

論文の内容の要旨

論文題目 Activation Mechanism of Mouse Endogenous Retrotransposon ETn in Embryonic Stem Cells

和訳 マウス内在性レトロトランスポゾン ETn の未分化 ES 細胞における
転写活性化機構の解析

指導教員 吉田進昭教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 古谷（小見） 美央

[背景]

ヒトゲノム計画の終了に伴い、われわれのゲノムは大半がリピート配列によって占められていることが明らかとなった。ヒトではゲノムの 45% がレトロトランスポゾン由来の配列であり、タンパクをコードする「遺伝子領域」は 2% 以下にすぎない。このことから、それまで「ジャンク DNA」とよばれてきた非遺伝子領域が近年着目されるようになり、non-coding RNA や miRNA など、タンパクに翻訳されることなく機能をもつ様々な RNA の存在が確認された。

レトロトランスポゾンは、哺乳類ゲノム中に多く散在するレトロウイルス様の構造をもつエレメントである。その転移様式は転写産物が逆転写されゲノム中に挿入されるというコピーアンドペースト型であり、コピー数は転移するごとに増大していく。その転移様式については研究が進んでいるが、レトロトランスポゾン配列の存在意義についてはほとんどわかっていない。

しかし、近年レトロトランスポゾン的一种である LINE-1 (L1) の転写産物がマウスの初期発生において重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、L1 の発現を抑制した癌細胞では増殖や分化能が低下すること、あるいはマウス発生過程で臓器特異的にクロマチドメインとして機能する SINE-B2 エレメントの存在など、レトロトランスポゾン配列が細胞の性質や機能に影響している例がいくつか報告されている。

ES (Embryonic Stem: 胚性幹) 細胞は、将来個体を形成するあらゆる種類の細胞に分化する能力を有した細胞である。その多分化能という特異な性質を ES 細胞に与える要素を

明らかにするために、アレイを用いた網羅的な遺伝子発現プロファイリングがなされてきたが共通解は得られず、ES 細胞が非常に雑多な遺伝子群を発現させていることが浮き彫りとなった。

最近、ヒトやマウス ES 細胞においてレトロトランスポゾンが活性化されていることがわかってきているが、その活性化機構や ES 細胞の性質との関連は不明である。マウス内在性レトロトランスポゾン ETn はマウスゲノムの全染色体に散在し、発生初期および ES 細胞など未分化細胞において特異的に発現する non-coding の LTR 型レトロトランスポゾンである。その活性化機構については Sp1/Sp3 の関わりが報告されたが、それらの因子はユビキタスに発現するものであり、発現制御を担う未分化細胞特異的な別の因子の存在が想定されていた。本論文では ETn の未分化細胞特異的転写制御機構の解明を試みた。

[結果]

1) 未分化細胞における ETn の発現

マウス未分化 ES 細胞と、レチノイン酸投与により 5 日間分化誘導した ES 細胞との mRNA を differential plaque hybridization により比較し、レトロトランスポゾン ETn が未分化細胞でのみ活発に転写されていることを確認した。分化細胞や 5 週齢マウスの臓器においては ETn の転写はほとんど検出されなかった。また、核および細胞質から調製した RNA を用いたノザンブロットティングにより、ETn の mRNA は細胞質のみならず核内にも蓄積していることを見出した。

2) ETn 転写活性化を担うシスエレメントの同定

レポータージーンアッセイを用いて、ETn の 5' LTR 内に存在するプロモーターが未分化 ES 細胞特異的に機能することを明らかにした。LTR 内をさまざまに欠失させたレポーターを用いて、転写に特に重要な 30 bp の領域を同定した (del2-3 領域とよぶ)。bisulfite assay の結果から、ETn のプロモーター領域の CpG のメチル化パターンは未分化・分化で変化しないことを明らかにした。

3) ETn の転写活性化因子の同定

未分化 ES 細胞・分化 ES 細胞の核抽出物を用いたゲルシフトアッセイで、del2-3 領域に未分化細胞特異的な DNA 結合活性が存在することを見出した。サイズ分画により、この結合活性を与える因子の分子量をおよそ 75-100 kDa であると推定した。

del2-3 の配列および結合タンパクの分子量から、結合する因子が CTCF とそのパラログ BORIS であると予想し、CTCF と BORIS の未分化 ES 細胞での発現をウエスタンブロットティングおよびノザンブロットティングにより解析した。CTCF の発現は ES 細胞の 5 日間の分化誘導とともに減少し、BORIS は未分化 ES 細胞でのみ mRNA が確認された。

