

1289.
 12) Imamichi, Y. & Menke, A. (2007) *Cells Tissues Organs*, 185, 180-190.
 13) Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M., & Hazan, R.B. (2002) *Cancer Cell*, 2, 301-314.
 14) Williams, E., Williams, G., Gour, B.J., Blaschuk, O.W., & Doherty, P. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 4007-4012.
 15) Shintani, Y., Fukumoto, Y., Chaika, N., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Wheelock, M.J., & Johnson, K.R. (2008) *Int. J. Cancer*, 122, 71-77.

新谷 康

(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター呼吸器外科)

Collagen I-induced epithelial mesenchymal transition
 Yasushi Shintani (Department of Thoracic Surgery, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Disease, 3-7-1 Habikino, Habikino-city, Osaka 583-8588, Japan)

**血管内皮細胞の遺伝子発現制御研究から
 みた *in vivo* プロモーター解析の重要性**

1. はじめに

遺伝子発現制御メカニズムの研究は、時代と共に大きく進歩し、DNA とそこに直接結合する転写因子だけが役者であった時代から、転写因子に結合するコファクター複合体、ヒストンの修飾やDNA のメチル化、これら全てが作り上げるクロマチン構造とその変化など、ゲノム上で誘起されるダイナミックな変化を考慮にいれて議論しなければ

ならない時代へと変化してきた。このため、これら核内で起こる多分子による複合的な変化を試験管内 (*in vitro*) で忠実に再現し研究することは非常に難しくなり、より生理的条件に近い状態を反映しうる遺伝子改変動物を用いた *in vivo* プロモーター解析の導入が不可欠となりつつある。本稿では、まず血管内皮細胞研究の側面からみた *in vivo* プロモーター解析の重要性について述べ、次に、種々の遺伝子改変マウスを用いたプロモーター解析法の特徴について、最後に、血管内皮細胞特異的に発現する *Robo4* 遺伝子をモデルとした *in vivo* プロモーター解析例について概説する。(なお、本稿における「*in vitro* プロモーター解析」は培養細胞への一過的な遺伝子導入実験によるプロモーター活性の評価を指し、「*in vivo* プロモーター解析」は、遺伝子改変動物を用いたプロモーター活性の評価をそれぞれ指すものとする。)

2. 血管内皮細胞研究からみた *in vivo* プロモーター解析の重要性

これまでの遺伝子発現調節機構の研究は、各遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、これにレポーター遺伝子(ルシフェラーゼなど)を連結したDNA断片を持つプラスミドを細胞に一過的に導入しプロモーター活性を評価する *in vitro* の手法で行われてきた(図1)。この *in vitro* 手法は簡便かつ有用なアプローチであるが、しばしば、この手法で解析された結果と、*in vivo* で解析した結果に相違が見られることが知られている。Longらは、この点を指摘し、*in vitro* 手法は生理的条件下でのプロモーターの活性を完全には評価できておらず、遺伝子改変マウス等を用いた *in vivo* 解析を行うことが重要であると述べてい

