



Title	血管内皮細胞特異的にRobo4遺伝子が発現するメカニズムに関する研究
Author(s)	舟橋, 伸昭
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58576
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	舟橋伸昭
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第24528号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
	薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	血管内皮細胞特異的にRobo4遺伝子が発現するメカニズムに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 八木 清仁 教授 藤尾 慎 教授 水口 裕之

論文内容の要旨

著者は、血管内皮細胞特異的に遺伝子が発現するメカニズムを解明するため、血管内皮細胞特異的に発現するRoundabout4 (Robo4) 遺伝子の発現制御メカニズムについて研究を行ってきた。これまでに、ヒトRobo4遺伝子の5'上流3 kbの配列が、Robo4遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現を制御するプロモーター配列であること、また、転写開始点付近のDNA配列 (-119 ETS) を介して転写因子GABPがRobo4遺伝子発現を制御することを明らかにしている。今回、著者は、Robo4遺伝子の発現制御を担う新しい転写因子を同定することを目的とし研究を行った。まず、種間で高度に保存されている転写開始点付近のプロモーター配列 (-285～+40) に存在する、2つの転写因子SP1結合配列 (-153 SP1, -42 SP1) に着目した。-153 SP1, -42 SP1の片方ずつ、あるいは両方に変異を導入したプロモーターを持つレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、-153 SP1, -42 SP1の両方の配列がプロモーターの活性化に寄与していることが明らかになった。次に、この2つのSP1配列に結合するタンパク質が存在するかをゲルシフトアッセイにより解析したところ、-153 SP1と-42 SP1にSP1が結合することが明らかになった。さらに、SP1発現ベクターを用いた強制発現実験により、SP1が-153 SP1と-42 SP1を介してプロモーターを活性化することが明らかになった。これらの結果から、-153 SP1, -42 SP1の両方の配列にSP1が結合し、プロモーターを活性化することを明らかにした。次に、この2つの配列が *in vivo*においてもプロモーターの活性化に寄与するかどうかを解析するために、-153 SP1と-42 SP1の片方ずつあるいは両方に変異を導入したプロモーターにLacZ遺伝子を連結させた配列を持つトランスジェニックマウスを作製した。各マウスの心臓と横隔膜におけるLacZの発現解析から、*in vivo*においても両配列がRobo4プロモーターの活性化に重要であることが明らかとなった。

これまでの検討により、GABPおよびSP1が転写開始点付近の結合し、転写を活性化することが明らかになった。しかし、GABPとSP1は血管内皮細胞以外の細胞にも発現しており、これらの因子だけでRobo4遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現が生み出されているとは考えられなかった。そこで、著者は、Robo4の血管内皮細胞特異的な発現にエビジェネティックな転写制御が寄与している可能性を考えた。バイサルファイト-シークエンシング法を用いて、2種類のヒト血管内皮細胞 (HCAEC, HUVEC) と3種類のヒト非血管内皮細胞 (HCASmC, NHDF, HEK293) におけるRobo4プロモーターのDNAメチル化状態の解析したところ、血管内皮細胞と非血管内皮細胞でプロモーターのメチル化状態には相違があり、特に転写開始点上流300 bpの領域で顕著な相違が見られることが明らかとなった。この300 bpの配列のDNAメチル化が、先に述べたGABPとSP1の結合に影響を与えるかどうかをゲルシフトアッセイにより評価したところ、DNAメチル化は-42 SP1へのSP1の結合を阻害するが、-119 ETSへのGABPの結合、-153 SP1へのSP1の結合を阻害しないことが明らかになった。次に、プロモーターのDNAメチル化がRobo4遺

伝子の発現制御に関与しているかをDNAメチル化酵素阻害剤5-aza-2'-deoxycytidine (5-AC) を用いて解析した。血管内皮細胞 (HCAEC) と非血管内皮細胞 (HCASmC, NHDF, HEK293) を5-ACで処理しRobo4遺伝子の発現量を解析したところ、プロモーターのDNAメチル化は非血管内皮細胞特異的にRobo4遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。さらに、Robo4遺伝子の発現制御に関与するメチル化サイト (CpG配列) を同定するために、血管内皮細胞と非血管内皮細胞においてメチル化状態に相違が見られた11個、もしくは22個のCpGをCpTに変換し、メチル化を受けないようにした変異プロモーターを作製した。これら2種の変異プロモーターを含むレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、プロモーターへの変異が転写因子の結合阻害など、DNAメチル化以外のメカニズムでプロモーター活性を変化させないことを確認した。次に、2種の変異プロモーターにLacZ遺伝子を連結させた配列を持つES細胞を作製し、血管内皮細胞および胚様体へと分化させ、LacZの発現量を解析した。その結果、プロモーターへの11個、もしくは22個の変異は、血管内皮細胞におけるLacZの発現に大きな影響を与えたかったが、胚様体におけるLacZ発現を増加させた。この増加は、胚様体内的非血管内皮細胞におけるLacZ遺伝子の発現に由来すると考えられたため、11個のCpG配列のメチル化がRobo4遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現に寄与していることが明らかになった。

以上著者は、転写因子とエビジェネティクスの両側面からRobo4遺伝子の発現制御について解析を行い、Robo4遺伝子が血管内皮細胞特異的に発現するメカニズムの一端を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

舟橋君は、血管内皮細胞特異的に遺伝子が発現するメカニズムを解明するため、Robo4の発現制御メカニズムについて研究を行い、以下の知見を得た。まず、Robo4遺伝子の種間で保存されている転写開始点付近の-153 SP1、-42 SP1について、それらがプロモーター活性に寄与しているかを解析し、これらを介してSP1がプロモーター活性を上げていることを明らかにした。しかし、SP1やGABPだけでは内皮細胞特異的遺伝子発現を説明できないため、血管内皮細胞と非血管内皮細胞におけるプロモーターのDNAメチル化状態を比較したところ、転写開始点上流300bpで顕著な相違を発見した。そこにはSP1とGABPの結合配列が存在したため、メチル化が結合を阻害するかを調べた結果、-42 SP1のメチル化はSP1の結合を阻害することがわかった。次に、メチル化がRobo4の発現制御に関与しているかについてメチル化酵素阻害剤を用いて解析し、プロモーターのメチル化が非血管内皮細胞特異的にRobo4発現を抑えることを明らかにした。さらに、Robo4の発現制御に関与するCpG配列の同定のため2種の変異プロモーターにLacZを連結させた配列を持つES細胞を血管内皮細胞および胚様体へと分化させ、LacZの発現量を解析したところ、変異プロモーターは血管内皮細胞におけるLacZ発現に影響を与えないが、胚様体におけるLacZ発現を増加させることが判明した。この増加は、胚様体内的非血管内皮細胞におけるLacZの発現に由来すると考えられたため、メチル化がRobo4の血管内皮細胞特異的な発現に寄与していることが明らかになった。

以上の成果は、血管内皮細胞特異的遺伝子発現におけるDNAメチル化の役割の一端を明らかにしたものであり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものと認められる。