

非コード・アンチセンスRNAによる標的遺伝子
特異的エピジェネティック制御に関する研究

応用動物科学専攻

平成21年度博士課程 入学

指導教員 塩田邦郎 教授

熊谷 勝義

目次

緒言	1
<u>第一章 T-DMRのDNAメチル化制御に関する内在性ASncRNA 候補の探索</u>	
序論	8
材料および方法	12
結果	15
考察	20
図と表	23
<u>第二章 培養細胞系を用いたSa114領域の内在性ASncRNAによる遺伝子制御</u>	
序論	37
材料および方法	40
結果	46
考察	54
図と表	58
<u>第三章 Sa114領域に存在する内在性ASncRNAを標的にしたinducible shRNAのTgマウス作製</u>	
序論	75
材料および方法	78
結果	84
考察	90
図と表	95
総括	110
引用文献	115
論文要旨	135
謝辞	139

緒言

生物の設計図ゲノムの全塩基配列が決定されたが、ヒトを含む多細胞生物の生命活動はゲノム塩基配列という一次情報からだけでは理解できない。同じゲノムを持ちながら、どのようにして細胞の種類に特有の遺伝子(群)のみが発現し、他の遺伝子(群)は発現しないのか？また、遺伝子の発現レパートリーが細胞分裂後も維持され得るのか？は一次情報のみからは分からないからである。

エピジェネティクスとは、「DNAの塩基配列の変化を伴わずに細胞分裂後も伝達される遺伝子機能の変化について探求する学問領域」を意味する。DNAメチル化はシトシンの5位の炭素にメチル基が付加される修飾でDNAメチル化酵素によって触媒される。哺乳類ではCG配列のCがメチル化されるのに対し、植物では、CG配列に加え、CHG配列およびCHH配列(HはG以外の塩基)のCにもメチル化が認められる。DNAメチル化は細胞や組織の種類によって変化する領域、即ち組織・細胞種依存的メチル化可変領域 (tissue-dependent and differentially methylated region; T-DMR) が存在する (Shiota K *et al.* 2002)。また、ゲノムDNA上にはCpGアイランドと呼ばれるCpG配列が密に存在する領域がある。CpGアイランドの多くは遺伝子の転写調節領域付近に存在し、DNA障害と進化の淘汰圧の結果、保存されてきたと考えられている (Antequera F 2003; Fazzari MJ & Grealley JM 2004)。一方、いくつか知られるヒストンの翻訳後修飾は、様々な細胞機能制御に重要な役割を果たす。遺伝子発現やクロマチン構造の制御には、特定のリジン残基のアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP リボシル化、SUMO化などが知られている (Ruthenburg AJ *et al.* 2007; Berger SL 2007)。このエピジェネティック制御は、DNAメチル化とヒストン修飾以外にもヒストン・シヤペロ

ン、その他の核タンパク質が相互作用することで成立している。非コード・アンチセンスRNAは、配列特異的な遺伝子発現抑制(Willingham AT & Gingeras TR 2006)や、X染色体不活性化転写後遺伝子発現抑制に働く(Sado T *et al.* 2005)だけではなく、ヘテロクロマチンの形成に関わることで遺伝子の転写抑制に寄与する(Shamovsky I and Nudler E 2006; Mercer TR *et al.* 2009; Ponting CP *et al.* 2009; Wilusz JE *et al.* 2009) ことなどから、新たに非コード・アンチセンスRNAがエピジェネティクス制御に関連していることが明らかとなってきた(図G-1)。

DNAメチル化は、動き回る遺伝子であるトランスポゾンの活動抑制、哺乳類のメス個体が持つ2本のX染色体の片方のX染色体の不活性化、親の性に依存した遺伝子の抑制であるゲノミックインプリンティング、および、組織特異的な遺伝子発現など、様々な生命現象に関わっている。また、CpG配列の多少に関わらず正常組織においてもT-DMRが存在し、このT-DMRのメチル化パターンにより、遺伝子ごとに組織や細胞腫に特異的な発現を制御していることが知られている(Imamura T *et al.* 2001; Cho JH *et al.* 2001; Nishino K *et al.* 2011; Hattori N *et al.* 2004)。哺乳類のゲノム上には細胞の種類に応じてメチル化と非メチル化のT-DMRが多数存在しており、細胞種特異的メチル化・非メチル化模様(DNAメチル化プロファイル)ができあがる(Shiota K 2004)(図G-2)。1個の受精卵から約200種類に分化し、組織や機能に応じて専門化した体細胞が作られ、逆に、胎生期に生殖細胞が作られる時にも大幅なDNAメチル化プロファイルの書き換えが起きることで次世代の受精卵からの発生を担保する生殖細胞が形成され、DNAの折り畳まれ方も細胞の種類により異なってくるのである。また、T-DMRの異常なメチル化は、ガンなどの特定疾患の病因に関与している(Jones PA & Baylin SB 2002; Ushijima T 2005; Asada H *et al.* 2008)。ゲノム全域を対象としたDNAメチル化状態を解析することができるD-REAM法により、成体マウスの様々な組織のDNAメチル化プロ

ファイルが明らかにされた。その結果、転写調節領域のT-DMRはゲノム上広範囲に存在し、様々な組織で広範囲な機能に関わる遺伝子を制御していることが明らかとなった (Yagi S *et al.* 2008)。すなわち、T-DMRのメチル化状態は、組織・細胞種特異的な遺伝子の発現制御に重要なのである。

現在までに哺乳類で活性が確認された DNA メチル化酵素として、DNMT1, DNMT3a, DNMT3b が報告されている。DNMT1 は全ての細胞に発現しており、DNA の複製の際には、親鎖のシトシンメチル化（ヘミメチル化）を認識して新生鎖にもメチル基を導入することで複製前のメチル化状態を維持させる。どの DNA メチル化パターン維持に重要な役割を果たす (Jeltsch A 2006)。一方、DNMT3a と DNMT3b は互いに高い相同性をもつファミリー遺伝子であり、組織特異的な発現を示し、既存の DNA メチル化に依存せずに新たに DNA メチル化 (de novo DNA メチル化) を導入する活性を持つ (Lei H *et al.* 1996; Okano M *et al.* 1998; Cheng X & Blumenthal RM 2008)。しかし、これらの DNA メチル化酵素は、CpG 配列に作用してメチル化を修飾させる以外に機能を持たない。様々な組織のメチル化プロファイルを形成する T-DMR の CpG 配列へ DNA メチル化酵素がリクルートされることでメチル化の制御が行われていることが予想される。この T-DMR のメチル化パターン形成のメカニズムを明らかにすることで、狙った遺伝子のエピジェネティックな活性化状態を自在に操れる可能性がある。

Sphk1 遺伝子の T-DMR を含む転写調節領域において、同定された内在性アンチセンス・非コード RNA (以後、内在性 ASncRNA と称する) は、Sphk1 遺伝子が発現しているアレルでは発現せず、逆に Sphk1 遺伝子が発現していないアレルで発現する。つまり、Sphk1 の内在性 ASncRNA が発現しているアレルでは、センスの Sphk1 mRNA の発現を抑制し、遺伝子転写調節領域の T-DMR のメチル化を誘導している可能性が考えられた。一方で、内在性 ASncRNA の一部の配列を人為的に過剰発現させると、Sphk1 遺伝子の

T-DMR は領域特異的に脱メチル化される (Imamura T *et al.* 2004)。つまり、Khps1 の解析からは、内在性 ASncRNA と人為的に導入した ASncRNA では働きが違う可能性が高いものの、転写調節領域に内在性 ASncRNA を持つ遺伝子で、ASncRNA 量を人為的に変化させることで特定ゲノム領域の DNA メチル化状況を狙った方向に変える事が出来る可能性を示唆している。

本研究では、細胞種ごとにセンス mRNA の発現と一致する内在性 ASncRNA による T-DMR の DNA メチル化制御について明らかにする事を目的とし、第一章では T-DMR の DNA メチル化制御に関与する内在性 ASncRNA 候補の探索を行い、第二章では培養細胞系を用いた内在性 ASncRNA の遺伝子発現制御を明らかにし、第三章では Sa114 領域に存在する内在性 ASncRNA を標的にした inducible shRNA の Tg マウス作製を行った。

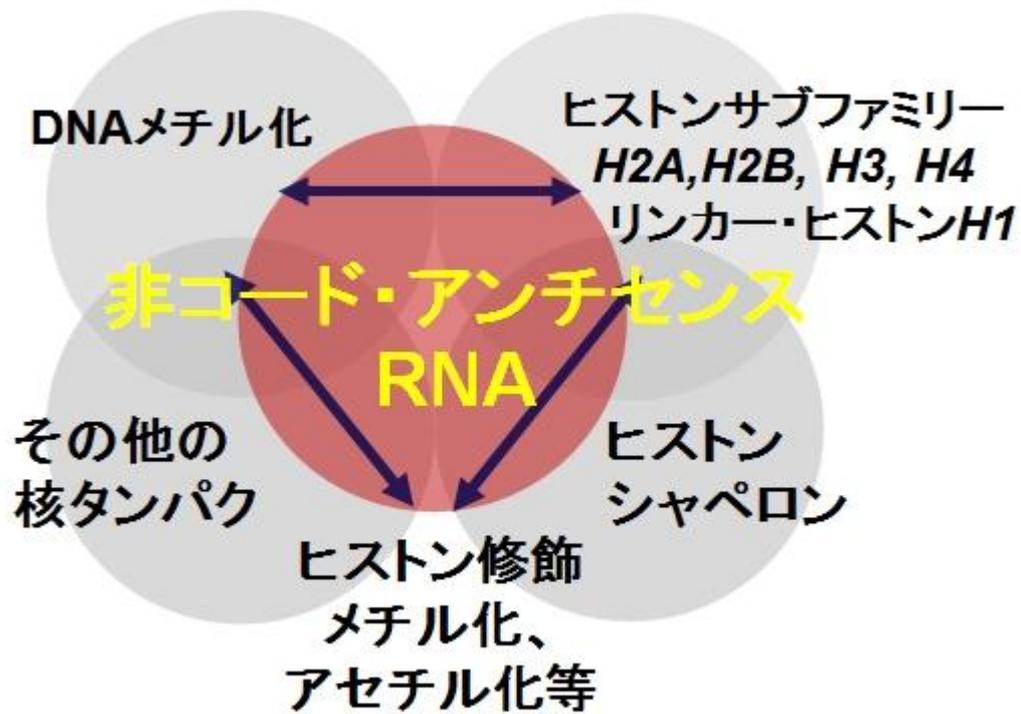


図 G-1. エピジェネティック制御

エピジェネティック制御は、DNA メチル化とヒストンサブファミリー、リンカー・ヒストン、ヒストン・シャペロン、ヒストンのメチル化、アセチル化、その他の核タンパク質が相互作用することで成立している。近年、新たに非コード・アンチセンス RNA がエピジェネティック制御に関わっていることが明らかとなってきた。

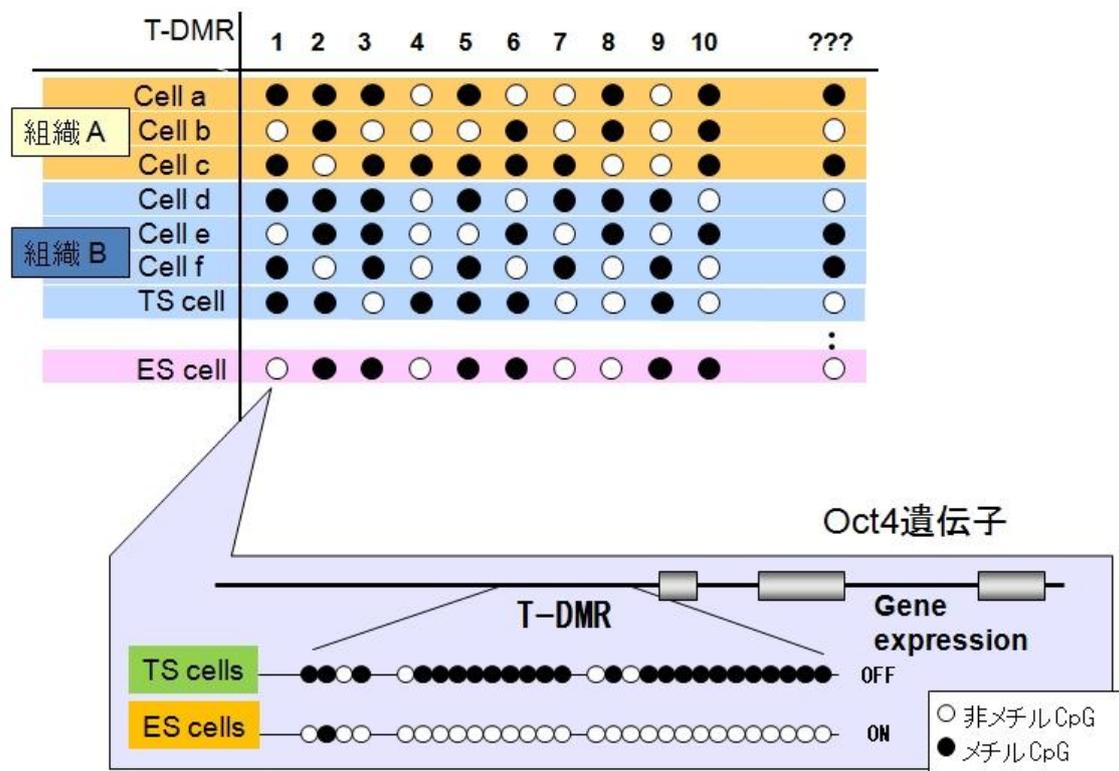


図 G-2. 遺伝子転写調節領域に存在する組織・細胞種依存的メチル化可変領域(T-DMR) 遺伝子転写調節領域に存在する組織・細胞種依存的メチル化可変領域 (tissue-dependent and differentially methylated region;T-DMR)のメチル化パターンにより、遺伝子の ON/OFF が制御される。例えば Oct4 遺伝子は、TS cells の T-DMR では、高メチル化状態のため発現せず、ES cells の T-DMR では、非メチル化状態のため発現する。T-DMR のメチル化パターンにより、組織や細胞の種類ごとにメチル化プロファイルが形成される。

第一章

T-DMR の DNA メチル化制御に関する内在性 ASncRNA 候補の探索

序論

哺乳類のゲノムでタンパク質をコードする領域はほんのわずかであり、コードしない領域はヒトでは98~99%にのぼる(Cheng J *et al.* 2005)。ところが転写物について見てみると、タンパク質をコードする mRNA 以外に、タンパク質をコードしない転写物が多数存在することも近年わかり始めた(Cheng J *et al.* 2005; Carninci P *et al.* 2005; Ota T *et al.* 2004)。このような non-coding RNA(非コード RNA:以後 ncRNA と称する)はタンパク質をコードしない多種多様な RNA 転写物の総称である。広義にはリボソーム RNA(rRNA)や転移 RNA(tRNA)を含む(Gibb EA *et al.* 2011)が、狭義には rRNA や tRNA を除く RNA 種を指すことが多い(Storz G 2002)。これまでに、ncRNA は大規模なトランスクリプトームのシーケンス解析、あるいはゲノムワイドのマイクロアレイ解析から発見されている(Washietl S *et al.* 2005; Carninci P *et al.* 2005; Hüttenhofer A & Vogel J 2006; Katayama S *et al.* 2005)。また、ヒトとマウスのゲノムからの転写では、最大半分程度は ncRNA を生じることが報告されている(Mercer TR *et al.* 2009; ENCODE Project Consortium *et al.* 2007)。しかし、機能が明らかにされた ncRNA として同定されているものはわずかであり、残りは transcript of unknown function(TUF)とよばれるものである(Cheng J *et al.* 2005; Willingham AT & Gingeras TR 2006)。このうちアンチセンス・非コード RNA (以後、ASncRNA と称する)は、タンパク質をコードするセンス(mRNA)の反対鎖が転写される。網羅的な cDNA 解析により、多くの ASncRNA が転写されていることがわかってきた(Katayama S *et al.* 2005; Cheng J *et al.* 2005)。その一部は機能を有し、遺伝子発現を制御している(表 1-1)。しかし、これらの網羅的な解析から同定されたセンス-アンチセンス転写物のペアでは、例えばある組織でセンス転写物のみが発現し、別の組織でアンチセンス転写物のみが発現するものもペアとして多いため、センス転写物とアンチセンス転写物の関係が不明確なものも多い。さらにタンパク質をコードするセンス RNA のゲノム上の

どの位置にアンチセンス転写物が存在するかによって、アンチセンス RNA の機能も異なると考えられるが、その区別も不明瞭であった。一方で、個々の遺伝子領域の解析から、ヒトの前立腺ガンや乳ガン、肺ガンなど特定疾患に関連する ncRNA も報告されており、ポリコーム複合体の一つである PRC2(Polycomb repressive complex 2)を標的領域にリクルートすることによって、ヒストン修飾および PRC1 による更なる不活性化が誘導され、標的領域近傍の遺伝子がエピジェネティックに不活性化されるものがある(Hekimoglu B & Ringrose L 2009; Jovanovic J *et al.* 2010)。その一部の ncRNA については、アルツハイマーや肺ガンなどの特定疾患に関連することも報告されている(表 1-2)。しかし、これらの ncRNA についても、細胞のガン化に伴って ncRNA の発現が異常になるものや、染色体 DNA の転座や欠失を伴う ncRNA 自体の配列異常が多く見受けられる。以上より、ゲノムから転写されるアンチセンス RNA を始めとした多数の ncRNA について、正常な細胞分化や個体発生過程においても、遺伝子発現制御機構としてエピジェネティック制御に関わるかどうかを明らかにすることが必要となってきた。

エピジェネティクスに関係する ncRNA としては、Dicer によって生成する短い二本鎖 RNA (double-strand RNA; dsRNA) によるものもよく知られている。植物のヘテロクロマチン形成では、Dicer によって生成する small interfering RNA (siRNA) が相同な配列を持つゲノム領域へリクルートされることによって、DNA メチル化やヒストン修飾を介した標的領域のクロマチン不活性化が引き起こされる(Martienssen RA *et al.* 2005; Chan SW *et al.* 2005; Matzke M *et al.* 2004)。植物での siRNA による DNA メチル化の亢進は、RdDM(RNA-directed DNA methylation)と呼ばれ、siRNA と相同な配列を持つ領域周辺で DNA 配列のシトシンが新たにメチル化(de novo メチル化)される(Chan SW *et al.* 2005; Matzke M *et al.* 2004)。この DNA メチル化はヘテロクロマチン化の要因の一つであり、いくつかのレトロトランスポゾンなどの繰り返し配列が、

自身の配列に由来する内在性 siRNA により DNA メチル化されることで、繰り返し領域のクロマチン不活性化が引き起こされる (Chan SW *et al.* 2005)。動物の細胞でも、合成した siRNA の細胞への導入により、抑制性のヒストン修飾を誘導することで siRNA と相同な配列を持つプロモーターを不活性化することが報告されている (Kim DH *et al.* 2006)。しかし、動物細胞での人工的に合成した siRNA の導入による標的プロモーターの不活性化は、細胞本来の遺伝子制御機構ではない可能性が高い。これ以外の短い二本鎖 dsRNA によるエピジェネティック制御では、piRNA (PIWI-interacting RNA) による IAP や LINE-1 (または L1) などのレトロトランスポゾン配列の DNA メチル化が報告されている (Kato Y *et al.* 2007)。これらレトロトランスポゾン配列の DNA メチル化には、DNA メチル化酵素 DNMT3A および DNMT3B と PIWI タンパク質、piRNA が必要である (Kato Y *et al.* 2007; Aravin AA *et al.* 2008; Kuramochi-Miyagawa S *et al.* 2008)。piRNA は 24~30 ヌクレオチド程度の生殖巣に特異的な RNA で PIWI タンパク質と結合する。この piRNA による DNA メチル化制御は主にレトロポゾンの不活性化に働いており、内在性遺伝子の細胞分化などに伴う DNA メチル化制御とは異なる。以上のように、動物細胞における短鎖 dsRNA によるエピジェネティック制御は、これまでの研究では人工的な siRNA によるものやレトロポゾンなどの外来因子の制御に関わるものが多く、細胞の性質決定や環境への応答に重要な内在性遺伝子での細胞種特異的 DNA メチル化制御とは異なっていると考えられる。

組織特異的な遺伝子発現を示す Sphk1 では、プロモーター領域に CpG アイランド(約 3.7kb)が存在する。この中の約 200bp の領域は、組織によって異なるメチル化パターンを有する T-DMR である (Imamura *et al.* 2001)。Sphk1 遺伝子転写調節領域近傍の T-DMR のメチル化パターンは、個体の発生に伴って形成される。脳では T-DMR の低メチル化状態が胎仔期から成体まで維持されつづける。逆に、心臓では胎仔期には低メチル化状態にあるが、発生過程で徐々にメチル化され、成熟したラットでは高メチル

化となる(Imamura *et al.* 2001)。Sphk1 には CpG アイランド内に複数のエクソン 1 を使い分ける 6 種類のサブタイプが存在するが、これらのサブタイプはそれぞれ組織特異的な発現パターンを示す。そのうちの Sphk1a の発現と T-DMR のメチル化は関連性がある(Imamura *et al.* 2001)。さらに、Sphk1 遺伝子の転写調節領域で発見された内在性 ASncRNA (Khps1) は、Sphk1 遺伝子の転写調節領域の T-DMR にオーバーラップする形で mRNA とは逆のアンチセンス方向へ転写される(Imamura *et al.* 2004)。この Khps1 は、Sphk1 遺伝子が発現しているアレルでは発現せず、逆に Sphk1 遺伝子が発現していないアレルで発現する。すなわち、内在性の Khps1 は、発現しているアレルにおいて、Sphk1 転写調節領域の T-DMR の DNA メチル化を誘導する方向に働いている可能性が考えられる。一方で、Sphk1 の T-DMR がメチル化されている培養細胞に Khps1 の一部の配列を過剰発現させると、Sphk1 遺伝子の T-DMR は領域特異的に脱メチル化される(Imamura *et al.* 2004)。つまり、内在性 ASncRNA 量を人為的に変化させることで特定のゲノム領域の DNA メチル化状況を変える事ができる可能性を示唆している。しかし、これまでに Khps1 を始め当研究室で発見された遺伝子転写調節近傍の内在性 ASncRNA は、GC リッチな CpG アイランドと関連し、発現量が少ないものが多いために増幅・検出が困難であると予想される。多くのトランスクリプトーム解析でも Khps1 と類似した転写調節領域近傍の内在性 ASncRNA と考えられるものについての報告はほとんどなく、転写制御に関与する内在性 ASncRNA を持つ遺伝子は、大部分の網羅的な解析において見逃されて来た可能性が高い。Sphk1 遺伝子の内在性 ASncRNA は特殊な例なのか？逆に、個体発生や細胞分化に重要な遺伝子群にもエピジェネティックな転写制御に関与する ASncRNA が存在するのかを明らかにする必要がある。

そこで第一章では、胚性幹細胞(ES 細胞)の多分化能維持や細胞分化および個体形成に重要な遺伝子群に注目し、細胞種ごとに内在性 ASncRNA がセンス mRNA のエピジェネティックな発現調節に関与している可能性のある遺伝子の探索を行った。

材料および方法

試薬

試薬は、特に断りがない限り和光純薬より購入した。

ES 細胞の培養・調整

未分化状態での培養の為に、購入した液体の DMEM(invitrogen)に最終濃度で 20%KSR(invitrogen)、100 μ M MEM Non-Essential Amino Acid(invitrogen)、1mM Sodium Pyruvate(invitrogen)、100 μ M 2-Mercaptoethanol(nakalai tesque)、1000 単位/ml の白血病抑制因子(LIF:leukemia inhibitory factor、商品名 : ESGRO, CHEMICON)になるように添加したものを使用した。

Total RNA 抽出

細胞・組織からの total RNA 抽出は RNeasy Mini Kit(50) (QIAGEN)を用い、添付のプロトコールに従って行った。抽出した RNA は使用するまで -80°C で保存した。

Total RNA からの cDNA 合成

Reverse Transcription (RT) 反応には、TaqMan Reverse Transcription Reagents (ABI) を使用した。TaqMan Reverse Transcription Reagents (ABI) の試薬を利用して、10 \times RT buffer 5 μ l, MgCl_2 11 μ l, dNTPs Mix 10 μ l, Random Hexamers 2.5 μ l, RNase Inhibitor 1 μ l, Reverse Transcriptase 1.25 μ l, total RNA を 1 μ g 使用し、 25°C 10min, 48°C 30 min, 95°C 5sec, 4°C の条件で反応した。

strand-specific RT-PCR 用の cDNA 合成は、TaqMan Reverse Transcription Reagents (ABI) の試薬を利用して、10 \times RT buffer 5 μ l, MgCl_2 11 μ l, dNTPs Mix 10 μ l, 50 μ M primer 2.5 μ l, RNase Inhibitor 1 μ l, Reverse Transcriptase 1.25 μ l,

total RNA を 500ng 使用し、48°C 30 min, 95°C 5sec, 4°C の条件で反応した。なお、RT のプライマー配列は表 1-4 へ示した。

RT-PCR による内在性アンチセンス RNA 検出

cDNA をテンプレートとし、内在性アンチセンス RNA の検出を行った。サンプルの cDNA は全量 50 μ l のうち、それぞれ 1 μ l を用いた。LA Taq Polymerase (TAKARA) を用いて PCR を行い、反応後に 2% アガロースゲル (Sigma) で電気泳動を行った。また、各々の内在性 ASncRNA の検出条件およびプライマーを表 1-3 へ記した。なお、内在性の遺伝子発現で発現量を補正するために β -actin を利用した。

RT-PCR によるセンス mRNA 検出

cDNA をテンプレートとし、センス mRNA の検出を行った。サンプルの cDNA は全量 50 μ l のうち、それぞれ 1 μ l を用いた。LA Taq Polymerase (TAKARA) を用いて PCR を行い、反応後に 2% アガロースゲル (Sigma) で電気泳動を行った。また、各々のセンス mRNA の PCR による検出条件およびプライマーを表 1-4 へ記した。なお、内在性の遺伝子発現で発現量を補正するために β -actin を利用した。

TaqMan Gene Expression Assay による遺伝子発現解析

TaqMan universal PCR Master Mix (ABI) を使用して ES 細胞の未分化マーカーである Nanog, Sox2, Dlx4 遺伝子の発現解析を行った。遺伝子発現解析に利用したソフトウェアは、【<http://www.appliedbiosystems.com/support/software/7700/updates.cfm>】より入手して利用した。また、各々の probe assay ID を表 1-4 へ記した。なお、内在性の遺伝子発現で発現量を補正するために β -actin を利用した。また、Nanog, Sox2, Dlx4 遺伝子については、以下の分量で試薬を調整して Assay した。

- Master Mix: 6.25 μ l

- Probe, Primer Mix solution: $0.5 \mu\text{l}$
- ミリ Q 水: $3.25 \mu\text{l}$
- 4 倍希釈 cDNA サンプル: $2.5 \mu\text{l}$

Sequencing

ASncRNA より cDNA を合成し、PCR 法により増幅した DNA 断片を TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) を用いてクローニングし、3130 Genetic Analyzer (ABI) で塩基配列を解析した。

D-REAM 法により構築した DNA メチル化データ解析・データベースからの内在性

ASncRNA 抽出

神経細胞塊 (Nsph) と胚性幹細胞 (ES 細胞) の DNA メチル化パターンを比較したデータベース (D-REAM) (Yagi S *et al.* 2008) を利用して、T-DMR を有する遺伝子群の選抜を行った。次に UCSC マウスゲノムブラウザー【<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>】より、Nsph と ES 細胞の間で DNA メチル化状態の異なる T-DMR を持つ遺伝子群について、転写調節領域付近 (-7.5kb から $+2.5\text{kb}$) にタンパク質をコードする遺伝子とは逆方向の ASncRNA が EST またはジーントラップ転写物として登録されている遺伝子群を抽出して、実際の RT-PCR による転写物解析の候補とした。

統計学的解析

統計学的解析は、2 群間を比較する実験では、対応のない両側 t 検定を用いて評価し、2 群以上の実験では、JMP® (SAS Institute) を用いて、one-way ANOVA/Tukey-Kramer の HSD 検定を行い評価した。統計分析の結果は、平均値と標準誤差を用いて示した。 $P < 0.05$ の場合を統計学的な有意差として取り扱った。

結果

転写物としてこれまでに登録されていない内在性 ASncRNA の発見

内在性 ASncRNA は遺伝子領域の GC リッチな領域から転写されるため、EST データベースのような全転写物の逆転写、PCR 増幅では効率が悪く、多くが検出困難であると考えられた。また、これまでの解析から対になる mRNA と比較して転写量が非常に少ないことも考えられた。一方で、ゲノムから転写される領域の情報としては、ES 細胞を用いたプロモータージーントラップ法によるデータベースも公開されている。プロモータージーントラップデータベースでは、内在性遺伝子のプロモーターから転写される RNA と抗性物質耐性遺伝子の融合 RNA からの翻訳産物による選別で内在性転写物の存在と方向を確定する。そのため、逆転写・PCR 増幅による膨大な種類の転写物からの競合的な増幅によって検出される EST や全転写物解析法と比べて、発現量が低く PCR による増幅が困難なものについても非常に高感度で検出できる特徴を持つと考えた。そこで、ES 細胞でエピジェネティックな転写調節に関与する可能性のある ASncRNA を探索することを目的として、ES 細胞の多分化能維持に重要な遺伝子で転写調節領域に T-DMR を持ち、ジーントラップクローンが登録されている遺伝子について、ランダムプライマーにより逆転写した cDNA からの RT-PCR 法により、転写調節領域(-250bp~-750bp)での ASncRNA 候補の検出を行った。その結果、Sox2 および Nanog の転写調節領域おり ASncRNA の候補が検出された。ASncRNA の候補と考えられる転写物が確認できたものについて、strand-specific RT-PCR 法により転写調節領域でアンチセンス方向に転写されていることの確認を行った。その結果、Sox2 および Nanog より、転写調節領域の T-DMR にオーバーラップするアンチセンス方向への転写物が確認された。

現存するタンパク質の平均的なアミノ酸の数は、概ね 50-1500 の範囲であることから、一般的にはアミノ酸の数 50 個(塩基配列数 150 bp に相当する。)以上により安定したタンパク質が翻訳される。また、RNA の中で 200 nt 以上のコード領域がないもの

を ncRNA と定義されている (Gibb EA *et al.* 2011)。そこで、検出されたアンチセンス方向への転写物がタンパク質に翻訳される可能性を検討するため、GENETYX-WIN Ver. 7.0 を用いて、Open Reading Frame (ORF) の検出および終止コドン数の確認を行った。その結果、Sox2 の転写物では、ORF として 150 bp 以上のものは存在せず、いずれの読み枠でも複数の終止コドンが検出されたことから、タンパク質をコードしない内在性 ASncRNA であることが考えられた (図 1-1A)。一方、Nanog については、約 150 bp の ORF が検出されたが、ORF のアミノ酸配列で NCBI のタンパク質データベース (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=OGP__10090__9559&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn) にてモチーフの検索を行ったところ、既知のタンパク質には存在していないアミノ酸配列であることから、内在性 ASncRNA の可能性が高いと考えられた (図 1-1A)。さらに、13.5 dpc (day of post-coitus) の胎仔と ES 細胞の比較から、内在性 ASncRNA の発現を解析した。その結果、Sox2 および Nanog で発見された内在性 ASncRNA の発現は、13.5 dpc の胎仔に比べて ES 細胞では有意に高いことが示された。また、TaqMan Gene Expression Assay により Sox2 および Nanog の mRNA の発現解析を行った。その結果、いずれにおいても 13.5 dpc の胎仔に比べて ES 細胞では有意に高いことが示された (図 1-1C)。これらの結果から、Sox2 および Nanog において、転写調節領域付近の T-DMR に転写物としてこれまでに登録されていなかったセンス mRNA と発現が一致する新規内在性 ASncRNA を発見することができた。

D-REAM 法による DNA メチル化データベースからの ES 細胞と神経細胞塊 (NSph) でメチル化可変領域 (T-DMR) を有する遺伝子選抜

DNA メチル化データベース (D-REAM) を用いれば、異なる細胞種の DNA メチル化模様を比較することで転写調節領域付近に T-DMR を持つ遺伝子を発見することができる。

そこで、D-REAM から ES 細胞と Nsph 間でメチル化状態の異なる T-DMR を有する転写因子を抽出した。11.5 dpc の Nsph より ES 細胞で高メチル化状態の T-DMR を有する遺伝子は 67 個検出された。逆に、ES 細胞より 11.5 dpc の Nsph で高メチル化状態のものは 135 個検出された。また、分化の方向が異なる 11.5 dpc の Nsph と 14.5 dpc の Nsph の比較では、11.5 dpc の Nsph より 14.5 dpc の Nsph で高メチル化の遺伝子が 19 個、14.5 dpc の Nsph より 11.5 dpc の Nsph で高メチル化状態のものは 44 個検出された(表 1-5)。なお、D-REAM のデータベースを利用した ES 細胞と Nsph との T-DMR の DNA メチル化パターンの比較例を記した(図 1-2)。

つぎに、UCSC マウスゲノムブラウザー (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) の EST データベースから、転写調節領域 (-7.5kb から+2.5kb) に内在性 ASncRNA が存在する候補遺伝子を選抜した。なお、UCSC データベースを利用した内在性 ASncRNA の候補として EST が存在する遺伝子の例を記した(図 1-3)。その結果、11.5 dpc の Nsph より ES 細胞が高メチル化状態の転写調節領域に内在性 ASncRNA の候補が存在する遺伝子は 16 個検出され、ES 細胞より 11.5 dpc の Nsph が高メチル化状態のときでは 43 個抽出された。同様に Nsph 同士の比較では、11.5 dpc の Nsph より 14.5 dpc の Nsph が高メチル化状態の遺伝子で 3 個、14.5 dpc の Nsph より 11.5 dpc の Nsph が高メチル化状態のもので 9 個、内在性 ASncRNA の候補が見出された(表 1-6)。

RT-PCR および strand-specific RT-PCR 法による転写物の検出

表 1-6 の遺伝子群について、ランダムプライマーを用いて逆転写した cDNA を用いて RT-PCR 法による転写物の検出を行うことで、実際に候補とした EST が ES 細胞または Nsph で発現しているかどうかの予備的な確認を行なった。予備検討により ASncRNA と考えられる転写物が検出できた候補について、strand-specific RT-PCR 法により転写物がタンパク質をコードする遺伝子とは逆向きのアンチセンス方向に転写されていることを確認した。その結果、6 つの遺伝子(Gli3、Foxj2、Yy1、Rfx1、Dlx4、Sall4)に

ついて、アンチセンス方向の転写物が検出された。これらの結果から、遺伝子転写調節領域付近にアンチセンス方向の転写物を持つ遺伝子を検出することができた(図 1-4)。

この解析から見出した 6 遺伝子について、Sox2 および Nanog のときと同様に、150 bp 以上の ORF の検出を検討した。その結果、Foxj2、Yy1、Rfx1、Dlx4、Sal14 の転写物では、ORF として 150 bp 以上のものは存在せず、いずれの読み枠でも複数の終止コドンが検出されたことから、タンパク質をコードしない内在性 ASncRNA であることが考えられた(図 1-4)。一方、Gli3 では 250 bp の ORF が検出されたが、NCBI のタンパク質データベースにて ORF のアミノ酸配列よりモチーフの検索を行ったところ、既知のタンパク質には存在していないアミノ酸配列であることが確認された。このことから、Gli3 においてアンチセンス側に検出された転写物は、内在性 ASncRNA の可能性が高いと考えられた(図 1-4)。

