

審査の結果の要旨

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。Chicken Ovalbumin Upstream Promoter – Transcription Factor (COUP-TF) 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。ヒトでは現在までに COUP-TFI、COUP-TFII、COUP-TF γ の 3 種類が報告されている。COUP-TFII 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。生化学的な解析により、COUP-TF は二量体として存在し、Direct Repeat (DR) と呼ばれる AGGTCA の繰り返し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。COUP-TFII ノックアウトマウスの解析により COUP-TFII の mutant では肥大した血管、動静脈の発生異常、心血管の異常等が見られ、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ている。COUP-TFII 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があり、一般に抑制型転写因子と考えられているが、抑制メカニズムは現段階では不明である。

本研究では、血管内皮細胞における COUP-TFII の機能を明らかにするために次に挙げる実証的研究を行った。

(1) COUP-TFII を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

血管内皮細胞における COUP-TFII 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-TFII を認識できる抗体がないため、抗ヒト COUP-TFII モノクローナル抗体の作製を行った。当研究室で確立されたバキュロウイルスを用いたタンパク質発現法と抗体作製系を用いてヒト COUP-TFII 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を作製した。

(2) Chromatin immunoprecipitation with deep sequencing (ChIP-seq)を用いた結合領域の探索、マイクロアレイを用いた COUP-TFII の下流遺伝子の解析

血管内皮細胞のゲノム上での COUP-TFII 結合領域を明らかにするため ChIP-seq を行った。COUP-TFII 抗体を用いた ChIP-seq はクロマチン構造を維持した状態で免疫

沈降実験を行い、COUP-TFII とゲノムの複合体を沈降させ、そのゲノムの塩基配列を決定することで COUP-TFII の結合領域を同定する手法である。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。ChIP-seq の結果 COUP-TFII は遺伝子の転写開始点上流 1 kb 以内に多く結合していることが分かり、遺伝子のプロモーターを制御していることが示唆された。

血管内皮細胞において COUP-TFII 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-TFII 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。ChIP-seq でプロモーター領域に結合が見られ、COUP-TFII ノックダウンにより顕著に遺伝子発現量の増加した growth differentiation factor 15 (GDF15) 遺伝子に着目した。

(3) レポーターアッセイによる転写制御解析

COUP-TFII 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、ルシフェラーゼコンストラクトを作製した。COUP-TFII の発現していない COS7 細胞に GDF15-luc ベクターと COUP-TFII 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。その結果 GDF15 の転写活性は COUP-TFII の濃度依存的に減少することが分かった。このことから COUP-TFII による発現抑制があることが示唆された。また、Genomatix (Genomatix Software GmbH) を用いた GDF15 のプロモーター領域の DR 配列を検索した結果、3 か所あることがわかり、DR-A、DR-B、DR-C とした。DR 配列に変異を加え、それぞれの DR を潰したコンストラクトを作製し、HUVEC にて内在性 COUP-TFII による転写活性を測定した。その結果 DR-C を潰すことで活性が 2.3 倍に上昇した。COUP-TFII による抑制が解除されたと考えられる。

本研究は血管内皮細胞における COUP-TFII の機能解明を目的に行い、COUP-TF II に特異的なモノクローナル抗体の作製、ChIP-seq による結合領域の同定、マイクロアレイによる下流遺伝子の同定を行った。ChIP-seq とマイクロアレイの結果から、COUP-TFII が GDF15 のプロモーター領域に結合し、抑制的に制御するという仮説を導き、レポーターアッセイにより仮説の検証を行った。検証の結果、COUP-TFII が GDF15 の遺伝子発現を抑制的に制御することを明らかにした。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。