

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	池田 裕一
論文審査担当者	主査 井関 祥子 副査 春日井 昇平、横山 三紀
論文題目	A candidate enhancer element responsible for high-level expression of the aggrecan gene in chondrocytes.
(論文内容の要旨) <要旨> アグリカンは、軟骨組織に豊富に存在するプロテオグリカンである。アグリカンはそのコアタンパク質に多数の負に荷電したグリコサミノグリカン鎖を結合させることで、組織内に高浸透圧を発生させている。つまり、軟骨の圧負荷などに対する生物力学的特性は、マトリックスに豊富に含まれるアグリカンに依るところが大きい。そこで、軟骨細胞におけるアグリカンの高発現を制御する遺伝子転写メカニズムを明らかにするため、我々はβ-galactosidase と hygromycin phosphotransferase の融合遺伝子を用いた独自のレポーターアッセイシステムをラット軟骨肉腫細胞に導入して、アグリカンの遺伝子領域中の 130-kb 以上の範囲にわたりエンハンサーのスクリーニングを行なった。その結果、転写開始点から約 30-kb 上流に、アグリカンの高発現に関与する新たなエンハンサーの候補領域を同定した。 <諸言> 軟骨は豊富な細胞外マトリックスによって特徴づけられる組織であり、軟骨の生物学的機能は細胞外マトリックスの恒常性に依るところが大きい。軟骨の細胞外マトリックスの主要な構成要素は、II 型コラーゲンとアグリカンである。II 型コラーゲンは密な線維ネットワークを構築して機械的剛性を発揮し、アグリカンはその高い浸透圧により組織内に水を引き入れている。結果、これらの細胞外マトリックスによって圧縮力に対する動的な抵抗性がもたらされている。すなわち、軟骨が適切な機能を発揮するには、II 型コラーゲンとアグリカンの高発現、およびこれらのマトリックス分子の産生と会合、分解の調和によるマトリックスの恒常性維持が必須であると考えられる。近年のこれら分子の転写制御に関する研究により、転写因子 SOX9 が特異的発現をコントロールしていることを示している。しかし、軟骨細胞での II 型コラーゲンとアグリカンの高発現を制御するメカニズムに関しては未だに不明な点が多い。我々は以前、軟骨細胞における II 型コラーゲンの高発現を制御する強いエンハンサー領域を同定した。本研究では、軟骨細胞におけるアグリカンの発現を転写レベルで検討し、アグリカンの高発現に重要なエンハンサーの存在を検討した。	

<方法>

ラットのアグリカン遺伝子をコードする Bac clone (167-kb) を制限酵素で切断し、17 個のゲノム DNA 断片を得てクローニングを行った。クローニングしたゲノム DNA から、プロモーター領域、Exon1 領域、3' 末端領域をそれぞれ切り出し、 β -galactosidase と hygromycin phosphotransferase の融合遺伝子と組み合わせ、アグリカンのレポーターコンストラクトを作成した (prAgg- β gyg-3' N)。また、prAgg- β gyg-3' N にこれまでにアグリカンのエンハンサーとして報告されている A1、A2、A3 を組み込んだレポーターコンストラクトも作成した (pA1-rAgg- β gyg-3' N、prAgg-A2- β gyg-3' N、prAgg-A3- β gyg-3' N)。次に、直鎖化したこれら 4 種類のレポーターコンストラクトを単独で、あるいは上述したゲノム DNA 断片と共にラット軟骨肉腫細胞に遺伝子導入し、hygromycin B による薬剤選択を行なって耐性コロニーを得た。得られたコロニーでのエンハンサー活性を X-gal 染色で検討し、活性がみとめられた DNA 断片はさらに細分化し、エンハンサー領域の絞り込みを行った。

さらに、本実験で同定されたアグリカンのエンハンサーと以前我々が報告した II 型コラーゲンのエンハンサー E2 との互換性に関し、アグリカン (pA1-rAgg- β gyg-3' N) と II 型コラーゲンのレポーターコンストラクトを用いて比較検討を行った。