選抜した 6 遺伝子における内在性 ASncRNA と mRNA の発現解析

選抜した 6 遺伝子において、神経系細胞への運命がすでに決定した 11.5 dpc の Nsph と多分化能を持つ ES 細胞の比較から、内在性 ASncRNA と mRNA の発現解析を行った。なお、内在性 ASncRNA の発現解析は strand-specific RT-PCR 法を用いた。また、mRNA の発現解析は、Dlx4 を除く 5 つの遺伝子(Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1, Sal14)においては RT-PCR 法で発現解析を行い、Dlx4 は TaqMan Gene Expression Assay により発現解析を行った。その結果、Foxj2、Gli3、Rfx1、Yy1 遺伝子では、内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現がともに ES に比べて Nsph は有意に高いことが示された。逆に、Sal14、Dlx4 遺伝子では内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現がともに Nsph に比べて ES は有意に高いことが示された(図 1-5)。これらの結果から、ASncRNA は mRNA と同じ発現を示すことが明らかとなった。

DNA メチル化パターンと内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現との関係

D-REAM 法を用いた Nsph と ES における T-DMR のメチル化状態の比較から、Foxj2、Gli3、Sall4、Sox2、Nanog 遺伝子において、低メチル化状態の細胞では内在性 ASncRNA と mRNA の発現が共に高く、高メチル化状態の細胞では内在性 ASncRNA および mRNA の発現が共に低いことが示された(図 1-1、図 1-4、図 1-5)。このことから、これらの遺伝子で見出された内在性 ASncRNA は、タンパク質をコードするセンス遺伝子の転写調節領域付近の T-DMR のメチル化を制御している可能性が考えられた。以上の 5 遺伝子におけるセンス mRNA と内在性 ASncRNA の関係は、Sphk1-Khps1 とは異なることが考えられる。一方、Rfx1、Yy1、Dlx4 遺伝子については、低メチル化状態の細胞で内在性 ASncRNA と mRNA の発現が共に低く、高メチル化状態の細胞で内在性 ASncRNA および mRNA の発現が共に高いことが示された(図 1-4、図 1-5)。これらのことから、これらの遺伝子で見出された内在性 ASncRNA は Sphk1 の内在性遺伝子である Khps1 のように、内在性 ASncRNA が遺伝子転写調節領域の T-DMR のメチル化を誘導する方向へ働いている可能性が考えられた。

考察

網羅的なトランスクリプトーム解析から、最大 70%程度の転写物にセンス-アンチセンス転写物が存在することが報告されているが (Katayama S *et al.* 2005)、アンチセンス RNA とセンス mRNA とのゲノム上での位置関係に基づいたアンチセンス RNA の機能についてはあまり明確にされていなかった。本章では、D-REAM のデータベース (Yagi *et al.* 2008) を利用することで ES 細胞と Nsph 細胞の比較から T-DMR を有する遺伝子を抽出し、それらの転写調節領域に注目して ASncRNA を持つ遺伝子の候補を選抜した。ES 細胞と Nsph 細胞における内在性 ASncRNA と mRNA の発現パターンの比較から、センス-アンチセンス RNA がどちらも発現しうることを明らかにした。つまり同種の細胞でセンス-アンチセンス RNA のペアを両方とも発現する遺伝子が多いと考えられる。しかし、同じ細胞腫でセンス、アンチセンス RNA とともに発現が見られたが、それが一つの細胞内で起きているのか、あるいは、ある細胞ではセンス RNA のみが発現し、また別の細胞ではアンチセンス RNA のみが発現しているのかなどは今後明らかにする必要がある。また、D-REAM のデータベースより ES 細胞と Nsph 細胞の比較から T-DMR のメチル化パターンを検出し、センス-アンチセンス RNA の発現パターンとの関連性を明らかにすることができた。以上より第一章では Khps1 とは逆に、センス-アンチセンス RNA がともに発現するものを複数同定することができた。

エピジェネティック制御を介し、遺伝子制御機構に関わる可能性のある ncRNA は、抑制性ヒストン修飾を誘導する人工的に合成した siRNA やレトロトランスポゾンの発現を抑制する piRNA が挙げられる。プロモーターを標的とした siRNA が、主に抑制性ヒストン修飾を誘導し、転写レベルでプロモーター下流の遺伝子の発現を抑制することが報告されている (Kim DH *et al.* 2006)。つまり、導入された siRNA はヒストン修飾を介して相同的な配列をもつ標的ゲノム領域を不活性化する。一方、piRNA は内在

性の短鎖 dsRNA であるが、染色体上のトランスポゾンなどの繰り返し配列のエピジェネティック制御が主であり、細胞の性質を決定したり環境に応答して発現するような内在性遺伝子では別の制御があると考えられる (Kuramochi-Miyagawa S *et al.* 2008)。本章で発見した ASncRNA は、内在性の一本鎖 RNA であり、転写調節領域 T-DMR のメチル化を制御する可能性がある。つまり、人工的に合成した siRNA やトランスポゾンに主に作用する piRNA のような短鎖 dsRNA とは異なり、遺伝子転写調節領域付近の ASncRNA は、繰り返し配列ではない内在性遺伝子の転写調節領域に存在する T-DMR を制御すると考えられる。

本章では、EST として ASncRNA の候補がすでに登録されていたものについて、ASncRNA を同定することができたことから Khps1 は例外ではなく、多くの遺伝子の転写制御領域に ASncRNA が存在することが明らかになり、内在性 ASncRNA は T-DMR のメチル化パターンを制御する可能性がある。一方で、これまでのトランスクリプトーム解析により多種多様な ncRNA の発見に至っているが、内在性 ASncRNA に関しては、Khps1 のようにセンス mRNA の遺伝子転写調節領域は GC リッチであることが多く、内在性 ASncRNA は発現量も低いことから検出が困難であると考えられた。つまり、網羅的なトランスクリプトーム解析では見逃されてきた可能性がある。そこで、これまで見逃されてきた EST とは異なる内在性転写物のデータベースであるプロモータージーントラップに注目した。実際に、ES 細胞の多分化能維持に関する遺伝子のうち、ジーントラップデータベースにアンチセンス方向の転写物が登録されている Nanog と Sox2 において、EST としては登録されていない新規内在性 ASncRNA を発見することができた。この事実から、やはりこれまでの網羅的解析では検出困難な内在性 ASncRNA が多かったと考えられる。

Sphk1 遺伝子の転写調節領域に存在する内在性 ASncRNA (Khps1) は、センス Sphk1 mRNA が発現しているアリルでは発現せず、逆に Sphk1 mRNA が発現していないアリル

で発現する (Imamura T *et al.* 2004)。すなわち、内在性 Khps1 は、Khps1 の発現するアレルでは Sphk1 mRNA の発現を抑制する。または、Sphk1 上流領域の T-DMR の DNA メチル化を誘導することが考えられる。本章では、同じ細胞種で mRNA の発現が高いときに内在性 ASncRNA の発現も高い傾向を示す 8 遺伝子を見出した。これらは、これまでに報告がある Sphk1 と Khps1 の発現様式とは逆の発現様式である可能性が考えられる。この内、5 遺伝子の内在性 ASncRNA は、転写調節領域の T-DMR が低メチル化状態のときに高い発現を示し、逆に T-DMR が高メチル化状態のときは発現が低いことから、同じ細胞種において、遺伝子の転写調節領域付近の T-DMR を非メチル化に維持している可能性が考えられる。以上の結果から、転写制御に関係のある ASncRNA では、Khps1 による制御とは逆に作用するものも存在することが強く示唆されたが、実際に内在性 ASncRNA を発現する細胞での DNA メチル化制御については、明らかにすることが必要である。

表 1-1. ncRNA の種類と機能

ncRNAのType	長さ(nt)	機能	ncRNAの作用部位	Reference
miRNA (microRNA)	21-25	翻訳効率、 クロマチン制御など	標的遺伝子および広範囲な ミスマッチ部位	Racz Z <i>et al.</i> 2011
piRNA (Piwi-interacting RNA)	25-31	Piwiタンパク質と 相互作用	他のncRNA配列	Watarabe T <i>et al.</i> 2011
siRNA (small interfering RNA)	21-23	配列特異的な遺伝子 発現抑制	標的遺伝子および標的遺伝子に 類似した領域	Morris KV <i>et al.</i> 2004
rasiRNA (repeat associated RNA)	24-29	遺伝子発現制御	Piwiへ結合	Gunawardane LS 2007
scaRNA (small Cajal body specific RNA)	60-330	RNAプロセッシング	mRNAやリボソームRNA	Deryusheva S <i>et al.</i> 2009
lncRNA (long non-coding RNA)	(17Kbp)	X染色体の不活性化	標的遺伝子を含む近傍の 遺伝子領域	Hoki Y <i>et al.</i> 2009
snoRNA (small nucleolar RNA)	60-300	RNAプロセッシングや ヌクレオチド修飾	リボソームRNA	Kiss T 2001
lincRNA (Large intergenic non- coding RNA)	200<	多能性維持や分化経路 の制御	標的遺伝子を含む近傍の 遺伝子領域	Guttman M <i>et al.</i> 2011
ASncRNA (Antisense non-coding RNA)	-	脱メチル化誘導	標的遺伝子特異的	Imamura T <i>et al.</i> 2004
	-	mRNA発現制御	標的遺伝子特異的	Hernandez <i>et al.</i> 2004
	-	mRNAの安定	標的遺伝子特異的	Matsui K <i>et al.</i> 2008

表 1-2. ヒトの病気に関連する ncRNA

ncRNAの Type	name	機能	関与する病気	エピジェネティクス制御との関連	Reference
lncRNA	PCA3	前立腺ガンでの過剰発現	前立腺ガン	不明	De Kok JB <i>et al.</i> 2002
lncRNA	MALAT-1	初期の非小細胞性肺ガンでの転移、スフィンジンシグナル制御	肺、膀胱、膵臓、肝臓ガン等	不明	Ji P <i>et al.</i> 2003
lncRNA	ANRIL	前立腺ガンの亢進	前立腺ガン	PRC1のCBX7、PRC2 Pasmant E <i>et al.</i> 2007	
lncRNA	H19	インブリカイン	肺、膀胱、肝臓、卵巣ガン等	不明	Yoshimizu T <i>et al.</i> 2008
lincRNA	HOTAIR	乳ガン転移の指標である HOXD遺伝子抑制	乳ガン	PRC2やヒストン修飾	Rinn JL <i>et al.</i> 2007
	aHIF	肺ガンの予後診断のバイオマーカー	肺ガン	H3K27me3 ↑ 不明	Carye A <i>et al.</i> 2003
	LIT1	インブリカイン	Beckwith-Wiedemann 症候群	PRC2やヒストン修飾 H3K9me3 ↑ H3K27me3 ↑ 強制発現させると、p15のプロモーター領域が	Arima T <i>et al.</i> 2005 Pandey R. 2008
ASncRNA	p15AS	p15ガン抑制遺伝子をサイレンシング	白血病	H3K4me2 ↓ H3K9me2 ↑ 不明	Yu W <i>et al.</i> 2008
	FMR4	アポトーシス抑制	脆弱X症候群	不明	Khalil AM <i>et al.</i> 2008
	BACE1-AS	BACE1遺伝子発現と相関	アルツハイマー	不明	Faghihi MA <i>et al.</i> 2008

表 1-3. 内在性 ASncRNA および mRNA 検出用プライマー

RT-PCRで使ったプライマー 標的分子	Forward配列	Reverse配列	PCR cycles
Gli3内在性AsncRNA	5'- GAAGGGCCCGTCCAGGACAGAGGGCGGGGGG96°C CGA-3' TG-3'	5'- TG-3'	5 min; 96°C 30 sec, 68°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 30 cycles; 72°C 5 min
FoxJ2内在性AsncRNA	5'- GTCAGTTGGAGATCTGA GTG-3'	5'- GCTCCAGGGAGTCTAATGC96°C T-3'	5 min; 96°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Yy1内在性AsncRNA	5'- CCGCTCCGGGGCCCCAGCTCGTCAGAGCAGACTTTA TCG-3'	5'- 96°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min T-3'	5 min; 96°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Rfx1内在性AsncRNA	5'- CCCGGTTACCTCGGCTCGCCTTTAGGGTTAGCTT TC-3'	5'- 96°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min -3'	5 min; 96°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Sall4内在性AsncRNA	5'- CCCATTCCAGAAATCGGCTCACATGTAGGGCCGACTA95°C CCCGGAA-3' CACAAAGGC-3'	5'- 95°C 30 sec, 62°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min CACAAAGGC-3'	5 min; 95°C 30 sec, 62°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min
Dlx4内在性AsncRNA	5'- CCAAITGTTGCTGGCGG GGC-3'	5'- GCTTCTTGGCTGTTTTCTCTG96°C -3'	5 min; 96°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Sox2内在性AsncRNA	5'- CTTGTGCAGGGTTGGAGTGGTGCCATTGTTTCT GT-3'	5'- 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min G-3'	5 min; 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min
Nanog内在性AsncRNA	5'- CTTAAATTGGGCATGGTGGCGGATCTAGTGGAA96°C GT-3'	5'- 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min G-3'	5 min; 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min
Gli3 mRNA	5'- GACTGAGAGGAAGAAAGTCGAGGGCTCCTCACTGAT CTG-3'	5'- T-3'	5 min; 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 30 cycles; 72°C 5 min
FoxJ2 mRNA	5'- GGTCCACCAAGATGGCA CCTCCGGAAACACTTGT AGC-3'	5'- A-3'	5 min; 96°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Yy1 mRNA	5'- CGGGGAATAAGAAGTGGAGGTATCCCTCCAGGAGG96°C GAG-3'	5'- A-3'	5 min; 96°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Rfx1 mRNA	5'- AGCAGTATGTGGCAGAG CTGCACCTGCTGGACCACT CTC-3'	5'- T-3'	5 min; 96°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 30 sec) × 35 cycles; 72°C 5 min
Sall4 mRNA	5'- AATGCGCGCACCATTGTC ATGTCCTGGGGTGTGGAT96°C GAG-3'	5'- G-3'	5 min; 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min) × 35 cycles; 72°C 5 min
β-actin mRNA	5'- GTTACCACCATGTACCCAGAAAGGGGTGTAACACGCA GG-3'	5'- GC-3'	5 min; 96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min) × 30 cycles; 72°C 5 min

表 1-4. strand-specific RT-PCR 用 RT 配列および

TaqMAN Gene Expression Assay 用 probe ID

strand-specific PCR で利用した RT 用プライマー	
標的分子	RT 用プライマー配列
Gli3 内在性 AsncRNA	5'-AAACCAACTTCGCCCCCTGC-3'
FoxJ2 内在性 AsncRNA	5'-TTCACAGCATCCAAGGAGGC-3'
Yy1 内在性 AsncRNA	5'-GCAAAAACGAAACGGGAAACCA-3'
Rfx1 内在性 AsncRNA	5'-ICTCAGGGCTGCTTCCCTCGC-3'
Sal1 内在性 AsncRNA	5'-IAGTCAGCGAGAAGGCAGGT-3'
Dlx4 内在性 AsncRNA	5'-TGACCTAGGCCCTGTGGCCC-3'
Sox2 内在性 AsncRNA	5'-GAGCTTCITTCCTCCGTTGATGC-3'
Nanog 内在性 AsncRNA	5'-GCCAGCCTAGGTTTACAGT-3'

qPCR (TaqMAN Gene Expression Assay) で利用したプローブの Assay ID		
標的分子	Assay ID	PCR cycles
Nanog mRNA	Mm02384862_gH	50°C 2min; 95°C 10min, 95°C 15sec, 60°C 1min) × 40 cycle
Sox mRNA	Mm00488369_s1	50°C 2min; 95°C 10min, 95°C 15sec, 60°C 1min) × 40 cycle
Dlx4 mRNA	Mm01309627_g1	50°C 2min; 95°C 10min, 95°C 15sec, 60°C 1min) × 40 cycle
β-actin mRNA	Mm01205647_g1	50°C 2min; 95°C 10min, 95°C 15sec, 60°C 1min) × 40 cycle

表 1-5. D-REAM 法による DNA メチル化データベースから抽出した ES 細胞と Nsph で T-DMR を有する遺伝子数 (A<B : A は B より低メチル化状態を示す。)

メチル化状態	T-DMRを有する遺伝子数
11.5 dpcのNsph < ES	67
11.5 dpcのNsph < 14.5 dpcのNsph	19
14.5 dpcのNsph < 11.5 dpcのNsph	44
ES < 11.5 dpcのNsph	135

表1-6. 転写調節領域(-7.5kb から+2.5kb)に内在性 ASncRNA が存在する

転写調節因子群

11.5 dpcの NsphよりES 細胞では高 メチル化な 遺伝子群	11.5 dpc のNsphより 14.5 dpcの Nsphでは高 メチル化な 遺伝子群	14.5 dpcの Nsphより 11.5 dpcの Nsphでは高 メチル化な 遺伝子群	ES細胞より11.5 dpcのNsphでは高 メチル化な 遺伝子群
Bcl11a Dlx4 Ehf	Arid5b Zfp57 Id4	Ddit3 Dlx5 Foxa3	Aebp2 Arid3b Arf4 Bach1 Dlx5 Jarid1b
Gli3 Hoxa3 Hoxd1		Mxi1 Nhlh2 Yy1	Klf1 Klf3 Klf5 Mafg Myst2 Ncor1
Olig3		Zfp367	Nfatc3 Nfx1
Repin1		Zfp52	Nr2c1 Nr2e1
Zbtb8 Zfhx1b		Rfx1	Pax6 Pitx2 Rarb Rbpsuh
Zfhx4 Zfp336 Id4 Dmrt2			Rest Sall4 Ssr1 Tcf2 Tef Trp53 Uncx4.1 Vezf1
Foxj2			Xbp1 Zbtb12
Gata5			Zbtb26 Zbtb5 Zfp11 Zfp336 Zfp367 Zfp532 Zfp90 Zfp95 Zkscan1 Nr5a1 Nufip1 Sp3 Gfil

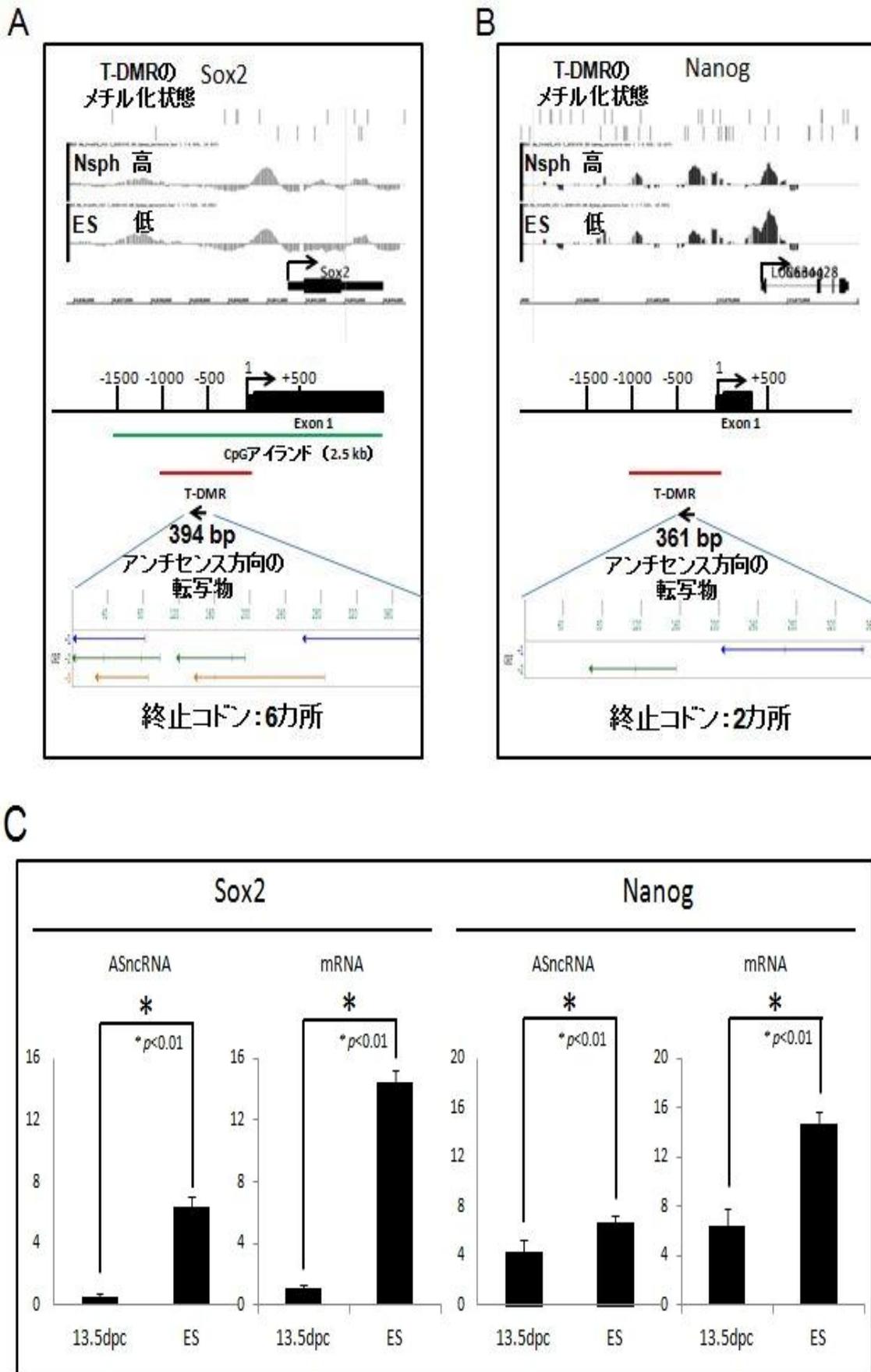


図 1-1. ES 細胞の多分化能維持に重要な遺伝子で転写物として UCSC マウスゲノムブラウザの EST データベースに登録されていない内在性 ASncRNA の発見および発現パターンの解析

(A), (B) Sox2 および Nanog において、内在性 ASncRNA の探索を行った。Nsph は神経細胞塊、ES は ES 細胞を示し、Sox2 および Nanog において、Nsph では ES 細胞に比べて T-DMR の DNA メチル化が高いことを示す。Sox2 および Nanog は右側に転写することを示す。緑色の横棒は CpG アイランドを示し、赤色の横棒は T-DMR を示す。Sox2 では、転写調節領域(-250bp~-750bp)でアンチセンス側に 394 bp の転写物が検出されたことを示す。また、Nanog では、アンチセンス側に 361 bp の転写物が検出されたことを示す。黒色以外の矢印は予測される ORF を示し、矢印の根は開始コドン、先端は終止コドンを示す。検出された Sox2 の転写物には、終止コドンが 6 カ所存在し、150 bp 以上の ORF は存在しないことを示す。また、Nanog の転写物には、150 bp 以上の ORF が存在することを示す。

(C) 内在性 ASncRNA および mRNA の発現解析を行った。ASncRNA; 内在性 ASncRNA、mRNA; センス mRNA、13.5 dpc; 13.5 日目の胎仔、ES; ES 細胞を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な各遺伝子の内在性 ASncRNA または mRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: p<0.01

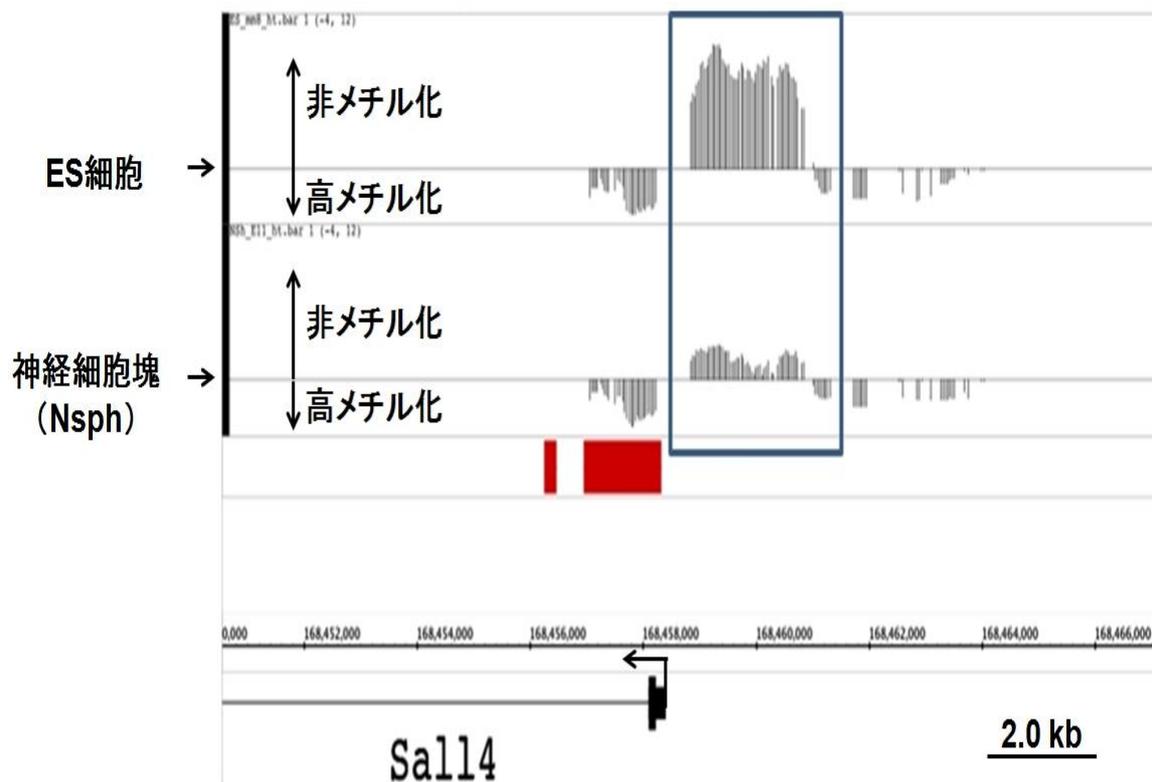


図 1-2. D-REAM による ES 細胞と Nsph 細胞の T-DMR の DNA メチル化パターン比較

Sall14 の転写調節領域の T-DMR の DNA メチル化状態を示す。Sall14 遺伝子は左向きに転写され、□で囲った部位がメチル化状態のシグナルを示す。D-REAM で同定された T-DMR は Sall14 遺伝子の転写調節領域付近に存在し、Nsph と ES 細胞の DNA メチル化状態の比較を示す。ES 細胞では Nsph より低メチル化であることを示す。赤いボックスは CpG アイランドを示す。

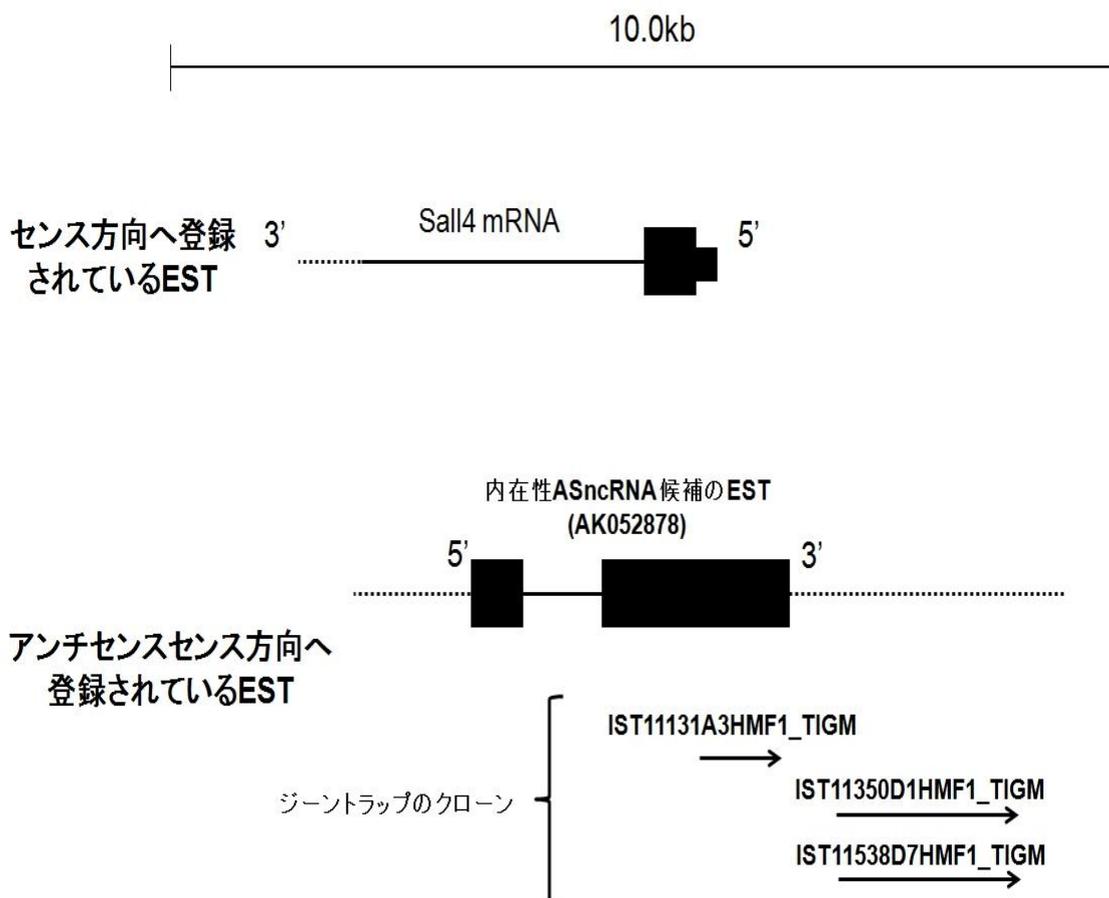
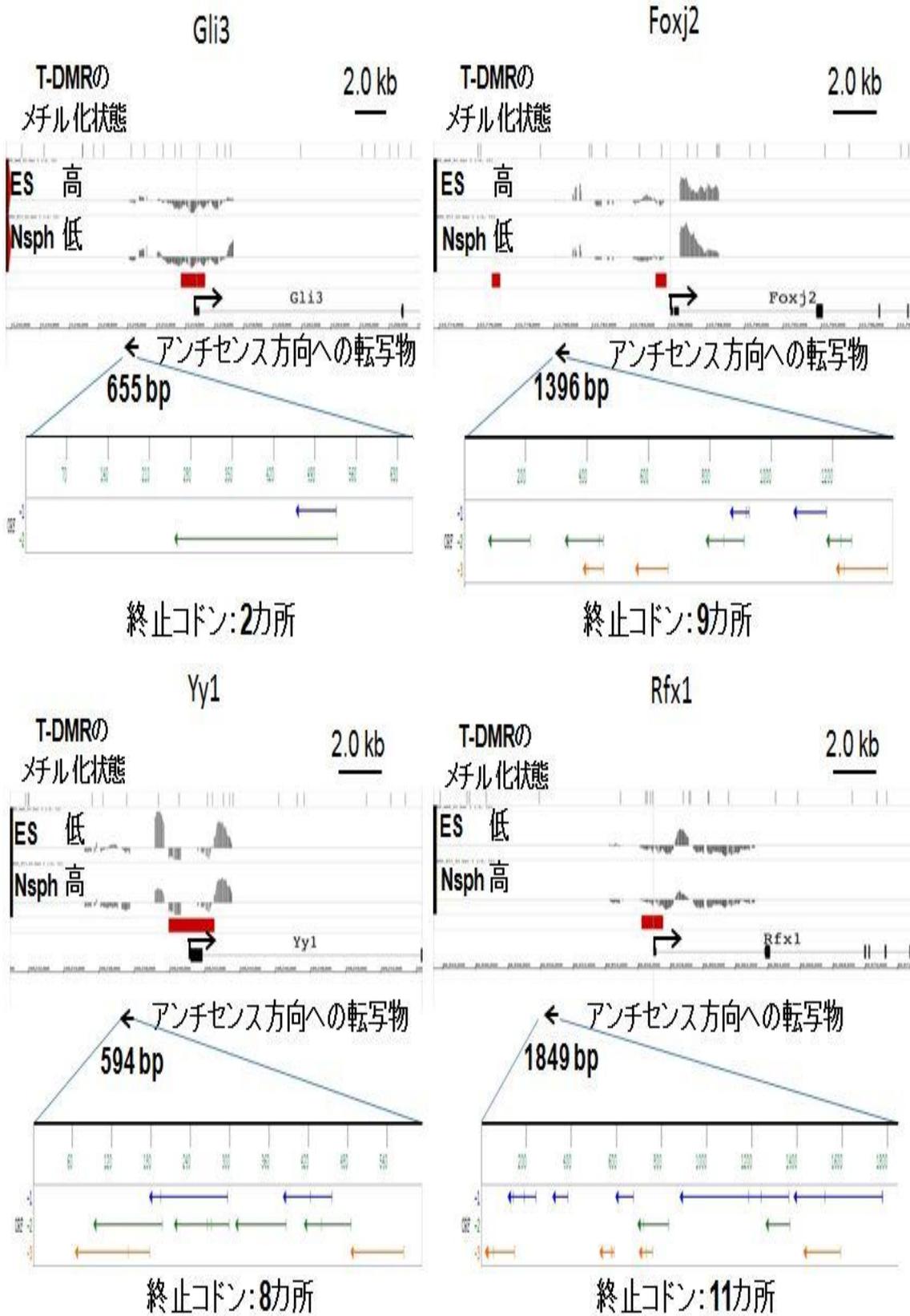


図 1-3. UCSC ゲノムブラウザのデータベースを利用した内在性 ASncRNA の候補として EST が存在する遺伝子の探索

内在性 ASncRNA の候補と考えられる EST およびジーントラップクローンの同定法を示す。Sall14 mRNA とは逆のアンチセンス方向に UCSC マウスゲノムブラウザのデータベースに登録された内在性 ASncRNA 候補の EST (AK052878) を示す。また、Sall14 mRNA とは逆のアンチセンス方向にジーントラップクローン (IST11131A3HMF1_TIGM, IST111350D1HMF1_TIGM, IST111538D7HMF1_TIGM) が登録されていることを示す。



