

## Protein S 遺伝子のイントロン 1 に潜む未知の発現調節機構の解明

丸山慶子

国立循環器病研究センター 分子病態部

### 【研究の背景】

プロテインS (PS) は、肝細胞や血管内皮細胞などで合成され、活性化プロテインCや組織因子経路インヒビターの補因子として働き、血栓形成を抑制する。さらに PS は、TAM レセプター (Tyro3/Axl/Mertk) のリガンドとなり、アポトーシス細胞の貪食や免疫・炎症、血管形成などの制御も担う。ヒト PS 遺伝子 *PROSI* は全長約 100 kb で 15 個のエクソンからなり、イントロン 1 は 46,266 bp と非常に長いという特徴をもつ。これまでに、*PROSI* のイントロン1が遺伝子発現を調節する可能性を検討した報告はない。

### 【目 的】

*PROSI* のイントロン1が遺伝子発現を調節する可能性を考え、イントロン1内にある転写調節領域を探索・同定し、イントロン1 が発現調節に寄与することを明らかにする。

### 【方 法】

転写活性に対するイントロン1の効果を調べるために、pGL3-Basic レポーターベクターのルシフェラーゼ ORF 上流に *PROSI* のプロモーター配列 [c.-2000\_-2] を、下流にイントロン1 [c.76+1\_76+46266] を細分化した配列を挿入したコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトと pRL コントロールベクターを HepG2 細胞に同時トランスフェクトし、Dual-Glo ルシフェラーゼアッセイシステムを用いて転写活性を測定した。次に、転写活性解析で同定した領域が染色体上の *PROSI* でも作用するかを調べるために、CRISPR-Cas9 システムを用いてイントロン1全体あるいは同定領域を欠失した細胞を作製した。細胞から RNA を調製し、*PROSI* およびリファレンス遺伝子 *TBP* に対する TaqMan プローブを用いた定量デジタル PCR を行い mRNA 量を測定した。さらに、イントロン1の影響を *in vivo* で解析するため、CRISPR-Cas9 システムを用いてイントロン1欠失マウスを作製し、血漿および血小板での PS 抗原量を ELISA およびウエスタンブロッティングで測定した。

### 【結 果】

転写活性解析の結果、イントロン1内に3カ所のエンハンサー領域 (c.76+438\_76+450、c.76+850\_76+860、c.76+35976\_76+36076) と、3カ所のサイレンサー領域 (c.76+491\_76+500、c.76+861\_76+950、c.76+36077\_76+3616) が存在することが分かった。同定領域を欠失した細胞を樹立して解析した結果、エンハンサー領域3カ所のうち、c.76+399\_76+451 欠失細胞では mRNA 量が有意に低下し、c.76+678\_76+857 欠失細胞では有意な変化は認められなかった。一方、サイレンサー領域3カ所のうち、c.76+491\_76+540 欠失細胞では mRNA 量が低下し、c.76+862\_76+964 欠失細胞では有意な変化はなく、c.76+36096\_76+36149 欠失細胞では mRNA 量が増加した。また、イントロン1のほぼ全体を欠失した細胞では、mRNA 量の有意な低下を認めた。さらに、イントロン1欠失マウスでは、血漿および血小板での PS 抗原量は野生型に比べて有意に低下していた。

## 【考 察】

今回の検討により、イントロン1内に3カ所のエンハンサー領域および3カ所のサイレンサー領域を同定した。さらに、イントロン1がマウス個体においても発現調節に関与することが明らかになった。これまでに、他の遺伝子においてイントロンが細胞特異的な発現調節に関与するとの報告<sup>1)</sup>もあり、PS 遺伝子においても細胞特異的な発現調節や妊娠などによる発現量変化に影響を与える可能性が考えられるため、今後解析する予定である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

先天性 PS 欠損症の遺伝子変異同定率は、他の血栓性素因に比べて低い。近年のゲノムワイド関連解析により、疾患関連バリエーションの多くが遺伝子発現調節領域に存在することが明らかになっており<sup>2,3)</sup>、イントロン1内の配列が先天性 PS 欠損症の新たな原因バリエーションの探索に繋がる可能性がある。

## 【参考・引用文献】

- 1) Uveges TE, et al. J Neurosci, 15; 7959-67, 2002.
- 2) Farh KK, et al. Nature, 518; 337-43, 2015.
- 3) Gupta RM, et al. Cell, 170; 522-33, 2017.