

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 14 年度博士課程進学
氏 名 吉村公宏
指導教員 加藤茂明

論文題目 WSTF (Williams syndrome transcription factor) の生体内高次機能の解析

1.はじめに

発生・分化を始めとするあらゆる生命現象は、無数の遺伝子の時期・組織特異的な発現調節を介し達成される。これら遺伝子群の発現調節は、各種転写因子群が標的遺伝子上流プロモーター上の特異的配列に結合し、基本転写因子複合体を転写開始領域にリクルートすることで開始される。しかし、遺伝子をコードする染色体 DNA は通常高次のクロマチン構造を形成し凝集した状態をとり、転写因子が結合できない。そのため転写因子が特異的 DNA 配列を認識し結合するためにはヌクレオソーム配列の弛緩が必要であり、その際ヌクレオソーム配列の再構成能を有するクロマチンリモデリング複合体群との会合が必須となる。クロマチンリモデリング複合体群は、ATP 依存的にクロマチンを再構成して弛緩した状態を形成することにより標的遺伝子近傍の DNA を露出させ、転写因子が直接エンハンサー上に結合しやすい状態をつくる。

我々はリガンド依存性転写因子であり核内レセプタースーパーファミリーに属するビタミン D レセプター (VDR) とリガンド非依存的に会合する新規クロマチンリモデリング複合体として WINAC (WSTF including nucleosome assembly complex) 複合体を単離した。WINAC は Brg1/Brm・WSTF・BAF250・BAF170・BAF155・BAF60a・BAF57・BAF53・Ini1・FACT p140・CAF-1 p150 より構成され、その中で VDR と直接相互作用する因子として WSTF (Williams syndrome transcription factor) が同定された。WSTF は Williams syndrome と称される常染色体優性の遺伝病で欠失する染色体 7 番 q11.23 のおよそ 1.6Mbp 領域に存在する約 20 個の遺伝子のひとつである。Williams syndrome の表現型は、妖精様顔貌・心血管奇形・精神遅滞・成長障害・生下時の一過的な血清 Ca 濃度の上昇など多様である。欠失領域中に多数の遺伝子が存在するものの、これら多様な変異を説明できる遺伝子の同定には至っていなかった。

これまでに *in vitro* 実験系により、WINAC 複合体が VDR の転写調節を介してビタミン D 代謝・Ca 代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されてきた。しかし、実際の個体の発生・恒常性の維持における WINAC 複合体の重要性の解明には、遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの解析

が必須の課題であった。また、クロマチンリモデリング複合体はそれぞれが特異的な機能を担っていることと示唆されているものの、これら複合体を生体内で使い分ける分子機構の詳細は不明であった。

そこで、本研究では WINAC 複合体の生体内機能を解析することにより個々のクロマチンリモデリング複合体の特異的な機能を解明し、さらに Williams syndrome におけるクロマチンリモデリング異常の寄与を検討するために WINAC 複合体の主要構成因子である *WSTF* 遺伝子欠損マウスを作成し、その変異を詳細に解析した。

2. *WSTF* 遺伝子欠損マウスの作製

WSTF がノム領域を含む BAC クローンの塩基配列をもとに *WSTF* 遺伝子のエクソン・イントロン構造を決定し、翻訳開始点を含むエクソン 1 を欠失させる置換型のターゲティングベクターを構築した。このベクターを TT2 ES 細胞株にエレクトロポレーション法により導入し、サザンブロット法にて相同組み換え体を同定した。得られた相同組み換え体をアグリゲーション法により CD-1 マウス 8 細胞期胚に導入し、キメラマウスを作製した。このキメラ個体と C57BL/6J マウスの交配から *WSTF*^{+/+} マウスを得、*WSTF*^{+/+} マウス同士の交配により *WSTF*^{-/-} マウスを得た。

