



| | |
|--------------|--|
| Title | P0U転写因子、Epoc-1変異マウスの作製 |
| Author(s) | 安居, 輝人 |
| Citation | 大阪大学, 1995, 博士論文 |
| Version Type | |
| 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 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|----------------------------|
| 氏名 | やす い てる ひと |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第 11777 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 と非常に相同意の高い 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ティング法による 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ークハイブリダイゼーション法にてスクリーニングした。得られたクローナー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 種のターゲティングベクターを構築した。ES 細胞にターゲティング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エ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、ウエ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ニーエオジン染色し、胸腺形成に対する影響を検討した結果、欠損型の胸腺髓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髓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ニング法による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、胸腺髓質の萎縮と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である。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。