

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト血管内皮細胞における核内受容体COUP-TF IIによる
遺伝子発現制御解析

氏 名 藤井 美也子

核内受容体は真核生物において発生・分化やホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている。ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンといった細胞外からの刺激を受容し、下流の遺伝子の発現を制御するとされている。核内受容体はDNA結合能を有しており、結合した場所の遺伝子発現を制御することから転写因子としても分類される。最初に発見された核内受容体は、ステロイドホルモンが結合するステロイドホルモン受容体であり、遺伝子のクローニングと配列解析の進歩で、配列の相同性を手掛りとして、多数の核内受容体類似のタンパク質が発見された。ヒトゲノム解読では、類似タンパク質の数は48に達し、これらは核内受容体スーパーファミリーと呼ばれている。ゲノム配列から同定された受容体は当初リガンドが未知であったために、オーファン（孤児）受容体と呼ばれていたが、その後これらの一部が脂肪酸など脂質分子をリガンドとすることが判明し、（養子となって最早孤児でなくなったという意味の）Adapted Orphan Receptorsと呼ばれるようになった。

COUP-TF II（Chicken Ovalbumin Upstream Promoter - Transcription Factor II）は、原始的な生物（ウニ等）からヒトまで全ての後口生物で保存されている核内受容体であり、リガンド不明のオーファン受容体でもある。Apolipoprotein AIというコレステロール代謝に関わる遺伝子のプロモーター上にdimerを形成して結合する遺伝子としてクローニングされた。生化学的な解析により、DR（Direct Repeat）と呼ばれる配列

に非常に高い親和性をもって結合すると報告されている。ノックアウトマウスでの解析が行われており、COUP-TF II ヘテロノックアウトマウスは2/3が離乳前に死亡し、ホモノックアウトは胎生10日で死亡する。このことから、COUP-TF II は発生において非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。このマウスは頭蓋と心臓の発生が遅延しており、重度の出血、浮腫を胎生9.5日までに起こす。組織学的に解析すると、肥大した血管、動静脈の発生異常、心血管の異常等が見られる。血管新生、血管再構築の異常の原因がAng1-Tie2シグナルの異常に起因するという報告もあり、COUP-TF II は発生期において間葉系と血管内皮細胞とのシグナル系を制御している可能性は高い。

発現解析によるとCOUP-TF II は発生期において全ての胚葉において発現しており、その発現分布は上皮に分化しうる間葉系細胞において発現が高い傾向がある。COUP-TF II の発現が高い組織は唾液腺、心房、肺、胃、脾臓原基、中腎、腎臓、前立腺である。

当初より血管系とのかかわりが指摘されていたCOUP-TF II であるが、2005年に報告された文献により、血管内皮細胞における動静脈分化機構のキーとなる分子であることが明らかとなった。当時までは静脈はデフォルト分化であり、VEGFからNOTCHシグナルが入った場合のみ動脈に分化すると考えられていた。具体的にはNotchはシグナルが入るとその細胞内ドメインが切り離され核内移行し、標的遺伝子である*ephrinB2*(動脈のマーカー)と*hey1*, *hey2*を活性化し、*hey*が静脈のマーカーである*EphB4*を抑制するというものである。この動脈分化の機構内においてCOUP-TF II はNotchを抑制し、同時にVEGF受容体の一つであるNP1 (Neuropilin1)を抑制することで*ephrin B2*, *Hey*の発現を抑制することで静脈へと分化させる。報告によると、血管内皮細胞においてCOUP-TFIIを恒常的にノックダウンすると、動脈マーカーであるNP1, *ephrinB2*, Notchといった分子の発現が上昇し、逆に異所性に発現させると動脈と静脈の境があいまいになる。これらの事象からCOUP-TFIIは血管内皮細胞の分化(特に動静脈分化)に必須の因子であることがわかるが、その詳細なメカニズムはいまだ不明である。

そこで血管内皮細胞における核内受容体COUP-TF II がヒトゲノム上でどこに結合し、どの遺伝子をどのように発現制御しているのか明らかにするために次の3点の実証的研究を行った。

(1) COUP-TF II を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、血管内皮細胞におけるタンパク発現を生化学的、および病理学的に明らかにする。

血管内皮細胞におけるCOUP-TF II の機能を解析するには優れた抗体が必要である。現段階では未だ内在性のCOUP-TF II を認識できる抗体がないため、抗ヒトCOUP-TF II モノクローナル抗体の作成を最初に行った。当研究室で確立されたバキュロウイルス