また、これまでにガドリニウム (0.4 mM) によってラット軟骨肉腫細胞が脱分化することが報告されていることから、pA1-rAgg- β gyg-3' N と活性が認められたエンハンサー領域の遺伝子導入を行ったラット軟骨肉腫細胞をガドリニウム存在下で培養し、脱分化した軟骨細胞でのエンハンサー活性を調べた。

<結果>

まず作成した 4 種類のレポーターコンストラクト単独でラットの軟骨肉腫細胞に遺伝子導入を行った。すると pA1-rAgg- β gyg-3' N 単独を導入した群は、ほかの群に比べ有意にコロニー数の上昇を認めた。しかし、軟骨肉腫細胞では内因性のアグリカンの高い発現が認められているにもかかわらず、X-gal ではほとんど染色されなかった。このことから、アグリカンの高発現を制御する新たなエンハンサーの存在が示唆された。

この新たなエンハンサー領域を同定するため、pA1-rAgg- β gyg-3' N とアグリカンのゲノム DNA 断片をラット軟骨肉腫細胞に遺伝子導入し、スクリーニングを行った。結果、転写開始点から約 30-kb 上流のゲノム DNA 断片 (7.4-kb) とともに遺伝子導入した場合に、コロニー形成数が有意に増大し ($p < 0.05$)、そのうち 65% 以上のコロニーが X-gal 染色陽性を示した。これより、この断片をさらに細分化してスクリーニングを繰り返し、最終的に 475-bp のエンハンサー配列を同定した。我々はこの領域を B1 と名付けた。この B1 の領域をさらに細分化すると、徐々にコロニー出現数が減少し、最終的に X-gal 染色陽性コロニーがほぼなくなった。

B1 の領域のホモロジー検索を行うと、ラット、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリの生物種間で高いホモロジーを示す領域が見つかった。さらにその領域には、転写因子である SOX family が結合する可能性のある配列が存在し、その配列に変異を導入すると、有意に出現するコロニー数が減少したが、X-gal 染色性が完全に消失することにはなかった。

II 型コラーゲン遺伝子 (Col2a1) の第 7 イントロン領域にはエンハンサー領域 (E2) が同定され

ており、また、アグリカンと II 型コラーゲンは SOX9 によって特異的に発現が制御されていることが知られている。今回同定したエンハンサーB1 とエンハンサーE2 間には相同性がみられないが、それぞれのエンハンサーに互換性があるのかどうか確かめた。アグリカン (pA1-rAgg- β gyg-3' N)、II 型コラーゲン (pCol2(P/int1)- β gyg-3' N) のレポーターコンストラクトを用意し、B1 あるいは E2 とともに軟骨肉腫細胞に遺伝子導入を行うと、アグリカンと II 型コラーゲンのエンハンサーの互換性が認められた。

エンハンサーB1 の特異性をさらに検討するため、pA1-rAgg- β gyg-3' N と B1 を遺伝子導入した軟骨肉腫細胞をガドリニウム (0.4 mM) 存在下で培養すると、線維芽細胞様の形態を示し、X-gal 染色性が消失した。また、軟骨様の性質を持たない KusaA1 細胞や MC3T3-E1 細胞に pA1-rAgg- β gyg-3' N と B1 を遺伝子導入しても、コロニーの出現が認められなかった。このことから、エンハンサーB1 の活性は分化した軟骨細胞特異的に発揮されることが示唆された。

< 考察 >

アグリカンは軟骨の主要成分であり、その転写は Sox9、Sox5、Sox6 によって制御されると報告されている。しかし今回、SOX トリオが結合すると報告されている既知のエンハンサーA1、A2、A3 だけでは、内在性のアグリカン遺伝子の高発現を達成するには不十分であることが分かった。よって、アグリカン遺伝子の高発現に関与するエンハンサーのスクリーニングを行ったところ、転写開始点から 30-kb 上流に位置するエンハンサーB1 (475bp) を同定した。近年、ChIP-Seq を用いたエンハンサーの探索を行った研究によっても、この領域がエンハンサー領域である可能性が示唆されている。つまり、B1 領域は *in vivo* の軟骨細胞においてもエンハンサー活性を持つと考えられる。