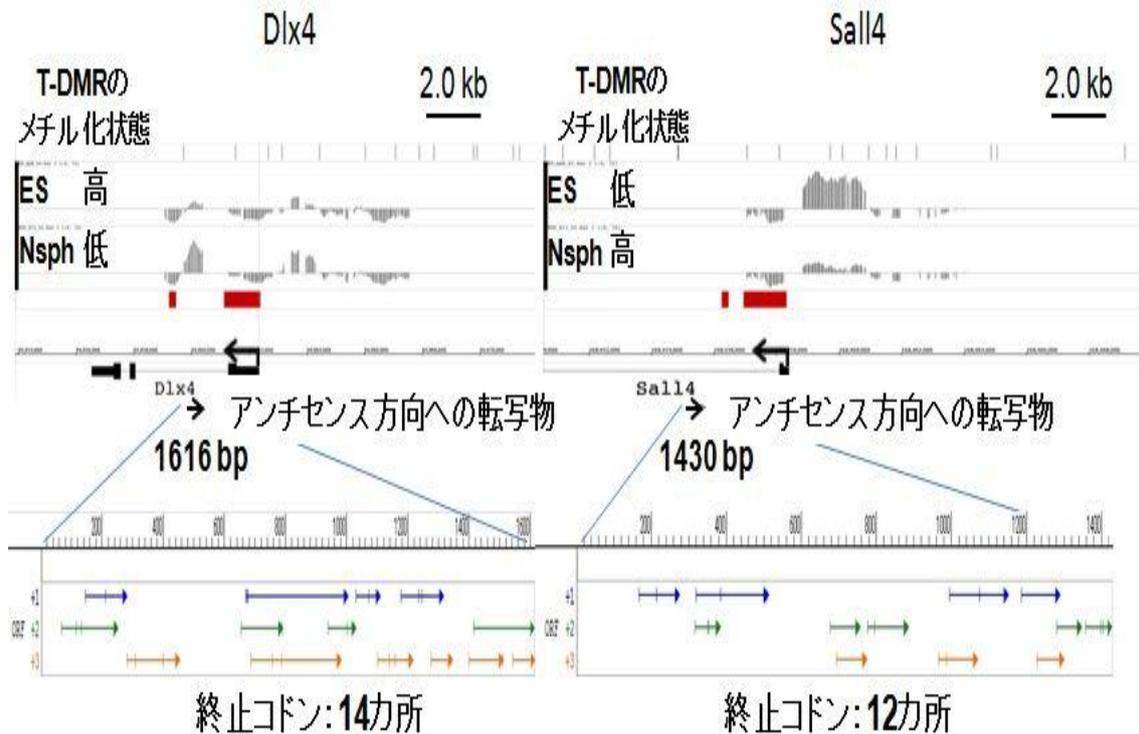


図 1-4. T-DMR にオーバーラップし、アンチセンス側へ検出された転写物

Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1, Dlx4, Sall4 の内在性 ASncRNA の探索を行った。NspI は神経細胞塊、ES は ES 細胞を示し、Gli3, Foxj2, Dlx4 において、ES 細胞では NspI に比べて T-DMR の DNA メチル化が高いことを示す。逆に、Yy1, Rfx1, Sall4 は、ES 細胞では NspI に比べて T-DMR の DNA メチル化が低いことを示す。Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1 は右側に転写することを示す。Dlx4 および Sall4 は、逆に左側に転写することを示す。赤色のボックスは CpG アイランドを示す。また、これら遺伝子の転写調節領域に、アンチセンス側への転写物 (Gli3 では 655 bp、Foxj2 では 1396 bp、Yy1 では 594 bp、Rfx1 では 1849 bp、Dlx4 では 1616 bp、Sall4 では 1430 bp) が検出されたことを示す。黒色以外の矢印は予測される ORF を示し、矢印の根は開始コドン、先端は終止コドンを示す。Gli3 を除いた遺伝子の転写物には、複数の終止コドンが存在し、150 bp 以上の ORF は存在しないことを示す。一方、Gli3 の転写物には終止コドンが 150 bp 以上の ORF が存在することを示す。

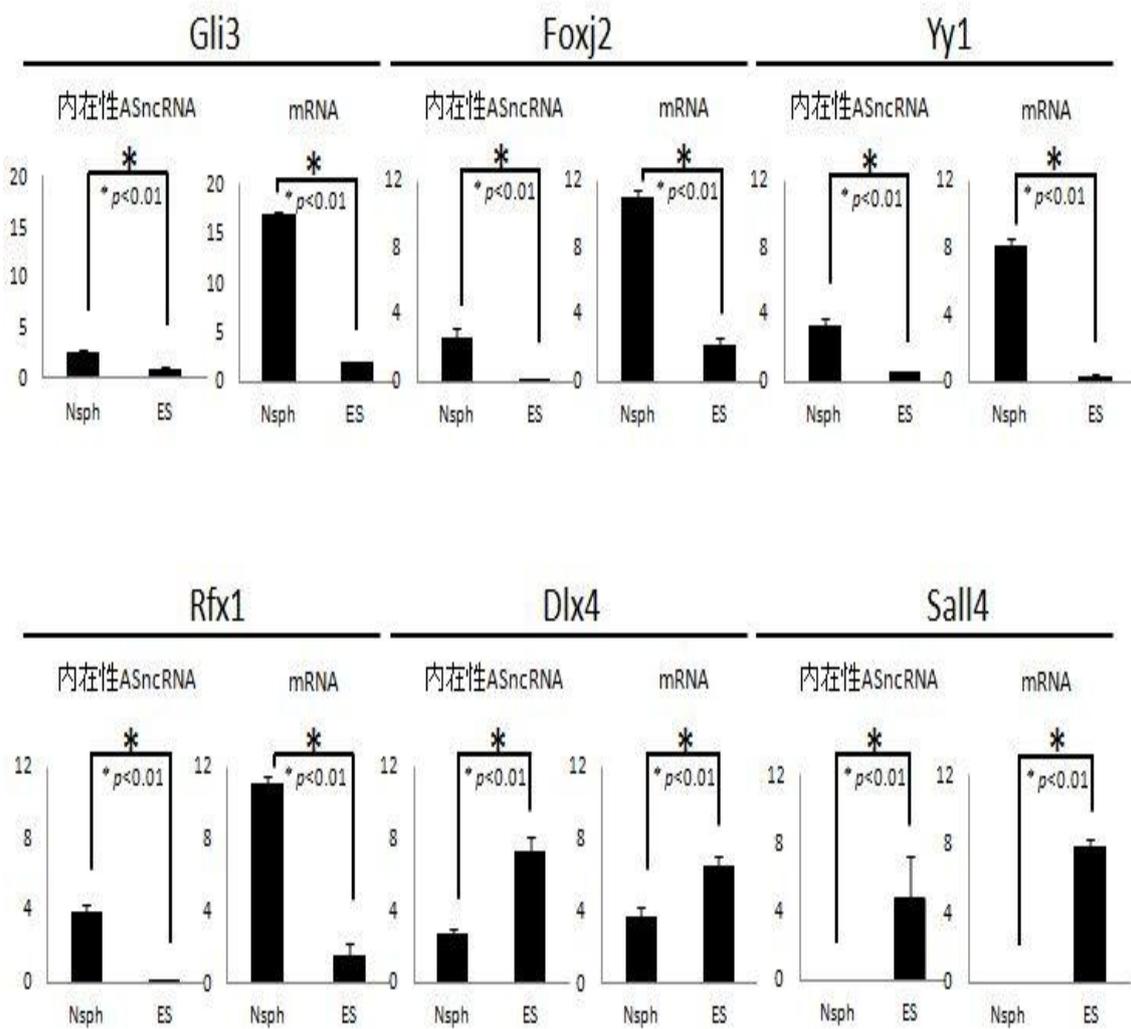


図 1-5. 内在性 ASncRNA と mRNA の発現パターンの比較

Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1, Dlx4, Sal14 の内在性 ASncRNA および mRNA の発現解析を行った。

ASncRNA; 内在性 ASncRNA、mRNA; センス mRNA、Nsph; 神経細胞塊、ES; ES 細胞を示す。

縦軸は β -actin に対する相対的な各遺伝子の内在性 ASncRNA または mRNA の発現量を示す。

解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: p < 0.01

第二章

培養細胞系を用いた Sa114 領域の内在性 ASncRNA による遺伝子制御

序論

第一章では、転写調節領域内の T-DMR にオーバーラップする内在性 ASncRNA が存在することを発見した。これらの内在性 ASncRNA はセンス mRNA と一致した発現を示したことから、内在性 ASncRNA は遺伝子転写調節領域の T-DMR の DNA メチル化による転写制御と関連する可能性が考えられた。ncRNA の中で、siRNA を哺乳動物細胞へ導入すると、ヒストン修飾を介した遺伝子発現の抑制が起こることが報告されている (Kim DH *et al.* 2006)。このうちの一部は mRNA の分解に関わっているのではないかとされている。しかし、内在性 ASncRNA とセンス mRNA の発現の関連性を調べるとセンス mRNA の発現が高いときに内在性 ASncRNA も高い例が 70%にのぼる (Wahlestedt C 2006)。すなわち、siRNA とは異なり、内在性 ASncRNA がセンス mRNA の発現制御に関わる可能性を示し、個々の遺伝子座における内在性 ASncRNA の役割を明らかにする必要がある。

ゲノム上の様々な領域から転写されていると考えられる長い一本鎖の ncRNA は、mRNA 同様 5' 末端にキャップ構造、3' 末端に poly (A) 鎖を持ち、スプライシングも受けるが、ごく短い ORF しか見いだされないことからタンパク質には翻訳されないと考えられる。このような ncRNA の 1 つが Xist RNA で、哺乳類の雌に特有な X 染色体不活性化に必須な役割を果たす (Borsani G *et al.* 1991; Brockdorff N *et al.* 1991; Brown CJ *et al.* 1991)。また、この Xist 遺伝子座にはアンチセンス方向に転写される Tsix と呼ばれる ncRNA も存在し、これは Xist の発現を負に制御にしている (Lee JT *et al.* 1999; Sado T *et al.* 2005)。また、遺伝子の発現抑制に関わるポリコム群 (PcG) タンパク質複合体と相互作用し、PcG 複合体を標的領域へ運ぶのに重要な役割を果たす antisense non-coding RNA in the INK4 locus (ANRIL) (Burd CE *et al.* 2010; Pasmant E *et al.* 2011) などの long non-coding RNA (lnc RNA) も知られている。エピジェネティック制御に関連すると考えられる ncRNA は、large intergenic non-coding RNA (linc

RNA)のHOX antisense intergenic RNA (HOTAIR) (Gupta RA *et al.* 2010)やアンチセンス方向の転写物であるp15ASが挙げられる。linc RNAであるHOTAIRはゲノムワイドにヒストンメチル化を引き起こすことで複数の遺伝子発現を抑制する(Tsai MC *et al.* 2010)。また、p15遺伝子の下流に位置するp14遺伝子の転写開始点付近からp15遺伝子の上流にまたがって存在する全長30-40kbのlinc RNAのp15ASは、p15プロモーターとは異なる部位から発現し、ヘテロクロマチン形成を制御することによりp15 mRNA発現を抑制する(Yu W *et al.* 2008)。しかし、本研究で同定した内在性ASncRNAは、転写調節領域に存在し、mRNAの発現と一致していたことから、linc RNAやlnc RNAとは異なる機序でエピジェネティック制御に関わると考えられる。そこで、本研究で同定した転写調節領域の内在性ASncRNAについては、局在、機能、エピジェネティック制御機構について明らかにする必要がある。

転写調節領域に存在する内在性ASncRNAは、DNAのメチル化制御に関わることが報告されている(Imamura T *et al.* 2004; Tomikawa J *et al.* 2011)。Khps1はセンスmRNAのSphk1が不活性化時に活性化する内在性ASncRNAであり、Sphk1の転写調節領域のT-DMRにオーバーラップしている。また、Sphk1のT-DMRがメチル化されているラット腎臓由来の繊維芽細胞株(NRK)でKhps1を強制発現させると、T-DMRの脱メチル化が誘導される(Imamura T *et al.* 2004)。近年報告された内在性ASncRNA(Nef1-as, Vim-as)では、いずれもセンスmRNAの発現と一致し、メチル化されているNRKでNef1-asを強制発現させることで、T-DMRが脱メチル化される(Tomikawa J *et al.* 2011)。また、ラット副腎髄質由来の褐色細胞株(PC12)で発現しているNef1-asをshRNAでノックダウンさせるとDNAメチル化が亢進する(Tomikawa J *et al.* 2011)。これらの例はいずれも、不死化された細胞で、その細胞の生死や運命決定に寄与しないと考えられる遺伝子についての結果であった。これに対して本研究で同定した内在性ASncRNAは、ES細胞の多分化能維持や神経細胞への分化に必要な転写因子をコード

する遺伝子の転写制御に関わる可能性がある。これら内在性 ASncRNA を持つ転写因子の中で、Sal14 は個体の初期発生から組織の形成に重要な因子であることが報告されている (Elling U *et al.* 2006; Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006; Koshiba-Takeuchi K *et al.* 2006; Warren M *et al.* 2007)。つまり、ES 細胞で発現している内在性 Sal14 ASncRNA に注目することで、初期発生および器官形成期における内在性 ASncRNA のエピジェネティック制御機構を解明することが可能と考えられる。

本章では、第一章で同定した ES 細胞で発現する新規内在性 ASncRNA の DNA メチル化制御について検討する。第一章で同定した内在性 ASncRNA の中で、Sal14 はショウジョウバエからヒトまで保存されている Zinc フィンガー型転写因子であり (Al-Baradie R *et al.* 2002)、ES 細胞の増殖・未分化能維持に関わること (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006) や他の ES 細胞マスター転写因子群と相互作用することが報告されている (Yang J *et al.* 2008)。一方、Sal14 のヒトホモログは、眼球運動異常や四肢、心臓等の形成異常を呈する Okihiro 症候群の原因遺伝子である (Ma Y *et al.* 2006)。また、腫瘍マーカーとしても報告されている (Cao D *et al.* 2009)。このように、Sal14 は ES 細胞の多分化能維持や初期発生、四肢や心臓の形成に重要な転写因子である (図 2-1)。ES 細胞における内在性 Sal14 ASncRNA の発現は、Sal14 mRNA の発現と一致し、転写調節領域の T-DMR は低メチル化状態であることから、内在性 Sal14 ASncRNA によるメチル化の制御が予想される。ES 細胞において内在性 Sal14 ASncRNA によるメチル化の制御が明らかとなれば、ES 細胞の多分化能維持について新たな知見を得られると考えられる。これは、内在性 Sal14 ASncRNA の初期胚発生や器官形成期におけるメチル化制御の解明につながる。

本章では、内在性 Sal14 ASncRNA 発現を shRNA により低下させることで ES 細胞における T-DMR のメチル化制御について検討を行った。

材料および方法

試薬

試薬は、特に断りがない限り和光純薬より購入した。

ES 細胞の培養・調整

ES 細胞の培養と調整は、第一章に準じて行った。

コンストラクトの構築・調整

SalI4 ASncRNA をノックダウンする shRNA をコードするオリゴ DNA を合成して Puro 耐性遺伝子により導入細胞を選択可能な shRNA 発現ベクター (pENTR U6) へ挿入し、コンピテントセル(JM109, TAKARA)へ導入後に QIA prep Spin Miniprep kit (QIAGEN) でプラスミドを抽出および精製した。また、シーケンシングにてインサートの挿入および塩基配列の確認を行った。なお、shRNA をコードする配列では、センス mRNA に相補的な領域に 3 カ所の変異を導入することで、アンチセンス RNA のみを特異的にノックダウンするように設計した(図 2-4)。

トランスフェクション

2×10^5 個の ES 細胞をゼラチンコートした 6well plate (IWAKI) の 1 穴へ播種した。培養開始 1 日後に $4 \mu\text{g}$ コンストラクト/ $250 \mu\text{l}$ OPTI-MEM を調整して、これを 1 液とした。また、 $4 \mu\text{l}$ Lipofectamin 2000 reagent (invitrogen)/ $250 \mu\text{l}$ OPTI-MEM を調整して、これを 2 液とした。次に 1 液および 2 液を混合し、常温で 20 分間静置した。この間に、ES 細胞を OPTI-MEM (Invitrogen) で洗浄し、更に 1.5ml OPTI-MEM を 6 穴プレートへ加えた。次に 1, 2 の混合液を ES 細胞へ加え、 37°C 5% CO_2 インキュベーター (HIRASAWA) 内で 4 時間トランスフェクションを行った。次に PBS (Sigma) で細胞を洗浄

し、ES 細胞培地に交換して、37°C 5% CO₂ インキュベーター (HIRASAWA) で翌日まで培養を行った。トランスフェクション翌日よりピューロマイシン (Sigma) 1 μg/ml を含む ES 細胞培養液に置換し、4 日間培養する事でコンストラクトが導入された ES 細胞を選択した。

Total RNA 抽出および RT-PCR による内在性 ASncRNA 検出

マウス幹細胞および組織からの total RNA 抽出と cDNA 合成は第一章に準じて行った。なお、PCR 条件は表 2-1 に示した。

TaqMan Gene Expression Assay による遺伝子発現解析

TaqMan universal PCR Master Mix (ABI) を使用して ES 細胞の未分化マーカーである Oct4, Nanog, Sox2 および Sall14 遺伝子の発現解析を行った。遺伝子発現解析に利用したソフトウェアは、【<http://www.appliedbiosystems.com/support/software/7700/updates.cfm>】より入手した。また、各々の probe assay ID を表 2-1 に示した。なお、内在性の遺伝子発現で発現量を補正するために β-actin を利用した。また、Oct4, Nanog, Sox2, Sall14 遺伝子については、以下の分量で試薬を調整して Assay した。

- Master Mix: 6.25 μl
- Probe, Primer Mix solution: 0.5 μl
- ミリ Q 水: 3.25 μl
- 4 倍希釈 cDNA サンプル: 2.5 μl

Oct4, Nanog, Sox2, Sall14 遺伝子発現検出に利用した TaqMAN Gene Expression Assay ID および PCR 条件は表 2-1 に示した。

ウェスタンブロッティング法

ES 細胞内の Sall4 タンパク質量の変化について、ウェスタンブロッティング法を用いて検討した。ES 細胞を PBS で洗浄後、タンパク質回収用緩衝液 (Cell Lysis Buffer, 10% NP 40, 50×プロテアーゼインヒビター $60\mu\text{l}$ を混合した溶液) を加えた。液体窒素にて瞬時に凍結させ、次に氷中にて凍結したサンプルを 1.5ml エッペンチューブへ回収した。サンプルへ 1X SDS Sample Buffer (63 mM Tris HCl, 10% Glycerol, 2% SDS, 0.0025% Bromophenol Blue, pH 6.8) を加え、Microplate Reader にて総タンパク質量を測定後、Sall4 タンパク質の定量を行うために総タンパク質の濃度を調整した。次に濃度調整 (総タンパク質量が最低量のサンプルの濃度に、他のサンプルの濃度を合わせた) したサンプル $10\mu\text{l}$ を 2-15% のアクリルアミドグラジエントゲル (第一化学) にアプライした。電気泳動によって、サンプル中のタンパク質を分子量で分画し、タンパク質を PVDF メンブレン (Hybond P Amersham) に転写した。転写後、メンブレンを Western Blocking Reagent (Roche) でブロッキングし、5% スキムミルクで 500 倍に希釈した Sall4 の一次抗体 (anti-Sall4-antibody : ab31968) を 4°C で一晩反応させた。Wash buffer を 8 分毎に 3 回交換しながらメンブレンを洗浄した後、5% スキムミルクで 2500 倍に希釈した 2 次抗体 (Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody, ECL) を室温で 1 時間反応させた。Wash buffer を 8 分毎に 3 回交換しながらメンブレンを洗浄した後、chemiluminescence (ECL) detectin kit (Amersham) を用いて、Sall4 タンパク質を検出した。5% スキムミルクで 1000 倍に希釈した β -actin の一次抗体 (monoclonal Anti- β -actin antibody, sigma, A5441) を 4°C で一晩反応させた。Wash buffer を 8 分毎に 3 回交換しながらメンブレンを洗浄した後、5% スキムミルクで 2000 倍に希釈した 2 次抗体 (Peroxidase labeled anti-mouse Antibody, NA931VS, ECL) を室温で 1 時間反応させた。Wash buffer を 8 分毎に 3 回交換しながらメンブレンを洗浄した後、chemiluminescence (ECL) detectin kit (Amersham) を用いて、 β -actin タンパク質を検出した。なお、遺伝子解析ソフト (Image

J)を用いて、Sal14 タンパク質の検出量を β -actin タンパク質の検出量で補正した。

ゲノム DNA 抽出

DNA 抽出には E. Z. N. A. Mollusc DNA Isolation Kit (Omega Biotek) を使用した。ES 細胞を PBS (Sigma) で洗浄し、350 μ l ML1 (25 μ l プロテナーゼ K 添加) を加えた。セルスクレーパー (Invitrogen) でサンプル溶解物を回収し、オートクレーブ滅菌を施した 1.5ml エッペンチューブ (Watoson) へ移した。37°C 5% CO₂ インキュベーター (HIRASAWA) で翌日まで静置し、サンプルへ 350 μ l (chloroform: isoamyl alcohol 24:1) を加え、混合した。10000 \times g で 2min の遠心分離を行い、上清を 1.5ml エッペンチューブ (Watoson) へ移した。350 μ l MBL (10 μ l RNaseA 添加) をサンプルへ加えて混合し、13000 \times g で 15sec の遠心分離を行った。サンプルを 70°C ホットプレート (TAITEC) 上で 10min 静置し、700 μ l の 100% EtOH を加えて混合し、13000 \times g で 15sec の遠心分離を行った。また、E. Z. N. A. Mollusc DNA Isolation Kit column へ 100 μ l の Equilibration (OMEGA BIO-TEK) を加えて 13000 \times g で 1min の遠心分離を行った。E. Z. N. A. Mollusc DNA Isolation Kit column へサンプルを加え、10000 \times g で 1min の遠心分離を行い、フロースルー分画は廃棄した。サンプルが入った E. Z. N. A. Mollusc DNA Isolation Kit column へ 500 μ l の HB (OMEGA BIO-TEK) を加えて 10000 \times g で 30sec の遠心分離を行った。700 μ l の DNA wash Buffer (OMEGA BIO-TEK) を加えて、10000 \times g で 1min の遠心分離を行い、フロースルー分画は廃棄した。50 μ l の Elution Buffer (OMEGA BIO-TEK) を加えて 70°C ホットプレート (TAITEC) 上で 5min 静置し 10000 \times g で 5min の遠心分離を行い、ゲノム DNA を回収した。サンプルの保管は -20°C フリーザー (SANYO) 内にて行い、使用時には常温にて融解して使用した。

ゲノム DNA のバイサルファイト反応

メチル化解析にはバイサルファイト反応を利用した。3-5 μg のゲノム DNA を EcoRI (TAKARA) で消化し、エタノール沈殿によりゲノム DNA を精製し、サンプルを 10 μl Tris-EDTA に溶解した。サンプル DNA を 1 本鎖に変性させるため、22 μl H_2O および 10N NaOH 1 μl を加えて 37°C 恒温槽 (TAITEC) で 15min 加温した。バイサルファイト反応のため、サンプルへ 12.5 μl の 10mM Hydroquinone (wako)、200 μl の 2.5 M 二亜硫酸ナトリウム (wako) pH 5、4.5 μl H_2O を混合し、55°C (気相) にて 16h 遮光で静置した。バイサルファイト反応後のサンプルは、500 μl QG (QIGEN) を加えて混合し、Gel Extraction Kit (QIAGEN) column へ全量移した。2min 静置し、13000rpm 2min 遠心分離を行い、フロースルー分画は廃棄した。サンプルの入ったカラムへ 750 μl PE を加えて 13000rpm 1min 遠心分離を行い、フロースルー分画は廃棄した。サンプルの入ったカラムへ 100 μl の 10mM Tris-HCl (pH 8.0) を加えて、3min 静置した。13000rpm 5min 遠心分離を行い、回収したサンプルへ 3 μl の 10N NaOH を加えて混合し、37°C ホットプレート (TAITEC) 上で 15min 加温し、脱スルホン化を行った。サンプルへ 99 μl の 6M 酢酸アンモニウムを加えて中和した。次に 1 μl エタチンメイト (ニッポンジーン) を共沈剤として加えた後に、500 μl の 100% EtOH (-20°C) を加えて混合した。-20°C フリーザー (SANYO) にて 30min 静置し、15000rpm 2min 遠心分離を行い、上清を廃棄した。サンプルへ 20 μl の 10mM Tris-HCl (pH 8.0) を加えてサンプルを溶解した。保管は -20°C フリーザー (SANYO) 内にて行い、使用時には常温にて融解して使用した。

バイサルファイト PCR

バイサルファイト反応後の DNA を PCR により増幅した。サンプル DNA は全量 20 μl のうち、それぞれ 1 μl を用いた。Immolase DNA Polymerase (BIOLINE, Randolph, MA) を用いた。PCR に使用したプライマーの配列については、表 2-1 に示した。PCR 産物は、エチジウムブロマイド添加した 1% アガロースゲル中で電気泳動を行い、目的とするバ

ンドをゲルより切り出した。ゲル中の DNA 断片は QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて精製した。なお、バイサルファイト PCR に使用したプライマーは表 2-2 に示した。

バイサルファイトシーケンシング

バイサルファイト PCR により増幅された DNA 断片を、TOPO TA Cloning kit(Invitrogen)を用いてクローニングし、3130 Genetic Analyzer(ABI)で塩基配列を解析し、DNA メチル化状態を決定した。

統計学的解析

統計学的解析は、2 群間を比較する実験では、対応のない両側 t 検定を用いて評価し、2 群以上の実験では、JMP®(SAS Institute)を用いて、one-way ANOVA/Tukey-Kramer の HSD 検定を行い評価した。統計分析の結果は、平均値と標準誤差を用いて示した。P<0.05 の場合を統計学的な有意差として取り扱った。

結果

Sal14 転写開始点近傍での T-DMR の同定と Sal14mRNA 発現

Sal14 遺伝子は、初期発生中胎仔の内部細胞塊および ES 細胞で高発現する遺伝子である。本章では初期発生で胎仔由来の ES 細胞と胎盤由来の TS 細胞を用いて、初期発生過程での Sal14 の活性化、不活性化の分岐点に注目して解析した。まず、Sal14 遺伝子の転写調節領域における DNA メチル化状態を解析し、細胞種特異的な DNA メチル化パターンを示す T-DMR の同定を行なった。ES 細胞および TS 細胞の比較から Sal14 の転写開始点周辺の DNA メチル化パターンについて、バイサルファイトシークエンシング法により解析した。その結果、ES 細胞では低メチル化(10.9%)状態であったのに対し、TS 細胞では高メチル化(73.6%)を示す T-DMR (promoter T-DMR) を転写開始点上流に同定した (図 2-2A)。また、Sal14 遺伝子のイントロン 1 には、Nanog が結合してエンハンサーとして機能する領域が報告されている (Wu Q *et al.* 2006) ことから、転写開始点下流についても解析した結果、イントロン内の Nanog 結合配列近傍にも T-DMR (intronic T-DMR) を発見した。Intronic T-DMR は ES 細胞では 5.7%のメチル化率であったのに対し、TS 細胞では 68.6%であった (図 2-2A)。これらの結果から、Sal14 T-DMR は、TS 細胞に比べて ES 細胞では低メチル化であることが示された。つぎに Sal14 mRNA の発現量を解析した結果、TS 細胞に比べて ES 細胞では mRNA 発現量が有意に高いことが示された (図 2-2B)。

内在性 Sal14 ASncRNA の解析

Sal14 遺伝子には、第一イントロンから転写開始点上流に向かって、アンチセンス方向の EST (AK052878) が登録されている (図 2-3A)。しかし、登録されている EST は、Sphk1-Khps1 の例のように、転写調節領域の T-DMR (promoter T-DMR) とオーバーラップするかどうか不明であった。同定した内在性 Sal14 ASncRNA が T-DMR の領域を含んで

転写されているかを確認するために、T-DMR 内に逆転写用の RT プライマーを設定して cDNA を合成した。この cDNA を用いて T-DMR (PCR I) および登録された EST (PCR II) の領域を増幅する PCR プライマーを設計し、strand-specific RT-PCR による増幅を行った。その結果、内在性 Sall14 ASncRNA は、EST (AK052878) として登録されている領域よりも下流側に少なくとも約 0.3 kb 程度長く、Sall14 の promoter T-DMR とオーバーラップすることが確認できた(図 2-3C)。また、内在性 Sall14 ASncRNA は ES 細胞で発現が高く、TS 細胞では発現が低いことも確認できた(図 2-3B)。次に、Sall14 ASncRNA の転写開始点を同定するために、FANTOM の転写開始点データベースの CAGE Tag を検索した。Sall14 ASncRNA の転写開始点と考えられる CAGE Tag を同定し、その CAGE Tag の場所から登録された EST 内の配列を増幅できる PCR プライマー (PCR III) を設計し、T-DMR 内から逆転写した cDNA を用いて、同様に strand-specific RT-PCR を行なった。これにより、CAGE Tag から登録された EST までの転写物が確認できたことから、内在性 Sall14 ASncRNA は登録された EST より約 1.0 kb 上流の CAGE Tag 部位から転写されることが考えられた。新たにアンチセンス方向へ発見された転写物が非コード RNA であるかどうかを検討するため、塩基配列に含まれる ORF を GENETYX-WIN Ver. 7.0 を用いて解析した。その結果、新たに同定した 5' 側の 842 bp では 6 カ所、3' 側の 282 bp では 1 カ所に終止コドンが確認された(図 2-3C)。

これまでに発見されている内在性 ASncRNA は、末端に poly (A) が付加されるものと付加されないものの双方が報告されている (Kiyosawa H *et al.* 2005)。核内へとどまるものと、核外へ転写されるものがある。そこで、内在性 Sall14 ASncRNA の 3' 末端への poly (A) 付加を検討するために、poly (A) 部位から逆転写できるオリゴ dT プライマー (invitrogen) により poly (A) を 3' 側に持つ RNA から選択的に cDNA を合成し、内在性 Sall14 ASncRNA の検出を試みた。その結果、内在性 Sall14 ASncRNA は検出されなかった(図 2-3D)。この結果から、内在性 Sall14 ASncRNA は 3' 末端に poly (A) が付加されていないことが示唆された。

内在性 Sa114 ASncRNA と Sa114mRNA の発現パターンを検討するため、ES 細胞、TS 細胞、MEF (マウス線維芽細胞)、組織 (精巣、腎臓、脳) の比較から内在性 Sa114 ASncRNA と Sa114 mRNA の発現を、ランダムプライマーで逆転写した cDNA を用いて RT-PCR 法により解析した。その結果、ES 細胞では、内在性 Sa114 ASncRNA と Sa114mRNA の顕著な発現が認められたが、TS 細胞では双方とも発現が非常に低く、MEF および精巣、腎臓、脳では内在性 Sa114 ASncRNA と Sa114mRNA の発現が認められなかった。以上より、内在性 Sa114 ASncRNA と Sa114mRNA とともに、ES 細胞での発現が最も高いことが示された (図 2-3E)。これらの結果から、内在性 Sa114 ASncRNA は、ES 細胞での発現が最も高く、Sa114 mRNA と同じ発現パターンであることが示された。

ES 細胞における内在性 Sa114 ASncRNA のノックダウンによる内在性 ASncRNA の機能解析

RNA 干渉を利用して内在性 Sa114 ASncRNA 量を低下させ、DNA メチル化への影響を調べた。なお、コンストラクト構築の際に、Sa114mRNA へ作用させないようにするため、shRNA の二重鎖部分でセンス mRNA に相補的な配列には三か所の変異を導入した (図 2-4A)。

内在性 ASncRNA 中の 4 カ所を標的配列とするコンストラクト A, B, C, D を作製し、内在性 ASncRNA を発現する ES 細胞に一過的に導入した。この細胞で内在性 Sa114 ASncRNA の量を検討した結果、コントロールに比べて D を除く実験群では有意に発現が低下することが示された。特にコンストラクト A が最も効率よく内在性 Sa114 ASncRNA の発現量を低下させることが示された (図 2-4B)。

内在性 Sa114 ASncRNA の発現低下による Sa114 の mRNA およびタンパク発現への影響

内在性 Sa114 ASncRNA をノックダウンした ES 細胞を用いて、Sa114mRNA 発現やタン

パク質の発現への影響を調べるために定量的 PCR 法およびウェスタンブロッティング法による解析を行った (図 2-5)。その結果、D を除く実験群ではコントロールに比べて Sal14 mRNA の発現が有意に低下した (図 2-5A)。また、Sal14 タンパク質は、B を除く実験群がコントロールに比べて Sal14 タンパク質の発現量が低い傾向を示した (図 2-5B)。

これらの結果から、コンストラクト A でのノックダウン効果が最も高く、内在性 Sal14 ASncRNA の発現量低下に伴い、Sal14 mRNA およびタンパク質の発現も抑制できることが示された。なお、コンストラクト B の導入では、Sal14 タンパク質の発現量の低下が見られなかったが、後で示すように同じコンストラクトを導入した ES 細胞では、Nanog mRNA の発現低下も見られなかった (図 2-10)。Sal14 のタンパク質は Nanog のタンパク質と協調して両者の標的遺伝子の発現を制御することから、Nanog と Sal14 のタンパク質同士の相互作用により Sal14 のタンパク質が若干安定化されていたために、一過的なノックダウンでは Sal14 のタンパク質量が低下しなかった可能性が考えられる。一方で、コンストラクト B の導入により Sal14 T-DMR は若干メチル化の亢進が見られ、Sal14 mRNA の発現も有意に低下した。すなわち、コンストラクト B による内在性 ASncRNA の低下によって、ゲノム DNA レベルでは T-DMR のメチル化亢進により Sal14 mRNA の転写が抑制されたが、タンパク質発現のレベルでは Nanog との相互作用で安定化したことにより Sal14 のタンパク質発現量の低下が見られなかったことが考えられる。

内在性 Sal14 ASncRNA の発現低下による Sal14 転写調節領域 T-DMR の DNA メチル化パターンへの影響

内在性 Sal14 ASncRNA をノックダウンした ES 細胞を用いて、Sal14 の promoter T-DMR(-1507bp~-376bp) および intronic T-DMR(+2260bp~+2690bp) の DNA メチル化解析を行った (図 2-6)。なお、コントロールとして empty vector を導入した ES 細胞を

用いた。その結果、promoter T-DMR(-1507bp~-376bp)のDNAメチル化解析では、コントロール群のメチル化率が11.8%に対して、コンストラクトAは39.1%、コンストラクトBは18.2%、コンストラクトCは11.8%、コンストラクトDは9.1%であった。この結果から、内在性Sal14 ASncRNAのノックダウン効果の最も高かったコンストラクトAを導入したES細胞では、Sal14 T-DMRのメチル化が最も亢進した。また、intronic T-DMR(+2260bp~+2690bp)のDNAメチル化解析では、コントロール群のメチル化率が12.9%に対して、コンストラクトAは31.4%、コンストラクトBは17.1%、コンストラクトCは21.4%、コンストラクトDは17.1%であった。この結果から、intronic T-DMRにおいてもpromoter T-DMRと同様に、コンストラクトAを導入した細胞でのメチル化率が最も高いことが示された。なお、コンストラクトCおよびDを用いて内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンしたES細胞では、Sal14のpromoter T-DMRのDNAメチル化には変化がなかったが、intronic T-DMRではメチル化が亢進した。コンストラクトCおよびDの内在性Sal14 ASncRNAのノックダウン効果は、コンストラクトAおよびBに比べて低い傾向を示した(図2-4B)ことから、内在性Sal14 ASncRNAは、promoter T-DMRよりもintronic T-DMRの方が内在性ASncRNA量の低下により変化を受けやすい可能性が考えられる。

以上の結果から、内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンにより、Sal14遺伝子のpromoterおよびintronic T-DMRの高メチル化が誘導され、内在性Sal14 ASncRNAのノックダウン効果が最も高かったコンストラクトAにおいて、DNAメチル化の亢進も最も顕著であった(図2-6A)。

