290.

Jobling, M.F., Stewart, L.R., White, A.R., McLean, C., Friedhuber, A., Maher, F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Barrow, C.J., Collins, S.J. and Cappai, R. (1999). The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106-126. *Journal of neurochemistry* 73, 1557-1565.

- Jones-Villeneuve, E.M., McBurney, M.W., Rogers, K.A. and Kalnins, V.I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of cell biology* *94*, 253-262.
- Jones, C.E., Abdelraheim, S.R., Brown, D.R. and Viles, J.H. (2004). Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein. *The Journal of biological chemistry* *279*, 32018-32027.
- Jones, P.A. (2002). DNA methylation and cancer. *Oncogene* *21*, 5358-5360.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics* *13*, 484-492.
- Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics* *3*, 415-428.
- Jowaed, A., Schmitt, I., Kaut, O. and Wullner, U. (2010). Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 6355-6359.
- Jucker, M. and Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* *501*, 45-51.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Kobayashi, T. (2008). Roles of Hes genes in neural development. *Development, growth & differentiation* *50 Suppl 1*, S97-103.
- Kaisho, T., Tsutsui, H., Tanaka, T., Tsujimura, T., Takeda, K., Kawai, T., Yoshida, N., Nakanishi, K. and Akira, S. (1999). Impairment of natural killer cytotoxic activity and

- interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *190*, 1573-1582.
- Kanaani, J., Prusiner, S.B., Diacovo, J., Baekkeskov, S. and Legname, G. (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *Journal of neurochemistry* *95*, 1373-1386.
- Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., Chen, L., Villemare, M., Ali, Z., Jirik, F.R. and Zamponi, G.W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The Journal of cell biology* *181*, 551-565.
- Kim, B.H., Lee, H.G., Choi, J.K., Kim, J.I., Choi, E.K., Carp, R.I. and Kim, Y.S. (2004). The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain research Molecular brain research* *124*, 40-50.
- Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Conte da Frota, M.L., Jr., Walz, R., Andrades, M.E., da Silva, E.G., Brentani, R.R., Izquierdo, I. and Fonseca Moreira, J.C. (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free radical biology & medicine* *30*, 1137-1144.
- Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S. and Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* *400*, 225-226.
- Lam, L.L., Emberly, E., Fraser, H.B., Neumann, S.M., Chen, E., Miller, G.E. and Kobor, M.S. (2012). Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109 Suppl 2*, 17253-17260.

- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (New York, NY)* 240, 1759-1764.
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W. and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128-1132.
- Lazarini, F., Deslys, J.P. and Dormont, D. (1991). Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. *Brain research Molecular brain research* 10, 343-346.
- Lee, K.J., Panzera, A., Rogawski, D., Greene, L.E. and Eisenberg, E. (2007). Cellular prion protein (PrPC) protects neuronal cells from the effect of huntingtin aggregation. *Journal of cell science* 120, 2663-2671.
- Lee, Y.J. and Baskakov, I.V. (2014). The cellular form of the prion protein guides the differentiation of human embryonic stem cells into neuron-, oligodendrocyte-, and astrocyte-committed lineages. *Prion* 8, 266-275.
- Leonhardt, H. and Cardoso, M.C. (2000). DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *Journal of cellular biochemistry Supplement* Suppl 35, 78-83.
- Liao, Y.C., Lebo, R.V., Clawson, G.A. and Smuckler, E.A. (1986). Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science (New York, NY)* 233, 364-367.
- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I. and Brentani, R.R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiological reviews* 88, 673-728.

- Link, A., Balaguer, F. and Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical pharmacology* 80, 1771-1792.
- Liu, T., Yi, W., Feng, B., Zhou, Z. and Xiao, G. (2013). IGF-1-induced enhancement of PRNP expression depends on the negative regulation of transcription factor FOXO3a. *PloS one* 8, e71896.
- Lo, R.Y., Shyu, W.C., Lin, S.Z., Wang, H.J., Chen, S.S. and Li, H. (2007). New molecular insights into cellular survival and stress responses: neuroprotective role of cellular prion protein (PrPC). *Molecular neurobiology* 35, 236-244.
- Lopez de Heredia, L. and Magoulas, C. (2013). Lack of the transcription factor C/EBPdelta impairs the intrinsic capacity of peripheral neurons for regeneration. *Experimental neurology* 239, 148-157.
- Lu, H., Liu, X., Deng, Y. and Qing, H. (2013). DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Frontiers in aging neuroscience* 5, 85.
- Lutzenberger, M., Burwinkel, M., Riemer, C., Bode, V. and Baier, M. (2015). Ablation of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta (C/EBPD): Increased Plaque Burden in a Murine Alzheimer's Disease Model. *PloS one* 10, e0134228.
- MacDonald, M.E., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Myers, R.H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S.A., James, M., Groot, N., et al. Datson, N., Shaw, D. and Harper, P.S. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.
- Mahal, S.P., Asante, E.A., Antoniou, M. and Collinge, J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 268, 105-114.

