

氏 名 小林 未佳

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1006 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Chromatin - Immunoprecipitation - Mediated Target
Identification Proved Aquaporin 5 is Regulated Directly
by Estrogen in the Mouse Uterus

論文審査委員 主 査 教授 長濱 嘉孝
教授 井口 泰泉
教授 諸橋 憲一郎
助教授 渡邊 肇
教授 今川 正良(名古屋市立大学)

論文内容の要旨

女性ホルモンであるエストロゲンは、雌性生殖器官だけでなく、神経細胞、免疫系細胞など様々な細胞の細胞分裂・分化に関与している。こうしたエストロゲンの作用は、核内受容体の一つであるエストロゲン受容体 (estrogen receptor : ER α 及び ER β) を介し、ゲノム DNA を介する経路とゲノム DNA を介さない経路で発現することが知られている。ゲノム DNA を介する経路では、ゲノム DNA の転写制御領域上に存在する特定配列(estrogen responsive element ; ERE)などを認識し結合することで、特定の遺伝子の発現を調節すると考えられている。しかし、転写制御領域中に完全な ERE を持つエストロゲン応答遺伝子の報告は非常に少なく、ゲノム DNA を介する経路によってどの程度の遺伝子が制御されているか不明な点が多い。特にこれらの解析は培養細胞を中心に進められてきたために、実際の個体でエストロゲン標的器官における遺伝子がどのような制御を受けているのかについては研究が進んでいなかった。そこで、エストロゲン標的器官において、エストロゲンがゲノム DNA を介して及ぼす作用を明らかにするために、本研究では、ER α がゲノム DNA へ結合し発現調節を行っている遺伝子群を明らかにすることとした。

まずマウス子宮のゲノムにおける ER α の結合領域を特定するために、一般的に行われているクロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation(ChIP) assay) を改良した ChIP-mediated target cloning の手法を確立した。クロマチン免疫沈降法は、固定化した細胞から抗転写因子の抗体を用いて、ゲノム DNA 上で作用している転写因子と DNA 断片を回収し解析する手法である。通常的手法は既知のプライマーを用いて DNA 断片に目的の遺伝子断片が含まれているかを確認するが、本研究では、回収した DNA 断片を網羅的に解析する

ことを目的とし、回収した DNA を ligation-mediated target cloning 法により、クローニングしその塩基配列を解析した。これにより多数の ER α の結合領域のゲノム上の位置を明らかにし、多数の未知の標的遺伝子の同定が可能となった。この際に、CsCl の密度勾配を用いた分画により、転写因子と DNA が架橋された複合体の精製段階を加えることにより、混入する非特異的な DNA 断片によるバックグラウンドの低減に成功した。

これと並行してエストロゲン刺激によるマウス子宮の遺伝子発現変化について経時的な解析を行い、ChIP-mediated target cloning により同定したゲノム DNA 断片の位置との比較を行なった。ER α の結合領域からの距離によって周辺の遺伝子を分類し、発現パターンの解析を行なったところ、ER α の結合領域の近傍に存在する遺伝子の中に、エストロゲン刺激により一過的に発現誘導を受けると見出された。こうした遺伝子発現誘導は、一般に ER α の結合領域が標的遺伝子の近傍に存在するほど誘導の程度が強い傾向が見られた。

今回確立した ChIP-mediated target cloning の手法によって同定された遺伝子の中に Aquaporin (AQP) 5 が含まれていた。エストロゲン反応による子宮の膨潤は、エストロゲン刺激による顕著な初期応答の一つであり、Aquaporin 遺伝子ファミリーの関与を明らかにすることは重要であるのみならず、遺伝子応答としても良いモデルとなることからさらに解析を行った。通常の ChIP assay により、AQP 5 遺伝子の近傍を解析したところ、マウス子宮において ER α は AQP 5 遺伝子の転写開始点上流約 100 bp の位置に結合することが明らかになった。また、この ER α の結合によって、AQP 5 遺伝子の発現が活性化することを、レポータージーンアッセイにより確認した。これらの結果から、AQP 5 遺伝子のエストロゲンによる転写活性化には、ER α の結合が関与している事が明らかになっ

