The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	プロトオンコジーン産物 c-Ets によるサイトケラチン EndoA 遺伝子の転写制御
Author(s)	濱里, 史明
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38007
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【16】

氏　　名	濱　里　史　明（はま　ざと　ふみ　あき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　10154　号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科　生理系専攻
学位論文名	**プロトオンコジーン産物 c-Ets によるサイトケラチン *EndoA* 遺伝子の転写制御**
論文審査委員	(主査) 教　授　松代　愛三 (副査) 教　授　中田　篤男　　教　授　岡山　博人

論文内容の要旨

（目　　的）

マウス初期胚は受精後，8 細胞期桑実胚までは各割球は等価でかつ未分化であり分化全能性を備えているが，その後胚盤胞を形成するにあたって外側を覆う一層の栄養外胚葉と，内側に位置し多分化能を有する内部細胞塊という 2 種類の細胞集団に分化する。EndoA はタイプⅡ－サイトケラチンであり，タイプⅠ－サイトケラチン EndoB と重合し上皮系細胞内で中間径フィラメントを構成する。この *EndoA* 遺伝子は 8 細胞期桑実胚よりその発現が認められるが，胚盤胞の形成に伴って栄養外胚葉でのみ発現されるようになる。したがって，この *EndoA* 遺伝子の発現調節機構を解析することにより胚盤胞形成の分子機構を解明するための手がかりが得られることが期待される。

既に当研究室において *EndoA* 遺伝子下流約 1 kb の位置に分化特異的に転写を活性化する144bp からなるエンハンサー領域が同定されている。このエンハンサーは22bp の共通配列が同一方向に 6 回繰り返して並ぶという特徴的な構造をしており，ゲルシフトアッセイによりこの共通配列に結合するいくつかの核内タンパク性因子の存在が確認されている。さらにこの共通配列中にはポリオーマウイルスエンハンサー中に存在する PEA 3 結合モチーフ様配列が含まれていた。PEA 3 モチーフにはプロトオンコジーン産物の 1 つである Ets ファミリータンパク質が結合して転写を活性化することが知られている。そこで *c-Ets*-1 及び *c-Ets*-2 遺伝子をクローニングし，Ets タンパク質が *EndoA* 遺伝子エンハンサーのこのモチーフへ結合し，プロモーターからの転写を活性化するかを調べることを目的として実験を行った。

（方　　法）

1．上記のエンハンサーが活性を示し，*EndoA* 遺伝子が発現している分化型テラトーマ PYS－2細胞から抽出したtotal RNA を用いて PCR（polymerase chain reaction）法により *c-ets-1*及び *c-ets-2* 遺伝子 mRNA の存在を調べた。

2．PCR 法を用いて胸腺の total RNA から *c-ets*-1 及び *c-ets*-2 の coding 領域の全長の cDNA をクローニングした。この cDNA を pGEX－2T プラスミドにクローニングし，*E.coli* XLI-blue 株において GST（Glutathione S-Transferase）との融合タンパク質を産生させ，これを glutathione agarose beads を用いて精製した。この融合タンパク質 GST－Ets-1 及び GST－Ets-2 について，*EndoA* 遺伝子エンハンサー共通配列22bp をプローブとしてゲルシフトアッセイ法によりその共通配列に対する特異的な結合を調べた。

3．*c-ets-1* 及び *c-ets-2* cDNA を SV 40ウイルスの初期遺伝子プロモーターを持った真核細胞発現ベクターpSG 5 にクローニングし，それぞれの発現ベクター pSG 5-ets-1 及び pSG 5-ets-2 を作製した。また *EndoA* 遺伝子のプロモーター領域を CAT（chloramphenicol acetyl transferase）遺伝子に結合させたプラスミド（pendoA－CAT）及びさらにその下流に EndoA 遺伝子エンハンサー全長を挿入したプラスミド（pendo A－CAT－EARE）の2種類のプラスミドを作製した。そして pSG 5－ets-1 または pSG 5－ets-2 と pendoA－CAT または pendoA－CAT－EARE とをリン酸カルシウム法により PYS－2細胞中に遺伝子導入して，発現ベクターによって産生された Ets タンパク質が細胞内においてエンハンサーを介して *EndoA* 遺伝子プロモーターからの転写を活性化するかを CAT アッセイ法によって調べた。

（結果と考察）

1．PCR 法により PYS－2細胞において *c-ets-1* mRNA の存在が認められた。融合タンパク質GST－Ets－1を用いたゲルシフトアッセイではシフトしたバンドがみられ，Ets－1タンパク質が共通配列に結合することが確認された。また PYS－2細胞への遺伝子導入実験により pSG 5－ets-1 は pendoA－CAT－EARE からの転写を約2倍上昇させ，pendoA－CAT に対しては転写活性を上昇させなかった。以上より，c-Ets－1 は PYS－2細胞内においてエンハンサーへの結合を介して *EndoA* 遺伝子プロモーターからの転写を活性化することが示された。

2．*c-ets-2* については PYS－2細胞においてその mRNA の存在が認められた。しかしゲルシフトアッセイによる融合タンパク質 GST－Ets-2 の共通配列への結合はみられず，遺伝子導入実験によるエンハンサーを介した転写活性の上昇もみられなかった。したがって，c-Ets－2 は PYS－2細胞内には存在したとしても *EndoA* 遺伝子エンハンサーに対する転写因子としての活性は持たないものと考えられる。

3．以上の結果より PYS－2細胞内において実際に c-Ets－1 タンパク質が *EndoA* 遺伝子のエンハンサーに対する結合を介して転写の活性化を行っている可能性が示唆された。しかし転写の活性化の度合が約2倍と低いことから，他の因子との協調的な作用が必要であるか，または c-Ets-1 とは別の Ets ファミリーに属する因子が PYS－2細胞内に存在しており，そちらが主として *EndoA* 遺伝子エンハンサーに作用して転写の活性化を行っている等の可能性も考えられる。

論文審査の結果の要旨

１個の受精卵から固体の体が形成られる「発生」という現象の解明は生物学の中でも興味深い分野の１つである。胚盤胞形成はマウス発生のおける最初の分化であり，その後の発生の進行に伴って起こる数多くの分化のプロトタイプであると考えられる。その分子レベルでの機構についてはまだ不明な点が多いが，胚盤胞形成に伴う分化マーカーであるサイトケラチン *EndoA* 遺伝子の発現制御の解析が，その解明のための一助となると考えられる。*EndoA* 遺伝子の下流には分化特異的に機能するエンハンサーが存在する。本研究によってこのエンハンサーに転写調節因子であるプロトオンコジーン産物c-Ｅtsが結合し，*EndoA* 遺伝子プロモーターからの転写を活性化することが示された。この研究成果を足がかりにして，最終的に何が胚盤胞形成における分化に伴う *EndoA* 遺伝子の転写の活性化を決定しているのか，さらに胚盤胞形成の分子レベルでの機構の解明という問題の解答がえられることが期待される。よって本研究は学位の授与に値すると考えられる。