- Malaga-Trillo, E., Solis, G.P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., Thomanetz, V. and Stuermer, C.A. (2009). Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS biology* 7, e55.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S. and Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science (New York, NY)* 302, 871-874.
- Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G. and Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *The EMBO journal* 21, 202-210.
- Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y. and Lehmann, S. (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biology of the cell* 96, 125-132.
- Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H. and Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development (Cambridge, England)* 115, 117-122.
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P.D. and Rogers, J. (2010). Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiology of aging* 31, 2025-2037.
- Mathers, J.C., Strathdee, G. and Relton, C.L. (2010). Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. *Advances in genetics* 71, 3-39.
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A. and Sorice, M. (2004). Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS letters* 560, 14-18.

- Menke, R.A., Agosta, F., Grosskreutz, J., Filippi, M. and Turner, M.R. (2016). Neuroimaging Endpoints in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*.
- Milhavet, O. and Lehmann, S. (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain research Brain research reviews* 38, 328-339.
- Milhavet, O., McMahon, H.E., Rachidi, W., Nishida, N., Katamine, S., Mange, A., Arlotto, M., Casanova, D., Riondel, J., Favier, A. and Lehmann, S. (2000). Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13937-13942.
- Miranda, A., Pericuesta, E., Ramirez, M.A. and Gutierrez-Adan, A. (2011). Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PloS one* 6, e18422.
- Miura, T., Hori-i, A. and Takeuchi, H. (1996). Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS letters* 396, 248-252.
- Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J. and La Bonnardiere, C. (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *The Journal of general virology* 82, 2017-2024.
- Moya, K.L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J. and Di Giamberardino, L. (2000). Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microscopy research and technique* 50, 58-65.
- Nephew, K.P. and Huang, T.H. (2003). Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer letters* 190, 125-133.

- Norstrom, E.M. and Mastrianni, J.A. (2005). The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrP^{Sc}-PrP^C complex that leads to prion propagation. *The Journal of biological chemistry* *280*, 27236-27243.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. and Welssmann, C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* *40*, 735-746.
- Ong, C.T. and Corces, V.G. (2012). Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO reports* *13*, 423-430.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T. and Imagawa, M. (1996). DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *The Journal of biological chemistry* *271*, 3891-3896.
- Pan, K.M., Stahl, N. and Prusiner, S.B. (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein science: a publication of the Protein Society* *1*, 1343-1352.
- Parchi, P., Zou, W., Wang, W., Brown, P., Capellari, S., Ghetti, B., Kopp, N., Schulz-Schaeffer, W.J., Kretzschmar, H.A., Head, M.W., Ironside J.W., Gambetti, P. and Chen S.G. (2000). Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 10168-10172.
- Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., Baybutt, H.N., Turner, A.J. and Hooper, N.M. (2007). Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 11062-11067.

- Parkin, S.E., Baer, M., Copeland, T.D., Schwartz, R.C. and Johnson, P.F. (2002). Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (Ig/EBP). *The Journal of biological chemistry* 277, 23563-23572.
- Pena-Altamira, E., Polazzi, E., Moretto, E., Lauriola, M. and Monti, B. (2014). The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein beta protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis through its transcription-activating isoforms. *The European journal of neuroscience* 39, 176-185.
- Peralta, O.A., Huckle, W.R. and Eyestone, W.H. (2011). Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 81, 68-77.
- Peralta, O.A., Huckle, W.R. and Eyestone, W.H. (2012). Developmental expression of the cellular prion protein (PrP(C)) in bovine embryos. *Molecular reproduction and development* 79, 488-498.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13363-13383.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C. and Hood, L. (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *American journal of human genetics* 49, 320-329.
- Pulido-Salgado, M., Vidal-Taboada, J.M., and Saura, J. (2015). C/EBPbeta and C/EBPdelta transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Progress in neurobiology* 132, 1-33.
- Qin, K., Yang, D.S., Yang, Y., Chishti, M.A., Meng, L.J., Kretzschmar, H.A., Yip, C.M., Fraser, P.E. and Westaway, D. (2000). Copper(II)-induced conformational changes and

- protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. *The Journal of biological chemistry* 275, 19121-19131.
- Qiu, G.H., Salto-Tellez, M., Ross, J.A., Yeo, W., Cui, Y., Wheelhouse, N., Chen, G.G., Harrison, D., Lai, P., Tao, Q. and Hooi, S.C. (2008). The tumor suppressor gene DLEC1 is frequently silenced by DNA methylation in hepatocellular carcinoma and induces G1 arrest in cell cycle. *Journal of hepatology* 48, 433-441.
- Quaglio, E., Chiesa, R. and Harris, D.A. (2001). Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *The Journal of biological chemistry* 276, 11432-11438.
- Rachidi, W., Mange, A., Senator, A., Guiraud, P., Riondel, J., Benboubetra, M., Favier, A. and Lehmann, S. (2003). Prion infection impairs copper binding of cultured cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 14595-14598.
- Rakyan, V.K., Down, T.A., Thorne, N.P., Flicek, P., Kulesha, E., Graf, S., Tomazou, E.M., Backdahl, L., Johnson, N., Herberth, M., Howe, K.L., Jackson, D.K., Miretti, M.M., Fiegler, H., Marioni, J.C., Birney, E., Hubbard, T.J., Carter, N.P., Tavaré, S. and Beck, S. (2008). An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome research* 18, 1518-1529.
- Ramji, D.P. and Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical journal* 365, 561-575.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nature medicine* 3, 1383-1388.

- Roman, C., Platero, J.S., Shuman, J. and Calame, K. (1990). Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes & development* 4, 1404-1415.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C.G. and LeBlanc, A.C. (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *The Journal of biological chemistry* 278, 40877-40881.
- Saeki, K., Matsumoto, Y., Hirota, Y., Matsumoto, Y. and Onodera, T. (1996a). Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. *Virus genes* 12, 15-20.
- Saeki, K., Matsumoto, Y., Matsumoto, Y. and Onodera, T. (1996b). Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochemical and biophysical research communications* 219, 47-52.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. and Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.
- Sales, N., Hassig, R., Rodolfo, K., Di Giamberardino, L., Traiffort, E., Ruat, M., Fretier, P. and Moya, K.L. (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *The European journal of neuroscience* 15, 1163-1177.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., Ojala, J., Haapasalo, A., Soininen, H. and Hiltunen, M. (2013). Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Progress in neurobiology* 106-107, 33-54.

- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *The Journal of cell biology* *169*, 341-354.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes & development* *6*, 2620-2634.
- Saxonov, S., Berg, P. and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 1412-1417.
- Schapira, A.H., Olanow, C.W., Greenamyre, J.T. and Bevard, E. (2014). Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet (London, England)* *384*, 545-555.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M.A., Ball, H.L., Bradon, N., Bosque, P.J., Crossin, K.L., Edelman, G.M., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *Journal of molecular biology* *314*, 1209-1225.
- Schubeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature* *517*, 321-326.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* *81*, 741-766.

- Selkoe, D.J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M.B., Koo, E.H., Teplow, D.B. and Haass, C. (1996). The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 777, 57-64.
- Shi, F., Yang, Y., Wang, T., Kouadir, M., Zhao, D. and Hu, S. (2016). Cellular Prion Protein Promotes Neuronal Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Upregulating miRNA-124. *Journal of molecular neuroscience: MN* 59, 48-55.
- Shyng, S.L., Huber, M.T. and Harris, D.A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 268, 15922-15928.
- Shyu, W.C., Lin, S.Z., Chiang, M.F., Ding, D.C., Li, K.W., Chen, S.F., Yang, H.I. and Li, H. (2005). Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 8967-8977.
- Smethurst, P., Sidle, K.C. and Hardy, J. (2015). Review: Prion-like mechanisms of transactive response DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuropathology and applied neurobiology* 41, 578-597.
- Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., Dearmondii, S.J., Westaway, D., Prusiner, S.B. and Weiner, L.P. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7358-7362.
- Sproul, D. and Meehan, R.R. (2013). Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. *Briefings in functional genomics* 12, 174-190.

- Stadler, M.B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Scholer, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E.J., Gaidatzis, D., Tiwari, V.K. and Schübeler, D. (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* 480, 490-495.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.
- Stella, R., Massimino, M.L., Sorgato, M.C. and Bertoli, A. (2010). Prion and TNFalpha: TAC(E)it agreement between the prion protein and cell signaling. *Cell cycle* (Georgetown, Tex) 9, 4616-4621.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37, 7185-7193.
- Strohmeyer, R., Shelton, J., Loughheed, C. and Breitkopf, T. (2014). CCAAT-enhancer binding protein-beta expression and elevation in Alzheimer's disease and microglial cell cultures. *PLoS one* 9, e86617.
- Sugita, S., Hosaka, Y., Okada, K., Mori, D., Yano, F., Kobayashi, H., Taniguchi, Y., Mori, Y., Okuma, T., Chang, S.H., Kawata, M., Taketomi, S., Chikuda, H., Akiyama, H., Kageyama, R., Chung, U.I., Tanaka, S., Kawaguchi, H., Ohba, S. and Saito, T. (2015). Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3080-3085.
- Tabé, S., Hikiji, H., Ariyoshi, W., Hashidate-Yoshida, T., Shindou, H., Okinaga, T., Shimizu, T., Tominaga, K. and Nishihara, T. (2016). Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 1/membrane-bound O-acyltransferase 1 regulates morphology and

