

Title	Isolation and Characterization of Retinoic Acid-Inducible cDNA Clones in F9 Cells : One of the Early Inducible Clones Encodes a Novel Protein Sharing Highly Homologous Regions with a Drosophila Polyhomeotic Protein
Author(s)	野村, みどり
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39243
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 ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	野村みどり
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 1 1 5 6 2 号
学位授与年月日	平成 6 年 1 0 月 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Isolation and Characterization of Retinoic Acid - Inducible cDNA Clones in F9 Cells: One of the Early Inducible Clones Encodes a Novel Protein Sharing Highly Homologous Regions with a Drosophila Polyhomeotic Protein (F9 細胞においてレチノイン酸により誘導される cDNA クローンの単離と解析: 早期誘導クローンの一つはショウジョウバエのポリホメオティックタンパク質といくつかの領域において高い相同性を示す新規タンパク質をコードしていた。)
論文審査委員	(主査) 教授 島田 和典 (副査) 教授 西宗 義武 教授 近藤 寿人

論文内容の要旨

[目的]

マウス胚性腫瘍細胞F9は形態学的及び生化学的に内部細胞塊に性質が良く似ており、レチノイン酸 (RA) 存在下で培養することによって遠位内胚葉へと効率良く分化させることができる。この *in vitro* の系を用いて従来より初期分化の研究がなされているが、分化誘導に至る一連の遺伝子発現については十分明らかにされていない。そこで、マウス初期胚分化の分子機構を明らかにする目的でF9細胞を分化誘導後、早期に発現誘導される cDNA クローンを系統的に単離し、その解析を行った。

[方法]

RAにより発現誘導されるクローンの系統的単離のために、RAを24時間、及び48時間作用させたF9細胞から作製した2種の cDNA ライブラリーをディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法を用いて、分化誘導後比較的早期に発現が誘導される cDNA クローンの単離を行った。これらの得られたクローンについて、発現誘導の動態をノーザンブロットングにより検討した。RA 処理後48時間までに発現誘導される RA 早期反応グループ (RA early response group ; Rae) と48時間以降に発現誘導される RA 後期反応グループ (RA late response group ; Ral) の2つのグループに分類した。また成熟マウスの9種類の臓器を用いて臓器別発現による分類を行った。次にこれらの cDNA の部分塩基配列を決定し、核酸及びタンパク質のデータベースを検索し、既知の遺伝子と未知の遺伝子に分類した。早期に発現誘導される8個の Rae クローンの中から、最も早期にしかも一過性に発現が誘導される未知のクローン、Rae - 28に注目し、全長クローンの単離、全塩基配列の決定、ホモロジー検索及びサザンブロットングを行った。

[結果]

RAにより発現誘導されるクローンとして17個のクローンを得ることできた。次にこれらの遺伝子について発現誘導の動態をノーザンブロットングにより検討したところ、Rae グループが8個、Ral グループ9個であった。また成熟マウスの9種類の臓器を用いて臓器別発現による分類を行った。その結果、Rae グループは組織特異的に、Ral グループは組織非特異的に発現が見られる傾向があった。次にこれらの cDNA の部分塩基配列を決定し、核酸及びタンパク

質のデータベースを検索したところ、10種類が既知の遺伝子と有意な相同性を示したが、残りの7種類のクローンは未知のものであった。10種類の既知の遺伝子の中で、今までにF9細胞の分化誘導により発現誘導されるという報告のあるのはオステオネクチン (osteonectin) とPDI (protein disulfide isomerase) の2個だけであり、残りの8個の遺伝子についてはF9細胞で発現誘導されるという報告はない。これらの中には、シグナル伝達に関わっている、PI (phosphatidyl inositol) 転移タンパク質, $G\alpha_i$, 細胞の分化, 癌化, 転移との関係が示唆されているリソゾーム膜タンパク質の LAMP-1 や CD63 などが含まれていた。

早期に発現誘導される Rae クローンの中から未知のクローン, Rae-28 に注目し詳細な解析を行った。ノーザンブロットングにより発現の誘導を見ると、分化誘導しないF9細胞での低いレベルの発現が、RA処理後3時間で誘導を受け、12時間がピークで、その後は徐々に減少していき、分化誘導しない状態よりも低いレベルまで低下した。臓器別の発現では、精巣に大量の発現がみられたほかは、脳、胸腺で弱い発現が見られた。Rae-28の全長クローンを単離したところ、ほぼ全長クローンと思われる Rae-2803, Rae-2819, Rae-2821 の3つの異なったクローンを得ることができた。塩基配列を決定した結果、3つのクローンは3カ所で異なっていたため、RT-PCR法によりどのクローンが主に発現されている mRNA の構造に対応するかを決定した。その結果 Rae-2819 が主な mRNA の構造を示すクローンの一つであり、Rae-2803 と Rae-2821 は少数クローンであることがわかった。Rae-2819 から推測されるアミノ酸配列についてホモロジー検索を行ったところ、ショウジョウバエのポリホメオティックタンパク質と2つのモチーフ及び2ヶ所の領域において高いホモロジーが見られた。2つのモチーフとは単一ジンクフィンガー、高グルタミン領域であり、2ヶ所の領域とは60%以上のホモロジーを示す28アミノ酸、66アミノ酸よりなる領域であった。ショウジョウバエのポリホメオティック遺伝子はその変異体がホメオティック遺伝子の機能獲得変異を示すため、その産物はホメオティック遺伝子の発現を抑制する作用を有しているクロマチンタンパク質と考えられており、形態形成に必須で重要な役割を果たしていると考えられている。従って、RAE-28タンパク質は、マウスの初期分化において形態形成に関わる遺伝子の発現を制御している可能性が示唆される。

[総括]

F9細胞を用いて、17個の RA により発現誘導される遺伝子を単離した。10個が既知の遺伝子で、7個が未知の遺伝子であった。既知の遺伝子の中で、今までにF9細胞の分化誘導により発現誘導されるという報告のあるのは2個だけであった。最も早期に発現が誘導される未知の遺伝子、Rae-28はショウジョウバエのポリホメオティック遺伝子と有意なホモロジーを示し、初期分化において形態形成に関わる遺伝子の発現を調節している重要な遺伝子である可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

マウス胚性腫瘍細胞F9は形態学的及び生化学的に内部細胞塊に性質が良く似ており、レチノイン酸 (RA) 存在下で培養することによって遠位内胚葉へと効率良く分化させることができる。この *in vitro* の系を用いて従来より初期分化の研究がなされているが、分化誘導に至る一連の遺伝子発現の制御機構については十分明らかにされているとは言えない。そこで、マウス初期胚分化の分子機構を明らかにする目的でF9細胞を分化誘導後、早期に発現誘導される cDNA クローンを系統的に単離した。

その結果、17個の RA により発現誘導される遺伝子を単離することができた。データベースを検索したところ、10個が既知遺伝子で、7個が未知遺伝子であった。既知遺伝子の中で、今までにF9細胞の分化誘導により発現誘導されるという報告があるのは2個だけであり、残り8個についてはそのような報告はなく、この論文の結果は新しい知見となった。さらに、未知遺伝子の中から最も早期に発現が誘導される、Rae-28について詳細に解析したところ、ショウジョウバエのポリホメオティック遺伝子と有意なホモロジーを示していることがわかった。

そのため、Rae-28は初期分化において形態形成に関わる Hox 遺伝子の発現を調節している重要な遺伝子である

可能性が考えられた。

Rae-28の単離はマウス初期胚分化, 特に初期形態形成の分子機構の解明に大きな貢献をするものであり, 学位の授与に値する研究と考えられる。