3. *WSTF* は心臓の形成と神経堤細胞の機能に必須である

WSTF^{-/-} マウスはメンデルの法則通り出生したものの生後 2 日目までに全個体が死亡した。死因として想定される新生児心臓の組織学的な検討を行ったところ、*WSTF*^{-/-} マウスは心室中隔欠損・心房中隔欠損など Williams syndrome でも観察される異常を示した。これら心奇形は既に胎生 9.5 日目において観察され、さらに *WSTF*^{+/+} マウス個体の一部にも同様の異常がみられた。そこで胎生 9.5 日目の胎児心臓における心臓形成に必要なマーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法・WISH 法にて検討した。その結果、心室の内部を構成する trabeculation (肉柱) のマーカー遺伝子である *Irx3* と、刺激伝導系のマーカー遺伝子である *Connexin40* (*Cx40*) の発現が *WSTF*^{+/+} マウスでも顕著に低下し、*WSTF*^{-/-} マウスではほとんど消失していた。一方これら遺伝子発現を制御する転写因子である *Nkx2.5*・*Gata4*・*Tbx5* の発現には各遺伝子型のマウス間で差は見られなかった。以上の結果より、心臓特異的な遺伝子発現を制御する転写因子に対する *WSTF* の転写調節機能の破綻が示唆された。

また、*WSTF*^{-/-} 新生児マウスは神経堤細胞の変異により引き起こされる発生異常、すなわち大動脈縮窄や胸腺の萎縮を示した。そこで、神経堤細胞の発生に関与するマーカー遺伝子の発現を WISH 法にて解析した。その結果、神経堤細胞の発生及び移動に寄与するマーカー遺伝子の発現は正常であったものの、移動後の神経堤細胞の機能に必須である *Endothelin converting enzyme* (*Ece1*) の発現が *WSTF*^{-/-} マウスで顕著に低下していた。一方、*Ece1* の発現を制御している *Gata2*・*Ets-1* の発現には各遺伝子型のマウス間で差は見られなかった。以上の結果より、心臓と同様に神経堤細胞においても、*WSTF* が転写因子の機能調節を行っていることが示唆された。

4. *WSTF* ならびに WINAC 複合体は組織特異的な転写因子の転写調節を行っている

心臓形成と神経堤細胞において発現低下が見られた遺伝子群の *WSTF* による転写調節機構を

分子レベルで詳細に解析した。まず、+/+及び-/-各個体から Mouse embryonic fibroblast (MEF) を調整し、*Cx40* promoter を用いて Nkx2.5・Gata4・Tbx5 の転写活性化能をレポーターアッセイにて検討した。その結果いずれの転写因子においても、-/-MEF では+/+MEF に比べて転写活性が低下していることが明らかになった。また、この転写活性の低下は WSTF または Brg1 を強制発現させると回復した。*Ece1c* promoter でも同様に Gata2・Ets-1 の転写活性が低下していた。

次に、WSTF と前述の各転写因子群との相互作用を免疫沈降法にて検討した。その結果 WSTF と5種の転写因子それぞれとの相互作用が確認された。また、直接的な相互作用を GST pull down 法を用いて検討し、WSTF は Nkx2.5・Tbx5 とは直接相互作用するが、Gata4・Gata2・Ets-1 とは直接結合しないことを見出した。

さらに、WSTF を始めとする WINAC 構成因子と、各種転写因子群の *Cx40* promoter 上へのリクルート状況を、+/+及び-/-の新生児心臓を用いた *in vivo* クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)にて検討した。その結果、+/+の心臓では、転写因子である Nkx2.5・Gata4・Tbx5 と WSTF が WINAC 構成因子とともにリクルートされていることが明らかになった。一方-/-の心臓では WSTF のリクルートが消失すると共に、WINAC 構成因子と転写因子群のリクルートも弱まっていた。また、クロマチンの転写活性化状態の指標である、ヒストン H3 のアセチル化とヒストン H3K4 のジメチル化は、+/+と比較して-/-の心臓で顕著に減少していた。以上の結果より、WSTF は WINAC 複合体を特異的な転写因子とともに標的遺伝子プロモーター上にリクルートし、その遺伝子の転写を調節していることが明らかになった。

5. 考察

本研究では *WSTF* 遺伝子欠損マウスを作出し、その変異を解析することにより、クロマチンリモデリング複合体の発生過程における生体内機能を解析し、さらに Williams syndrome とクロマチンリモデリング異常との関係性の解明を試みた。