- function of P19C6 cell-derived neurons. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30, 2591-2601.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G., Salmona, M., Bugiani, O and Frangionet, B. (1993). Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9678-9682.
- Thomas, E.A. (2016). DNA methylation in Huntington's disease: Implications for transgenerational effects. *Neuroscience letters* 625, 34-39.
- Thomassin, H., Hamel, D., Bernier, D., Guertin, M. and Belanger, L. (1992). Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP beta and C/EBP gamma. *Nucleic acids research* 20, 3091-3098.
- Tichopad, A., Pfaffl, M.W. and Didier, A. (2003). Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Molecular and cellular probes* 17, 5-10.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2042-2047.

- Villar-Menendez, I., Blanch, M., Tyebji, S., Pereira-Veiga, T., Albasanz, J.L., Martin, M., Ferrer, I., Perez-Navarro, E. and Barrachina, M. (2013). Increased 5-methylcytosine and decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. *Neuromolecular medicine* 15, 295-309.
- Vincent, B., Paitel, E., Frobert, Y., Lehmann, S., Grassi, J. and Checler, F. (2000). Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *The Journal of biological chemistry* 275, 35612-35616.
- Vincent, B., Sunyach, C., Orzechowski, H.D., St George-Hyslop, P. and Checler, F. (2009). p53-Dependent transcriptional control of cellular prion by presenilins. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 6752-6760.
- Vinson, C. and Chatterjee, R. (2012). CG methylation. *Epigenomics* 4, 655-663.
- Walmsley, A.R., Watt, N.T., Taylor, D.R., Perera, W.S. and Hooper, N.M. (2009). alpha-cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. *Molecular and cellular neurosciences* 40, 242-248.
- Wang, C., Wu, R., Li, F.D., Liu, L., Zhang, X.L., Zhao, C.L., Diao, X.L. and Guan, H.W. (2011). Expression patterns of prion protein gene in differential genotypes sheep: quantification using molecular beacon real-time RT-PCR. *Virus genes* 42, 457-462.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics* 39, 457-466.

- Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G.A. and Prusiner, S.B. (1994a). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 6418-6422.
- Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C.M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A.L., Detwiler, L. and Prusiner, S.B. (1994b). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes & development* *8*, 959-969.
- White, A.R., Collins, S.J., Maher, F., Jobling, M.F., Stewart, L.R., Thyer, J.M., Beyreuther, K., Masters, C.L. and Cappai, R. (1999). Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *The American journal of pathology* *155*, 1723-1730.
- Wong, B.S., Brown, D.R., Pan, T., Whiteman, M., Liu, T., Bu, X., Li, R., Gambetti, P., Olesik, J., Rubenstein, R. and Sy, M.S. (2001a). Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *Journal of neurochemistry* *79*, 689-698.
- Wong, B.S., Liu, T., Li, R., Pan, T., Petersen, R.B., Smith, M.A., Gambetti, P., Perry, G., Manson, J.C., Brown, D.R. and Sy, M.S. (2001b). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *Journal of neurochemistry* *76*, 565-572.
- Wong, B.S., Venien-Bryan, C., Williamson, R.A., Burton, D.R., Gambetti, P., Sy, M.S., Brown, D.R. and Jones, I.M. (2000). Copper refolding of prion protein. *Biochemical and biophysical research communications* *276*, 1217-1224.

- Wright, J.A., McHugh, P.C., Stockbridge, M., Lane, S., Kralovicova, S. and Brown, D.R. (2009). Activation and repression of prion protein expression by key regions of intron 1. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66, 3809-3820.
- Wu, Z., Bucher, N.L. and Farmer, S.R. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Molecular and cellular biology* 16, 4128-4136.
- Yang, Y.X., Wood, N.W. and Latchman, D.S. (2009). Molecular basis of Parkinson's disease. *Neuroreport* 20, 150-156.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 145-150.
- Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., de Oliveira, E., Jachieri, S.G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R. and Martins, V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO journal* 21, 3307-3316.
- Zannetti, C., Bonnay, F., Takeshita, F., Parroche, P., Menetrier-Caux, C., Tommasino, M. and Hasan, U.A. (2010). C/EBP{delta} and STAT-1 are required for TLR8 transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 285, 34773-34780.

- Zeng, F., Watt, N.T., Walmsley, A.R. and Hooper, N.M. (2003). Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 84, 480-490.
- Zhang, Y.W., Thompson, R., Zhang, H. and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain* 4, 3.