



Title	Sequence of the EndoA gene encoding mouse cytokeratin and its methylation state in the CpG-rich region
Author(s)	玉井, 淑貴
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38176
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"〉 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	たま い よし たか 玉 井 淑 貴
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 1 6 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	Sequence of the <i>EndoA</i> gene encoding mouse cytokeratin and its methylation state in the CpG-rich region (マウスサイトケラチン <i>EndoA</i> 遺伝子の構造と発現制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 代 愛 三 (副査) 教 授 島 田 和 典 教 授 羽 倉 明

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

EndoA はマウスタイプIIサイトケラチンであり、タイプIサイトケラチンの *EndoB* と重合して、単層上皮組織で中間径フィラメントを形成する。又、マウス初期発生の過程では *EndoA* と *EndoB* をコードする遺伝子は 8 細胞期頃から発現が始まり、胚盤胞期になると胚の内側に位置する内部細胞塊では発現せず、外側の栄養外胚葉で強く発現するといった組織特異的な発現様式を示す。このような遺伝子の発現調節機構を解析することはマウス初期胚発生における初期分化を分子生物学的に解明することに通じる。本研究では *EndoA* 遺伝子の単離、遺伝子全塩基配列の決定、遺伝子発現に重要な配列や CpG に富んだ領域の同定、さらに、この CpG に富んだ領域のメチル化と発現調節との関連について検討を行った。

(方法並びに結果)

1. *EndoA* 遺伝子の構造

EndoA の完全長 cDNA と第 3 インtron に存在する B2 反復配列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、*EndoA* ゲノムをクローニングした。単離された遺伝子 DNA は 10,247 塩基対で 9 個のエクソンから成り、5' 側の 962bp と 3' 側の 1,778bp のフランキング領域を持っていた。開始コドンの ATG から 5' 上流 104 塩基に TATA ボックスが存在し、遺伝子の 3' 下流側には AATAAA のポリ A 付加シグナルが認められた。9 個のエクソンに分断する 8 個のイントロンはすべて翻訳領域に存在し、そのうち 7 個は α ヘリックスを形成することの予想される部分に位置していた。又、エクソンの数、イントロンの場所そして、エクソンとイントロンの長さは、どれも他のタイプIIサイトケラチン遺伝子とほとんど同じであった。このように、タイプIIサイトケラチンは、タンパク質構造ばかりでなく遺伝子の構造も非常によく似ていることから 1 個の祖先遺伝子から由来していることが示唆される。

2. 転写調節領域

次に、組織特異的転写調節に重要と思われる既知の配列について検討した。その結果、*EndoA* 遺伝子と同じくテラトカルシノーマ細胞の分化に伴って発現するポリオーマウイルスのエンハンサー α (PEA) モチーフである PEA 1 (AP-1) と PEA 3 が遺伝子の 5' 上流と 3' 下流、第 1 と第 3 インtron に存在していた。特に遺伝子の約 1 kb 下流には PEA 3 モチーフの 6 回の繰り返しが存在していた。この領域は *EndoA* 遺伝子の組織特異的な転写を調節するエンハンサーとして機能していることも明らかにした。

EndoA と *EndoB* はほとんどの場合、同じ細胞型で発現している。マウス *EndoA* とヒト *CK8* は異種ホモログであるため、同じ細胞で発現している。従ってこれらの遺伝子は何らかの共通な機構によって発現調節されていると考えられる。そこで、その可能性を検討するために3つの遺伝子間で相同性を調べた。

EndoA 遺伝子と *CK8* 遺伝子のエクソンを除いた領域の塩基配列を比較すると、5' 領域 TATA ボックス付近の約200bp、第1イントロン中の約50bpで相同性の高い領域が見つかった。又、*EndoA* と *EndoB* について比較すると、*CK8* とも相同性を示す TATA ボックス配列付近のやや上流と、転写開始点やや下流に相同性を持つ領域が見つかった。それ以外の領域はほとんど相同性がないことから、ここで見つかった相同性の高い領域と、発現の相同性との相関について興味を持たれる。

