

## [課程一 2]

### 審査の結果の要旨

氏名 古谷（小見） 美央

本研究は未分化細胞に特徴的なゲノム動態を探索する過程で単離された、未分化細胞特異的に活発に転写されているレトロトランスポゾン配列 ETn の転写活性化機構を明らかにするため、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）内で機能する ETn プロモーター内のシスエレメント、およびそこに結合する転写活性化因子の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 未分化状態のマウス ES 細胞で発現する遺伝子を Differential Plaque Hybridization の手法を用いて探索し、未分化因子として知られる Rex-2 および Ribosomal Protein S6、Prdx1、ETn の 4 つの遺伝子を得た。ETn はゲノム内に数百コピーが散在するマウス内在性レトロトランスポゾンであり、E14.1、R1、D3 などの異なる ES 細胞株、およびマウス胚性腫瘍細胞（EC 細胞）F9 で同様に活発に転写されていた。生後 5 週齢のマウスの臓器においては、骨髄、胸腺、脳、脾臓でわずかに ETn の mRNA が検出された以外発現は確認されず、ETn の発現は未分化状態の細胞に限られていることが示唆された。
2. ETn のプロモーター活性を未分化 ES 細胞（UD）および 5 日間のレチノイン酸添加による分化誘導をおこなった分化 ES 細胞（D）でレポーター遺伝子アッセイを用いて調べたところ、UD でプロモーターは活性化されており、D でその活性は著しく低下した。ゲノム内の ETn プロモーター領域の DNA メチル化状態は 5 日間の分化誘導で変化しないことを bisulfite 法にて示した。このことから、ES 細胞の分化誘導に伴う ETn プロモーター活性の低下は、プロモーター上のメチル化状態の変化によるものではないことが示された。
3. UD 特異的に機能する ETn のシスエレメントを、ゲルシフトアッセイとレポーター遺伝子アッセイを用いて探索した。UD と D 由来の核抽出物を用いて ETn のプロモーター領域に対するゲルシフトアッセイをおこなった結果、ETn LTR のプロモーター領域内の 30 塩基対の部位（del2-3）に UD 特異的に因子が結合することを明らかにした。レポーター遺伝子アッセイにより、del2-3 領域が ETn プロモーターの UD 特異的な転写活性化に必須であることを示し、この領域が UD 特異的にシスエレメントとして機能することを明らかにした。
4. 同定したシスエレメントに UD 特異的に結合する因子の単離を試み、結合する因子を CTCF およびそのパラログ BORIS にしぼりこんだ。CTCF と BORIS は排他的な発現パターンを示すことが知られているが、UD においては CTCF も BORIS も発現していた。NIH 3T3 細胞に BORIS や CTCF を導入することにより ETn のプロモーター

5. 293T 細胞に BORIS と CTCF を強制発現させて免疫沈降すると、両者が共沈してきたことから、同時に発現している細胞において両者が相互作用している可能性が示唆された。また、クロマチン免疫沈降法を用いて、UD で CTCF が del2-3 領域に結合していることを示した。さらに CTCF および BORIS に対する shRNA を UD にレトロウイルスベクターを用いて感染させ、それらの因子の発現を抑制することで、ETn の mRNA 量が 30%程度減少した。したがって、BORIS と CTCF は UD において ETn のプロモーター領域に結合し、転写活性化因子として機能していると考えられた。

以上、本論文はマウス未分化胚性幹細胞において、未分化特異的に活性化されるレトロトランスポゾン ETn の転写活性化機構を明らかにした。本研究は内在性レトロトランスポゾンの存在意義の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。