

論文の内容の要旨

応用動物科専攻
平成10年度博士課程 進学
氏名： 青 再鉉
指導教官：塩田 邦郎

論文題目

DNA メチル化による胎盤性ラクトジェンの発現調節

背景

胎盤は妊娠期間特有の母体生理環境の維持や調節、また胎児の発育に重要な役割を担う器官で、母体と胎仔の双方に作用する種々のホルモン等を妊娠時期に応じて分泌している。げっ歯類の場合、胎盤の機能を担っている栄養膜細胞の中で、主に栄養膜巨細胞と海綿状栄養膜細胞が内分泌細胞として機能している。妊娠環境の維持は、主に、これらの細胞が分泌する胎盤性プロラクチン(PRL)ファミリーに属している複数の胎盤性ラクトジェン(PL)によると考えられている。これらの分子は、胎盤で妊娠時期に応じて発現しており、組織特異的および時期特異的な転写制御を受けていると考えられる。

当研究室において塩基配列が決定されたラット胎盤性ラクトジェン rPL-I は、妊娠中期に栄養膜巨細胞のみで発現している。一方、rPL-I と同じく PRL ファミリーに属している rPL-Iv は、rPL-I と cDNA の塩基配列で 90% 以上の相同性を持ちながらその発現時期が妊娠後期に特異的で、巨細胞と海綿状栄養膜細胞で発現する。この2つの遺伝子は、組織特異的および時期特異的な転写制御を研究する上で大変有用なモデルであると考えられる。

哺乳類では、ゲノム DNA を構成する 4 種類の塩基の中で、特に CpG 配列中のシトシンがメチル化されることが知られている。ゲノム DNA のメチル化は、遺伝子発現を制御する機構に関与していることが知られ、哺乳類の雌での片方の X 染色体の不活化や、発現するアレルが親の性に依存しているゲノムインプリンティングなどに関わり、高等動物の発生・分化の過程における遺伝子発現調節機構の一つとして重要である。特に組織特異的遺伝子では転写活性化と DNA のメチル化が一般に負に相関している。一方、正の転写制御はプロモーター、エンハンサーなどに結合する転写制御因子によって行われている。本研究では、PL の分子の転写調節について、シトシンメチル化による制御と転写因子の結合の双方の観点から組織特異的および時期特異的な転写調節機構を明らかにすることを試みた。

第一章 Cloning and characterization of the 5'-flanking region of rPL-I and rPL-Iv genes, and genomic structure of rPL-I gene.

RT-PCR によって胎盤を含む複数の臓器 (脳、心臓、腎臓、肝臓、筋、卵巣、下垂体、脾臓) における rPL-I および rPL-Iv の発現を確認した。ノザンプロットで検出されるレベルでは胎盤特異的であることが報告されているが、より微量の RNA も検出可能な RT-PCR においてもやはり rPL-I および rPL-Iv は胎盤でのみ検出され、この遺伝子は極めて厳密に組織特異的な転写制御を受けていることが明らかになった。次に、rPL-I のゲノム構造を調べた。翻訳開始コドンを含む 5' 末端および終止コドンを含む 3' 末端にそれぞれプライマーを設計し、ラットの腎臓から抽出したゲノム DNA を鋳型にして PCR を行ったところ、5.5 kb の断片を得ることができた。その断片を解析した結果、rPL-I 遺伝子は 5 つのエクソンおよび 4 つのイントロンからなっていることが分かった。得られた塩基配列をもとにプライマーを設計し、カセットライゲーション PCR 用、5' 上流側 3.5 kb の断片を得ることができた。rPL-Iv の場合は、ラット肝臓ゲノムライブラリーからスクリーニングし、翻訳開始点より上流 1.8 kb の塩基配列を決定した。興味深いことに、rPL-I および rPL-Iv 翻訳開始コドンの約 700 bp 上流域まではお互いに 85% の相同性があることが明らかになった。また、rPL-I および rPL-Iv の 5'-上流領域に特異的な領域をプローブにして、メチル化感受性酵素 (Hha I) を用いたサザンブロッティングを行い、それぞれの上流領域は組織特異的に非メチル化状態にあることが明らかになった。

第二章 DNA methylation regulates rat placental lactogen-I gene expression.

