

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

奥寄 雄也

● 目次

序論

序論	5.
参考文献	13.

第1章：インターフェロン誘導性膜タンパク質 IFITM10 の

発現および機能の解析

緒言	17.
実験材料および手法	19.
実験結果	25.
考察	30.
参考文献	32.
図表	35.

第2章：ニワトリ *TET* ファミリー遺伝子のクローニング

および赤血球分化におけるニワトリ *TET1* の役割

緒言	56.
実験材料および手法	59.
実験結果	63.
考察	68.

参考文献	71.
図表	74.
結言	120.
出版物一覧	122.
謝辞	124.

序論

● 序論

ニワトリとヒトの関わり

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) は、我々人類にとって最も身近に存在する鳥類だといえるであろう。2014年現在、我が国では常時3億羽のニワトリが飼育されており、これに世界中で飼育されているニワトリを合計すると、その数は約260億羽にのぼる^[1]。世界の人口が約70億人であることを考えると、ヒト一人当たり3羽以上のニワトリが飼育されていることになる。他の主要な家畜である牛や豚は、全世界の飼育数を合計してもそれぞれ15億頭に過ぎない^[1]。さらにニワトリは、家畜の中で最初に全ゲノムのDNA配列が決定された動物である^[2]。これらのことからいかにニワトリが我々ヒトの生活に深く寄り添い、また不可欠な存在であるかが見て取れる^{[3][4]}。

ニワトリの家畜化がいつ始まったのかについては、4000年前とも8000年前ともいわれ、いまだはっきりとはしていない。しかし、少なくともそれは東南アジアのどこかで起こったと考えられている^[3]。ニワトリの原種は、インドシナ半島からインド東部にかけて生息する赤色野鶏 (*Gallus gallus*) であるとされる。ニワトリと異なり赤色野鶏は、雄鶏においては鮮やかな生殖羽を持ち、雌鶏には鶏冠が存在しない。また、ニワトリよりずっと小柄で細身であり、ある程度の距離であれば飛行することもできる。このような差異はあるものの、家畜のニワトリと野生の赤色野鶏の子孫は稔性を有しており、生物学的にはこれらの鳥は同種であると考えられる。赤色野鶏は非常に憶病な鳥であり、初めの家畜化には困難が伴ったと予測される。しかしいったん家畜化されたニワトリは、良質なタンパク質源になる肉と卵だけにとどまらず、文化的には闘鶏という娯楽や、光に応答して定期的に鳴く性質^[5]や美しい羽根を使った宗教儀式への利用、そして医薬品製造への応用など様々な恩恵を我々にもたらした。

家畜化されたニワトリが単一起源を持つのか、それとも複数の起源を持つのかについても未だ議論の余地が残る^{[6][7][8][9]}。ただし、近年のミトコンドリアDNAを用いた遺伝型解析は、複数起源説を支持するものが多く見受けられる。さらに、ニワトリは、赤色野鶏を単一の起源とするのではなく、インドに生息する灰色野鶏 (*Gallus sonneratii*) との交雑種であるとする論文も存在する^[10]。これら

の議論をまとめることが非常に困難である理由のひとつは、ニワトリは大昔からヒトとともに移動し、かつ飼育され続けてきたため、出自が正確な資料を発掘することが困難という点にある^[3]。一方でそれは数千年もの長きにわたり、ヒトとニワトリが共に暮らしてきたことを示す証拠であるとも考えられる。

ニワトリと生物学

現代における生物学の主流は、実験に基づいた生命現象の説明および解明であると考えられる。一方で、自然科学 (natural science) という単語が存在せず、今日のこうした概念が自然哲学 (natural philosophy) と呼ばれていた近世まで時代を遡ってみると、生物学の出自は様々な生物の収集と分類を目的とする博物学 (natural history) であり、実験科学が生物学の主流になったのは近代に入ってからであると考えられる。こうした点で生物学は、近世においても実験に基づく自然現象の原理解明が試みられてきた物理学、化学とは対照的である。実際に、ニュートンが『自然哲学の数学的原理』を発表したのが 1687 年であるのに対し、ダーウィンにより『種の起源』が発表されたのは、1859 年と、19 世紀も半ばに入ってからである。さらに、ワトソン・クリックによる DNA の二重らせん構造の発見まで話を進めれば、1953 年とつい最近のことになる^[11]。このようにまとめると現代的な生物学は、他の自然科学分野に比べて歴史の浅い学問であるように感じられる。一方、この 200 年間ににおける生物学分野の発展が目覚ましいものであることは明らかである。さらに、自然原理の解明という基礎的な面だけではなく、農学や医学などの応用の面からも現代の生物学はさらなる進歩が望まれている。

ここで、生物学とニワトリの関わりについて話を戻すと、生物学史の中でニワトリは、常に脚光を浴びるスターではないかもしれないが、影の名脇役的な存在として常に研究され続けてきた。以降、生物学におけるニワトリについて時代を追って記述する。

ニワトリは卵生であり、さらに家禽として改良された品種は、卵をほぼ毎日産むことができる。また、胚発生の様子が卵を割ることにより簡便に観察することができ、胚のサイズも大きいため、観察・操作共に容易である。このような特徴を持つニワトリは、発生生物学分野の実験モデル動物として、その黎明

期から現在にわたり広く用いられてきた。16世紀ごろから盛んに研究が行われた、生物の解剖学的特徴を比較・考察する比較解剖学の創始者のひとりとして知られるピエール・ブロンは、1555年の著書である『鳥類誌』において、トリとヒトの骨格の共通性について記述している。この比較解剖学は、生物の解剖学的特徴の共通性からその起源に関する関心を生み、19世紀初頭には発生学を生み出した。比較発生学者であり、発生における胚葉説の提唱者のひとりであるクリスティアン・パンダーは、ニワトリ胚の研究から胚葉説のアイデアを得た^[12]。さらに、これらの発生学的研究はダーウィンにも影響を及ぼしている。『種の起源』における進化論の引き合いとして、ガラパゴス諸島のフィンチ類の適応進化は有名であるが、ダーウィンはこれ以外にも『種の起源』の中で自身の進化論の証拠のひとつとして、ニワトリの先祖が赤色野鶏であることを主張している。実験手法の改良に伴い、近年ではマウスなどの哺乳類が発生学に用いられることも増えてきているが、四肢形成や神経管形成、色素細胞の遊走など、依然多くの発生学の分野においてニワトリ胚がモデル生物として用いられている^{[13][14][15]}。

分子生物学分野におけるニワトリは、発生学分野に比べるとメジャーな研究対象ではないが、それでも分子生物学上のいくつかの重要な発見は、ニワトリを用いた研究に基づいている。1909年にペイトン・ラウスは、ニワトリのがん細胞抽出液を、別のニワトリに移植することにより再度がんが発生することを発見し、この知見から発がん性ウイルスの存在を提唱した^[16]。ラウス肉腫ウイルス (RSV: Rous sarcoma virus) と名付けられたこの腫瘍ウイルスに関する研究はその後も続き、1970年代後半にはJ・マイケル・ビジョップ、ハロルド・ヴァーマスらによってRSVのゲノム中にコードされているがん原遺伝子 *v-Src* 遺伝子が、ニワトリのゲノム中に存在する遺伝子と構造的に相同であることが発見され、*c-src* (*cellular-src*)と命名された^[17]。また日本の花房秀三郎は、*v-Src* 遺伝子が部分的欠損しておりトランスフォーメーション能を欠いたRSVをニワトリに感染させると、ニワトリ内で*c-src*との組換え反応が起こり、RSVのがん原性が回復することを示し、RSVの*v-Src*がニワトリ由来であることを証明した^[18]。これらの一連の発見により、ペイトン・ラウスは1966年に、J・マイケル・ビジョップとハロルド・ヴァーマスは1989年にノーベル医学・生理学賞を受賞している。

さらに、現在の遺伝子工学の分野においてもいくつかのニワトリ由来の DNA シスエレメントが常用されている。例えば、汎用の動物細胞用高発現プロモーターとして知られる CAG プロモーターは、サイトメガロウイルスの早期遺伝子エンハンサーに、ニワトリの β -アクチン遺伝子のプロモーターと、ウサギの β -グロビン遺伝子のスプライシングアクセプターを繋いだ合成プロモーターである^[19]。また、ニワトリ β -グロビン遺伝子座の研究の中で発見された、遺伝子発現の制御領域である HS4 は、エンハンサー遮断効果と、エピジェネティック制御因子の遮断効果の両方を持つインシュレーターとして知られており、ローカス非依存的な外来遺伝子の安定発現を狙いベクターに組み込まれることがある^{[20][21][22]}。

このようにして、ニワトリは生物学の各時代において様々な側面から研究がなされてきた。加えて、生物学の基礎的な分野にとどまらず、ニワトリは生物学に基づく応用分野においても活用が進んできている。次の項ではニワトリを用いた医薬品の生産という観点からニワトリの可能性を議論する。

ニワトリを用いた医薬品の生産

ニワトリは、我々に食肉や鶏卵を提供するだけでなく、生物学におけるモデル生物でもあり、また医薬品生産でも重要な家禽である。中でも、発育鶏卵を用いたワクチン生産は、ニワトリを用いた医薬品生産において最も確立され、また広く用いられている技術であると考えられる。例えば、おたふくかぜや麻疹のワクチンは、発生 10 日前後のニワトリ胚由来の胚性線維芽細胞 (CEFs: **Chicken embryonic fibroblasts**) にそれぞれのウイルスを感染させ、増殖させることで生産されている^[23]。また、現在我が国で用いられているインフルエンザワクチンは、発生 9 日の発育鶏卵のしょう尿液中に直接インフルエンザウイルスを播種し、生産されたものである^[23]。

このような伝統的にニワトリが用いられてきたワクチン生産に加え、医薬品生産におけるニワトリの新たな利用法として、遺伝子組換え技術を用いたバイオ医薬品の生産が考えられる。その背景として、近年、医薬品市場においては従来型の低分子医薬に加えて、抗体医薬品をはじめとしたバイオ医薬品が売り上げの上位を占めるようになってきたことが挙げられる。このようなバイオ医

薬品は、従来型の医薬品と比べて、疾病に対してより特異的にはたらき、かつ人体に低負荷であることが期待されている。一方で、バイオ医薬品を広く世間に普及させるにあたり解決すべき重要な問題の1つに、生産コストの高さと、それに付随した薬価の高さがある。例えば、近年上市され注目されている抗がん剤オプジーボは、抗PD-1抗体という抗体医薬品であり、悪性黒色腫や非小細胞性肺がん、腎細胞がんに対して高い効能を示すことが期待されている^[24]。一方でオプジーボの薬価は73万円/100mgであり、治療により年間にかかる医療費は3000万円を超える。昨年(2016年)の薬価改定により、今年からオプジーボの薬価は半分に引き下げられたが、依然として高価な医薬品であることは変わらない。高齢社会にある我が国において、このような高額な医薬品は患者本人のみならず、社会保障全般の維持運営に関わる問題であり、安価なバイオ医薬品製造技術の開発は急務である。

現在このようなバイオ医薬品生産におけるゴールドスタンダードは、遺伝子組換えCHO細胞(Chinese hamster ovary cells)を用いた方法である。CHO細胞は、増殖速度が速く、浮遊培養が可能であり、また多くの研究により効率的な培養法や生産物の精製法が確立されている。さらに、前述したオプジーボも含め、実際に上市され使用実績のある医薬品が既に多く存在するため、安全性が第一に問われる医薬品市場における信頼性も高い。したがって、遺伝子組換えニワトリを含め、遺伝子組換え動物を用いたバイオ医薬品生産が、今からバイオ医薬品生産におけるゴールドスタンダードとして再定義される可能性は低いと言わざるを得ない。一方で、遺伝子組換えニワトリによるバイオ医薬品生産にも、CHO細胞に勝る点が存在する可能性があることも確かである。

例えば、鶏卵一個あたりには約4gのタンパク質が含まれており、その半分はオボアルブミンである。したがって、遺伝子組換え技術を用いてオボアルブミンタンパク質を目的のタンパク質に置き換えることができれば、理論上は鶏卵一個から最大2gもの生産物を得られる可能性がある。現実的にこのような大量のタンパク質を卵白中に生産させることは困難を伴い、依然解決すべき課題は多いが、遺伝子組換えニワトリによるバイオ医薬品生産は、安価に大量の医薬品を生産するポテンシャルを秘めていると考えられる。我々の研究室ではこうした考えに基づき、遺伝子組換えニワトリを用いて、バイオ医薬品となりうる有用タンパク質を卵白中に生産させる技術の開発を行ってきた^{[25][26]}。また、実

際に遺伝子組換えニワトリを用いた医薬品がすでに実用化された例もある。希少疾病であるリソソーム酸性リパーゼ欠損症用の組換え酵素製剤として開発されたカヌマは、ニワトリ卵白中に生産されたリコンビナントヒトリソソーム酸性リパーゼを精製したものであり、2016年に厚生労働省の承認を得て日本においても販売されている^[27]。このように、ニワトリは医薬品生産の場面についても魅力的な生物であり、今後のさらなる活用が期待されている。

本研究の目的

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においては、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。一方で、ニワトリは農学・生物学・医学と多くの面について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についての知見は少ない。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、ウイルス感染とそれに応答した遺伝子の発現、および発生過程における細胞の分化と遺伝子発現を遺伝子工学および分子生物学的手法を用いて解析を行った。

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の変異により、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^[23]。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疫することは、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、細胞膜もしくは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^{[28][29]}。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^{[30][31]}。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^[32]。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最も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。その結果、IFITM10 も IFITM3 と同様に 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活性を持ち、またその活性は VSV-G による細胞膜融合の阻害によることが示唆された。

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 (epigenetics) 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。

これらメカニズムの中でもゲノム DNA のメチル化については、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT: DNA methyl transferase) によりシトシン残基のメチル化が触媒され、またそ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、比較的早くから報告されていた^{[33][34]}。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完全に解明されたのは 2011 年とつい最近のことである^{[35][36]}。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脱メチル化が完了する^{[37][38]}。

本研究では、これまで解析が行われていなかったニワトリ *TET* 遺伝子 *TET1*, 2, 3 をクローニングし、その酵素活性を確認した。その結果、これらの TET タンパク質は、いずれも 5mC を 5hmC へと変換する酵素活性を有していた。また、ニワトリ *TET1* が赤血球で高発現しており、 β -グロビン遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を制御することで、 β -グロビン遺伝子の発現を制御することを発見した。

● 参考文献

- [1] 国際連合食糧農業機関統計 2014 年 URL: <http://www.fao.org/faostat/en/>
- [2] G.K. Wong, B. Liu, J. Wang et al., A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms, *Nature* 432 (2004) 717-22.
- [3] A. Lawler, In search of wild chicken, *Science* 23 (2012) 1020-4.
- [4] A. Lawler 著, 熊井ひろ美 訳, ニワトリ 人類を変えた大いなる鳥, 発行 インターシフト
- [5] T. Shimmura, T. Yoshimura, Circadian clock determines the timing of rooster crowing, *Curr. Biol.* 23 (2013) 231-3.
- [6] A. Fumihito, T. Muiyake, S. Sumi, et al., One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (1994) 12505-9.
- [7] D. Niu, Y. Fu, J. Luo, et al., The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds, *Biochem. Genet.* 40 (2002) 163-74.
- [8] Y.P. Liu, G.S. Wu, Y.G. Yao, et al., Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles, *Mol. Phylogenet. Evol.* 38 (2006) 12-9.
- [9] V.A. Thomson, O. Lebrasseur, J.J. Austin, et al., Using ancient DNA to study the origins and dispersal of ancestral Polynesian chickens across the Pacific, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111 (2014) 4826-31.
- [10] J. Eriksson, G. Larson, U. Gunnarsson, et al., Identification of the *Yellow Skin* gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken, *PLoS Genet.* 29 (2008) e1000010.
- [11] J.D. Watson, F.H.C. Crick, A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* 25 (1953) 737-8.
- [12] S. Schmitt, From eggs to fossils: epigenesis and transformation of species in Pander's biology, *Int. J. Dev. Biol.*
- [13] Y. Morishita, A. Kuroiwa, T. Suzuki, Quantitative analysis of tissue deformation dynamics reveals three characteristic growth modes and globally aligned anisotropic tissue deformation during chick limb development, *Development* 142 (2015) 1672-83.
- [14] D. Saito, Y. Takase, H. Murai, Y. Takahashi, The dorsal aorta initiates a

- molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification, *Science* 336 (2012) 1578-81.
- [15] R. Tadokoro, H. Murai, K. Sakai, et al., Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho-regulated membrane blebbing, *Sci. Rep.* 2 (2016) 38277.
- [16] R. Dulbecco, Francis Peyton Rous, *Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.* 48 (1976) 275-306.
- [17] D. Stehelin, D.J. Fujita, T. Padgett, H.E. Varmus, Detection and enumeration of transformation-defective strains of avian sarcoma virus with molecular hybridization, *Virology* 76 (1977) 675–84.
- [18] H. Hanafusa, C.C. Halpern, D.L. Buchhagen, S. Kawai, Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants, *J Exp Med.* 146(1977) 1735-47.
- [19] H. Niwa, K. Yamamura, J. Miyazaki, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, *Gene* 108 (1991) 193-200.
- [20] M.N. Prioleau, P. Nony, M. Simpson, G. Felsenfeld, An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β -globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene, *EMBO J.* 18 (1999) 4035-48.
- [21] R. Ghirlando, K. Giles, H. Gowher, et al., Chromatin domains, insulators, and the regulation of gene expression, *Biochim. Biophys. Acta.* 1819 (2012) 644-51.
- [22] N. Uchida, K.N. Washington, C.J. Lap, et al., Chicken HS4 insulators have minimal barrier function among progeny of human hematopoietic cells transduced with an HIV1-based lentiviral vector, *Mol. Ther.* 19 (2011) 133-9.
- [23] 厚生労働省ホームページ URL: <http://www.mhlw.go.jp/>
- [24] J.D. Wolchok, H. Kluger, M.K. Callahan, et al., Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 122-33.
- [25] M. Kamihira, K. Ono, K. Esaka, et al., High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector, *J. Virol.* 79 (2005) 10864-74.
- [26] D. Kodama, D. Nishimiya, K. Iwata, et al., Production of human erythropoietin by

- chimeric chickens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (2008) 834-9.
- [27] C. Sheridan, FDA approves 'farmaceutical' drug from transgenic chickens, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 17-9.
- [28] J.M. Perreira, C.R. Chin, E.M. Feeley, et al., IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses, *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 4937–55.
- [29] C.C. Bailey, G.C. Zhong, I.C. Huang, et al., IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense, *Annu. Rev. Virol.* 1 (2014) 261–83.
- [30] C.C. Bailey, I.C. Huang, C. Kam, et al., Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002909.
- [31] S.E. Smith, M.S. Gibson, R.S. Wash, et al., Chicken interferon-inducible transmembrane protein 3 restricts influenza viruses and lyssaviruses *in vitro*, *J. Virol.* 87 (2013) 12957–66.
- [32] S. Kidani, Y. Okuzaki, H. Kaneoka, et al., Expression of interferon-inducible transmembrane proteins in the chicken and possible role in prevention of viral infections, *Cytotechnology* 65 (2013) 985-92.
- [33] Z.D. Smith, A. Meissner, DNA methylation: roles in mammalian development, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 204–20.
- [34] M.G. Goll, T.H. Bestor, Eukaryotic cytosine methyltransferases, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 481–514.
- [35] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y. Shen, et al., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324 (2009) 930–5.
- [36] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, et al., Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* 333 (2011) 1300–3.
- [37] A. Maiti, A.C. Drohat, Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35334–8.
- [38] Y.-F. He, B.-Z. Li, Z. Li, et al., Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA, *Science* 333 (2011) 1303–7.

第1章

インターフェロン誘導性膜タンパク質 IFITM10 の 発現および機能の解析

● 1.1 緒言

インターフェロン (IFN) 応答性膜タンパク質 (IFITM: interferon-inducible transmembrane protein) は、ウイルス感染による免疫の活性化に応答して誘導される抗ウイルス性タンパク質であり、哺乳類においてはヒトで *IFITM1, 2, 3, 5*, および *10* が、マウスでは *Ifitm1, 2, 3, 5, 6, 7*, および *10* が機能性の *IFITM* ファミリー遺伝子として報告されている^{[1][2]}。中でも *IFITM1, 2, 3* は、ウイルスの膜タンパク質と宿主細胞の細胞膜との融合を阻害することで、A 型インフルエンザウイルスやエボラウイルス、西ナイル熱ウイルスなど様々なウイルスの感染を阻害する活性を持つことが報告されている^[2]。これらウイルスの中で A 型インフルエンザウイルスは、鳥類およびヒトを含む哺乳類に対して感染能を持つことが広く知られている。近年、東南アジアを中心として鳥類に感染する A 型インフルエンザウイルス、いわゆるトリインフルエンザウイルスに変異が起こり、ヒトに容易に感染する能力を持った新型インフルエンザウイルスが発生し、世界的な大流行であるパンデミックが引き起こされることが懸念されている^[3]。トリインフルエンザの自然宿主は、水鳥であることが知られているが、感染の流行においては家禽として飼育されているニワトリが果たす役割が大きい。したがって、ニワトリに対するインフルエンザウイルスの防疫、ウイルス感染機構の解明が急がれている。こうした背景のもとニワトリの *IFITM* 遺伝子についても研究がなされ、徐々にその機能が明らかにされつつある。これまでの研究においてニワトリ *IFITM* 遺伝子には、*IFITM1, 2, 3, 5*, および *10* が存在し、また *IFITM3* は、インフルエンザウイルスやラッサウイルスに対して抗ウイルス活性を持つことが報告されている^[3]。さらに当研究室における先行研究では、ニワトリ *IFITM3* が遺伝子工学分野において広く使用されているウイルスベクターである水泡性口内炎ウイルス (VSV: vesicular stomatitis virus) G タンパク質 (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^[4]。

ここで、哺乳類において *IFITM* は、ウイルス感染の阻害以外にも様々な働きが報告されている。例えば *IFITM1* は、細胞増殖の抑制や細胞接着に寄与する^{[5][6][7]}。*IFITM2* はアポトーシス誘導活性が知られており、また *IFITM3* は細胞増殖の阻害や、エンドサイトーシスによるトランスフェリンや EGF の取り込み抑

制などの活性が報告されている^{[8][9][10]}。加えて **IFITM3** は、マウス始原生殖細胞 (PGCs: primordial germ cells) の発生にも関与すると考えられている^{[11][12]}。さらに、**IFITM5** は骨芽細胞特異的な発現を示し、骨の石灰化に関与する可能性がある^{[13][14]}。これら **IFITM** ファミリー遺伝子はゲノム DNA 上でクラスター構造をなしており、例えばマウスにおいては7番染色体中の 70 kb という狭い領域に *Ifitm1*, 2, 3, 5, および 6 がコードされている。近年の報告において、この *Ifitm* 遺伝子をクラスターごとノックアウトした (*Ifitm1, 2, 3, 5, 6^{ΔΔ}*) マウスではレプチン経路の異常による加齢性の肥満が観察されている^[15]。このように **IFITM** 遺伝子はその多くがクラスターをなしているのに対して、**IFITM10** 遺伝子は、哺乳類およびニワトリの両者において上述したクラスターの外に単独でコードされている。一方で、**IFITM10** は脊椎動物間でのアミノ酸配列の相同性が **IFITM** ファミリーの中で一番高く、何らかの保存された機能を持つことが推測される^[16]。しかし、これまでに脊椎動物の **IFITM10** についてその生理的な機能は報告されていない。

本章は **IFITM** ファミリー遺伝子の中で解析が進んでいないこの **IFITM10** に焦点を当て解析を行った。ニワトリの各時期における **IFITM10** の発現解析では、**IFITM10** は胚時期の組織において比較的発現が高く、また PGC においても他の **IFITM** 遺伝子と比べて高い発現を示した。さらに、ウイルスベクターの感染実験より、**IFITM10** は **VSV-G** シュードタイプレンチウイルスベクターに対し感染阻害活性を持つ可能性が示された。

● 1.2 実験材料および手法

1.2.1 培養細胞

ニワトリ線維芽細胞である DF-1 細胞 (CRL-12203) は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入した。

HeLa 細胞、293FT 細胞、および DF-1 細胞は、10% の牛胎児血清 (FBS; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)、90 $\mu\text{g/ml}$ のペニシリン G、100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシン (P&S) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) high glucose 培地中で培養を行った。

1.2.2 ニワトリおよび種卵

実験に使用した白色レグホーン種のニワトリおよび種卵は、竹内農園 (奈良, 日本)、または日生研 (山梨, 日本) より購入した。また、白色レグホーン種の特定病原体非感染 (SPF: specific pathogen-free) ニワトリ組織は、稲吉勇仁氏 (日生研) より提供していただいた。ニワトリ胎児線維芽細胞 (CEFs: chicken embryonic fibroblasts) は、ニワトリ 10 日胚をトリプシンにより消化することで取得した。CEFs は、10% の FBS、P&S を含む DMEM high glucose 培地中で培養を行い、2-3 回継代の後実験に使用した。また、5.5 日胚、および成鳥の各組織は、解剖後リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-): phosphate-buffered saline (-)) により良く洗浄し、ハサミにより細かく切断した後、全 RNA を抽出した。全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の定める倫理規定に則り行った。

1.2.3 始原生殖細胞の分離

本研究においては、各発生ステージの胚より取得した SSEA-1 陽性細胞を PGCs として用いた。また、PGCs の分離は既報の手法を参考にした^{[17][18]}。簡潔に述べると、実験には、2.5 日胚 (Hamburger-Hamilton (HH) stages^[19] 13-16) の血中循環 PGCs (cPGCs: circulating PGCs)、3.5 日胚 (HH stages 18-19) の生殖隆起部由来 PGCs (grPGCs: genital ridge PGCs) および 5.5 日胚 (HH stages 27-28) の生

殖腺由来 PGCs (gPGCs: gonadal PGCs) を用いた。2.5 日胚の血液は、ガラスキャピラリーを胚血管に穿刺し、吸い上げることで回収した。また、3.5 日胚生殖隆起部および 5.5 日胚生殖腺は、解剖により該当する組織を採取した後、トリプシンにより細胞を分散した。回収した 2.5 日胚血液、3.5 日胚生殖隆起部細胞、および 5.5 日胚生殖腺細胞は、氷上、1% FBS/PBS (-) 中で、マウス抗 stage-specific embryonic antigen (SSEA) -1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と 1 時間反応させた後、PBS (-) により洗浄し、ついでフィコエリスリン (PE: phycoerythrin) 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と 1 時間反応させた。その後、セルソーター (EPICS ALTRA, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) もしくは FACSJazz, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて PGCs の回収を行った。

1.2.4 ニワトリ IFITM10 のクローニング

ニワトリ IFITM10 全長 (FL) および N 末端欠損 (Δ N) をコードする DNA 断片は、ニワトリ 3 日胚由来の cDNA を鋳型とし、KOD-Plus-Neo (東洋紡, 大阪, 日本) を用いて PCR により増幅した。

また、クローニングに用いたプライマーの配列は以下の NCBI のデータベース (cIFITM10: XM_00123445.3.) を基に設計し、それらの配列は以下の表 1.1 にまとめた。

増幅した DNA 断片は p3xFLAG-CMV14 ベクター (Sigma) にクローニングした。コントロールとして用いたヒト IFITM3 (hIFITM3) は、HeLa 細胞由来の cDNA を鋳型とし、同様に PCR により増幅を行い p3xFLAG-CMV14 ベクターにクローン化した。プライマーは以下の NCBI のデータベースを基に設計した (hIFITM3: NM_021034.2.)。

1.2.5 定量 PCR (qPCR) および定量-逆転写 PCR (qRT-PCR)

定量 PCR には、LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) もしくは LightCycler 96 (Roche Diagnostics) を用いた。サンプルからの全 RNA 抽出には ISOGENII (ニッポンジーン, 東京, 日本) を、cDNA の合成には、オリゴ dT を

プライマーとし、ReverTra Ace (東洋紡) をそれぞれ製造元のプロトコルに従い使用した。少量のサンプル (PGCs サンプル) からのサンプル調整には ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて全 RNA を精製した後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) により cDNA を合成した。また、定量 PCR 酵素としては Thunderbird qPCR Mix (東洋紡) を用いた。PCR の条件は以下にまとめた。

Pre-denature 95 °C for 60 s

Denature	95 °C for	3 s	} 40 cycles
Annealing	60 °C for	10 s	
Extension	72 °C for	30 s	

Melting 65 °C to 95 °C

cDNA の定量には、LightCycler 付属の解析ソフトウェアを使用し、制限酵素により鎖状化した各遺伝子 (*cIFITM2, 3, 10*, および *GAPDH*) を含むプラスミドから得たスタンダードカーブにより絶対定量を行った後、サンプルのロード量を *GAPDH* の発現量により補正した。

またニワトリ *IFITM10* は、データベース上で long バリエントおよびエキソン 2 が欠損した short バリエントという 2 つの転写バリエントの存在が示唆されていた。これらバリエントの発現解析には、両方のバリエントが増幅される CD225 ドメイン内に設計したプライマーセット、および long バリエント特異的なエキソン 2 内部に設計したプライマーセットを用いた。

また、これら PCR に使用したプライマーは以下の表 1.1 にまとめた。

1.2.6 IFN- α による *IFITM10* の誘導

CEF を 1.0×10^5 cells/well で 24 ウェルプレートに播種し、24 時間後に IFN- α (Abcam, Cambridge, UK) を 200 ng/ml の濃度で加えた。18 時間の培養の後、細胞を回収し定量 PCR による解析を行った。

1.2.7 IFITM10 安定発現 DF-1 細胞の取得

DF-1 細胞を 1.0×10^5 cells/well で 24 ウェルプレートに播種し、24 時間後に ScaI による制限酵素処理で鎖状化した p3x FLAG-CMV14 IFITM10 発現プラスミドを、LF2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてトランスフェクションした。48 時間後から G418 を 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、生存細胞をバルクの状態で安定発現株として使用した。また、コントロールとして空の p3x FLAG-CMV14 をトランスフェクションした安定発現株も同様にして取得した。

1.2.8 VSV-G シュードタイプ化レンチウイルスベクターの作製

293FT 細胞を 2×10^6 cells/dish でコラーゲンコートした 60 mm ディッシュに播種し、24 時間後にレンチウイルス生産プラスミドである pSicoR (CMV プロモーター駆動で eGFP を発現する) (3.8 $\mu\text{g}/\text{dish}$), ウイルスタンパク質生産プラスミド pLP1 (2.0 $\mu\text{g}/\text{dish}$) (Invitrogen), pLP2 (1.1 $\mu\text{g}/\text{dish}$) (Invitrogen), VSV-G タンパク質生産プラスミド pLP VSV-G (1.1 $\mu\text{g}/\text{dish}$) (Invitrogen) を、LF2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。72 時間後に培養上清を回収し、DISMIC 0.45 μm フィルター (ADVANTEC, 東京, 日本) により濾過することで、ウイルス溶液を得た。また、HeLa 細胞に段階希釈したウイルスを感染させ、フローサイトメトリーにより eGFP 陽性細胞の割合を測定することで、作製したウイルスの力価を決定した。

1.2.9 レンチウイルス感染効率の測定

DF-1 細胞を 5.0×10^4 cells/well で 24 ウェルプレートに播種し、24 時間後にレンチウイルスベクターを多重感染度 (MOI: multiplicity of infection) 0.1 で感染させた。9 時間後に細胞を PBS (-) で洗浄、ついでトリプシンにより処理し、細胞表面に吸着したウイルス粒子を取り除いてから回収した。ゲノム DNA およびウイルス cDNA の精製には QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた。ウイルスの感染効率の測定には、ウイルス由来 cDNA に含まれる eGFP 遺伝子のコピー数を指標として利用した。また、ウイルスを感染させた細胞数

の補正には、DF-1 細胞ゲノム DNA 由来の *GAPDH* コピー数を用いた。使用したプライマーは表 1.1 にまとめた。ゲノム DNA 由来の *GAPDH* を測定するプライマーは、mRNA 由来の *GAPDH* を測定するプライマーと同様の配列を用いているが、アンプリコンのサイズの違い (ゲノム: 182 bp, mRNA: 98bp) から判別することができる。

1.2.10 VSV-G による細胞融合実験

HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well で 24 ウェルプレートに播種し、24 時間後に 500 ng/well の p3x FLAG-CMV14 IFITMs 発現プラスミドを、Viafect (Promega) を用いてトランスフェクションした。翌日 300 ng/well の pLP VSV-G 発現プラスミドを同様にトランスフェクションした。24 時間の培養後、培地を取り除き Opti-MEM 培地 (Invitrogen) に溶かした 500 ng/ml Calcein-AM (同仁化学研究所、熊本、日本) を加え、37 °C で 15 分間反応させた。ついで細胞を PBS(-) で洗浄し、融合バッファー (10 mM HEPES, 10 mM MES, pH 5.5) を加え、1 分間反応させた。その後、融合バッファーを取り除き、500 μ l の DMEM を添加し、さらに 37 °C で 15 分間細胞融合をさせた。細胞融合を、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定することで停止し、融合の度合いを In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Japan, 東京, 日本) もしくは Biozero (キーエンス, 大阪, 日本) により観測した。また、細胞融合の度合いは、ImageJ ソフトウェアにより解析し、“% 融合面積 (% fusion area)” を“(融合した細胞の面積)/(全細胞の面積) x 100”として表した^[20]。

