



Title	マウス初期発生におけるEndoC遺伝子の発現とその調節
Author(s)	森, 雅彦
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38126">https://hdl.handle.net/11094/38126</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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

氏名	森 雅彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 10624 号
学位授与年月日	平成5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	マウス初期発生における <i>EndoC</i> 遺伝子の発現とその調節
論文審査委員	(主査) 教授 松代 愛三 (副査) 教授 中田 篤男 教授 西宗 義武

### 論文内容の要旨

#### (目的)

*EndoC* はマウスタイプ-I サイトケラチンであり、タイプ-II サイトケラチン *EndoA* と重合して中間径フィラメントを形成する。成体における発現は消化管などの単層上皮組織に限られることから単層上皮特異的サイトケラチンと言われている。またマウス胚発生過程においては初期胚分化に伴い胎盤や卵黄嚢などの胚体外組織で発現し、未分化胚細胞では発現しない。従って、*EndoC* 遺伝子の発現調節機構を解析することにより単層上皮の分化ばかりでなく胚発生過程における初期分化の分子機構を解明するための手掛かりが得られることが期待される。

本研究はマウス初期発生過程における *EndoC* 遺伝子の発現様式を明らかにするとともに *EndoC* 遺伝子の発現調節領域を同定すること目的として行なった。

#### (方法ならびに結果)

##### 1. *EndoC* 遺伝子のマウス初期胚での発現

ICR 系統マウスから着床前各発生段階の初期胚を採取し、RNA を抽出し、cDNA の塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて RT-PCR 法により *EndoC* mRNA の発現を調べた。その結果、*EndoC* 遺伝子は未受精卵では発現されておらず、4～8 細胞期で弱い発現が始まり、胚盤胞期に発現が強まることが明かとなった。次に培養細胞の RNA を用いてノーザンハイブリダイゼイションを行なったところ分化型 F9 (F9 RA)，胎盤の栄養芽層細胞 (PL) と臓側内胚葉細胞 (MB4) で発現し、未分化 F9 (F9)，壁側内胚葉 (PYS-2, HR9) さらに L 細胞では発現していなかった。

##### 2. *EndoC* 遺伝子のクローニング

マウス小腸 cDNA ライブラリーからクローニングした完全長の *EndoCcDNA* をプローブとしてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングした。その結果、*EndoC* 遺伝子の 6 個のエクソンすべてを含む 17kb のゲノム DNA をクローニングすることができた。

##### 3. DNase I 高感受性領域の検討

遺伝子が発現する際には特定領域でのクロマチン構造の変化が起こり、それらは DNase I に対して高感受性を示し、検出が可能である。また、多くの場合その領域は遺伝子発現調節と関連している。そこで *EndoC* 遺伝子を発現している PL と F9 RA、発現していない L と F9 という 4 種類の細胞からそれぞれ核を分離し、*EndoC* 遺伝子の

DNase I 高感受性領域 (DHS) を調べた。その結果、発現の有無に関わらず合計 5箇所の DHS が特定された。その内、2箇所は転写開始点上流約 2 kb (DHS 1) と約 0.2kb (DHS 2) のプロモーター領域にあり他の 3箇所 (DHS 3～5) は第一イントロン内に存在していた。DHS 1 は調べた細胞すべてで検出でき、DHS 2～4 は PL, F 9, F 9 RA で検出されたが、L では検出できなかった。DHS 5 は F 9 でのみ検出されたが、RNA ポリメラーゼⅢにより転写されるマウス高頻度反復配列である B 1, B 2 の内部にあることから B 1 あるいは B 2 配列の発現と関連していると思われる。

#### 4. *EndoC* 遺伝子の転写を調節する 5' 上流 cis-element の同定

*EndoC* 遺伝子 5' 上流域に存在すると想定される転写に対する cis-element を同定するために種々の長さの上流域を CAT 遺伝子に連結したレポーター遺伝子を構築した。それらの遺伝子をリン酸カルシウム法により PL と F 9 の各細胞にトランسفエクトし CAT アッセイを行なった。その結果、DHS 2 を含む転写開始点上流約 300bp の領域は F 9 と比較し PL で非常に強い活性を示した。さらに DHS 1 も含む上流約 6 kb はさらに約 3 倍の活性が検出された。

(総括)

1. *EndoC* 遺伝子はマウス初期発生過程において胚盤胞形成期から強く発現され、その後栄養外胚葉や臓側内胚葉で引き続き発現し、未分化胚細胞では発現しない初期分化特異的遺伝子であることを明かにした。
2. *EndoC* 遺伝子発現に関するある cis-element が局在すると思われる遺伝子上の 4 箇所の DNase I 高感受性領域を同定した。
3. 5' 上流域の 2 箇所の DNase I 高感受性領域はそれぞれ栄養芽細胞における *EndoC* 遺伝子発現に必要な領域である可能性を示した。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はマウス初期胚発生における分化の分子機構を遺伝子調節レベルで解析することを目的として行なったものである。まずテラトーマ細胞の分化にともない発現されるサイトケラチンをコードする *EndoC* 遺伝子が実際の着床前マウス胚において胚盤胞分化にともない発現することを明らかにした。次に *EndoC* 遺伝子全長を含むゲノム DNA をクローニングした。さらに、*EndoC* 遺伝子上あるいは近傍に、発現調節に係ると思われる 4ヶ所の DNase I 高感受性領域を同定した。そしてこれらの領域のうち上流域に存在する 2カ所の DNase I 高感受性領域は、*EndoC* 遺伝子発現に必要な領域である可能性を示した。

よって本研究は、マウス初期胚発生における遺伝子の発現機構に新しい知見を加えるものであり学位に値する業績と認められる。