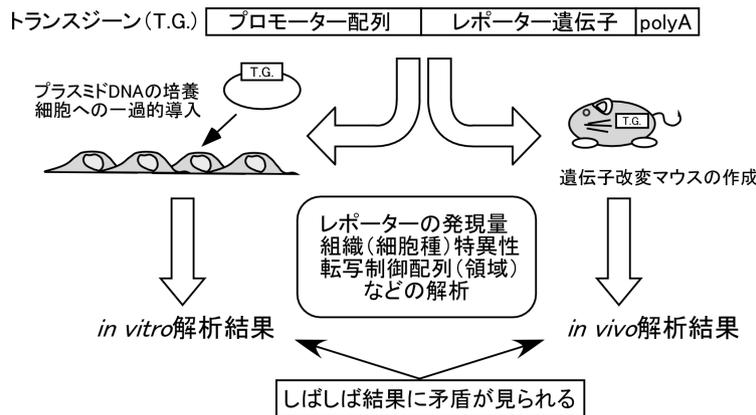


図1 レポーター遺伝子を用いた *in vitro* プロモーター解析と *in vivo* プロモーター解析

る¹⁾。この *in vitro* と *in vivo* におけるプロモーター活性の解析結果の相違は、血管内皮細胞における遺伝子発現制御の研究においても見られている。例えば、Elvert らは、E26 transformation-specific (ETS) ファミリーの転写因子が結合する配列 (ETS サイト) と低酸素刺激への応答を担う DNA 配列 (hypoxia-responsive element) に変異を導入した Flk-1 プロモーターが、*in vitro* ではプロモーター活性を持つにも関わらず、*in vivo* では全く活性を持たないという結果を得ている²⁾。また、Kappel らは、同じく Flk-1 プロモーターに含まれる ETS サイトが *in vitro* では活性に重要であるが、*in vivo* ではそうでないことを示している³⁾。つまり、*in vitro* で活性のあるプロモーターが *in vivo* で活性を持たなかったり、*in vitro* で重要だと示された転写因子結合サイトが *in vivo* では大して重要ではなかったりするといった結果が得られているのである。さらに、近年、Matouk らは、*in vivo* において血管内皮細胞特異性を持つと証明された eNOS プロモーター配列が、*in vitro* においては特異性を持たず、非血管内皮細胞においても高いプロモーター活性を示す例を示し、その理由を、プラスミドを用いた *in vitro* 評価系においては、生理的条件下で形成されるクロマチン構造がうまく形成されていないことが原因であろうと述べている⁴⁾。これらの報告は、生理的条件下におけるプロモーター活性の正確な評価に、*in vivo* 手法を用いることが非常に重要であることを示している。

3. トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* プロモーター解析法

in vivo プロモーター解析は、遺伝子改変マウスを用いて行うことができる。基本的な解析は、*in vitro* 解析と同

様に、遺伝子のプロモーター領域にレポータージーンを連結させ、これをマウスのゲノムに挿入し、得られたマウスにおけるレポータージーン発現パターンや発現量を解析することで行う。ここでは、3種の遺伝子改変マウスの利点と欠点について比較する (図2)。一つ目は一般的なトランスジェニックマウスである。このマウスの作製には、トランスジーンゲノムへの挿入にランダムインテグレーション法を用いる。このランダムインテグレーション法は、特別なターゲティングベクターの構築を必要とせず短期間でトランスジェニックマウスが得られるが、挿入されるトランスジーンの数 (コピー数) と位置が制御できない。このため、定量的な解析には向かず、挿入位置によっては内在性の遺伝子が破壊されレポータージーン発現に影響を及ぼす可能性があるため、その解析には多ラインのマウスを作製し、その平均的な発現量と発現パターンを検証する必要がある、解析に多大な時間を要するという欠点がある。

二つ目のノックインマウスは、マウスの内在性の遺伝子をレポータージーンと置き換えることにより作製する。すなわち、この方法では、プロモーターの遺伝子座を天然の位置から変えることなくプロモーターの解析が行えるため、極めて生理的条件下に近い条件でのプロモーター解析を行える大きな利点がある。しかし、本手法で解析できるのはマウスのプロモーターだけであることや、このマウスの作製には、遺伝子組換えのためのターゲティングベクターの作製と、それを用いた ES 細胞の遺伝子組換えを行う必要がある、マウスの樹立までに非常に長い期間を要するという欠点もある。このため、*in vitro* で行うようなプロモーターの部分的欠失や、変異導入など種々のプロモ-

	スタンダード トランスジェニックマウス	ノックインマウス	Hprtターゲティングマウス
	ゲノム上のランダムな位置 — T.G. T.G. — T.G. —	内在性プロモーター ↓ レポーター遺伝子	— T.G. — Hprt遺伝子
遺伝子改変法	ランダムインテグレーション	相同組換え	相同組換え
コピー数	多コピー	1コピー (レポータージーン)	1コピー
挿入位置	制御不可	内在性遺伝子座	Hprt遺伝子上流
作製時間	短	長	中
解析時間	長	短	短
ライン間比較	難	可	可