1.2.11 ウェスタンブロッティング

解析に用いた細胞は、SDS サンプルバッファー (60 mM Tris-HCl (pH6.8), 1% SDS, 10% グリセロール, 0.01% ブロモフェノールブルー, 0.01% キシレンシアノール, 5% β -メルカプトエタノール) により溶解し、100 °C で 10 分間熱変性させた後、急冷し、アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF メンブレン (GE Healthcare Japan) に転写した。各 IFITM-FLAG およびローディングコントロールに用いた β -ACTIN の検出には、1 次抗体としてマウス抗 FLAG 抗体 (和光純薬, 大阪, 日本)、またはマウス抗 β -ACTIN 抗体 (医学生物学研究所, 名古屋,

日本) を、2 次抗体としてヤギ抗マウス IgG-HRP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。また、発色基質としては、ECL plus (Perkin Elmer, 横浜, 日本) もしくは ImmunoStar LD (和光純薬) を用い、LAS-3000 mini (富士フイルムエンジニアリング, 東京, 日本) により解析した [21]。また、バンド強度の定量には、ImageJ ソフトウェアを用いた。

● 1.3 実験結果

1.3.1 ニワトリ *IFITM10* のクローニング

ニワトリ *IFITM10* をクローニングするにあたり、2 種類の転写バリエントが NCBI のデータベース上にコンピューター予測されていた(XM_001234445.3, および XM_001234445.2)。このうち、スプライシングバリエントだと予測される短いバリエントは、予測上のエクソン 2 (27 から 157 番ヌクレオチド) が欠損していた (図 1.1.A)。

本研究においては、この予測配列を基に *IFITM10* のクローニングを行った。10 個のそれぞれ異なったクローンを解析したが、本研究において取得できた *IFITM10* は短いバリエントのみであった。そこで、長いバリエントが、転写産物として存在しているかを確認するため、このバリエント特異的に増幅が行えるプライマーセットを、予測上のエクソン 2 内部に設計した。これを用いて、5.5 日胚および成鳥の各臓器より取得した cDNA について PCR を行ったが、これらのサンプルにおいて長いバリエントの存在は確認できなかった (図 1.1.B)。したがって、少なくともこれらの発生時期のニワトリにおいて、*IFITM10* の長いバリエントは転写されていないと考えられる。

また、今回取得できた *IFITM10* の短いバリエントの DNA 配列は、NCBI データベースの DNA 配列と完全に一致していた。本研究においては、この短いバリエントのみが *IFITM10* 遺伝子の転写産物として観察されたため、以降の実験ではこの短いバリエントをニワトリ *IFITM10* として使用することにした。

IFITM10 のアミノ酸配列は、他の *IFITM1, 2, 3* といったファミリータンパク質と比べて、種間での保存性が高いことが知られている^[16]。ヒトおよびマウス *IFITM10* とのアミノ酸相同性解析の結果、細胞膜内部ドメイン 1, 2 (IM1, 2) および保存された細胞内ループ構造 (CIL) を含む CD225 ドメイン (ニワトリにおける 126 アミノ酸残基 (AA)–187 AA) は、ヒトとニワトリ間でよく保存されていた (図 1.2.A)。一方で、マウスは CIL, IM2 がヒト、ニワトリ共に相同性が低く、独自の配列を持つように見えた。N 末端側については、CD225 ドメインに近い 80 AA–126 AA にかけては保存性が高く、一方ではじめの 35AA は、ヒトとマウスでは相同性が高いが、ニワトリとの相同性は低かった。さらにニワトリ *IFITM*

ファミリー遺伝子間でアミノ酸配列の比較をしてみると、CD225 ドメインは各遺伝子間で比較的相同性が高く、また他の種の *IFITM* において翻訳後修飾を受けることが知られている部位は、特によく保存されていた (図 1.2.B)。

1.3.2 ニワトリ *IFITM10* の発現解析

当研究室の先行研究において、ニワトリ *IFITM1*, 2, 3, および 5 の発現解析が報告されており、中でも *IFITM3* が胚および成鳥の臓器において最も高いレベルで発現していることが確認されている^[4]。

本研究ではこれを踏まえ、ニワトリ *IFITM10* の発現解析を行った。成鳥の各臓器から合成した cDNA を定量 PCR により解析した結果、肝臓、精巣を除く、解析したほぼすべての臓器で *IFITM10* の発現が確認された (図 1.3.)。特に、輸卵管、卵巣、脳において比較的高い *IFITM10* の発現が見られた。一方で、これらの発現量は、成鳥において *IFITM3* の発現が最も高い肺における発現量 (1.12 ± 0.32 vs. *GAPDH*) と比べると低い値であった^[4]。また、SPF ニワトリの臓器における *IFITM10* の発現も、本研究室で飼育しているニワトリにおける発現量とほとんど同じであった (データ未記載)。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る。

また、5.5 日胚における *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 (図 1.4.)。ここで、成鳥で最もメジャーな *IFITM* である *IFITM3* の発現は、5.5 日胚においては低く、*IFITM10* と比べて同程度の発現量であった^[4]。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 *IFITM10* の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 (図 1.5.)。また、PGCs における *IFITM3* の発現についても同様の傾向が報告されている^[4]。

1.3.3 CEFs においてニワトリ *IFITM10* は IFN- α 応答性を示さない

ウイルス感染により細胞から誘導される IFN- α は、*IFITM* ファミリー遺伝子を含む種々の抗ウイルス活性を示す遺伝子の転写を活性化することで、細胞にウイルス抵抗性を与えることが知られている。ここでヒトには、IFN 刺激により *IFITM1, 2, 3* が強く誘導されることが報告されている^[114]。また、マウスにおいては IFN 刺激により *Ifitm1, 2* が弱く誘導され、一方で *Ifitm3* は強く誘導されたとの報告がある^[22]。

ニワトリ胚性線維芽細胞である CEFs において、IFN 刺激を行わない基底状態における *IFITM10* の発現は非常に低く、5.5 日胚の生殖腺と比べるとおよそ 2% 程度の発現しか観察されなかった (図 1.6.A)。また、IFN- α 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 (図 1.6.B)。一方で、既報と同様に CEFs で最も発現量の高い *IFITM* 遺伝子である *IFITM2* の発現は、IFN- α 刺激により約 25 倍上昇した^[4]。

これらの結果からニワトリにおいて *IFITM10* は、IFN- α 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。

IFITM ファミリー遺伝子の IFN 応答性についてさらに検討するべく、プロモーター上の IFN 応答配列 (ISRE: IFN-stimulated response element) の部位予測をコンピューター上で行った(図 1.6.C)。その結果、IFN に強い応答性を示す *IFITM2, 3* については、遺伝子上流 -500 bp 以内のプロモーター上に複数個の予測 ISRE が存在することが示された。また *IFITM10* プロモーター上にも、遺伝子上流 -400 bp くらいの位置に予測 ISRE が 1 つ存在した。一方でプロモーター上に予測 ISRE を持たない *IFITM1, 5* は、IFN 刺激により発現が中程度に誘導されることが報告されている^[4]。したがって、IFN- α 刺激による *IFITM1, 5* の発現誘導は、プロモーター部位の ISRE 以外のメカニズムが関与している可能性がある。可能性のひとつとして、*IFITM1, 2, 3, 5* は、各遺伝子がすぐ近傍に並列するクラスター構造をなしているため、これら遺伝子全体をまとめて制御する何らかのメカニズムがあると推測される。一方で、*IFITM10* はこれらの遺伝子とは同一の染色体上に

あるものの、10 Mb 以上離れた位置に存在するため、他の *IFITMs* とは独立した制御を受けるのかもしれない。

1.3.4 DF-1 細胞においてニワトリ IFITM10 は 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

哺乳類の *IFITM3* は後期エンドソーム内において、また *IFITM1* は初期エンドソーム内において、種々のウイルスの感染を阻害することが知られている^[1]。本研究の先行研究では、DF-1 細胞においてニワトリ *IFITM3* は、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がわかっている^[4]。さらに、ニワトリ *IFITM3* は A 型インフルエンザウイルスや、ラッサウイルスの感染を阻害することも報告されている^[3]。これらの結果を基に本研究においては、*IFITM10* が 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かを検討した。

実験を行うにあたり、ニワトリ DF-1 細胞は *IFITM10* の発現が非常に低い ($< 1 \times 10^{-5}$ vs. *GAPDH*) ため、*IFITM10* 安定発現株を作製し実験に用いることにした。また、作製した安定発現株は、*IFITM10* の発現量が生理条件の cPGC における *IFITM10* の発現量と同レベルのものを使用した (図 1.7.A)。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 (図 1.7.B)。この結果は、*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。

1.3.5 ニワトリ IFITM10 は VSV-G タンパク質による膜融合を阻害する

インフルエンザウイルスのヘマグルチニンや、水泡性口内炎ウイルスの VSV-G などのウイルス膜タンパク質は、脂質二重膜で構成されたウイルスエンベロープと宿主細胞の細胞膜やエンドソームとを膜融合させる活性を有している。また、これらのタンパク質を細胞に強制発現させた場合、細胞間において膜融合が引き起こされることが知られている。ここで *IFITM* タンパク質には、このようなウイルスの膜タンパク質による細胞融合を阻害する活性があること

が報告されている^[23]。前項の結果から IFITM10 が 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が示唆された。そこで、IFITM10 によるウイルス感染の阻害は、VSV-G タンパク質による膜融合の阻害によるものなのかを検証するため、合胞体形成アッセイ (syncytia formation assay) を試みた。

合胞体形成アッセイでは、C 末端に FLAG タグを融合した cIFITM10 および膜融合阻害効果を持つことが知られている hIFITM3 をコントロールとして HeLa 細胞に強制発現させた。各 IFITM の発現をウエスタンブロットイングにより確認したところ、cIFITM10、hIFITM3 とともに予測分子量より高い位置にメジャーバンドが観察された (cIFITM10: 予測分子量 24 kDa, 実測分子量 27-28 kDa および hIFITM10: 予測分子量 17.5 kD, 実測分子量 22-23 kDa) (図 1.8.A)。IFITM タンパク質はリン酸化、パルミトイル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが報告されていることから、観察された分子量の増加の原因はこれらの翻訳後修飾による可能性が考えられた^[24]。ついでこれらの細胞に VSV-G タンパク質を強制発現させた。その後、細胞を酸性バッファーに晒すことで VSV-G タンパク質による膜融合を誘導した^{[25][26][27]}。その結果、cIFITM10 および hIFITM3 を強制発現させた細胞の両方において、膜融合の阻害が確認された (図 1.8.B,C)。

ここで、IFITM 遺伝子間において CD225 ドメインは比較的保存性が高く、一方でドメイン構造を持たない N 末端側は相同性が低い (図 1.2.B)。そこで、N 末端部位が VSV-G による膜融合を阻害するために重要であるかの評価を試みた。N 末端 105 AA を欠損した IFITM10 (Δ N) を発現するプラスミドベクターを作製し、同様にして VSV-G による合胞体形成アッセイを行った。IFITM10 (Δ N) を強制発現させた細胞は、IFITM10 (FL) 発現細胞と同様に強く膜融合を阻害した。

これらの結果より、cIFITM10 は hIFITM3 と同様に VSV-G に対する膜融合阻害活性を持っていることが示された。また、その活性には、cIFITM10 タンパク質の N 末端は必須ではなく、おそらく CD225 ドメインが重要であることが示唆された。

● 1.4 考察

これまでに各 IFITM タンパク質に関して、様々な機能が報告されてきた。例えば、IFITM1, 2, および 3 は、抗ウイルス活性を持つ細胞内タンパク質として広く知られている。また、IFITM5 は主に骨芽細胞で発現しており、骨の石灰化に関与していると考えられている^{[1][2][13][14]}。その一方で、IFITM10 の生理活性については未知のままであった。本研究では、IFITM10 がもつ分子生物学的な機能として、VEV-G シュードタイプレンチウイルスベクターの感染阻害、および VSV-G タンパク質による膜融合の阻害というふたつのはたらきを初めて明らかにした (図 1.7-8.)。また、これらの実験結果およびに他の IFITM タンパク質によるウイルス感染阻害機構から推測するに、IFITM10 はウイルス膜タンパク質を介したエンドソームとウイルスエンベロープの膜融合を阻害することで、ウイルスの感染を阻害していると考えられる。一方で IFITM10 は、成鳥において IFITM2, 3 といった他の IFITM ファミリー遺伝子に比べ発現が低く (図 1.3.)、また CEFs を用いた実験において IFN- α 応答性を示さなかった (図 1.6.A)。したがって、成鳥において IFITM10 が意味のある抗ウイルス活性を示すかどうかは疑問である。一方で、5.5 日胚や PGCs において、IFITM10 の発現レベルは他の IFITM 遺伝子と同等であった (図 1.4-5.)。ニワトリにおいて免疫応答の未発達な胚時期では、主に母鶏由来の IgY が種々の感染に対する防御機構としてはたらいっているが、これに加えて IFITM10 がウイルスに対する自然免疫として寄与する可能性は考えられる。さらに、マウスにおいて *Ifim5* は主に骨芽細胞特異的に発現しているが、*Ifim5* ノックアウトマウスは呼吸器系疾患の表現系が観察されることから、必ずしも多量の IFITM が、生理的な機能を発揮するために必要であるわけではないのかもしれない^[14]。いずれにせよ、生理条件下において IFITM10 が抗ウイルス活性を十分に発揮しているかについては、いまだ議論の余地があると考えられる。

胚性の組織においては、PGCs で比較的高い IFITM10 の発現が観察され、その発現量は発生が進むにつれて次第に減少していった (図 1.5.)。また、PGCs における同様の発現パターンは、IFITM3 についても観察されている^[4]。マウスの胚において *Ifim3* は、PGC 特異的な発現を示すことから PGC のマーカータンパク質として使用されている^[12]。一方で *Ifim* 遺伝子座のノックアウトマウス (*Ifim1*,

2, 3, 5, 6^{△△}) において、PGC や生殖細胞に対する目立った表現系の変化は観察されておらず、その生理的機能はいまだ不明である^[28]。また、マウスにおいても *Ifitm10* は他の *Ifitm* 遺伝子とは離れた場所に位置しており、現在までノックアウトマウスをもちいた解析はなされていない。したがって、ニワトリにおいて **IFITM10** が PGC の発生に関与しているのかということは、今後の課題として興味深い。

本章では、脊椎動物を通して初めて **IFITM10** の分子生物学的機能を明らかにした。また上述した結果は、**IFITM** ファミリー遺伝子が共通して潜在的に抗ウイルス活性を持つこと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であると考えられる。

なお本章は以下の論文に発表したものであり、また図表は同論文より引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 May ;81(5):914-921.

● 1.5 参考文献

- [1] J.M. Perreira, C.R. Chin, E.M. Feeley, et al., IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses, *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 4937–55.
- [2] C.C. Bailey, G.C. Zhong, I.C. Huang, et al., IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense, *Annu. Rev. Virol.* 1 (2014) 261–83.
- [3] S.E. Smith, M.S. Gibson, R.S. Wash, et al., Chicken interferoninducible transmembrane protein 3 restricts influenza viruses andlyssaviruses *in vitro*, *J. Virol.* 87 (2013) 12957–66.
- [4] S. Kidani, Y. Okuzaki, H. Kaneoka, et al., Expression of interferon-inducible transmembrane proteins in the chicken and possible role in prevention of viral infections, *Cytotechnology* 65 (2013) 985-92.
- [5] S.S. Evans, D.B. Lee, T. Han, et al., Monoclonal antibody to the interferon-inducible protein Leu-13 triggers aggregation and inhibits proliferation of leukemic B cells, *Blood* 76 (1990) 2583–93.
- [6] S.S. Evans, R.P. Collea, J.A. Leasure, et al., IFN-alpha induces homotypic adhesion and Leu-13 expression in human B lymphoid cells, *J. Immunol.* 150 (1993) 736–47.
- [7] G.A. Deblandre, O.P. Marinx, S.S. Evans, et al., Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23860–6.
- [8] R. Brem, K. Oraszlan-Szovik, S. Foser, et al., Inhibition of proliferation by 1-8U in interferon-alpha-responsive and non-responsive cell lines, *Cell Mol. Life Sci.* 260 (2003) 1235–48.
- [9] V. Daniel-Carmi, E. Makovitzki-Avraham, E.M. Reuven, et al., The human 1-8D gene (IFITM2) is a novel p53 independent proapoptotic gene, *Int. J. Cancer* 125 (2009) 2810–9.
- [10] D. Ibi, T. Nagai, A. Nakajima, et al., Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice, *Glia* 61 (2013) 679–93.
- [11] S.S. Tanaka, Y.L. Yamaguchi, B. Tsoi, et al., IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion, *Dev. Cell* 9 (2005) 745–56.

- [12] M. Saitou, S. C. Barton, M.A. Surani, A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice, *Nature* 418 (2002) 293–300.
- [13] P. Moffatt, M.H. Gaumond, P. Salois, et al., Bril: a novel bonespecific modulator of mineralization, *J. Bone Miner Res.* 23 (2008) 1497–1508.
- [14] N. Hanagata, X. Li, H. Morita, et al., Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice, *J. Bone Miner. Metab.* 29 (2011) 279–90.
- [15] Y.S. Wee, J.J. Weis, L.C. Gahring, et al., Age-related onset of obesity corresponds with metabolic dysregulation and altered microglia morphology in mice deficient for ifitm proteins, *PLoS One* 10 (2015) e0123218.
- [16] D. Hickford, S. Frankenberg, G. Shaw, et al., Evolution of vertebrate interferon inducible transmembrane proteins, *BMC Genomics* 13 (2012) 155.
- [17] M. Motono, T. Ohashi, K. Nishijima, et al., Analysis of chicken primordial germ cells, *Cytotechnology.* 57 (2008) 199–205.
- [18] M. Motono, Y. Yamada, Y. Hattori, et al., Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector, *J. Biosci. Bioeng.* 109 (2010) 315–21.
- [19] V. Hamburger, H.L. Hamilton, A series of normal stages in the development of the chick embryo, *J. Morphol.* 88 (1951) 49–92.
- [20] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 671–5.
- [21] M. Ando, W. Tu, K. Nishijima, et al., Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2008) 878–83.
- [22] C.C. Bailey, I.C. Huang, C. Kam, et al., Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002909.
- [23] K. Li, R.M. Markosyan, Y.M. Zheng, et al., IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003124.
- [24] J.S. Yount, R.A. Karssemeijer, H.C. Hang, S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 19631–41.

- [25] B.L. Fredericksen, M.A. Whitt, Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity, *J. Virol.* 69 (1995) 1435–43.
- [26] M.A. Whitt, M.A.P. Zagouras, B. Crise, et al., A fusion-defective mutant of the vesicular stomatitis virus glycoprotein, *J. Virol.* 64 (1990) 4907–4913.
- [27] L. Zhang, H.P. Ghosh. Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G, *J. Virol.* 68 (1994) 2186–2193.
- [28] U.C. Lange, D.J. Adams, C. Lee, et al., Normal germ line establishment in mice carrying a deletion of the ifitm/fragilis gene family cluster, *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) 4688–96.

表1.1. プライマーリスト

クローニングに使用したプライマー		
<i>cIFITM10</i> FL	Dir	CATA <u>AAGCTT</u> ACCATGGACGGACGGACAGGCAGC
<i>cIFITM10</i> ΔN	Dir	AAAA <u>AGCTT</u> ACCATGAACCCACCACCGTCATCGAGATCT
<i>cIFITM10</i> Rev	Rev	CATGA <u>ATTCT</u> CGTAATCGGTGAGGGGGTACCGCAGG
<i>hIFITM3</i>	Dir	AAAGA <u>ATTC</u> ACCATGAATCACACTGTCCAAACCC
	Rev	AAAGGATCCTCCATAGGCCTGGAAGATCAG

下線は制限酵素認識部位を示している

この表は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

表1.1. プライマーリスト

定量PCRおよび逆転写PCRに使用したプライマー		
<i>cIFITM2</i>	Dir	AGGTGAGCATCCCGCTGCAC
	Rev	ACCGCCGAGCACCTTCCAGG
<i>cIFITM3</i>	Dir	TCACGGCCCATCTGATCAAC
	Rev	GGGTCCAATGAATTCGGGGT
<i>cIFITM10</i>	Dir	ATTGCTGAAAGTCCGGGAT
	Rev	GGGCTGAGCTGGTGATGTTA
<i>cIFITM10</i> (long バリエント専用)	Dir	GACAACCAGAGGGACAGCC
	Rev	ATCCTGCGTCCTCTCCGT
<i>GAPDH</i>	Dir	GGGCACGCCATCACTATC
	Rev	GTGAAGACACCAGTGGACTCC

この表は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

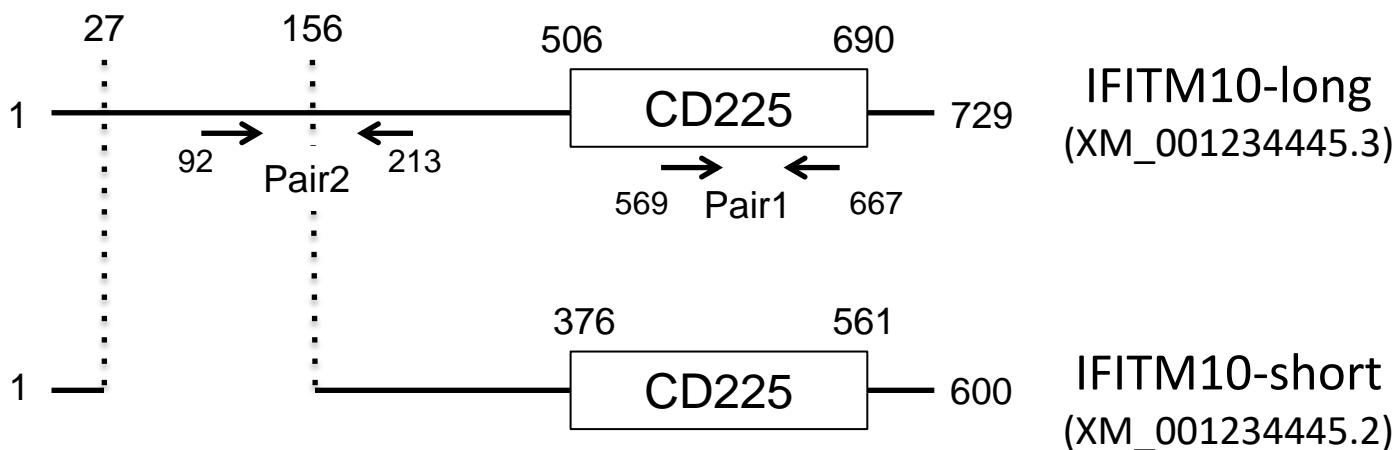
A

図1.1. IFITM10転写バリエーションの発現解析

A: *IFITM10* 各バリエーションの構造模式図および、逆転写PCR解析に用いたプライマーセットの位置を示した。数字はヌクレオチド残基の番号を示している。Pair1: 両方のバリエーションを増幅するプライマー。Pair2: longバリエーション特異的なプライマー

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
 Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

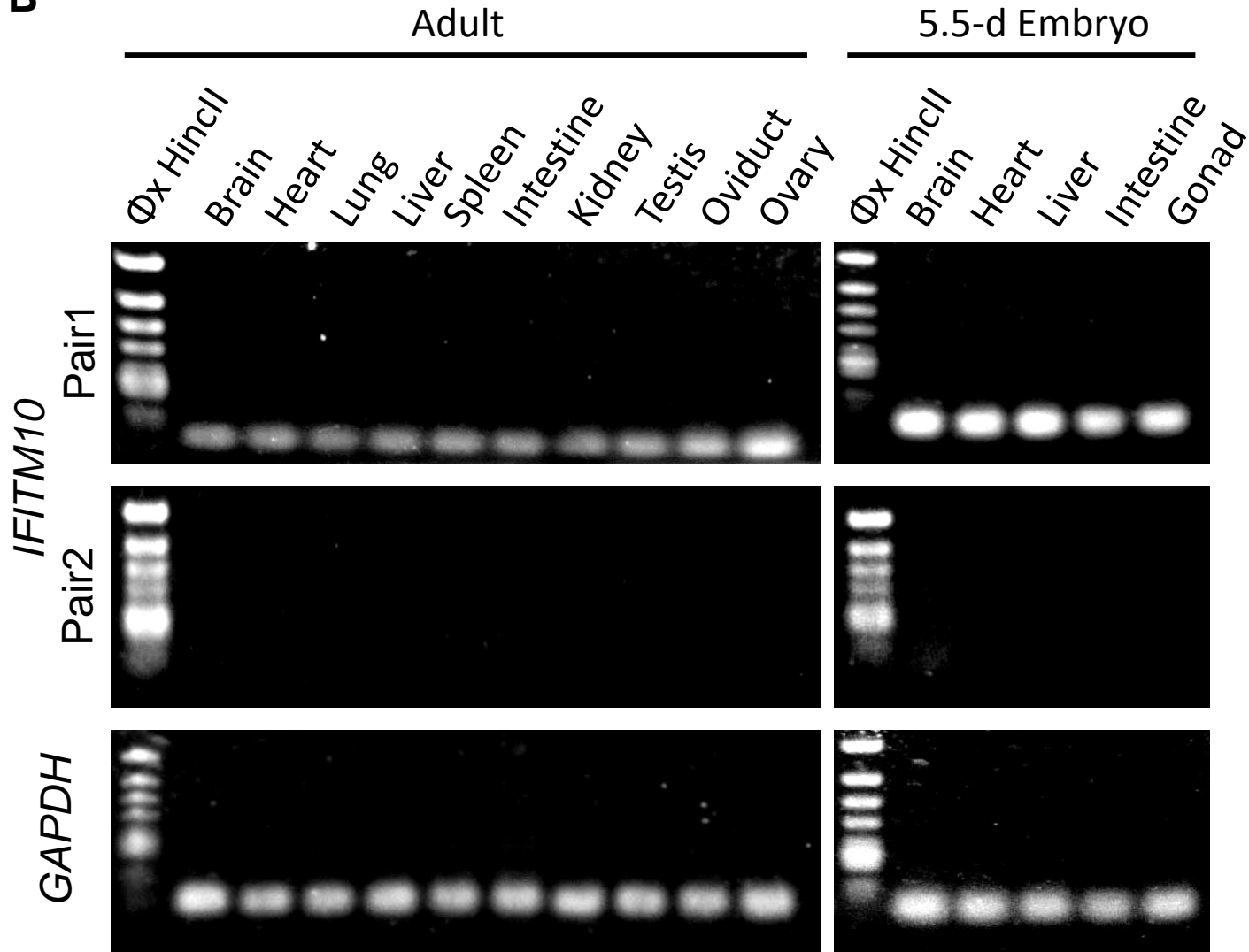
B

図1.1. IFITM10転写バリエーションの発現解析

B: *IFITM10* 各バリエーションの逆転写PCR解析。PCRにより、目的のDNA断片を40サイクルの増幅した後、アガロースゲル電気泳動により増幅の確認を行った。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
 Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

A

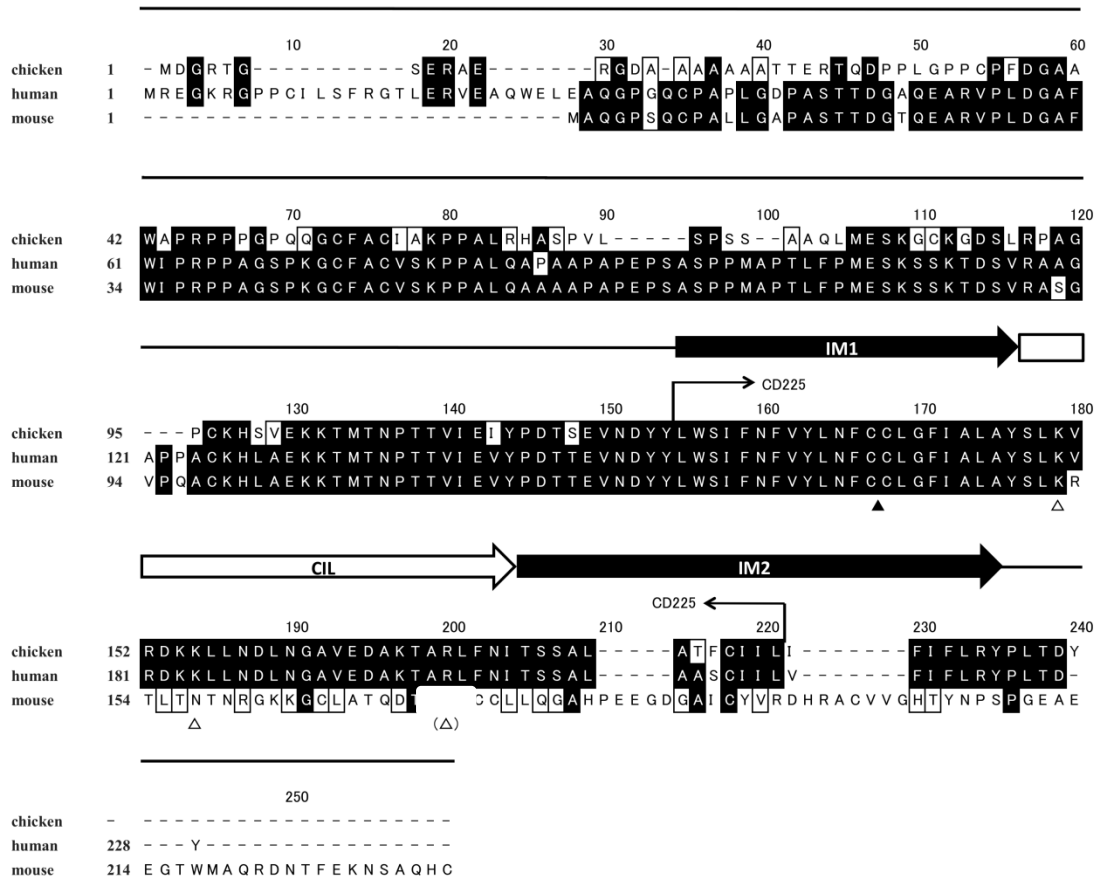


図1.2. IFITM10のアミノ酸配列解析

A: 本章でクローン化したニワトリIFITM10のアミノ酸配列の相同性を、NCBIデータベース上のマウスおよびヒトのIFITM10タンパク質のアミノ酸配列と比較した。また、解析には以下のデータベース上の配列を用いた。(ヒトIFITM10): NP_001164291.2, およびマウスIFITM10: NP_001334470.1)

IM: 膜内部ドメイン CIL: 保存された細胞内ループ部位

また、アミノ酸配列のアライメントには以下のソフトウェアを用いた。
Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

B

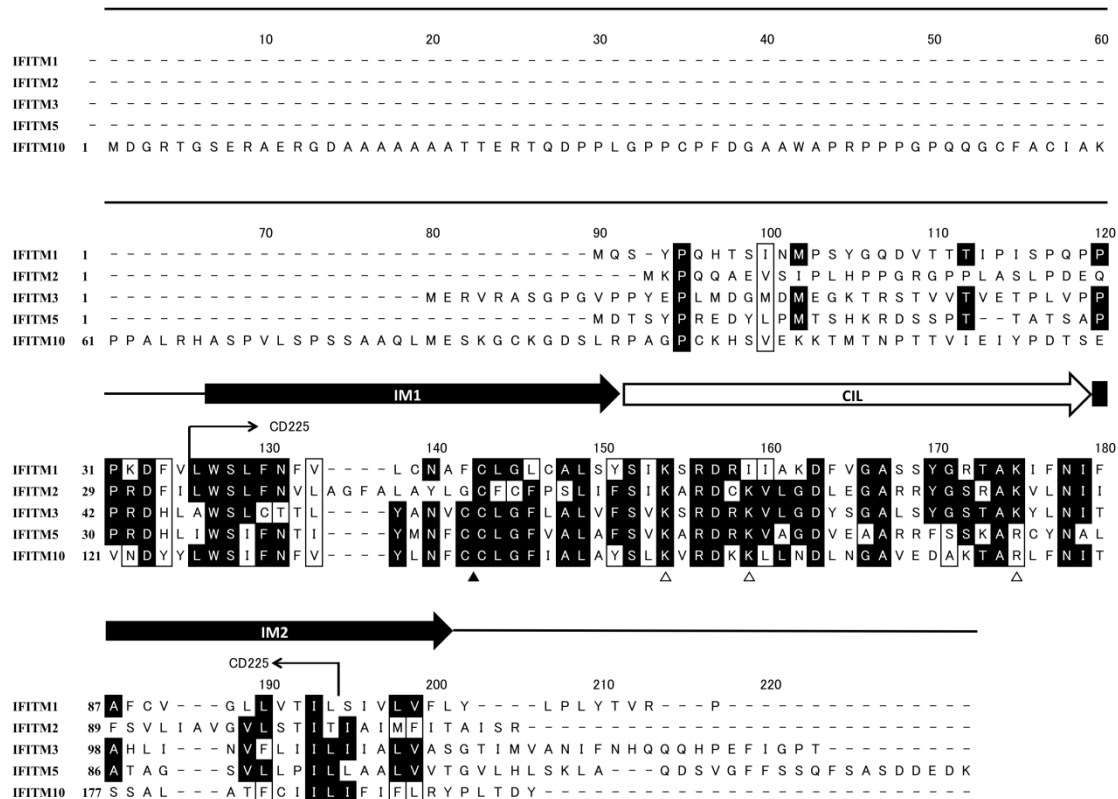


図1.2. IFITM10のアミノ酸配列解析

B:本章でクローン化したニワトリIFITM10と他のニワトリIFITMタンパク質とのアミノ酸配列を比較した。

予測上のユビキチン化部位 (K) およびパルミトイル化部位 (C)は、それぞれ△および▲で示した。IM: 膜内部ドメイン CIL: 保存された細胞内ループ部位

また、アミノ酸配列のアライメントには以下のソフトウェアを用いた。
Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