薬剤選択によって得られたコロニーは、X-gal 染色を行うと様々な染色強度を示した。これは、遺伝子導入時のコンカテマーの形成や染色体位置効果などが原因と考えられる。また、B1 のエンハンサー活性は、領域を短くしていくにつれて徐々に減弱していった。これは、II 型コラーゲンのエンハンサーE2 を同定した際には見られない現象であった。このことから、B1 がエンハンサー活性を示すには、クロマチンの特異的な高次構造の形成が必要な可能性、または複数の転写因子が結合する可能性などが考えられる。SOX9 がこの領域にかかわるのかも含め、今後 B1 に結合する転写因子を同定する必要がある。

アグリカンと II 型コラーゲンの軟骨細胞での発現には SOX9 が重要であることは広く知られているが、アグリカンと II 型コラーゲンの SOX9 結合領域の塩基配列には相同性が見られない。それにもかかわらず、アグリカンと II 型コラーゲンのそれぞれのシス性のエンハンサーは互いに同様な機能を有している。そこで、エンハンサーB1 と E2 の互換性を調べたところ、どちらのエンハンサーともに互換性が認められた。しかし、B1 のエンハンサー活性は E2 よりも弱かった。このことから、アグリカンと II 型コラーゲンの *in vivo* での発現制御は、異なるメカニズムで動いている可能性が考えられた。

< 結論 >

本研究では、アグリカン遺伝子を含む約 130-kb の領域にわたりエンハンサーのスクリーニング

を行い、転写開始点から約 30-kb 上流の領域にアグリカンの高発現を制御するエンハンサーB1 を同定した。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 4750 号	池田 裕一
論文審査担当者	主 査 井関 祥子 副 査 春日井 昇平、横山 三紀	
(論文審査の要旨) 軟骨はアグリカンや II 型コラーゲンなど豊富な細胞外マトリックスを含む、高度に分化した組織である。組織内では、II 型コラーゲンが高密度な線維ネットワークを形成して構造的剛性を発揮している。またアグリカンは高い浸透圧により水を組織内に引き入れ、クッションの役割を果たしている。このことからアグリカンと II 型コラーゲンは軟骨組織の形成と適切な機能の発現に欠かすことのできないものと言える。 これまでに II 型コラーゲンとアグリカンの転写制御に関しては広く研究されており、近年のこれら分子の転写制御に関する研究により、転写因子 SOX9 が特異的発現をコントロールしていることが明らかになっている。しかし、軟骨での II 型コラーゲンとアグリカンの高発現を制御するメカニズムに関しては未だに不明な点が多い。2012 年には篠村らの研究によって、II 型コラーゲンの高発現を制御するエンハンサー E2 が同定されている。よって本研究において、池田は軟骨細胞におけるアグリカンの発現を転写レベルで検討し、アグリカンの高発現に重要なエンハンサーの存在を検討した。 本研究ではまず、ラットのアグリカン遺伝子をコードする Bac clone (167-kb)を制限酵素で切断し、17 個のゲノム DNA 断片のクローニングを行った。クローニングしたゲノム DNA から、プロモーター領域、Exon1 領域、3' 末端領域をそれぞれ切り出し、β-galactosidase と hygromycin phosphotransferase の融合遺伝子と組み合わせ、アグリカンのレポーターコンストラクトを作成した (prAgg-β yg-3' N)。また、prAgg-β yg-3' N にこれまでにアグリカンのエンハンサーとして報告されている A1、A2、A3 を組み込んだレポーターコンストラクトも作成した。(pA1-rAgg-β yg-3' N、prAgg-A2-β yg-3' N、prAgg-A3-β yg-3' N)。次に、直鎖化したこれら 4 種類のレポーターコンストラクトを単独で、あるいは上述したゲノム DNA 断片と共にラット軟骨肉腫細胞に遺伝子導入し、hygromycin B 存在下での耐性コロニーの形成、および得られたコロニーでのエンハンサー活性のレベルを X-gal 染色で検討した。そして活性を認めた DNA 断片をさらに細分化して同様にエンハンサー活性を検討し、領域の絞り込みを行った。 本研究において、池田裕一は組換え DNA 実験の方法、軟骨における遺伝子発現・転写メカニズムに関してよく理解し、用意周到な準備計画のもとに本実験を遂行したと判断される。また、遺伝子の高発現を制御するエンハンサーの活性レベルを検討するために、レポーター遺伝子として β-galactosidase を用いて新たなエンハンサー B1 を同定した点、そしてエンハンサー B1 の軟骨細胞特異性を示したことは高く評価できる。		