つぎに、内在性Sal14 ASncRNAノックダウンの特異性を評価するため、Sal1ファミリー遺伝子への影響を検討した。ほ乳類では、Sal1ファミリーにはSal11からSal14までの4種類が存在する。Sal11およびSal13では、Sal14と同様にES細胞で低メチル化、TS細胞で高メチル化を示すT-DMRが同定されている(Ohgane J *et al.* 2004; Yagi S *et al.* 2008; Oda M *et al.* 2009)。特にSal13はクローンマウスにおいて高頻度で

エピジェネティックなエラーが発生する領域である (Ohgane J *et al.* 2004)。そこで、内在性 Sa114 ASncRNA による DNA メチル化制御が標的遺伝子特異的であるかどうかを検証するために、ノックダウン効果の最も高かったコンストラクト A の shRNA 導入により内在性 Sa114 ASncRNA 量を低下させた ES 細胞を用いて、Sa11 ファミリーに属する他の遺伝子 (Sa111 および Sa113) の T-DMR の DNA メチル化解析を行った (図 2-6B, C)。なお、コンストラクト A の shRNA 配列は Sa111 および Sa113 の転写調節領域には完全に一致する配列が存在しないことを確認した。バイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化解析の結果から、内在性 Sa114 ASncRNA 発現を人為的に低下させた細胞においても、Sa111 では対照と比較して DNA メチル化状態が変化しないことが示された (図 2-6B)。この結果は Sa113 T-DMR についても同様であった (図 2-6C)。なお、Sa111 および Sa113 の遺伝子発現を RT-PCR により解析した結果、両遺伝子ともに発現が低下する傾向が示された (図 2-6D)。

内在性 Sa114 ASncRNA は、他の Sa11 ファミリー遺伝子の T-DMR では DNA メチル化パターンへの影響がないことから、Sa114 T-DMR 特異的に DNA メチル化状態を制御していることが強く示唆された。また、Sa11 ファミリー遺伝子はお互いにタンパク質の発現レベルで相互作用しながら、Sa11 ファミリー遺伝子の転写を活性化することから、内在性 Sa114 ASncRNA のノックダウンに伴う Sa111 および Sa113 mRNA の発現低下は、Sa114 のタンパク質発現量の低下 (図 2-5B) に伴う二次的な変化であると考えられる。

内在性 Sa114 ASncRNA による Sa114 遺伝子近傍に存在する遺伝子の発現への影響

これまでによく研究されている HOTAIR などの長い一本鎖の遺伝子間 ncRNA は、ncRNA が転写される領域の周辺に存在する複数の遺伝子の発現に影響を与える。そこで、内在性 Sa114 ASncRNA によるエピジェネティック制御が Sa114 遺伝子に特異的であるかどうか調べるために、内在性 Sa114 ASncRNA 発現をノックダウンした ES 細胞で、Sa114 遺伝子近傍の約 500 kb の領域に存在する遺伝子群 (Atp9a、Nfatc2、Zfp64) の発現解

析を行った (図 2-7)。その結果、内在性 Sal14 ASncRNA をノックダウンした ES 細胞では、Sal14 遺伝子発現はコントロールに比べて有意に低下したが、近傍の遺伝子である Atp9a、Nfatc2、Zfp64 の発現はコントロールに比べて有意な差が認められなかった。この結果から、内在性 Sal14 ASncRNA 量の低下は、Sal14 近傍遺伝子群の発現には影響を与えていないことから、クロマチン修飾により広範な遺伝子領域の制御に関与することが報告されている HOTAIR などの lincRNA (遺伝子間 RNA) とは違うタイプの ncRNA であることが示された。

Dicer による内在性 Sal14 ASncRNA 量および DNA メチル化への影響評価

Sal14 ASncRNA は Sal14 のイントロンから転写調節領域上流まで転写されることから、少なくとも一部で Sal14 のセンス mRNA と相補的な二本鎖 RNA を形成する可能性が考えられた。真核細胞内で形成された長い二本鎖 RNA は Dicer によって短い RNA に切断される。そこで、内在性 Sal14 ASncRNA によるエピジェネティック制御が Dicer を介した mRNA と ASncRNA の二本鎖 RNA 形成による短鎖 RNA への切断による可能性を調べるために、Dicer を欠損した ES 細胞での内在性 Sal14 ASncRNA 発現および Sal14 mRNA 発現と Sal14 の T-DMR の DNA メチル化状況をバイサルファイトシーケンス法により解析した (図 2-8)。その結果、Dicer 欠損 ES 細胞での内在性 Sal14 ASncRNA 発現は、野生型 ES 細胞に比べて有意な差が認められなかった。また、Dicer を介した短い二本鎖 RNA への切断から予想される Dicer 欠損下の Sal14 mRNA 量の上昇は認められなかった。一方、Sal14 mRNA 発現は、野生型 ES 細胞に比べて低下したが (図 2-8A)、Dicer 欠損により ES 細胞では増殖速度が低下し、分化しやすい傾向がみられることから、間接的に Sal14 mRNA の発現が低下したと考えられる。DNA メチル化解析においても、Dicer 欠損 ES 細胞の Sal14 の promoter T-DMR および intronic T-DMR の DNA メチル化パターンは、野生型 ES 細胞に比べて変化が認められなかった (図 2-8B, C)。これらの結果から、内在性 Sal14 ASncRNA は、Dicer を介した短い二本鎖 RNA 生成とは異なる

メカニズムで機能することが示唆された。

内在性 Sa114 ASncRNA による ES 細胞の増殖能への影響

内在性 Sa114 ASncRNA 発現を人為的に低下させた ES 細胞の細胞数を解析した (図 2-9)。その結果、実験群では、いずれもコントロール群に比べて有意に細胞数が低いことが示された。この結果から、内在性 Sa114 ASncRNA 量の減少は、ES 細胞の増殖能へ影響を及ぼすことが示唆された。

内在性 Sa114 ASncRNA によるマスター転写因子群 (Nanog、Oct4、Sox2) への影響

Sa114 転写因子は ES 細胞の多分化能維持に関与する転写因子群と相互作用し、ES 細胞の多分化能維持に関与するマスター遺伝子の発現を制御する (Yang J *et al.* 2008; Yang J *et al.* 2010)。そこで、内在性 Sa114 ASncRNA によるマスター転写因子群への影響を検討するために、内在性 Sa114 ASncRNA 発現を人為的に低下させた ES 細胞におけるマスター転写因子群の発現を検討した (図 2-10)。その結果、Oct4、Nanog、Sox2 のいずれにおいても、mRNA の発現が内在性 Sa114 ASncRNA のノックダウンによりコントロールと比べて低下することが示された (図 2-10A-C) これらの結果から、内在性 Sa114 ASncRNA 量の減少は、ES 細胞の多分化能維持に必至なマスター転写因子群の遺伝子発現にも影響を及ぼすことが示された。

考察

第一章では、Sal14 を始めとした複数の遺伝子でセンス mRNA の発現が高い細胞で、T-DMR は低メチル化であり、ASncRNA も高発現していることがわかった。Sal14 は、ES 細胞の多分化能維持とともに、器官形成期の四肢・心臓形成などにも関係する重要な遺伝子である。そこで本章では、Sal14 mRNA と内在性 Sal14 ASncRNA をともに発現する ES 細胞を用い、shRNA コンストラクトを設計して内在性 Sal14 ASncRNA 発現量を低下させ、エピジェネティック制御への関与を明らかにすることを試みた。shRNA により内在性 Sal14 ASncRNA 発現を低下させたところ、Sal14 T-DMR の DNA メチル化が亢進し、それに伴って Sal14 mRNA の発現も低下することが明らかになった。これにより内在性 Sal14 ASncRNA は、発現している細胞で T-DMR の低メチル化維持による Sal14 遺伝子の活性化に関与することが明らかになった。内在性 Sal14 ASncRNA の発現低下による Sal14 遺伝子の不活性化に伴い、他の ES 細胞のマスター遺伝子の発現および ES 細胞の増殖も抑えられたことから、内在性 Sal14 ASncRNA は ES 細胞の多分化能維持に必須な因子であることが示された。

Khps1 の一部を NRK 細胞内で強制発現させると、転写調節領域の T-DMR が脱メチル化へ誘導される。このことから、Khps1 は Sphk1 遺伝子のメチル化制御に関わるということが明らかとなった (Imamura T *et al.* 2004)。また、第一章で発見された内在性 ASncRNA と同様に、mRNA 発現と一致するものでは、Nef1 遺伝子の内在性 ASncRNA (Nef1-as) と Vim 遺伝子の内在性 ASncRNA (Vim-as) が報告されている (Tomikawa J *et al.* 2011)。NRK 細胞内で Nef1-as を強制発現させると、遺伝子転写調節領域の T-DMR が脱メチル化へ誘導される。なお、Vim-as も PC12 細胞で脱メチル化の誘導が再現された (Tomikawa J *et al.* 2011)。このことは、内在性 ASncRNA の発現が mRNA 発現と一致する場合でも強制発現により T-DMR の脱メチル化が誘導されることを示唆している。しかし、これら

はその細胞の生死や運命決定に重要ではないことから、内在性 ASncRNA の強制発現による T-DMR の脱メチル化が誘導されたにも関わらず、細胞の形質に変化は認められなかった。つまり、内在性 ASncRNA による T-DMR の DNA メチル化を変えることで細胞の形質を転換させるためには、細胞の生死や運命決定に重要な遺伝子の内在性 ASncRNA でなければならないと考えられた。これに対して本研究で同定した内在性 ASncRNA は、ES 細胞の多分化能維持や神経細胞への分化に必須な転写因子をコードする遺伝子の転写制御に関わる可能性がある。本研究では、多分化能を有する ES 細胞において、多分化能維持に重要な *Sal14* mRNA と一致する発現を示す内在性 *Sal14* ASncRNA を shRNA で発現を低下させ、T-DMR のメチル化制御を解析した。その結果、遺伝子転写調節領域の T-DMR とイントロン 1 の T-DMR のメチル化が亢進することが明らかとなった。さらに、メチル化の亢進に伴って *Sal14* mRNA、タンパク発現の低下、*Sal14* と相互作用するマスター転写因子群の発現低下、さらに ES 細胞の自己再生に影響を与えることが明らかとなった。このことにより、内在性 ASncRNA が ES 細胞の多分化能維持に重要な因子であることを初めて明らかにしたのである。ES 細胞は多能性幹細胞であることから、ES 細胞由来の生体を得ることが可能である。つまり、今まで明らかにされていない初期発生から個体形成時期における内在性 ASncRNA の機能を明らかにすることが可能となる。

真核生物では、長い dsRNA は RNase III ファミリーの一種(ショウジョウバエの Dicer など)によって認識され、21-23 ヌクレオチドの siRNAs に分解される可能性がある (Elbashir SM *et al.* 2001; Hammond SM *et al.* 2000; Bernstein E *et al.* 2001)。その後、siRNA のうちの片方の鎖が RISC (RNA 誘導型サイレンシング複合体) と呼ばれる RNAi 標的複合体に組み込まれる。この RISC によって、組み込まれた RNA 鎖の配列に相補的な mRNA が分解される (Hammond SM *et al.* 2000; Bernstein E *et al.* 2001)。内在性 ASncRNA は、センスとは逆向きに転写され (Tomaru Y & Hayashizaki Y 2006;

Yelin R *et al.* 2003)、その機能性は明らかにされていないがセンスの mRNA と相補的に結合することで Dicer による siRNA の生成や RISC による mRNA の分解に関わっているのではないかとされていた。本研究で解析した内在性 Sal14 ASncRNA も、一部はセンスの mRNA と二本鎖を形成する可能性が考えられたが、Dicer を欠損した ES 細胞での解析から、内在性 Sal14 ASncRNA 発現に変化は認められなかった。さらに Dicer 欠損 ES 細胞での Sal14 T-DMR メチル化状態にも野生型 ES 細胞と比較して変化は見られなかった。一方、Sal14 遺伝子が Dicer により生成する siRNA を介した Sal14 mRNA の分解を受ける場合には、Dicer 欠損により Sal14 mRNA 発現が相対的に上昇する可能性も考えられたが、Dicer 欠損 ES 細胞での Sal14 mRNA の発現上昇は認められなかった。以上のことから、内在性 Sal14 ASncRNA は Dicer を介した短い二本鎖 RNA の形成とは異なり、一本鎖の長鎖 ncRNA として DNA メチル化制御に関与することが強く示唆された。

これまでによく研究されている長い一本鎖 ncRNA である linc RNA は、HOTAIR に代表されるように、ゲノムワイドな PRC2 の再配置を介した H3K27me3 の誘導により遺伝子発現を抑制することが報告されている (Gupta RA *et al.* 2010)。したがって、lincRNA は遺伝子間領域から大量に転写され、広範囲なゲノム領域での遺伝子不活性化に関与すると考えられる。これに対して、本章で解析した内在性 Sal14 ASncRNA は、Sal14 遺伝子の遺伝子転写調節領域とオーバーラップし、発現量は非常に低いながら、Sal14 T-DMR のみの DNA 低メチル化維持による遺伝子活性化に関与するという点で、lincRNA とは転写される位置および発現制御様式が異なることが示された。さらに、Sal14 近傍の約 500 kb には、Sal14 以外に 3 つの遺伝子 (Atp9、Nfatc、Afp64) がコードされているが、Sal14 ASncRNA 量の低下によって近傍の 3 遺伝子の発現状態には変化が見られなかった。この事実からも、Sal14 ASncRNA は Sal14 遺伝子特異的に働き、複数遺伝子の発現に影響を与える lincRNA とは機能的にも異なっていることが示された。

ASncRNA を基盤とした内在性遺伝子の DNA メチル化制御は標的遺伝子特異的に行なわれる必要があり、遺伝子転写調節領域の内在性 ASncRNA は lincRNA と違って標的遺伝子特異的な DNA メチル化制御に応用できる可能性があることが、本章の結果から示された。

Sall 遺伝子については、ほ乳類では 4 種類(Sall1~Sall4)が知られ、ショウジョウバエからヒトまで広く保存されている。Sall ファミリーの一つである Sall4 は、ES 細胞では Nanog と結合し Oct4 の発現を制御することで幹細胞の未分化能維持・自己増殖に重要な役割を担う (Yang J *et al.* 2008)。また、Sall4 タンパク質に支配される遺伝子は 3, 223 にのぼり、これらの Sall4 標的遺伝子の転写制御については、ES 細胞の多分化能維持に関わる遺伝子の活性化のみならず、分化に伴って細胞系譜決定に関与する遺伝子の不活性化も含まれており、Sall4 は ES 細胞の多分化能維持・分化抑制に非常に重要である (Yang J *et al.* 2008)。本章では、マウス ES 細胞で発現している内在性 Sall4 ASncRNA 発現を shRNA により低下させると、Sall4 遺伝子転写調節領域の T-DMR (promoter T-DMR および intronic T-DMR) のメチル化状態が亢進することを示し、Sall4 mRNA の発現低下とともに、他の ES 細胞多分化能維持のマスター遺伝子である Oct4、Nanog、Sox2 の発現も低下することが示された。以上のことから、内在性 Sall4 ASncRNA は、Sall4 遺伝子転写調節領域の T-DMR (promoter T-DMR および intronic T-DMR) のメチル化状態を制御することで、ES 細胞の多分化能維持に重要な転写因子群の発現にも影響することが示された。また、内在性 Sall4 ASncRNA のノックダウンにより、ES 細胞の自己複製も影響を受けたこととあわせて考えると、様々な細胞種の機能維持に重要な遺伝子を ASncRNA のノックダウンによりエピジェネティックに不活性化することで、細胞の性質を人為的に操作し、有用細胞の樹立などにつながると考えられる。

表 2-2. Bisulfite PCR 用プライマー

Bisulfite PCR で利用したプライマー

標的分子	Forward配列	Reverse配列	PCR cycles
Sall4(-376bp~- 1000bp)	5'- AAGGTTATAGAGG GGGTTGGTT-3'	5'- CAACTTTTCCCTCTAAA ATCAAACCTA-3'	95°C 10min;(95°C 30sec,52°C 30sec,72°C 1min)×43cycles;72°C 10min 95°C 10min;(95°C 30sec,52°C
Sall4(-1068bp ~-1507bp)	5'- GTGGAGAATATTG GTAGATTAGTT-3'	5'- CAACCTCTCCTCCATCT TTCTA-3'	30sec,72°C 1min)×43cycles;72°C 10min 95°C 10min;(95°C 30sec,55°C
Sall4(+2276bp ~-2657bp)	5'- TTTTGGAAGTTTTTCCCTTAATCCCACATCACC GGATTTTTT-3'	5'- AATA-3'	30sec,72°C 1min)×43cycles;72°C 10min 95°C 10min;(95°C 30sec,62°C
Dlx4(-3.5kbp~- 4.5kbp)	5'- AGTTAGGGAAGGT AGTGTTTT-3'	5'- ACCACCCCTTACACTTCA CTAAA-3'	30sec,72°C 1min)×43cycles;72°C 10min

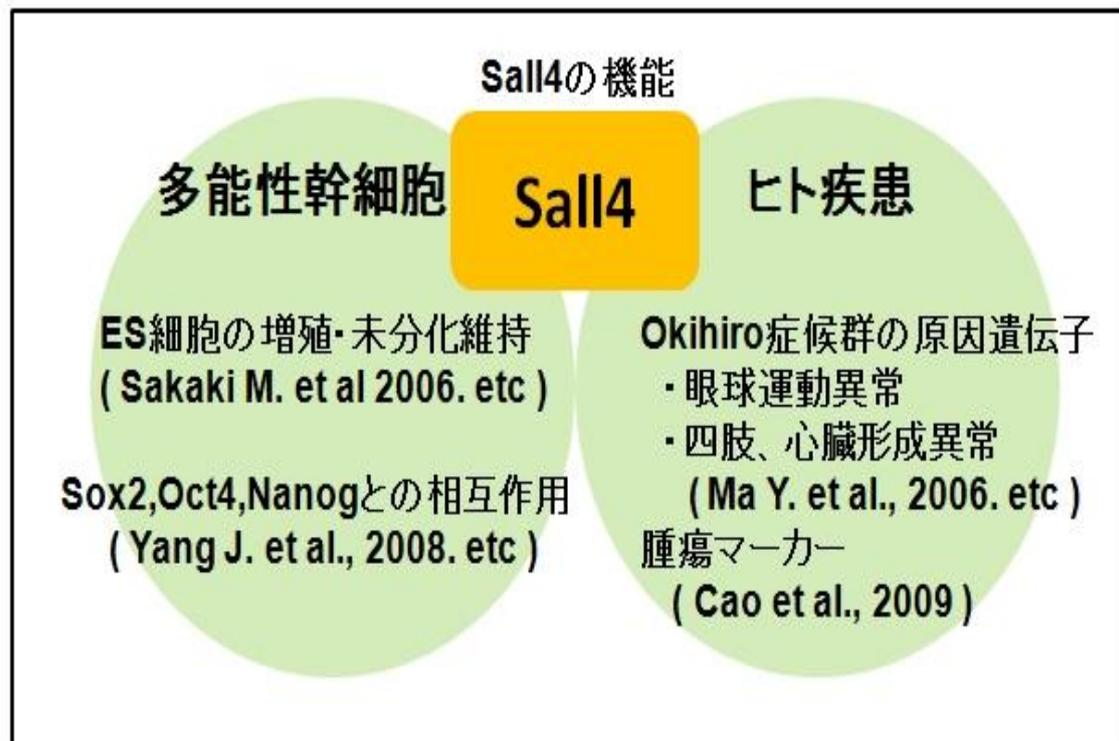


図 2-1. Sall4 の機能

Sall4 は、多能性幹細胞ではマスター転写因子群と相互作用することでES 細胞の増殖や未分化維持、細胞系譜決定に重要な不活性化に関わる。一方、ヒト疾患ではOkihiro症候群の原因遺伝子であり、また、腫瘍マーカーとして利用されている。Sall4 はES細胞の形質維持やマウスやヒトの個体形成に重要な役割を担う転写因子である。

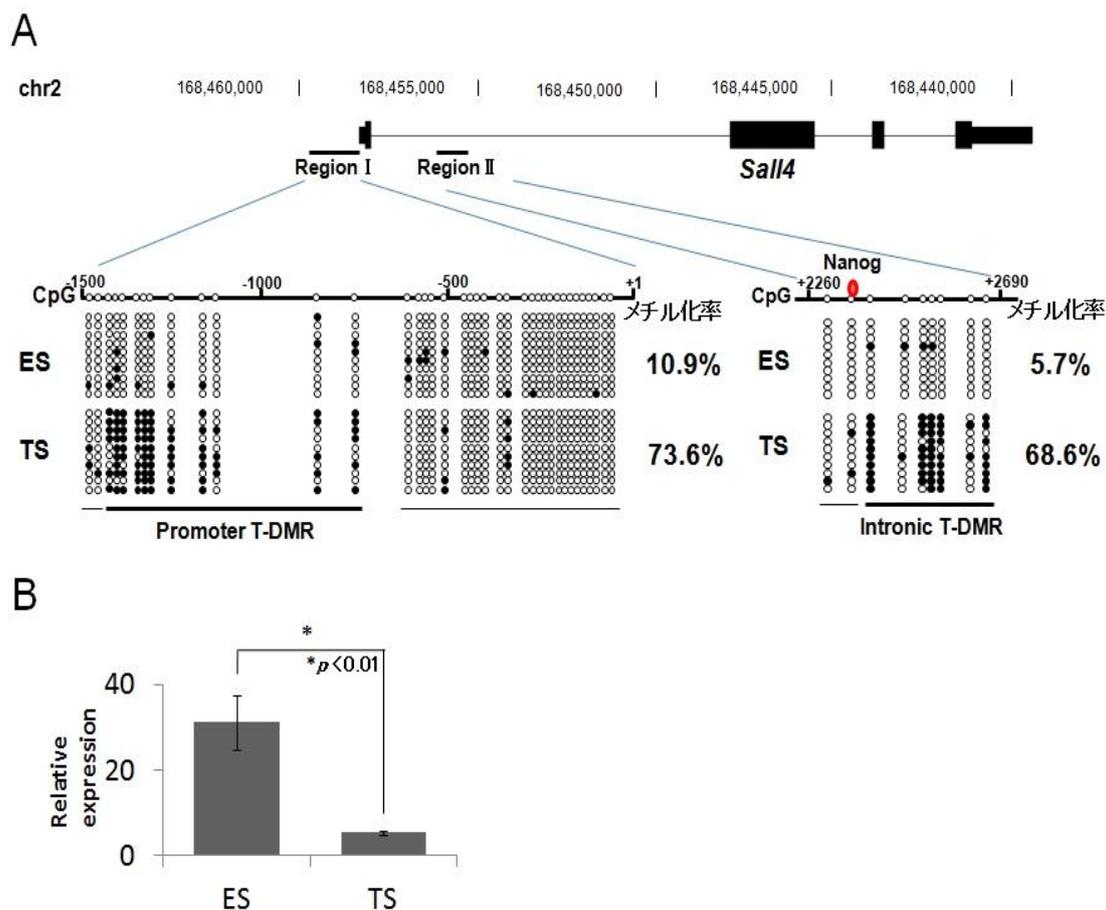


図 2-2. *Sal14* 遺伝子の T-DMR の同定と mRNA 発現との関連性

(A) *Sal14* の転写調節領域における T-DMR の DNA メチル化状態を示す。promoter T-DMR(-1507 bp~-376 bp)および intronic T-DMR(+2276 bp~2657 bp)の *Sal14* 転写開始点上流の CpG のメチル化状態をバイサルファイトシークエンシング法により解析した。すべての組織とも 10 クローン解析し、メチル化率を算出した。●はメチル化シトシン、○は非メチル化シトシン、赤丸は Nanog の binding site を示す。

(B) *Sal14* mRNA の発現解析を行った。縦軸は β -actin に対する相対的な *Sal14* mRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: $p < 0.01$

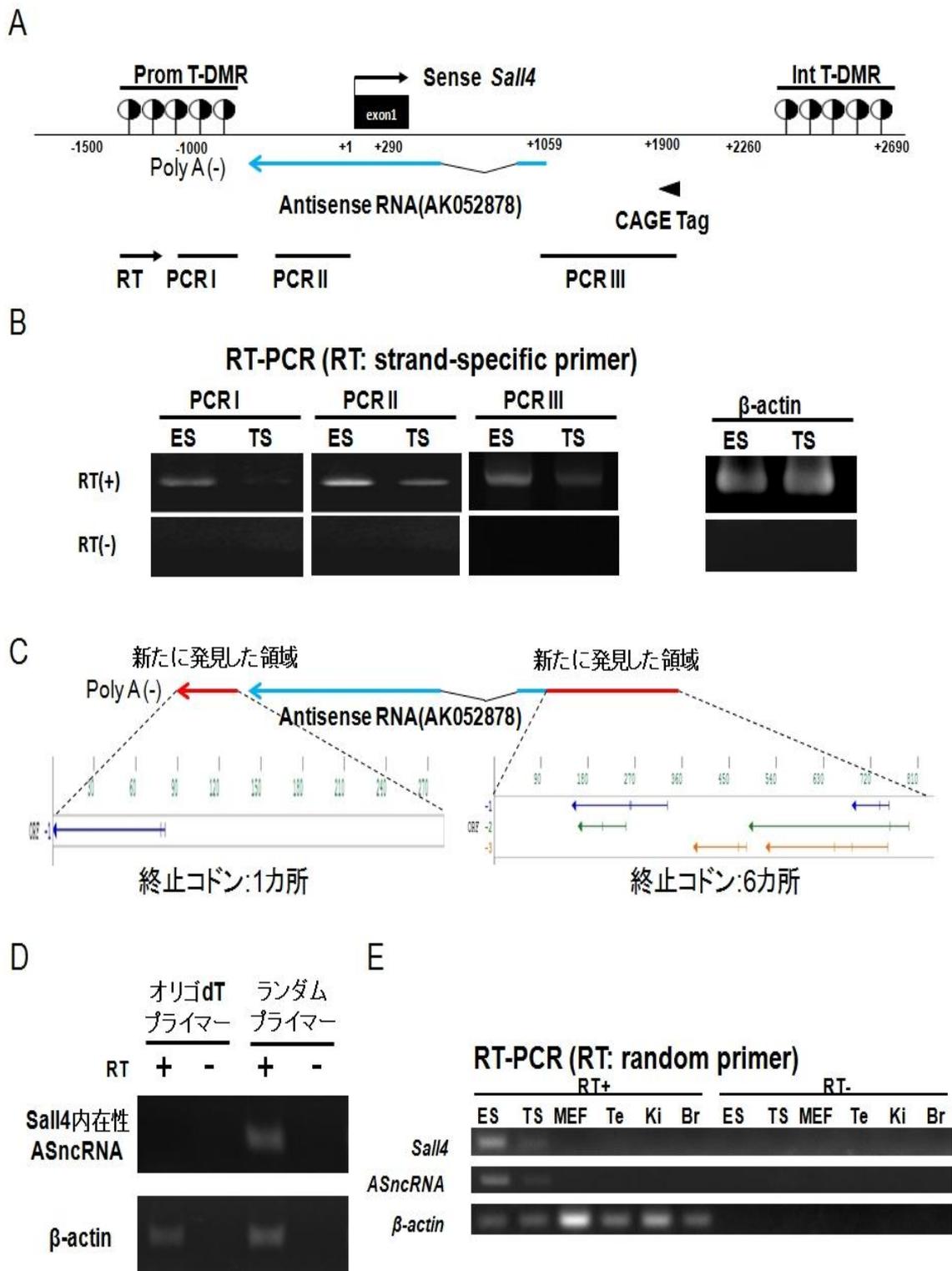


図 2-3. 内在性 Sal14 ASncRNA の同定と発現パターンの解析

(A) Sal14 の転写調節領域に EST (AK052878) として USCS マウスゲノムブラウザのデータベースに登録されている内在性 Sal14 ASncRNA を示す。内在性 Sal14 ASncRNA は、Sal14 遺伝子のイントロン 1 の領域から Sal14 の転写調節領域の T-DMR (promoter T-DMR) の手前の領域まで転写する。また、Sal14 遺伝子のイントロン 1 に CAGE Tag が

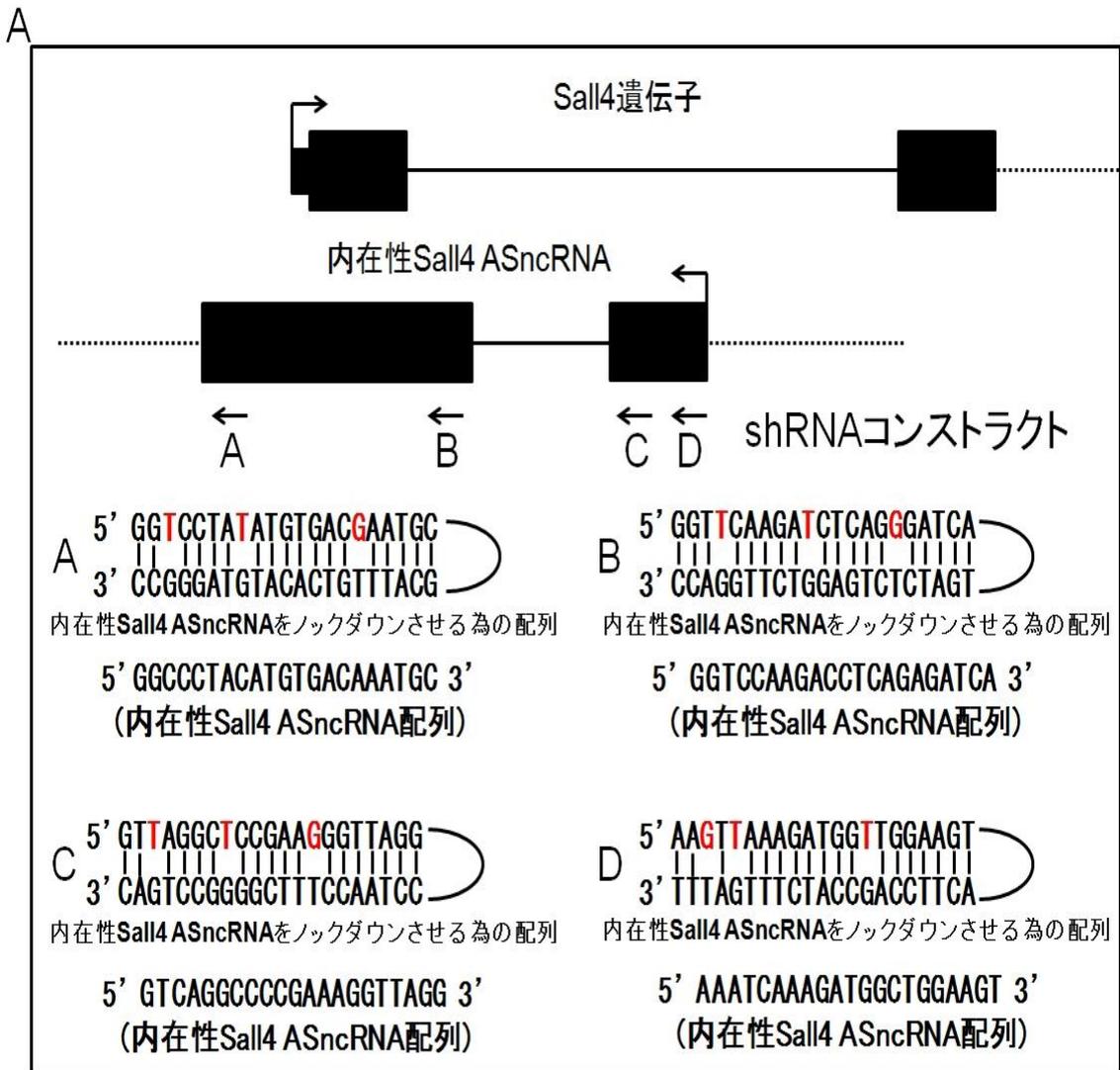
登録されている。青色の矢印は内在性 Sall14 ASncRNA を示す。

(B)ES 細胞および TS 細胞を用いて、strand-specific RT-PCR 法により新規の内在性 Sall14 ASncRNA の検出を行った。promoter T-DMR に RT 用のプライマーを設定し、PCR I、PCR II、PCR III の領域において、内在性 Sall14 ASncRNA を含む転写物を検出した。

(C)内在性 Sall14 ASncRNA の 5' 側に約 1.0 kb および 3' 側に約 0.3 kb の新たに検出した転写物を示す。水色の矢印は登録されている内在性 Sall14 ASncRNA を示す。また、赤色の矢印は新たに検出した転写物を示す。水色および赤色以外の矢印は予測される ORF を示し、矢印の根は開始コドン、先端は終止コドンを示す。新たに検出された転写物では、複数の終止コドンが検出された。

(D)内在性 Sall14 ASncRNA の 3' 末端に poly (A) の有無を示す。オリゴ dT プライマーおよびランダムプライマーを用いて RT-PCR を行った。RT+は Reverse Transcriptase にて合成した cDNA を示し、RT-はネガティブコントロールとして Reverse Transcriptase を用いていないことを示す。

(E)ES 細胞および TS 細胞、マウス線維芽細胞、精巣、腎臓、脳における内在性 Sall14ASncRNA およびセンス mRNA の発現解析を行った。RT+は Reverse Transcriptase にて合成した cDNA を示し、RT-はネガティブコントロールとして Reverse Transcriptase を用いていないことを示す。



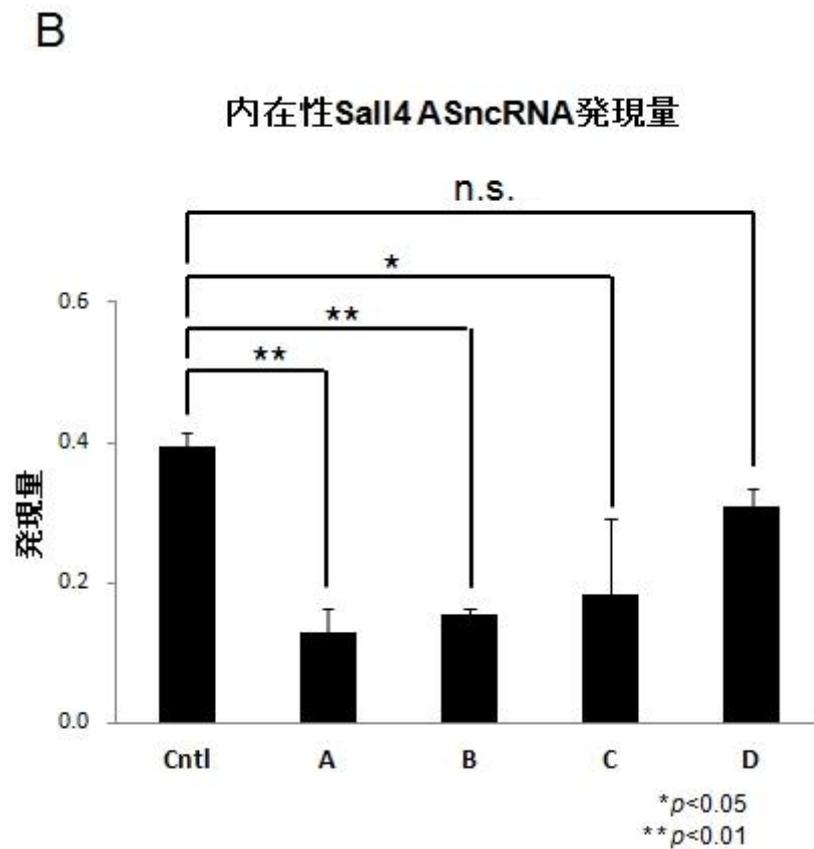


図 2-4. ES 細胞における内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウン

(A) 内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウン shRNA コンストラクトを示す。Sal14 遺伝子は右側へ転写し、内在性 Sal14 ASncRNA はアンチセンス方向への転写を示す。shRNA コンストラクト A-D では、Sal14 mRNA へ作用しないようにするため、二重鎖部分でセンス mRNA に相補的な配列には三か所の変異を導入した。なお、赤文字が変異部位を示す。