図2 *in vivo* プロモーター解析に用いられる3種の遺伝子改変マウスとその特徴

ター変異体を用いるような多種のマウスの作製が必要である実験への利用は難しいという側面も持つ。

三つ目として、生理的条件に近い状態での解析が行え、比較的簡便に作製できるヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*Hprt*) ターゲティングマウスについて紹介する。*Hprt* ターゲティング法は、1コピーのトランスジーンを相同組換えにより *Hprt* 遺伝子上流に挿入する手法であり、トランスジーン的位置とコピー数を完全に制御できる遺伝子組換え法である⁵⁾。また、ターゲティングベクターの構築は、*Hprt* 遺伝子座と相同な配列が組込まれたターゲティング用親ベクターに、目的トランスジーンを挿入するだけの簡便な方法で行うことができる。相同組換えは *Hprt* 遺伝子が一部欠損したES細胞を用い、相同組換えが良好に行われた細胞では *Hprt* 遺伝子が補完され、HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を含む培地中での生存が可能となりコロニーを形成する。このセクション法では、経験上得られるESコロニーの90%以上が目的のクローンであることがわかっており、通常のポジティブ、ネガティブセクションを用いたES細胞の組換えに比べ、短期間でES細胞の樹立とマウス作製を行うことができる。また、こうして作られたマウスはトランスジーンの数と挿入部位が同じであるため、プロモーターに変異や欠損を加えたマウスを同じ手法で作製すれば、マウスのライン間での表現型の解析が可能となる利点も併せ持っている。この *Hprt* ターゲティング法は、*in vivo* プロモーター解析に非常に適した手法であるため、次に血管内皮細胞特異的に発現する *Robo4* 遺伝子のプロモーターの研究で行った解析例を紹介したい。

4. *Hprt* ターゲティング法を用いたヒト *Robo4* プロモーター領域の決定

遺伝子の発現制御について研究するには、まず遺伝子の発現制御領域(プロモーター領域)を同定する必要がある。我々は、ヒト *Robo4* 遺伝子の5'上流領域のDNA配列を解析し、種間で高く保存されている領域を含み、かつ転写因子結合配列や特徴的な繰り返し配列を含む上流3kbの領域をクローニングすることにした。この3kbの配列に *LacZ* 遺伝子を連結させ、上述の *Hprt* ターゲティング法を用いて、1コピーのトランスジーンをマウスES細胞の *Hprt* 遺伝子上流に導入した(図3A, 野生型)。得られたES細胞を用いてキメラマウスを作製し、トランスジェニックマウスを樹立した。このマウスの解析を行ったところ、胎児と成体の全ての臓器において *LacZ* は血管内皮細

胞に特異的に発現しており、各臓器における発現量(臓器分布)は内在性のマウス *Robo4* の発現パターンとほぼ同じであった⁶⁾。この結果から、3kbの領域が、血管内皮細胞特異的に発現する *Robo4* の発現制御に十分な領域を含んでいることが明らかとなった。

一方、この3kbのプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結させ、*in vitro* 解析により血管内皮細胞特異性についての評価も行った。その結果、血管内皮細胞においては非血管内皮細胞に比べルシフェラーゼ活性が強いものの、*Robo4* を全く発現していない非血管内皮細胞においても、ルシフェラーゼ活性が検出された。この結果もまた、先に述べた *in vitro* と *in vivo* の解析結果の相違の例となり、やはりプロモーターの組織特異性等の解析には *in vivo* プロモーター解析を行うことが重要であるといえる。

5. *Hprt* ターゲティング法を用いた転写因子結合配列の解析

次に、*Hprt* ターゲティング法を用いた *in vivo* における転写因子結合配列の解析例について紹介する。3kbのプロモーターによる転写制御機構について、一般的に用いられる *in vitro* の手法(ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法など)を用いて解析したところ、転写開始点付近のETSサイトに転写因子 GA-binding protein が結合し、プロモーターを活性化することが明らかとなった。そこで、このETSサイトが *in vivo* においても *Robo4* プロモーターの活性に重要な機能を持つかどうかを明らかにするために、このETSサイトに変異を加えた *Robo4* プロモーターを用い *Hprt* ターゲティング法を用いてマウスを作製した。このマウスと先に作製した野生型のプロモーターを持つマウスのゲノム配列を比較すると、唯一の違いはETSサイトの変異の有無だけである(図3A)。このため、両マウスの *LacZ* の発現パターンの違いは、ETSサイトへの変異が原因で起こったものと結論付けられる。そこで、ETSサイト変異マウスにおける *LacZ* の発現を解析し、野生型マウスと比較したところ、変異マウスにおいては、血管内皮細胞における *LacZ* の発現が大きく低下していることが明らかとなった⁷⁾。この結果から、ETSサイトは *in vivo* においても、*Robo4* プロモーターの活性に重要な配列であることが証明された。