を用いた発現—抗体作成系を用いてヒト COUP-TF II の43—64アミノ酸をエピトープとしてマウスモノクローナル抗体H7147を作成した。

作成した抗体の特異性を検討するために、siRNAによるCOUP-TF II ノックダウン細胞を作成した。本研究では血管内皮細胞のモデル細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞

(HUVEC) を用いた。COUP-TF II をノックダウンするように3種類のsiRNAを設計し、終濃度40 nMでHUVECにトランスフェクトした。48時間後のRNAを抽出し、定量的PCR

により遺伝子発現量を確認した(図1A)。設計したsiRNAによりRNAレベルでCOUP-TF II 遺伝子発現が抑制されたことを確認した。次に同条件にてタンパク質抽出を行い、作成した抗ヒトCOUP-TF II 抗体を用いて、ウエスタンブロットにてタンパク質発現量を確認した(図1B)。コントロールでは予想されるサイズのバンドを検出し、siRNAではこのバンドが消えることから、HUVEC内因性のCOUP-TF II が検出できたことがわかり、COUP-TF II 特異的抗体が作成できたと言える。この抗体を用いて、ヒト胎児10週組織の免疫染色を行った(図2)。二種類の血管組織を免疫染色した。COUP-TF II は冠動脈(A、矢印)においても、大動脈(B、矢印)においても染色されなかったが、冠静脈(A、矢頭)、毛細血管(B、矢頭)の内皮細胞に発現していた。ヒト血管組織ではCOUP-TF II は、動脈系以外の細胞に発現することが分かった。

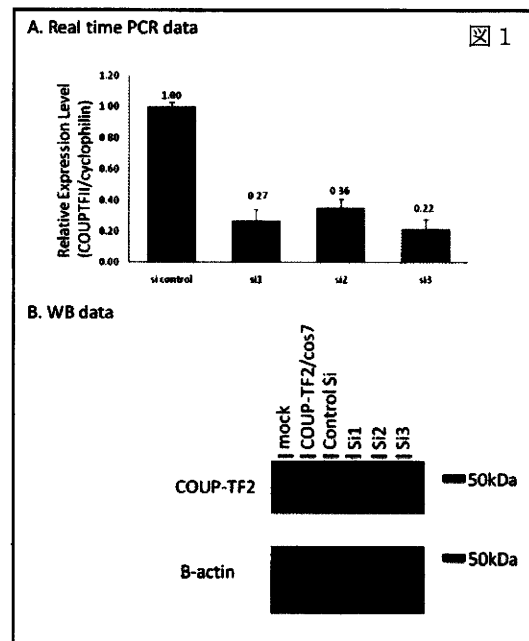


図 1

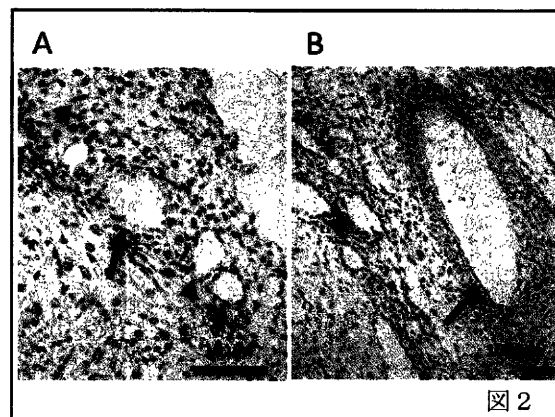


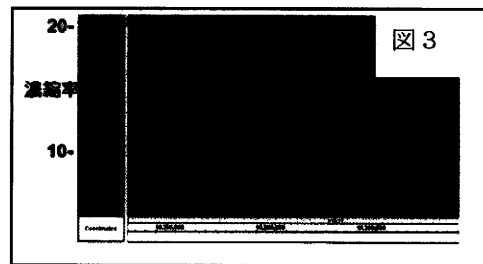
図 2

(2) COUP-TF II の結合部位を明らかにするためHUVECにおけるChIP-seq法を開発し、ゲノムワイドに結合解析を行った。

血管内皮細胞においてCOUP-TF II により発現調節を受けている可能性のある遺伝子を特定するため、COUP-TF II をノックダウンした場合のHUVECでの全遺伝子の発現量変化をマイクロアレイ解析により検討した。COUP-TF II ノックダウンにより発現が