(B) 内在性 Sal14 ASncRNA の発現解析を行った。Cntl は野生型の ES 細胞を示す。A-D は内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウン shRNA コンストラクトを導入した ES 細胞を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な内在性 ASncRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、n. s. ; not significant

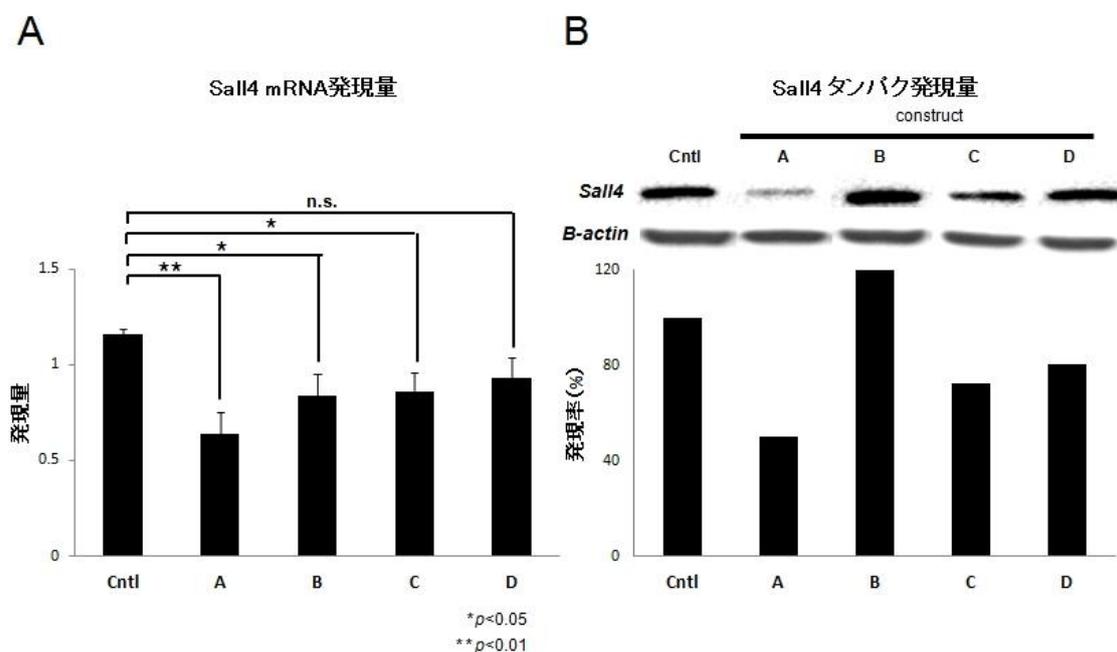
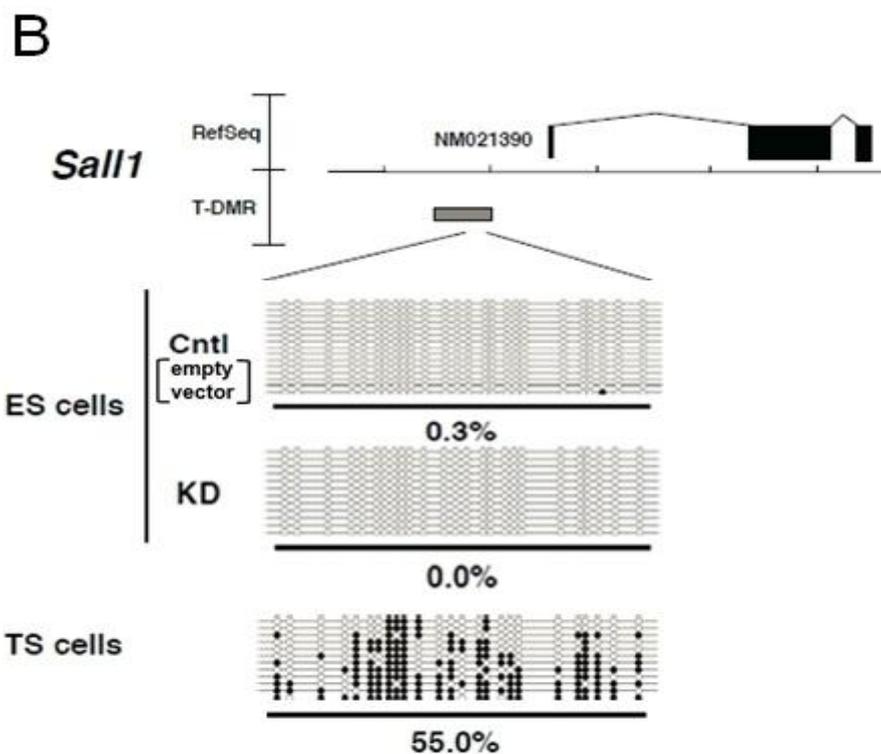
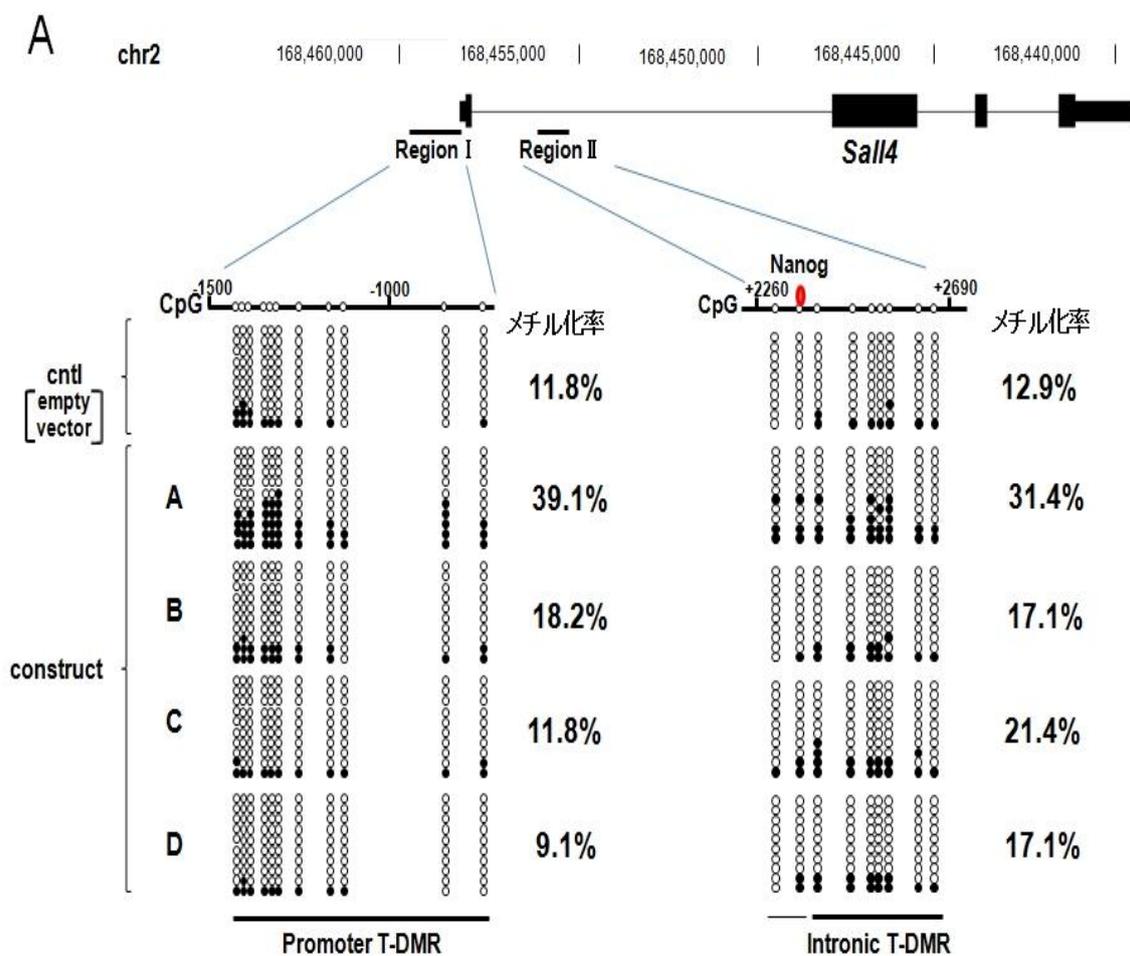


図 2-5. 内在性 Sal14 ASncRNA 発現の低下による Sal14 mRNA およびタンパク発現への影響

(A) Sal14 mRNA の発現解析を行った。Cntl は野生型の ES 細胞を示す。A-D は内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウン shRNA コンストラクトを導入した ES 細胞を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な Sal14 mRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、n. s. ; not significant

(B) Sal14 のタンパク質発現解析を行った。Cntl は野生型の ES 細胞を示す。A-D は内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウン shRNA コンストラクトを導入した ES 細胞を示す。縦軸の発現率 (%) を示す。コントロール群の発現量を 100% とし、実験群 A-D に対する割合を発現率として示した。



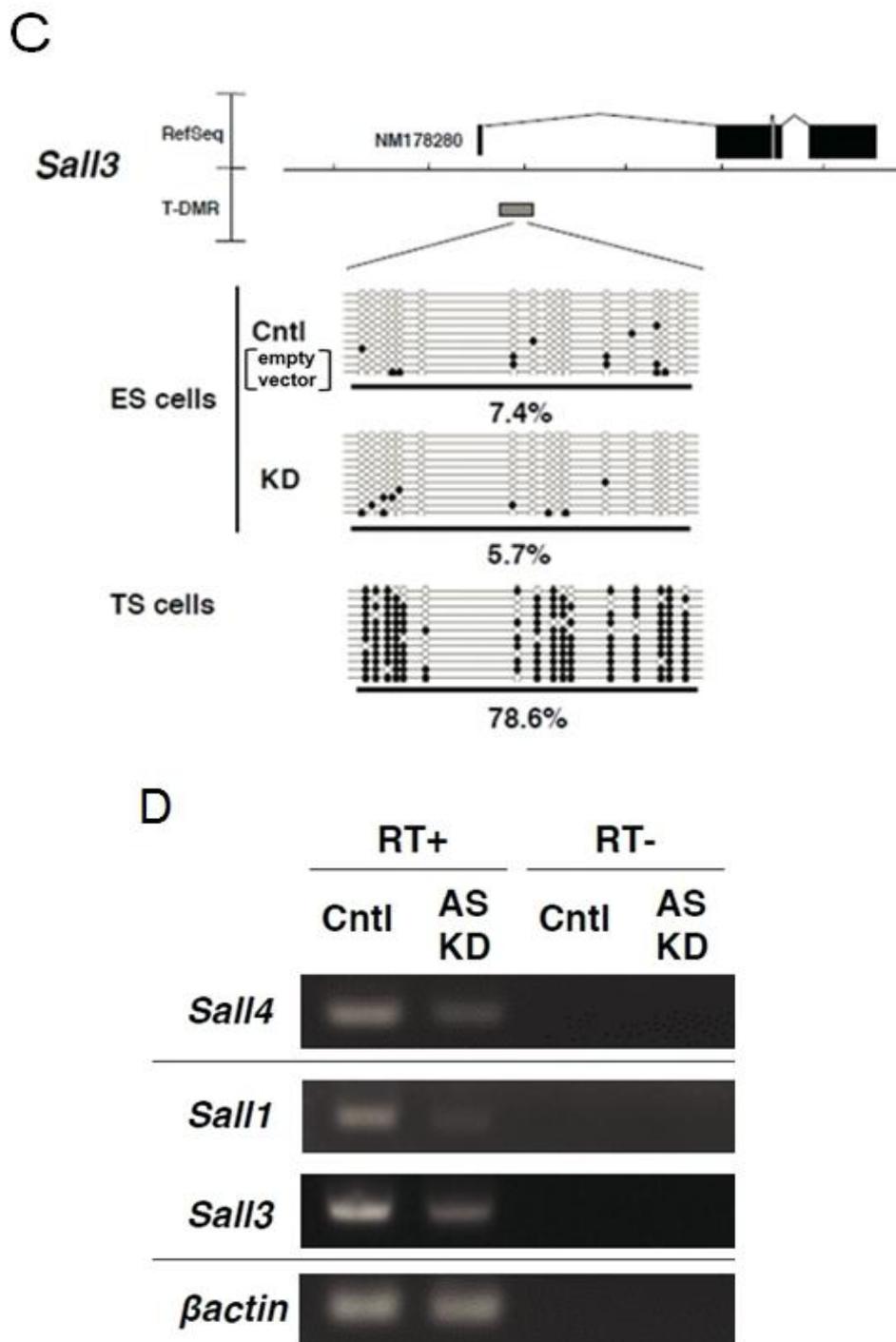


図 2-6. 4つのコンストラクトを用いた ASnc*Sall14* ノックダウン後の T-DMR 内のメチル化パターンおよび内在性 *Sall14* ASncRNA による *Sall14* ファミリー遺伝子への影響 (A) *Sall14* の T-DMR (promoter T-DMR および intronic T-DMR) の DNA メチル化状態を示す。promoter T-DMR (-1507 bp ~ -376 bp) の転写開始点上流と intronic T-DMR (+2276 bp ~ 2657 bp) の転写開始点下流に位置する CpG のメチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法により解析した。図中の Region I は promoter T-DMR、Region II は

intronic T-DMR を示す。すべての組織とも 10 クローン解析し、メチル化率を算出した。Cnt1 はコントロールとして empty vector を導入した ES 細胞を示し、construct A-D は、内在性 Sal14 ASncRNA をノックダウンした ES 細胞を示す。

(B) Sal11 の T-DMR の DNA メチル化状態を示す。図中のボックスは転写調節領域の T-DMR を示す。ES 細胞は 12-15 クローン、TS 細胞は 12 クローン解析し、各々メチル化率を算出した。

(C) Sal13 の T-DMR の DNA メチル化状態を示す。図中のボックスは転写調節領域の T-DMR を示す。すべての細胞とも 12 クローン解析し、各々メチル化率を算出した。

(D) Sal1 ファミリー遺伝子発現解析を行った。Cnt1 はコントロールとして野生型の ES 細胞を示し、AS KD は内在性 Sal14 ASncRNA をコンストラクト A でノックダウンした ES 細胞を示す。なお、RT+は Reverse Trascriptase にて合成した cDNA を示し、RT-はネガティブコントロールとして Reverse Trascriptase を用いていないことを示す。

(A), (B), (C) ●はメチル化シトシン、○は非メチル化シトシンを示す。

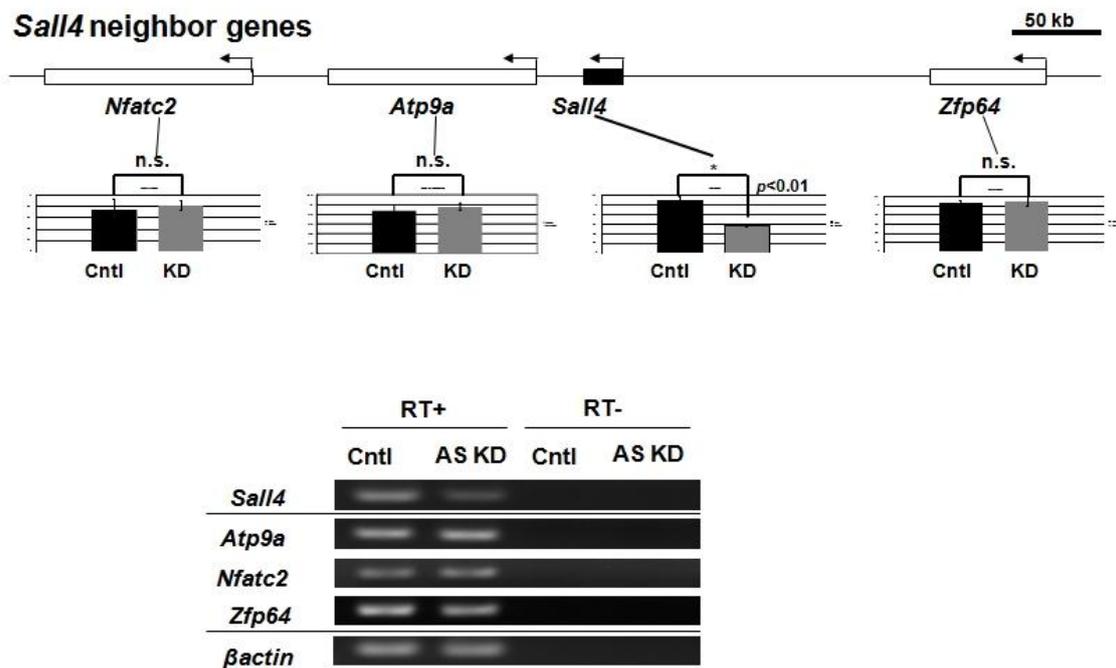


図 2-7. 内在性 *Sall4* ASncRNA による *Sall4* 近傍遺伝子近への影響

Sall4 近傍遺伝子群 (*Atp9a*、*Nfatc2*、*Zfp64*) の遺伝子発現解析を行った。Cntl はコントロールとして野生型の ES 細胞を示し、AS KD は内在性 *Sall4* ASncRNA をコンストラクト A でノックダウンした ES 細胞を示す。なお、RT+は Reverse Trascriptase にて合成した cDNA を示し、RT-はネガティブコントロールとして Reverse Trascriptase を用いていないことを示す。解析結果は Means±SE で示し、 β -actin に対する相対的な各遺伝子の mRNA の発現量を示す。各群 n=3 で行った。*:p<0.01、n. s. ; not significant

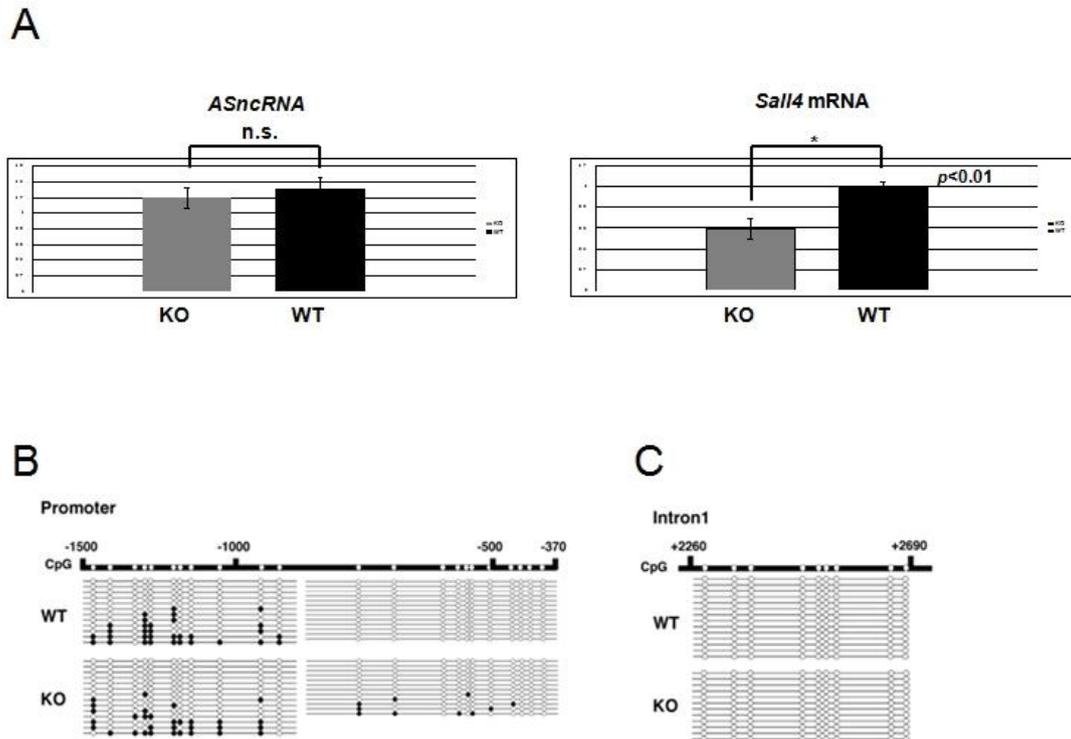


図 2-8. Dicer による内在性 Sall4 ASncRNA への影響

(A) Sall4 における内在性 Sall4 ASncRNA とセンス mRNA の発現解析を行った。KO は Dicer 欠損 ES 細胞を示し、WT は野生型の ES 細胞を示す。解析結果は Means \pm SE で示し、縦軸は β -actin に対する相対的な Sall4 mRNA または内在性 Sall4 ASncRNA の発現量を示す。各群 n=3 で行った。*: $p < 0.01$ 、n. s.; not significant

(B) Sall4 の promoter T-DMR の DNA メチル化状態を示す。promoter T-DMR (-1507 bp ~ -376 bp) の Sall4 転写開始点上流の CpG のメチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法により解析した。すべての組織とも 12-14 クローン解析し、メチル化率を算出した。

(C) Sall4 の intronic T-DMR の DNA メチル化状態を示す。intronic T-DMR (+2276 bp ~ 2657 bp) の Sall4 転写開始点下流に位置する CpG のメチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法により解析した。すべての組織とも 12-14 クローン解析し、メチル化率を算出した。

(B), (C) ●はメチル化シトシン、○は非メチル化シトシンを示す。

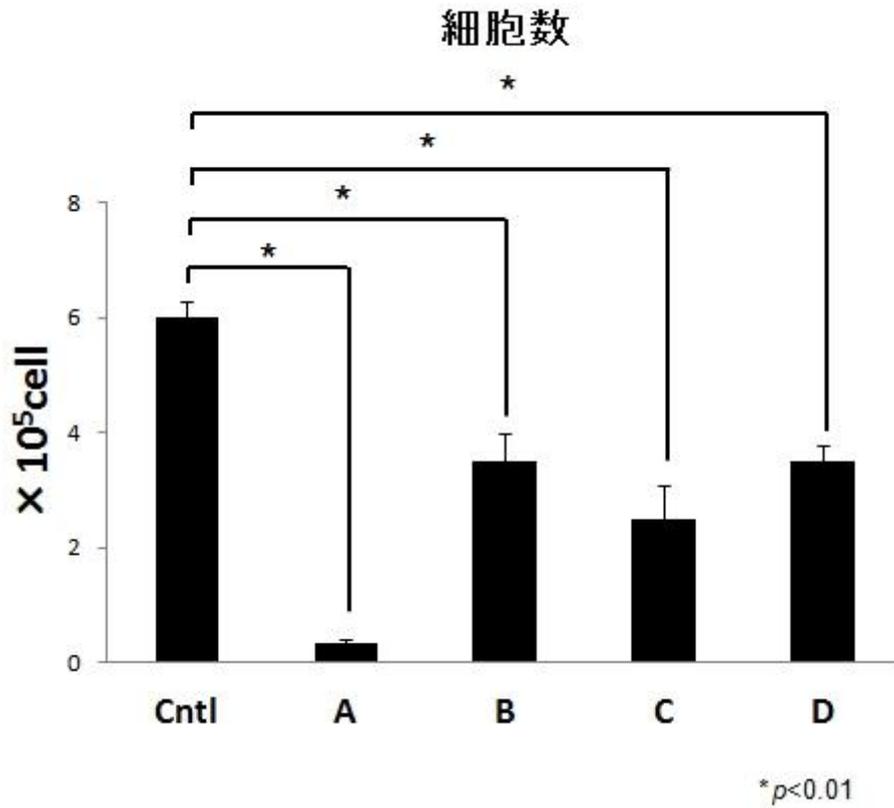


図 2-9. 内在性 Sa114 ASncRNA による ES 細胞の増殖能への影響

ES 細胞の増殖能を解析した。Cntl は野生型 ES 細胞を示し、A-D は内在性 Sa114 ASncRNA をノックダウンした ES 細胞を示す。縦軸は細胞数を示す。解析結果は Means ± SE で示し、培養終了時の細胞数を示した。各群 n=3 で行った。*:p<0.01、n. s. ; not significant

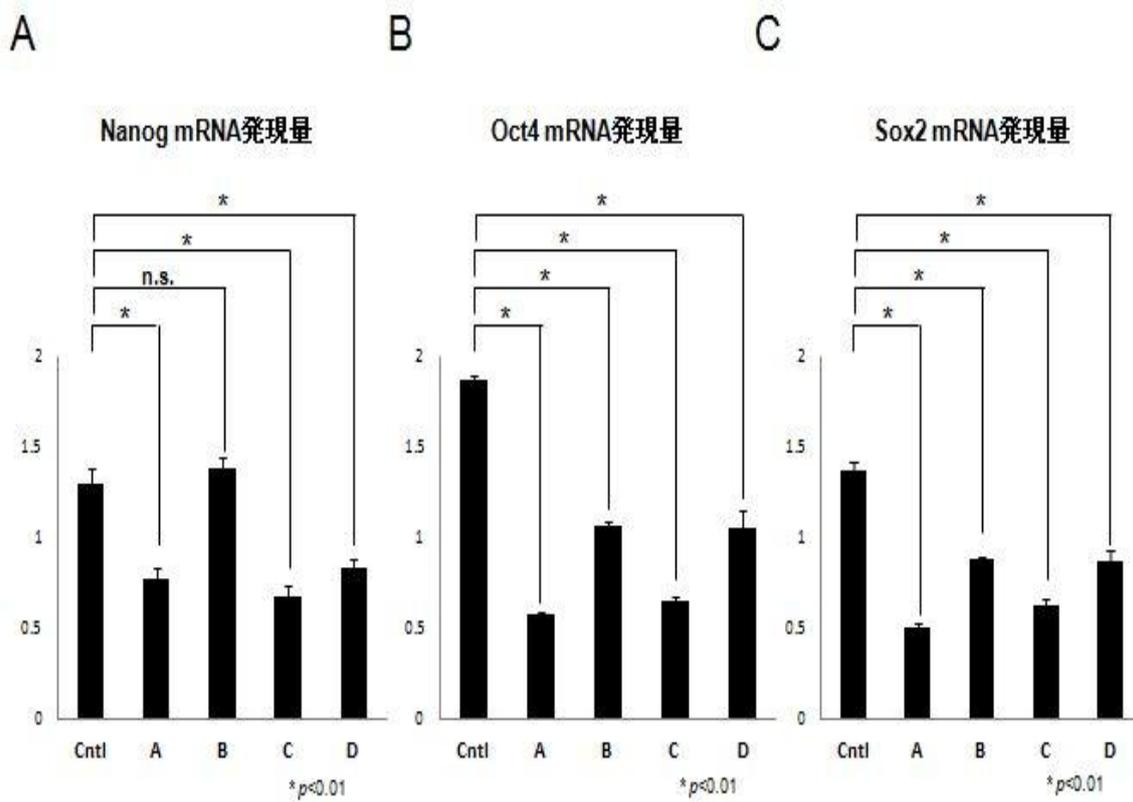


図 2-10. 内在性 Sa114 ASncRNA 発現の低下における Nanog, Oct4, Sox2 の遺伝子発現への影響

(A), (B), (C) マスター転写因子群 (Nanog, Oct4, Sox2) の発現解析を行った。Cnt1 は野生型 ES 細胞を示し、A-D は内在性 Sa114 ASncRNA をノックダウンした ES 細胞を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な各遺伝子の mRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: p < 0.01、n. s. ; not significant

第三章

Sal14 領域に存在する内在性 ASncRNA を標的とした
inducible shRNA の Tg マウス作製

序論

第二章では内在性 *Sal14* ASncRNA が培養細胞レベルで *Sal14* T-DMR の DNA 低メチル化状態を維持し、ES 細胞の自己再生に寄与することを明らかにした。生体において、*Sal14* は初期胚では 8-16 細胞期から受精後の転写が始まり、胚盤胞期胚の内部細胞塊で発現し、将来胎仔になる内部細胞塊で重要な働きをする (Elling U *et al.* 2006; Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006)。その後の器官形成期では、5.5-6.5 dpc の原始外胚葉で強く発現し (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006)、7.0 dpc では尿膜や羊膜にて発現する (Koshiba-Takeuchi K *et al.* 2006)。また、8.5-9.5 dpc では、間充組織と神経上皮、神経細胞に *Sal14* の発現が限定される (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006; Koshiba-Takeuchi K *et al.* 2006)。器官形成期以降の 11.5-12.5 dpc では、前脳や中脳、生殖結節、四肢、尾、肛門、心筋に *Sal14* が発現していることが報告されている (Kohlhase J *et al.* 2002; Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006; Tsubooka N *et al.* 2009; Koshiba-Takeuchi K *et al.* 2006)。出生後では、脳や心臓、精巣、筋肉、卵巣に発現していることが報告されている (Tsubooka N *et al.* 2009)。以上より、*Sal14* 遺伝子は第二章で明らかにした ES 細胞で重要であるのみでなく、初期発生胚の内部細胞塊および器官形成期の心臓原器や枝芽、脳で強く発現し、出生後も一部の組織で発現が見られ、生体でも重要な働きをする転写因子であると考えられる (図 3-1)。

Sal14 遺伝子のエクソン 2-3 までを欠損した null 型ノックアウトマウスの初期胚は、6.5 dpc 以降は生存することができない。また、原始外胚葉のマーカー遺伝子 (FGF4, *Nodal*, *Oct4*) の発現が減少していることから、*Sal14* は胚の発生に重要な因子である (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006; Tsubooka *et al.*, 2009)。*Sal11* および *Sal14* ダブルヘテロマウスでの解析から、*Sal11* と *Sal14* はお互いに二量体を形成することで腎臓や肛門、心臓を形成に関与する (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006)。*Sal14* エクソ

ン2内へのマーカー遺伝子の挿入による別の *Sall14* 欠損マウスの解析では、11.5 dpc の胎仔で心臓の形成不全により死亡する例が報告されている (Koshiba-Takeuchi K *et al.* 2006)。また、9.5 dpc および 10.5 dpc の胎仔の前肢では、*Sall14* が、別のホメオティック転写因子である *Tbx5* と相互作用することで四肢や心臓の形成に関与する (Koshiba-Takeuchi K *et al.* 2006)。以上より、*Sall14* を欠損した胎仔では発生異常を起こして致死になることから、*Sall14* は生体の発生に重要な因子である。本論文の第二章では、ES 細胞で内在性 *Sall14* ASncRNA をノックダウンすることで *Sall14* と相互作用する多分化能維持に必須な転写因子の発現や self-renewal に影響を与えることを明らかにした。これらから考えると、内在性 *Sall14* ASncRNA は生体においてもマウスの発生や心臓・脳などの機能維持に重要である可能性が極めて高い。

Sall14 ヘテロ欠損マウスの大半は正常に生まれるが一部では、14.5–18.5 dpc の胎仔の脳および心室中隔の形成異常を呈し、出生後の仔の生存率が減少する。また、ヒト *SALL4* は上肢の形成異常や眼球運動の制限等を主症状とする疾患 (Okihiro 症候群) の原因遺伝子であり、患者には直腸の形成異常も一部に認められる (Kohlhase J *et al.* 2005)。出生後 5 週令のヘテロ欠損マウスの一部では、肛門形成異常および腸管肥大の症状を示し、ヒト *SALL4* の変異でおきる Okihiro 症候群の症状の一部を示す (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006)。Okihiro 症候群以外のヒトの *SALL4* の変異では、胚の発生異常、心房隔欠損症、腎形成不全、肛門狭窄症、鎖肛、ヒルシュスプルング病が報告されている (Kohlhase J *et al.* 2005)。*Sall14* 遺伝子の欠損マウスの解析からは、完全な遺伝子破壊ではなく、ヘテロマウスでの *Sall14* 遺伝子発現量の減少とヒト疾患の症状に共通点が多く見出される。これらの事実から、少なくとも *SALL4* 遺伝子が病因となる疾患は、*SALL4* 遺伝子の転写調節異常により発現が減少することで起きる可能性が高いと考えられる。

Sal14 は初期胚でも機能することから、器官形成期や出生後の組織での内在性 ASncRNA の機能を解析するためには、内在性 ASncRNA 量を変化させる時期や程度をコントロールする必要がある。また、ヘテロ欠損での症状が実際のヒト疾患に類似した表現型であったことから、ヒト疾患の病態モデル動物では、遺伝子破壊による完全な欠損ではなく、発現時期や量の異常により遺伝子機能の低下を誘導することで、より実際の病態に近いヒト SALL4 による疾患モデルが作製できる可能性も考えられる。本章では、生体での内在性 Sal14 ASncRNA の機能を解析するために、ドキシサイクリン (Dox)により Sal14 ASncRNA をノックダウンする shRNA の発現を操作することが可能な内在性 Sal14 ASncRNA トランスジェニック (Tg)マウスの樹立に成功した。この Tg マウスを用いて、実際に生体での内在性 Sal14 ASncRNA の機能を明らかにするために、胎仔発生への影響および DNA メチル化への関与を検討する。

材料および方法

試薬および細胞培養、遺伝子解析

試薬は、特に断りが無い限り和光純薬より購入した。

細胞培養および RNA 発現と DNA メチル化解析は、第一章または第二章に準じて行なった。なお、用いたプライマーやプローブは表 3-1 に示した。

Microinjection 法による Tg マウス作製

C57BL/6J 雌 4 週令マウス（日本チャールスリバー）へ 16 時より PMS（あすか製薬）を 5.0 I.U. 腹腔内へ投与し、その 48 時間後に hCG（あすか製薬）を 5.0 I.U. 腹腔内へ投与することで過排卵処理を行い、C57BL/6J 雄 8~12 週令マウスと個別に交配を行った。翌日、M2 培地(Sigma)へヒアルロニダーゼ(Sigma)を小さじ一杯分加えた培地を充填させた注射筒で、交配した C57BL/6J 雌マウスの卵管膨大部をシャーレ内にてひっかくことで受精卵を採取した。採取した受精卵はキャピラリーにて回収し、M16 培地(Sigma)のドロップで 3 回洗浄した。洗浄後、18 時まで 5% CO₂ 37°C インキュベーター内(Hirasawa)にて培養した。18 時より実体顕微鏡下にて受精卵を観察し、正常胚および雌雄前核が目視確認された受精卵の選抜を行った。20 時より、注入針を Sutter P-97 micropipette puller (Sutter Instrument) を利用し、適した設定値 (heat set to 730, pull set to 0, velocity set to 30, time set to 250, heat set to 730, pull set to 80, velocity set to 60, and time set to 200) で注射針を作成し、マイクロローダー (eppendorf) にてコンストラクトを注射針の先へ充填した。Microinjection 用倒立顕微鏡 (Leica) 下にて、コンストラクトを充填させた注入針をフェムトジェット (eppendorf) に装着し、電動のマニピュレーター(eppendorf)にて注射針の微動で可動することでコンストラクトを受精卵の前核へ注入した。コンストラクトを前核へ注入した受精卵は M16 培地ドロップへ移し、5% CO₂ 37°C インキュベーター内(Hirasawa)