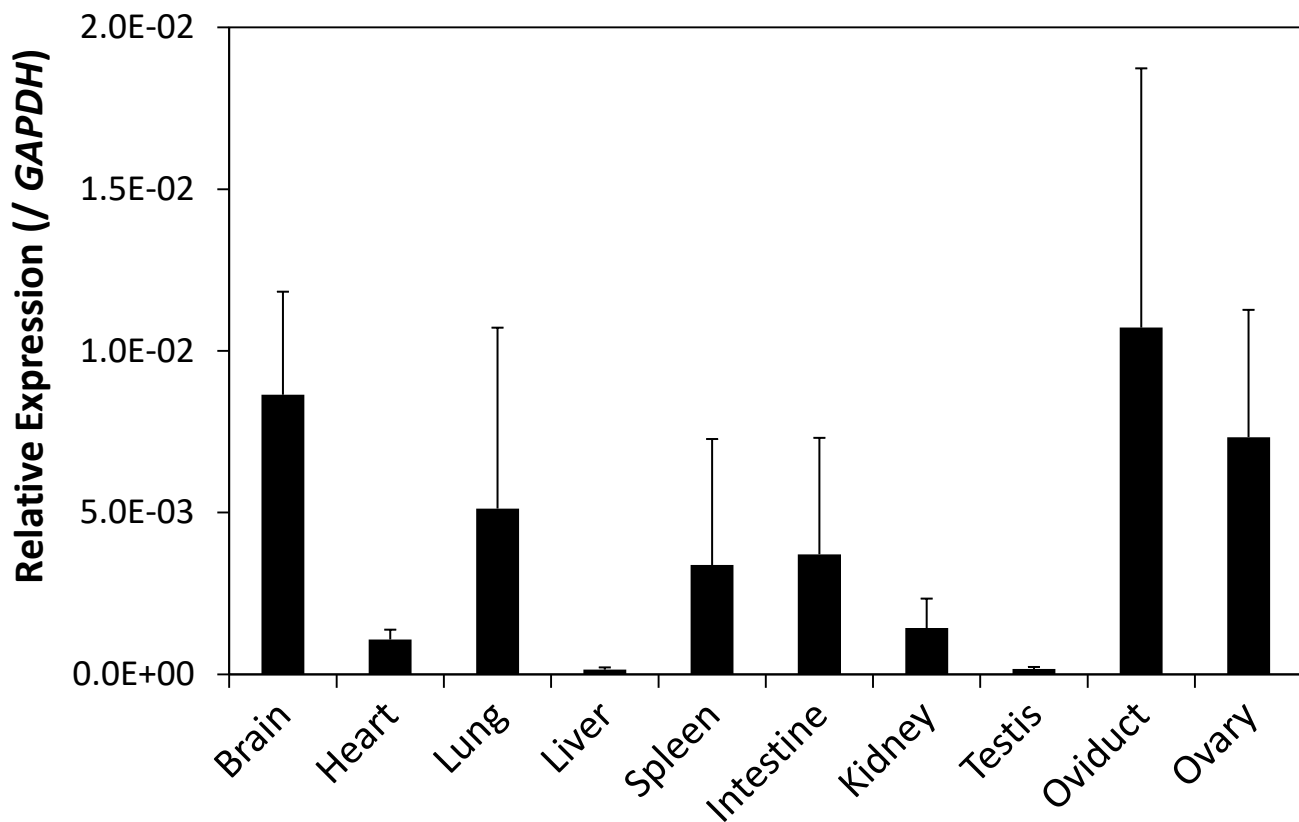


図1.3. 成鳥におけるニワトリIFITM10の発現解析

性成熟したニワトリの各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。*IFITM10*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。データは精巣 (testis), 輸卵管 (oviduct), 卵巣 (ovary) については3個体の、それ以外の臓器は6個体 (雌雄それぞれ3個体ずつ) の異なったニワトリの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

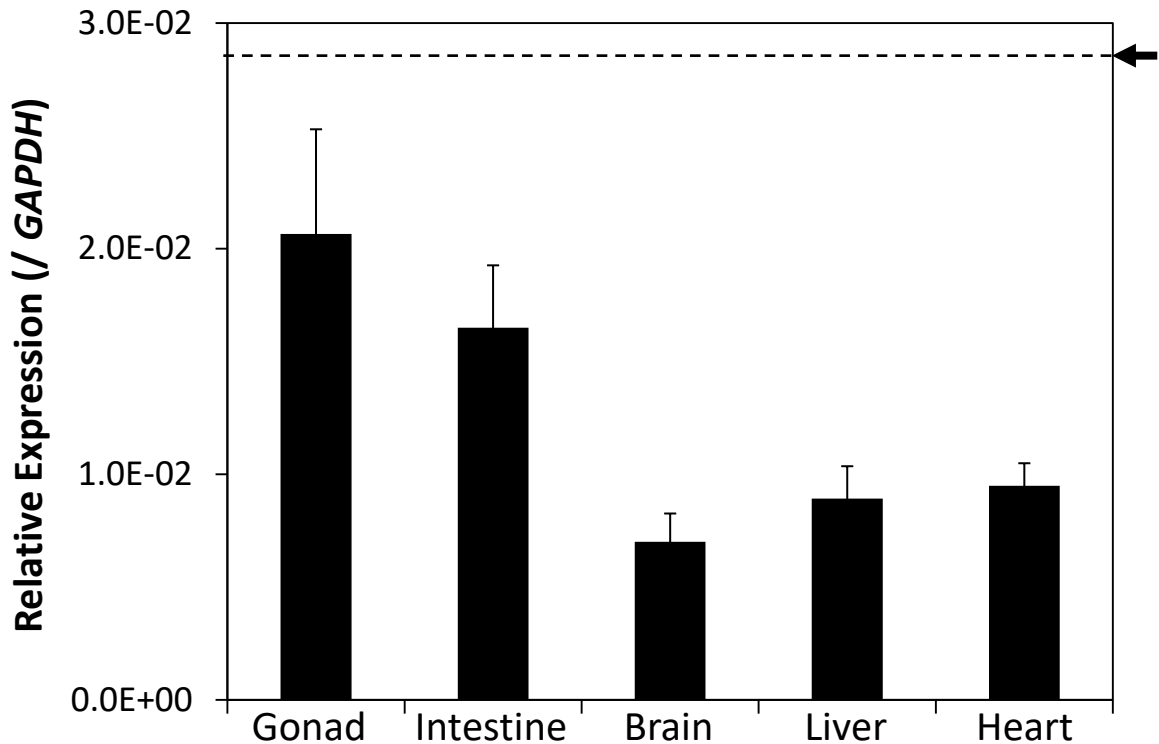


図1.4. 5.5日胚におけるニワトリIFITM10の発現解析

5.5日胚ニワトリの各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。*IFITM10*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは3胚の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。矢印は5.5日胚における生殖腺の*IFITM3*の発現量を示している($2.89 \pm 0.11 \times 10^{-2}$ vs. *GAPDH*)

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

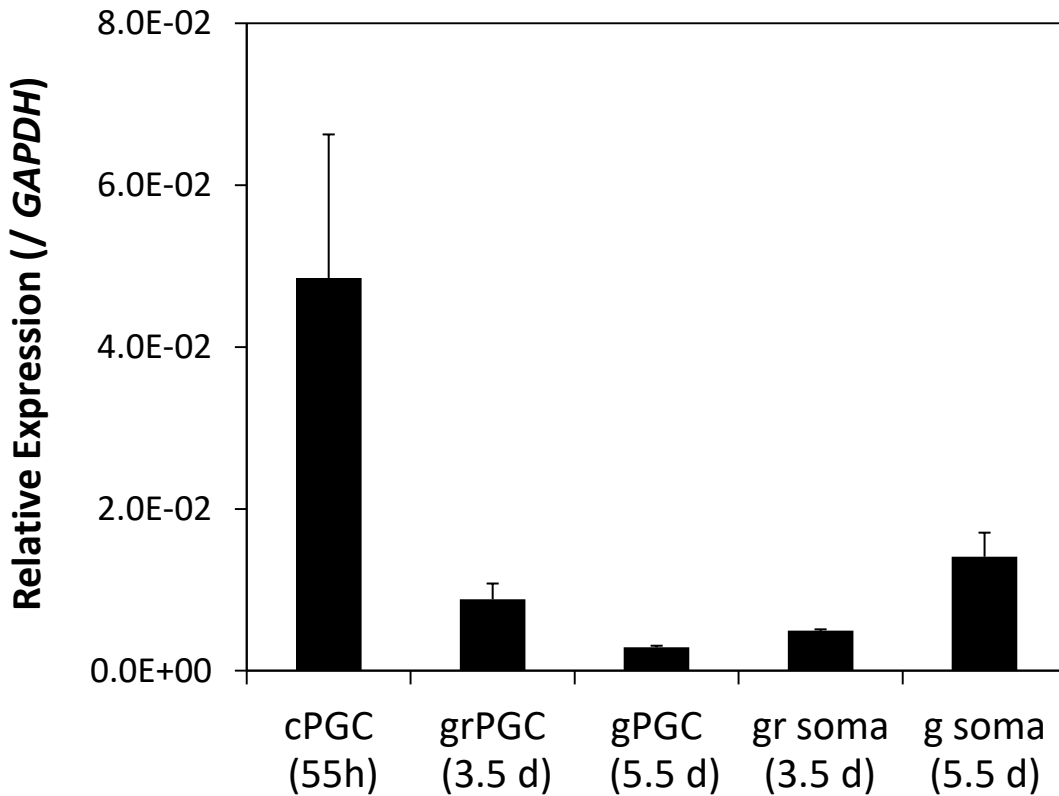


図1.5. PGCにおけるニフトリIFITM10の発現解析

55時間胚の血液、3.5日胚の生殖隆起部、および5.5日胚の生殖腺からフローサイトメトリーを用いて、SSEA-1陽性細胞として分離したPGCs(それぞれcPGC、grPGC、gPGC)より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。また、生殖隆起部および生殖腺の体細胞としてSSEA-1陰性細胞も同時に回収し(それぞれgr soma、およびg soma)、同様にして定量PCRを行った。IFITM10の発現は、GAPDHの発現に対する相対発現量として示した。また、データは3つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

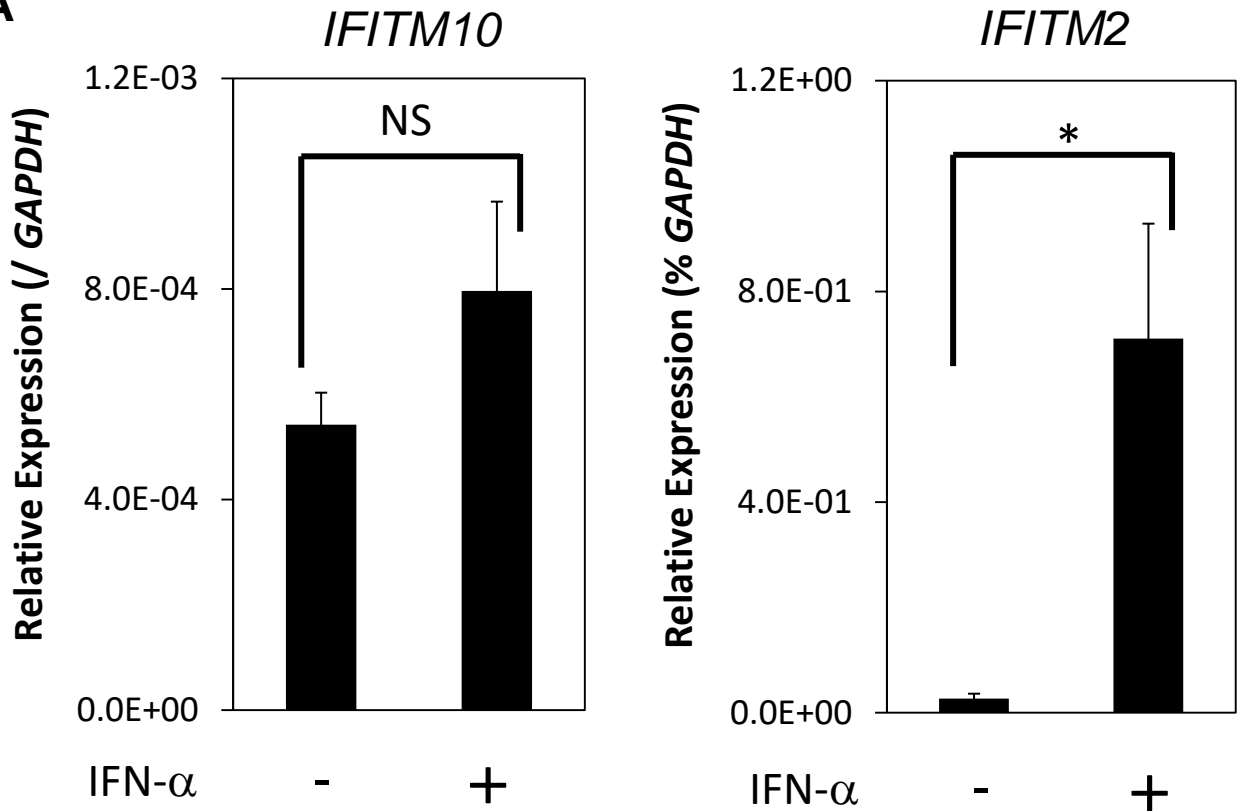
A

図1.6. CEFにおいてIFITM10はIFN- α 応答性を示さない

A: IFN- α により刺激を行ったCEFより精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。*IFITM10*、および2の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは3つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。*は、Student's *t*-testにおいて有意な差が認められることを示している($p < 0.05$)。NS, 有意な差は認められない。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

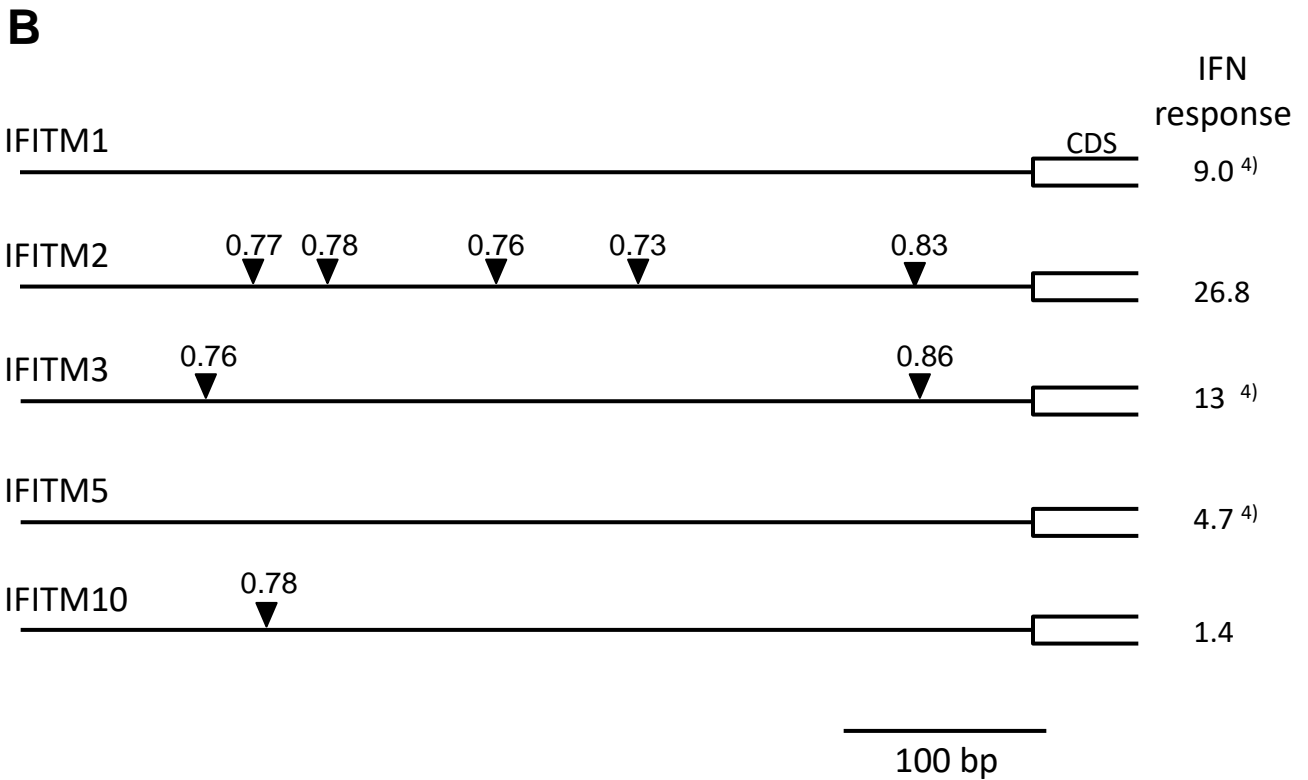


図1.6. CEFにおいてIFITM10はIFN- α 応答性を示さない

B: TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp/>)を用いて転写因子結合部位予測を行い、予測されたISRE部位をスコアとともに示した。また、本章における結果、および先行研究⁴⁾において示された各IFITM遺伝子のIFN- α 応答性を、図の右側に示した。CDS: アミノ酸コード領域

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

A

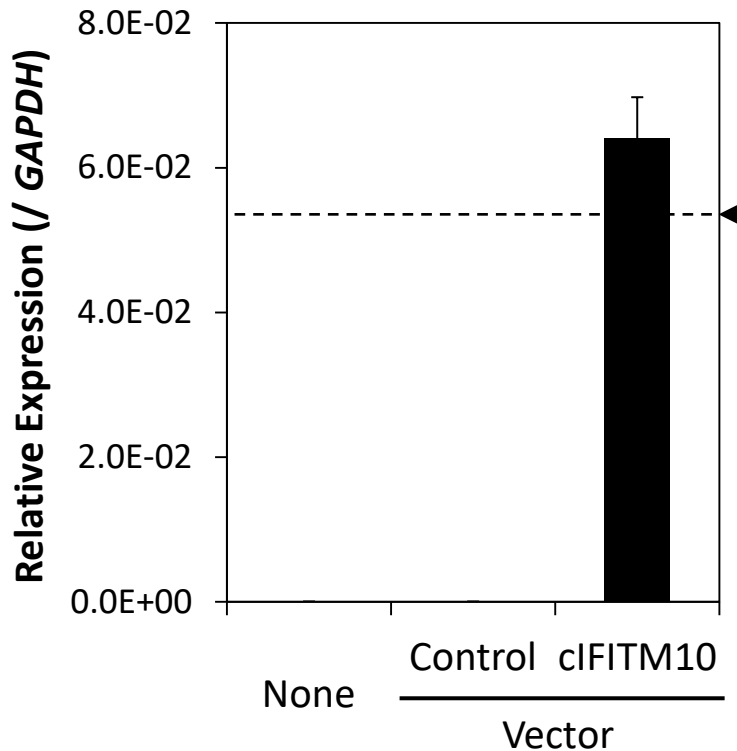


図1.7. IFITM10はVSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターの感染を阻害する

A: 樹立したIFITM10安定発現DF-1細胞、コントロールベクターの安定発現株、および遺伝子導入操作を行っていないDF-1細胞より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。IFITM10の発現は、GAPDHの発現に対する相対発現量として示した。また、データは3つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。矢頭はcPGCにおけるIFITM10の発現量を示している

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

B

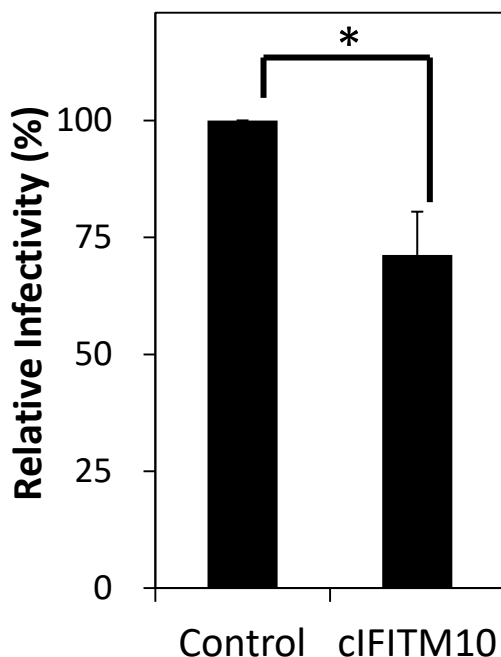


図1.7. IFITM10はVSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターの感染を阻害する

B: VSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターの感染効率を示した。データはコントロールベクターの安定発現株における感染効率を100%とした相対感染効率として、6つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。*は、Student's *t*-test において有意な差が認められることを示している($p < 0.05$)。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

A

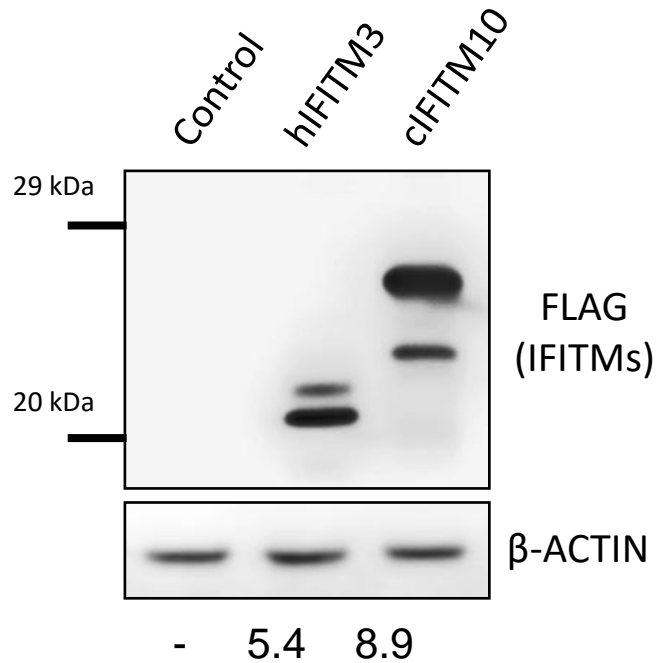


図1.8. IFITM10はVSV-Gによる膜融合を阻害する

A: 各IFITM-FLAGの発現量を、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。各IFITM-FLAGのメジャーバンドの発現量は、ローディングコントロールに用いた β -ACTINの発現量で補正することでその強度を定量した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

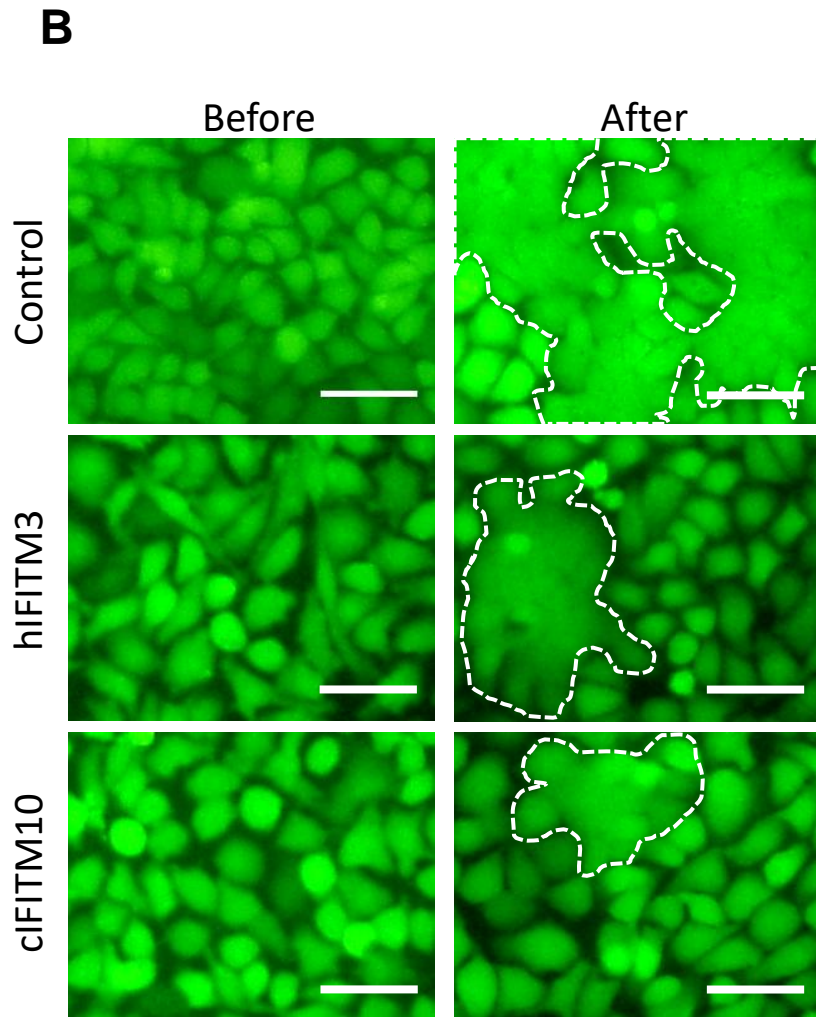


図1.8. IFITM10はVSV-Gによる膜融合を阻害する

B: VSV-Gによる膜融合の誘導前後における細胞の形態を示した。破線は融合した細胞と融合していない細胞との境界を示している。バー: 50 μm

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

C

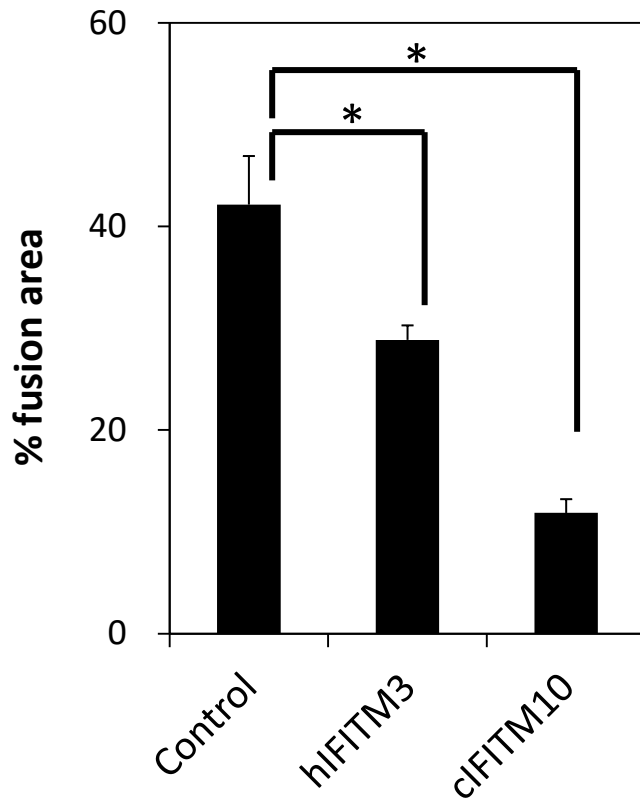


図1.8. IFITM10はVSV-Gによる膜融合を阻害する

C: VSV-Gによる膜融合の度合いを画像解析により定量した。また、データは3連のサンプルにおける平均値を相対誤差とともに示した。*は、Student's *t*-test において有意な差が認められることを示している($p < 0.05$)。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

A

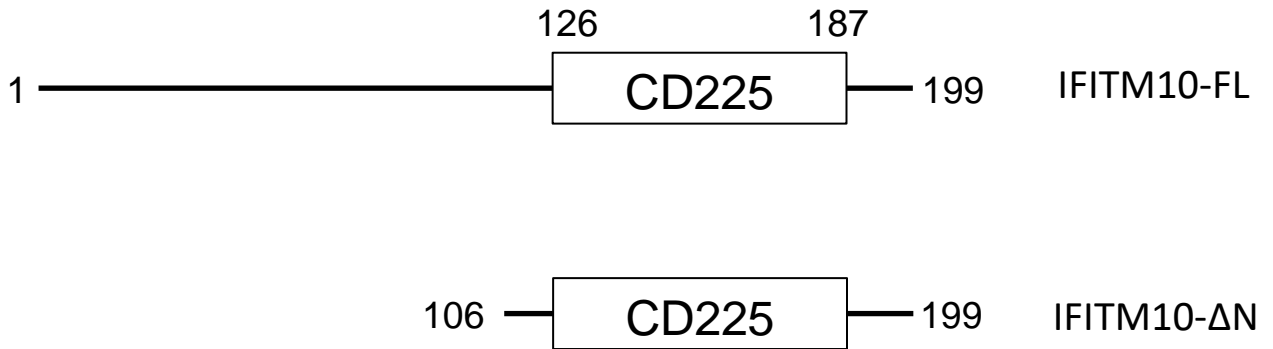


図1.9. IFITM10がVSV-Gによる膜融合を阻害するために、
N末端領域は必要でない

A: N末端欠損IFITM10の構造模式図。数字はアミノ酸残基の番号を示している。
FL: IFITM10全長 ΔN: IFITM10 N末端欠損

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

B

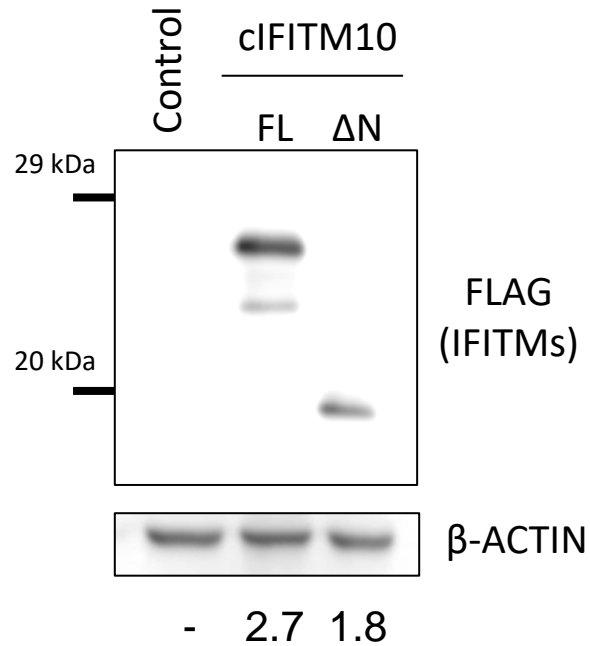


図1.9. IFITM10がVSV-Gによる膜融合を阻害するために、N末端領域は必要でない

B: 各IFITM-FLAGの発現量を、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。各IFITM-FLAGのメジャーバンドの発現量は、ローディングコントロールに用いたβ-ACTINの発現量で補正することでその強度を定量した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

C

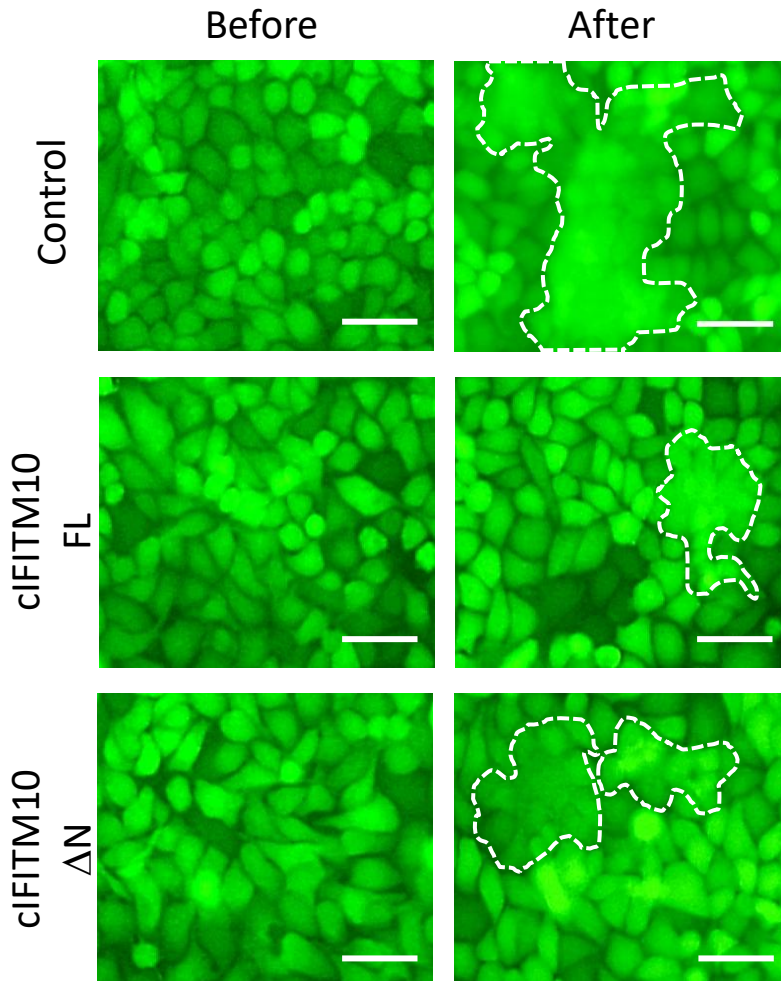


図1.9. IFITM10がVSV-Gによる膜融合を阻害するために、N末端領域は必要でない

C: VSV-Gによる膜融合の誘導前後における細胞の形態を示した。破線は融合した細胞と融合していない細胞との境界を示している。バー: 50 μm

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

D

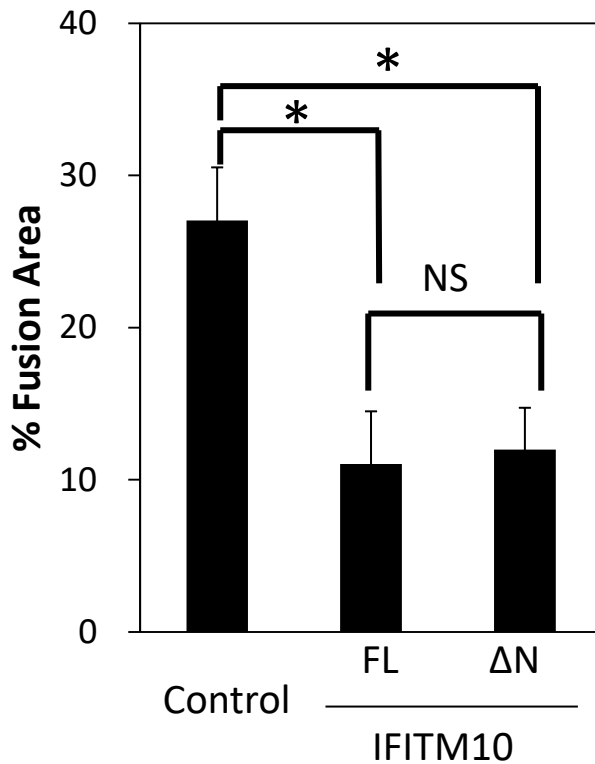


図1.9. IFITM10がVSV-Gによる膜融合を阻害するために、N末端領域は必要でない

D: VSV-Gによる膜融合の度合いを画像解析により定量した。また、データは3連のサンプルにおける平均値を相対誤差とともに示した。*は、Student's *t*-test において有意な差が認められることを示している($p < 0.05$)。NS, 有意な差は認められない。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10
Biosci Biotechnol Biochem. 2017 May ;81(5):914-921.