まず、通常 ETn を発現しない NIH 3T3 細胞に BORIS の発現ベクターを導入するこ

とで、ETn レポーターの転写活性が上昇することを見出した。その細胞から調製した核抽出物において、del2-3 領域で見られる DNA 結合活性が増加することを明らかにした。また、NIH 3T3 細胞に BORIS および CTCF 発現ベクターを導入しレポーター ジーンアッセイをおこなうと、BORIS 単独および CTCF 単独と比べ、BORIS と CTCF を同時に発現させた細胞でレポーターの活性が上昇することがわかった。

次に、BORIS および CTCF の抑制が ETn の発現に与える影響を、shRNA を用いて検証した。レトロウイルスベクターを用いてそれぞれの shRNA を ES 細胞に感染させた。感染させた細胞から RNA を調製し、ノザンブロットィングで ETn の mRNA を検出したところ、shRNA によって CTCF と BORIS を同時に抑制したときに ETn の mRNA が 30%程度減少することを明らかにした。

293T 細胞に HA タグ付加 BORIS および CTCF を発現させ、coimmunoprecipitation を試みた。抗 HA 抗体による免疫沈降で CTCF が沈降物に含まれることが明らかになり、BORIS と CTCF がともに発現している状態では両者が複合体を作る可能性が示唆された。さらに、抗 CTCF 抗体を用いてクロマチン免疫沈降をおこない、未分化 ES 細胞において、CTCF が del2-3 領域に結合していることを示した。

[考察]

本論文では、これまで Sp1/Sp3 というユビキタスに発現する因子の関与のみが明らかにされていたマウス内在性レトロトランスポゾン ETn の未分化細胞特異的な転写活性化因子として、CTCF と BORIS を同定した。また、これまで排他的な発現パターンを示すといわれてきた CTCF と BORIS が ES 細胞においてはともに発現しているということを明らかにした。CTCF はインシュレーター因子として知られ、がん抑制遺伝子であると考えられている。BORIS は CTCF が発現していない精巣細胞およびがん組織において発現がみられることから癌精巣遺伝子といわれている。これら二つの因子が同時に発現する状態は通常の細胞ではみられず、ES 細胞特異的な性質であるともいえる。

また、NIH 3T3 に CTCF と BORIS をコトランスフェクションしたレポーター遺伝子アッセイにより、BORIS および CTCF は単独でも ETn のプロモーターを活性化させることができるが、両方発現させた場合に転写活性化能が高いことが明らかとなった。このことから、BORIS と CTCF がともに発現している状態の ES 細胞では、両者が協調して ETn のプロモーターを活性化させていると考えられる。BORIS と CTCF の shRNA を ES 細胞に感染させた実験においても、BORIS のみ、あるいは CTCF のみに対する shRNA を導入した場合より、双方に対する shRNA を同時に導入した ES 細胞において ETn の mRNA 量はより大きく減少していた。この結果からも CTCF と BORIS 両方の存在が ETn の転写活性化にとって重要であることが示唆される。

293T 細胞に強制発現させて免疫沈降をおこなった結果、BORIS と CTCF は共に発現している状態では相互作用するという結果を得た。さらにクロマチン免疫沈降により、

未分化 ES 細胞において CTCF が ETn プロモーター領域に結合することが示された。CTCF が ETn プロモーターに直接結合しているかについては今後検討すべき課題である。

BORIS は PRMT7 というヒストン修飾酵素をターゲット上にリクルートすることが知られており、ETn の LTR 上にも同様にそのような因子を引き込み、ゲノムワイドにヒストンの修飾状態を変化させている可能性も考えられる。興味深いことに、ETn の mRNA は細胞質だけでなく核内にも存在することが本論文により明らかとなった。核内に存在する ETn mRNA の役割は不明であるが、ETn の核内 mRNA が細胞の分化に伴うヒストン修飾のガイドとして働くことなどが考えられる。今後、DNA 配列としての ETn エlement がゲノム内で持つ役割や、核内 RNA としての ETn の転写産物の機能について研究を進めることで、これまでわからなかった内在性レトロトランスポゾン の存在意義についての理解が深まることが期待される。