

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 徐 寧淳

論文題目 Coactivator in the regulation of interferon-tau gene transcription

(Interferon-tau 遺伝子発現制御における coactivator の関与)

生命の誕生が受精により始まると言われているが、哺乳類においては約半数の受精卵が着床期に死に至ることが知られている。したがって、着床の成否が妊娠成立に重要な役割を持っていると考えられる。着床成立には母親が胚仔の存在を認識する、いわゆる母体の妊娠認識が必要とされる。反芻動物において、胚の栄養膜細胞から時期特異的に盛んに分泌される Interferon-tau (IFN τ)が妊娠認識に働く事が知られている。IFN τ は子宮上皮細胞上のレセプターと結合し、子宮内膜のプロスタグランジン F2 α の産生・分泌を抑制する事により、黄体の退行を阻止し、母体は妊娠維持に必要な不可欠なホルモン（プロゲステロン）を産生し続けることが可能となる。IFN τ の発現調節機構を解明する事は、反芻動物における着床現象を理解する上で、非常に重要であると考えられる。

IFN τ は他の IFN (α , β , ω)と同様に抗ウイルス活性、細胞増殖抑制作用、免疫抑制作用などを有するが、その発現様式は他の IFN と異なり、ウイルスや二本鎖 RNA では誘導されず、発現は一週間以上にも及ぶ。ヒツジの場合、受精した胚は、妊娠 12 日目から伸長を開始し、それと同時に IFN τ を分泌始める。胚の伸長とともに IFN τ の分泌量も増加し、胚の栄養膜細胞と子宮上皮の接着が始まる 16 日目に最大量に達するが、16 日目以降、その分泌量は減少し、胎盤形成が始まる 22 日目以降には検出できなくなる。以上のような時期特異的な発現のパターンを解析する目的で、IFN τ 遺伝子上流域解析が行われており、これまで IFN τ 遺伝子上流域においていくつかの転写因子結合領域が発見・同定されている。本研究で、より詳細な IFN τ 遺伝子発現様式を解明する目的で、転写因子 AP-1、Ets-2 とコアクチベーターとして知られる CBP/p300 に注目し、IFN τ 遺伝子転写機構の解析を行っ

た。

本論文は二章により構成され、第一章は IFN τ 遺伝子発現に関与する事が知られている転写因子、AP-1、Ets-2 の結合領域を同定し、子宮内で発現の高い IFN τ 遺伝子と低い遺伝子の発現制御の差異を明らかにしようとした。第二章では、AP-1 や Ets-2 の転写因子を結ぶことが考えられるコアクチベーター (CBP/p 300) の関与を検討し、IFN τ 遺伝子発現制御機構を明らかにしようとした。

ヒツジ IFN τ (oIFN τ o10) 遺伝子上流域 654 ベースを挿入したレポーター (ルシフェラーゼ) プラスミドを、ヒト絨毛性ガン細胞 JEG3 に導入することにより、oIFN τ o10 の転写活性を測定した。転写因子 c-Jun と Ets-2 の共発現により、oIFN τ o10 の転写活性が上昇することが確認した。また、IFN τ o10 の AP-1 や Ets-2 サイトにミューテーションを加えることでその転写活性は減少し、c-Jun と Ets-2 を共生発現させても転写活性の上昇は認められなかった。以上により、c-Jun と Ets-2 は oIFN τ o10 遺伝子上流域に存在する結合サイト、AP-1、Ets-2 を介して、oIFN τ o10 遺伝子の発現を上昇させることが示された。また、oIFN τ には 10 種類以上の遺伝子が同定されているが、個々の遺伝子の発現は一樣ではない。これらのうち、最も発現の高い oIFN τ 遺伝子 o10 と発現の非常に弱い o8 遺伝子にも、それぞれの上流域には AP-1 結合サイトが共通して存在する。一方、o10 の上流域には Ets-2 結合サイトが存在するが、他の遺伝子群には Ets-2 サイトが存在しないことが知られている。各々の遺伝子の Ets-2 結合サイトを含む配列を交換した oIFN τ レポーター・プラスミドの転写活性を測定することによって、Ets-2 周辺 23 塩基の配列が oIFN τ 遺伝子発現に重要であることが分かった。以上のことから、転写因子 AP-1 が働くには Ets-2 が必要であり、AP-1 と Ets-2 が相互作用をすることで oIFN τ 遺伝子の転写活性を上昇させる可能性が示唆された。また、c-Jun と Ets-2 のタンパク質の存在を、妊娠 1 日目から分離したヒツジ栄養膜細胞、ウシ栄養膜細胞株 BT-1、シバヤギ栄養膜細胞株 HTS1 と JEG3 を用いてウエスタンブロット法で解析したところ、c-Jun はすべての細胞に存在し、Ets-2 は HTS1 に存在しないことから、Ets-2 の発現は IFN τ の時期特異的な発現に関与する可能性を示した。