第2章

ニワトリ *TET* ファミリー遺伝子のクローニング
および赤血球分化におけるニワトリ *TET1* の役割

● 2.1 緒言

ゲノム DNA 上のシトシン残基のメチル化は、ヒストンテールの化学修飾と並び最も重要なエピジェネティック修飾のひとつである。ゲノム DNA のメチル化は胚発生や細胞分化、細胞のがん化など生体内の多くのプロセスにおける遺伝子発現制御に深く関与している^[1]。これまでの研究から DNA のメチル化を触媒する酵素、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMTs: DNA methyl transferases) には、維持メチル化 (maintenance methylation) と *de novo* メチル化 (*de novo* methylation) のふたつのタイプが存在することが知られている。一般に維持メチル化を行う DNMT1 タンパク質は、細胞分裂の際に母鎖の DNA 上に存在するメチルシトシン (5mC) を認識し、新生された娘鎖の DNA 上のシトシンを同様にメチル化することで、ゲノム DNA のメチル化状態を細胞分裂前後で維持するはたらきを有している。一方で、*de novo* メチル化を行う DNMT3A、3B タンパク質は、ゲノム DNA 上の未修飾のシトシンに新たにメチル基を付加する触媒活性を有しており、これにより細胞内の遺伝子発現を変化させることができる^{[1][2]}。

このようにゲノム DNA メチル化の制御機構については多くの研究がなされているのに対し、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るかについてはいまだ不明な点が多い。長年ゲノム DNA の脱メチル化機構としては、DNMTs の発現低下と、細胞分裂に伴うゲノム DNA メチル化の希釈という受動的なゲノム DNA 脱メチル化 (passive demethylation) が、主たるメカニズムであると考えられてきた。これに加えて、近年能動的なゲノム DNA 脱メチル化 (active demethylation) の存在が提唱され、またそれに関与すると考えられるタンパク質 Ten eleven translocation methylcytosine dioxygenase (TET) が発見された。TET ファミリー遺伝子には *TET1*, *2*, *3* の 3 つの遺伝子があり、それぞれのタンパク質が 5-メチルシトシン (5mC) を基質とし、5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に水酸化する酵素活性を有している。また、TET タンパク質は 5hmC をさらに酸化し、5-ホルミルシトシン (5fC) および 5-カルボキシルシトシン (5caC) に変換する酵素活性も持つ^{[3][4]}。TET タンパク質は能動的に 5mC を別の化学種に変換することができるため、結果として積極的なゲノム DNA の脱メチル化が引き起こされると考えられている。一方で TET タンパク質を介したゲノム DNA の脱メチル化にも受動的なものと、能動的なものがあると提唱されてい

る。上述した維持型の DNMT である DNMT1 は、細胞分裂の際にメチル化された母鎖の DNA を認識し、新生された娘鎖 DNA のメチル化を行う。ところが、DNMT1 は 5hmC をメチル化シグナルとして認識できないため、TET による 5mC の水酸化は受動的な脱メチル化の引き金となる^[5]。他方、TET により 5mC が 5fC および 5caC まで酸化されると、塩基除去修復機構がこれを認識し、これらの化学種は未修飾のシトシンへと置換される。この脱メチル化メカニズムは、細胞分裂非依存的に起こるため、能動的脱メチル化であると考えられている^{[6][7]}。

このように、TET はゲノム DNA のメチル化状態をグローバルに変化させる可能性を持ち、実際に胚発生、細胞分化の制御に重要であるとの報告が、多くなされている。発生初期のマウスにおいては、胚盤胞期の内部細胞塊や、そこから樹立したマウス胚性幹細胞、および始原生殖細胞においてマウス *Tet1* (*mTet1*) および 2 が、受精直後の胚において *mTet3* が強く発現していることが知られており、これらの細胞において TET タンパク質は、細胞の未分化性の維持、およびグローバルなエピゲノム状態のコントロールを行っている^{[8][9][10]}。また TET は、胚発生の後期や特定の細胞種の分化においても重要である。TET1 は、神経形成や腸管幹細胞の機能維持に関わることが知られている^{[11][12]}。TET2 は、血球系の細胞において幅広く発現しており、それらの細胞の分化に重要である^{[13][14][15][16][17][18]}。また、TET3 も神経形成や血球系細胞の分化に関与している。一方でこれらの報告は主に哺乳類におけるものであり、ニワトリを含む鳥類における TET 遺伝子のはたらきは、ほとんど研究がされていないのが現状である。

ニワトリ α - および β -グロビン遺伝子座は、エピジェネティック制御であるヒストン修飾や、DNA のメチル化におけるモデル系として広く研究がなされてきた^{[19][20][21][22][23][24]}。ニワトリ α -グロビン遺伝子は 3 つの機能性遺伝子 — π (*HBZ*), αD (*HBM*), および αA (*HBA1*) — から構成されており、 β -グロビン遺伝子は 4 つの遺伝子 — ρ (*HBG1*), βH (*HBE1*), βA (*HBG2*), および ϵ (*HBE*) — から構成されている。また、これらグロビン遺伝子は発生の時期に応じて発現する遺伝子が変わっていくという特徴を持っており、特に β -グロビン遺伝子 (ρ および βA) は、プロモーターにおける DNA のメチル化の状態が遺伝子発現に関わることが報告されている^{[21][22][25]}。

本章では、ニワトリ TET ファミリー遺伝子についてクローニングを行い、その活性を、培養細胞を用いた系で確認した。さらに、ニワトリ TET1 が赤血球に

において非常に強く発現し、 β -グロビン遺伝子の発現制御を行うことを明らかにした。

● 2.2 実験材料および手法

2.2.1 培養細胞

293FT、HeLa、および DF-1 細胞は 10% の FBS、P&S を含む DMEM high glucose 培地中で培養を行った。DT40 細胞は、7.5% の FBS (Biological Industries)、2.5% のニワトリ血清 (Invitrogen)、P&S を含む RPMI1640 (日水製薬, 東京, 日本) 培地中で培養を行った。

2.2.2 ニワトリおよび種卵

実験に使用した白色レグホーン種のニワトリおよび種卵は竹内農園、または日生研より購入した。組織は解剖後 PBS(-) により良く洗浄し、ハサミにより細かく切断した後、全 RNA を抽出した。血液サンプルはシリンジもしくはガラスキャピラリーを用いて、成鳥および胚体より採取した。血液からの白血球と赤血球の分離には、Histodenz (Sigma-Aldrich) を用いた密度勾配遠心を使用した。赤血球前駆細胞である T2ECs (TGF- α / TGF- β -induced erythroid cells) は、孵化後間もないヒヨコの大腿骨髄より既報の手法により樹立した^[26]。T2ECs は 10% の FBS、1% のニワトリ血清、P&S、0.1 mM の β -メルカプトエタノール (和光純薬)、5 ng/ml のヒト TGF- α (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、1 ng/ml のヒト TGF- β (Peprotech)、1 μ M のデキサメタゾン (和光純薬) を含む α -MEM (Invitrogen) 培地中で培養を行った。T2ECs を分化誘導する際は、培地中より TGF- α 、TGF- β 1、およびデキサメタゾンを除去した後、10 ng/ml のインスリン (和光純薬) および 100 IU/ml のエポジン (中外製薬, 東京, 日本) を加え、実験条件に示した期間培養を行った。また、全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の定める倫理規定に則り行った。

2.2.3 TET 遺伝子のクローニング

ニワトリ *TET1*, 2, 3 遺伝子 (*c TET1*, 2, 3) 全長 (FL) および触媒活性ドメイン (CD) (*cTET1*: 1486–2244 アミノ酸(AA)、*cTET2*: 1101–1955 AA、および *cTET3*: 568–1524 AA) をコードする DNA 断片は、ニワトリ胚盤葉もしくは脳由来の cDNA を鋳型とし、KOD-Fx-Neo (東洋紡) を用いて PCR により増幅した。増幅に用いたプライマーの配列は以下の NCBI のデータベースを基に設計した (*cTET1*: XM_015278732、*cTET2*: NM_001277794、および *cTET3*: XM_015297468.1)。増幅した DNA 断片は pFLAG-CMV2 ベクター (Sigma) にクローニングした。*mTet1* CD (1367–2039 AA) は、NIH3T3 マウス繊維芽細胞由来の cDNA を鋳型とし、同様に PCR により増幅を行い pFLAG-CMV2 にクローン化した。プライマーは以下の NCBI のデータベースを基に設計した (*mTet1*: NM_001253857)。またクローニングに用いた各プライマーの配列は、表 2.1 にまとめた。

2.2.4 In vitro における 5hmC の検出

293FT 細胞を 5×10^5 cells/dish の濃度で 35 mm ディッシュに播種し、翌日 4 μg の各 FLAG-TET (CD) 発現プラスミドベクターを LF2000 (Invitrogen) を用いトランスフェクションした。24 時間の培養後、細胞を回収し、MagExtractor-Genome (東洋紡) を用いてゲノム DNA の抽出、もしくは SDS サンプルバッファーに溶解した。5hmC 検出のためのドットブロットアッセイでは、抽出したゲノム DNA を Hybond-XL membranes (GE Healthcare) に等量ずつブロットし、80°C で 3 時間加熱することで固定化した。5hmC の検出には 1 次抗体としてウサギ抗 5hmC 抗体 (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) を、2 次抗体としてヤギ抗ウサギ IgG-HRP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いたイムノブロット法を使用した。また、各 FLAG-TET およびローディングコントロールに用いた β -ACTIN の検出には、1 次抗体としてマウス抗 FLAG 抗体 (和光純薬)、またはマウス抗 β -ACTIN 抗体 (医学生物学研究所) を、2 次抗体としてヤギ抗マウス IgG-HRP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。また、発色基質として、ECL plus (Perkin Elmer) もしくは ImmunoStar LD (和光純薬) を用い、LAS-3000 mini (富士フイルムエンジニアリング) により解析した。

2.2.5 定量 PCR (qPCR) および定量-逆転写 PCR (qRT-PCR)

RNA の抽出、cDNA の合成および qPCR については前章で述べた方法と同様である^[27]。また、PCR に使用したプライマーは以下の表 2.1 にまとめた。

2.2.6 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)

解析に用いたゲノム DNA は、ニワトリ赤血球、T2ECs および DT40 細胞から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。MeDIP および hMeDIP は既報の手法を参考に行った^[8]。簡潔に述べると、精製した DNA は超音波破碎により約 500 bp 程度に断片化した後、95 °C で 10 分間加熱、変性させた後急冷した。次に、4 °C の MeDIP バッファー (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 140 mM 塩化ナトリウム, 0.05% TritonX-100) 中で、それぞれマウス抗 5mC 抗体 (Active motif) もしくはウサギ抗 5hmC 抗体を用いて一晩の間免疫沈降した。また、MeDIP においては、マウス抗 5mC 抗体をブリッジするために、ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を同時に等量加えた。その後、プロテイン G アガロースビーズ (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を加え、4 °C で 3 時間抗体-DNA 複合体を吸着させた。免疫沈降したサンプルは、MeDIP バッファーで 3 回洗浄した後、55 °C で 5 時間プロテイナーゼ K により消化を行い、QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) により DNA を精製した。その後、定量 PCR による解析を行った。解析に用いたプライマーは表 2.1 にまとめた。

2.2.7 テトラベンジジン染色

T2ECs を PBS(-)により洗浄した後、96 ウェルプレートに 5×10^4 cells/well で播種した。ついでテトラベンジジン染色液 (0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0), 0.5 mM テトラベンジジン, 0.01% 過酸化水素) を加え、37 °C で 30 分間発色させた。その後、染色液と等量の 2M 硫酸を加え反応を停止させ、MTP-500 プレートリーダー (コロナ電気, 茨城, 日本) を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した。

2.2.7 cTET1 のノックダウン

cTET1 ノックダウン実験においては、150 pmol の cTET1 特異的 (北海道システムサイエンス, 北海道, 日本) またはコントロール (siTrio; B-Bridge International Inc, Santa Clara, CA, USA) siRNA を 1×10^6 cells の T2ECs に対して NEPA21 electroporator (ネッパジーン, 千葉, 日本) を用いたエレクトロポレーション法により導入した。T2ECs は通常の培養条件で 24 時間培養した後、48 時間分化誘導条件で培養を行い、以降の解析に用いた。実験に使用した cTET1 特異的 siRNA の配列は、表 2.1 に示した。

● 2.3 実験結果

2.3.1 ニワトリ *TET1, 2, 3* のクローニングおよび生化学的活性の確認

マウスにおいては 3 種類の *Tet* ファミリー遺伝子が知られており、またそれらすべての TET タンパク質において、5mC を水酸化する酵素活性が報告されている^[8]。ニワトリにおける *TET* ファミリー遺伝子である *cTET1, 2, 3* についても、NCBI のデータベース上に予測配列のデータが存在することが確認できた。本研究は、この予測配列を基に *cTET* 遺伝子のクローニングを行い、実際にその配列を決定した (図 2.1.A-C)。

クローン化した *cTET1, 2, 3* 遺伝子はそれぞれ 2244 AA, 1955 AA, 1524 AA のアミノ酸配列をコードしていた (図 2.1.D-F)。また、3 種類全ての *cTET* 遺伝子について、いくつかの塩基で NCBI データベースと異なる部分が見られた。一方で、アミノ酸配列の変異は *cTET2* においては観察されなかった。*cTET1* については 1832 番目のリジン残基がプロリンへ置換されることが観察された。*cTET3* は 3 か所において 1 塩基が挿入される変異が観察された (550 番目と 551 番目の塩基対の間に C の挿入、1292 番目と 1293 番目の塩基対の間に G の挿入、1363 番目と 1364 番目の塩基対の間に C の挿入)。このため *cTET3* は一部データベースとは異なったオープンリーディングフレームを有することが予測された。一方で、今回取得した *cTET3* のアミノ酸配列は、進化的にニワトリに近縁の種であるウズラ *TET3* のアミノ酸配列 (XP_015738510.1) と高い相同性を持つことが確認できた (図 2.1.G)。したがって、この *cTET3* 遺伝子は少なくとも白色レグホーン系統のニワトリでは機能的であると推定し、以降の実験ではこの配列を用いることとした。

クローニングした *cTET1* は、N 末端付近に CXXC タイプのジンクフィンガードメインを持ち、タンパク質中央付近のシステインに富んだ領域とそれに続く 2 つの分離した触媒活性ドメイン (CD1, CD2) を持つことが解析より予測された。また、*cTET2, 3* に関しては *cTET1* と同様にシステインに富んだ領域と CD1, CD2 を持つが、ジンクフィンガードメインは観察できなかった (図 2.1.D-F)。*cTET1, 2* のドメイン構造は他種の *TET1, 2* とよく似ている一方で、*TET3* は他種では N 末端領域に CXXC ジンクフィンガードメインを持つことが報告されている。

TET3 の CXXC ジンクフィンガードメインは、メチル化および非メチル化 CpG 配列に結合し、眼球および神経の発生を行う遺伝子の制御を行うことがアフリカツメガエルの系で報告されている^[28]。本研究において CXXC ジンクフィンガードメインを持つ cTET3 はクローニングできておらず、また NCBI のデータベースの予測配列上でも確認されてはいないが、脊椎動物間における TET3 のドメイン構造の保存性を鑑みると、CXXC ジンクフィンガードメインを持つ cTET3 のアイソフォームが存在する可能性は否定できない。

cTET1, 2, 3 はいずれも全長を発現し解析するには巨大なタンパク質であるため、既報を参考に酵素活性の確認には活性ドメインのみを用いた^[8]。システインに富む領域から C 末端までの領域を触媒活性ドメイン(CD)とし、この領域を FLAG タグ融合タンパク質として 293FT 細胞に強制発現させた。その結果、cTET1-, cTET3-, およびポジティブコントロールである mTet1 を強制発現させた細胞においてゲノム DNA における 5hmC の集積が観察された。一方で、cTET2 を強制発現させた細胞においては目立った 5hmC シグナルの増加は観察されなかった (図 2.2.A)。TET タンパク質の発現を、FLAG タグを用いたウエスタンブロットティングにより確認したところ、cTET1-, cTET3-, mTet1, を強制発現させた細胞においては発現が確認されたが、cTET2 を強制発現させた細胞では予想される分子量の位置にタンパク質の発現が確認できなかった(図 2.2.B)。cTET2 の発現は、HeLa 細胞、およびニワトリ線維芽細胞である DF-1 細胞に対して、同様の実験を行った場合でも観察されなかった (データ未記載)。ここで、ヒトの培養細胞系で TET2 の活性ドメインは、ユビキチン化の後、ユビキチンプロテアソーム系によって分解されると報告されている^[29]。これを参考に、cTET2 を強制発現させた細胞を、ユビキチンプロテアソーム系の阻害剤である MG132 存在下で培養し、同様に 5hmC の検出及び TET タンパク質の発現確認を行った。その結果、ゲノム DNA における 5hmC の集積、および cTET2 タンパク質の発現を確認することができた (図 2.2.C,D)。これらの結果より、培養細胞の系において cTET1, 2, 3 はいずれも 5mC を 5hmC に変換する触媒活性を有していると推定された。

2.3.2 ニワトリ *TET* 遺伝子の発現解析

マウスにおいて、5hmC のシグナルは受精直後の胚において観察できるようになり、また胚盤胞期の胚およびこの発生段階の胚より樹立されたマウス胚性幹細胞、ならびに始原生殖細胞においてもゲノム DNA 上に 5hmC が豊富に存在することが知られている^{[8][9][10]}。一方、ニワトリ胚における 5hmC の集積は、原条の伸長以前には観察されず、6 体節期 (転卵 28 時間胚) の辺りから強い 5hmC のシグナルが観察され始めると報告されている^[30]。しかし、5mC を 5hmC に変換する *TET* 遺伝子自体の発現の時空間的パターンについては未だ解析がなされていない。そこで、様々な発生段階の胚および成鳥における *cTET* 遺伝子の発現量解析を行った。

胚盤葉期の胚 (EK stage X^[31]) において *cTET* 遺伝子の発現量はいずれも低い値であった(図 2.3.A)。5、10、15 日胚では、胚盤葉期の胚と比較して一部の臓器において *TET* 遺伝子の発現量の増加が見られた (図 2.3.B-D)。成鳥においては、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 *cTET* 遺伝子の発現量が観察された (図 2.3.E-G)。また、興味深いことに、赤血球において非常に高い *cTET1* の発現が観察された。そこで、様々な発生ステージでの赤血球における *cTET* 遺伝子の発現量を測定したところ、発生にしたがって *cTET1* のみが増加していくことが明らかとなった。また特に、5 日胚を境に *cTET1* の発現量が急増する傾向が観察された (図 2.3.H)。これに加えて、ゲノム DNA メチル化を触媒する *DNMTs* についても発現の解析を行ったところ、これらの遺伝子は、3 日胚から 15 日胚にかけて微増する傾向が観察された (図 2.3.I)

2.3.3 ニワトリ β -グロビン遺伝子座における 5mC および 5hmC の変化

qRT-PCR による発現量解析から、*cTET1* が赤血球において非常に高いレベルが発現していることが明らかとなった。そこで、赤血球における *cTET1* の生理的役割を明らかにすべく実験を行った。

赤血球における重要なタンパク質の一つとしてヘモグロビンが挙げられる。生体内の酸素運搬を担うタンパク質であるヘモグロビンは、それぞれ 2 分子の

α -グロビンと β -グロビタンパク質から構成されている。脊椎動物で保存された特徴として、 α -グロビンおよび β -グロビン遺伝子は、比較的狭い領域にそれぞれ数個の相同性の高い遺伝子が並ぶというクラスター構造をなしており、またそこから実際に転写される遺伝子は、発生時期に応じて変化していくという特徴を持っている。ニワトリ β -グロビン遺伝子については、2日胚から5日胚にかけて存在する primitive タイプの血球細胞では、胚性の β -グロビン遺伝子 (ρ および ϵ) が発現している。一方、5日胚以降に増加する definitive タイプの血球細胞では、胎性および成熟型の β -グロビン遺伝子 (βH および βA) の発現が優位となり、胚性の β -グロビン遺伝子の発現は抑制される。さらに、孵化後の個体においては胎性の β -グロビン遺伝子は抑制され、成熟型の β -グロビン遺伝子が主に発現することが知られている^[25]。実際に、5日胚および8日胚から採取した赤血球における β -グロビン遺伝子の発現量を調べてみると、発生に伴い胚性の β -グロビン遺伝子 (ρ および ϵ) は抑制されており、胎性および成熟型の β -グロビン遺伝子 (βH および βA) の発現量が増加することが確かめられた (図 2.4.A)。

ゲノム DNA 上のヒドロキシメチル化が β -グロビン遺伝子の発現に関与していることはバブーンにおいてすでに報告がなされている^[16]。また、ニワトリにおいても血球細胞の分化の際に、胎性の α -グロビン遺伝子 αD における 5hmC の集積が報告されている^[24]。さらに、胚発生の過程においてニワトリ β -グロビン遺伝子 ρ および βA 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^{[21][22]}。しかしながら、ニワトリ β -グロビン遺伝子の発現制御におけるヒドロキシメチル化の役割については明らかではない。これを解明するため私は、様々な発生ステージにおける ρ および βA 遺伝子のプロモーター領域におけるゲノム DNA のメチル化およびヒドロキシメチル化を、MeDIP および hMeDIP 法により解析した。また、実際の解析には胚より単離した赤血球、およびコントロールとして非血球細胞であり *TET* 遺伝子の発現量が低い、ニワトリ B 細胞由来の細胞株 DT40 より精製したゲノム DNA を用いた (Fig. 2.4.B)。PCR による増幅領域は、ゲノム DNA がメチル化されることが知られている ρ および βA 遺伝子の転写開始点 500 bp 以内のプロモーター近接領域に設定し、断片化したゲノム DNA はそれぞれ抗 5mC および抗 5hmC 抗体を用いて免疫沈降することにより濃縮した。既報の通り、 ρ プロモーターにおける 5mC の集積は、5日胚赤血球においては観察されず、転写が抑制され始める 8日胚において上昇し、10

日胚および成鳥においても維持されていることが確認された (図 2.4.C)。また、 ρ 遺伝子が発現していない DT40 においても、同様にゲノム DNA がメチル化されていることが観察できた。さらに興味深いことに、5hmC のシグナルは 5 日胚から 8 日胚にかけて増加する傾向が見られ、その後分化が進むにつれ減少したが、一定量の 5hmC は成鳥においても維持されていることが判明した (図 2.4.D)。一方で DT40 において、 ρ プロモーターにおける 5hmC のシグナルはほとんど見られなかった。 ρ プロモーターとは対照的に、赤血球での βA プロモーターにおける 5mC は、5 日胚において非常に強く観察され、5 日胚から 8 日胚の間に急速に減少し、成鳥においてはほとんど消失していた。他方、 βA 遺伝子も発現していない DT40 では、 ρ プロモーターと同様に βA プロモーターにおいても 5mC のシグナルが観察された。また、赤血球の βA プロモーターにおける 5hmC のレベルは 5 日胚から 8 日胚にかけて上昇しており、その後発生に伴い減少していった。DT40 においては 5hmC のシグナルはほとんど観察されなかった。さらに、HS4 領域についても同様の解析を行った。HS4 領域は、 β -グロビン遺伝子座の上流に位置しており、非常に強いインシュレーター活性を持つ遺伝子制御領域である。また、HS4 領域は非血球細胞においてもゲノム DNA メチル化状態が低く維持されている (hypomethylated) ことが知られている^{[32][33]}。この領域において 5mC は、全ての発生ステージにおける赤血球および DT40 について低い値を維持しており、同様に 5hmC の値も低く抑えられていた。全体としては、 ρ および βA 遺伝子のプロモーター領域における 5mC の強さは、それぞれの遺伝子の発現と逆相関していることが示された。また、 βA プロモーター領域上の 5hmC シグナルの増加時期は、5mC シグナルの減少時期と一致していた。これは 5hmC が能動的な 5mC 消去カスケードにおける中間体であるということを反映しているからだと考えられる。一方で、 ρ プロモーターにおいて 8 日胚から 10 日胚にかけて 5hmC のシグナルが増加する生理的意義については不明な点が残る。

2.3.4 分化誘導した T2ECs において cTET1 は βA 遺伝子の発現を促進する

前項までにおいて βA 遺伝子の発現の変化とゲノム DNA 上の 5hmC の変化に相関がある可能性が示された。ニワトリ赤血球においては cTET1 が強く発現していることから、cTET1 がゲノム DNA 上のメチル化状態を変化させることで βA 遺伝子の転写を促進していることが予想された。これを証明するため *in vitro* の細胞系を用いた実験を行った。

本研究では、ニワトリ赤血球前駆細胞としての性質を持つことが知られている T2ECs を、ヒヨコ大腿骨髄より樹立し、実験に使用した^[26]。樹立した T2ECs が赤血球への分化能を持つことは、テトラベンジジン染色によりヘモグロビンの存在を測定することで確認した (図 2.5.A)。また、定量 PCR により α - および β -グロビン遺伝子が発現誘導されることも確認した。分化誘導により、成熟型のグロビン遺伝子 (αA および βA) が誘導される一方で、胚性のグロビン遺伝子 (π および ρ) には変化が見られなかった (図 2.5.B)。これは今回使用した T2ECs がヒヨコの骨髄細胞から樹立されたため、血球前駆細胞が潜在的に definitive タイプの赤血球の性質を有しているからだと考えられる。また、分化誘導により cTET1 の発現が上昇することも確認された。一方で、cTET2 および cTET3 の発現には変化が見られなかった (図 2.5.C)。次に、分化誘導前後における βA プロモーター上の 5mC および 5hmC の変化について、T2ECs から精製したゲノム DNA を MeDIP および hMeDIP により解析した。 βA プロモーター上の 5mC は、48 時間の分化誘導により有意に減少しており、一方で 5hmC は有意に増加していた (図 2.5.D,E)。これらの結果は、分化に伴う βA プロモーターの脱メチル化に cTET1 が関与していることを示唆するものである。

これについてさらに詳しく調べるため、siRNA を用いた cTET1 のノックダウン実験を行った。T2ECs に対する siRNA の導入効率は約 50%前後とあまり高い値は達成できなかったが、2種類の異なる配列を持つ siRNA のどちらにおいても、cTET1 特異的な発現低下が観察され、また cTET1 のノックダウンは βA 遺伝子の発現量を低下させた (図 2.5.F)。これらより、cTET1 はおそらくゲノム DNA 上の 5mC の脱メチル化を介して βA 遺伝子の発現を制御していると考えられる。

● 2.4 考察

本章では初めに、ニワトリ *TET* ファミリー遺伝子、*cTET1*, 2, 3 のクローニングを行い、培養細胞中での強制発現の系においてこれら *TET* タンパク質による 5hmC の集積を確認した (図 2.2.A,C)。これまでの研究から、5mC を水酸化するという *TET* タンパク質の酵素活性は、魚類から哺乳類まで脊椎動物間で広く保存されていることが知られている^{[8][15][28][30]}。本研究は鳥類における *TET* ファミリー遺伝子のはたらきを初めて確認したものであり、上述した結果より *cTET* タンパク質も他の脊椎動物と同様に 5mC を基質としそれを水酸化する酵素活性を有していると予測される。

定量 PCR による発現解析から、マウスとは異なり、ニワトリ胚盤葉では *TETs* の発現が比較的低いことが明らかとなった(図 2.3.A)。この結果は、胚盤葉では 5hmC のシグナルが検出されないという以前の報告とよく一致している^[30]。正確な議論をするには *in vivo* におけるさらに詳細な解析が必要であるが、本研究における結果は、哺乳類とは異なりニワトリにおいては発生の初期段階において *TET* による制御が重要でないことを示唆している。

また、*cTET1* は赤血球において非常に高い発現が観察された。さらに、*cTET1* の発現は、血球細胞が primitive 型から definitive 型へと置き換わる 5 日胚から 8 日胚にかけて増加する傾向が見られた (図 2.3.H)。MeDIP および hMeDIP 法による解析から、 βA プロモーター上の 5mC は 5 日胚から 8 日胚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(図 2.4.C)。また、この際一過的な 5hmC シグナルの増加が観察された(図 2.4.D)。ここで、*DNMTs* の発現解析から βA プロモーター上の 5mC の消失は、*DNMT1* の発現低下による受動的な脱メチル化によるものではないと考えられる(図 2.3.I)。さらに、 βA プロモーター上の 5mC および 5hmC 量の変化は、T2ECs を用いた *in vitro* の分化系でも同様の傾向が観察された(図 2.5.D,E)。これらの結果に加えて、*cTET1* のノックダウンにより βA の発現が低下するという実験の結果(図 2.5.F)を統合すると、ニワトリでは血球細胞分化の際に、*cTET1* が βA プロモーター上の 5mC を直接 5hmC に変換し、脱メチル化を促進することで βA の発現を促進しているのだと推定される。一方で、例えばゼブラフィッシュにおいて、*Tet2* が *scl*, *gata-1*, および *cmyb* といった血球細胞系の主要な転写因子のプロモーター領域の脱メチル化を促進しており、

tet2 のノックアウトにより赤血球新生がトータルに阻害されることが報告されている^[15]。またヒトにおいても、TET2 の機能喪失により赤血球特異的転写因子の結合部位における 5hmC のパターンが変化し、赤血球の分化が阻害されるという報告がある^[18]。したがって、cTET1 についても、 βA プロモーターの直接的脱メチル化以外のメカニズムにより βA の発現を制御している可能性を捨てることはできない。

本研究からニワトリにおいては cTET1 が赤血球における主要な働きを行う TET 遺伝子であることが示された。しかしながら、他の種 — ゼブラフィッシュ、バブーン、およびヒト — においては TET2 および 3 が主に赤血球新生に関わることが知られている^{[15][16][17][18]}。したがって、TET1 が赤血球で主に発現していることは、ニワトリ (あるいは鳥類) 特異的なことであると考えられるが、なぜ TET2 や 3 でなく TET1 が強く発現し、グロビン遺伝子の制御を行っているのかを説明するにはさらなる研究が必要である。

本章では、ニワトリ TET 遺伝子のクローニングを行い、その活性について評価した。また、ニワトリ TET 遺伝子の生理的な役割のひとつとして、赤血球分化における cTET1 の役割、特に β -グロビン遺伝子の発現制御についてふれた。ニワトリ β -グロビン遺伝子座は、転写制御、クロマチン構造の制御機構、そしてエピジェネティック修飾研究におけるモデルとして古くから多くの研究が行われてきた。本章の研究により、cTET1 を介した脱メチル化が、 β -グロビン遺伝子の発現を制御するという新たな知見をこのモデル系に加えることができた。これは、細胞内における包括的な遺伝子発現制御メカニズム理解の一助になるという点で意義深いものだと考えられる。

なお本章は以下の論文に発表したものであり、また図表は同論文より引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis, *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

● 参考文献

- [1] Z.D. Smith, A. Meissner, DNA methylation: roles in mammalian development, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 204–20.
- [2] M.G. Goll, T.H. Bestor, Eukaryotic cytosine methyltransferases, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 481–514.
- [3] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y. Shen, et al., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324 (2009) 930–5.
- [4] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, et al., Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* 333 (2011) 1300–3.
- [5] V. Valinluck, L.C. Sowers, Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1, *Cancer Res.* 67 (2007) 946–50.
- [6] A. Maiti, A.C. Drohat, Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35334–8.
- [7] Y.-F. He, B.-Z. Li, Z. Li, et al., Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA, *Science* 333 (2011) 1303–7.
- [8] S. Ito, A.C. D'Alessio, O. V. Taranova, et al., Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, *Nature* 466 (2010) 1129–33.
- [9] S. Yamaguchi, K. Hong, R. Liu, et al., Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression, *Nature* 492 (2012) 443–7.
- [10] T.P. Gu, F. Guo, H. Yang, et al., The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes, *Nature* 477 (2011) 606–10.
- [11] M. Santiago, C. Antunes, M. Guedes, et al., TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function - How critical are they?, *Genomics* 104 (2014) 334–40.
- [12] R. Kim, K.L. Sheaffer, I. Choi, et al., Epigenetic regulation of intestinal stem cells by Tet1-mediated DNA hydroxymethylation, *Genes Dev.* 30 (2016) 2433–42.

