

報告番号	甲 第 12108 号
------	-------------

## 主 論 文 の 要 旨

### 論文題目

ニワトリ細胞の遺伝子発現制御に関する研究  
(A Study on the Regulation of Gene Expression  
in Chicken Cells)

氏 名 奥 寄 雄 也

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年の分子生物学、細胞生物学や遺伝子工学などの技術の開発と向上により、ヒトやマウスなど主要な哺乳類では、細胞内外の刺激に対する細胞の遺伝子発現の変化や制御メカニズムについて、その全容が明らかになりつつある。一方、ニワトリは農学・生物学・医学などで利用される重要な動物であるにもかかわらず、細胞内における遺伝子発現の制御メカニズムの知見は少ない。ニワトリの細胞生物学を研究することは、家禽としてニワトリを活用する際に有用であるだけでなく、得られた結果をヒトやマウスのデータと比較することで、哺乳類における細胞生物学の理解や、生物の進化を考察する際の一助にもなる。

本研究は、ニワトリ細胞における遺伝子発現の制御機構の解明を目指し、ウイルスの感染による遺伝子の発現、および発生過程における細胞の分化と遺伝子の発現について遺伝子工学および分子生物学的手法を用いて解析した。序論ではこれらの研究の背景となるヒトとニワトリの関わりについてまとめた。

第1章ではニワトリの自然免疫に関わる因子である IFITM (interferon-inducible transmembrane protein) に着目した。近年、トリインフルエンザウイルスが変異することで人への感染力が強まった新型インフルエンザウイルスが出現し、これが世界的に大流行することの危険性が盛んに議論されている。この一連のシナリオは、ニワトリがトリインフルエンザウイルスの自然宿主とされる水鳥を介して、ウイルスに感染することから始まると想定されている。したがって、ニワトリの免疫機構を解析し、インフルエンザウイルスの感染から防御するこ

とは、公衆衛生上きわめて重要であると考えられる。

IFITM ファミリータンパク質は、細胞膜やエンドソーム上に存在する膜タンパク質であり、ウイルス感染に応答して発現するインターフェロン (IFN) により発現誘導され、種々のウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが知られている。中でも IFITM3 は、インフルエンザウイルスの感染を阻害することが、哺乳類だけでなくニワトリにおいても報告されている。また、当研究室の先行研究においても、ニワトリ IFITM3 が遺伝子工学分野で常用される VSV-G シュードタイプレンチウイルスベクターの感染を阻害することを報告している。これらの背景より本研究では、この IFITM ファミリー遺伝子の中で解析が進んでおらず、機能が未知であった IFITM10 に焦点を当てて、その発現と抗ウイルス活性を含む機能の解析を行った。

本研究ではまず初めにニワトリ IFITM10 遺伝子のクローニングを行った。データベース上では IFITM10 には 2 種類の転写バリエーションが予測され、おそらくスプライシングバリエーションだと予測される短いバリエーションは、予測上のエクソン 2 が欠損していた。本研究ではこの予測配列を基に IFITM10 のクローニングを行ったが、取得できた IFITM10 は短いバリエーションのみであった。さらに、逆転写 PCR においても発現が確認できたのは短いバリエーションのみであった。また、成鳥の各臓器における IFITM10 の発現量を定量 PCR 解析した結果、ほぼ全身の臓器で IFITM10 の発現が確認された。一方で、これらの発現量は、成鳥における IFITM2 や 3 の発現量と比べると低い値であった。これらの結果から、IFITM10 は成鳥の多くの臓器で発現しているが、その絶対量は、他の強い発現が見られる IFITM 遺伝子に比べると低いと考えられた。また、発生時期の 5.5 日胚での IFITM10 の発現解析も行った。5.5 日胚において IFITM10 の発現は、解析したすべての臓器において観察された。ここで、成鳥で主要な IFITM3 の発現は、5.5 日胚においては低く、IFITM10 と比べて同程度であった。また、解析した 5.5 日胚の組織の中では生殖腺が最も高い発現を示したことから、生殖幹細胞である PGCs についても IFITM10 の発現量の解析を行った。その結果、PGCs においては 2.5 日胚血中循環期の PGCs において IFITM10 の発現が最も高く、発生時期が進むにつれてその発現が低下していくことが明らかとなった。

次に IFITM10 の抗ウイルス活性について解析を行った。IFITM10 の IFN 刺激による応答性を、ニワトリ胚性線維芽細胞 (CEFs) を用いて調べた結果、IFN- $\alpha$  刺激により IFITM10 の発現量はおよそ 1.4 倍に増加したものの、統計的に有意といえるほどの発現量の増加は認められなかった。一方で、既報と同様に CEFs で最も発現量の高い IFITM2 の発現は、IFN- $\alpha$  刺激により約 25 倍上昇した。これらの結果からニワトリにおいて IFITM10 は IFN- $\alpha$  に非応答性であり、したがって IFN 刺激による IFITM10 のウイルス抵抗性への寄与は強くないと考えられる。

一方、ニワトリ線維芽細胞株 DF-1 において、*IFITM10* の発現量が PGC と同レベルである安定発現株を作製し、この細胞に対して VSV-G シュードタイプレンチウイルスベクターを感染させたところ、ウイルスの感染効率が 30%程度低下した。さらに、合胞体形成アッセイにおいて、*IFITM10* は VSV-G タンパク質による細胞膜間の融合を阻害する活性を示した。これらの結果は、*IFITM10* が他の *IFITM* 遺伝子と同様に、ウイルスに対する感染阻害能力を持つ可能性を示唆するものである。しかしながら、生体内における *IFITM10* の正確な役割を議論するには、今後のさらなる研究が必要と考えられる。

