

審査の結果の要旨

氏名 井上 剛

本研究は低酸素刺激による遺伝子誘導メカニズムを明らかにするため、低酸素応答性遺伝子群の1つである *angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)* に注目し以下の解析を行った。*ANGPTL4* は血管内皮機能とも関連し、低酸素のほかに、脂質代謝において重要な役割を果たしている *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ* リガンド刺激でも誘導されることが知られている。本研究では正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用い、異なる2つの転写因子 (低酸素誘導遺伝子のマスターレギュレーターである低酸素誘導因子 (HIF) 1 および核内受容体のひとつである *PPAR β/δ*) による遺伝子発現調整における新規機序を示唆する下記の結果を得た。

1. 低酸素および *PPAR β/δ* リガンド刺激下でマイグレーションアッセイを行った結果、単独刺激に比べ、両方の刺激によってマイグレーションが相乗的に誘導された。これにより、低酸素および *PPAR β/δ* の両方の刺激による、協調的な遺伝子発現メカニズムの存在が示唆された。
2. 低酸素刺激、*PPAR β/δ* 刺激、両方刺激下でのマイクロアレイ解析を行った結果、それぞれの単独刺激、両方刺激のいずれでも *ANGPTL4* が最も誘導された。real time PCR にても *ANGPTL4* が相乗的に誘導されることが確認され、RNA ポリメラーゼ II の局在も両方の刺激によって増加していた。
3. HIF1 抗体および *PPAR β/δ* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降及び高速シーケンス (ChIP-seq) によって、*ANGPTL4* 遺伝子周囲の HIF1 および *PPAR β/δ* の結合部位を同定した。これにより、*ANGPTL4* が転写因子である HIF1 および *PPAR β/δ* を介して誘導されることが確認された。
4. 上記 HIF1 および *PPAR β/δ* の結合に加え、プロモーターマーク (H3K4me3) やエンハンサーマーク (H3K27ac, H3K4me1) などのヒストン修飾の解析結果をもとに、*ANGPTL4* のプロモーターおよびエンハンサー候補を推測した。これらのプロモーター・エンハンサー領域を含むコンストラクトを用いて、レポーターアッセイを施行した。さらに、転写因子結合モチーフ領域に変異を入れたコンストラクトを作成して、増強したルシフェラーゼ活性がキャンセルされたことから、*ANGPTL4* の転写開始点より約 2 kb 上流の HIF1 結合領域 (HRE) および *ANGPTL4* の第3イントロ

ン（転写開始点より約 3.3 kb 下流）の PPAR δ /6 結合領域（PPRE）が、機能的に重要な転写因子結合領域であることが確認された。

5. 転写因子である HIF1 および PPAR δ /6 は、DNA 上の認識配列に結合後、ヒストンアセチル化酵素である CBP/P300 を誘導し、この酵素がヒストン H3 の 27 番目リジン (K) をアセチル化 (H3K27ac) することにより、RNA ポリメラーゼ II が誘導され、転写が活性化されることが知られている。そこで、低酸素・PPAR δ /6 単独刺激および同時刺激下での H3K27 アセチル化の局在変動を検討した。HIF および PPAR の刺激にて、それぞれ HRE および PPRE 周囲の H3K27ac の誘導を認めた。しかしながら、予想に反して低酸素刺激による PPRE 周囲のアセチル化、一方 PPAR δ /6 刺激による HRE のアセチル化も認めた。このことから約 5.3 kb 離れた HRE および PPRE 間の相互作用が強く示唆された。
6. Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing (ChIA-PET) を用いて網羅的なクロマチン立体構造変化を観察したところ、*ANGPTL4* 周囲において、機能的な HRE と PPRE の間に近接関係が認められた。
7. ChIA-PET で示唆された近接関係が、刺激応答性に変化することを Chromosome Conformation Capture (3C) アッセイを用いて検討したところ、無刺激状態と比べて、低酸素刺激、PPAR δ /6 刺激および両方の刺激によって両エレメントが近接する頻度が増加することが示された。さらに、HIF1 のノックダウン、PPAR δ /6 のノックダウン、HIF1 および PPAR δ /6 のダブルノックダウンにて、その近接関係がキャンセルされた。

以上の結果から、本論文は血管内皮細胞を用いて、異なる転写因子が共通の遺伝子を発現する際に、受容体や、シグナル経路を共有するなど従来知られているクロストークメカニズムに加えて、クロマチン立体構造変化を通じた機序が存在していることを明らかにした。本研究は、これまでにない新しい転写のメカニズム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。