にて一晚培養し、2細胞期胚へ発生させた。2細胞期胚は偽妊娠マウス（精官結紮を施した ICR ♂ マウスと交配し、翌日、膈開口部に膈栓が確認された♀マウス）の卵管采より卵管膨大部へ移植し、移植から 19 日目に帝王切開にて founder 候補マウスを得た。得られた founder 候補マウスは、里親（帝王切開日の前日に自然分娩した ICR ♀ マウス）につけることで離乳まで維持した。生後 8 週目にて Wt のマウスと交配することで次世代を作成し、その次世代の Genotype により得られた founder の Germline transmission の確認を行った。なお、Microinjection 法で注入したコンストラクトは第二章で最も内在性 Sall14 ASncRNA を一過性にノックダウンさせることができたコンストラクト A を用いた。

内在性Sall14 ASncRNA誘導型ノックダウンコンストラクトの構築・調整

Dox により shRNA を誘導的に発現させることができるベクター (pSingle-tTS-shRNA, clontech) に、第二章で最もノックダウン効果の高かったコンストラクト A のオリゴ配列を挿入し、コンピテントセル (JM109, TAKARA) へ組み込んだ。PCR およびシーケンシングにてインサートの確認を行った。

サザンブロッティング解析

得られた Tg マウスの尾部を 5mm 程度カットし、プロテイナーゼ K を添加した Lysis Buffer 400 μ l へ浸漬し、37°C 5% CO₂ インキュベーター (HIRASAWA) で翌日まで静置した。次ぎにサンプルを定法に従い PCI 抽出を 2 回、イソプロパノール抽出を 1 回行った後に 70%EtOH で抽出されたゲノム DNA を洗浄した。洗浄後 13000 \times g で 5min の遠心分離を行い、70%EtOH を除去し、80 μ l の Tris-EDTA を加え、37°C 5% CO₂ インキュベーター (HIRASAWA) で翌日まで静置することでゲノム DNA 溶液を得た。得られたゲノム DNA 5 μ g を BamHI (TAKARA) で消化し、0.6%アガロースゲルへアプライし、10V 10W 50mA で 24 時間以上、電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルよりメンブレンへゲノム DNA

を転写し、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (TAKARA) を用いて α -dCTP(PerkinElmer)で標識したプローブ (ネオマイシン耐性遺伝子内部の 364bp) とメンブレンを 68°C 24 時間以上ハイブリダイズした。ハイブリダイズ後にメンブレンを洗浄し、BAS-2500 (FUJIFILM) システムにてバンドの検出を行い、Multi Gauge Ver3.0 (FUJIFILM) にて解析を行った。なお、プローブ配列は表 3-2 へ記した。

実験動物と組織の摘出

本研究で用いた実験動物は室温 22-25°C、湿度 40-60%、明期 12 時間-暗期 12 時間条件の SPF 施設にて、滅菌水および滅菌した実験動物用餌を自由摂取させることで飼育した。なお、飼育管理は実験動物飼育管理を主な業務とする専門家 (三共ラボサービス) により行われた。購入したマウスは、順化のために購入後 1 週間ほど飼育した。また、膣栓を確認した日の正午を妊娠 0.5 日、同様に胎仔については胎生 0.5 日あるいは 0.5 dpc とした。

5.5 dpc、7.5 dpc、10.5 dpc の胎仔を母胎より実体顕微鏡下で摘出し、必要な解析を行った。

in situ Hybridization

雄の Tg マウスと野生型の 8 週令・雌の C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) を自然交配し、翌日に雌の膣開口部に膣栓が確認された日 (正午) を妊娠 0.5 日目および胎仔を 0.5 dpc とした。妊娠 0.5 日目から妊娠 5.5 日目および妊娠 7.5 日目まで Dox {200 μ g/ml (5%スクロース溶液)} を自由摂水した。Dox を摂水した妊娠 5.5 日目および 7.5 日目の母親を灌流固定し、5.5 dpc および 7.5 dpc を摘出した。摘出した組織は常法に従ってパラフィン固定を行い、厚さ 6 μ m の組織切片の作製を行った。脱パラフィン後、作製した組織切片は 60°C で 16 時間、プローブとハイブリダイゼーションを行い、NBT-BCIP および alkaline phosphatase color substrate にてサンプルへハ

イブリダイズしたプローブの検出を行った。さらに、Keruechtrot (MUTO PURE CHEMICALS) を用いて、サンプルを染色することでシグナルの検出を行った。なお、組織の固定や摘出、切片の作成、染色の工程を株式会社ジェノスタッフ (<http://www.genostaff.com/>) に依頼した。なお、各プローブの配列情報は表 3-2 に記した。

Tg マウス由来 ES 様細胞の樹立

雄の Tg マウスと事前に過排卵処理を施した野生型マウス (C57BL/6J 雌 4 週令) を自然交配し、翌日、膈開口部に膈栓が確認された日を 0.5 日目とし、3.5 日目に交配した雌マウスの子宮角内部より M2 培地 (Sigma) で洗い流すことで胚盤胞期胚を回収した。回収した胚盤胞期胚は、事前に用意した 2.4×10^4 フィーダー細胞を敷き詰めた平底の 96 穴 plate1 穴へ胚盤胞期胚一つずつ分取し、 37°C 5% CO_2 インキュベーター (HIRASAWA) 内にて 5 日間、無血清 ES 細胞用培養液にて培養を行った。この間、培地交換は行わなかった。培養した胚盤胞期胚のハッチングにより内部細胞塊が観察されたものについて、各々の胚を PBS で洗浄し、 $50 \mu\text{l}$ の 0.05% トリプシン溶液を加えて 37°C 5% CO_2 インキュベーター (HIRASAWA) 内にて 5 分間静置した。無血清 ES 細胞用培養液 $50 \mu\text{l}$ をサンプルへ加えることで相対的に細胞に効くトリプシンの量を少なくすることによりトリプシンを失活させ、ピペッティングを行うことで単一細胞に分離した。800rpm 5min 遠心分離を行った後に上清を廃棄してトリプシンを除去し、事前に 2×10^6 フィーダー細胞を敷き詰めた 10cm ディッシュに播種し、無血清 ES 細胞用培養液にて 10 日間培養した。なお、この期間は毎日培地交換を行った。培養後 10 日目にコロニーが目視確認されたら、クリーンベンチ内に実体顕微鏡 (Leica) を設置し、クリーンベンチ内でコロニーをイエローチップで吸い取り、事前に用意した 2.4×10^4 フィーダー細胞を敷き詰めた平底の 96 穴プレート of の 1 穴でコロニーを培養した。2-3 日目に事前に用意した 2.4×10^5 フィーダー細胞を敷き詰めた 24 穴プレートの 1 穴へ細胞継代

を行った。2-3 日目に事前に用意した 6×10^5 フィーダー細胞を敷き詰めた 6 穴プレート
の 1 穴へ細胞継代を行った。2-3 日目に事前に用意した 2×10^6 フィーダー細胞を敷
き詰めた 10cm ディッシュへ細胞継代を行った。2-3 日目に一部の細胞を凍結保存し、
一部は得られた ES 様細胞が Tg マウス由来のものであることを確認するために、コン
ストラクトの一部の領域 (tTS) を検出し、ジェノタイピングを行った。なお、tTS の
プライマーや PCR の条件は表 3-1 へ記した。

蛍光免疫染色

5 日間培養した ES 細胞を PBS で 2 回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒド(Wako)で 20
分間固定した。Rinse buffer { $1 \times$ TBST ($10 \times$ Liquid, Santa Cruz Biotechnology)} で
10 分間静置しながら 2 回洗浄し、0.1% TritonX-100/PBS を加えて 10 分間静置した。
Rinse buffer で 10 分間静置しながら 2 回洗浄し、Blocking solution (4% normal goat
serum/PBS) を加えて 30 分間静置した。次に 50 倍希釈した一次抗体 {SSEA-1 (MS X
SSEA-1, IgM, clone MC-480, CHEMICON)、Oct-4 (MS X Oct-4, IgG, clone 9E3, CHEMICON)}
を加え、1 時間静置した。Rinse buffer で 10 分間静置しながら 3 回洗浄し、100 倍希
釈した二次抗体 (SSEA-1 は (AP128F, Gt X Ms IgM Fluor FITC ; CHEMICON), Oct-4 は
(AP128C Gt X Ms IgM Cy3 ; CHEMICON) を加え、1 時間静置した。Rinse buffer で 10
分間静置しながら 3 回洗浄し、PBS を加えることでサンプルの乾燥を防ぎ、蛍光顕微
鏡 (キーエンス) にて鏡検した。

アルカリフォスファターゼ染色

5 日間培養した ES 細胞を PBS で 2 回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒド(Wako)で 2
分間固定した。Rinse buffer { $1 \times$ TBST ($10 \times$ Liquid, Santa Cruz Biotechnology)} で
10 分間静置しながら 2 回洗浄し、Naphthol/Fast Red Violet Solution (CHEMICON) を
サンプルへ加えて 15 分間 5%CO₂ 37°C インキュベーター内にて静置した。Rinse buffer

で10分間静置しながら1回洗浄し、サンプルの乾燥を防ぐためにPBSを加え、倒立顕微鏡（オリンパス）にて鏡検した。

統計学的解析

統計学的解析は、2群間を比較する実験では、対応のない両側 t 検定を用いて評価し、2群以上の実験では、JMP®(SAS Institute)を用いて、one-way ANOVA/Tukey-Kramer の HSD 検定を行い評価した。統計分析の結果は、平均値と標準誤差を用いて示した。P<0.05 の場合を統計学的な有意差として取り扱った。

結果

内在性Sal14 ASncRNAによるマウス初期胚発生への影響

第二章のshRNAによる内在性Sal14 ASncRNAのノックダウン実験結果において、ノックダウン効果が最も高かったコンストラクトAをマウス胚の前核へ導入し、着床前における胚の発生への影響について検討した(p66 図2-4参照)。なお、対照群ではempty vectorを胚の前核へ導入した(表3-3)。ノックダウン群では4-8細胞期までは対照群と差がなかった。このとき、胚盤胞期胚1日目の発生率は、ノックダウン群では全ての発生が認められなかったのに対して、対照群では1回目40.2%、2回目33.7%、3回目30.6%であった。以上の結果から、内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンにより、初期胚発生過程の少なくとも胚盤胞期胚には内在性Sal14 ASncRNAの発現が重要であることが示された。

Doxによる内在性Sal14 ASncRNA誘導型ノックダウンコンストラクトの構築

マウス個体発生への内在性Sal14 ASncRNAの機能を解明するために、Doxを用いて内在性Sal14 ASncRNA発現を誘導的に低下させるshRNAを発現するコンストラクトを構築した。shRNAの転写を誘導するU6 promoterの下流に内在性Sal14 ASncRNA発現を最も効率よく低下させたコンストラクトAの配列(p66 図2-4参照)(図3-2A)を挿入してコンストラクトを作製し、Pvu Iで直線化した全長が約7.0 kbのコンストラクトをC57BL6Jマウス(日本チャールスリバー)の1細胞期胚の前核へ導入した。なお、Tgマウスのジェノタイプングにはネオマイシン耐性遺伝子(以後、Neoと称する)をゲノムPCRまたはサザンブロッティングで検出することで行った(図3-2A)。

構築したコンストラクトが正常に機能するかを検討するために、コンストラクトを内在性Sal14 ASncRNAが発現しているマウスES細胞へ一過的に導入し、Dox (10 μ g/ml)を培地へ添加することで内在性Sal14 ASncRNA量を調べた(図3-2B)。実験群のI. D. 1-3

のいずれとも内在性Sa114 ASncRNA量が有意に低いことが示された。また、Sa114 mRNAの低下も認められた(図3-2C)。さらに細胞増殖の低下も伴った(図3-2D)。対照群(Wt、I. E. 1-2)では、Doxの添加有無で内在性Sa114 ASncRNA発現に変化がなかったことが示された。次に、内在性Sa114 ASncRNA量がマスター転写因子群(Nanog、Oct4、Sox2)の発現に与える影響を検討した。Dox(10 μ g/ml)添加によりマスター転写因子群の発現が低下した(図3-3A, B, C)。一方、対照群ではマスター転写因子群の発現に変化は示されなかった。なお、実験群のI. D. 3の内在性Sa114 ASncRNAは、コントロール群(Wt)に比べて上昇傾向を示したが、Sa114 mRNAおよびマスター転写因子群の発現ではWtに比べて低い傾向を示し、また、Dox添加によりいずれも発現が低下したことから、Doxの効果があることは確認できた。

これらの結果は、第二章での内在性Sa114 ASncRNA発現を一過的にノックダウンしたES細胞の実験結果と一致した。以上のように、誘導可能な内在性Sa114 ASncRNAノックダウンコンストラクトを構築できた。

誘導型内在性 Sa114 ASncRNA ノックダウン Tg マウスの樹立

図 3-2 で確立した誘導型内在性 Sa114 ASncRNA ノックダウンコンストラクトをC57BL6J マウス(日本チャールスリバー)の受精卵へMicroinjectionし、Tg マウスの作製を試みた。

サザンブロッティングによるスクリーニングの結果、8 匹のファウンダー個体(#2, #8, #9, #11, #18, #19, #26, #29)を得ることができた(図 3-4A)。また、サザンブロッティングのバンドパターンから解析したコンストラクトのコピー数および挿入部位数の確認、また、掛け合わせ実験により生殖細胞への寄与の確認を行った。以降の実験に利用するラインは、得られたファウンダーと Wt を交配し、Wt へ Dox を飲水後、胎仔(F₁)に形態的な異常が観察されたライン (No. 19) を以降の Tg マウス解析に利用した。なお、ファウンダーNo. 19 はゲノム上複数カ所に合計 16 コピー導入され、生殖細

胞への寄与が確認された(図3-4B)。これらのことから、No. 19由来のF₁では、複数のゲノム座位にトランスジーンが挿入されているため、交配によってトランスジーンのコピー数が変わり、Doxによる内在性Sal14 ASncRNAノックダウン効果に変化する可能性が考えられたが、No. 19のF₁およびF₂においても、Doxにより異常形態を示した胎仔が確認できたことから、Doxによる内在性Sal14 ASncRNAノックダウンモデル動物として樹立することができた。

誘導型内在性Sal14 ASncRNAノックダウンTgマウスの表現型の解析

ファウンダーNo. 19の雄Tgマウスを8週令・雌の野生型(Wt) C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)と自然交配を行った。膣栓が確認された日より母体へDoxを飲水し、7.5 dpcの胎仔の内在性Sal14 ASncRNAの発現量を解析した。本実験では交配後膣栓が確認された日の胎仔を0.5 dpctとした。その結果、Tgマウスの内在性Sal14 ASncRNA発現は、Wtに比べてDoxにより有意に発現が低いことが示された。一方、Doxを飲水していないTgの内在性Sal14 ASncRNA発現は、Wtに比べて有意な差は認められなかった(図3-5A)。母体のDoxの飲水による7.5 dpcのTgマウスの形態は、Wtに比べて明らかな発生異常が観察された(図3-5B, C)。さらに発生を進めた10.5 dpcのTgマウスでもWtに比べて明らかな形態異常が観察された(図3-5D)。

以上の結果から、TgラインNo. 19は、Doxにより内在性Sal14 ASncRNAを誘導的に発現低下させることが示された。

TgにおけるSal14 mRNA発現

in situ ハイブリダイゼーションにより5.5 dpcおよび7.5 dpcのTgにおける内在性Sal14 ASncRNA発現およびSal14 mRNA発現を解析した。5.5 dpcの胎仔の内在性Sal14 ASncRNA発現の誘導的な低下に伴い、Sal14 mRNA発現はTgではWtに比べて発現が減少した(図3-6A)。7.5 dpcの胎仔の内在性Sal14 ASncRNA発現の誘導的な低下に伴い、中胚

葉のSa114 mRNA発現はTgではWtに比べて減少した(図3-6B)。

以上の結果から、本Tgマウスでは内在性Sa114 ASncRNA発現が低下し、Sa114 mRNA発現も減少することが示された。

Tgマウス由来ES細胞の形態および未分化マーカー遺伝子発現

TgマウスのSa114のT-DMRのメチル化パターンを検討するために、Tgマウス由来のES細胞の樹立を行った。まず、雄のTgマウスと事前に過排卵処理した雌のWtマウス(C57BL/6J)を自然交配させ、翌日雌の膈開口部に膈栓が確認された日を0.5日目とし、3.5日目に胚盤胞を採取した。採取した胚盤胞は、フィーダー細胞上で培養をした(図3-7A)。胚盤胞の培養5日目に透明体から抜け出した内部細胞塊が観察された(図3-7B)。内部細胞塊を0.05%トリプシン溶液で単一細胞にした後に継代し、ES細胞様コロニーが観察された(図3-7C-E)。樹立したES様細胞をアルカリフォスファターゼ染色(図3-7F, G)およびES様細胞を未分化マーカー遺伝子抗体による免疫染色を行ったところ、ES様細胞はSSEA-1およびOct-4陽性であることも確認された(図3-7H, I)。

以上の結果から、内在性Sa114 ASncRNA発現を誘導的に低下させるTgマウスよりES様細胞を4株樹立することができた。

Tgマウス由来ES細胞の内在性Sa114 ASncRNA発現を誘導的に低下させたSa114転写調節領域T-DMRのDNAメチル化パターンへの影響

Dox (10 μ g/ml) を培地へ添加してTgマウス由来ES細胞でT-DMR(-1507bp~-1000bp)のDNAメチル化解析を行った(図3-8)。対照群のES細胞では、Dox添加に関わりなく10.0%、11.1%のメチル化率を示した。一方、Tg由来ES細胞ではDox無添加は、8.9%のメチル化率を示したが、Dox添加により18.9%となった(Tg由来ES細胞No. 5)。他のTg由来ES細胞(No. 6)は、Dox無添加では11.1%、Dox添加により16.7%となった。以上、Tg胎仔由来のES細胞において、内在性Sa114 ASncRNAのノックダウンによりSa114 T-DMRのメチル化

亢進を誘導できたことから、樹立したTgマウスにおいてもSal14 T-DMRのDNAメチル化パターンを制御していることが示唆された。なお、Doxにより内在性Sal14 ASncRNAをノックダウンしたTg由来ES細胞では、promoter T-DMRのDNAメチル化に変化がみられず、intronic T-DMRのDNAメチル化が亢進した。これは、第二章の内在性Sal14 ASncRNA発現を一過的に低下させたES細胞の実験結果(図2-6A)でも示したように、内在性ASncRNAのノックダウン効果が低いときに、promoter T-DMRのDNAメチル化に変化がみられなかった結果とも一致していた。つまり、内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンによるDNAメチル化への影響は、promoter T-DMRよりもintronic T-DMRの方が検出されやすいことがこの結果からも示唆された。

Tgマウス由来ES細胞での内在性Sal14 ASncRNA発現低下によるSal14 mRNA発現、ES細胞の増殖率およびES細胞マーカー遺伝子の発現への影響

内在性Sal14 ASncRNA発現を誘導的に低下させたTgマウスのSal14 mRNAの発現およびES細胞の増殖能、マスター転写因子の発現への影響について検討を行った(図3-9)。対照群(ES、No. 1)では、Doxの有無で内在性Sal14 ASncRNAの発現に影響がないことが示された。一方、Tg由来ES細胞(No. 5、No. 6)では、Dox添加により内在性Sal14 ASncRNAの発現が低下した(図3-9A)。Dox添加によるSal14 mRNA発現への影響を検討した。このときTg由来ES細胞では、Dox添加によりSal14 mRNA発現が低下する傾向がみられた(図3-9B)。また、Tg由来ES細胞では、Dox添加により細胞の増殖率が有意に低下した(図3-9C)。マスター転写因子(Nanog, Oct4, Sox2)の発現も低下した(図3-9D-F)。なお、実験群のNo. 5の内在性Sal14 ASncRNAは、Wtに比べて上昇傾向を示したが、DoxによりSal14 ASncRNA量は低下傾向を示し、Sal14 mRNAとマスター転写因子群の発現低下やES細胞の増殖能低下が示されたことから、Doxにより内在性Sal14 ASncRNAがノックダウンされたことが考えられる。以上の結果から、Tgマウス由来ES細胞は、Dox添加によりSal14 mRNA発現およびES細胞の増殖能、ES細胞マーカー遺伝子の発現が低下すること

が示された。

考察

本研究の第二章では、内在性Sal14 ASncRNAはSal14遺伝子のDNAメチル化制御を介してOct4などのマスター転写因子群と相互作用し、ES細胞の多分化能維持と細胞増殖に重要な役割を果たすことを初めて明らかにした。これを受けて本章では生体での内在性Sal14 ASncRNAの機能を解析するために、マウス初期胚において内在性Sal14 ASncRNAをshRNA導入によりノックダウンを試みたところ、胚盤胞期胚への発生遅延が観察された。この表現型は、Sal14 Null型欠損胚に類似した胚の発生異常 (Tsubooka N *et al.* 2009) とほぼ同じであることから、内在性Sal14 ASncRNAは培養下ではあるものの発生中の初期胚でSal14遺伝子の発現を制御していることが強く示唆され、内在性Sal14 ASncRNAは初期胚の発生に関与することを初めて明らかにした。なお、1-8細胞期胚の内在性Sal14 ASncRNAをノックダウンした胚の発生は正常であった。Sal14は受精後8細胞期胚より発現する (Elling U *et al.* 2006)。従って、8細胞期以降に発現する内在性Sal14 ASncRNAによるSal14遺伝子のエピジェネティック制御が初期胚の発生に必須であると考えられる。また、本章で作製したTgマウスの内在性ASncRNAをDoxによりノックダウンしたところ、胎仔のSal14 mRNAの発現低下に伴い、顕著な形態異常が観察された。さらに、Tgマウス由来ES細胞の内在性Sal14 ASncRNAをDoxによりノックダウンすると、Sal14 T-DMRのメチル化が亢進する傾向を示した。これらの結果をあわせて考えると、内在性Sal14 ASncRNAは生体である初期胚および胎仔の発生において、8細胞期以降のゲノムでSal14 T-DMRの低メチル化を維持し、Sal14遺伝子の発現に必須であることが強く示唆された。

これまでに報告されているncRNAのエピジェネティック制御として、ポリコーム複合体 (PRC2) と会合し、がん転移に関係するHoxDクラスターのH3K27me3の維持に重要なHOTIARが知られる (Gupta RA *et al.* 2010)。また、ANRILやLIT1、p15ASなど、他のncRNAもPRC2と会合し、がん化やインプリンティング、白血病に関係することが培養細胞を

用いた実験で明らかとなっている (Yap KL *et al.* 2010; Arima T *et al.* 2005; Yu W *et al.* 2008)。これらはヒストンメチル化修飾を介したクロマチン形成に関わるため、複数の遺伝子発現が同時に制御されていると考えられている。これらの知見はいずれも培養細胞を用いて明らかにされたことであった。これに対して本章では、初期胚および胎仔の解析から、内在性Sal14 ASncRNAは生体内において、初期胚の発生および胎仔形成に重要であることを明らかにした。また、Tg由来ES細胞の解析から、Sal14 T-DMRの低メチル化を維持することが示唆された。すなわち、内在性ASncRNAが生体内において、エピジェネティック制御を通して遺伝子の発現に必須であることを明らかにした。また、上記の遺伝子間ncRNAとは異なり、内在性Sal14 ASncRNAのような転写調節領域のASncRNAはこれまで未同定なものが多かったと考えられるが、第一章で転写物として登録されていないASncRNAを持ち、ES細胞の多分化能維持に必要な遺伝子を同定できた。したがって、これまでによく研究されている遺伝子間ncRNAが遺伝子の発現抑制に重要であるのに対して、内在性Sal14 ASncRNAを始めとした転写調節領域のASncRNAは特定遺伝子の活性化に作用することからも別の機能を持つncRNAであると考えられる。以上より、内在性Sal14 ASncRNAは生体内においても、T-DMRの低メチル化を維持することでSal14の遺伝子発現を制御していると考えられる。

大部分の遺伝子にはT-DMRが存在し、そのDNAメチル化状態と遺伝子発現との関連性について報告がある (Imamura T *et al.* 2001; Cho JH *et al.* 2001; Hattori N *et al.* 2004; Yagi S *et al.* 2008; Nishino K *et al.* 2011)。転写調節領域にT-DMRを持つSphk1やNefl、Vimの内在性ASncRNAの機能については、いずれも培養細胞でのASncRNA強制発現によるT-DMRの脱メチル化誘導 (Imamura T *et al.* 2004; Tomikawa J *et al.* 2011) と、内在性ASncRNAのノックダウンによるT-DMRのメチル化亢進であった (Tomikawa J *et al.* 2011)。これに対して本章では、作製したTgマウスの解析から、胎仔の内在性Sal14 ASncRNAをDoxによりノックダウンすることで、内在性Sal14 ASncRNAが生体で機能していることを初めて示すことができた。また、本章で樹立したTgマウス由来ES細胞では、

DoxによりSal14 T-DMRのメチル化が亢進する傾向を示した。ヒトでは、アルツハイマー患者より発見された内在性ASncRNA (BASE-1AS) が主要な組織でmRNAと一致した発現を示すことが報告されている (Faghihi MA *et al.* 2008)。これらのことから、内在性ASncRNAはマウスのみでなくヒトでも器官形成や病態発症に関与している可能性が考えられる。また第一章でT-DMRのDNAメチル化制御に関係する可能性のある転写調節領域のASncRNAを同定できたこととあわせて考えると、生体でのASncRNAによるDNAメチル化制御は、細胞の生死や運命決定に重要なSal14以外の遺伝子において、転写調節領域の内在性ASncRNAでも起こりうることが示唆される。

本章では、まず実際にSal14 ASncRNAが生体で機能するかどうかを検討するために、1細胞期からshRNAを発現させることで内在性Sal14 ASncRNAをノックダウンし、初期胚でSal14の完全欠損胚と類似した表現型 (Tsubooka N *et al.* 2009) を検出することが出来た。よって、内在性Sal14 ASncRNAは培養下の初期発生胚でも機能していることが確認できた。Sal14は生体内において初期胚から成体にかけて発現し、初期胚のみならず特定組織の形成にも重要であり、特定疾患との関連性についても報告されてきた。(Kohlhase J *et al.* 2002; Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006; Tsubooka N *et al.* 2009; Koshiha-Takeuchi K *et al.* 2006)。そこで次に、実際に母体で発生中の胎仔において内在性Sal14 ASncRNAの機能を解析するために、樹立したTgマウスの発生初期から内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンを試みたところ、5.5 dpcおよび7.5 dpcの胎仔ではSal14 mRNAの発現低下に伴い、形態的にSal14変異胎仔の表現型に類似した形態異常 (Sakaki-Yumoto M *et al.* 2006) が観察された。また、10.5 dpcにおいても形態異常が観察された。さらに、Tg由来ES細胞では、Doxによる内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンにより、Sal14 T-DMRのメチル化が亢進する傾向を示すことから、胎仔の内在性Sal14 ASncRNAは、メチル化制御を介して器官形成に重要な役割を担うことが明らかとなった。すなわち、内在性ASncRNAを利用することで、エピジェネティック異常の積極

的な誘導による新たな病態モデル動物の作製につながる可能性が考えられる。

Sal14の発現パターンやSal14ヘテロ欠損マウスの表現型から類推すると、ヒト遺伝病や組織機能不全で問題になるSal14遺伝子の異常は、遺伝子自体の完全な破壊ではなく、器官形成期以降での発現低下にあると考えられる。本研究で樹立に成功したTgマウスでは、器官形成期以降または出生後に低濃度のDoxによりSal14遺伝子の軽度なDNAメチル化異常を誘発することで起きる可能性が考えられる。実際に本章でのTg胎仔の解析から、器官形成期中胚葉でも内在性Sal14 ASncRNAのノックダウンにより、Sal14遺伝子の発現低下および形態異常が観察されたことから、ノックダウンの時期や程度を加減することで、その後の心臓形成に関与する内在性Sal14 ASncRNAの機能を解析できると考えられる。Sal14は、心臓の形成のみならず、mRNAの発現パターンからは生殖器官の機能にも重要であることから、内在性ASncRNAノックダウンによる部分的なDNAメチル化異常の誘導により、慢性心不全や不妊治療のためのモデル動物の作製につながる可能性も考えられる。今後は、内在性ASncRNAをノックダウンする時期を調節することで、ヒトSALL4遺伝子異常に由来するOkihiro症候群につながる病態モデル動物が作製できると考えられる。

ここで確立した病態モデル作成法は、アルツハイマーなど、様々な疾患に応用できる。アルツハイマーを引き起こす原因としては、脳内で γ セクレターゼおよび β セクレターゼ1 (BASE-1)がアミロイド前駆体タンパク質 (APP)を切断することにより、脳内でA β が蓄積して細胞死による脳萎縮が引き起こされる (Zhu D *et al.* 2006; Lacor PN *et al.* 2007; Matsuyama S *et al.* 2007)。脳内でAPPを切断するBASE-1には、アンチセンス方向に転写される内在性ASncRNAであるBASE-1 ASが同定されている (Faghihi MA *et al.* 2008)。BASE-1 ASは、脳や心臓、腎臓、脾臓、肝臓、肺などの組織でmRNAと一致した発現パターンを示す (Faghihi MA *et al.* 2008)。本章でのSal14の結果を応用することで、アルツハイマー病のモデルとなり得るエピゲノム疾患モデル動物の新たな

作出法の基盤になることも考えられる。

本章ではSal14内在性ASncRNAが発生中の胎仔でも機能することを初めて明らかにし、今後発生や組織形成に重要な転写調節領域にASncRNAを持つ遺伝子で内在性ASncRNA量の人為的な操作によって、これまでとは異なる病態モデル動物の作製につながる技術の原理証明ができたと考えられる。

表 3-1. 内在性 ASncRNA および mRNA 検出用 TaqMAN Gene Expression Assay 用
プローブ ID、Tg マウスの PCR スクリーニング用プライマー

RT-PCRで利用したプライマー			
標的分子	Forward配列	Reverse配列	PCR cycles
および領域			
Sall4内在性 ASncRNA	5'-CCGATTCAGAAATCGGCTCCGGGAA-3'	5'-CACATGTAGGGGGGACTACAGAAGG-3'	95°C 5min;95°C 30sec;62°C 1min)×35cycles;72°C 5min
β-actin	5'-TTCTACAATGAGCTGGTGTGG-3'	5'-ATGGCTGGGGTGTGAAGGT-3'	95°C 5min;95°C 30sec;63°C 30sec;72°C 1min)×25cycles;72°C 5min
qPCR (TaqMAN Gene Expression Assay)で利用したプローブの Assay ID			
標的分子	Assay ID	PCR cycles	
Nanog mRNA	Mm02384862_gH	50°C 2min;95°C 10min;95°C 15sec;60°C 1min)×40cycle	
Oet4 mRNA	Mm00658129_gH	50°C 2min;95°C 10min;95°C 15sec;60°C 1min)×40cycle	
Sox mRNA	Mm009488369_s1	50°C 2min;95°C 10min;95°C 15sec;60°C 1min)×40cycle	
Sall4 mRNA	Mm01309627_gI	50°C 2min;95°C 10min;95°C 15sec;60°C 1min)×40cycle	
β-actin mRNA	Mm01205647_gI	50°C 2min;95°C 10min;95°C 15sec;60°C 1min)×40cycle	
Bisulfite PCRで利用したプライマー			
標的分子	Forward配列	Reverse配列	PCR cycles
Sall4 (-376bp~-1000bp)	5'-AAGCTTATAGAGGGGTTGGTT-3'	5'-CAACTTTTCGCTGTAATAATCAAAAGCTA-3'	95°C 10min;95°C 30sec;52°C 30sec;72°C 1min)×43cycles;72°C 10min
Sall4 (-1068bp~-1507bp)	5'-GTGGAGAATATGGTAGATTAGTT-3'	5'-CAACCTGCTGCTCGATCTTTCTA-3'	95°C 10min;95°C 30sec;52°C 30sec;72°C 1min)×43cycles;72°C 10min
Sall4 (+2276bp~-42857bp)	5'-TTTTGGAAAGTTTTGGATTTTT-3'	5'-CCTTAATCCGCATCACCAGATA-3'	95°C 10min;95°C 30sec;55°C 30sec;72°C 1min)×43cycles;72°C 10min
founderマウススクリーニングで利用したプライマー			
標的分子	Forward配列	Reverse配列	PCR cycles
Neo	5'-TGCTCTGCGGAGAAAGTAT-3'	5'-AATATCAGCGGTAGCCAACG-3'	95°C 5min;95°C 30sec;60°C 30sec;72°C 1min)×30cycles;72°C 5min
tTs	5'-GAGTTGGCAGGAGTTTCTCC-3'	5'-AAAGCCGTGCATGGCAGATAGAG-3'	95°C 5min;95°C 30sec;60°C 30sec;72°C 1min)×35cycles;72°C 5min

表 3-2. ネオマイシン耐性遺伝子および Sa114 mRNA、
内 在 性 Sa114 ASncRNA 検 出 用 プ ロ ー プ

サザンブロッティングおよび <i>in situ</i> hybridization で使用したプローブ配列	
標的分子	塩基配列
	size
Neo	5'- TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGGGTGCATACGC TTGATCCGGCTACCTGCCCC ATTGCACCACCAAGCGAACA TCGCATCGAGGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGA TCTGGACGAGAGGATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGGCAGCATGCCCGACGGCG AGGATCTCG TCGTGACCCATGGGATGCCCTGCTGCCGAATATCATGG TGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA TCGACTGTGCCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTTGATATT-3' 364bp
Sa114	5'- ACGACGCAGCAGAAAGGATGGAAGCCGAGGAGG TCTGTTCTCAGGATGTTCCAGTGGCCCCCTCAACTGCTCTC TGCCGGTCCCAGTGCCACCTGGCATCGCCCTCTCTGGGCTTCTCTG TG TTGGCCCTCC TGGATACCGCAGGGGA AAGGGCTCTTCCGGGCTGGCCCTGCAGAGGCAGAGCAGTCGAGAAAACAGCTCCCTGGAGGGCGGTGACACT GGTCCAGCCAATGACTCTTCC TTGCTCGTGGGTG ACCAGGAGTGT CAGAGCCGAAGCCAGATGCCACGGAGAC CATGTGCTACCAGGCAGTGTCACTGCCAATAGCCAAGCCGGAAGTGTCAAGTCCCGGCTC CCGAGGGTCACAA GGCCGAGGGCGTGGAGAGCTGCCGGGTTGACACCGAAGTGTG TACCAGCCCTCC TCCAACATTTATCCGAGCAC AGCCACCTTTGTCAAAGTTGAAGTGCTGGCACCTTTGTGGGACCCCCAGCATGCCCTCGGGTATGCCGGCTT TGC TAG-3' 528bp
Sa114 内在性 ASncRNA	5'- CATGCTGGGCTTGTAGTCCGGCCCTACATGTGACAAAGCGGTGTTTCATCTAGGAAGCATAGCTAAATTAGCATCC GGGCTCAGATTGGCCGAGGGGTGGATCGACTTGGAGGTGGGGGAATCATCTTGGGGCCACTATCCGAATTCGTG AGACGGAAAAGGAAAATTGGTTTATTGAAAA TCAGGGCTGGACATGAAAGTCTTAGAACCGATGATCTCGGTTA CGCGCTCCACAAAATTATTGTAATAATTGGGTAGTTGATAACTAGCAGCTGAGAAAAGGTC TTTCCGCTCACAGAA AAATAAGTCGGTTC AAC TTTCCCTCTAAAATCAAACCTGAACAAGAGACTCGAGTCCCTTTTCAATTTTCTTTT CGGAAATGTTAAAAC TGCGTTTTTGAAGTGCCCGG TGGTAGC TTCTGTCCA TCCCACCTC-3' 438bp