- [13] S. Montagner, C. Leoni, S. Emming, et al., TET2 regulates mast cell differentiation and proliferation through catalytic and non-catalytic activities, *Cell Rep.* 15 (2016) 1566–79.
- [14] M. Ko, J. An, W.A. Pastor, et al., TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers, *Immunol. Rev.* 263 (2015) 6–21.
- [15] L. Ge, R.-P. Zhang, F. Wan, et al., TET2 plays an essential role in erythropoiesis by regulating lineage-specific genes via DNA oxidative demethylation in a zebrafish model, *Mol. Cell. Biol.* 34 (2014) 989–1002.
- [16] M.A. Ruiz, A. Rivers, V. Ibanez, et al., Hydroxymethylcytosine and demethylation of the γ -globin gene promoter during erythroid differentiation, *Epigenetics* 10 (2015) 397–407.
- [17] H. Yan, Y. Wang, X. Qu, J. Li, et al., Distinct roles for TET family proteins in regulating human erythropoiesis, *Blood* 129 (2017) 2002–12.
- [18] J. Madzo, H. Liu, A. Rodriguez, et al., Hydroxymethylation at gene regulatory regions directs stem/early progenitor cell commitment during erythropoiesis, *Cell Rep.* 6 (2014) 231–44.
- [19] M.D. Litt, M. Simpson, M. Gaszner, et al., Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus, *Science* 293 (2001) 2453–5.
- [20] J.D. Mcghee, G.D. Ginder, Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken β -globin genes, *Nature* 280 (1979) 419–20.
- [21] R. Singal, R. Ferris, J.A. Little, et al., Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 13724–9.
- [22] K. Ramachandran, J. van Wert, G. Gopisetty, R. Singal, Developmentally regulated demethylase activity targeting the β A-globin gene in primary avian erythroid cells, *Biochemistry* 46 (2007) 3416–22.
- [23] R. Singal, J.M. vanWert, L. Ferdinand, Methylation of α -type embryonic globin gene $\alpha\pi$ represses transcription in primary erythroid cells, *Blood* 100 (2002) 4217–22.

- [24] C.V. Quezada, C.A. Canon, Y.F. Guzmán, et al., CTCF demarcates chicken embryonic α -globin gene autonomous silencing and contributes to adult stage-specific gene expression, *Epigenetics* 8 (2013) 827–38.
- [25] G.A.P. Bruns, V.M. Ingram, Erythropoiesis in the developing chick embryo, *Dev. Biol.* 459 (1973) 455–9.
- [26] O. Gandrillon, U. Schmidt, H. Beug, J. Samarut, TGF- β cooperates with TGF- α to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: Evidence for an autocrine mechanism, *EMBO J.* 18 (1999) 2764–81.
- [27] Y. Okuzaki, S. Kidani, H. Kaneoka, et al., Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81 (2017) 1–8.
- [28] Y. Xu, C. Xu, A. Kato, et al., Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development, *Cell* 151 (2012) 1200–13.
- [29] Y.W. Zhang, Z. Wang, W. Xie, et al., Acetylation enhances TET2 function in protecting against abnormal DNA methylation during oxidative stress, *Mol. Cell* 65 (2017) 323–35.
- [30] R.D. Almeida, M. Loose, V. Sottile, et al., 5-hydroxymethyl-cytosine enrichment of non-committed cells is not a universal feature of vertebrate development, *Epigenetics* 7 (2012) 383–89.
- [31] H.E. Giladi, S. Kochav, From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology, *Dev. Biol.* 49 (1976) 321–37.
- [32] J.H. Chung, M. Whiteley, G. Felsenfeld, A 5' element of the chicken α -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*, *Cell* 74 (1993) 505–14.
- [33] M.N. Prioleau, P. Nony, M. Simpson, G. Felsenfeld, An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β -globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene, *EMBO J.* 18 (1999) 4035–48.

表2.1. プライマーおよびsiRNAリスト

クローニングに使用したプライマー		
cTET1 FL	Dir	CAT <u>ATCGATA</u> AATGGCTCACCCACGCAAGGC
cTET1 CD	Dir	CAT <u>ATCGATAG</u> AATTGCCAACTTGTGACTGTGTTG
cTET1 Rev	Rev	CAT <u>TCTAGACT</u> TATGCCCAATGGTTGTAAGGCC
cTET2 FL	Dir	CAT <u>GAATTC</u> AAATGGAACAGGACAGAACCATCCATG
cTET2 CD	Dir	CAT <u>GAATTC</u> AAGATTTCCCATCTTGCAGCTG
cTET2 Rev	Rev	CAT <u>GCGGCCG</u> CTTAGATGTATCTGTTGTAAAGGCC
cTET3 FL	Dir	CAT <u>GAATTC</u> AATGGCTGCCCGGCCCGCCGGCC
cTET3 CD	Dir	CAT <u>ATCGATAG</u> AGTTCCCCACCTGCGA
cTET3 Rev	Rev	CAT <u>TCTAGAT</u> CAAACCCAGCGGCTG
mTet1 CD	Dir	CAT <u>ATCGATAG</u> AAGCTGCACCCTGTGACTGTGATG
	Rev	CAT <u>GGATCCT</u> TAGACCCAACGATTGTAGGGTCCC

下線は制限酵素認識部位を示している

この表は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

表2.1. プライマーおよびsiRNAリスト

定量PCRに使用したプライマー（発現解析用）		
<i>GAPDH</i>	Dir	GGGCACGCCATCACTATC
	Rev	GTGAAGACACCAGTGGACTCC
<i>cTET1</i>	Dir	CAGGAAGCGCAAACCAGTC
	Rev	CCTCAAAGGTAGTGTGA
<i>cTET2</i>	Dir	TCGAGTACGAACACAGAGCG
	Rev	TGCAAACCAGTGTACTCCCG
<i>cTET3</i>	Dir	CAGAATGCAGGGTATGGCGT
	Rev	TCATGCTGTAAGGGTCGGAG
π	Dir	TCACTGGAGAGGCTTTTTGCC
	Rev	GTGGGAAAGCAGCTTGAAGTT
αA	Dir	CCCTGGAAAGGATGTTCAACC
	Rev	GGCCCAGGAGTTTGAAGTTG
ρ	Dir	CTTCAGGCTCCTGGGGAACA
	Rev	TCACACTGTGTCCTGCTCTG
βH	Dir	GAGAACTTCAGGCTCCTGGG
	Rev	GAGCATCTCCAAGTGGCTGT
βA	Dir	ACTTCAGGCTCCTGGGTGA
	Rev	GTGATCTTTGGTGCTGGTGC
ε	Dir	GAACTTCAGGCTCCTTGGGG
	Rev	CAACGTTGACCAGCTTCTGC

この表は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

表2.1. プライマーおよびsiRNAリスト

定量PCRに使用したプライマー (MeDIP, hMeDIP用)		
HS4	Dir	CGGGGAAGGTGGCACG
	Rev	AGCTTTTCCCCGTATCCCC
ρ promoter	Dir	TGCAGTGAGGACAGCAAGAT
	Rev	TGTGCACAAGGTGTGGTCTT
βA promoter	Dir	CCTCTGGAGATGCAGCCAAT
	Rev	TCTTGCTCCCCGTGGGGATA

この表は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

表2.1. プライマーおよびsiRNAリスト

siRNA		
siTET1 #1	guide	UUAUCAUUCAGCAAAAUCCCA
	passenger	GAAUUUUGCUGAAUGAUAAGA
siTET1 #2	guide	CAUCCUUUGCCUCAAAACUUUU
	passenger	AAGUUUGAGGCAAAGGAUGUG

この表は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

A

Cloned 1 ATGGCTCACCACCGCAAGGCCTCCAGATTAGCAAAAAAGGAAGAGATAGGCCAAAAGAAAACTAACCCAGGGTAAAAAGAAATCTAGCCAAGTGAGAAAAG 100
 NCBI database 1 ATGGCTCACCACCGCAAGGCCTCCAGATTAGCAAAAAAGGAAGAGATAGGCCAAAAGAAAACTAACCCAGGGTAAAAAGAAATCTAGCCAAGTGAGAAAAG 100
 101 AAAGCACAAGACTCCACAAAAGCTGTTAGTCTGGAAAAGGCCAAAAGCCGGCACAAGAAAAGATGTTAAGAAAAGGAGCAGAAAAGAAACCAAT 200
 101 AAAGCACAAGACTCCACAAAAGCTGTTAGTCTGGAAAAGGCCAAAAGCCGGCACAAGAAAAGATGTTAAGAAAAGGAGCAGAAAAGAAACCAAT 200
 201 CATGAGCTCTTCAGGTAGATTCTCAGGAGCAGTGTCCACGAGAACCCTGTCTGGAAACACCTTGGGTGAGTTTGGAGAAAAGCTGACAAATATCCTCTTTCAT 300
 201 CATGAGCTCTTCAGGTAGATTCTCAGGAGCAGTGTCCACGAGAACCCTGTCTGGAAACACCTTGGGTGAGTTTGGAGAAAAGCTGACAAATATCCTCTTTCAT 300
 301 AGCCAGGAAGCTTCAACATCAATGGTTTACAATGTCTCTGGTAACCCGATCGTTCTCCCGTAGATTTCTCAAGCTCCAACAATTGCAAAACCCAGAA 400
 301 AGCCAGGAAGCTTCAACATCAATGGTTTACAATGTCTCTGGTAACCCGATCGTTCTCCCGTAGATTTCTCAAGCTCCAACAATTGCAAAACCCAGAA 400
 401 AAGCTGCAGCACA AAAAAGCTAGAAAACAAGGAAAAACATGAACAAGCTCTGGCAGTAGTGAAGAAAAAATGTGAAGCATCTGAAAAGGTGTTGGA 500
 401 AAGCTGCAGCACA AAAAAGCTAGAAAACAAGGAAAAACATGAACAAGCTCTGGCAGTAGTGAAGAAAAAATGTGAAGCATCTGAAAAGGTGTTGGA 500
 501 ACAGAATTTAGCACAAGATGAATTAGCTCTCTGCCCTGTAGAGGATATTCATGCAGTGTAGCTGAAGAGCCTGCTGCCACATGTGCTGGTCAAGAAGAG 600
 501 ACAGAATTTAGCACAAGATGAATTAGCTCTCTGCCCTGTAGAGGATATTCATGCAGTGTAGCTGAAGAGCCTGCTGCCACATGTGCTGGTCAAGAAGAG 600
 601 GAGGGAGAAAATACCTGAAACGAAGAAGCTCTGTTCCAAGCACCAGTAGCTGATGACAATACAGCAGTGTGAGAGGTGGAGATGAGCAGCAAGACCTGC 700
 601 GAGGGAGAAAATACCTGAAACGAAGAAGCTCTGTTCCAAGCACCAGTAGCTGATGACAATACAGCAGTGTGAGAGGTGGAGATGAGCAGCAAGACCTGC 700
 701 CCTGTGAGCCACACTCGTGTGATCTCAATGCAAGTAGTGACAGTGAAGCATTTGTTGAAGATGCTGCATTTGGTGGTTCGCTCTTGTGATTCATTAAACCAC 800
 701 CCTGTGAGCCACACTCGTGTGATCTCAATGCAAGTAGTGACAGTGAAGCATTTGTTGAAGATGCTGCATTTGGTGGTTCGCTCTTGTGATTCATTAAACCAC 800
 801 CTCTGAATCAACCTCGAAGGTGTGATAGAGACTCCCTTCGACTTGGTGCCTAACAGTAAAGAAATCTGACTCTGGTCTATTGATACCTCAGACCCGAGT 900
 801 CTCTGAATCAACCTCGAAGGTGTGATAGAGACTCCCTTCGACTTGGTGCCTAACAGTAAAGAAATCTGACTCTGGTCTATTGATACCTCAGACCCGAGT 900
 901 TCAGCCGTGCTGTTAGAAGAGTTGGTCCCCTTGTGAAATCCACACTGAAGCAGAGTGCAGACCTGGTGGTGCAGTGTGAAAGAACACAACTCGAATTCGG 1000
 901 TCAGCCGTGCTGTTAGAAGAGTTGGTCCCCTTGTGAAATCCACACTGAAGCAGAGTGCAGACCTGGTGGTGCAGTGTGAAAGAACACAACTCGAATTCGG 1000
 1001 CAGCCAGAGTTACCTCTGAATTAATTCAGAAGAATGTTTAGAAGATTTGAGTTCATTTGCAGAGTCTGCTTAAAGAGAGATGGGGATTTGGAGTCTGA 1100
 1001 CAGCCAGAGTTACCTCTGAATTAATTCAGAAGAATGTTTAGAAGATTTGAGTTCATTTGCAGAGTCTGCTTAAAGAGAGATGGGGATTTGGAGTCTGA 1100
 1101 GAATGTACACCTTGGTTCACATTCACACTCTGAAGCTGCCACTGGAATCAAAATCACTTTTACATTTTGAAGGTGAAGCTCCCTTGTGGAATCCAAACATG 1200
 1101 GAATGTACACCTTGGTTCACATTCACACTCTGAAGCTGCCACTGGAATCAAAATCACTTTTACATTTTGAAGGTGAAGCTCCCTTGTGGAATCCAAACATG 1200
 1201 AAACCTCGTGGATTTTGTGCCCGTTCACAAAGAGCTTGACTCATGTTTCAGACTTGAGCCGTACAGTAGAGAATACAGAAATCAGACTCAAAAAATATATTTA 1300
 1201 AAACCTCGTGGATTTTGTGCCCGTTCACAAAGAGCTTGACTCATGTTTCAGACTTGAGCCGTACAGTAGAGAATACAGAAATCAGACTCAAAAAATATATTTA 1300
 1301 CAGGAAGCGAATCAGTTTCTGATACCTCTTTAACCAATATGAAGTGGAGGATATTGAACAGCTTGTAAATGTATGATGGAGAGACATTAATTTTGAA 1400
 1301 CAGGAAGCGAATCAGTTTCTGATACCTCTTTAACCAATATGAAGTGGAGGATATTGAACAGCTTGTAAATGTATGATGGAGAGACATTAATTTTGAA 1400
 1401 TTCAGTTATGTCCCTGCTTTATCATCAGATATAGAAAAAGAGCAGTGCATTAATATCTCCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAATCTCTGAAAGGTTTGTGTTCA 1500
 1401 TTCAGTTATGTCCCTGCTTTATCATCAGATATAGAAAAAGAGCAGTGCATTAATATCTCCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAATCTCTGAAAGGTTTGTGTTCA 1500
 1501 GAGTTGCCTTCAAGCAGGAAATCTCTGTTCTTGCCTTAGAAAAGCCATAAATGCAGATTTGCCAGCTGACTTGAGACTGCAGCAGAAATGATTATTCAT 1600
 1501 GAGTTGCCTTCAAGCAGGAAATCTCTGTTCTTGCCTTAGAAAAGCCATAAATGCAGATTTGCCAGCTGACTTGAGACTGCAGCAGAAATGATTATTCAT 1600
 1601 CACAGCTGGAAGTGTGGAAATAGCTTGAATTTGGTTCAGGACAAGCTGAGCAACAGCCTCAACAGTGGAGGCTCAGGTCGATCCTCTCTTACAAA 1700
 1601 CACAGCTGGAAGTGTGGAAATAGCTTGAATTTGGTTCAGGACAAGCTGAGCAACAGCCTCAACAGTGGAGGCTCAGGTCGATCCTCTCTTACAAA 1700
 1701 TCCAGCTGGTGGTTACCTCCTGCATATTCATCTGTGCTCCCTATGTTAGAGAAAAGAAACGAAAGCGGTTGGAGTCTGTGAGCCCTGTCTGCGGAAA 1800
 1701 TCCAGCTGGTGGTTACCTCCTGCATATTCATCTGTGCTCCCTATGTTAGAGAAAAGAAACGAAAGCGGTTGGAGTCTGTGAGCCCTGTCTGCGGAAA 1800
 1801 ACAAATTTGGAAGAAATGCAGCTGTGCAAGGAAGCGAAAACCCAGTACCCGGATATGTA AAAAAGAGAAAATGTGAAGAGCTGAAGAAAGCCACCACCACCAA 1900
 1801 ACAAATTTGGAAGAAATGCAGCTGTGCAAGGAAGCGAAAACCCAGTACCCGGATATGTA AAAAAGAGAAAATGTGAAGAGCTGAAGAAAGCCACCACCACCAA 1900
 1901 TCACACTACCTTTTGAAGTTCTAACTGAAAACAAAAGACCTCAGAGGAGGAAGCAAAAGAGTTTAAAGGCAATTTAGAAAACAACCCAGTAAATGGCGG 2000
 1901 TCACACTACCTTTTGAAGTTCTAACTGAAAACAAAAGACCTCAGAGGAGGAAGCAAAAGAGTTTAAAGGCAATTTAGAAAACAACCCAGTAAATGGCGG 2000
 2001 CAGACCAGAAGCTCAATGGAATGCAGTATTGCGGCTCATGGTGA AAAATACAGGGTGA AAAACAACCCAAACACACACCCCTTTGAAAATGCACAGCTCAAGGAG 2100
 2001 CAGACCAGAAGCTCAATGGAATGCAGTATTGCGGCTCATGGTGA AAAATACAGGGTGA AAAACAACCCAAACACACACCCCTTTGAAAATGCACAGCTCAAGGAG 2100
 2101 AAAGAAAAGAAATGACAGGCTTAGAAGCAGAGAAGTGGGCACATAACGAGAGAGCCATCTTTTGGTGTTCATGTCAATGGAGATACCCATGGAAGCTGTGACAG 2200
 2101 AAAGAAAAGAAATGACAGGCTTAGAAGCAGAGAAGTGGGCACATAACGAGAGAGCCATCTTTTGGTGTTCATGTCAATGGAGATACCCATGGAAGCTGTGACAG 2200
 2201 GCCACGAACTTGAAGAAATGCAGAAAGAAAGTGAAGAGGGGCTCTCCAGTCAATAGCTGAGCCAAAATAATCATTTGGCAGAGCATTCAAAAATGG 2300
 2201 GCCACGAACTTGAAGAAATGCAGAAAGAAAGTGAAGAGGGGCTCTCCAGTCAATAGCTGAGCCAAAATAATCATTTGGCAGAGCATTCAAAAATGG 2300
 2301 CATAAAACCCACATTTACTCATCACGAGAAGCAGTTGCTTCGCTGAAA AAAAGCATCTGTAGAGAAAAGGACAGATTTGACAAGTAACCTCCCATGGCCAG 2400
 2301 CATAAAACCCACATTTACTCATCACGAGAAGCAGTTGCTTCGCTGAAA AAAAGCATCTGTAGAGAAAAGGACAGATTTGACAAGTAACCTCCCATGGCCAG 2400
 2401 TGGATGAAGGCTACCAATCTGAATGACATAGTCAGCAGCTGTGACAACACTAGCGTGTAGCTGTGTTACCCAGACAAAACAAGGGAATCTTTTTCATGAAAGAGG 2500
 2401 TGGATGAAGGCTACCAATCTGAATGACATAGTCAGCAGCTGTGACAACACTAGCGTGTAGCTGTGTTACCCAGACAAAACAAGGGAATCTTTTTCATGAAAGAGG 2500
 2501 AAAATGTACTTGCAGCATCTTTCAGGATTCTCATAAAGTCAAGTATTGCAAAACAGTCTGTTTGGATCTGCAAGAAAAGCAGATGTTGCTCCGATTGGT 2600
 2501 AAAATGTACTTGCAGCATCTTTCAGGATTCTCATAAAGTCAAGTATTGCAAAACAGTCTGTTTGGATCTGCAAGAAAAGCAGATGTTGCTCCGATTGGT 2600
 2601 TAAAGAGAAAGTGCATGGAGAGGATGGCTTCAAAGTACCTAACACAGAGACACAGATGAGAAATCCCTCGCTCCAGCCAACTTTCTGTGCTCGATTAAA 2700
 2601 TAAAGAGAAAGTGCATGGAGAGGATGGCTTCAAAGTACCTAACACAGAGACACAGATGAGAAATCCCTCGCTCCAGCCAACTTTCTGTGCTCGATTAAA 2700

Cloned 2701 AACAGAAACCTAACTGTGGAGCAGGTTGTAGCTATGAAGCTTTAACACAGTTATCTGAAGTCCCTTTAGGAACATCTTCCCAGGTAAAGCTGACAATA 2800
 NCBI database 2701 AACAGAAACCTAACTGTGGAGCAGGTTGTAGCTATGAAGCTTTAACACAGTTATCTGAAGTCCCTTTAGGAACATCTTCCCAGGTAAAGCTGACAATA 2800

2801 CTGAATGTACGGGAAGAAAGAACTTCCAACCTTGCTCCATAGTTATAAAAAGGATATTTGATCCTCCTTTACGCTCTCTACGTTAAAAAGAAATCAAAGACAC 2900
 2801 CTGAATGTACGGGAAGAAAGAACTTCCAACCTTGCTCCATAGTTATAAAAAGGATATTTGATCCTCCTTTACGCTCTCTACGTTAAAAAGAAATCAAAGACAC 2900

2901 TTACTTAGAGAAAGAAAGACAGCTGTTGACTCACTGTGCTCACTCACAAAAGCAGCTCCAAAATAGCCAGTGTATACAATGGTCAAAGTTGCAATTTCT 3000
 2901 TTACTTAGAGAAAGAAAGACAGCTGTTGACTCACTGTGCTCACTCACAAAAGCAGCTCCAAAATAGCCAGTGTATACAATGGTCAAAGTTGCAATTTCT 3000

3001 GAATGGGTGATAAACCTCCGAATCTAGCTAGCGAGATGTATAAAATGCAGTTATCCTCGAGAGATACGAAAACCTTATCTGAGTTGAGATCTAATGCAA 3100
 3001 GAATGGGTGATAAACCTCCGAATCTAGCTAGCGAGATGTATAAAATGCAGTTATCCTCGAGAGATACGAAAACCTTATCTGAGTTGAGATCTAATGCAA 3100

3101 AATCATTTTCAGGACTTAATACCAAGAAAACTATGATCCAGTACCCTTTACGGGTGTGCAATGTCCAGCATACAAGCAACAACCTTGGACTCTTGG 3200
 3101 AATCATTTTCAGGACTTAATACCAAGAAAACTATGATCCAGTACCCTTTACGGGTGTGCAATGTCCAGCATACAAGCAACAACCTTGGACTCTTGG 3200

3201 CCAGTTAGATCAAAGGCAACCTGTAATGATTCGAGCTTGGAAAGCTGGTCTTTAATTAAGAAAGGAGGAATTCACAGCCAGGATGAAGAGGATGTAGCT 3300
 3201 CCAGTTAGATCAAAGGCAACCTGTAATGATTCGAGCTTGGAAAGCTGGTCTTTAATTAAGAAAGGAGGAATTCACAGCCAGGATGAAGAGGATGTAGCT 3300

3301 ACTCAACTAACTCAACTTGCAGCATTAATGAAATCAAACCCGGGCAATCCAGCCGAGAGAATGACATGAAGACATCACTGCTTAACCTAATATCCCAT 3400
 3301 ACTCAACTAACTCAACTTGCAGCATTAATGAAATCAAACCCGGGCAATCCAGCCGAGAGAATGACATGAAGACATCACTGCTTAACCTAATATCCCAT 3400

3401 AGAGGCAAGCAAAAACATAACCAAGATCTGCTGCAGAGAAAAGAAATCTGTATTTTTTAGGCATAACTGCAGCTCCTTACTGTTAAAGCAAAAACAATCAAC 3500
 3401 AGAGGCAAGCAAAAACATAACCAAGATCTGCTGCAGAGAAAAGAAATCTGTATTTTTTAGGCATAACTGCAGCTCCTTACTGTTAAAGCAAAAACAATCAAC 3500

3501 AAATAAAAAAGGAAATGCTGTACCATGGAACCAAGGCACAAAAAAAAGCCTCAAGAAGCAGGCTATCAACAATAATCGAAACCAACTAGAGTTGTTG 3600
 3501 AAATAAAAAAGGAAATGCTGTACCATGGAACCAAGGCACAAAAAAAAGCCTCAAGAAGCAGGCTATCAACAATAATCGAAACCAACTAGAGTTGTTG 3600

3601 TCATGCCAGCAGGTGAGTTACAGACATTTGGATATGATCAAAAAGTGCACAAGCTGGTCAAGCCATGCCACAGGATCCAGAAATAGCTCTGGCTGAAA 3700
 3601 TCATGCCAGCAGGTGAGTTACAGACATTTGGATATGATCAAAAAGTGCACAAGCTGGTCAAGCCATGCCACAGGATCCAGAAATAGCTCTGGCTGAAA 3700

3701 AAAAATCACCGAGAACCAGTACAGAAAGCAGTGAATCAAAAATGCGCTAACATTACAGGAAAAACCTAGGTTGTTCTTCTCAAACACAGATAAAAAAT 3800
 3701 AAAAATCACCGAGAACCAGTACAGAAAGCAGTGAATCAAAAATGCGCTAACATTACAGGAAAAACCTAGGTTGTTCTTCTCAAACACAGATAAAAAAT 3800

3801 CCATAGGTTATCTGAGGTACACAGGAGAAAAAAAAGACAGGTTGTTTGGCTATGAAGTGGTGAATGAGCAAAATCAAAAATGCAGGCTCCAGTGAACCA 3900
 3801 CCATAGGTTATCTGAGGTACACAGGAGAAAAAAAAGACAGGTTGTTTGGCTATGAAGTGGTGAATGAGCAAAATCAAAAATGCAGGCTCCAGTGAACCA 3900

3901 CCAGGCATCGTTCAGGTGAAAAGACGATTTGCTCCGTGTAACCAATATAGTGATCTGCTCCCATAACTCCTCTGTCAGTTTACAGTTGAAAACAGCAT 4000
 3901 CCAGGCATCGTTCAGGTGAAAAGACGATTTGCTCCGTGTAACCAATATAGTGATCTGCTCCCATAACTCCTCTGTCAGTTTACAGTTGAAAACAGCAT 4000

4001 CCTTGTAAACAGACCAAGTAAAACACACAGATGTTTACAGAAAAATGTAATTCCTCAGGTACAGCAAGCAGTGAACGTTGGTCAGACACATCCTTTGCC 4100
 4001 CCTTGTAAACAGACCAAGTAAAACACACAGATGTTTACAGAAAAATGTAATTCCTCAGGTACAGCAAGCAGTGAACGTTGGTCAGACACATCCTTTGCC 4100

4101 TCAAACCTTTTAGTCAGTCTAACCTGAGAGCTGGTGAACATCGCGTGAAGATAAAGCCTATGTCAGCAGGAGTGGTGTGATCAACGGGTAGATCCGAAG 4200
 4101 TCAAACCTTTTAGTCAGTCTAACCTGAGAGCTGGTGAACATCGCGTGAAGATAAAGCCTATGTCAGCAGGAGTGGTGTGATCAACGGGTAGATCCGAAG 4200

4201 TCGCAGATGCTGGCTGTTTCCGTCAGTGGGGTCAGGTGCCAGGCACTGTGGAAGCTCTCAGGAACATGGAGTGTGCAGTGAAGTTACCATCTAACGT 4300
 4201 TCGCAGATGCTGGCTGTTTCCGTCAGTGGGGTCAGGTGCCAGGCACTGTGGAAGCTCTCAGGAACATGGAGTGTGCAGTGAAGTTACCATCTAACGT 4300

4301 CAAGAAGTTTGGGTACTGACCATCCACAGAGCACAGGGCACTCAGGGTGTCTCCAGCAAAAACACACTCAGCAGTTTCTCGAATCACCTATGAAGTT 4400
 4301 CAAGAAGTTTGGGTACTGACCATCCACAGAGCACAGGGCACTCAGGGTGTCTCCAGCAAAAACACACTCAGCAGTTTCTCGAATCACCTATGAAGTT 4400

4401 TCTCGTACTCCTACAAAAATTTAATAGATACACCTACAAAAAAGGACAGTCTGAATGCAACTTGTGACTGTGTTGAGCAAAATATGAGAAAGAT 4500
 4401 TCTCGTACTCCTACAAAAATTTAATAGATACACCTACAAAAAAGGACAGTCTGAATGCAACTTGTGACTGTGTTGAGCAAAATATGAGAAAGAT 4500

4501 GAAGGCCCGTATTACACACACCTCGGGACAGGACCAAGTGTGCTGCTGTGAGAGAAATATGGAAGACAGGTATGGAGCAAAAGGAAGGCGTGTGAGAA 4600
 4501 GAAGGCCCGTATTACACACACCTCGGGACAGGACCAAGTGTGCTGCTGTGAGAGAAATATGGAAGACAGGTATGGAGCAAAAGGAAGGCGTGTGAGAA 4600

4601 TAGAGGTAGTCGTTTATACAGGAAAGGAAGGAAAAAGCTCTCAGGGGTGTCGGATTGCCAAGTGGGTGATACGAAGAAGTGTGATGAGGAGAAGTTGCT 4700
 4601 TAGAGGTAGTCGTTTATACAGGAAAGGAAGGAAAAAGCTCTCAGGGGTGTCGGATTGCCAAGTGGGTGATACGAAGAAGTGTGATGAGGAGAAGTTGCT 4700

4701 ATGCTTGGTACGTCAGGTCGGGGACACCAGTGTGACTGCTGATAGTATTCTCATACTGGCGTGGGAGGGATCCCTCATCTCCTGGCTGATACG 4800
 4701 ATGCTTGGTACGTCAGGTCGGGGACACCAGTGTGACTGCTGATAGTATTCTCATACTGGCGTGGGAGGGATCCCTCATCTCCTGGCTGATACG 4800

4801 CTGTACAAAGAGCTGACGAGAGGCTCAGAAAAATAGGCTGTCCACAGGCGCAGATGTGCACGTAATGAAGACGGTACATGTGATGTACAGGCACTG 4900
 4801 CTGTACAAAGAGCTGACGAGAGGCTCAGAAAAATAGGCTGTCCACAGGCGCAGATGTGCACGTAATGAAGACGGTACATGTGATGTACAGGCACTG 4900

4901 ATCCAGAAACATGTGGAGCATCGTTCTCATTTGGCTGTTCATGGAATGATGATTTCAATGGATGTAATTCGCCAGAGAAGCAAAAACCCAGGAAATTTAG 5000
 4901 ATCCAGAAACATGTGGAGCATCGTTCTCATTTGGCTGTTCATGGAATGATGATTTCAATGGATGTAATTCGCCAGAGAAGCAAAAACCCAGGAAATTTAG 5000

5001 GCTTCTCACTGATGACCTAAACAAGAGGAACTTCTTGAACATAAATTTGCAAACTTTAGCTACTGATGTGGCTCCGGTTTATAAAAAGCTTGCTCCTGAA 5100
 5001 GCTTCTCACTGATGACCTAAACAAGAGGAACTTCTTGAACATAAATTTGCAAACTTTAGCTACTGATGTGGCTCCGGTTTATAAAAAGCTTGCTCCTGAA 5100

5101 GCTTCCAGAAACAGGTGAAAAATGAACACATGGGCCAGACTGTGGCTTGGATCCAAGGACGGTAGGCCCTTCTCTGGTGTACAGCTTGCATAGATT 5200
 5101 GCTTCCAGAAACAGGTGAAAAATGAACACATGGGCCAGACTGTGGCTTGGATCCAAGGACGGTAGGCCCTTCTCTGGTGTACAGCTTGCATAGATT 5200

5201 TTTGTGCCATGCCATAAAGGACACACATAACATGCACAATGGAAGCACTGTGGTCTGTACATTAAACAAGGAGGACAACCCGAGAGTGGGGTGTATCC 5300
 5201 TTTGTGCCATGCCATAAAGGACACACATAACATGCACAATGGAAGCACTGTGGTCTGTACATTAAACAAGGAGGACAACCCGAGAGTGGGGTGTATCC 5300

5301 AAGTGATGAGCAGCTCCATGTGTTACCTCTACAAAAATTTACAAAACAGATGAAATTTGGCACTGAAGAGGGATTGGAAGCTAAGATAAAAGCCGGAGCC 5400
 5301 AAGTGATGAGCAGCTCCATGTGTTACCTCTACAAAAATTTACAAAACAGATGAAATTTGGCACTGAAGAGGGATTGGAAGCTAAGATAAAAGCCGGAGCC 5400

5401 ATACAGGTGCTCAGAGCTTTCCAGAGAAGTACGGATGTTAGCCGAGCCTCTGAGAGCTACAAAAGAAAAAGAAACCTGACACAAGGAGGACCCGAGGTG 5500
 5401 ATACAGGTGCTCAGAGCTTTCCAGAGAAGTACGGATGTTAGCCGAGCCTCTGAGAGCTACAAAAGAAAAAGAAACCTGACACAAGGAGGACCCGAGGTG 5500

