



Title	Chromatin states shape insertion profiles of the piggyBac, Tol2 and Sleeping Beauty transposons and murine leukemia virus
Author(s)	吉田, 純子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61565
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	吉田 純子
論文題名 Title	Chromatin states shape insertion profiles of the piggyBac, Tol2 and Sleeping Beauty transposons and murine leukemia virus (クロマチン状態は、piggyBac、Tol2、Sleeping Beautyトランスポゾンおよびマウス白血病ウィルスの挿入部位を規定する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 DNA型トランスポゾンのpiggyBac(PB)、Tol2、Sleeping Beauty(SB)、およびMurine Leukemia Virus (マウス白血病ウィルス; MLV) は、遺伝子改変、iPS細胞作製、遺伝子治療など様々な分野に利用されている。これらのベクターのゲノムへの挿入部位の分布を知ることが、目的に適合したベクターを開発する上で重要である。そこで我々は、4ベクターを同一条件でマウスES細胞に導入し、次世代シーケンサーを用いて挿入部位を網羅的に比較解析した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 野生型マウスES細胞に上記4ベクターを導入し、ゲノムDNAを精製した。Ligation-mediated PCR法によって挿入部位のゲノム配列を増幅し、Roche GS FLXおよびIllumina GA-IIでシーケンスを行った。次に、実験的に決定した挿入部位数と同じ数のコントロール挿入部位セットを、in silicoで1000セット分、作製した。最後に、これらの挿入部位とゲノムの様々な特性(exon density、遺伝子発現量、転写開始点、各種ヒストン修飾、ゲノムの三次元構造に関与するDNA結合タンパクの結合部位など)との相関関係を調べ、ベクター間で比較した。 その結果、4ベクターともコントロールに比べて遺伝子内に挿入しやすいことがわかったが、PBとMLVはマウスES細胞で高発現の遺伝子への挿入を好み、反対にTol2とSBは弱く発現している、もしくは発現していない遺伝子への挿入を好むことがわかった。遺伝子発現はエピジェネティックな因子で制御されている。そこで、各種ヒストン修飾と挿入部位の相関を調べたところ、PBとMLVは、エンハンサー領域(H3K4me1)、遺伝子の転写開始点(H3K4me3)、およびgene bodyに特徴的なヒストン修飾(H3K36me3)と相関した。Tol2は、polycomb repressive complex 2で導入されるH3K27me3と高い相関を示すとともに、ES細胞の分化に伴い発現が上昇する遺伝子に特徴的なbivalent修飾(H3K4me3+H3K27me3)との相関も認めた。一方、SBは、いずれのヒストン修飾にも相関を示さなかった。Openクロマチン領域を示すDNase I hypersensitive site (DNase I HS)との相関も調べたが、4ベクターとも異なる分布を示した。Tol2がDNase I HSに一致して急峻なピークを示したのに対し、PBではDNase I HSにピークを示しながらも、その周囲への挿入も見られた。MLVはDNase I HS自体ではなく、そこから約700bpほど離れた部位に挿入のピークを認めた。SBは相関を示さなかった。これより、クロマチンがopenだけで挿入が起きるわけではないことが示された。そこで、クロマチンの三次元構造との相関を調べるため、三次構造の形成に関与するDNA結合タンパクの結合部位との相関を調べた。その結果、MLVはエンハンサー/プロモーターループを形成するMediatorとCohesinの結合部位から約700bp離れたところに挿入しやすいことがわかった。PBとTol2はともにTopological Associated Domain (TAD)を形成するCTCFとCohesinの結合部位との相関を示したが、CTCFやCohesinと共局在していると考えられるES細胞特異的転写因子との相関についてはPBのみで見られ、Tol2では認められなかった。このことは、「PBはマウスES細胞で高発現している遺伝子への挿入を好み、反対にTol2は弱く発現している、もしくは発現していない遺伝子への挿入を好む」という前述の結果と一致している。SBは、いずれのDNA結合タンパクの結合部位との相関も見られず、4ベクターの中で最も偏りなく挿入するベクターであると考えられた。クロマチン状態が挿入部位を規定することを実証するために、H3K27me3の修飾が消滅するEedホモ変異体ES細胞における挿入部位を調べたところ、H3K27me3の修飾領域を好むTol2の挿入部位に変化を認め、本来はH3K27me3が存在するはずの領域において、Tol2の挿入頻度が低下した。これより、ベクターのゲノムへの挿入におけるクロマチン状態の重要性が証明された。 〔総括(Conclusion)〕 本研究により、4つのベクターのゲノムへの挿入部位の分布はすべて異なることが示された。これらの情報は、積極的に遺伝子を破壊したい場合や、逆に遺伝子破壊を避けたい場合、もしくはゲノム全体を偏りなく標的にしたい場合、といった様々な状況において、適切なベクターを選ぶために有用であろう。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 吉田 純子		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	吉田 純子
	副 査 大阪大学教授	原田 彰宏
	副 査 大阪大学教授	藤堂 剛

論文審査の結果の要旨

piggyBac (PB)、Tol2、Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン、及び、Murine Leukemia Virus (MLV) は、遺伝子導入やゲノム改変のベクターとして多用されているが、ゲノムへの挿入部位の分布に関する情報は乏しい。申請者はこれら4ベクターの挿入部位の分布を、マウスES細胞において次世代シーケンサーを用いて解析した。DNase I 高感受性部位との相関性はベクター間で異なり、クロマチンがオープンなだけでは挿入部位は決まらないことがわかった。MLVは4ベクターの中で挿入部位が最も限局し、プロモーターとエンハンサーが相互作用するクロマチンループへ挿入しやすかった。PBは、より大きなクロマチンループであるtopologically associating domainsへ挿入しやすく、かつ、転写の活発な領域への挿入頻度が高かった。Tol2は転写活性の低いクロマチンループへ挿入しやすく、SBは挿入の偏りが極めて少なかった。

本論文で明らかにした各ベクターの特性は、目的に応じて適切なベクターを選択するための指針を与えるものであり、生命科学全般の進展へ大きく貢献すると考えられ、博士（医学）の学位授与に値する。