表 3-3. 内在性 ASncRNA におけるマウス初期発生胚への影響

Exp.	Injection 後生存胚数 (1細胞期胚数)	2細胞期胚 (%)	4-8細胞期 胚(%)	胚盤胞期胚 1日目(%)	胚盤胞期胚 2日目(%)	
Cont	1	82	79(96.3)	77(93.9)	33(40.2)	42(51.2)
	2	83	79(95.2)	73(88.0)	28(33.7)	39(47.0)
	3	72	66(91.7)	54(75.0)	22(30.6)	24(33.3)
A	1	59	55(93.2)	49(83.1)	2(3.4)	8(13.6)
	2	61	50(82.0)	44(72.1)	0(0.0)	13(21.3)
	3	57	51(89.5)	39(68.4)	0(0.0)	9(15.8)

Injection 後生存胚数を100%とした

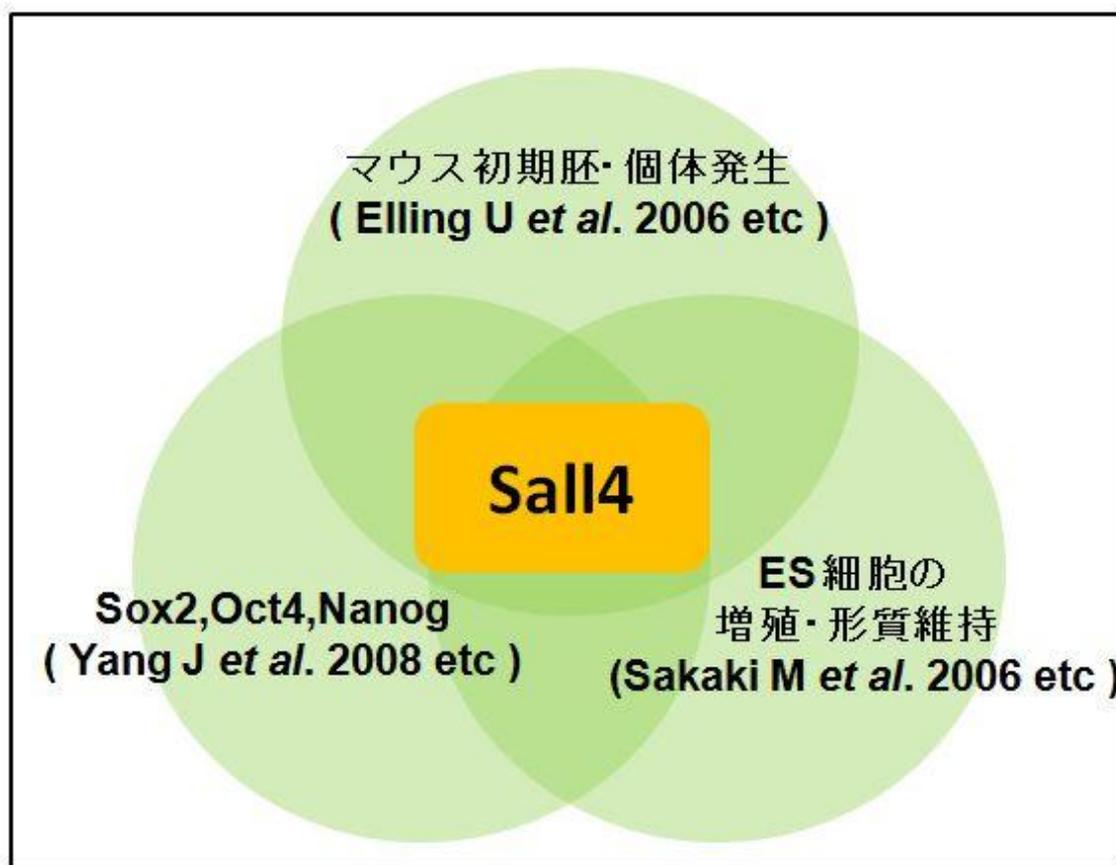


図3-1. Sall4におけるマスター転写因子群やES細胞維持およびマウス個体発生との関わり

Sall4はマスター転写因子であるSox2、Oct4、Nanogと相互作用することでES細胞の多能性を維持している。また、Sall4はマウス初期胚においても、8細胞期胚より発現することで細胞系譜への分化に関与している。さらに、Sall4は他の転写因子と協調することで胎仔の器官や組織の形成に関わる重要な遺伝子である。

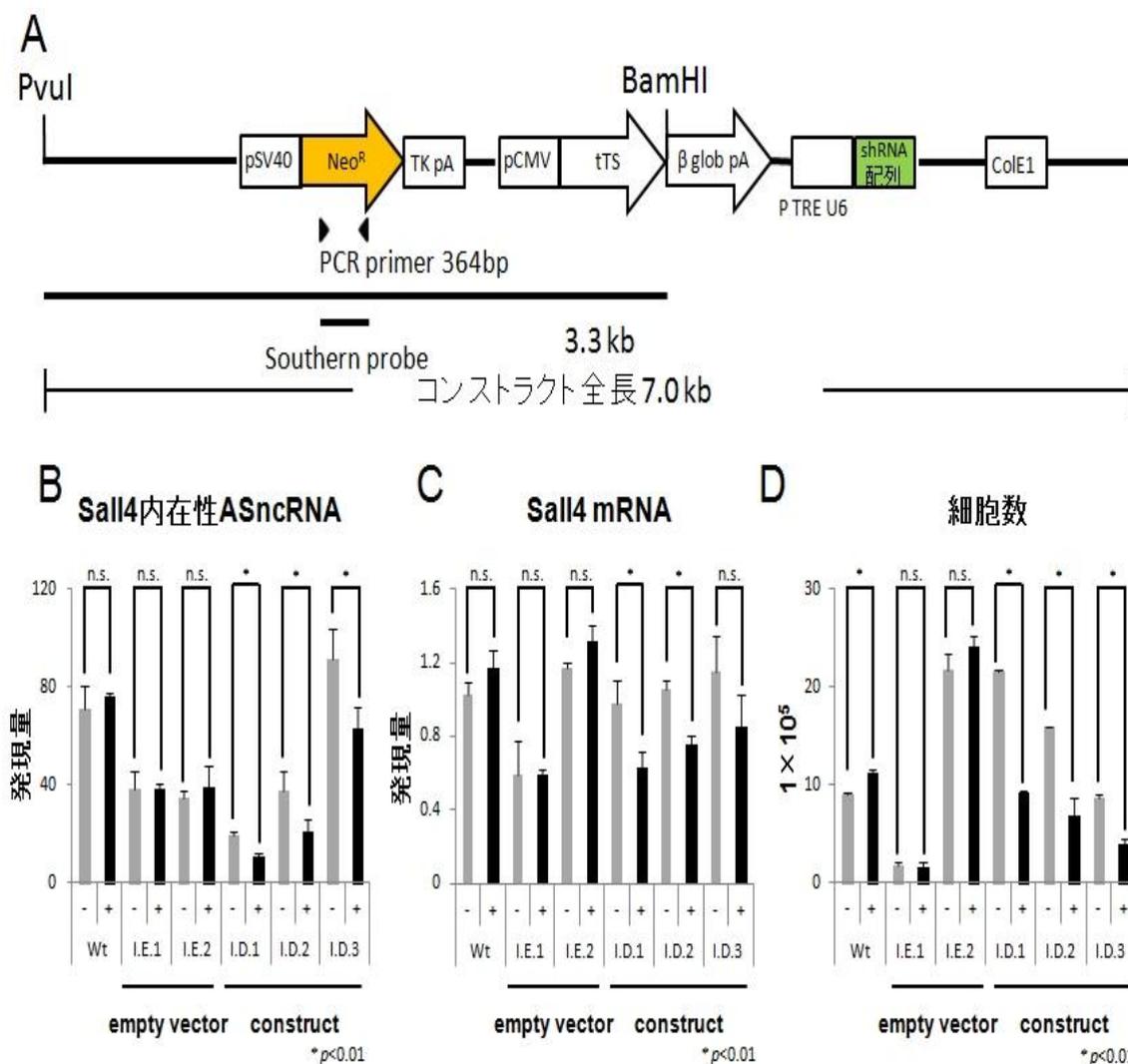


図3-2. ドキシサイクリンによる内在性Sall4 ASncRNA誘導型ノックダウンコンストラクトの構築

(A) 誘導型内在性Sall4 ASncRNAノックダウンコンストラクトの構築を示す。コンストラクトは、第二章で最もノックダウン効果が高かったコンストラクトAの配列を Knockout Single Vector Inducible RNAi System(Clontech)のベクター領域内の緑色のボックスへ挿入し、構築した。pSV40;SV40ウイルス由来プロモーター、Neo^R;ネオマイシン耐性遺伝子、TK pA;poly (A)を付加したチミンキナーゼ遺伝子、pCMV;サイトメガロウイルス由来プロモーター、tTS;テトラサイクリン調節性の転写サイレンサー、β glob pA;β-グロビン遺伝子のpoly (A)、P TRE U6;テトラサイクリン応答因子と結合したU6プロモーター、ColE1;複製起点。PCR primer;ネオマイシン耐性遺伝子の内部

で設定したプライマーを示し、PCR法により364 bpが検出される。Southern probe;ネオマイシン耐性遺伝子の検出に設定したサザンブロッティング解析のためのプローブを示す。Pvu I はコンストラクトの直線化に利用した制限酵素を示し、BamH I はサザンブロッティング法によるファウンダーのスクリーニングに利用した制限酵素を示す。コンストラクトの導入後のサザンブロッティング法によるスクリーニングでは、コンストラクトのBamH I サイトからゲノム領域に挿入した領域付近の内在性BamH I サイトまでの距離およびコンストラクトの全長7.0 kbが検出される。

(B), (C) 内在性Sal14 ASncRNAおよびSal14 mRNAの発現解析を行った。Wtは野生型ES細胞を示し、I. E. 1-2はempty vectorを導入したES細胞を示す。I. D. 1-3は誘導型内在性Sal14 ASncRNAノックダウンコンストラクトを導入したES細胞を示す。-;Dox無添加、+;Dox添加を示す。縦軸は β -actinに対する相対的なSal14 mRNAまたは内在性Sal14 ASncRNAの発現量を示す。解析結果はMeans \pm SEで示し、Dox-の発現量に対する割合を示した。各群n=3で行った。*:p<0.01、n. s. ; not significant

(D) ES細胞の増殖能解析を行った。Wtは野生型ES細胞を示し、I. E. 1-2はempty vectorを導入したES細胞を示す。I. D. 1-3は誘導型内在性Sal14 ASncRNAノックダウンコンストラクトを導入したES細胞を示す。-;Dox無添加、+;Dox添加を示す。縦軸は細胞数を示す。解析結果は培養終了時の細胞数をMeans \pm SEで示した。各群n=3で行った。

*:p<0.01、n. s. ; not significant

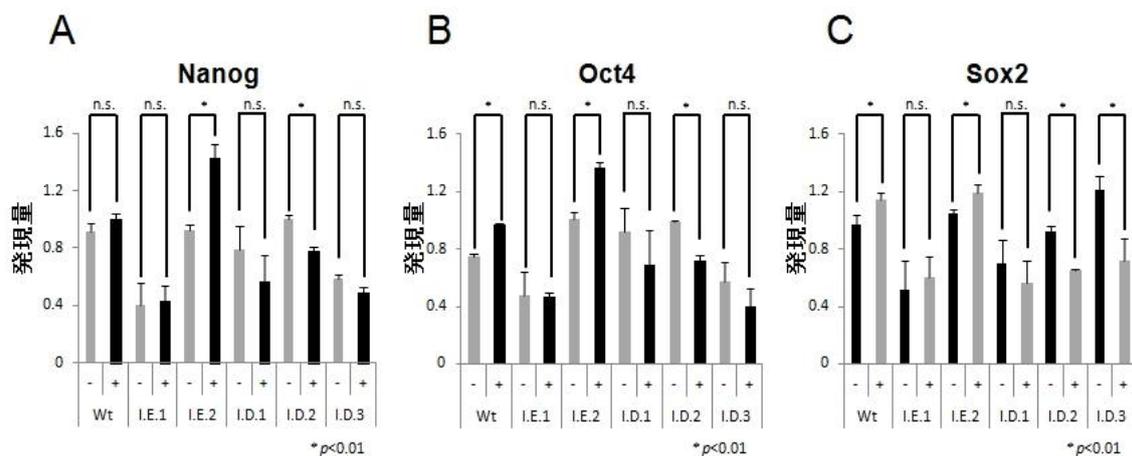


図 3-3. 内在性 Sa114 ASncRNA 発現の誘導的な低下による Nanog, Oct4, Sox2 の遺伝子発現への影響

(A), (B), (C) マスター転写因子 (Nanog, Oct4, Sox2) の発現解析を行った。Wt は野生型 ES 細胞を示し、I. E. 1-2 は empty vector を導入した ES 細胞を示す。I. D. 1-3 は誘導型内在性 Sa114 ASncRNA ノックダウンコンストラクトを導入した ES 細胞を示す。-;Dox 無添加、+;Dox 添加を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な各遺伝子の mRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*:p<0.01、n. s. ; not significant

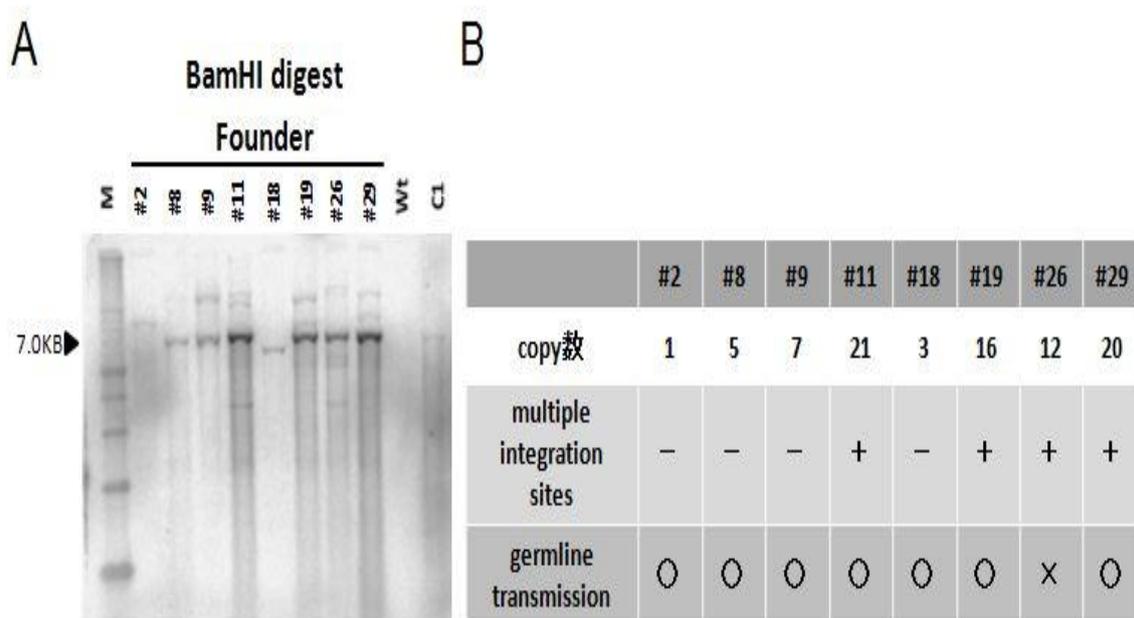


図 3-4. 内在性 *Sal14 ASncRNA* 発現ノックダウン Tg マウスの樹立

(A) サザンブロッティング法によるファウンダーのスクリーニングを行った。誘導型内在性 *Sal14 ASncRNA* ノックダウンコンストラクトを導入したファウンダーは 8 匹 (#2, #8, #9, #11, #18, #19, #26, #29) 得ることができた。M; 1 kb ladder、Wt; 野生型マウス、C1; ポジティブコントロール (トランスジーン 1 コピーの量に調整) を示す。

(B) ファウンダーのトランスジーンのコピー数および multiple intergration sites の確認、germline transmission の確認を行った。ファウンダーのトランスジーンのコピー数は、C1 のポジティブコントロールのバンドの濃さから算出した数値を示した。サザンブロッティング法で検出されたバンドの位置から、multiple integration sites の有無を示した(-; 無、+; 有)。germline transmission は、次世代を作出後、ジェノタイプングによりファウンダーの生殖系列への移行を確認した(○; 生殖系列への移行が確認されたライン、×; 生殖系列への移行が確認できなかったライン)。

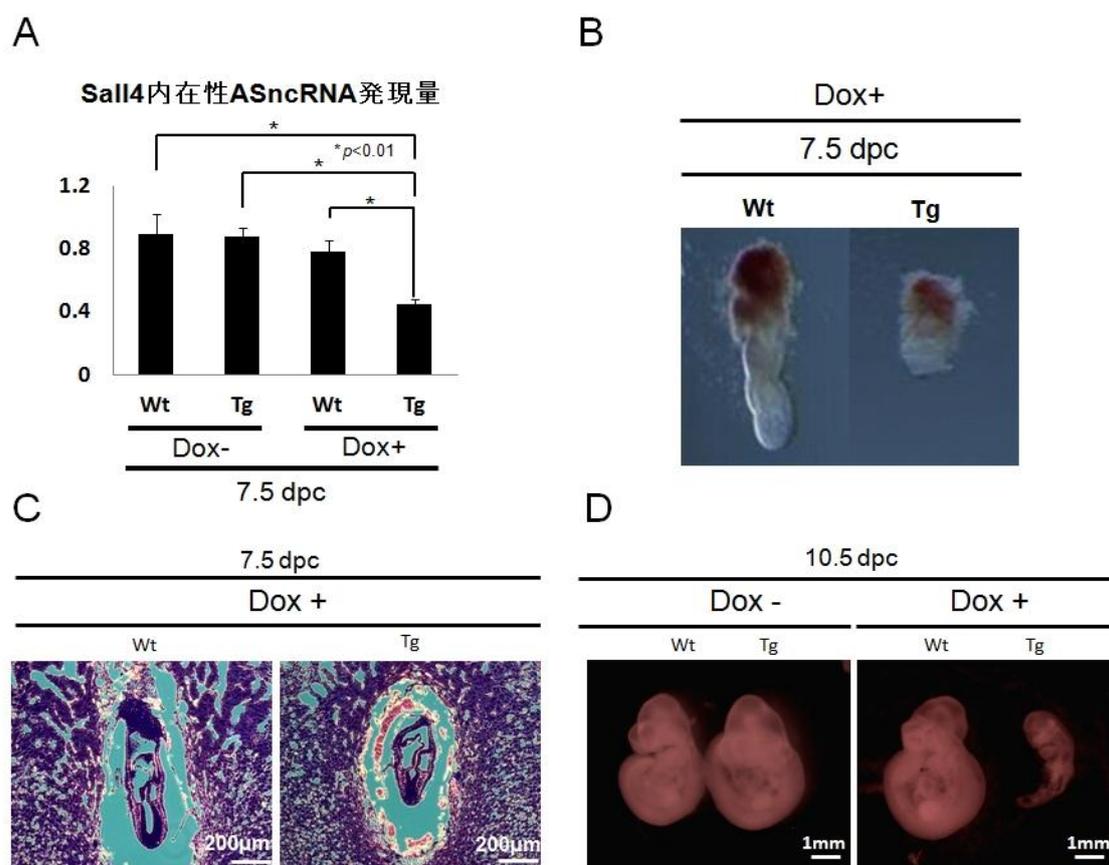


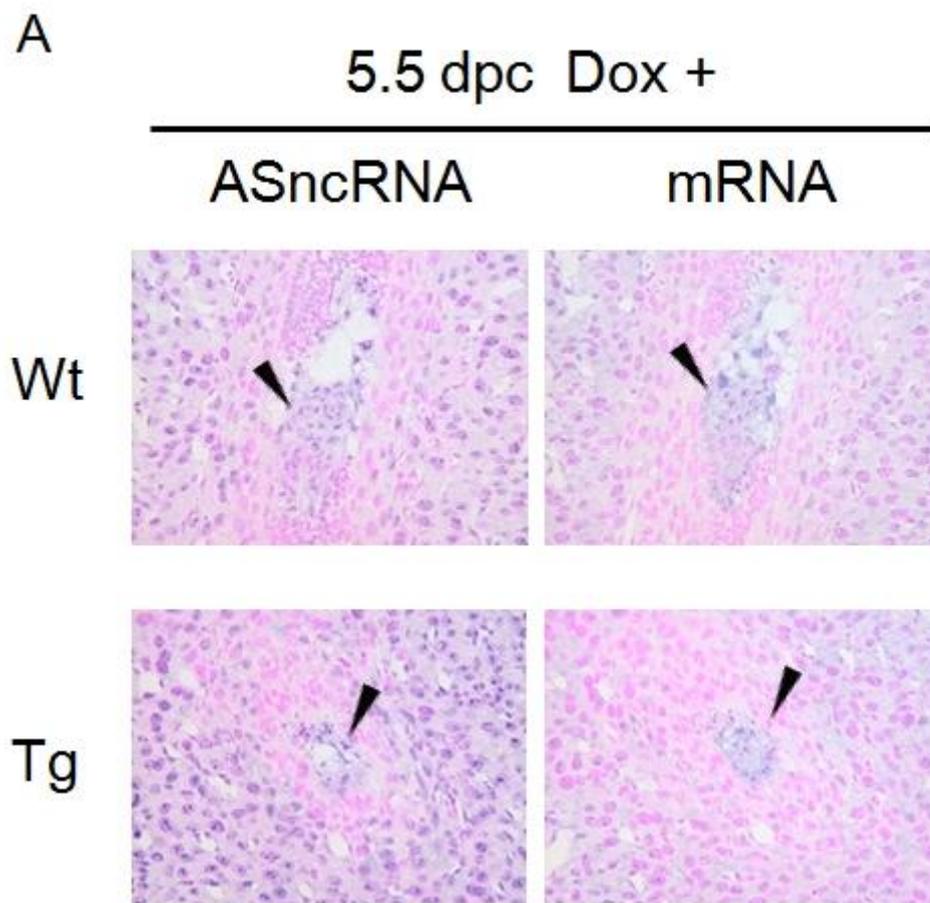
図 3-5. 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン Tg マウスの表現型

(A) 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン 7.5 dpc の胎仔の内在性 Sal14 ASncRNA 発現解析を行った。Wt は野生型マウスを示し、Tg はファウンダーNo. 19 の F₁ を示す。Dox-; Dox 無添加、Dox+; Dox 添加を示す。縦軸は β-actin に対する相対的な内在性 Sal14 ASncRNA の発現量を示す。解析結果は Means ± SE で示した。各群 n=3 で行った。*: p<0.01

(B) 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン 7.5 dpc の胎仔の形態観察を行った。Wt は野生型マウスを示し、Tg はファウンダーNo. 19 の F₁ を示す。Dox+; Dox 添加を示す。

(C) 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン 7.5 dpc の胎仔を HE 染色し、形態観察を行った。Wt は 7.5 dpc の野生型マウスを示し、Tg はファウンダーNo. 19 の 7.5 dpc の F₁ を示す。Dox+; Dox 添加を示す。Bar; 200 μm。

(D) 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン 10.5 dpc の胎仔の形態観察を行った。Wt は野生型マウスを示し、Tg はファウンダーNo. 19 の F₁ を示す。Dox-; Dox 無添加、Dox+; Dox 添加を示す。Bar; 1 mm。



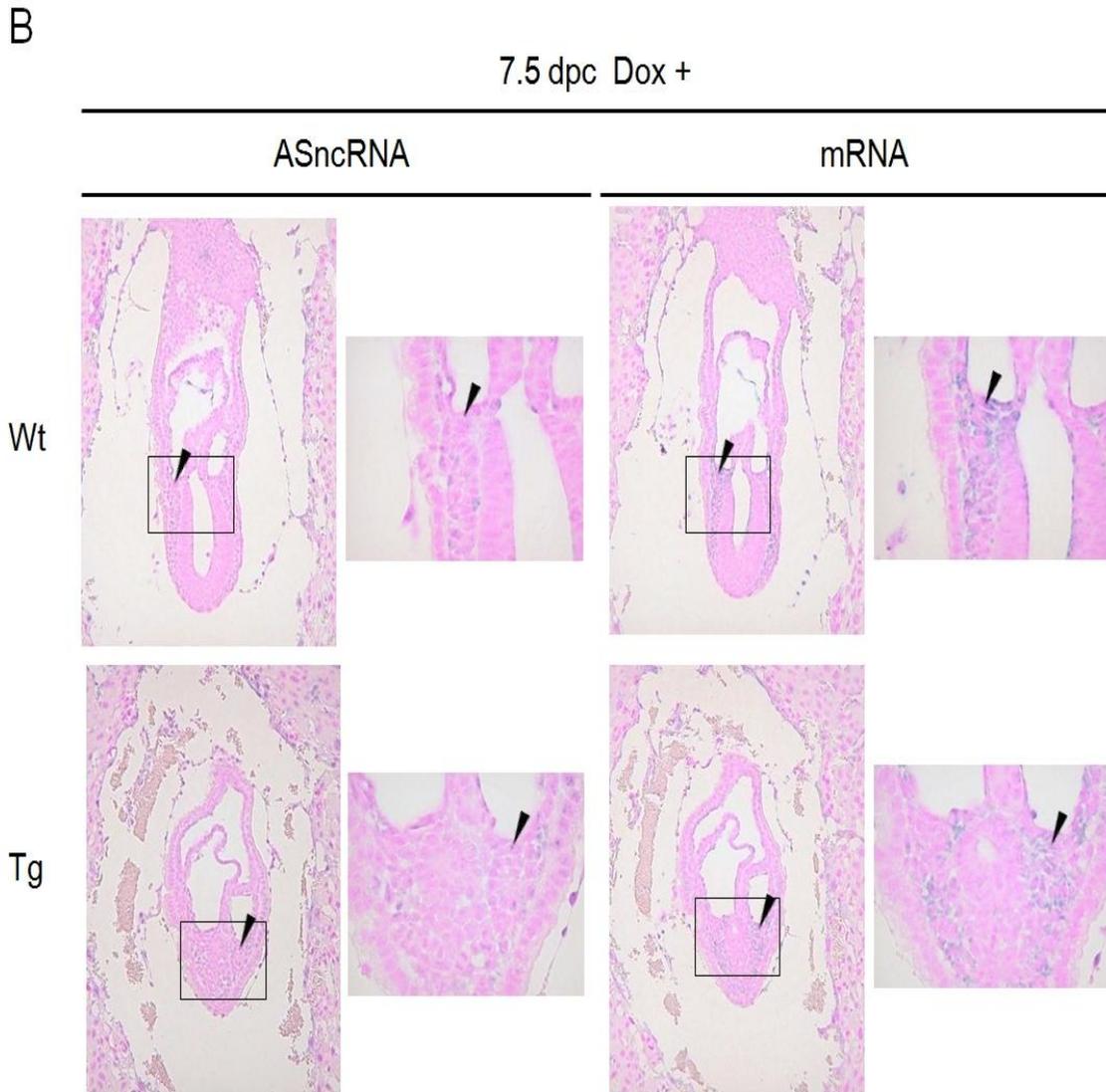


図3-6. Tg マウスの 5.5 dpc および 7.5dpc 胎仔の中胚葉における Sal14 mRNA 発現

(A) 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン 5.5 dpc の胎仔における、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。Wt は野生型マウスを示し、Tg はファウンダー No. 19 の F₁ を示す。Dox⁺; Dox 添加、ASncRNA; 内在性 Sal14 ASncRNA、mRNA; Sal14 mRNA を示す。青く染色された部位 (黒い矢頭) が発現していることを示す。

(B) 内在性 Sal14 ASncRNA ノックダウン 7.5 dpc の胎仔における、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。Wt は野生型マウスを示し、Tg はファウンダー No. 19 の F₁ を示す。Dox⁺; Dox 添加、ASncRNA; 内在性 Sal14 ASncRNA、mRNA; Sal14 mRNA を示す。黒い矢頭で示した部位は中胚葉を示し、青く染色された部位が発現していることを示す。

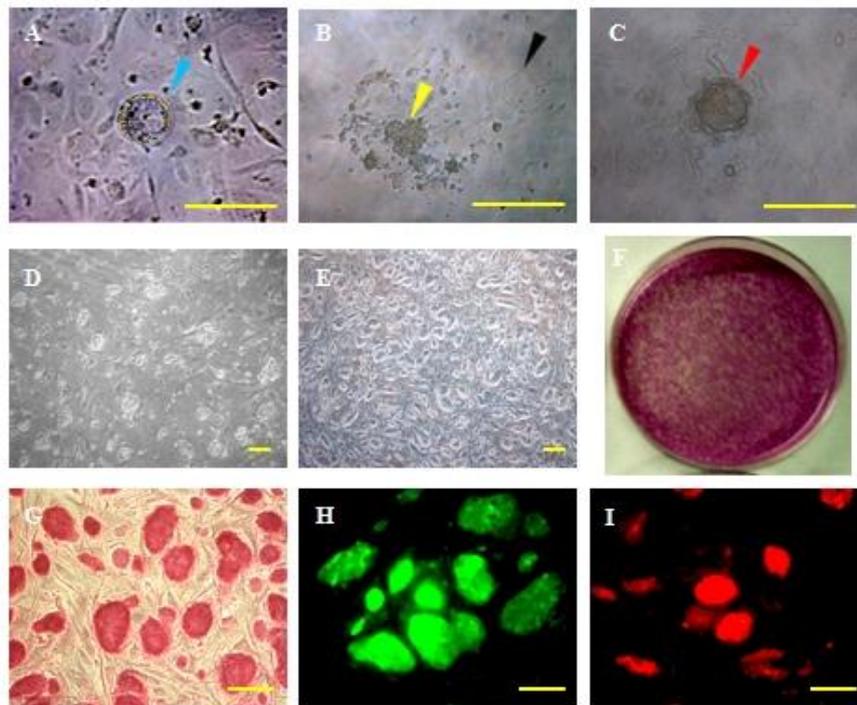


図 3-7. Tg マウス由来 ES 細胞の形態および未分化マーカー遺伝子の発現

Tg マウス由来の ES 細胞の樹立を行った。(A)フィーダー細胞上で培養を開始した 3.5 日目の胚盤胞の形態(青い矢頭)。(B)胚盤胞の培養 5 日目に透明体(黒い矢頭)から抜けた内部細胞塊の形態(黄色い矢頭)。(C)内部細胞塊を単一細胞に分離し、継代後 10 日目に形成された ES 細胞様コロニーの形態(赤い矢頭)。(D)ES 細胞様コロニーを単一細胞に分離し、継代後 1 日目の ES 細胞様形態。(E)ES 細胞様コロニーを単一細胞に分離し、ES 様細胞を増殖後、継代後 2 日目の ES 細胞様形態。(F)ほとんどの ES 様細胞にアルカリフォスファターゼ活性が検出された。(G)フィーダー細胞とは明瞭に区別され、アルカリフォスファターゼ活性を示す ES 様細胞。(H)蛍光免疫染色により、ES 様細胞で SSEA-1 陽性が示された。(I)蛍光免疫染色により、ES 様細胞で Oct-4 陽性が示された。なお、図中のスケールバーの長さは $200\ \mu\text{m}$ を示す。

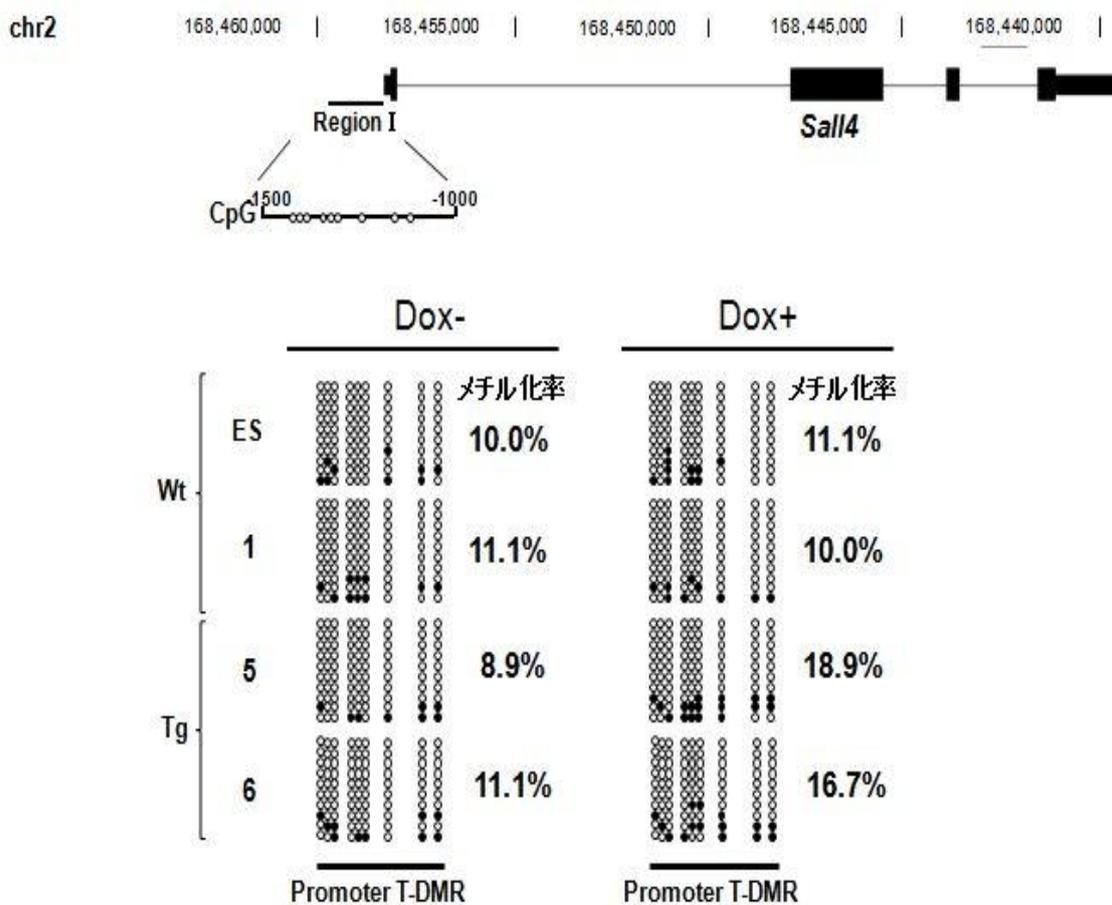


図3-8. Tgマウス由来ES細胞の内在性Sall14 ASncRNA発現を誘導的に低下させたTgマウス由来ES細胞のSall14 T-DMRのDNAメチル化パターンへの影響

Sall14 の T-DMR (promoter T-DMR) の DNA メチル化状態を示す。promoter T-DMR (-1507 bp ~ -1000 bp) の転写開始点上流に位置する CpG のメチル化状態をバイサルファイトシークエンシング法により解析した。図中の Region I は promoter T-DMR を示す。すべての組織とも 10 クローン解析し、メチル化率を算出した。ES は野生型 ES 細胞を示し、1 は野生型の Tg 由来 ES 細胞を示す。5, 6 は Tg 由来 ES 細胞を示す。Dox-; Dox 無添加、Dox+; Dox 添加を示す。chr2 は第 2 染色体、●はメチル化シトシン、○は非メチル化シトシンを示す。