6. *Hprt* ターゲティングマウスとノックインマウスにおける解析結果の比較

ここまで述べてきたように、*Hprt* ターゲティング法は、

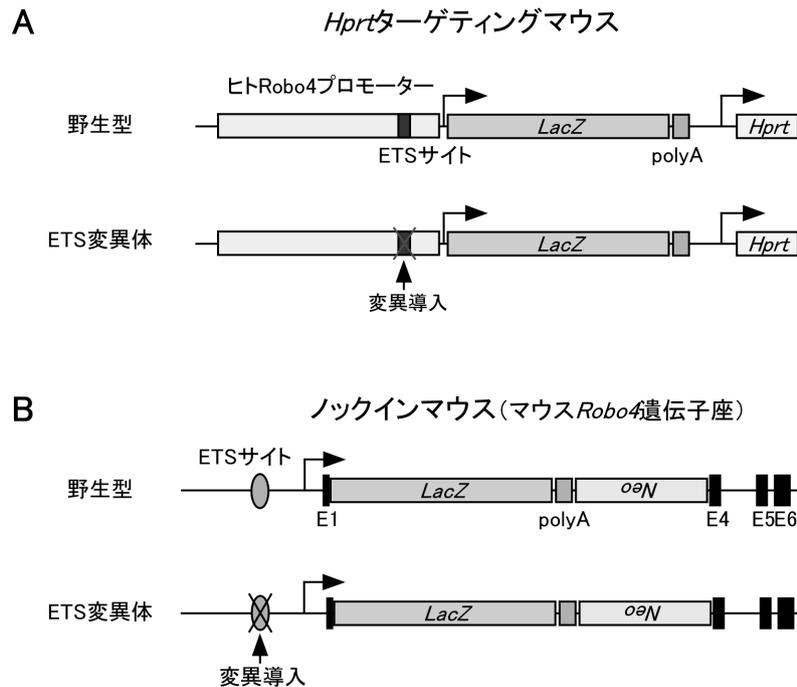


図3 Robo4 プロモーターを用いた *Hprt* ターゲティングマウスとノックインマウス

簡便かつ有用な *in vivo* プロモーター解析ツールであるが、本来の遺伝子座とは異なる位置にプロモーターを挿入し解析しているという問題がある。そこで我々は、マウスの *Robo4* 遺伝子を *LacZ* 遺伝子に置き換えた *LacZ* ノックインマウスを作製・解析し、*Hprt* ターゲティングマウスから得られた結果との比較を行った(図3)。その結果、ノックインマウスにおいても *LacZ* は血管内皮細胞特異的に発現し、さらに内在性のプロモーターの ETS サイトに変異を加えることで *LacZ* の発現が大きく減少するという、*Hprt* ターゲティングマウスと同様の結果を得た⁷⁾。今回の結果と、これまでの *Hprt* ターゲティング法を用いたプロモーター解析の報告⁸⁻¹¹⁾は、*Hprt* 遺伝子座上流が外来プロモーターの解析に良好な場であることを示しており、この手法により行われたプロモーター解析結果が、生理的条件下におけるプロモーターの挙動に近いものであると考えられる。

7. おわりに

近年、クロマチン構造や DNA メチル化などによるエピジェネティックな制御が、転写制御に重要な役割を担っていることが明らかとなっており、この DNA 配列によらない転写制御メカニズムが、*in vitro* と *in vivo* のプロモ-

ーター解析結果の相違を生み出しているのではないかと考えられ始めている¹⁾。すなわち、*in vitro* 解析において、一過的に細胞に導入されたプラスミド DNA が、細胞内において生理的条件下に見られるメチル化やクロマチン構造の形成を正常に受けていない点が指摘されつつあるのである。今回紹介した *Hprt* ターゲティング法は、ゲノム中に簡便に組み込み、正常な発生段階を経た生理的条件下に極めて近いプロモーターの機能を解析できるため、今後のエピジェネティックな転写制御に研究への強力なツールとなっていくものと期待される。

- 1) Long, X. & Miano, J.M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 15941-15945.
- 2) Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., & Flamme, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 7520-7530.
- 3) Kappel, A., Schlaeger, T.M., Flamme, I., Orkin, S.H., Risau, W., & Breier, G. (2000) *Blood*, **96**, 3078-3085.
- 4) Matouk, C.C. & Marsden, P.A. (2008) *Circ. Res.*, **102**, 873-887.
- 5) Bronson, S.K., Plaehn, E.G., Kluckman, K.D., Hagan, J.R., Maeda, N., & Smithies, O. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9067-9072.
- 6) Okada, Y., Yano, K., Jin, E., Funahashi, N., Kitayama, M., Doi, T., Spokes, K., Beeler, D.L., Shih, S.C., Okada, H.,