本研究の主たる結果は、以下の通りである。

作成した 4 種類のレポーターコンストラクト単独でラットの軟骨肉腫細胞に遺伝子導入を行うと、pA1-rAgg- β gyg-3' N を導入した群が、ほかの群に比べ有意なコロニー数の増加を示した。しかし、軟骨肉腫細胞は内因性に高いアグリカンの発現が認められているにもかかわらず、X-gal 染色陽性コロニーはほとんど認められず、アグリカンの高発現を制御する新たなエンハンサーの存在が示唆された。

この新たなエンハンサー領域の同定のために、pA1-rAgg- β gyg-3' N とともにアグリカンのゲノム DNA 断片をラット軟骨肉腫細胞に遺伝子導入してスクリーニングを行い、転写開始点から約 30-kb 上流のゲノム DNA 断片 (7.4-kb) が新たなエンハンサー領域を含む領域であることを確認した。このゲノム DNA 断片をさらに細分化してスクリーニングを繰り返し、最終的に 475-bp のエンハンサー配列 B1 を同定した。

B1 の領域は、ラット、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリの生物種間で高いホモロジーを示す領域であった。その領域には、転写因子である SOX family が結合する可能性のある配列が存在し、その配列に変異を導入すると、エンハンサー活性が低下した。

今回同定したエンハンサーB1 とは配列の相同性が認められないが SOX9 によって発現が制御される、II 型コラーゲン遺伝子 (Col2a1) のエンハンサー領域 (E2) とエンハンサーB1 に互換性があることを、アグリカン (pA1-rAgg- β gyg-3' N) と II 型コラーゲン (pCol2(P/int1)- β gyg-3' N) のレポーターコンストラクトを B1 あるいは E2 とともに軟骨肉腫細胞に遺伝子導入することで示した。

pA1-rAgg- β gyg-3' N とエンハンサーB1 を遺伝子導入した軟骨肉腫細胞をガドリニウム (0.4 mM) 処理し、線維芽細胞様に脱分化させると X-gal 染色性が消失した。また、軟骨様の性質を持たない KusaA1 細胞や MC3T3-E1 細胞に pA1-rAgg- β gyg-3' N と B1 を遺伝子導入しても、コロニーの出現が認められなかった。これらの結果から、エンハンサーB1 の活性が分化した軟骨細胞特異的であることが示唆された。

このように、池田は、よく練られた計画的な実験手法によりアグリカン遺伝子を含む約 130-kb の領域にわたるエンハンサーのスクリーニングによってアグリカンの高発現を制御する新たなエンハンサー候補領域 B1 を同定した。さらに、このエンハンサーに結合する転写因子や、組織特異性、II 型コラーゲンのエンハンサーとの互換性について検討し、軟骨組織形成維持における遺伝子発現制御において重要な基礎的データを提供したことは高く評価できる。本研究結果は、硬組織学のみならず、歯科医学やさらに幅広い分野における発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値あるものと認められた。