

Title	Sleeping Beauty transposase has preference to heterochromatin conformation
Author(s)	池田, 龍史
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47460
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	いけ だ りゅう じ 池 田 龍 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20993 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科社会医学専攻
学位論文名	<i>Sleeping Beauty</i> transposase has preference to heterochromatin conformation (<i>Sleeping Beauty</i> transposase はヘテロクロマチン領域に親和性がある。)
論文審査委員	(主査) 教授 竹田 潤二 (副査) 教授 金田 安史 教授 岡部 勝

論文内容の要旨

[目 的]

トランスポゾン、1950年にゲノム上を動く DNA 配列として、トウモロコシから発見された。この配列は、多くの下等生物から高等生物のゲノム中に含まれていることがわかっている。しかし、現在では、脊椎動物におけるトランスポゾンの移動活性は、進化の過程で蓄積した DNA の変異によってほとんど失われている。

1997年、Ivicsらはサケ科のゲノム中から不活化されたトランスポゾンを試験管内で改変し、哺乳動物細胞でも移動可能な“*Sleeping Beauty* (SB) トランスポゾン”を開発した。SB トランスポゾン配列は、これを移動させる酵素 (SB トランスポゼース) の仲介のもと、ゲノム中から切り出され (Excision)、他の場所へ再挿入 (Reinsertion) される。つまり、SB トランスポゾンとは、現存する哺乳細胞内のゲノム中において、もとの存在場所から他の場所へゲノム中を移動する性質を持つものである。最近の研究では、この性質を用いて、遺伝子改変、遺伝子治療などの応用に使われ始めている。

以前、当研究室では、トランスポゾンの移動する効率が、トランスポゾン DNA を試験管内でメチル化させることにより上昇することを示した。すなわち、トランスポゾンの移動効率は、クロマチンの修飾状況により強く影響を受けることが示唆される。当研究は、より生理的状态に近い環境でこの現象について考察するため、生細胞内でトランスポゾン配列周辺をヘテロクロマチン化し、トランスポゾンの移動とクロマチン状態の関係を解析した。そして、トランスポゾンの移動効率の向上が、さらなる遺伝学的・生物学的な解析のツールになることを目的とした。

[方法ならびに成績]

SB トランスポゾンを移動させる酵素である SB トランスポゼースを ES 細胞に一過性に発現させ、その局在を免疫染色により観察すると、ヘテロクロマチンの領域に濃く染まる DAPI の局在と一致した。また、SB トランスポゼースを恒常的に発現させた ES 細胞とコントロール ES 細胞を細胞質、核、不溶性画分にそれぞれ分け、ウェスタンブロットティング法により所在の場所を解析したところ、SB トランスポゼースは不溶性画分に存在することがわかった。これは、ヘテロクロマチン領域に蓄積している HP1 ファミリーと同じ結果であった。つまり、SB トランスポゼース

は細胞内のヘテロクロマチン領域に局在していることがわかった。

次に、SB トランスポゼースが、標的とする SB トランスポゾン配列のクロマチン修飾によって、その配列への親和性にどのように影響するかを検討するため、以下の細胞を樹立した。

SB トランスポゾン配列の近傍に tetO 配列をもつベクターを ES 細胞に相同組み換えにより挿入し、次に、tetracycline-controlled transrepressor (tTR) 発現ベクターを導入することで、tTR タンパク質を恒常的に発現させる ES 細胞株を樹立した。この tTR タンパク質は tetO 配列を認識・結合し、周りのクロマチン環境を不活化（ヘテロクロマチン化）することを仲介する。したがって、tetO 配列の近傍に位置する SB トランスポゾンもヘテロクロマチン修飾を受けることが予想される。この tTR 発現株を SB トランスポゾン配列のヘテロクロマチン修飾株、非発現株をユークロマチン修飾株とした。クロマチン免疫沈降法とメチル化に感受性のある制限酵素を用いたサザンブロット法によって、予想通り SB トランスポゾン領域がヘテロクロマチン化していることを確認した。

これらの細胞株を用いて、クロマチン修飾による SB トランスポゼースの親和性の変化を調べるため、抗 SB トランスポゼース抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法により、SB トランスポゾン領域を解析した。ユークロマチン修飾株と比べて、ヘテロクロマチン修飾株の方がトランスポゾン領域への親和性が明らかに高いことがわかった。つまり、SB トランスポゼースは、tTR タンパク質により新規に導入されたヘテロクロマチン修飾領域でも同様に高い親和性をもつことがわかった。

これらの結果と一致して、ヘテロクロマチン修飾株とユークロマチン修飾株の SB トランスポゾンの Excision の効率は、前者の方が後者より約 100 倍上昇することがわかった、次に、一度 Excision を起こした SB トランスポゾンが Reinsertion される効率を解析したところ、同様にヘテロクロマチン修飾株で上昇することがわかった。

[総 括]

SB トランスポゼースはヘテロクロマチン領域に親和性を持つ。その結果、ヘテロクロマチン修飾を受けた SB トランスポゾンの移動効率は、有意に上昇する。

これらの結果は、トランスポゾンを用いた効率の良い遺伝子改変動物の作製や遺伝子治療としての応用が大いに期待される。

論文審査の結果の要旨

生物のゲノム中に存在しているトランスポゾンとは、それを動かす酵素（トランスポゼース）の仲介によりゲノム中を動く性質をもつ DNA 配列である。この動く性質から生物の進化に深く関わってきたと言われている。しかし、現在では、脊椎動物において、進化の過程で蓄積したゲノム中の変異によって、動く活性が失われている。

97 年に、不活性なトランスポゾンを試験管内で変異を修復し、動く性質を持つものが作られた。このトランスポゾンは、長年ゲノム内で眠っていた（不活性）トランスポゾンを起こした（活性）という意味で、Sleeping Beauty (SB) Transposon と名付けられた。つまり、動く DNA 配列を SB トランスポゾン、酵素の方を SB トランスポゼースと呼ぶ。この動く SB トランスポゾンは、細胞種によって転移効率が異なることが報告されている。この差異はどうして起こるのかということを検討した。

まず、免疫染色法および細胞分画法によって SB トランスポゼースの細胞内の局在を調べたところ、ゲノムの非常に凝集したヘテロクロマチンという領域に局在していることがわかった。次に、トランスポゾンの配列を細胞内でヘテロクロマチン化させ、その場所にトランスポゼースが近付きやすいかどうかを調べると、コントロール（ヘテロクロマチン化していない）に比べて、ヘテロクロマチン化させたトランスポゾン領域に非常に親和性が高いことがわかった。この結果と一致して、ヘテロクロマチン化させたトランスポゾンの転移効率は、約 100 倍増加した。つまり、トランスポゾンの凝集状態が、酵素の挙動に大きく作用し、トランスポゾンの動く頻度に影響しているのではないかという可能性が示唆された。

以上の論文内容は、学位に値するものと認められる。