

## 審査の結果の要旨

氏名 神吉 康晴

血管内皮細胞は血管の内壁を覆う一層の細胞であり、化学的、物理的、さらにはウイルスや細菌による感染や障害などの様々な刺激を受けて遺伝子発現プロファイルを変化させることが知られている。この遺伝子発現プロファイルの変化が、動脈硬化や腫瘍の進展等に深く関わっており、現在の日本の高齢化や主要な死因を考えると、これら血管内皮細胞の遺伝子制御メカニズムを解明することは医療に対する大きな貢献となることが期待される。

転写因子 GATA は 2 つの zinc finger を持つ転写因子であり、DNA 上の (A/T)GATA(A/G)配列に結合する。酵母からヒトまで種を超えて幅広く存在し、哺乳類では現在までに GATA1 から GATA6 まで 6 種類のタンパク質が知られている。GATA ファミリーに属する転写因子は様々な細胞で発現しており、その細胞ごとに特異的な遺伝子群の発現を制御していることが分かってきており、多細胞生物が分化していく上で非常に重要な転写因子であると認識されるようになってきた。血管内皮細胞には上記 GATA ファミリーのうち GATA2、GATA3、GATA6 の 3 種類が発現している。GATA2 は最初、内皮細胞に特異的に発現する endothelin1 遺伝子の発現を制御する因子として見つかった。これをきっかけに、血管内皮細胞で GATA2 の制御の対象となる遺伝子が研究され、現在までに VCAM1、ICAM2、vWF、PECAM1、P-selectin、eNOS、PAR3、DSCR1、KDR、GATA2 自身といった遺伝子群の制御において GATA2 が重要であることが報告されている。列挙したこれらの遺伝子は血管内皮細胞にとって重要な遺伝子ばかりであることから、GATA2 は血管内皮細胞を特徴付ける重要な因子となっていることが考えられる。このように内皮細胞にとって GATA2 は重要な転写因子であるが、現在ではいまだ内在性 GATA2 を認識できる抗体がないために、詳細な転写メカニズムの解析は進んでいない。そこで本研究ではまず、内在性 GATA2 を高感度かつ特異的に認識できる抗体の作製を試みた。次に、ヒト皮膚微小血管内皮細胞 HMVEC においてその抗体を用いた ChIP-seq 解析及びノックダウン細胞を用いたマイクロアレイ解析により GATA2 の新規標的遺伝子を探索した。そして、その発現制御メカニズムを解析した。

まず最初に抗 GATA2 モノクローナル抗体を作製した。ヒト GATA2 の 192-245 アミノ酸をエピトープとするマウスモノクローナル抗体を樹立し、その評価

を行ったところこの抗体は内在性 GATA2 を認識し、かつ特異性の高いものであった。次に作製された抗体を用いた ChIP-seq 解析を行うと、GATA2 の結合箇所のうち半分以上は非遺伝子部分であった。また、転写開始点付近の結合を調べたところ、血管内皮細胞特異的遺伝子である endothelin1 や vWF、endomucin といった遺伝子に結合していた。次に GATA2 が結合することで実際に転写を制御している遺伝子を探索するために si-GATA2 処理によるノックダウン細胞を用いたマイクロアレイ解析を行った。すると、GATA2 ノックダウンにより発現が大きく変動した遺伝子は 176 個であった。ChIP-seq 解析でプロモーター部位に GATA2 が結合している遺伝子の中でマイクロアレイで変動のあった遺伝子を抽出した。この中には既に GATA2 の標的であると報告されている endothelin1 や eNOS、vWF、PECAM1 等が含まれていた。この中から、新規の GATA2 標的遺伝子として endomucin を同定した。Endomucin は内皮細胞特異的遺伝子であり、内皮細胞と細胞外マトリックスとの結合を制御することから内皮細胞にとって重要な遺伝子である。レポーターアッセイ及び ChIP 解析により endomucin のプロモーター部位には GATA2 が結合して転写活性を上昇させていることが分かった。次に GATA2 結合部位の中で非遺伝子部分を H3K4me1 の ChIP-seq 結果と照合した。その結果、endomucin の上流 139kb に両者が重なるピークが見られ、レポーターアッセイによりこの領域はエンハンサー活性を持つことが示された。細胞内でエンハンサーとプロモーターがどのような位置関係にあるかを 3C アッセイにより調べたところ、endomucin 遺伝子では 139kb 離れたエンハンサーとプロモーターが近接するクロマチンループを形成していることが分かった。このループは endomucin が発現していない K562 細胞では認められなかった。また、HMVEC に si-GATA2 を作用させた 3C アッセイによりこのループは GATA2 依存的であることが示された。

以上の結果より、本研究では以下のことが示された。

内在性 GATA2 に対するモノクローナル抗体を樹立し、ChIP-seq 解析とマイクロアレイ解析により GATA2 の新規標的遺伝子として内皮細胞特異的遺伝子 endomucin を同定した。また、同時に H3K4me1 の ChIP-seq を行うことでエンハンサー部位を同定した。Endomucin の内皮細胞特異的な転写にはエンハンサーとプロモーターが空間的に近いクロマチンループ構造を形成しており、GATA2 をノックダウンするとこのループ構造は維持できないことを示した。本研究は内皮細胞特異的遺伝子発現メカニズムを分子生物学手法を用いて証明したものであり、内皮細胞の生理学及び病理学を理解するための重要な知見が得られた。

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。