

学位論文題名

Studies on the regulatory mechanism of the prolyl oligopeptidase gene expression

(プロリルオリゴペプチダーゼ遺伝子の発現調節メカニズムに関する研究)

学位論文内容の要旨

プロリルオリゴペプチダーゼ(POP)はプロリン残基を認識してペプチド鎖を切断するセリンプロテアーゼである。哺乳類で知られている約 500 種類のプロテアーゼの中で、このような活性は POP のみが持つ特殊なものであることから生理機能が注目を集め、発見から 40 年間盛んに研究が行われてきた。その結果、細胞分裂や細胞分化、細胞シグナル伝達系、学習や記憶、卵巣の濾胞成長や精子運動など、POP は多くの生理機能をもつ重要な分子であることが明らかになった。これらの生命現象が正確に起こるためには POP 遺伝子の発現を調節することが必須である。しかしながら、これまで POP 遺伝子の発現調節に関してはほとんど研究が行われてこなかった。そこで著者は POP 遺伝子の発現調節機構の解明を目指してこれまで研究を行ってきた。

第一章では生殖と発生に関わるマウスの組織や初期発生のマウス胚における POP mRNA の発現を解析した。その結果、卵巣顆粒膜細胞、胎盤の海綿状栄養膜層、胚盤胞胚において POP mRNA の発現が高く、発現の低い肝臓に比べてそれぞれ 18 倍、3 倍、40 倍高いことが明らかになった。これらの組織間における POP の発現調節メカニズムを解明するために、著者はまずエピジェネティックな遺伝子の発現調節機構で、転写抑制に関わる DNA メチル化と転写活性化に関わるヒストン修飾パターンについて解析を行った。POP 遺伝子座には DNA メチル化を受ける可能性のある CpG island (CGI) が、プロモーター付近(CGI-1)とエクソン 15 付近(CGI-2)に 2 か所存在した。これらの CGI の DNA メチル化とヒストン修飾パターンを解析した結果、CGI-1 に DNA メチル化は見られず、ヒストン修飾レベルも高かったが、組織間の差は見られなかった。一方、POP 発現の低い肝臓と POP 発現の高い顆粒膜細胞の CGI-2 では、DNA メチル化は POP の発現と負の相関を示し、ヒストン修飾レベルは正の相関を示した。in vitro レポーター解析の結果から、CGI-2 はプロモーター活性を上昇させるエンハンサー活性を示したが、DNA メチル化によってそのエンハンサー活性は抑制された。これらの結果から、CGI-2 がエピジェネティックな修飾を介して POP の発現を調節する新規のエンハンサーであることが示唆された。

第二章では POP mRNA の発現レベルが高かった胎盤について詳細な解析を行った。胎盤の構造が出来上がる妊娠 10.5 日目(E10.5)から生まれる直前の E18.5 の胎盤を用いて解析を行った。mRNA とタンパク質の局在を詳細に解析したところ、ホルモンや成長因子の合成や分泌に関わる巨核細胞や海綿状栄養膜細胞に強いシグナルが得られた。また、母親と胎

児の血管が複雑に入り組んだ迷路層における POP の発現は E12.5 を境に減少した。興味深いことに細胞質タンパク質である POP が膜分画にも存在することが明らかになり、特定の細胞種における POP の異なる機能の存在が示唆された。

第三章では POP の発現調節がプロモーターのみで行われているかを確かめるために、914bp のプロモーターを GFP 遺伝子につないだコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作製した。確立した 6 系統のうち、2 系統では全身で GFP 蛍光を検出したが、残りの 4 系統においてはどの組織においても GFP 蛍光は見られなかった。この結果は GFP 遺伝子を取り込まれたゲノム上の位置によって発現が異なる、すなわち位置効果の影響を受けたことを示唆している。この結果から POP 遺伝子の発現調節にはプロモーター以外の調節領域の存在が示唆された。さらに POP 発現の高かった卵巣と胎盤における GFP 局在を調べた。その結果、卵巣における GFP は POP のように顆粒膜細胞特異的に発現していないことが示され、ここでもプロモーター以外の調節領域の存在が示唆された。しかしながら、胎盤における GFP の局在を調べたところ、第二章で示した POP の局在と非常に良く似た変化を示すことが明らかになった。これは胎盤における POP の局在を決めるほぼ全ての因子が 914bp のプロモーター内に存在することを示唆している。

第四章では CGI 以外の調節因子として、long noncoding RNA (lncRNA) による調節について解析を行った。これは顆粒膜細胞と肝臓の内在の発現量の差に比べ、第一章で同定した CGI-2 のエンハンサー活性が低かったため、その他の調節因子が存在すると考えたからである。解析の結果、POP 遺伝子下流から転写される lncRNA (lnc+96kb) の発現パターンは POP と相関が見られた。そこで、この lnc+96kb が POP の発現調節に関わるかを調べるために、POP 発現の高い卵巣顆粒膜細胞と POP 発現の低い肝臓の細胞株である Hepa1-6 を用いてノックダウン実験および強制発現実験を行った。その結果、どちらの細胞においても lnc+96kb のノックダウンによって POP 発現は 40% 程度低下し、顆粒膜細胞においてのみ、強制発現による POP 発現の増加が見られた。この結果は lnc+96kb が POP 発現上昇に関わり、その作用メカニズムは細胞種特異的であることが示唆された。さらに lnc+96kb による POP 発現調節の意義を調べるために、過排卵誘導過程の卵巣と、分化誘導過程の Trophoblast Stem Cell (TS 細胞) を用いて POP と lnc+96kb の発現パターンを解析した。その結果、卵巣においてはホルモン処理後 6 時間で POP と lnc+96kb の発現が誘導された。また、TS 細胞においては分化誘導に伴って POP 発現は上昇したが、lnc+96kb の発現は減少した。この結果から、卵巣において lnc+96kb はホルモンによる POP 発現の誘導を仲介し、TS 細胞において分化誘導時に POP 発現の抑制を解除することが示唆された。以上の結果から、lnc+96kb は細胞種特異的な POP の発現調節機構を持つことが示唆された。