Cloned	5501	AAAAGCAGCAATTAGTGGATAAAGAAATATTCAACACCAATAAAACTGAAAACCTGAAGCGCCAGAAAAATCTCAGTAACACTTTGCATTGCTTAGGGAACAA	5800
NCBI database	5501	AAAAGCAGCAATTAGTGGATAAAGAAATATTCAACACCAATAAAACTGAAAACCTGAAGCGCCAGAAAAATCTCAGTAACACTTTGCATTGCTTAGGGAACAA	5800
	5801	AGCAGATGCTTTAAAACCTGGGATTAAGAGGAGACTTCTGATCAGCTCTGTGGCATGAAACATACTTCAAACAGTAGAAAAATTTGCTCCCTATTAAAA	5700
	5801	AGCAGATGCTTTAAAACCTGGGATTAAGAGGAGACTTCTGATCAGCTCTGTGGCATGAAACATACTTCAAACAGTAGAAAAATTTGCTCCCTATTAAAA	5700
	5701	CAGTATACGGCTTCCCCGCCCTTTTAAAGGTGGATAGTTTACATCCTTATTTCATCGTTAGCACATAAGCCTGGAATAACAGCAGTGACTAATATTCAACAAG	5800
	5701	CAGTATACGGCTTCCCCGCCCTTTTAAAGGTGGATAGTTTACATCCTTATTTCATCGTTAGCACATAAGCCTGGAATAACAGCAGTGACTAATATTCAACAAG	5800
	5801	ATTTTTCAGTTCCCTACGGGTATTTTGAATGCAGTAGTAAGCAACCTCAGGTGACACCTTATATTAATTGTAAGAACTTTGATGTGTCTGTCAAAGATTA	5900
	5801	ATTTTTCAGTTCCCTACGGGTATTTTGAATGCAGTAGTAAGCAACCTCAGGTGACACCTTATATTAATTGTAAGAACTTTGATGTGTCTGTCAAAGATTA	5900
	5901	TACTGGAATTTTTCGTAATGATAAGATGAACGGTGTGCCGCCAATTCTTCCAGAGGTCACCTGCTCCAGGCCCCCGAGCCACAAAAGACCCCTGCCCAGT	6000
	5901	TACTGGAATTTTTCGTAATGATAAGATGAACGGTGTGCCGCCAATTCTTCCAGAGGTCACCTGCTCCAGGCCCCCGAGCCACAAAAGACCCCTGCCCAGT	6000
	6001	ATACTTGAACATCAGCCAGACAAGCAGAATTGTCAGCCTCAGTCAGACAGTTCCTCTTCTTCAACAGATGATCAGCTCTTGGCATTTGTGGGTACCGTTAA	6100
	6001	ATACTTGAACATCAGCCAGACAAGCAGAATTGTCAGCCTCAGTCAGACAGTTCCTCTTCTTCAACAGATGATCAGCTCTTGGCATTTGTGGGTACCGTTAA	6100
	6101	GCTCTCCAGCAAAGGACGCGAGTTGGAATGAAGCCGACTGTTCCACAGATGCCCCTGGAAAAGGGTAGCTCCCATCGAGAACAGATGTGTGATTTTGA	6200
	6101	GCTCTCCAGCAAAGGACGCGAGTTGGAATGAAGCCGACTGTTCCACAGATGCCCCTGGAAAAGGGTAGCTCCCATCGAGAACAGATGTGTGATTTTGA	6200
	6201	CTGCACTGACGAAAAAGCAAAACAGTGCCTGGGACAACCGACTGACTCTGAAGAAAAAGCTGAGGAAATGTGGTCAGACAGCGAGCACAACCTTTTGGAT	6300
	6201	CTGCACTGACGAAAAAGCAAAACAGTGCCTGGGACAACCGACTGACTCTGAAGAAAAAGCTGAGGAAATGTGGTCAGACAGCGAGCACAACCTTTTGGAT	6300
	6301	GATGACATCGGGGGCGTCGCTGTGGCACCTTCTCATGGTTCTATCCTAATCGAATGTGCGAGACGTGAACCTCCATGCTACCCACCTATTAAAGAAACCCA	6400
	6301	GATGACATCGGGGGCGTCGCTGTGGCACCTTCTCATGGTTCTATCCTAATCGAATGTGCGAGACGTGAACCTCCATGCTACCCACCTATTAAAGAAACCCA	6400
	6401	ACCGCAATCATCCCACGGGATCTCCTTAGTATTCTACCAACACAAAAATTTAAATGAGCCAAAAACATGGTTTAGCCATGTGGGAAGCAAAGATGGCTGA	6500
	6401	ACCGCAATCATCCCACGGGATCTCCTTAGTATTCTACCAACACAAAAATTTAAATGAGCCAAAAACATGGTTTAGCCATGTGGGAAGCAAAGATGGCTGA	6500
	6501	GAGGGCGAAAGAAAAAGAAAAAGAAAGCAGAAAGATTAGGAACAGAGAACACTGAACTGAACTCCAGCAGCAGGAAAAACAAAGCAAACAAGTAAAAACAGA	6600
	6501	GAGGGCGAAAGAAAAAGAAAAAGAAAGCAGAAAGATTAGGAACAGAGAACACTGAACTGAACTCCAGCAGCAGGAAAAACAAAGCAAACAAGTAAAAACAGA	6600
	6601	GAGATTTTTTATGAGGACAATGAGTTCAACCAAATTCATCAGCGAGAGCATTAAACAGTAACTAAAGATAACGTAAATACAGTATCTTCTTATGCCCTTA	6700
	6601	GAGATTTTTTATGAGGACAATGAGTTCAACCAAATTCATCAGCGAGAGCATTAAACAGTAACTAAAGATAACGTAAATACAGTATCTTCTTATGCCCTTA	6700
	6701	CGCGAGTTGCAGGGCCTTACAACCATTGGGCATAG	
	6701	CGCGAGTTGCAGGGCCTTACAACCATTGGGCATAG	

図2.1. ニワトリTET遺伝子のクローニング

A: *cTET1* のヌクレオチド配列を、本章でクローン化したものとNCBIのデータベース上の配列 (*cTET1*: XM_015278732) との間で比較した。また、ヌクレオチドの変異は黒で示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

B

Cloned 1 ATGGAACAGGACAGAACCATCCATGTTGACGGCAATAGATTGAGTCCATTTTAAATATCACAACTTCTCACATTTGCCAGGCAGACCCCTTCTGCAGTGA 100

NCBI database 1 ATGGAACAGGACAGAACCATCCATGTTGACGGCAATAGATTGAGTCCATTTTAAATATCACAACTTCTCACATTTGCCAGGCAGACCCCTTCTGCAGTGA 100

101 AGCTACAGAACCGGAAGTCCAGCAACAGAGAGGCCCTGAGGTGCAAGTCAACGGCAACCACAAGCGGGTGTTCATTAAGAGCAACTACAGAGAGCCCCACGC 200

101 AGCTACAGAACCGGAAGTCCAGCAACAGAGAGGCCCTGAGGTGCAAGTCAACGGCAACCACAAGCGGGTGTTCATTAAGAGCAACTACAGAGAGCCCCACGC 200

201 AAAGGGAAGCCCAAAACCCAGCATTAGCCCTGACCTTTTACAAGAGAAGAAAGCATGCTCCATATATATGCAAAATGGTGGGATAAAACGCACCTTTTAGT 300

201 AAAGGGAAGCCCAAAACCCAGCATTAGCCCTGACCTTTTACAAGAGAAGAAAGCATGCTCCATATATATGCAAAATGGTGGGATAAAACGCACCTTTTAGT 300

301 GAGCCCTCTCTGTTTGGACTTCAACAGAGCAAGAAAGTGAACAAGACAAGAGGTAATGGAAGAAAAGCTGAGCCAGAGGATAACTATGAACACCCAA 400

301 GAGCCCTCTCTGTTTGGACTTCAACAGAGCAAGAAAGTGAACAAGACAAGAGGTAATGGAAGAAAAGCTGAGCCAGAGGATAACTATGAACACCCAA 400

401 GCATCTCCAATTGCTACAGTGAGAAGAAATCTGAGATGGGACAAGAAAATGAAGCTTTGGAGTTGATGCCGTCAACAAGATACAACAGTGGTGGTTCAGA 500

401 GCATCTCCAATTGCTACAGTGAGAAGAAATCTGAGATGGGACAAGAAAATGAAGCTTTGGAGTTGATGCCGTCAACAAGATACAACAGTGGTGGTTCAGA 500

501 AGACCCCTCGTGAACCTCCTGATTCAGGATGAGCAGGAGGGGGAAACATTAATGCCACAACAGGGACATTTGCTTACTACTCAAGAAACAAGGCGGTGCCA 600

501 AGACCCCTCGTGAACCTCCTGATTCAGGATGAGCAGGAGGGGGAAACATTAATGCCACAACAGGGACATTTGCTTACTACTCAAGAAACAAGGCGGTGCCA 600

601 ATGCCTAATGGTGTACAGTTTCTGCCTCTTCCATGGACAGCATGCATGGTGAACCTCCTGGAGAAAACACTGTCTCAATATTTATCCAGAACATGTTTCCA 700

601 ATGCCTAATGGTGTACAGTTTCTGCCTCTTCCATGGACAGCATGCATGGTGAACCTCCTGGAGAAAACACTGTCTCAATATTTATCCAGAACATGTTTCCA 700

701 TAGCAATGCAGAAGAAGACATCTCATATCAATGCCATTACCAGTCAGGCTACTAATGAGTTGTCCCAGGAGACAACGCATTCATCCCACCTCAGGGCA 800

701 TAGCAATGCAGAAGAAGACATCTCATATCAATGCCATTACCAGTCAGGCTACTAATGAGTTGTCCCAGGAGACAACGCATTCATCCCACCTCAGGGCA 800

801 GATCACTTCCCAGAGACCTCAAACCTCTGAGTGCCTCAAGTGCAGCTGTAGTGGTACTGAGGTTACGGTGTGATGACTCCAGTAAGCCACCTGTGTA 900

801 GATCACTTCCCAGAGACCTCAAACCTCTGAGTGCCTCAAGTGCAGCTGTAGTGGTACTGAGGTTACGGTGTGATGACTCCAGTAAGCCACCTGTGTA 900

901 TTGCCAGGTAGCTGTTCACTTCAGAAACCCAGAAGTACAGCTACAGGAGAGATTCAGGGTATGATACACACCGGTTACCTTAGGAAACAGTGTCTTTC 1000

901 TTGCCAGGTAGCTGTTCACTTCAGAAACCCAGAAGTACAGCTACAGGAGAGATTCAGGGTATGATACACACCGGTTACCTTAGGAAACAGTGTCTTTC 1000

1001 ATGGAAGCGTAGGGCAGGTTCCCAATCAAGACCTCTCTCTAAGTTCCAGCAGTAACCTGCAAGCTCAGAATGCTGCATCAGAAAGGTTTCTGAGCAAGC 1100

1001 ATGGAAGCGTAGGGCAGGTTCCCAATCAAGACCTCTCTCTAAGTTCCAGCAGTAACCTGCAAGCTCAGAATGCTGCATCAGAAAGGTTTCTGAGCAAGC 1100

1101 AGAGAAAATGGTGCTTTCTTTACACAGAAGTCAATGTTTCAACAAGATTCTCAACTCCTCCTGCTCCAGAAATGAACAGTGCATGTCGGTCAATGGTG 1200

1101 AGAGAAAATGGTGCTTTCTTTACACAGAAGTCAATGTTTCAACAAGATTCTCAACTCCTCCTGCTCCAGAAATGAACAGTGCATGTCGGTCAATGGTG 1200

1201 CGAGAAGGATGCCATTCCATGACAACAGATGCAATGAAACTCTTCTCGGAGAGATCAAGAACGAAGGGCAACATCAGGGACCAATGCCAGAAAGTCCCG 1300

1201 CGAGAAGGATGCCATTCCATGACAACAGATGCAATGAAACTCTTCTCGGAGAGATCAAGAACGAAGGGCAACATCAGGGACCAATGCCAGAAAGTCCCG 1300

1301 GCCTCAGCCAAACAGCAACTTCAACCCAGCAAGGGCTTCCGGCAGCAGGTGCAAAAGCTCGCAGGACAAAAGTCAAGCCACAGGATCCCCGAGCTGCTGCAGC 1400

1301 GCCTCAGCCAAACAGCAACTTCAACCCAGCAAGGGCTTCCGGCAGCAGGTGCAAAAGCTCGCAGGACAAAAGTCAAGCCACAGGATCCCCGAGCTGCTGCAGC 1400

1401 CGCTCCATTCAAGAGCACCCGAGAAGAAATGCGCGCGCGCCATCAGAGCTCCCTCCAAAACCTGCATGGTGGGAAGGGATGGTGGTGGCTCAA 1500

1401 CGCTCCATTCAAGAGCACCCGAGAAGAAATGCGCGCGCGCCATCAGAGCTCCCTCCAAAACCTGCATGGTGGGAAGGGATGGTGGTGGCTCAA 1500

1501 CTGTGTGAGCGTTTCCCAGGACAGAGAGAAGTCCCTCCTGACAAGAAAAGGACCAAGTGAAGAGTCTGTGCAACAGGCTCAGGGTACTCAA 1600

1501 CTGTGTGAGCGTTTCCCAGGACAGAGAGAAGTCCCTCCTGACAAGAAAAGGACCAAGTGAAGAGTCTGTGCAACAGGCTCAGGGTACTCAA 1600

1601 AGCCAGCCTGGATAGAATGGTTTCCAGCGCGTTCCGGCAGGGAGAGCTTCCCACAAGCCAAACGAAGATTACTGGGATCAATCTTCAGTACCAGGC 1700

1601 AGCCAGCCTGGATAGAATGGTTTCCAGCGCGTTCCGGCAGGGAGAGCTTCCCACAAGCCAAACGAAGATTACTGGGATCAATCTTCAGTACCAGGC 1700

1701 AAATACATCCAAAGCAGCTTATATGAAACAGTATGCTGGAAGTCTGATGCATTAAGAGGGCCGTCGGGACAGCCCAAGGCCAGAGATAATGCAACAA 1800

1701 AAATACATCCAAAGCAGCTTATATGAAACAGTATGCTGGAAGTCTGATGCATTAAGAGGGCCGTCGGGACAGCCCAAGGCCAGAGATAATGCAACAA 1800

1801 GAACAAATCCCTCGCAGTACAAAAGCGAGAGCTCCAGATGCAGCAGCATCCACAGCTGACCTGCAGCTGCTGTTCCAAAAGCACTCACCGCAGCCAC 1900

1801 GAACAAATCCCTCGCAGTACAAAAGCGAGAGCTCCAGATGCAGCAGCATCCACAGCTGACCTGCAGCTGCTGTTCCAAAAGCACTCACCGCAGCCAC 1900

1901 AGCTCACAAGATGGATTCCCTGCTCAAGTCCCGAGTGCAGCAACACCCCTCCACAGCAGCTCCATTTCCAGCAACAACCTGAAACAACAACCTGAACAGCC 2000

1901 AGCTCACAAGATGGATTCCCTGCTCAAGTCCCGAGTGCAGCAACACCCCTCCACAGCAGCTCCATTTCCAGCAACAACCTGAAACAACAACCTGAACAGCC 2000

2001 TTTAGGGGCCCGCGTGAACAGCAGCAGCTTGAATCCCAAGCCAGGGGAAAGTGAACAGTCTTGCATTCACACATTTTGCAACAGATGGTCCAAAAGCAG 2100

2001 TTTAGGGGCCCGCGTGAACAGCAGCAGCTTGAATCCCAAGCCAGGGGAAAGTGAACAGTCTTGCATTCACACATTTTGCAACAGATGGTCCAAAAGCAG 2100

2101 ACACAGGAGACACAGATGCTGTGCAGTCCGACGTAAC TCCAACAGCAGCAACAGGCTCTGCAATGAAAAGTAAAGAACCAGCCCAACTATTCCCCACT 2200

2101 ACACAGGAGACACAGATGCTGTGCAGTCCGACGTAAC TCCAACAGCAGCAACAGGCTCTGCAATGAAAAGTAAAGAACCAGCCCAACTATTCCCCACT 2200

2201 CCCAAAGCAACGCGGAGCAGCAGCAGCAGACAGGACATCCTTCAGTCAAGCCAAAGCAGATGAGTGCCTTCAAACCGGGAATAGTACATGAAACCAACCGC 2300

2201 CCCAAAGCAACGCGGAGCAGCAGCAGCAGCAGACAGGACATCCTTCAGTCAAGCCAAAGCAGATGAGTGCCTTCAAACCGGGAATAGTACATGAAACCAACCGC 2300

2301 ATTCCCCTGCATAGCCCTCAGCAAGGGCTAGAGCAGGTACAGAGCATGAACAACAAAACCTCCCTTTACAGCCAGAAAACAAGCAGCTGGTCTGCAGCAT 2400

2301 ATTCCCCTGCATAGCCCTCAGCAAGGGCTAGAGCAGGTACAGAGCATGAACAACAAAACCTCCCTTTACAGCCAGAAAACAAGCAGCTGGTCTGCAGCAT 2400

2401 CCCTGCCAAACAACGTCGACTTGATGTGACAGAGAAGCGGAAATGCCGCAAACTTTGAACACTTCGGAGCCAAACAAGCGCGTGACTTGAACAACGCTGC 2500

2401 CCCTGCCAAACAACGTCGACTTGATGTGACAGAGAAGCGGAAATGCCGCAAACTTTGAACACTTCGGAGCCAAACAAGCGCGTGACTTGAACAACGCTGC 2500

2501 AGTATTTCTCAAAATAACTTGCCCCCAAGCAAGATGTGAATCACTGTTTTCAAGAGCAAGAGCAACAGAGCCAAACAAGCTTCAGTTATACAGCTGCCACA 2600

2501 AGTATTTCTCAAAATAACTTGCCCCCAAGCAAGATGTGAATCACTGTTTTCAAGAGCAAGAGCAACAGAGCCAAACAAGCTTCAGTTATACAGCTGCCACA 2600

2601 AGGCTATGGTGGTAGCCTCAGTCAAGTCCCGGTCGCAACAGCCGCAAGATGCCAGCAGGAGTAAAGTGGGACAGCCAGCAAACTCCTGCACACTCA 2700

2601 AGGCTATGGTGGTAGCCTCAGTCAAGTCCCGGTCGCAACAGCCGCAAGATGCCAGCAGGAGTAAAGTGGGACAGCCAGCAAACTCCTGCACACTCA 2700

```

Cloned      5501  ATGCAACGACCCCGCTGAAAAACCCCAACAGGAACCATCCACCCAGAATATCCGTTGTCTTTTACCAGGACAAGAGCATGAACGAGCCAAAACAGGGGCT 5600
          *****
NCBI database 5501  ATGCAACGACCCCGCTGAAAAACCCCAACAGGAACCATCCACCCAGAATATCCGTTGTCTTTTACCAGGACAAGAGCATGAACGAGCCAAAACAGGGGCT 5600
          *****
5601  GGCTCTGTGGGAGGCAAAGATGGCTGAGAAGGCAAGAGAGAAGGAGGAGGAATGTGAAAAATACGGTCCAGACTACGTGCCTCAGAAATCTTACGGCAA 5700
          *****
5601  GGCTCTGTGGGAGGCAAAGATGGCTGAGAAGGCAAGAGAGAAGGAGGAGGAATGTGAAAAATACGGTCCAGACTACGTGCCTCAGAAATCTTACGGCAA 5700
          *****
5701  AAAGCAAAGCGAGAGCCTGCTGAGCCACACGAAACCCTCAGAACCAACGTACCTGCGCTTCATCAAGTCTCTTGCACAAAGGACACTGTGGGTCACCCAG 5800
          *****
5701  AAAGCAAAGCGAGAGCCTGCTGAGCCACACGAAACCCTCAGAACCAACGTACCTGCGCTTCATCAAGTCTCTTGCACAAAGGACACTGTGGGTCACCCAG 5800
          *****
5801  ACTCCACAGTAACACTACATCTCCATATGCCTTTACACGGGTTACAGGGCCTTAGAACAGATACATCTAA
          *****
5801  ACTCCACAGTAACACTACATCTCCATATGCCTTTACACGGGTTACAGGGCCTTAGAACAGATACATCTAA

```

図2.1. ニワトリTET遺伝子のクローニング

B: *cTET2* のヌクレオチド配列を、本章でクローン化したものとNCBIのデータベース上の配列 (*cTET2*: NM_001277794) との間で比較した。また、ヌクレオチドの変異は黒で示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

Cloned	2701	AAGTCTGTGCGGCAGAGACAGCTGGAAGCAAAGAAAGCCGACGAGAGAAGAAGAAACTGCAGAAAGGAGAAGCTGATGACACCAGAGAAGATCAAGCAAG	2800
NCBI database	2698	AAGTCTGTGCGGCAGAGACAGCTGGAAGCAAAGAAAGCCGACGAGAGAAGAAGAAACTGCAGAAAGGAGAAGCTGATGACACCAGAGAAGATCAAGCAAG	2797
	2801	AAGCACTCGAACTTCTACACTCCAGCAGAATGCAGGTATGGCGTTGAAAGTGGGCTCCCCACAGCCGCTGAAACCTTCATCAAAAGTGGAGCCGCA	2900
	2798	AAGCACTCGAACTTCTACACTCCAGCAGAATGCAGGTATGGCGTTGAAAGTGGGCTCCCCACAGCCGCTGAAACCTTCATCAAAAGTGGAGCCGCA	2897
	2901	GAGCCATTACAACGCCCTCAAAGTACAAGGCCAATGCGGTGGTGGAGAGCTACTCGGTGCTGGGACGCTGCCGGCCCTCCGACCTTACAGCATGAACAGT	3000
	2898	GAGCCATTACAACGCCCTCAAAGTACAAGGCCAATGCGGTGGTGGAGAGCTACTCGGTGCTGGGACGCTGCCGGCCCTCCGACCTTACAGCATGAACAGT	2997
	3001	GTTTACTCTTACCATTCTACTATGCACAGCCCAATCTGCCTTCGCTGAACGGGTTTCATTCCAAGTTCACGCTGCCCTCCTTTGGGTATTACGGTTTTT	3100
	2998	GTTTACTCTTACCATTCTACTATGCACAGCCCAATCTGCCTTCGCTGAACGGGTTTCATTCCAAGTTCACGCTGCCCTCCTTTGGGTATTACGGTTTTT	3097
	3101	CCAACAACCCAGTGTTCGCCCTCGCAGTTCTGTAATACGGGGTGCCCGAGAGGGGTGAGAGCTGGTGAGCAACAGCTACGAGAAGAAGCCCAACATTCA	3200
	3098	CCAACAACCCAGTGTTCGCCCTCGCAGTTCTGTAATACGGGGTGCCCGAGAGGGGTGAGAGCTGGTGAGCAACAGCTACGAGAAGAAGCCCAACATTCA	3197
	3201	GGTGTGGAGGAGAACCCTCAACCATACGTACAGGAACACGGATTTCGCCGAGCCCATGCCACACAGGCTCCGGAGCAAAAACCATCACCAGGGACCTAC	3300
	3198	GGTGTGGAGGAGAACCCTCAACCATACGTACAGGAACACGGATTTCGCCGAGCCCATGCCACACAGTGTCCGGAGCAAAAACCATCACCAGGGACCTAC	3297
	3301	GAGCGGGCCAGCCGCTATGCCAGCCAGCAGAAAGCGGCTGCGGCGGGGTGCACAGGACTAGCACAGGCTCGGAGGAGGCATCGCCATTGCACAGAACT	3400
	3298	GAGCGGGCCAGCCGCTATGCCAGCCAGCAGAAAGCGGCTGCGGCGGGGTGCACAGGACTAGCACAGGCTCGGAGGAGGCATCGCCATTGCACAGAACT	3397
	3401	GTTTTGGCAGCAGGACCATCAAGCAGGAGCCCGGGACCCCGCCAGCAATCGAGCCCTAAACAACCCCGCAGCGGCGGTACCCGGCACCGGTCTGGC	3500
	3398	GTTTTGGCAGCAGGACCATCAAGCAGGAGCCCGGGACCCCGCCAGCAATCGAGCCCTAAACAACCCCGCAGCGGCGGTACCCGGCACCGGTCTGGC	3497
	3501	TCTGCCTGCTGTCCCGTACCGGAGCAGCAGTGGAGTCCCTACAAGGGTCAATCCGAGGTTCTGCTTCCCGGAGCAGACTGGTGGCGCCGACAGCTCG	3600
	3498	TCTGCCTGCTGTCCCGTACCGGAGCAGCAGTGGAGTCCCTACAAGGGTCAATCCGAGGTTCTGCTTCCCGGAGCAGACTGGTGGCGCCGACAGCTCG	3597
	3601	TGGAGCAGCCTGGTGCCGGGTGCCGGAGGACGGGAGAAGCTGAGCGCCTTCGATGCCGCCGTGCCCTGCCGCTGCCGGAGAAGCAGTGGCCCAACGTCC	3700
	3598	TGGAGCAGCCTGGTGCCGGGTGCCGGAGGACGGGAGAAGCTGAGCGCCTTCGATGCCGCCGTGCCCTGCCGCTGCCGGAGAAGCAGTGGCCCAACGTCC	3697
	3701	TGGCAGGAGAAGCGTCTGCTGCTGCGGTTCCAGCTTCTGCTGCCGAAGCCGTGGAGCCCTGCAAGCTGGGGGAGACGGTGTGGGGGTGCGGGGTACCC	3800
	3698	TGGCAGGAGAAGCGTCTGCTGCTGCGGTTCCAGCTTCTGCTGCCGAAGCCGTGGAGCCCTGCAAGCTGGGGGAGACGGTGTGGGGGTGCGGGGTACCC	3797
	3801	GACCCGTGGGGACAAGGGCTGGGAAGCTGGGACCGTGGGCTTCGGCTGCGCCCTGCCGGAGCTGCCGCTTCTCCGAAGAGCCATGGGGGTCCGGCAAG	3900
	3798	GACCCGTGGGGACAAGGGCTGGGAAGCTGGGACCGTGGGCTTCGGCTGCGCCCTGCCGGAGCTGCCGCTTCTCCGAAGAGCCATGGGGGTCCGGCAAG	3897
	3901	GCGGAGGAGCGGAGGACGCCGGCCCGCTGGCGGGGTGCCCGAAAAGCCGTGGGAGGCGCGGTGCGTGAGAAAGGGGACGCGGGGTCCGCCGGGAGA	4000
	3898	GCGGAGGAGCGGAGGACGCCGGCCCGCTGGCGGGGTGCCCGAAAAGCCGTGGGAGGCGCGGTGCGTGAGAAAGGGGACGCGGGGTCCGCCGGGAGA	3997
	4001	AGCCGTGGGATCCCTTTGGGCTGGAGGAGGGCGTCGAGGAGGCGTCGGTGAAGGCGGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGAAGAGGAGGAGGAGGAGA	4100
	3998	AGCCGTGGGATCCCTTTGGGCTGGAGGAGGGCGTCGAGGAGGCGTCGGTGAAGGCGGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGAAGAGGAGGAGGAGGAGA	4097
	4101	GGAGTGGTCGGACAGCGAGCAAACTTCTGGACGAGAACAATCGGTGGCGTGGCCGTGGCCGCGCGGACGGCTCCATCCTCATCGAGTGGCCCGCCGC	4200
	4098	GGAGTGGTCGGACAGCGAGCAAACTTCTGGACGAGAACAATCGGTGGCGTGGCCGTGGCCGCGCGGACGGCTCCATCCTCATCGAGTGGCCCGCCGC	4197
	4201	GAGCTGCACGCCACCACCCGCTGAAGAAACCCACCCGCTGCCACCCACCCGCAATCTCCCTGGTCTTCTACCAACACAAGAACTTGAACACGCCCAACC	4300
	4198	GAGCTGCACGCCACCACCCGCTGAAGAAACCCACCCGCTGCCACCCACCCGCAATCTCCCTGGTCTTCTACCAACACAAGAACTTGAACACGCCCAACC	4297
	4301	ACGGCTGGCGCTGTGGGAGGCCAAGATGAAGCAGCTGGCGGAGCGCGCCCGCGCGCGGACAGGAGGAGGCGGCGGCTGGGGTGCAGCAGGACGCCAA	4400
	4298	ACGGCTGGCGCTGTGGGAGGCCAAGATGAAGCAGCTGGCGGAGCGCGCCCGCGCGGACAGGAGGAGGCGGCGGCTGGGGTGCAGCAGGACGCCAA	4397
	4401	GGCCTTCGCCAAGAAGCGCAAGTGGGGCGGCGCTGGCGGCGAGCGCGCCACCAAGGAGCGGAGGAACCGGGTCCCCACGCGGACGGGTGGCCATC	4500
	4398	GGCCTTCGCCAAGAAGCGCAAGTGGGGCGGCGCTGGCGGCGAGCGCGCCACCAAGGAGCGGAGGAACCGGGTCCCCACGCGGACGGGTGGCCATC	4497
	4501	CCCACCAACTCCGCCATCACTGTGTCTCCTACCGCTACACCAAGGTGACGGGGCCCTACAGCCGCTGGGTCTGA	
	4498	CCCACCAACTCCGCCATCACTGTGTCTCCTACCGCTACACCAAGGTGACGGGGCCCTACAGCCGCTGGGTCTGA	

図2.1. ニワトリTET遺伝子のクローニング

C: *cTET3* のヌクレオチド配列を、本章でクローン化したものとNCBIのデータベース上の配列 (*cTET3*: XM_015297468.1.) との間で比較した。また、ヌクレオチドの変異は黒で、挿入は赤でそれぞれ示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
 Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.
Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

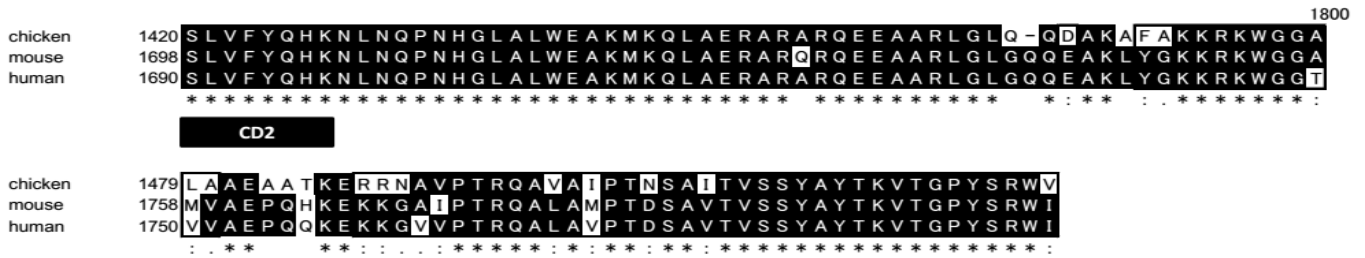


図2.1. ニワトリTET遺伝子のクローニング

F: 本章でクローン化したニワトリTET3のアミノ酸配列の相同性を、NCBIデータベース上のマウスおよびヒトのTET3タンパク質のアミノ酸配列と比較した。また、解析には以下のデータベース上の配列を用いた。(hTET3: NP_001274420.1, mTET3: NP_001334242.1.)

