

Title	POU転写因子、Epc-1変異マウスの作製
Author(s)	安居, 輝人
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38975
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	安 居 輝 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 7 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 3 月 23 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 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 名	POU 転写因子, Epoc-1 変異マウスの作製
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 青 笹 克 之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Epoc-1 (Epidermal octamer-binding protein-1) は Oct-1, Oct-2 と非常に相同性の高い POU ドメイン構造を有し、胸腺および皮膚に特異的に発現する POU 転写因子としてクローニングされた。しかし、胸腺、皮膚における発現細胞および生物学的機能についてはほとんど解明されていない。本研究では、Epoc-1 遺伝子の生物学的意義を明らかにするために胚幹細胞 (embryonic stem cells: ES cells) を用いたジーンターゲット法による Epoc-1 欠損マウスの作製を行い、Epoc-1 遺伝子の皮膚、胸腺をはじめとする組織形成への関与を個体レベルで検討した。

【方法ならびに成績】

1. マウス Epoc-1 染色体遺伝子のクローニング: BALB/c マウス染色体 DNA ライブラリーよりマウス Epoc-1 cDNA をプローブとしてブランクハイブリダイゼーション法にてスクリーニングした。得られたクローンは塩基配列を決定した。
2. Epoc-1 遺伝子欠損マウスの作製と確認: 先に得られた Epoc-1 染色体遺伝子を用いて Epoc-1 遺伝子を不活性化するために、DNA 結合に必須である POU 特異的ドメインをコードするエクソン内にネオマイシン耐性遺伝子を導入したベクター、あるいはネオマイシン遺伝子とその直前に β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (LacZ) を Epoc-1 のコーディングフレームと一致するように導入したベクターの 2 種のターゲットベクターを構築した。ES 細胞にターゲットベクターを導入することによって、それぞれ相同組換え体を得た。これら相同組換え体をマウス 3.5 日胚に注入してキメラマウスを作製し、さらに C57BL/6 マウスとの F1 を得た。続いて F1 同士の交配を行い Epoc-1 遺伝子欠損のホモ接合マウスを作製した。得られた F2 マウスのサザン解析をした結果、メンデルの法則に従いほぼ $+/+ : +/- : -/- = 1 : 2 : 1$ の割合でマウスが得られた。また Epoc-1 欠損マウスにおいて、Epoc-1 蛋白が産生されていないことを確認するためにウェスタン解析を行なった。野生型及び欠損型の皮膚角化細胞より細胞核抽出液を調製し、抗マウス Epoc-1 ポリクローナル抗体により検出した結果、野生型マウスにおいて約 40kDa の位置に Epoc-1 蛋白が検出されたのに対して、欠損型では Epoc-1 蛋白が検出されなかった。さらに Epoc-1 が認識するオクタマー DNA を用い結合蛋白を精製後、ウェスタン解析を行なった場合も同様の結果が得られた。

3. Epoc-1 遺伝子発現細胞の解析：Epoc-1 遺伝子に LacZ 遺伝子を導入したヘテロ接合マウスを用いて Epoc-1 遺伝子の各種組織における発現を検討した結果、16.5日胚における皮膚での発現は有棘層の角化細胞に強く認められた。また胸腺においても上皮細胞特異的にその発現がみられた。さらに他の臓器においても同様の発現解析をした結果、唾液腺、鼻腔上皮細胞に発現がみられたが舌および食道の角化細胞には発現が認められなかった。

4. Epoc-1 の胸腺組織形成および T 細胞分化に対する影響：4 週齢の野生型及び欠損型の胸腺組織をヘマトキシリン-エオジン染色し、胸腺形成に対する影響を検討した結果、欠損型の胸腺髄質が野生型に比し萎縮していることが確認された。さらに T 細胞に対する影響を検討するために FACS 解析を行なった結果、欠損型において CD3 陽性細胞の減少が観察された。しかし、皮膚の発達には両者に差は認められなかった。

【総括】

胸腺、皮膚に発現する POU 転写因子 Epoc-1 の生物学的機能を解明するために Epoc-1 遺伝子欠損マウスを作製し、Epoc-1 遺伝子産物の組織形成への影響と発現細胞を検討した。Epoc-1 遺伝子欠損マウスでは胸腺髄質の萎縮が認められ、CD3 陽性細胞も減少していた。しかし、皮膚の異常は認められなかった。LacZ を導入したマウスで皮膚有棘層角化細胞に LacZ の発現を認めたが、舌および食道上皮細胞にはみられなかった。

したがって、Epoc-1 遺伝子は胸腺の組織形成に関与することが明らかとなった。また、同じ角化細胞でも Epoc-1 発現の有無で亜群に分類できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は胸腺、皮膚特異的に発現する POU 転写因子、Epoc-1 の発現細胞の同定と生物学的機能を明らかにする目的で、胚性幹細胞を用いたジーンターゲティング法による Epoc-1 変異マウスの作製とその解析を行った。LacZ を導入したマウスの解析で Epoc-1 は皮膚有棘角化細胞、胸腺のハッサル小体に強く発現するが、同じ角化細胞でも舌、食道上皮細胞には発現しないことが明らかとなり、角化細胞の中でも Epoc-1 の発現の有無で亜群に分類される可能性が示唆された。また Epoc-1 遺伝子欠損マウスでは皮膚は正常に発生するが、胸腺髄質の萎縮と T 細胞の部分的分化異常を呈し、Epoc-1 が胸腺組織形成に関与することが明らかとなった。以上、本研究は胸腺、皮膚特異的転写因子の生物学的意義について有用な知見を与えており、生物学の発展に寄与するところが大きい。よって本研究は学位を授与するに十分であると考えられる。