POP 遺伝子の発現調節機構についてはその重要性は認識されつつも、遺伝子サイズが大きい等の理由からこれまでほとんど解析は行われてこなかった。本研究はこの問題に真摯に取り組み、世界で初めて具体的な POP の発現調節機構の存在を示したものである。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	木 村	敦
副 査	教 授	高 橋	孝 行
副 査	教 授	山 下	正 兼
副 査	准教授	勝	義 直

学 位 論 文 題 名

Studies on the regulatory mechanism of the prolyl oligopeptidase gene expression

(プロリルオリゴペプチダーゼ遺伝子の発現調節メカニズムに関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) は 1971 年に発見されたセリンプロテアーゼである。POP はプロリン残基を認識してペプチドを切断するという極めてユニークな活性を持つことと、さまざまな組織に広く分布していることから、重要な生理機能を持つと考えられ、世界中で研究が進められてきた。具体的には、この約 40 年間の研究によって POP が学習・記憶、ホルモンの代謝、細胞分裂、細胞分化、精子運動などに関わることがわかり、その生化学的性質、立体構造、遺伝子構造も明らかになった。しかしながら、POP が正しい機能を発揮するうえで極めて重要な遺伝子発現調節機構についてはこれまで全く研究がなされていなかった。本論文はこのような状況の中で POP 遺伝子の発現調節機構を解明しようという壮大な目的を持って行われた研究をまとめたものである。世界で誰も行っていない研究に取り組んだという点で、極めてオリジナリティーの高い研究であると評価できる。

学位論文ではマウスを用いて、まず POP がさまざまな組織の中で特に卵巣と胎盤で高い発現を示すことを明らかにしており、このうち卵巣における POP 遺伝子の転写活性化メカニズムに注目して解析を行った。著者は卵巣における高い発現がエピジェネティックな調節によるものであると予想して、DNA メチル化パターンとヒストン修飾パターンの解析を行い、実際に卵巣では他の組織とは違う独特の調節があることを証明した。また、この解析過程で、POP 遺伝子のエクソン 15 付近に存在する CGI-2 と呼ばれる領域が卵巣のみでエンハンサーとして働いている可能性も提示した。これらの発見はこれまで全く知られていなかった POP 遺伝子の調節機構の一端を示した事実上世界で初めての知見であり、学術上価値が高いものであると評価できる。

著者は次に胎盤における解析も行った。まず、胎盤の成熟過程で POP 遺伝子がどの細胞に発現するのかを詳細に解析し、その結果、受精後 12.5 日目を境にして発現部位が変化することを見出した。さらに、胎盤におけるこの POP 発現部位の変化は、POP プロモーターに緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をつないだコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスでも再現された。このことから、胎盤における POP 発現の調節にはプロモーターが非常に重要な役割を果たすことが明らかになっ

た。これらの研究結果は、POP 遺伝子が卵巣と胎盤で（そしておそらくその他の組織でも）全く異なる調節を受けることを示しており、このことは組織特異性を規定するメカニズムを考察するうえで重要な知見である。

学位論文の最後に、著者は卵巣における POP 遺伝子の活性化メカニズムをさらに追求しており、その結果、long noncoding RNA が深く関わっていることを明らかにした。解析によると、POP 遺伝子の下流の領域が long noncoding RNA として卵巣で特に高いレベルで転写されていることがわかり、著者はそれを lnc+96kb と名づけた。そして、卵巣の顆粒膜細胞においてこの lnc+96kb の発現を抑制すると POP 遺伝子の発現が減少することと、逆に lnc+96kb を過剰発現すると POP 遺伝子の発現量が増加することを発見した。この結果は lnc+96kb が卵巣において POP 遺伝子を活性化するために重要であることを明確に示している。また、この発見は単に POP 遺伝子の発現調節メカニズムに関する理解を深めただけでなく、これまでほとんど解明されていなかった卵巣における long noncoding RNA の機能を解明するうえでも重要な成果である。

以上のように、学位論文提出者は POP 遺伝子の発現調節について、①卵巣では CGI-2 エンハンサーと long noncoding RNA である lnc+96b が POP 遺伝子の活性化に関わっていること、②胎盤ではプロモーターが重要な調節配列であることを明らかにした。この成果はこれまで全くわかっていなかった POP 遺伝子の発現調節に関する世界で初めての知見であり、POP に関する研究分野に対して重要な貢献をしたものである。また、本研究は組織特異性のメカニズムという観点から見ても重要な知見をいくつか含んでおり、単に POP 研究にとどまらない分野での貢献も認められる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認める。