



Title	マウスサイトケラチンendoA遺伝子のプロモーター領域の解析
Author(s)	山本, 英幸
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38173">https://hdl.handle.net/11094/38173</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	山本英幸
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10626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	マウスサイトケラチン <i>endoA</i> 遺伝子のプロモーター領域の解析
論文審査委員	(主査) 教授 松代 愛三 (副査) 教授 島田 和典 教授 吉川 寛

### 論文内容の要旨

#### (目的)

*EndoA* 遺伝子は、中間径フィラメントの一種であるサイトケラチンのタイプIIに分類される遺伝子の一つである。この遺伝子産物は、タイプIサイトケラチン *EndoB* 遺伝子の産物と重合することにより、フィラメントを形成することが知られている。マウス初期胚発生過去における *EndoA* 遺伝子は、8細胞期の後期から発現が始まり、最初の分化が起こる胚盤胞期では、外側の栄養外胚葉だけで発現が見られ、内側の内部細胞塊では発現していない。さらに成体においては、肝臓、腎臓、腸などの器官を形成する単層上皮組織の細胞で特異的に発現している。

このような発現様式を示す遺伝子の発現調節機構を解析することは、遺伝子の分化に伴った発現および組織特異的な発現を分子生物学的に理解するための手掛かりとなる。よって本研究では、この遺伝子の転写制御領域を同定し、遺伝子の発現に重要と考えられる領域の一つであるプロモーター領域の解析を行なった。

#### (方法および結果)

##### 1. *EndoA* 遺伝子の転写制御領域の同定

遺伝子の発現は、細胞内におけるクロマチンの立体構造の変化と転写因子の作用様式により決定されると考えられている。そして、遺伝子のクロマチンの立体構造の変化を知る手段として、ゲノム上のDNase I高感受性部位(DH site)を調べる方法が知られている。この方法によりその遺伝子を発現している細胞において確認される遺伝子ゲノム上のDH siteは、その遺伝子の転写制御領域である可能性が高い。そこで、*EndoA* を発現している培養細胞であるPYS-2細胞及びレチノイン酸で処理したF9細胞(F9RA)を用いてDH siteを調べた。

その結果、F9RA細胞では、*EndoA* 遺伝子の5'上流(転写開始点付近から上流約500bpまでの領域)に2箇所、さらに3'下流(最終エクソンの約1Kb下流)に1箇所DH siteが存在することが判明した。さらにPYS2細胞では、F9RA細胞で確認されたDH siteに加えて、第1エクソンから第1イントロンの領域に4箇所のDH siteが存在しており、合計7箇所のDH siteを確認した。

##### 2. プロモーター領域の解析

DH site存在が確認された5'上流域に含まれる転写制御領域を同定するために5'上流約1Kbから翻訳開始点までの領域をCAT遺伝子(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)の上流につないだプラスミドを作成した。さらに、このプラスミドを基準として*EndoA* 5'上流域を段階的に欠損した欠損変異プラスミドを

数種類作成した。次に各欠損変異プラスミドを *EndoA* が発現している PYS 2 細胞に導入し、細胞の全 RNA を回収後 S1 マッピング法によりそれぞれの転写活性を測定した。

その結果、欠損変異プラスミドのうち転写開始点の上流 100bp から TATA-BOX と呼ばれる共通配列までの領域を欠損したものは、転写活性を失うことが判明した。よって、この領域は *EndoA* 遺伝子の転写制御領域の 1 つであることが示唆された。そして、この領域の塩基配列特異的に結合する因子の存在及びその存在が *EndoA* 遺伝子の発現と同様に細胞種特異的であるかどうかを調べるために、この領域をプローブ (TATA-BOX は含まない) としてゲルシフトアッセイを行なった。

*EndoA* を発現している細胞として、PYS 2, F 9 RA, Placenta, 発現していない細胞として、未分化 F 9, L (fibroblast), 984cl-10 (myoblast) を用い、各細胞からタンパクを回収しアッセイを行なった。その結果、未分化 F 9 以外の全ての細胞において共通のバンドを 2 本確認した。そして、未分化 F 9 細胞においては他の細胞とは移動度の異なる 2 本のバンドを確認した。

このことより、*EndoA* 遺伝子の転写に関与する因子自体の発現には厳密な細胞種特異性がない可能性が示唆された。さらに、分化すると *EndoA* 遺伝子を発現するようになる未分化 F 9 細胞では、他の細胞とは異なる発現制御機構が存在する可能性が示唆された。

(総括)

1. DH site の同定より、*EndoA* 遺伝子を発現している点で同じ特徴を持つ細胞どうしであっても、*EndoA* 遺伝子の発現を調節する領域が異なる可能性が示唆された。
2. 5' 上流 100bp から TATA-BOX の領域は、塩基配列特異的に結合する因子が存在するが、この領域はマウスのホモログであるヒト CK 8 遺伝子のプロモーター領域と塩基配列の類似性が高い。さらに、*EndoA* 遺伝子と同じ様な組織特異的発現を示す *EndoB* 遺伝子のプロモーター領域と同じ塩基配列が含まれている点も含めて領域の重要性が示唆された。またこの領域には、これまでに報告されている転写因子の結合配列は認められないので、この領域に結合する因子に対して興味を持たれる。

## 論文審査の結果の要旨

マウスサイトケラチン *EndoA* 遺伝子は、マウス初期胚発生過程において最初の分化が起こる胚盤胞期で栄養外胚葉だけで発現が見られることから、栄養外胚葉特異的な分化マーカーとして知られている。さらに成体においては、肝臓、腎臓、腸などの器官を形成する単層上皮細胞層で特異的に発現している。このような発現様式を示す遺伝子の発現調節機構を解析することは、遺伝子の分化段階および組織特異的な発現を分子生物学的に理解するための手掛かりとなる。

本研究はこの遺伝子の 5' 上流域を解析した結果 *EndoA* 遺伝子の新たな転写制御領域を同定し、さらに TATA-BOX 近傍に結合する因子がこれまでに単離、同定されていない新しい転写因子である可能性を示唆したものである。また TATA-BOX 近傍に結合する因子が *EndoA* 遺伝子を発現していない細胞内にも存在することも明らかにした。これは遺伝子の転写制御機構として知られる転写因子の存在様式による調節と、クロマチンの立体構造変化という 2 つの現象を結びつけたもので遺伝子の発現制御機構を考える上で、重要な示唆を与えていると思われる。よって本研究は学位授与に値するものである。