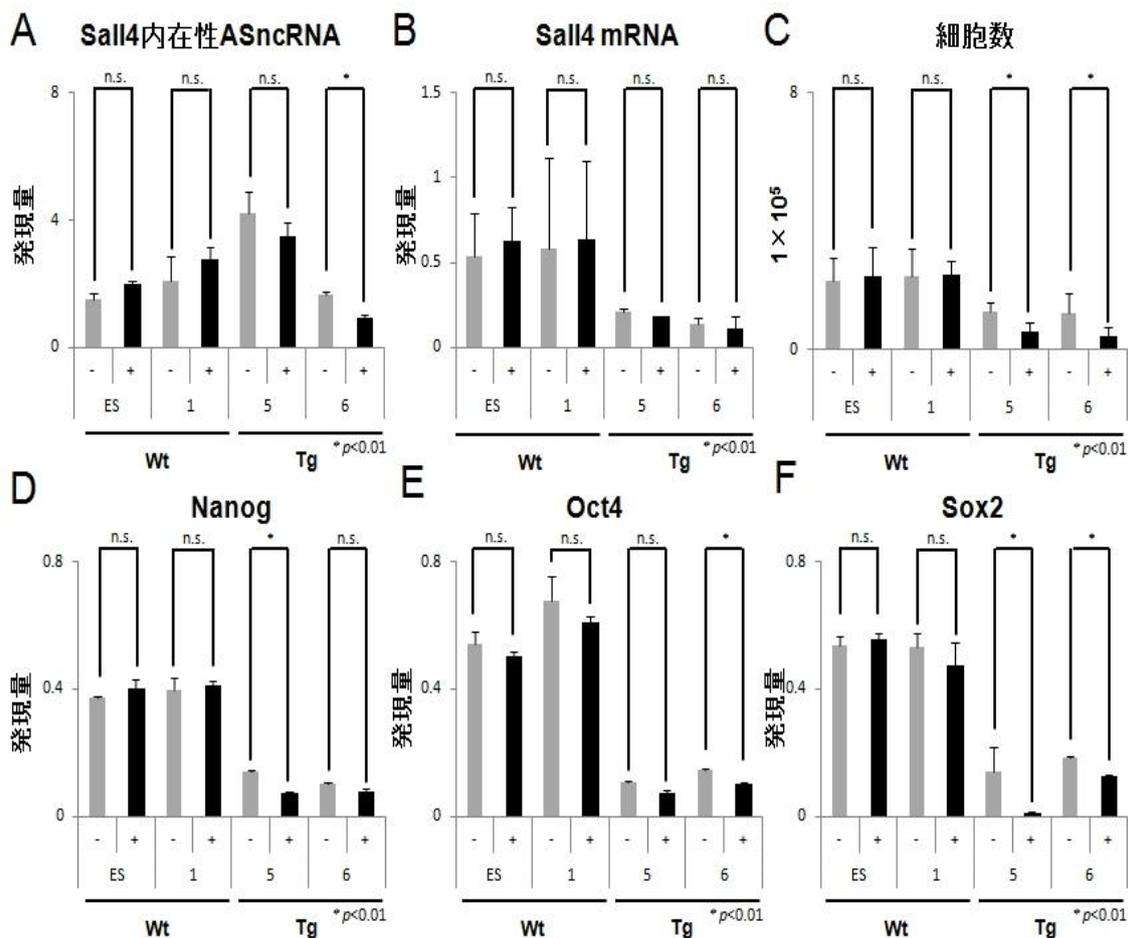


図3-9. Tg マウス由来ES細胞の内在性Sall14 ASncRNA 発現を誘導的に低下させたSall14 mRNA 発現およびES細胞数、マスター転写因子の発現への影響

(A), (B)内在性 Sall14 ASncRNA および Sall14 mRNA の発現解析を行った。ES は野生型 ES 細胞を示し、1 は野生型の Tg 由来 ES 細胞を示す。5, 6 は Tg 由来 ES 細胞を示す。-;Dox 無添加、+;Dox 添加を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な Sall14 mRNA または内 在性 Sall14 ASncRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行っ た。*:p<0.01、n. s.; not significant

(C)ES 細胞の増殖能を解析した。ES は野生型 ES 細胞を示し、1 は野生型の Tg 由来 ES 細胞を示す。5, 6 は Tg 由来 ES 細胞を示す。-;Dox 無添加、+;Dox 添加を示す。縦軸は 培養終了時の細胞数を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行っ た。

*:p<0.01、n. s.; not significant

(D), (E), (F) マスター転写因子 (Nanog, Oct4, Sox2) の発現解析を行った。ES は野生型 ES 細胞を示し、1 は野生型の Tg 由来 ES 細胞を示す。5, 6 は Tg 由来 ES 細胞を示す。-;Dox 無添加、+;Dox 添加を示す。縦軸は β -actin に対する相対的な各遺伝子の mRNA の発現量を示す。解析結果は Means \pm SE で示した。各群 n=3 で行った。*: p<0.01、n. s. ; not significant

総括

本研究での最も重要な発見は、タンパクをコードする遺伝子の転写調節領域に T-DMR の DNA メチル化を制御する可能性のある ASncRNA を持つものが多数あり、少なくともそのうちの一部は ASncRNA の標的 T-DMR の DNA メチル化制御を介して細胞分化・病態発症等の生体での機能に重要である、という点にある。これまでにゲノム全域を対象とした DNA メチル化解析により、様々な組織や主要幹細胞の DNA メチル化プロファイルが明らかにされてきた (Yagi S *et al.* 2008; Sato S *et al.* 2010)。その結果、転写調節領域の T-DMR はゲノム上広範囲に存在し、様々な組織で広範な機能に関わる遺伝子を制御していることが明らかとなった (Yagi S *et al.* 2008)。一方で転写調節領域の内在性 ASncRNA により DNA メチル化状態が制御されるものは、Sphk1 等のごく少数の遺伝子についてしか報告がなかった (Imamura T *et al.* 2004; Tomikawa J *et al.* 2011)。これに対して本研究では、転写調節領域の内在性 ASncRNA で T-DMR の DNA メチル化制御に関与する可能性のあるものに絞って解析した。その結果、転写物として登録されていなかったものも含めて、多数の ASncRNA を同定できたことから、転写調節領域の内在性 ASncRNA による DNA メチル化制御は、Sphk1 などの限られた遺伝子での特殊な例ではないと考えられる。よって、同じゲノム DNA 配列と DNA メチル化酵素を用いているにもかかわらず、組織・細胞種特異的に発現する内在性 ASncRNA により DNA メチル化制御が行なわれることは、生体での広範な遺伝子の T-DMR 形成に関わる一般的なメカニズムであることが示された。

本研究では、ES 細胞および発生中胎仔で Sa114 ASncRNA が T-DMR の脱メチル化状態の維持を通して Sa114 遺伝子の活性化状態を制御していることを明らかにした。Sa114 を例として細胞や個体組織で T-DMR の DNA メチル化パターンを改変 (エピジェネティック改変) することで発生異常を誘導できたことから、遺伝子破壊 (導入) とは違う次元

で、ゲノムにコードされる内在性の遺伝子についての発現制御機構を操作できる技術的な証明になったと考えられる。このことにより、内在性 ASncRNA を持ち、発生や細胞系譜決定に重要な遺伝子について、標的遺伝子の内在性 ASncRNA 量を操作することで、再生医療用の有用細胞の分化誘導や食肉の高品質化につながるエピジェネティック育種、個体でのエピジェネティック異常の積極的な誘導による病態モデル動物作製につながる可能性が浮上してくる。

第一章では、胚性幹細胞である ES 細胞の多分化能維持および細胞分化、個体形成に重要な遺伝子群に注目し、内在性 ASncRNA を探索した。まず、ES 細胞で特異的に低 DNA メチル化状態にある遺伝子領域情報を基に、Sox2 遺伝子および Nanog 遺伝子領域を探索し、それぞれの遺伝子領域に内在性 ASncRNA を発見した。これらの内在性 ASncRNA はセンス mRNA の発現が高い ES 細胞で発現しており、13.5 dpc では発現が低いこと、また、それぞれに複数の終止コドンが見られることなどを確認した。過去に報告されていた Sphk1 遺伝子領域の内在性 ASncRNA は、Sphk1 遺伝子（センス RNA）が発現しているアレルでは発現が抑制されており、一連の研究から DNA メチル化を誘導していると考えられている。ところが、Sox2 遺伝子および Nanog 遺伝子領域の内在性 ASncRNA は逆の発現様式を示していることになるため、これらの内在性 ASncRNA は、脱メチル化を誘導している可能性が考えられた。本章ではさらに ES 細胞と分化系としての神経前駆細胞塊 (Nsph) の比較から、さらに 6 遺伝子 (Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1, Dlx4, Sal14) の遺伝子領域にも、発現パターンから推測して脱メチル化の誘導に促進的に作用する可能性がある内在性 ASncRNA を発見した。

第二章では、上記の内在性 ASncRNA のうち、ES 細胞の多分化能維持に重要な Sal14 遺伝子領域の内在性 ASncRNA に焦点をあて研究を進めた。Sal14 は ES 細胞の多分化能維持および増殖に関与する転写因子である。まず、Sal14 mRNA を発現する ES 細胞と

抑制された栄養膜幹 (TS) 細胞との比較解析から、内在性 Sa114 ASncRNA は ES 細胞で高発現していることが示された。また、ES 細胞では Sa114 遺伝子の 5' 上流およびイントロン 1 に存在する T-DMR は低メチル化を示し、逆に TS 細胞では高メチル化であることも明らかになった。並行して、内在性 Sa114 ASncRNA の全長解析を試みたところ、Sa114 遺伝子領域の内在性 ASncRNA は、転写物としての登録データよりさらに長く、Sa114 遺伝子領域の上流に存在する T-DMR に重複していることや終止コドンの出現頻度が高くタンパク質をコードしていないこと、さらに、poly (A) が付加されていないことも示された。内在性 ASncRNA が脱メチル化に関与するとすれば、発現を抑制することで高メチル化を誘導できるはずである。そこで、ES 細胞における RNAi による内在性 ASncRNA のノックダウンを行ったところ、Sa114 遺伝子領域での特異的な高メチル化を誘導し、それに伴って Sa114 mRNA およびタンパクの発現が低下した。さらに、ES 細胞の多分化能維持にも影響を与えることを明らかにした。一方、内在性 ASncRNA の機能としては、lincRNA などの他の ncRNA のように広範囲なゲノム領域での遺伝子不活性化も考えられたが、内在性 Sa114 ASncRNA をノックダウンしても Sa114 近傍の遺伝子発現や、同じ Sa11 ファミリーに属する Sa111、3 の T-DMR のメチル化状態には影響がなかったことから、内在性 Sa114 ASncRNA は標的遺伝子である Sa114 特異的な DNA メチル化を介した制御に重要である。Dicer 欠損 ES 細胞では、内在性 Sa114 ASncRNA の発現に変化が認められなかったことから、Dicer による siRNA の生成とも異なることが示された。つまり、ES 細胞内の内在性 Sa114 ASncRNA は、これまでによく研究されてきた lincRNA や短い二本鎖 RNA とは異なるメカニズムで働き、Sa114 T-DMR 特異的に低メチル化を維持していることが示された。

第三章は、内在性 Sa114 ASncRNA を標的とした誘導型 shRNA コンストラクトの導入によるトランスジェニック (Tg) マウスモデルの作製である。まず、マウス初期胚の内在性 Sa114 ASncRNA の発現をノックダウンさせると、胚盤胞期胚への発生遅延など、

先に報告されている *Sal14 null* 型欠損胚に類似した異常が観察された。さらに、誘導型の内在性 *Sal14* ASncRNA KD Tg マウス 8 系統の樹立に成功した。*Sal14* ASncRNA KD Tg マウスでは、顕著な形態異常が観察された。また、Tg マウス由来 ES 細胞では、Dox による内在性 *Sal14* ASncRNA のノックダウンに伴って *Sal14* 遺伝子転写調節領域の T-DMR のメチル化が亢進し、*Sal14* mRNA の発現低下や ES 細胞の多分化能維持や細胞増殖へ影響を及ぼすことを明らかにした。以上より、初期胚での内在性 *Sal14* ASncRNA のノックダウンでは、胚盤胞期胚の内部細胞塊において *Sal14* T-DMR のメチル化が亢進することで *Sal14* mRNA の発現が低下し、胚盤胞期胚の発生に影響を及ぼしたことが考えられた。また、第三章で作製した誘導型内在性 *Sal14* ASncRNA ノックダウン Tg マウスの器官形成時期にあたる 5.5 dpc、7.5 dpc、10.5 dpc では、Dox による内在性 *Sal14* ASncRNA のノックダウンによって、*Sal14* mRNA の低下に伴い、個体形成異常が観察された。これらのことから、胎仔での内在性 *Sal14* ASncRNA のノックダウンによって、*Sal14* 遺伝子転写調節領域の T-DMR のメチル化が亢進し、胎仔の *Sal14* mRNA の発現が抑制されたために胎仔の発生へ影響を及ぼしたことが考えられた。つまり、初期胚や胎仔の内在性 *Sal14* ASncRNA は、*Sal14* T-DMR の DNA メチル化を低メチル化に維持していることが強く示唆された。

本研究の結果からは、様々な遺伝子の T-DMR 領域には脱メチル化を誘導あるいは維持している内在性 ASncRNA が存在し、発生制御や細胞分化の基盤になっていることを示唆している。また、これらの内在性 ASncRNA の発現を人為的に促進・抑制することで、エピジェネティック異常による病態モデル動物の樹立が可能なことが示唆された。また、内在性 ASncRNA を利用したエピジェネティクスの将来的な応用として、特定細胞への分化や幹細胞の未分化能維持に重要な遺伝子についての内在性 ASncRNA の強制発現または発現低下によるエピジェネティクス改変によって、積極的なエピジェネティック異常の誘導による病態モデル動物樹立や細胞系譜決定マスター遺伝子のエピゲノ

ム改変による特定の有用細胞分化系の確立への可能性が考えられる。たとえば、幹細胞誘導維持のマスター遺伝子をターゲットとした誘導性多能性幹細胞（iPS 細胞）の新規樹立法や、逆に分化誘導系の確立が上げられる。食肉産業においても、生産量や肉質は筋肉と脂肪の増殖・分化をエピジェネティックに制御することでも向上させることができる可能性が考えられる。一方で、近年社会問題化している二型糖尿病などの生活習慣病や心不全・腎不全などの慢性組織機能不全では、塩基配列の不可逆な変異ではなく、エピジェネティック異常の蓄積により長い時間をかけて発症に至ることが示唆されている。エピゲノム改変をこれら生活習慣病や慢性組織機能不全の原因遺伝子に用いることで、実際の発症形態により近い疾患モデル動物の作出につながるとも考えられる。以上、細胞分化・個体発生・病態発症に重要な遺伝子のエピゲノム改変技術を確立することで、今までにない新しい有用細胞やモデル動物樹立につながり、農学、医学研究の発展へ大きく貢献すると期待できる。

引用文献

Al-Baradie R, Yamada K, St Hilaire C, Chan WM, Andrews C, McIntosh N, Nakano M, Martonyi EJ, Raymond WR, Okumura S, Okihiro MM, Engle EC. (2002). Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet.* **71**:1195-9.

Antequera F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* **60**:1647-58.

Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell.* **31**:785-99.

Arima T, Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N. (2005). ZAC, LIT1 (KCNQ10T1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res.* **33**:2650-60.

Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. (2008). Potential link between estrogen receptor- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod.* **14**:539-45.

Berger SL. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* **447**:407-12.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. **409**:363-6.

Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C, Willard HF, Avner P, Ballabio A. (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature*. **351**:325-9.

Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, Cooper P, Smith S, McCabe VM, Norris DP, Penny GD, Patel D, Rastan S. (1991). Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature*. **351**:329-31.

Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. **349**:38-44.

Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. (2010). Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet*. **6**:e1001233.

Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. (2009). SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol*. **33**:1065-77.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasaki Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schönbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano

K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. **309**:1559–63.

Cayre A, Rossignol F, Clottes E, Penault-Llorca F. (2003). aHIF but not HIF-1alpha transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. **5**:R223–30.

Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*. **6**:351–60.

Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, Long J, Stern D, Tammana H, Helt G, Sementchenko V, Piccolboni A, Bekiranov S, Bailey DK, Ganesh M, Ghosh S, Bell I, Gerhard DS, Gingeras TR. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*. **308**:1149–54.

Cheng X, Blumenthal RM. (2008). Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*. **16**:341–50.

Cho JH, Kimura H, Minami T, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. (2001). DNA methylation regulates placental lactogen I gene expression. *Endocrinology*. **142**:3389–96.

de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeney LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA. (2002). DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* **62**:2695-8.

Deryusheva S, Gall JG. (2009). Small Cajal body-specific RNAs of *Drosophila* function in the absence of Cajal bodies. *Mol Biol Cell.* **20**: 5250-5259.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**:188-200.

Elling U, Klasen C, Eisenberger T, Anlag K, Treier M. (2006). Murine inner cell mass-derived lineages depend on *Sall4* function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:16319-24.

ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetrie D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA,

Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermüller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korbel J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaöz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JJ, Löytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Srinivasan M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA; NISC Comparative Sequencing Program; Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center; Washington University Genome Sequencing Center; Broad Institute; Children's Hospital Oakland Research Institute, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameer A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Shahab A, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Zhang X, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Ruan Y, Iyer

VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyraas E, Hallgrímsdóttir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. **447**:799–816.

Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med*. **14**:723–30.

Fazzari MJ, Grealley JM. (2004). Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet*. **5**:446–55.

Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. (2011). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. **10**:38.

Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*. **315**:1587-90.

Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. **464**:1071-6.

Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, Young G, Lucas AB, Ach R, Bruhn L, Yang X, Amit I, Meissner A, Regev A, Rinn JL, Root DE, Lander ES. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*. **477**:295-300.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. **404**:293-6.

Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*. **279**:17063-9.

Hernandez A, Martinez ME, Croteau W, St Germain DL. (2004). Complex organization and structure of sense and antisense transcripts expressed from the DIO3 gene imprinted locus. *Genomics*. **83**:413-24.

- Hekimoglu B, Ringrose L. (2009). Non-coding RNAs in polycomb/trithorax regulation. *RNA Biol.* **6**:129-37.
- Hoki Y, Kimura N, Kanbayashi M, Amakawa Y, Ohhata T, Sasaki H, Sado T. (2009). A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development.* **136**:139-46.
- Hüttenhofer A, Vogel J. (2006). Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **34**:635-46.
- Imamura T, Ohgane J, Ito S, Ogawa T, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. (2001). CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics.* **76**:117-25.
- Imamura T, Yamamoto S, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. (2004). Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island. *Biochem Biophys Res Commun.* **322**:593-600.
- Jeltsch A. (2006). On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics.* **1**:63-6.

Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. **22**:8031-41.

Jones PA, Baylin SB. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. **3**:415-28.

Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol*. **4**:242-54.

Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engström PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C; RIKEN Genome Exploration Research Group; Genome Science Group (Genome Network Project Core Group); FANTOM Consortium. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*. **309**:1564-6.

Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet*. **16**:2272-80.

Khalil AM, Faghihi MA, Modarresi F, Brothers SP, Wahlestedt C. (2008). A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS One.* **3**:e1486.

Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. (2006). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol.* **13**:793-7.

Kiss T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* **20**:3617-22.

Kiyosawa H, Mise N, Iwase S, Hayashizaki Y, Abe K. (2005). Disclosing hidden transcripts: mouse natural sense-antisense transcripts tend to be poly (A) negative and nuclear localized. *Genome Res.* **15**:463-74.

Kohlhase J, Chitayat D, Kotzot D, Ceylaner S, Froster UG, Fuchs S, Montgomery T, Rösler B. (2005). SALL4 mutations in Okihiro syndrome (Duane-radial ray syndrome), acro-renal-ocular syndrome, and related disorders. *Hum Mutat.* **26**:176-83.

Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Arruda EP, Kathiriya IS, Mo R, Hui CC, Srivastava D, Bruneau BG. (2006). Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat Genet.* **38**:175-83.

Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* **22**:908–17.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **27**:796–807.

Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet.* **21**:400–4.

Lei H, Oh SP, Okano M, Jüttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development.* **122**:3195–205.

Martienssen RA, Zaratiegui M, Goto DB. (2005). RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet.* **21**:450–6.

Matsui K, Nishizawa M, Ozaki T, Kimura T, Hashimoto I, Yamada M, Kaibori M, Kamiyama Y, Ito S, Okumura T. (2008). Natural antisense transcript stabilizes inducible nitric oxide synthase messenger RNA in rat hepatocytes. *Hepatology*. **47**:686-97.

Matsuyama S, Teraoka R, Mori H, Tomiyama T. (2007). Inverse correlation between amyloid precursor protein and synaptic plasticity in transgenic mice. *Neuroreport*. **18**:1083-7.

Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ. (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta*. **1677**:129-41.

Ma Y, Cui W, Yang J, Qu J, Di C, Amin HM, Lai R, Ritz J, Krause DS, Chai L. (2006). SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood*. **108**:2726-35.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. **10**:155-9.

Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. **305**:1289-92.

Nishino K, Hattori N, Sato S, Arai Y, Tanaka S, Nagy A, Shiota K. (2011). Non-CpG Methylation Occurs in the Regulatory Region of the Sry Gene. *J Reprod Dev.* **57**:586-93.

Oda M, Tanaka S, Yamazaki Y, Ohta H, Iwatani M, Suzuki M, Ohgane J, Hattori N, Yanagimachi R, Wakayama T, Shiota K. (2009). Establishment of trophoblast stem cell lines from somatic cell nuclear-transferred embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**:16293-7.

Ohgane J, Wakayama T, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Marh J, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. (2004). The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells.* **9**:253-60.

Okano M, Xie S, Li E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* **19**:219-20.

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida

M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase TO, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S. (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet.* **36**:40-5.

Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D, Kanduri C. (2008). Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* **32**:232-46.

Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bièche I. (2011). ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J.* **25**:444-8.

Ponting CP, Oliver PL, Reik W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*. **136**:629–41.

Rácz Z, Kaucsár T, Hamar P. (2011). The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs (review). *Acta Physiol Hung*. **98**:243–51.

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. **129**:1311–23.

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**:983–94.

Sado T, Hoki Y, Sasaki H. (2005). Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev Cell*. **9**:159–65.

Sato S, Yagi S, Arai Y, Hirabayashi K, Hattori N, Iwatani M, Okita K, Ohgane J, Tanaka S, Wakayama T, Yamanaka S, Shiota K. (2010). Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells. *Genes Cells*. **15**:607–18.

Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. (2006). The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development*. **133**:3005-13.

Shamovsky I, Nudler E. (2006). Gene control by large noncoding RNAs. *Sci STKE*. **2006**:pe40.

Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S, Hattori N. (2002). Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells*. **7**:961-9.

Shiota K. (2004). DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res*. **105**:325-34.

Storz G. (2002). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science*. **296**:1260-3.

Tomaru Y, Hayashizaki Y. (2006). Cancer research with non-coding RNA. *Cancer Sci*. **97**:1285-90.

Tomikawa J, Shimokawa H, Uesaka M, Yamamoto N, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Imamura T. (2011). Single-stranded noncoding RNAs mediate local epigenetic alterations at gene promoters in rat cell lines. *J Biol Chem*. **286**:34788-99.

Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. **329**:689–93.

Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S. (2009). Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells*. **14**:683–94.

Ushijima T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. **5**:223–31.

Wahlestedt C. (2006). Natural antisense and noncoding RNA transcripts as potential drug targets. *Drug Discov Today*. **11**:503–8.

Warren M, Wang W, Spiden S, Chen–Murchie D, Tannahill D, Steel KP, Bradley A. (2007). A Sall4 mutant mouse model useful for studying the role of Sall4 in early embryonic development and organogenesis. *Genesis*. **45**:51–8.

Washietl S, Hofacker IL, Lukasser M, Hüttenhofer A, Stadler PF. (2005). Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat Biotechnol*. **23**:1383–90.

Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyanagi K, Soloway PD, Sasaki H. (2011). Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science*. **332**:848–52.

Willingham AT, Gingeras TR. (2006). TUF love for “junk” DNA. *Cell*. **125**:1215–20.

Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*. **23**:1494–504.

Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B, Ng HH. (2006). *Sall4* interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. **281**:24090–4.

Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Li W, Takahashi Y, Hirakawa T, Wu G, Hattori N, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Liu XS, Shiota K. (2008). DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res*. **18**:1969–78.

Yang J, Chai L, Fowles TC, Alipio Z, Xu D, Fink LM, Ward DC, Ma Y. (2008). Genome-wide analysis reveals *Sall4* to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**:19756–61.

Yang J, Gao C, Chai L, Ma Y. (2010). A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. *PLoS One*. **5**:e10766.

Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. **38**:662-74.

Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, Diber A, Biton S, Tamir Y, Khosravi R, Nemzer S, Pinner E, Walach S, Bernstein J, Savitsky K, Rotman G. (2003). Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol*. **21**:379-86.

Yoshimizu T, Miroglio A, Ripoché MA, Gabory A, Vernucci M, Riccio A, Colnot S, Godard C, Terris B, Jammes H, Dandolo L. (2008). The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**:12417-22.

Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H. (2008). Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*. **451**:202-6.

Zhu D, Lai Y, Shelat PB, Hu C, Sun GY, Lee JC. (2006). Phospholipases A2 mediate amyloid-beta peptide-induced mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. **26**:11111-9.

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 21 年度博士課程入学

氏名 熊谷 勝義

指導教員 塩田 邦郎

論文題目 非コード・アンチセンス RNA による標的遺伝子
特異的エピジェネティック制御に関する研究

緒言

遺伝子領域には細胞の種類によって DNA のメチル化状態が異なる領域、つまり組織・細胞種依存的メチル化可変領域 (tissue-dependent and differentially methylated region: T-DMR) が存在する。これまでに、多くの遺伝子が組織特異的にメチル化される領域(T-DMR)を持ち、それらが組織・細胞種に依存した遺伝子発現に寄与していることが明らかになっている。T-DMR のメチル化パターンが組織・細胞種特異的に形成される機構については、今後明らかにする必要のある課題である。DNA メチル化やヒストン修飾系には、それぞれに対応する酵素 (DNA メチル化転移酵素、ヒストンアセチル化酵素等) が存在している。DNA 脱メチル化に関しては、単独の DNA 脱メチル化酵素の存在は未だ確認されていないものの、ゲノム修復系酵素と共役した DNA 脱メチル化機構について報告されている。さて、ゲノム全域の制御系としては、ゲノム上に多数存在する繰り返し配列に由来する siRNA や piRNA などの ncRNA の作用によりエピジェネティック制御が成立するが、ゲノム領域特異的に限定された DNA のメチル化・脱メチル化の制御系としては、領域特異的に作用する因子について明らかにする必要がある。

T-DMR のメチル化制御では、Sphk1 遺伝子領域の内在性 ASncRNA (Khps1) が T-DMR の

メチル化を誘導していることが示唆されている。Khps1 は、Sphk1 の T-DMR にオーバーラップする形で mRNA とは逆のアンチセンス方向へ転写され、Sphk1 遺伝子が発現しているアレルでは発現せず、逆に、Sphk1 遺伝子が発現していないアレルで発現する。すなわち、Khps1 が T-DMR のメチル化を誘導していると考えられる。一方で、Khps1 の一部の領域を培養細胞内で人為的に過剰発現させると、Sphk1 遺伝子の T-DMR は領域特異的に脱メチル化される。つまり、内在性 ASncRNA 量を人為的に変化させることで特定のゲノム領域の DNA メチル化状況を変える事ができる可能性を示唆している。

以上を背景として本論文は、内在性 ASncRNA による遺伝子領域 T-DMR の DNA 脱メチル化制御に関するもので、内在性 ASncRNA の探索、内在性 ASncRNA によるエピジェネティック制御、および内在性 ASncRNA を標的とした誘導型 shRNA コンストラクト導入による個体レベルの研究による以下の三章から構成されている。

第一章 T-DMR の DNA メチル化制御に関与する内在性 ASncRNA 候補の探索

第一章では、胚性幹細胞である ES 細胞の多分化能維持や細胞分化および個体形成に重要な遺伝子群に注目し、内在性 ASncRNA の探索を行った。まず、ES 細胞で特異的に低 DNA メチル化状態にある遺伝子領域情報を基に、Sox2 遺伝子および Nanog 遺伝子領域を探索し、それぞれの遺伝子領域に内在性 ASncRNA を発見した。これらの内在性 ASncRNA はセンス mRNA の発現が高い ES 細胞で発現しており、13.5 日胚では発現が低いこと、また、それぞれに複数の終止コドンが見られることなどを確認した。過去に報告されていた Sphk1 遺伝子領域の内在性 ASncRNA は、Sphk1 遺伝子（センス RNA）が発現しているアレルでは発現が抑制されており、一連の研究から DNA メチル化を誘導していると考えられる。ところが、Sox2 遺伝子および Nanog 遺伝子領域の内在性 ASncRNA は逆の発現様式を示していることになるため、これらの内在性 ASncRNA は、脱メチル化を誘導している可能性が考えられた。本章ではさらに ES 細胞と分化系としての神経前駆細胞塊 (Nsph) の比較から、さらに 6 遺伝子 (Gli3, Foxj2, Yy1, Rfx1, Dlx4,

Sal14)の遺伝子領域にも、発現パターンから推測して脱メチル化の誘導に促進的に作用する可能性がある内在性 ASncRNA を発見した。

第二章 培養細胞系を用いた Sal14 領域の内在性 ASncRNA による遺伝子制御

第一章で同定した内在性 ASncRNA を持つ遺伝子のうち、Sal14 は ES 細胞の多分化能維持および増殖に関与する。そこで、ES 細胞を用い内在性 Sal14 ASncRNA の DNA メチル化制御について検討した。まず、Sal14 mRNA を強発現する ES 細胞と Sal14 mRNA をほとんど発現しない栄養膜幹 (TS) 細胞とのメチル化状態の比較から、Sal14 遺伝子の転写調節領域上流およびイントロン 1 の 2 カ所に ES 細胞で低メチル化状態の T-DMR を同定した。また、内在性 Sal14 ASncRNA の全長解析を試みたところ、Sal14 遺伝子領域の内在性 ASncRNA は、転写物として登録されたものよりさらに長く、Sal14 遺伝子領域の上流に存在する T-DMR と重複していることや終止コドンの出現頻度が高くタンパク質をコードしていないこと、さらに、poly (A) が付加されていないことも示された。内在性 ASncRNA が脱メチル化に関与するとすれば、発現を抑制することで高メチル化を誘導できるはずである。そこで、ES 細胞における RNAi による内在性 ASncRNA のノックダウンを行ったところ、Sal14 遺伝子領域での特異的な高メチル化を誘導し、それに伴って Sal14 mRNA およびタンパクの発現が低下した。さらに、ES 細胞の多分化能維持にも影響を与えることを明らかにした。内在性 Sal14 ASncRNA をノックダウンした細胞でも、Sal14 近傍の遺伝子発現や同じ Sal1 ファミリーに属する Sal11、3 の T-DMR のメチル化状態には影響がなかったことから、内在性 Sal14 ASncRNA は標的遺伝子である Sal14 特異的な DNA メチル化を介した制御に重要である。Dicer 欠損 ES 細胞では、内在性 Sal14 ASncRNA の発現に変化が認められなかったことから、ES 細胞内の内在性 Sal14 ASncRNA は、これまでによく研究されてきた lincRNA や短い二本鎖 RNA とは異なるメカニズムで働き、Sal14 T-DMR 特異的に低メチル化を維持していることが示された。

第三章 Sal14 領域に存在する内在性 ASncRNA を標的とした inducible shRNA の Tg マウス作製

第三章では、内在性 Sal14 ASncRNA を標的とした誘導型 shRNA コンストラクトの導入によるトランスジェニック (Tg) マウスモデルを作製した。まず、内在性 Sal14 ASncRNA が実際に生体で機能しているかどうかを解析するために、培養下のマウス初期胚において内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウンを試みた。その結果、胚盤胞期胚への発生が遅延し、Sal14 Null 型欠損胚に類似した異常が観察された。さらに、第三章で作製した誘導型内在性 Sal14 ASncRNA Tg マウスを用い、母体で発生中の胎仔において内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウンしたところ、Sal14 mRNA の発現低下に伴う顕著な形態異常が観察された。また、Tg マウス由来 ES 細胞の内在性 Sal14 ASncRNA のノックダウンにより、Sal14 T-DMR のメチル化が亢進する傾向を示した。これらの結果を合わせて考えると、内在性 Sal14 ASncRNA は生体である初期胚および器官形成期胎仔の発生において、Sal14 T-DMR の低メチル化を維持することで Sal14 遺伝子の発現に必須であることから、個体発生に重要であることが強く示唆された。

総括

本研究により、内在性 Sal14 ASncRNA は転写調節領域内 T-DMR の低メチル化状態を維持することで生体での Sal14 mRNA 発現および個体発生に重要であることが初めて明らかになった。本研究では Sal14 以外にも T-DMR の DNA メチル化状態を制御する可能性のある内在性 ASncRNA を多数同定できた。内在性 ASncRNA による標的遺伝子特異的なエピジェネティック制御が多く遺伝子の T-DMR での遺伝子発現制御に重要であり、発生や個体形成に必須であると考えられる。本研究の結果を基に、ASncRNA の強制発現または発現低下によるエピジェネティクス改変を介した積極的なエピジェネティック異常の誘導による病態モデル動物樹立や、細胞系譜決定マスター遺伝子のエピゲノム改変による幹細胞や神経細胞などの有用細胞分化系確立の応用が考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科 細胞生化学研究室 塩田邦郎教授および放送大学大学院環境システム科学群 星元紀教授には研究全般にわたり御指導を賜りました。特に塩田邦郎教授より、研究者としての心構えや考え方、論文作製を中心に時間をかけて御指導を賜りました。また、研究の実地面では、東京大学大学院農学生命科学研究科 細胞生化学研究室 八木慎太郎特任教授には研究に対する心構えについて御指導を賜りました。田中智准教授には妊娠初期の胎仔のサンプリング方法や組織切片の確認について、御指導を賜りました。大鐘潤先生(現在、明治大学農学部生命科学科ゲノム機能工学研究室に所属)には、実験の指導以外にもデータの集積の仕方や得られたデータを様々な角度から見て考えることの重要性を御指導いただきました。また、私の社会人と学生としての両立を陰ながら応援してくださり、細部にわたる親身な御指導を賜りました。更に、東京大学大学院農学生命科学研究科 細胞生化学研究室 研究員 平林啓司博士、早川晃司博士、塩田研究室の皆様、東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科 佐藤智彦医師、東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科 門脇孝教授、窪田直人准教授、高本偉碩医師、笹子敬洋医師、門脇研究室の皆様には多くの御助力を頂きました。また、私を支えてくれている妻や子供達、義父、義母、友人には多くの御協力や御助言頂きました。特に妻は、3人の子供達を育てながら、自らもフルタイムで働きに出ることで私をサポートしてくれました。このように、この研究は陰ながら私をサポートしてくださった方々の御協力により遂行することができました。ここに深甚なる謝意を表します。