PL-I の転写制御に関しては、マウス PL-I では転写開始点から上流の 300 bp が必要で、AP-1 および GATA が関与していることが明らかにされている。しかし AP-1、GATA は共に胎盤特異的転写因子ではなく、これらの転写因子のみで rPL-I の胎盤特異的発現を説明することは困難である。そこで本章では、組織特異的な転写制御に深く関与していると予想される 5' 上流領域のメチル化について解析することにした。メチル化感受性の制限酵素である Hha I を用いた サザンブロッティングにより、rPL-I 上流-1279 の Hha I 部位が胎盤特異的に低メチル化状態にあることがわかった。さらに、その Hha I 部位を含む、上流 2.6 kb に含まれる 12ヶ所の CpG の胎盤、肝臓、脳下垂体におけるメチル化状態をメチル化されていないシトシン を特異的にウラシルに変換する方法である Bisulfite Genomic Sequencing 法により解析した。その結果、-1279 にある CpG (Hha I 部位) が胎盤特異的に非メチル化状態にあることが確認された。また、-189, -1181, -1309, -1790, -1807, -2309, -2348 にある CpG も胎盤特異的に低メチル化状態であることも明らかになった。

これらの CpG 配列を含む領域の、転写活性化における重要性を解析するために、翻訳開始点からそれぞれ 498bp、1069bp、1402bp、2445bp、および 3365bp 上流までの rPL-I 5' 上流域をもつルシフェラーゼ発現コンストラクト (-498Luc、-1069Luc、-1405Luc、-2445Luc および -3365Luc) を作成し、Rcho-1 細胞を用

いたルシフェラーゼアッセイを行った。Rcho-1 細胞はラット絨毛ガン由来細胞株で *in vitro* で栄養膜細胞に分化し rPL-I を発現するようになる。全てのコンストラクトが未分化 Rcho-1 よりも分化後の Rcho-1 でより高い活性を示したことから、少なくとも-498bp までの領域に分化依存的に rPL-I の発現を促進できるシスエレメントが存在することが明らかになった。また、-2445Luc は他に比べ分化依存的な発現促進活性が高く、rPL-I 遺伝子 5' 上流 1402 から 2445bp の間に、さらに転写を促進する部位が存在することが示唆された。

次に、rPL-I 遺伝子の発現制御へのメチル化の関与を調べるために、-498Luc、-2445Luc および -3365Luc をそれぞれ *in vitro* でメチル化し、Rcho-1 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。-498Luc ではメチル化による転写活性への影響が無かったのに対し、-2445Luc、-3365Luc ではメチル化によって発現が有意に抑制された。よって、-498 よりも上流の脱メチル化が rPL-I の転写の活性化に重要だと考えられた。この結果は、サザンブロッティングおよび Bisulfite sequence により得られた結果とよく一致する。

メチル化した-2445Luc あるいは-3365Luc と共に、Methylcytosine-binding protein2 (MeCP2) の発現ベクターを強制発現させると、これらの発現はさらに抑制された。この時、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の TSA で細胞を処理すると、転写活性の回復が見られた。

結論

これらの結果より、rPL-I 遺伝子の 5' 上流域は、発現している胎盤では低メチル化状態にあり、発現していない他の組織ではメチル化されていることを証明した。そして、rPL-I 遺伝子の 5' 上流域のメチル化は MeCP2 結合とヒストン脱アセチル化を介して、rPL-I の発現を抑制していることが示唆された。以上、本研究では rPL-I 及び rPL-Iv 遺伝子の組織特異的転写制御にメチル化が関与していることを明らかにした。