アミノ酸配列のアライメントには以下のソフトウェアを用いた。
Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.
Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

chicken NCBI 855 VLPLYKMSSTDEFGSEENQNAKVGSGAIQVLTSPREVRKLPEPAKSCRQRQLEAKKAAA 1020
chicken Cloned 856 VLPLYKMSSTDEFGSEENQNAKVGSGAIQVLTSPREVRKLPEPAKSCRQRQLEAKKAAA
quail 939 VLPLYKMSSTDEFGSEENQNAKVGSGAIQVLTSPREVRKLPEPAKSCRQRQLEA**R**KAAA

chicken NCBI 915 EKKKLQKEKLMTPEDIKQEALPTLQQNAGMALKSGLPQPLKPSIKVEPQSHYNAFKY 1080
chicken Cloned 916 EKKKLQKEKLMTPEDIKQEALPTLQQNAGMALKSGLPQPLKPSIKVEPQSHYNAFKY
quail 999 EKKKLQKEKLMTPEDIKQEALPTLQ**E**NAGM**P**LKSGL**T**QPLKPSIKVEPQSHYNAFKY

chicken NCBI 975 NGNAVVESYSVLGSCRPSDPYSMNSVYSYHSYYAQP NLPSVNGFHSKFTLPSFGYYGFSN 1140
chicken Cloned 976 NGNAVVESYSVLGSCRPSDPYSMNSVYSYHSYYAQP NLPSVNGFHSKFTLPSFGYYGFSN
quail 1059 NGNAVVESYSVLGSCRPSDPYSMNSVYSYHSYYAQP NLPSVNGFHSKFTLPSFGYYGFSN

chicken NCBI 1035 NHVFP SQFLNYGVPERGESWVSNSYEKKPNIQVLQENLNHTYRNTDFPEPIPHSVRSKNH 1200
chicken Cloned 1036 NHVFP SQFLNYGVPERGESWVSNSYEKKPNIQVLQENLNHTYRNTDFPEPIPHSVRSKNH
quail 1119 NHVFP SQFLNYGVPERGESWVSNSYEKKPNIQVLQENLNHTYRNTDFPEPIPHSVRSKNH

chicken NCBI 1095 HQRTYERASRYASQQKAAAAGVHRTSTGSEEEASPF AQNCFGSRTIKQEPDPPPSIEPLN 1260
chicken Cloned 1096 HQRTYERASRYASQQKAAAAGVHRTSTGSEEEASPF AQNCFGSRTIKQEPDPPPSIEPLN
quail 1179 HQRTYERAN**R**YASQQKAAAAGVHRT**S**MGSEEEASPF AQN**C**FG**N**R**A**IKQEPDPPPSIEPLN

chicken NCBI 1155 NPAAAVPGTGLALPAVPVPEQQWSPYKASSRGSSSPEQTGAADSSWSSLVPGAGGREKLS 1320
chicken Cloned 1156 NPAAAVPGTGLALPAVPVPEQQWSPYKASSRGSSSPEQTGAADSSWSSLVPGAGGREKLS
quail 1239 NP**T**AAVPGTGL**P**LPAVPVPEQQWSPYKASSRGSSSPE**R**T**S**AA**E**SSWSSLVPGAGGREKLS

chicken NCBI 1215 AFDAAVRLPLPEKQWPVNLAGEASSSCGSSLLPKPWSPCKLGETVLGGAGTPTLRDKGWE 1380
chicken Cloned 1216 AFDAAVRLPLPEKQWPVNLAGEASSSCGSSLLPKPWSPCKLGETVLGGAGTPTLRDKGWE
quail 1299 AFDAAVRLPLPEKQWPV**N**AGEASSSC**S**SLLPKPWSPCKLGETVLG**R**AGTPTLRDKG**D**

chicken NCBI 1274 LGPLGFGSALPELPVFSEEPWGSKAEER RTPAPVAGLPEKPWEAA - VREKGAAGVRREK 1440
chicken Cloned 1275 LGPLGFGSALPELPVFSEEPWGSKAEER RTPAPVAGLPEKPWEAA - VREKGAAGVRREK
quail 1358 LGPLGFGSALPELPVFSEEPWGS**S**KA**E**G**G**RTAPVAGL**A**EKPWEAA**T**VREKGAAGVRREK

chicken NCBI 1334 PWDPFGLEEGVEEASVKAVKEEEEEEEEEEEWSDSEHNFLDENIGGVAVAPAHGSI L 1500
chicken Cloned 1335 PWDPFGLEEGVEEASVKAVKEEEEEEEEEEEWSDSEHNFLDENIGGVAVAPAHGSI L
quail 1418 PWDPFGLEEGVEEA**A**VKAVKEEEEEEEEEEEWSDSEHNFLD**D**IGGVAVAP**S**HGSI L

chicken NCBI 1394 IECARRELHATTPLKKNRCHPTRISLVFYQHKNLNQPNHGLALWEAKMKQLAERARARQ 1560
chicken Cloned 1395 IECARRELHATTPLKKNRCHPTRISLVFYQHKNLNQPNHGLALWEAKMKQLAERARARQ
quail 1478 IECARRELHATTPLKKNR**N**HPTRI SLV FYQHKNLNQPNHGLALWEAKMKQLAERARARQ

chicken NCBI 1454 EEAARLGLQQDAKAF AKKRKWGGALAAEAATKERRNAVPTRQAVAIPTNSAITVSSYAYT 1620
chicken Cloned 1455 EEAARLGLQQDAKAF AKKRKWGGALAAEAATKERRNAVPTRQAVAIPTNSAITVSSYAYT
quail 1538 EEAARLGLQQDAKAF AKKRKWGGALAAEAATKERRNAVPTRQAVAIPTNSAITVSSYAYT

chicken NCBI 1514 KVTGPYSRWV
chicken Cloned 1515 KVTGPYSRWV
quail 1598 KVTGPYSRWV

図2.1. ニワトリTET遺伝子のクローニング

G: TET3のアミノ酸配列を、本章でクローン化したものと、NCBIデータベース上のニワトリTET3 (cTET3: XP_015152954.1) およびウズラTET3 (ウズラTET3: XP_015738510.1) の配列との間で比較した。

アミノ酸配列のアライメントには以下のソフトウェアを用いた。
Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。
Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

A

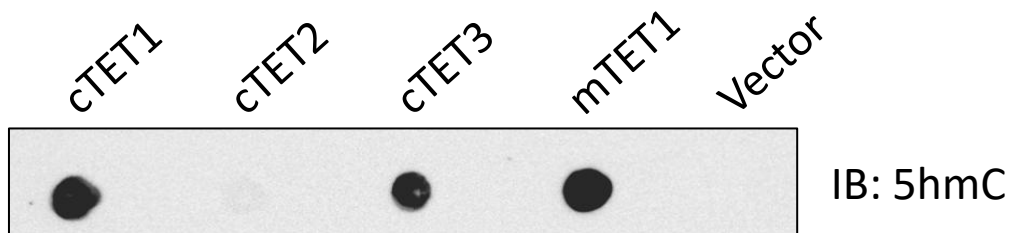


図2.2. ニワトリTETタンパク質の活性測定

A: 各FLAG-TET CDを強制発現させた293FT細胞からゲノムDNAを抽出し、メンブレン上に200 ng ずつゲノムDNAを滴下した。ついで、抗5hmC抗体を用いたイムノブロッティングにより各サンプル中の5hmCを検出した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

B

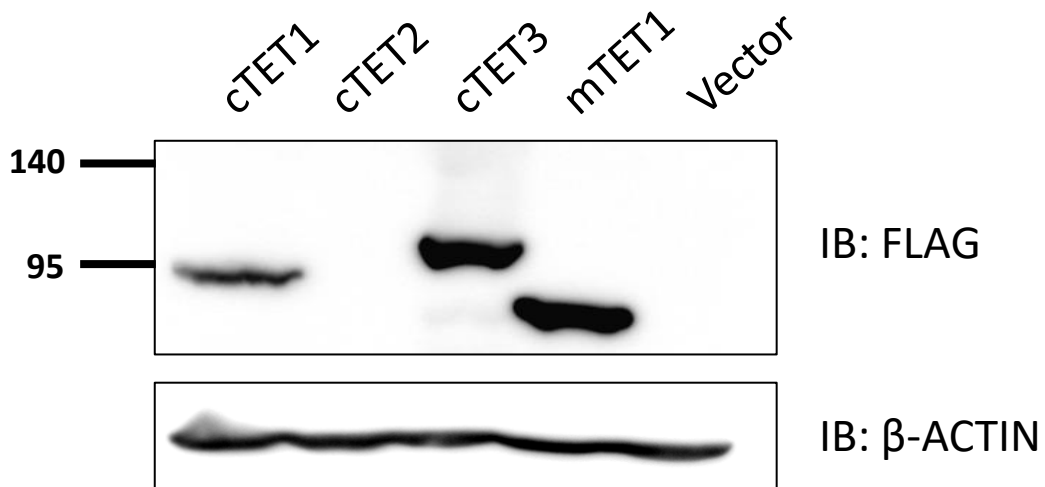


図2.2. ニフトリTETタンパク質の活性測定

B: 各FLAG-TET CDの発現量を抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。また、ローディングコントロールとしてβ-ACTINも同時に解析した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

C

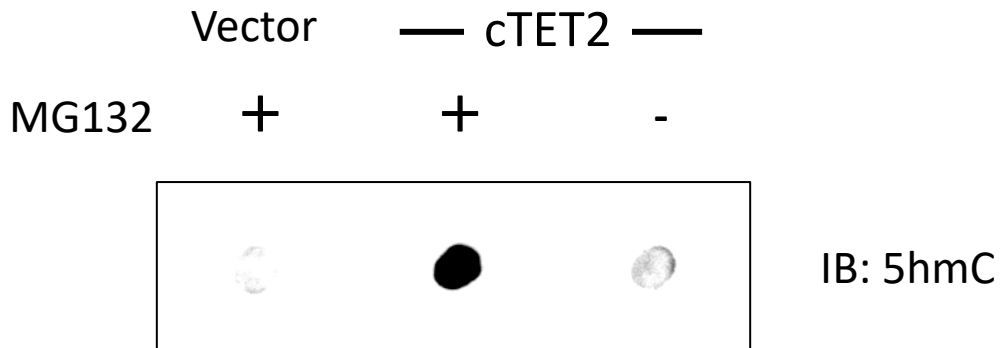


図2.2. ニワトリTETタンパク質の活性測定

C: HA-cTET2 CDを強制発現させた293FT細胞に18時間MG132を作用させ、その後ゲノムDNAを抽出し、メンブレン上に300 ng ずつゲノムDNAを滴下した。ついで、抗5hmC抗体を用いたイムノブロッティングにより各サンプル中の5hmCを検出した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

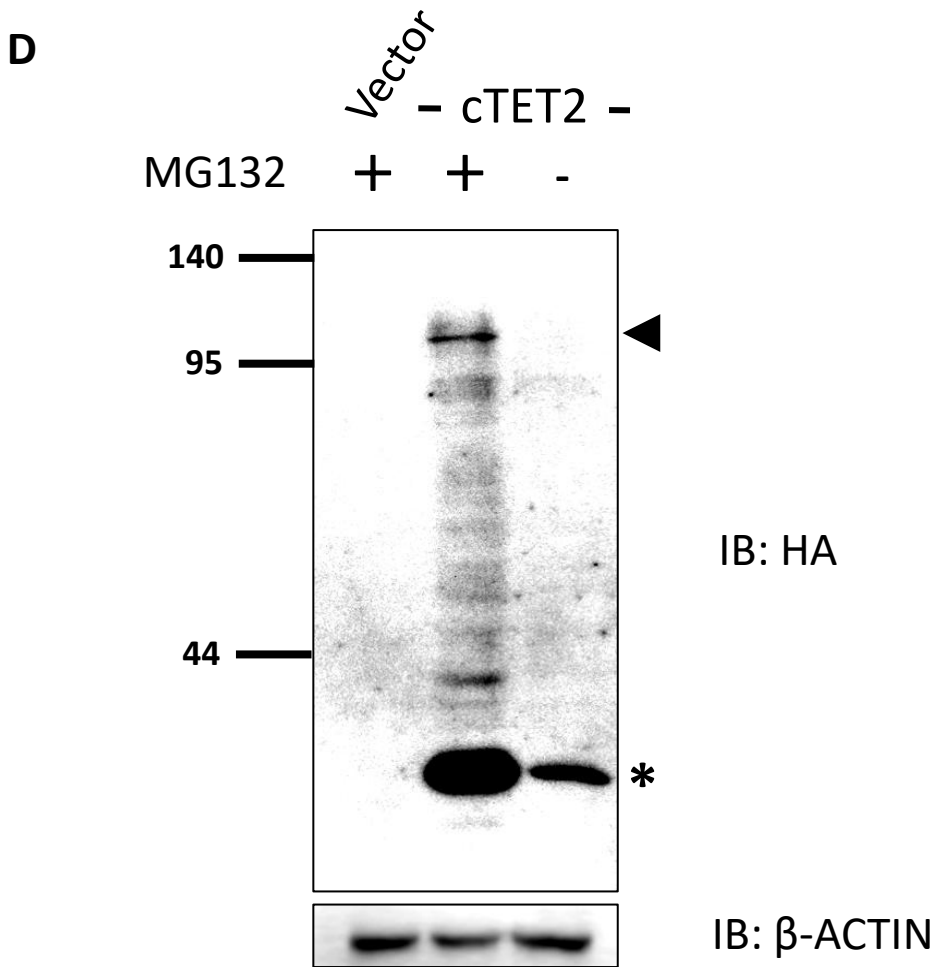


図2.2. ニワトリTETタンパク質の活性測定

D: HA-cTET2 CDの発現量を抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。また、ローディングコントロールとして β -ACTINも同時に解析した。▲はHA-cTET2 CDと考えられる分子量のバンドを示しており、また*は、HA-cTET2 CD由来と考えられる非同定のバンドを示している。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

A

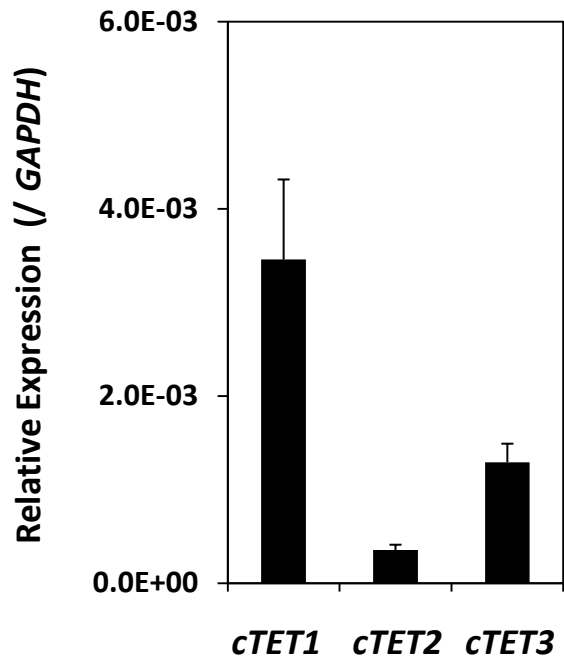


図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

A: 胚盤葉期の胚 (EK stage.X) より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。cTET1, 2, 3の発現は、GAPDHの発現に対する相対発現量として示した。また、データは3胚の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

B

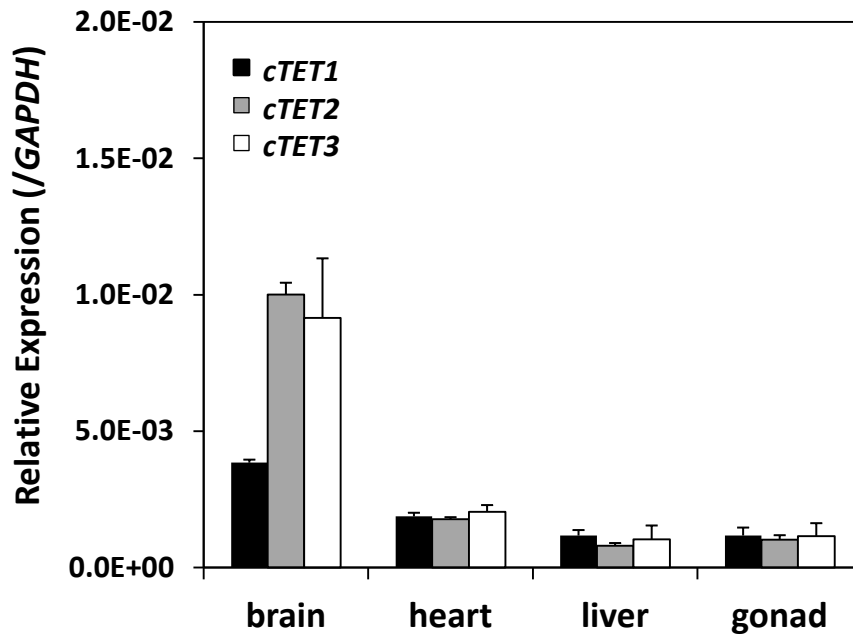


図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

B: 5日胚の各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。*cTET1, 2, 3*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは3胚の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

C

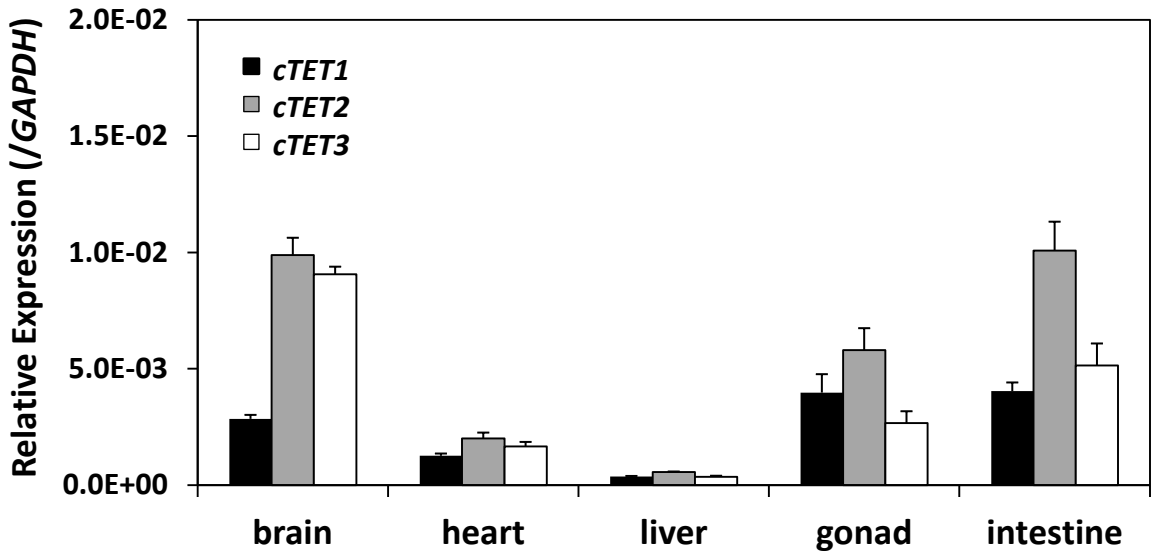


図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

C: 10日胚の各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。*cTET1, 2, 3*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは3胚の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

D

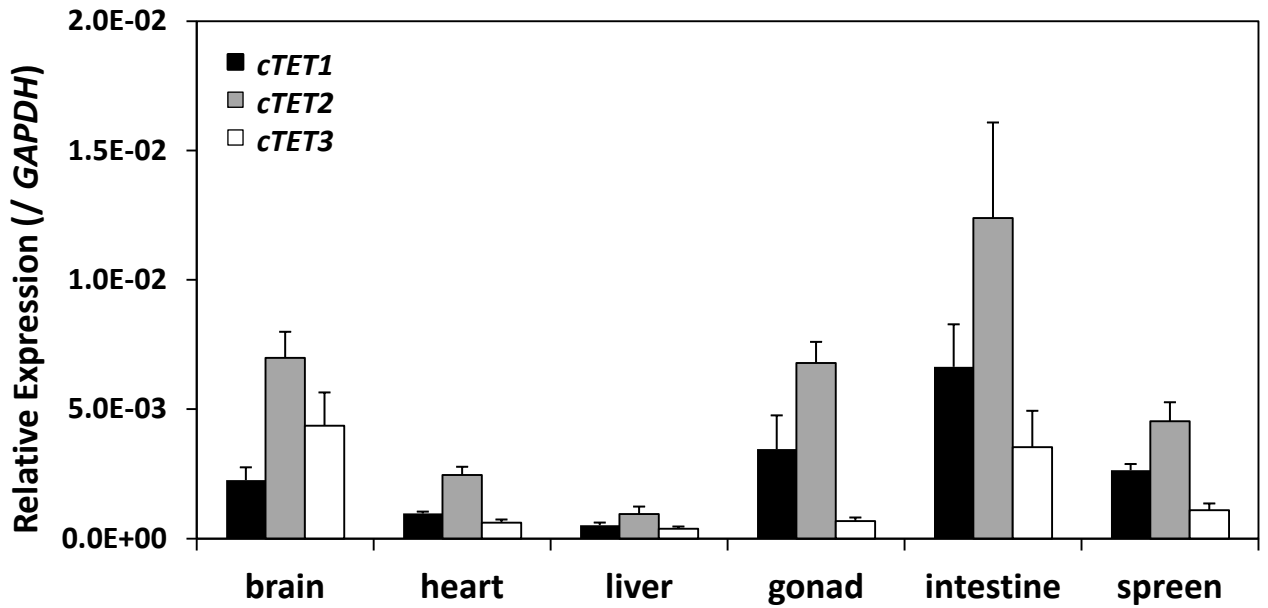


図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

D: 15日胚の各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。*cTET1, 2, 3*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは3胚の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

E

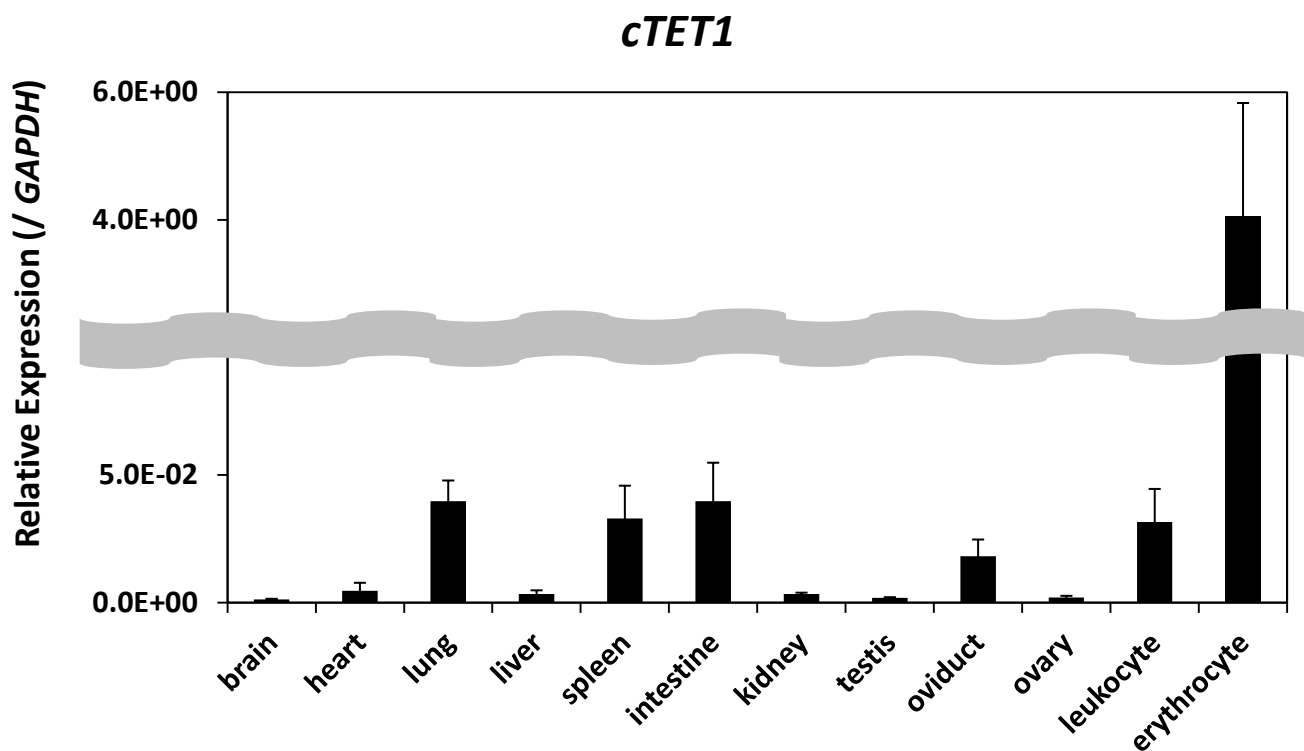


図2.3. ニワトリ*TET*遺伝子の発現解析

E: 性成熟したニワトリの各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRを行った。*cTET1*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは精巣 (testis), 輸卵管 (oviduct), 卵巣 (ovary) については3個体の、また赤血球 (erythrocyte), 白血球 (leukocyte) については4個体の、それ以外の臓器は6個体 (雌雄それぞれ3個体ずつ) の異なったニワトリの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

F

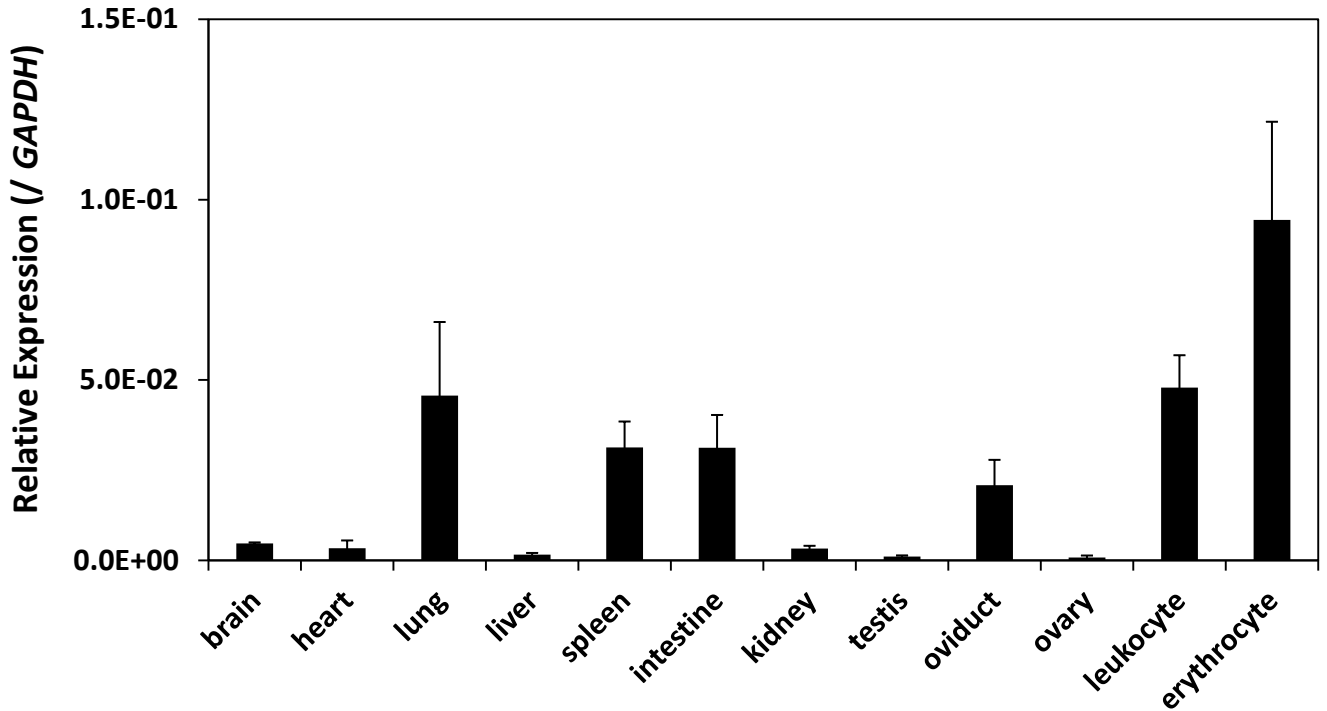
cTET2

図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

F: 性成熟したニワトリの各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRを行った。*cTET2* の発現は、*GAPDH* の発現に対する相対発現量として示した。また、データは精巣 (testis), 輸卵管 (oviduct), 卵巣 (ovary) については3個体の、また赤血球 (erythrocyte), 白血球 (leukocyte) については4個体の、それ以外の臓器は6個体 (雌雄それぞれ3個体ずつ) の異なったニワトリの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

G

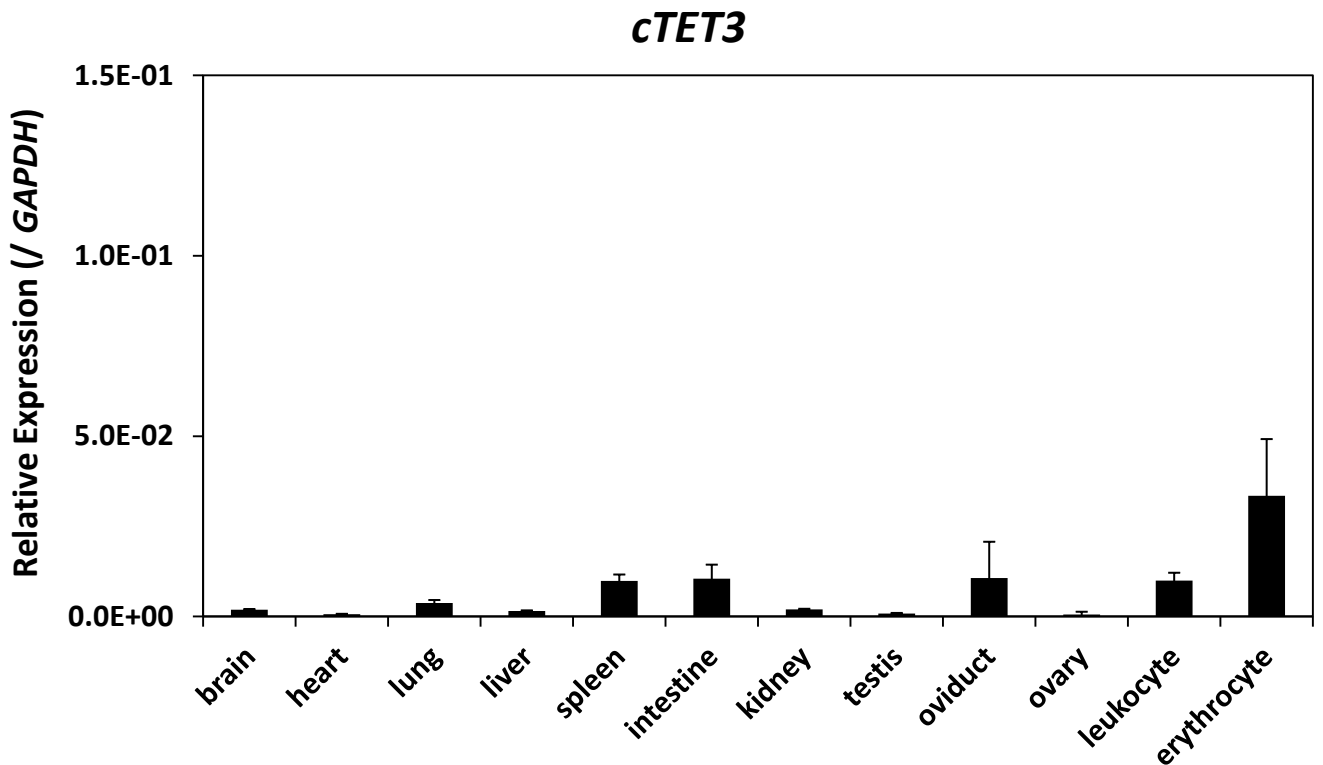


図2.3. ニワトリ *TET* 遺伝子の発現解析

G: 性成熟したニワトリの各臓器より精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRを行った。*cTET3* の発現は、*GAPDH* の発現に対する相対発現量として示した。また、データは精巣 (testis)、輸卵管 (oviduct)、卵巣 (ovary) については3個体の、また赤血球 (erythrocyte)、白血球 (leukocyte) については4個体の、それ以外の臓器は6個体 (雌雄それぞれ3個体ずつ) の異なったニワトリの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

H

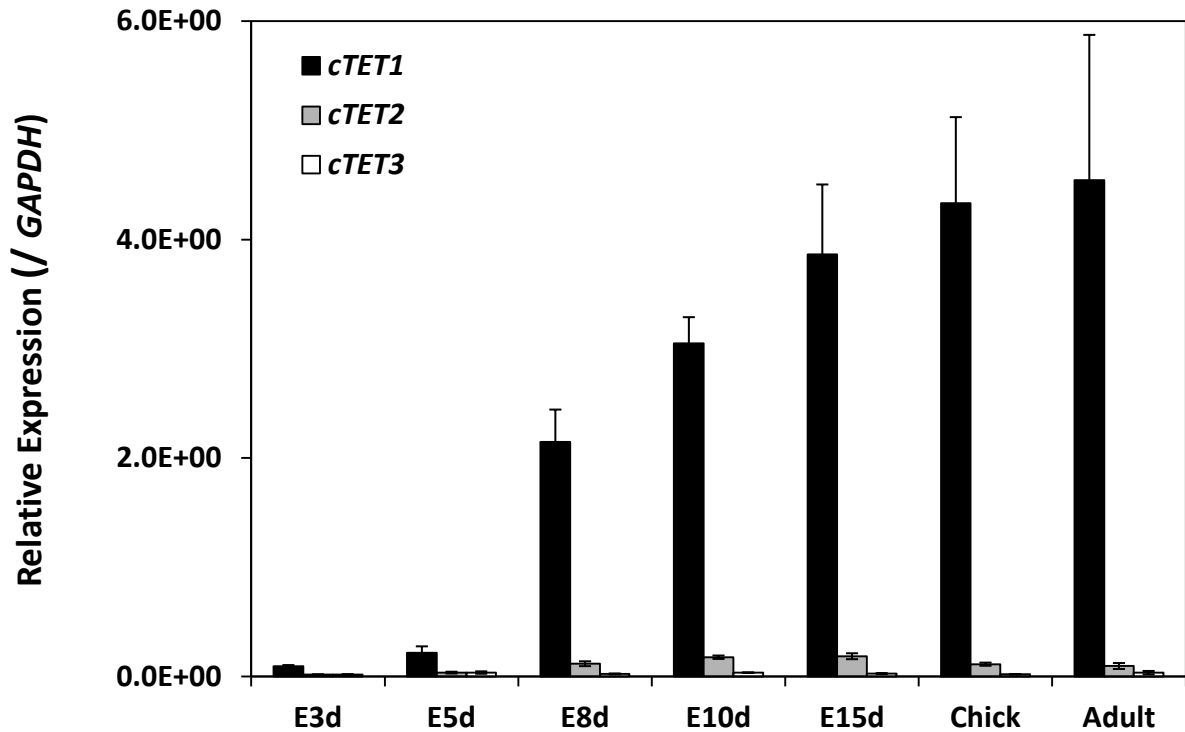


図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

H: 各発生時期 (胚、ヒヨコ、および成鳥)から採取した血液サンプルから、密度勾配遠心分離法により赤血球を単離した。ついで、全RNAの精製およびcDNAの合成を行い、定量PCRによる解析を行った。cTET1, 2, 3の発現は、GAPDHの発現に対する相対発現量として示した。また、データは4個体の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

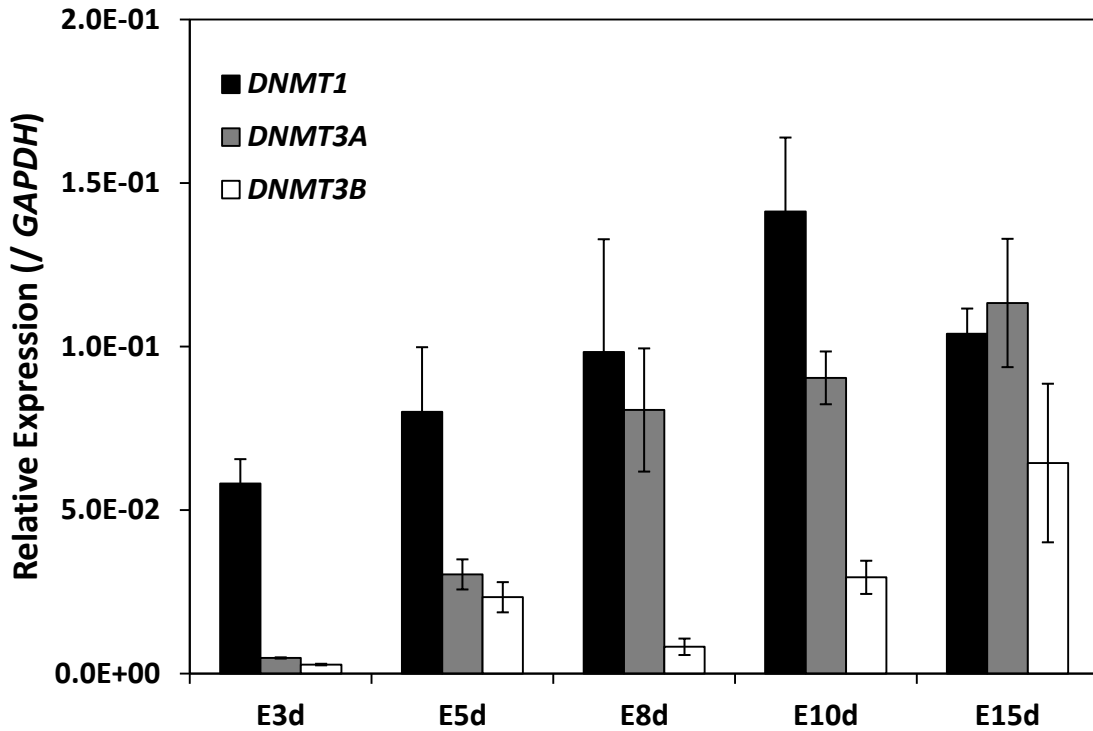


図2.3. ニワトリTET遺伝子の発現解析

I: 各発生時期の胚から採取した血液サンプルから、密度勾配遠心分離法により赤血球を単離した。ついで、全RNAの精製およびcDNAの合成を行い、定量PCRによる解析を行った。*DNMT1*, *3A*, *3B*の発現は、*GAPDH*の発現に対する相対発現量として示した。また、データは4個体の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