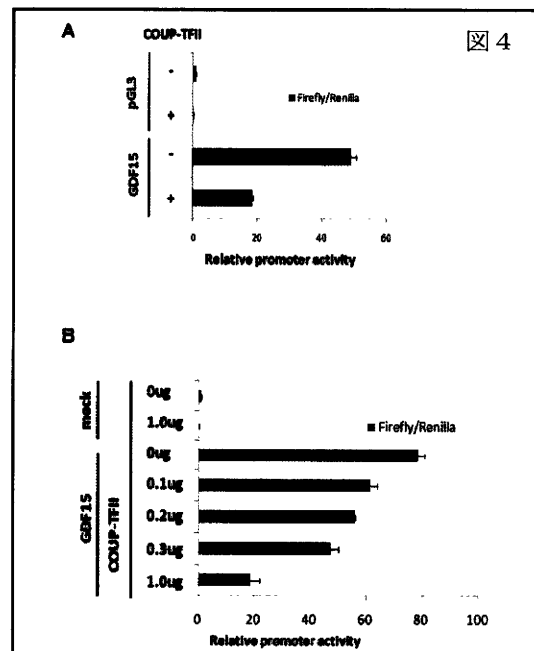
2倍以上に誘導された遺伝子は274遺伝子であり、また発現が半分以下に抑制された遺伝子は145遺伝子であった。COUP-TF IIが転写因子として、遺伝子発現制御をしている可能性のある遺伝子が多数あることが分かった。しかし発現アレイでは直接的、間接的制御の両方を含むので、発現調節の機序が、プロモーター領域におけるCOUP-TF IIの直接的な結合による遺伝子を明らかにするためにChIP-sequence法を行った。

HUVECのゲノムとタンパク質をホルマリンによりクロスリンクしたのち、抗ヒトCOUP-TF II抗体を用いてクロマチン免疫沈降実験を行い、COUP-TF IIに結合しているDNAを回収した。イルミナ社のSOLEXA 1G Genome Analyzerという高速シーケンサーを用いて回収したDNAの塩基配列を解読した。その結果、発現アレイ解析でCOUP-TF II ノックダウンによる発現誘導が最上位であったGDF15 (growth differentiation factor 15) 遺伝子のプロモーター領域にCOUP-TF IIの強い結合を確認した (図3)。



(3) 開発されたChIP-seqでの結合解析の妥当性を明らかとするため、結合の顕著であった領域が、実際に遺伝子制御にかかわっていることを検証する。

COUP-TF IIの標的遺伝子として予想されたGDF15に転写活性があるか検討するため、レポーターアッセイを行った。GDF15遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、pGL3 basicに組み込むことでFireflyルシフェラーゼコンストラクトを作成した。COUP-TF IIの発現していないCOS7細胞にGDF15 (-628/+32) -luc ベクターとCOUP-TF IIを共トランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した (図4A)。GDF15 (-628/+32) -luc ベクターのみで活性が見られ、この領域にプロモーター活性があることが確認できた。そこへCOUP-TF IIを強制発現させることによりルシフェラーゼ活性が減少した。このことからCOUP-TF IIによる発現抑制があることが示唆された。次に、COUP-TF IIの濃度を変えレポーターアッセイを行った。COUP-TF IIの濃度依存的にGDF15遺伝子のプロモーター活性は減少していった (図4B)。



これらのことからCOUP-TF IIは、確かにGDF15プロモーター領域に結合し、GDF15の転写に抑制的に働くことが確認された。

本研究により、h COUP-TF IIに特異的なモノクローナル抗体を作成し、ヒト血管内皮細胞でのタンパク質発現を示した。またHUVECにおいて発現アレイによりCOUP-TF IIの標的遺伝子を網羅的に解析した。作成した抗体を用いたChIP-seq法によりゲノムワイドにCOUP-TFII結合領域を同定した。発現アレイ解析とChIP-seq解析を組み合わせることでCOUP-TF IIの新規標的遺伝子を探索できる。その結果、GDF15遺伝子が候補として考えられ、レポーターアッセイによりChIP-seq法で示された結合がGDF15の転写誘導の抑制に関与していることが示された。以上の結果より、ChIP-seq法でシグナルのあった他の遺伝子についても同様にCOUP-TF IIによって制御されている可能性があり、ChIP-seq法がCOUP-TF IIの新規標的の同定に有用であることを示唆している。