

学位論文抄録

CTCF はリプログラムされた体細胞の INK4/ARF 遺伝子座の
高次エピゲノムの特性に関与する
(CTCF mediates distinct higher-order epigenetic signatures
of the INK4/ARF locus in reprogrammed somatic cells)

廣末 晃之

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻顎口腔病態学

指導教員

篠原正徳教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻顎口腔病態学

中尾光善教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻細胞医学

学位論文抄録

【目的】 特定の因子を導入することで、体細胞は誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) やセネッセンス細胞にリプログラムすることができる。ヒト 9 番染色体に位置する INK4/ARF 遺伝子座は 3 つの細胞周期制御因子 (p15/ARF/p16) をコードし、細胞リプログラミングの重要な鍵因子であることが報告されている。しかし、この遺伝子座の高次クロマチンの制御機構については不明である。CCCTC-binding factor (CTCF) は zinc-finger モチーフを持つタンパク質であり、転写調節、クロマチン境界形成、クロマチンループ形成などの多様な役割が判明してきた。本論文では、ヒト線維芽細胞に由来する iPS 細胞、セネッセンス細胞を用いて、CTCF と p15/ARF/p16 の発現様式、INK4/ARF 遺伝子座の高次クロマチン構造における CTCF の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 クロマチン免疫沈降-DNA チップ/シーケンスの解析データに基づいて、INK4/ARF 遺伝子座での CTCF 集積部位 (IC) を同定した。iPS 細胞の標準株、IMR90 線維芽細胞とそのセネッセンス細胞 (OIS: oncogene-induced senescence) を用いて、CTCF と p15/ARF/p16 遺伝子群の発現を定量 RT-PCR 等で解析し、CTCF の結合をクロマチン免疫沈降法で調べた。CTCF に対する RNA 干渉法を用いて、INK4/ARF 遺伝子群の発現状況を検討し、また、ルシフェラーゼ・レポーター法による CTCF の機能解析を行った。さらに Chromosome Conformation Capture (3C) アッセイを用いて、同遺伝子座における 3 次元的なクロマチン構造について解析した。

【結果】 INK4/ARF 遺伝子座に少なくとも 3 つの CTCF 集積部位を見出し、これらの部位を IC1~IC3 と名付けた。iPS 細胞において CTCF の高い発現と 3 カ所の IC 部位への結合の増加を認め、p15/ARF/p16 の発現は著明に抑制されていた。一方、OIS 細胞においては CTCF の発現低下と IC1/IC3 における結合量の低下を認め、p15/p16 の発現が高く誘導されていた。CTCF ノックダウンの IMR90 細胞で p15/p16 の発現が誘導されることから、この遺伝子座の転写調節に CTCF が必要であることが分かった。3C アッセイを用いて、CTCF が INK4/ARF 遺伝子座の高次クロマチン形成に関わり、興味深いことに、IMR90 細胞や iPS 細胞で認めたクロマチンループ形成が OIS 細胞で失われていた。

【考察】 CTCF は、INK4/ARF 遺伝子座の転写調節とともに、高次クロマチン構造の形成に関与することが明らかになった。リプログラム細胞において、CTCF の発現および IC 部位への結合がダイナミックに変化することで、INK4/ARF 遺伝子座は細胞特異的にエピジェネティックな制御を受けることが判明した。また、クロマチンループ形成における未知の機構の可能性も示唆された。

【結論】 CTCF は、リプログラム細胞において INK4/ARF 遺伝子座の発現調節と高次クロマチン制御に関与することが明らかになった。また、INK4/ARF 遺伝子座の CTCF 依存性の高次クロマチン構造がリプログラム細胞を特徴づける可能性を示唆する。本研究で用いた解析法および高次クロマチン構造は、細胞状態を識別する新しいアプローチとしての応用が期待できる。