WINAC複合体の生体内機能

作出された *WSTF*^{-/-} マウスは生後まもなく致死となることが判明し、この要因として胎生期における心臓及び心大血管の形成異常が寄与することが示唆された。WSTFは個体の発生、とりわけ心臓形成に必須の因子であったことから、WSTFを上流とした転写カスケードはVDRとはクラス異なる転写因子、すなわち心臓形成においてはNkx2.5・Tbx5・Gata4、心大血管形成においてはEts-1・Gata2 に作用し、それぞれの標的遺伝子である*Cx40* と*Ece1* を組織特異的に制御していることが明らかとなった。また、WSTF欠損は心筋細胞系の分化、増殖のみならず心臓神経堤細胞にも影響を及ぼしたことから、WSTFはCell lineageの異なる2種の細胞譜系を制御することで正常な心臓形成を促していると考えられる。

WSTFとWilliams syndromeとの相関

これまで、Williams syndromeの心臓疾患においては大動脈弁上狭窄の原因遺伝子として *Elastin* が報告されてきた。しかし、*Elastin* 遺伝子単独ではWilliams syndromeでみられる多様な心臓疾患は説明がつかず、さらに他の症状を担う責任遺伝子も未同定であった。*WSTF*^{-/-} マウス及び *WSTF*^{+/-} マウスはWilliams syndromeで発症する大動脈弁上狭窄を除く心血管奇形を呈した。これに加え、*WSTF*^{-/-} マウスはさらに重篤な心奇形を示し致死となることが明らかとなった。

したがって、これらの結果から *WSTF* が Williams syndrome におけるこれまで未同定であった心臓疾患の責任遺伝子であること、さらに未だ報告のない Williams syndrome ホモ接合体は致死である可能性が示唆された。また、*WSTF* 遺伝子欠損マウスは心臓神経堤細胞の異常に起因する心奇形を示した。これら異常は、神経堤細胞の異常が原因である遺伝病 DiGeorge syndrome の心大血管における表現型とも極めて類似していた。つまり、*WSTF* は Williams syndrome と DiGeorge syndrome をまたぐ心臓発生に極めて重要なクロマチンリモデリング因子といえる。したがって、Williams syndrome 心臓疾患はクロマチンリモデリング因子の機能破綻により引き起こされるクロマチンリモデリング病の最初の症例と捉えることができる。

WSTF は生存必須因子であったことから、成体における *WSTF* の役割は未解明のままである。Williams syndrome では精神遅滞と同時に特殊な神経機能が観察されることから、今後の課題として、*WSTF*^{+/−} マウスにおける脳神経機能の解析、さらに Cre/loxP system を用いた時期組織特異的 *WSTF* 遺伝子欠損マウスの作出、解析が必要と考える。

クロマチンリモデリング複合体群のサブクラス特異的生体内機能

WINAC 複合体を始めとする SWI/SNF 型クロマチンリモデリング複合体群は、ほぼ同一の因子群により構成されている。しかし *WSTF* 遺伝子欠損マウスは、クロマチンリモデリング複合体構成因子である *BAF60c* または *BAF180* 遺伝子欠損マウスと同様に心臓に異常を示したものの、それぞれ異なる表現型を示した。したがって、クロマチンリモデリング複合体群は構成因子の一部を使い分けることで独自の機能発現を可能にしていると思われる。このように、*WSTF* 遺伝子欠損マウスの作出により、器官形成におけるクロマチンリモデリング因子が標的とする特異的な転写因子とその標的遺伝子が同定され、時期組織特異的なクロマチンリモデリング転写調節機序の一端が解明された。

以上、本研究ではクロマチンリモデリング複合体である WINAC が心臓形成・神経堤細胞の機能に必須であり、この機能調節が転写制御レベルで行われていることを明らかにし、長く不明であったクロマチンリモデリング複合体の発生における生体内高次機能の一端を解明した。

参考文献

1. Yoshimura K. *et al.* Post-migratory cardiac neural crest cells and developing heart require Williams Syndrome Transcription Factor (*WSTF*), submitted
2. Fujiki R., Kim M., Sasaki Y., Yoshimura K. *et al.* Ligand-induced transrepression by VDR through association of *WSTF* with acetylated histones, *EMBO J.*, in press
3. Kitagawa H., Fujiki R., Yoshimura K. *et al.* The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome, *Cell* 113(7):905-17, 2003