A

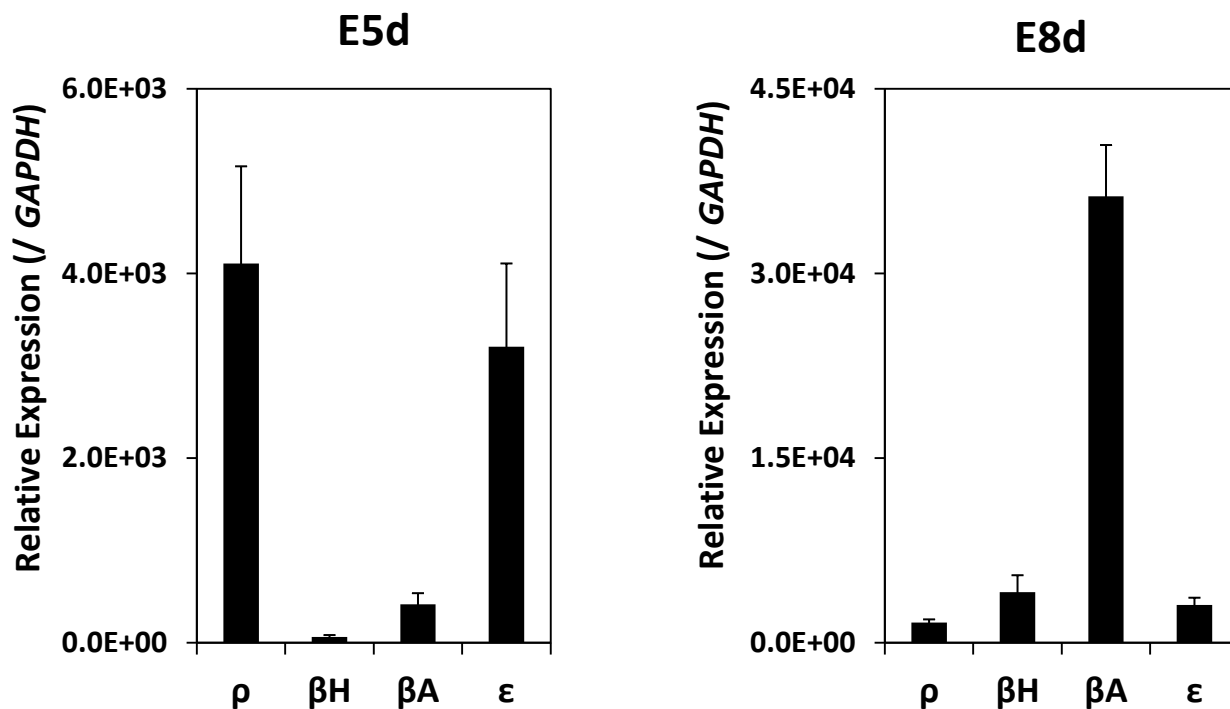


図2.4. 赤血球における β -グロビン遺伝子座のMeDIPおよびhMeDIP解析

A: 5日胚および8日胚 から採取した血液サンプルから、密度勾配遠心分離法により赤血球を単離した。ついで、全RNAの精製およびcDNAの合成を行い、定量PCRによる解析を行った。 ρ , βH , βA および ϵ の発現は、 $GAPDH$ の発現に対する相対発現量として示した。また、データは4個体の異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

B

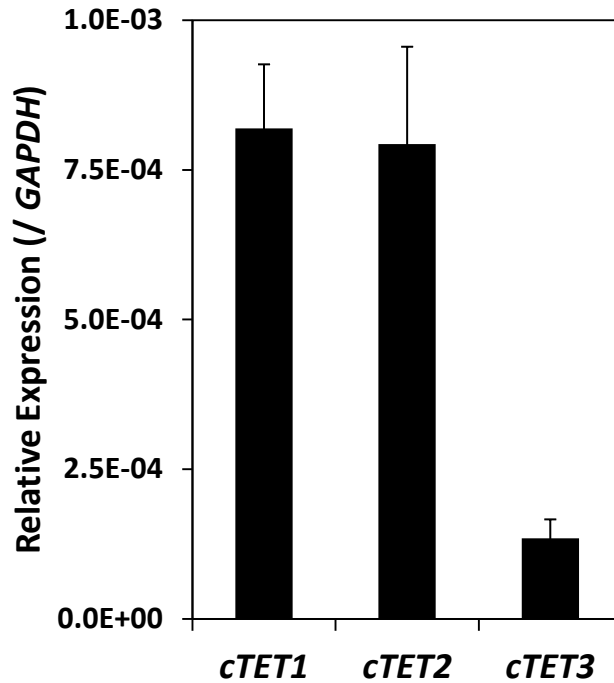


図2.4. 赤血球における β -グロビン遺伝子座のMeDIPおよびhMeDIP解析

B: DF-1細胞から精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。cTET1, 2, 3の発現は、GAPDHの発現に対する相対発現量として示した。また、データは3つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

C

5mC

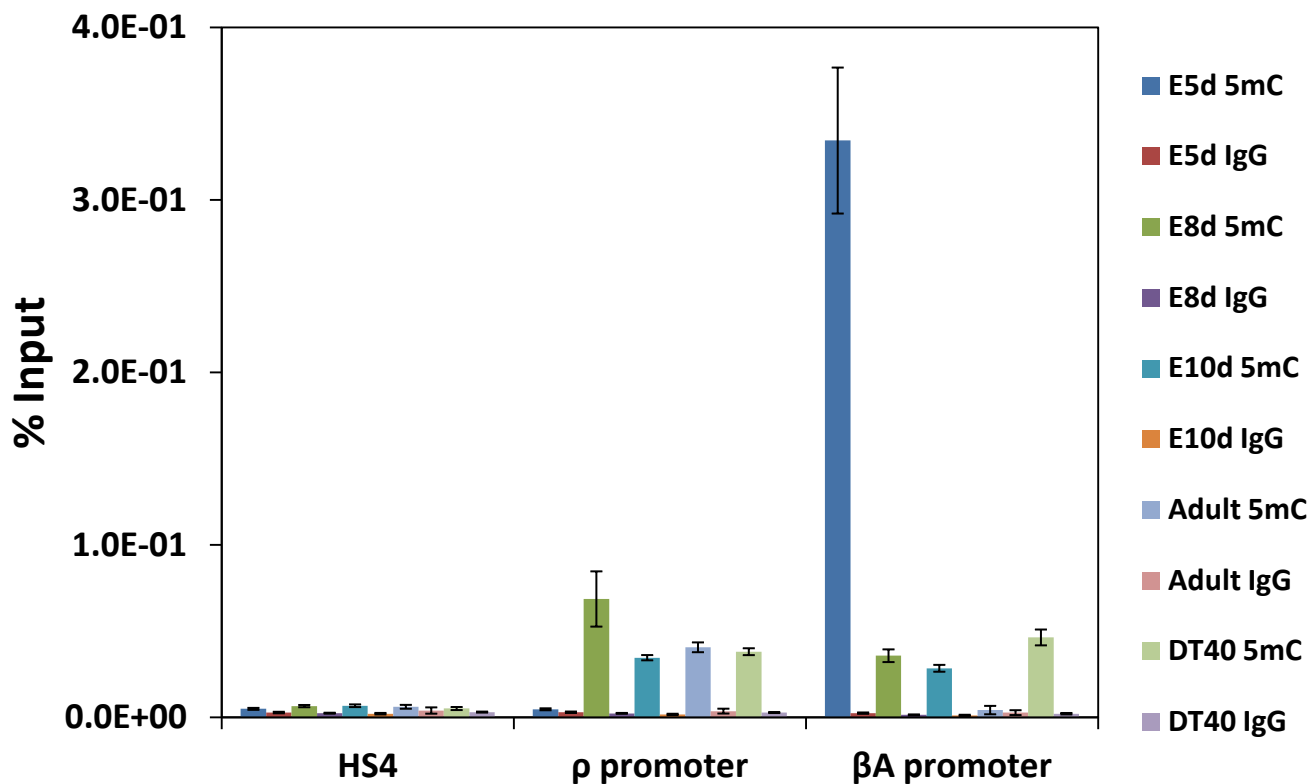


図2.4. 赤血球におけるβ-グロビン遺伝子座のMeDIPおよびhMeDIP解析

C: 各発生ステージより精製した赤血球およびDT40細胞からゲノムDNAを抽出し、抗5mC抗体により免疫沈降を行った。ついで、免疫沈降されたDNAを定量PCRにより解析した。また、データは3つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Aug 26;490(3):753-759.

D

5hmC

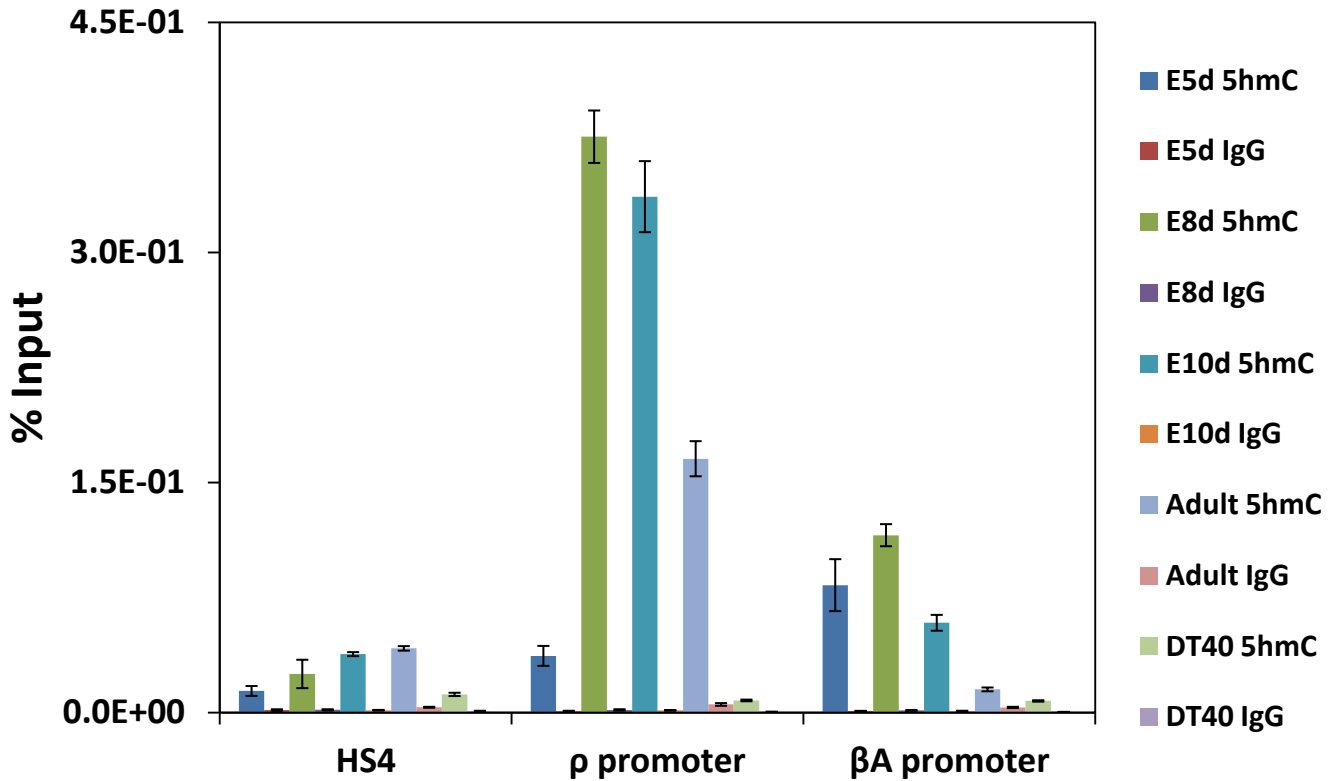


図2.4. 赤血球におけるβ-グロビン遺伝子座のMeDIPおよびhMeDIP解析

D: 各発生ステージより精製した赤血球およびDT40細胞からゲノムDNAを抽出し、抗5hmC抗体により免疫沈降を行った。ついで、免疫沈降されたDNAを定量PCRにより解析した。また、データは4つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

A

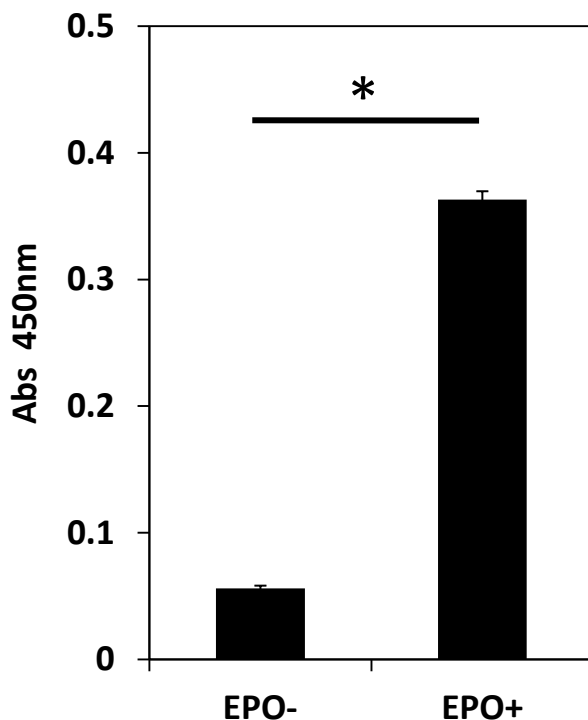


図2.5. T2ECs赤血球前駆細胞の分化時にcTET1は β Aの発現を促進する

A: 1週間分化誘導したT2ECs (EPO+) および分化誘導を行わなかったT2ECs (EPO-)をテトラベンジジン染色により染色した。また、データは8つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。*は、Student's *t*-test において有意な差が認められることを示している ($p < 0.01$)。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

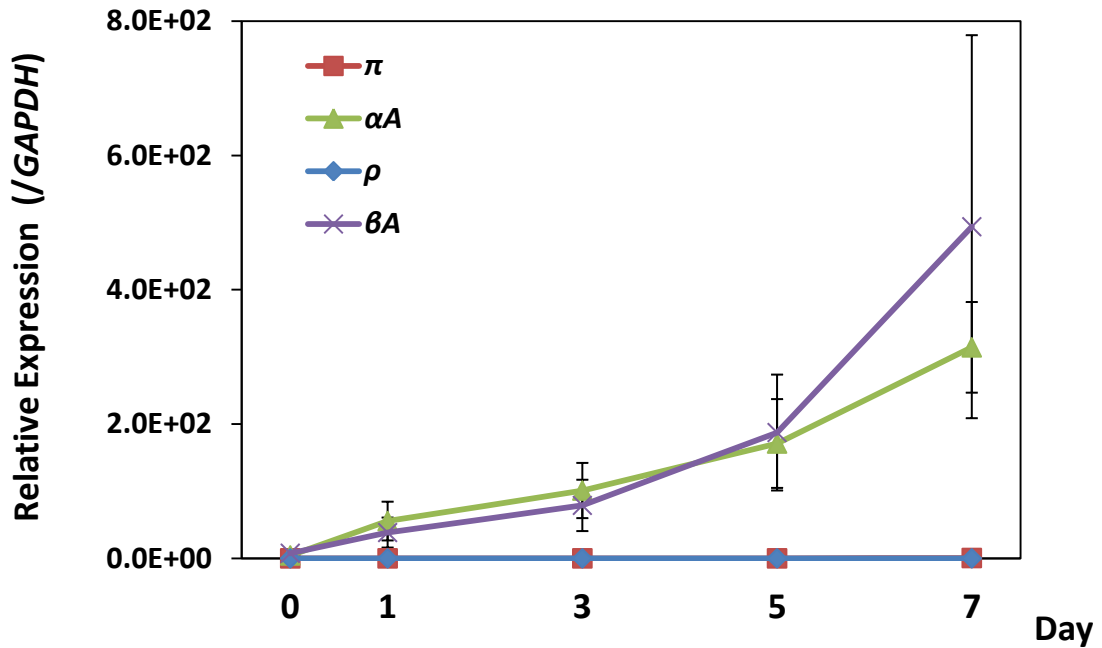
B

図2.5. T2ECs赤血球前駆細胞の分化時にcTET1は βA の発現を促進する

B: 各期間エポジン (EPO) により分化させたT2ECsより精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。 π , αA , ρ の発現は、 $GAPDH$ の発現に対する相対発現量として示した。また、データは6つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

C

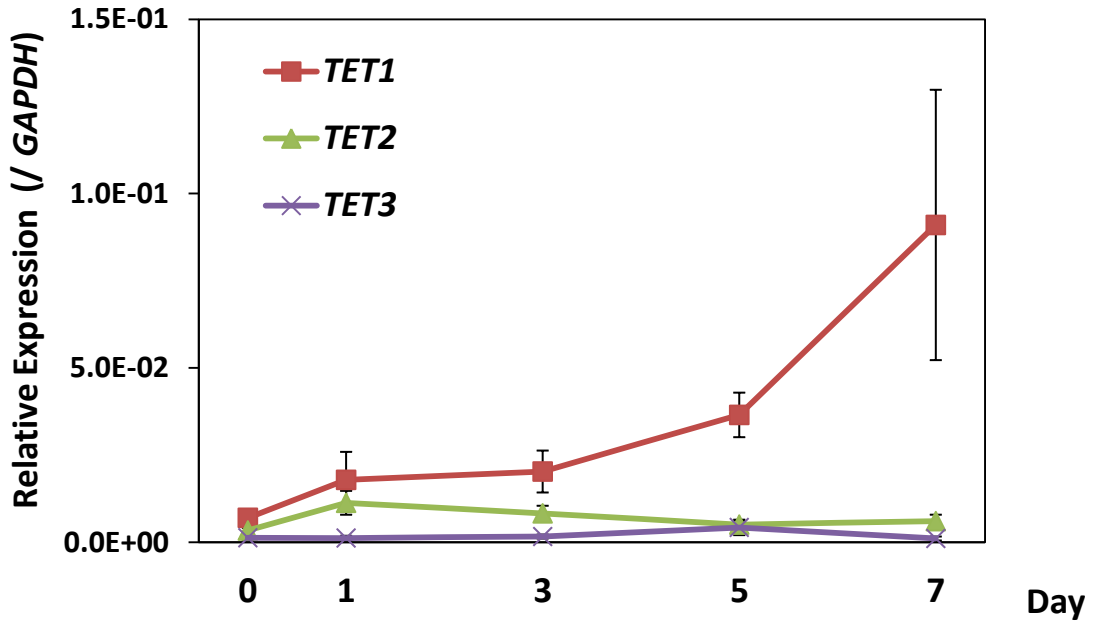


図2.5. T2ECs赤血球前駆細胞の分化時にcTET1はβAの発現を促進する

C: 各期間エポジン (EPO) により分化させたT2ECsより精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。cTET1, 2, 3の発現は、GAPDHの発現に対する相対発現量として示した。また、データは6つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Aug 26;490(3):753-759.

D

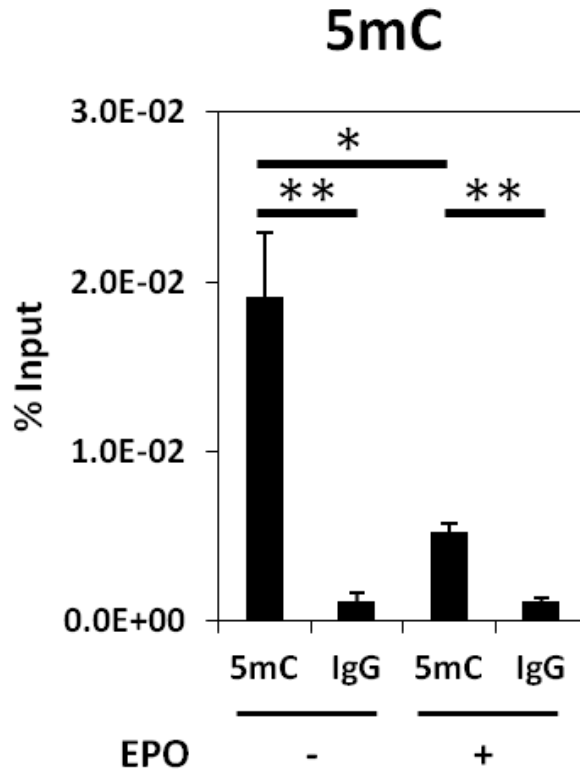


図2.5. T2ECs赤血球前駆細胞の分化時にcTET1は βA の発現を促進する

D: 48時間分化誘導したT2ECs (EPO+) および分化誘導を行わなかったT2ECs (EPO-) からゲノムDNAを抽出し、抗5mC抗体により免疫沈降を行った。ついで、免疫沈降されたDNAを定量PCRにより解析した。また、データは4つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。* および ** は、Student's *t*-test において有意な差が認められることを示している (それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$)。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

E

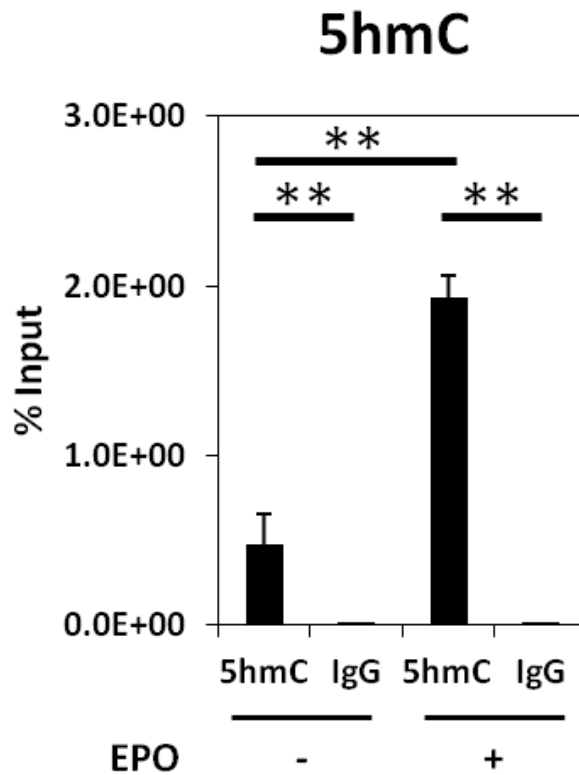


図2.5. T2ECs赤血球前駆細胞の分化時にcTET1は βA の発現を促進する

E: 48時間分化誘導したT2ECs (EPO+) および分化誘導を行わなかったT2ECs (EPO-) からゲノムDNAを抽出し、抗5hmC 抗体により免疫沈降を行った。ついで、免疫沈降されたDNAを定量PCRにより解析した。また、データは4つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。 ** は、Student's *t*-test において有意な差が認められることを示している ($p < 0.01$)。

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

F

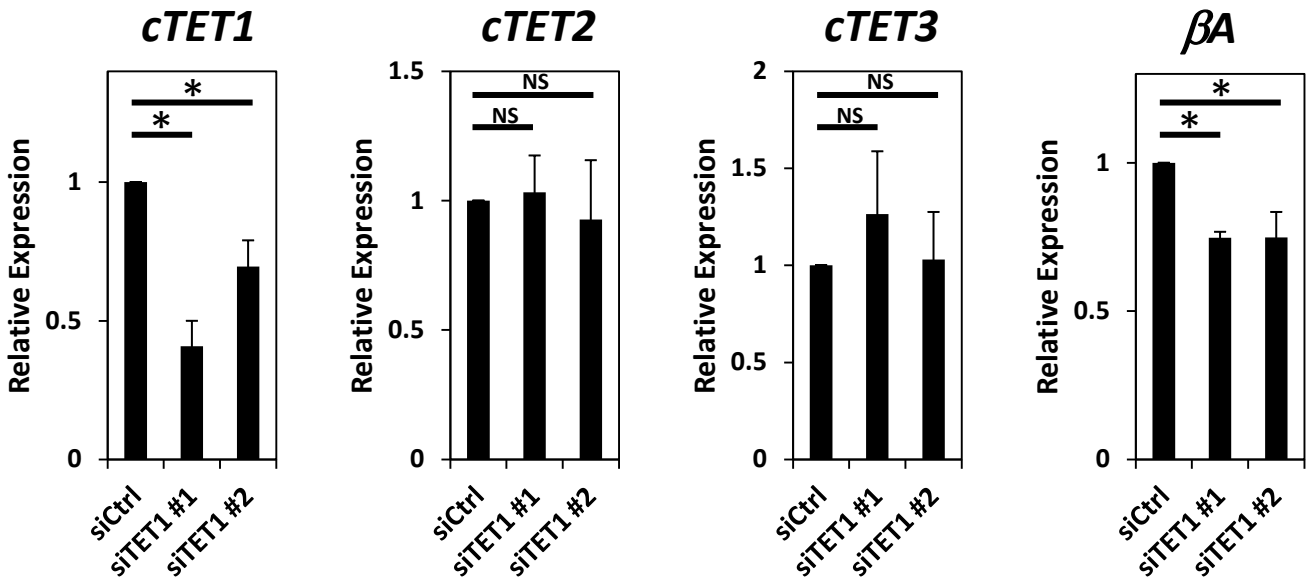


図2.5. T2ECs赤血球前駆細胞の分化時にcTET1はβAの発現を促進する

F: T2ECsにcTET1に対するsiRNAをエレクトロポレーションにより導入し、分化誘導をかけた後、精製した全RNAからcDNAを合成し、定量PCRによる解析を行った。cTET1, 2, 3, およびβAの発現は、コントロールsiRNAを導入した細胞における各遺伝子の発現量を1とする相対発現量として示した。また、データは4つの異なったサンプルの平均値を相対誤差とともに示した。*は、Student's *t*-testにおいて有意な差が認められることを示している($p < 0.05$)。NS, 有意な差は認められない

この図は以下の論文から引用、一部加筆したものである。

Okuzaki et al. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):753-759.

● 結言

本研究において得られた成果を各章ごとにまとめる。

第1章では家禽としてのニワトリに注目し、インフルエンザに対するニワトリの防疫という観点から、インターフェロン誘導性遺伝子として知られている *IFITM* ファミリー遺伝子のうち、機能が未知であった *IFITM10* に注目して解析を行った。*IFITM10* は成鳥の臓器においては他の *IFITM* 遺伝子と比べて発現量が低い一方で、胚時期の各組織においては、高い発現を示した。また、ニワトリ繊維芽細胞 DF-1 を用いたウイルスベクターの感染実験において、*IFITM10* は VSV-G シュードタイプレンチウイルスベクターの感染および機能発現を阻害した。さらに合胞体形成アッセイより、*IFITM10* は VSV-G による膜融合を阻害する活性を持つことが明らかになった。一方で、CEFs において *IFITM10* は IFN- α 応答性を示さなかった。これらの結果をまとめると、本研究において *IFITM10* は生化学的な機能として抗ウイルス活性を持つ可能性が示唆されたが、生理条件下に置いて *IFITM10* が十分に抗ウイルス活性を示すかどうかは、更なる研究が必要である。

第2章ではモデル生物としてのニワトリの活用を目指し、ゲノム DNA の脱メチル化を触媒する酵素 TET の、ニワトリにおける生化学的および生理学的機能を解析した。クローニングした TET ファミリータンパク質である TET1, 2, 3 は—TET2 は培養細胞系において不安定であったものの—その全てにおいて酵素活性が確認された。各発生時期のニワトリ組織における発現解析では、各 *TET* 遺伝子は発生の初期では発現が低く、それ以降の胚時期での臓器や、成鳥の臓器ではある程度の発現を示した。また特に *TET1* は、赤血球において胚から成鳥に至るまで高発現していることが明らかとなった。そこで、赤血球についてさらに詳しく解析したところ、 β -グロビン遺伝子プロモーター領域のゲノム DNA 上に 5hmC の集積が観察され、胚時期における β -グロビン遺伝子の発現制御に *TET1* が関与している可能性が示唆された。さらに、ヒヨコ骨髄から血球前駆細胞 T2ECs を樹立し、解析したところ、分化に伴った *TET1* の発現増加が観察された。また、*TET1* をノックダウンすることにより β -グロビン遺伝子 *β A* の発現が

抑制された。これらの結果から TET1 は、 β -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、 β -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り、また大量の血液を容易に入手できる。したがって、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。

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、本研究において明らかになった事柄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。

● 出版物一覧

学位論文に関する論文

第1章

Y. Okuzaki, S. Kidani, H. Kaneoka, S. Iijima, K. Nishijima, Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10, Biosci. Biotechnol. Biochem. 81 (2017) 914-21. doi: 10.1080/09168451.2016.1274639.

第2章

Y. Okuzaki, H. Kaneoka, K. Nishijima, S. Murakami, Y. Ozawa, S. Iijima, Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 490 (2017) 753-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.113.

その他の論文

[1] K. Yoshida, Y. Okuzaki, K. Nishijima, K. Kyogoku, T. Yamashita, Y. Kawabe, Motono. M, Kamihira. M, Iijima. S, Recombinant proteins produced into yolk of genetically manipulated chickens are partly sialylated in N-glycan, Cytotechnology 65 (2013) 985-92. doi: 10.1007/s10616-013-9613-z.

[2] Y. Kojima, A. Mizutani, Y. Okuzaki, Nishijima. K, Kaneoka. H, Sasamoto. T, Miyake. K, Iijima. S, Analyses of chicken sialyltransferases related to N-glycosylation, J. Biosci. Bioeng. 119 (2015) 623-8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.009.

[3] S. Kidani, H. Kaneoka, Y. Okuzaki, S. Asai, Y. Kojima, K. Nishijima, S. Iijima, Analyses of chicken sialyltransferases related to O-glycosylation, J. Biosci. Bioeng. 122 (2016) 379-84. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.01

[4] S. Kidani, Y. Okuzaki, H. Kaneoka, S. Asai, S. Murakami, Y. Murase, S. Iijima, K. Nishijima, Expression of interferon-inducible transmembrane proteins in the chicken and possible role in prevention of viral infections, *Cytotechnology* 69 (2017) 477-84. doi: 10.1007/s10616-016-9958-1.

国際会議発表

[1] The 27th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT 2014), Y. Okuzaki, Y. Murase, H. Kaneoka, K. Nishijima, S. Iijima, Molecular cloning and analysis of chicken Prdm14, Poster presentation (P-48), Nov. 11-14 (2014) Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan,

● 謝辞

本研究は、名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻 生命システム工学講座 遺伝子工学研究室において行われました。研究の遂行および本論文の執筆にあたりご協力賜りました全ての方々に深く感謝と御礼を申し上げます。

研究を遂行するにあたり、遺伝子工学研究室 飯島真司教授には実験の進め方とそのまとめ方、ならびに理論を正確に構築することの重要性について多大なご指導を賜りました。さらに、研究者として身を立てる上で身につけるべき能力と、心の在り方について多くのご助言を賜りました。大変お世話になりましたことを心より御礼申し上げます。同研究室 西島謙一准教授には実験の進行から、今後の進路まで多くの場面について大変お世話になりましたことを、深く感謝致します。また、同研究室 金岡英徳助教には実験の技術面について多大な指導を頂きましたことを御礼申し上げます。先生方には7年もの間、様々なことをご指導頂き、また私の至らなさから、多大なご心配とお手数をおかけしました。改めて、多大なご指導の下に本論文を執筆出来ていることに、心より深く感謝申し上げます。ありがとうございました。

名古屋大学大学院 工学研究科 本多裕之教授ならびに生命農学研究科 北島健教授には、お忙しい中にも関わらず本論文を査読頂き、有用なご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

また、研究生生活の多くの場面でお世話になりました先輩、同期ならびに後輩の皆さんに心から感謝申し上げます。特に小島祐介氏、木溪俊介氏には実験の進行から、私生活における相談まで公私ともに大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。また、同期の大西慎太郎君、梶田悠矢君、財津芳紀君、増田裕介君には在学中から卒業後まで、機に応じてお互いを鼓舞し進んで来られたことを、改めて心から感謝致します。さらに、村瀬佑介君、森脇脩一郎君、村上晴太郎君、萩原遥太君、中山裕貴君には実験の協力から、日常生活までたくさんの刺激を頂きましたことを感謝いたします。

グリーン自然科学国際教育プログラムには、経済的な支援から留学のサポートまで多大な御支援を賜りましたことを深く御礼申し上げます。

また、日本学術振興会には、特別研究員として経済的な御支援ならびに研究費用の御支援を賜りましたことを心より御礼申し上げます。

最後に、いつもいかなる時も私を支えて頂いた家族と友人の皆様に心より感謝申し上げます。

2017年10月