また、oIFN τ 遺伝子プロモーターやエンハンサーは同定されつつあるが、その間に位置

するコアクチベーターに関する知見はない。コアクチベーターはエンハンサー配列結合因子(AP-1、 Ets-2 など)と基本転写因子(Pol II、 TBP2 など)を結ぶ、転写開始複合体形成の安定化に関与していると考えられる。最近コアクチベーターCBP と p300 は histone acetyltransferase (HAT)活性を持つことが分かってきた。HAT により、chromatin の構造を緩め、転写因子が DNA に接触・結合しやすくなることが知られている。本研究では、コアクチベーターCBP と p300 を解析し、IFN τ 遺伝子の転写機構の解明を試みた。CBP 発現ベクターとともに oIFN τ レポーター・プラスミドを JEG-3 細胞に導入すると転写活性が増加し、CBP 抑制作用を持つ Adenovirus 12S E1A を投与すると転写活性が低下することより、oIFN τ 遺伝子の発現には CBP が関与していることが示唆された。また、CBP と c-jun と Ets-2 の方が転写活性を最も上げることが観察された。CBP は AP-1 と Ets-2 サイトを改変した oIFN τ レポーター・プラスミドを同時に JEG-3 細胞に導入しても転写活性が上昇しないことから、コアクチベーターCBP は AP-1 と Ets-2 サイトを介して IFN τ 遺伝子の発現に関与していることが示唆された。JEG3 細胞の核タンパク質を用い、免疫沈澱を行ったところ、CBP と c-Jun、CBP と Ets-2 の複合体を検出された。ヒツジ栄養膜細胞に JEG3 細胞と同様に CBP、c-Jun と Ets-2 タンパク質が発現されていることから、JEG3 細胞より得られた結果は実際 *in vivo* の状況を反映されることが考えられる。また組織免疫の結果により、CBP は細胞核内に存在していることが分かった。以上のことから、IFN τ の発現が盛んな時期にコアクチベーターCBP と転写因子 c-Jun、Ets-2 とが複合体を形成し、その協同作用で IFN τ 遺伝子の発現を上昇することが示唆された。一方、CBP と高い相同性を持つ p300 は単独で oIFN τ レポーター・プラスミドの転写活性を上げることができたが、c-jun を過剰発現された場合、活性はさらに上がらなかったことより、これ以上の解析を行わなかった。

これまでの知見から IFN τ の発現開始から中止するまで、この遺伝子は negative と positive 両方の制御を受けていると考えられる。Ets-2 は *in vitro* で DNA との結合が非常に低いのに対し、*in vivo* で遺伝子の発現を活性化することできることから、Ets-2 は *in vivo* で他の因子により活性化されることを示された。また、c-Jun のリン酸化は CBP との結合に重要であることを知られている。子宮が分泌する GM-CSF、IL-3 因子は胚仔 IFN τ の発現を増加するこ

とも報告されている。以上の知見から、CBP/c-Jun/Ets-2 複合体は母体側の因子による影響されている可能性を示した。一方、TGFβの処理によって、Ets-1/p300 複合体を解離されると報告されている。実際、胚のトロホブラスト細胞は TGFβを分泌することができ、子宮内では IFN τ の分泌が減少し始める時期から胚による TGFβの分泌が盛んになる。TGFβは IFN τ 遺伝子発現の negative control する因子として機能する可能性も示唆された。

以上のことから、私は IFN τ 遺伝子の転写機構を以下のように解釈する：IFN τ 遺伝子発現開始になる時期に、Ets-2 は低い活性で DNA と結合し、少量の IFN τ を産生する。その後、子宮の因子により、c-Jun がリン酸化され、CBP と結合し、CBP/c-Jun/Ets-2 複合体を完成する。CBP の recruitment 作用により、IFN τ の転写活性がさらに上がる。その後、TGFβにより、Ets-2 は CBP/c-Jun/Ets-2 複合体から分離され、IFN τ 遺伝子の転写が低下する。本研究は、IFN τ 遺伝子の発現制御機構を新しい視点から解析したことになり、IFN τ 遺伝子の転写制御に一步も二歩も近づいたことになる。

以上、本研究は妊娠・着床に必須な因子とされる IFN τ 遺伝子発現制御機構を、学際的な研究視座から精微な考察と緻密な実験手法により解析し、丹念なデータ処理に基づき新しい知見を提示したもので、公表論文や投稿予定論文にみられるように学術上、貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。