第 2 章では近年の分子生物学における主要なトピックの一つであるエピジェネティック制御因子に注目し、その中でもゲノム DNA の脱メチル化に関与する *TET* ファミリー遺伝子について解析を行った。一般的にエピジェネティクスとは、ゲノム DNA 上の塩基配列の変化を伴わずに、細胞分裂後や、あるいはその子孫まで維持される遺伝子発現の変化について研究する学問領域である。その具体的な例としては、ヒストンテールの化学修飾や、ノンコーディング RNA、またゲノム DNA 上の CpG 残基のメチル化による遺伝子発現の制御が挙げられる。

これらの中でもゲノム DNA のメチル化は、これまでに多数の報告があり、シトシン残基のメチル化が DNA メチルトランスフェラーゼにより触媒され、これが遺伝子の発現抑制のシグナルとしてはたらくことが知られている。一方で、メチル化されたゲノム DNA がどのようにして脱メチル化され、未修飾の CpG へと再変換されるのか、そのメカニズムがほぼ解明されたのはつい最近のことである。これらの論文で報告された *TET* タンパク質は、5-メチルシトシン(5mC)を水酸化し、5-ヒドロキシルメチルシトシン(5hmC)、5-ホルミルシトシン(5fC)、5-カルボキシルシトシン(5caC) へと変換する酵素活性を持つ。*TET* タンパク質により生じたこれらシトシンの誘導体は、細胞分裂による希釈や、DNA 修復機構によって未修飾のシトシンへと変換されることで脱メチル化が完了する。

本研究では、初めにこれまで解析が行われていなかったニワトリ *TET* 遺伝子のクローニングを行った。培養細胞を用いてクローニングした各 *TET* タンパク質の酵素活性を確認した結果、いずれの *TET* タンパク質も 5mC を 5hmC に変換する触媒活性を有していることが確認された。また、各発生時期における *TET* 遺伝子の発現を解析した結果、哺乳類とは異なり、発生初期の胚盤葉ではいずれの *TET* 遺伝子の発現量も低い値であった。5、10、15 日胚では、胚盤葉期と比較して一部の臓器において *TET* 遺伝子の発現の増加が見られた。成鳥では、肺、脾臓、腸管、輸卵管、子宮、白血球において他の臓器と比較して高い *TET* 遺伝子の発現が観察された。また、興味深いことに、赤血球において非常に高

い *TET1* の発現が観察された。そこで、様々な発生ステージで赤血球における *TET* 遺伝子の発現量を測定したところ、発生にしたがって *TET1* のみの特異的に増加していくことが明らかとなった。さらに、5 日胚を境に *TET1* の発現量が急増する傾向が観察された。

この結果を踏まえ、本研究では赤血球における *TET1* の生理的役割を明らかにすべく実験を行った。赤血球における主要なタンパク質であるヘモグロビンはそれぞれ 2 分子の  $\alpha$ -グロビンと  $\beta$ -グロビタンパク質から構成されている。このうち、胚発生の過程において  $\beta$ -グロビン遺伝子  $\rho$  および  $\beta A$  は、ゲノム DNA のメチル化により発現制御を受けることが知られている。そこで、これらの遺伝子のプロモーター近接領域の DNA の 5mC および 5hmC をメチル化 DNA 免疫沈降法 (MeDIP) およびヒドロキシメチル化 DNA 免疫沈降法 (hMeDIP) により解析した。その結果、5 日胚では強く観察された  $\beta A$  プロモーター上の 5mC は、8 日胚までの間に急速に消失し、成鳥ではほとんど検出されなくなった。また、この際一過的な 5hmC シグナルの増加が観察された。これは、*TET1* が  $\beta A$  プロモーター上の 5mC を能動的に消去することを示唆するものである。これを確かめるべく、ニワトリ赤血球前駆細胞 T2ECs を用いた *in vitro* の実験を行った。T2ECs を赤血球へ分化誘導したところ、グロビン遺伝子の発現上昇と並行した *TET1* の発現増加が見られた。また、分化誘導前後において MeDIP および hMeDIP 解析を行った結果、 $\beta A$  プロモーター上の 5mC は、48 時間の分化誘導により減少しており、一方で 5hmC は増加していた。さらに siRNA を用いて *TET1* をノックダウンしたところ、分化に伴う  $\beta A$  遺伝子の発現上昇が阻害された。これらの結果から *TET1* は、 $\beta$ -グロビン遺伝子プロモーター上の DNA メチル化状態を制御することで  $\beta$ -グロビン遺伝子の発現を制御していると考えられる。

*TET* 遺伝子の変異は、ヒトにおいても血球細胞由来のがんにおいて広く観察されており、*TET* 遺伝子は抗がん剤のターゲットとしても有望な遺伝子であると考えられる。ニワトリ赤血球は、哺乳類赤血球と異なり有核であることから、終末分化した赤血球においてもゲノム DNA の取得及び解析が可能である。このような研究はニワトリを用いてのみ行えるものである。以上の点から、本研究はニワトリの細胞生物学にとどまらず、ヒトの疾病を考える上でも有用な知見を得ることができたと考えられる。

結言では第 1 章、第 2 章の実験結果についてまとめ、本論文全体の総括を行った。本研究から、ウイルスの感染および発生過程における細胞分化の誘導という生体内外の刺激に対する、ニワトリ細胞の遺伝子発現制御メカニズムの一端を解明できたと考えられる。また、本研究の結果に基づき今後さらに詳細なニワトリ細胞の研究が発展することが期待される。