た。一方、他の AQP ファミリー遺伝子についても、発現解析を行なったところ AQP 8 遺伝子の発現上昇も見出されたものの、ゲノム DNA への ER α の直接的な結合は検出できなかった。

本研究では、マウス組織から目的の転写因子の未知のターゲット遺伝子を同定する手法として、ChIP-mediated target cloning の系を確立し、実際にモデルとして解析した遺伝子において、同定されたゲノム DNA 断片を含む領域が ER α の機能発現に重要であることを示した。これは適切な抗体を利用して今回確立した手法を用いることで、生体内の組織に置いて様々な転写因子の標的 DNA 配列を網羅的に解析できる可能性を示している。また、この手法と microarray などの発現解析の手法を用いることで、転写因子の機能解析に役立つと思われる。

論文の審査結果の要旨

女性ホルモンであるエストロゲンは、雌性生殖器官だけでなく、神経系、免疫系などにおける様々な生命現象に関与している。こうしたエストロゲンの作用は、一般に核内受容体の一つであるエストロゲン受容体 (estrogen receptor : ER α 及び ER β) を介して発現することが知られており、なかでもER α が主要な役割を果たしている。エストロゲン作用の発露にはERがゲノムDNAの特定配列(estrogen responsive element ; ERE) に結合し遺伝子発現変化を介する反応とゲノムDNAを直接介さない反応が考えられている。しかし、従来の研究の多くは培養細胞を中心としていたため、生体内での様々なエストロゲン応答において、どの程度の遺伝子がERの直接的なDNAへの結合を介した発現調節を受けているのか不明であった。

そこで申請者は、マウス子宮を用いて、生体内において実際にエストロゲン存在下でER α が結合しているゲノムDNAを明らかにし、周辺の遺伝子群のエストロゲン応答性について解析を行った。まず、クロマチン免疫沈降法(Chromatin Immunoprecipitation: ChIP)をもとにChIP-mediated target cloningの手法の開発を行った。これにより、抗ER α 抗体を用いてゲノム上でER α が結合しているDNA断片を効率的に回収し解析する手法を確立した。これらDNA断片の塩基配列解析により、ゲノム上のER α 結合位置と、近傍の遺伝子群を特定した。さらにこれら遺伝子群のエストロゲン依存的な発現変化についてDNAマイクロアレイ法を用いて解析した。ER α の結合部位と標的遺伝子の距離によって分類し、発現パターンの解析を行ったところ、ER α の結合領域の近傍に存在する遺伝子について、エストロゲンによる一過性の発現上昇が見られた。こうして決定したER α の標的遺伝子の中に、Adrenomedullin やAquaporin (AQP) 5 が含まれていた。

さらに、同定した遺伝子の一つ AQP5について詳細な解析を行った。マウス子宮を用いて通常の ChIP 法により ER α の結合領域を解析したところ、AQP5遺伝子の転写開始点上流約100bp の位置に存在する不完全な ERE に結合することを明らかにした。また、この結合部位を含む領域を培養細胞内に導入し、エストロゲン依存的な応答をレポーターアッセイ法により解析したところ、ER α がこの不完全な ERE へ結合することによって、AQP5遺伝子の発現がエストロゲン依存的に活性化することを明らかにした。これらの結果から、AQP5遺伝子のエストロゲンによる転写活性化には、ER α の結合が関与している事を示した。この結果は、ChIP-mediated target cloning の手法の有用性をも示しており、多くの ER α 標的配列を解析することにより、生体内におけるエストロゲン作用の全体像について知見を得ることが可能となるのみならず、生体内における遺伝子発現制御を解明する上での有用性についても議論している。

本論文では、生体内におけるエストロゲン標的の同定とその解析という重要な問題において、新たな手法でアプローチを行い、その汎用性を示した点において高く評価される。以上の成果は博士論文に値するものと審査委員全員一致で判断された。