3. CpG 領域のメチル化

EndoA 遺伝子の第1エクソン周辺には CpG の2塩基配列が高い頻度で存在していた。遺伝子内上流域に存在する高頻度 CpG 領域がメチル化されていると、その遺伝子の転写は抑えられるという報告がある。そこでこの CpG に富んだ領域のメチル化状態を数種類の細胞で調べた。酵素認識配列が CCGG であり、メチル化に感受性のある制限酵素 Hpa II と非感受性の Msp I を用いてゲノム DNA を消化し、サザンブロット解析を行い、各々で検出されるバンドのパターンを比較した。ゲノム DNA は *EndoA* を発現していない細胞である、F9 と 3T3、そして発現している細胞である PYS-2 とレチノイン酸で処理した F9 (F9RA) からそれぞれ精製した。ハイブリダイゼーションのプロープには *EndoA* 遺伝子 DNA を4つに分断した各断片を用いた。その結果、*EndoA* 遺伝子の第1エクソン周辺に存在する CpG に富んだ領域は *EndoA* を発現していない 3T3 細胞で強くメチル化されているが、*EndoA* を発現している細胞 (PYS-2, F9RA) あるいは、発現することのできる細胞 (F9) ではほとんどメチル化されていなかった。又、遺伝子の他の領域についてはどの細胞も同程度にメチル化されていた。さらにマウスの各臓器から精製した DNA を用いて同様のサザンブロットを行ってみたが、この CpG に富んだ領域のメチル化はほとんど検出できなかった。今回の研究から、*EndoA* 遺伝子の5'側に位置する CpG に富んだ領域は 3T3 細胞でのみ強くメチル化されており、遺伝子発現の抑制機構にメチル化が関与することが示された。

(総括)

1) 遺伝子を単離して塩基配列を決定したところ、マウス *EndoA* 遺伝子の構造は、9つのエクソンに分断されていた。そのイントロンの位置を他のタイプIIケラチンと比較すると保存性が高く、1つの祖先型から多岐にわたって進化してきたと考えられる。サイトケラチン遺伝子の進化を検討する上で興味深い。

2) *EndoA* 遺伝子の3'下流にポリオーマウイルスのエンハンサーコア様の配列が6回繰り返し存在していた。解析の結果、この領域が *EndoA* のエンハンサーとして機能していることが認められた。今後、この領域に作用して転写の調節を行っているような因子の解析への糸口となった。

3) *EndoA* 遺伝子の5'側に位置する CpG に富んだ領域は *EndoA* を発現していない繊維芽細胞でメチル化されており、培養細胞系では遺伝子の発現抑制にメチル化が関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

サイトケラチン *EndoA* はマウス初期胚発生期において8細胞期頃から発現が始まり、胚盤胞期になると栄養外胚葉で強く発現する。このような発現様式から *EndoA* はマウス初期胚発生における分化マーカーとして注目されている。

本研究において、*EndoA* 遺伝子を単離して塩基配列を決定したところ、9つのエクソンによって構成されていることが明らかになった。また、*EndoA* 遺伝子の3'下流にポリオーマウイルスのエンハンサーコア様の配列が6回繰り返し存在し、この領域が *EndoA* のエンハンサーとして機能していることを認めた。さらに、*EndoA* 遺伝子の5'側に位置する CpG に富んだ領域は *EndoA* を発現していない繊維芽細胞でメチル化されており、培養細胞系では遺伝子の発現抑制にメチル化が関与する可能性が示唆された。

以上、マウスサイトケラチン *EndoA* 遺伝子の構造決定と遺伝子発現調節機構の解析はマウス初期胚発生における初期分化を分子生物学的に解明するうえで重要であり、本研究は学位論文に値すると考えられる。