

Title	INSULATION OF THE UBIQUITOUS RXRB PROMOTER FROM THE CARTILAGE-SPECIFIC ADJACENT GENE, COL11A2
Author(s)	村井, 純子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/49888
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

ビタミンA、Dの受容体の一つであるレチノイドX受容体β遺伝子 (*Rxrb*) は、軟骨基質の構成成分であるXI型コラーゲンα2鎖遺伝子 (*Col11a2*) のすぐ上流に同じ向きに存在している。*Rxrb*は様々な組織で発現することが報告されている。一方で、*Col11a2*はその第1イントロンが強力な組織特異的エンハンサーとして作用し、極めて軟骨特異的に発現する。しかし、この隣接する両遺伝子が全く異なる発現パターンを示すメカニズムは不明である。今回我々は*Rxrb*プロモーターが、*Col11a2*エンハンサーの影響から隔離されるためのメカニズムを明らかにすることを目的とし、両遺伝子間にenhancer blocking element (insulator) の存在を推測し、その機能解析をおこなった。

〔 方法ならびに成績 〕

様々な組織や細胞株からRNAを抽出し、ノザンプロットおよびRT-PCRで*Rxrb*と*Col11a2*の発現パターンを解析したところ、*Rxrb*は様々な組織、細胞株で発現していたが、軟骨での発現は比較的低かった。また*Col11a2*の第1イントロンエンハンサーは異種のプロモーターに対しても、軟骨特異的発現を誘導することを、トランスジェニックマウスを使った実験で確かめた。現在のところ、脊椎動物で見つかっているinsulatorのほとんどにはCTCFタンパクが結合する。我々は両遺伝子間に2か所、CTCFが結合しうる領域を同定した。一つは*Rxrb*の終始コドンと*Col11a2*の開始コドンの間で、EMSAにてCTCF結合領域 (11P) を同定した。もう一つは*Rxrb*の第4イントロン内で、データベース検索にてCTCF結合領域 (RX4) を同定した。次に、11PやRX4が*Rxrb*の発現量、発現パターンに及ぼす影響を検討するために、*COL11A2/RXRB*遺伝子全体を中央に含む142kbのヒトBAC DNA (WT) を用意した。WTの11Pに14bpの変異を導入したコンストラクト (11Psub)、11Pを含む507bpを欠失させたコンストラクト (11Pdel)、RX4に14bpの変異を導入したコンストラクト (RX4sub) を作成し、*in vitro*、*in vivo*でその機能を解析した。WT、11Psub、11Pdel、RX4subそれぞれの*RXR*転写開始位置にピューロマイシン耐性遺伝子を挿入したコンストラクト (WT-Pur、11Psub-Pur、11Pdel-Pur、RX4sub-Pur) を筋芽細胞株に安定的に遺伝子導入し、ピューロマイシン耐性となったコロニー数で*RXRB*プロモーターの活性を検討した。WT-Purに比べ、11Psub-Pur、11Pdel-Purを導入すると、コロニー数は有意に減少した。RX4sub-PurとWT-Purに有意な差はなかった。このことから、筋芽細胞株では11Pの変異、欠失により*RXRB*プロモーター活性が落ちたと考えた。次に、SV40プロモーター下にピューロマイシン耐性遺伝子を発現するコンストラクトをWT、11Psub、11Pdelの片端に挿入し、それぞれSV40-Pur/ WT、SV40-Pur/ 11Psub、SV40-Pur/ 11Pdelとした。これらを軟骨肉腫細胞株に安定的に遺伝子導入し、SV40-Pur/ WT、SV40-Pur/ 11Psub、SV40-Pur/ 11Pdelのクローンをそれぞれ12個、14個、18個樹立した。これらの細胞よりtotal RNAを抽出し、導入した*RXRB*と*COL11A2*のmRNAの発現量をRT-PCRで解析した。補正には導入したピューロマイシン耐性遺伝子の発現量を用いた。SV40-Pur/ 11Psub、SV40-Pur/ 11Pdel 導入細胞の*RXRB*の発現量はSV40-Pur/ WTに比べ有意に上昇していた。*COL11A2*の発現量には有意差はなかった。このことから、軟骨肉腫細胞株では11Pの変異、欠失により*RXRB*プロモーター活性が上昇したと考えた。次に、WT、11Psub、11Pdel、RX4subそれぞれの*RXR*転写開始位置に*LacZ*遺伝子を挿入したコンストラクト (WT-LacZ、11Psub-LacZ、11Pdel-LacZ、RX4sub-LacZ) をマウス受精卵に打ち込み、受精後13.5日トランスジェニックマウス (Tg) をX-gal染色し、*LacZ*の発現パターンを解析した。WT-LacZ Tg は13匹中7匹 (54%) が様々な組織で*LacZ*を発現していたが、残りの6匹 (46%) は軟骨特異的に*LacZ*が発現していた。11Pdel-LacZ Tgは10匹中9匹 (90%) で、軟骨特異的に*LacZ*が発現していた。このことから、11Pを含む507bpを欠失させることで、*RXRB*の発現が軟骨特異的に誘導されたと考えた。クロマチン免疫沈降法では、CTCFはRX4には結合していたが、11Pには結合していなかった。

〔 総 括 〕

以上のことから、*RXRB*プロモーターは、11Pを含む領域によって*COL11A2*エンハンサーの影響から隔離されていると考えた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ユビキタスに発現するレチノイドX受容体遺伝子 (RXRB) と軟骨特異的に発現するXI型コラーゲンα2鎖遺伝子 (COL11A2) が、ゲノム上で隣接するにも関わらず、なぜまったく異なる発現パターンを示すのか？また、COL11A2の軟骨特異的エンハンサーがなぜRXRBプロモーターに影響しないのか？という問題に対し、両遺伝子間にエンハンサーブロッキング配列が存在すること推測し、BAC (バクテリア人工染色体) コンストラクトを用いたユニークな方法で、エンハンサーブロッキング作用を

〔28〕

氏 名	むら い じゅん こ 村 井 純 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 5 4 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 10 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	INSULATION OF THE UBIQUITOUS <i>RXRB</i> PROMOTER FROM THE CARTILAGE-SPECIFIC ADJACENT GENE, <i>COL11A2</i> (ユビキタスに発現する <i>RXRB</i> 遺伝子のプロモーターは、隣接し軟骨特異的に発現する <i>COL11A2</i> 遺伝子から隔離されている)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 川 秀 樹 (副査) 教 授 竹 田 潤 二 教 授 宮 崎 純 一

もつ配列を同定した。その成果は伝統ある“The Journal of Biological Chemistry”に掲載されることから、学位の授与に値すると考えられる。