



Title	Isolation and Characterization of Retinoic Acid-Inducible cDNA Clones in F9 Cells : A Novel cDNA Family Encodes Cell Surface Proteins Sharing Partial Homology with MHC Class I Molecules
Author(s)	鄒, 志華
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40068
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	鄒志華
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12996号
学位授与年月日	平成9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	Isolation and Characterization of Retinoic Acid-Inducible cDNA Clones in F9 Cells: A Novel cDNA Family Encodes Cell Surface Proteins Sharing Partial Homology with MHC Class I Molecules (F9細胞においてレチノイン酸で誘導されるcDNAの単離と解析: MHC class Iと弱い相同性を示す細胞表面蛋白質をコードする新規cDNAファミリー)
論文審査委員	(主査) 教授 島田 和典
	(副査) 教授 野島 博 教授 西宗 義武

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様細胞へと効率良く分化させることができたため、哺乳動物の初期発生分化のモデル系として広く研究に利用されている。このF9細胞の分化誘導系を用いてRAで発現が誘導される遺伝子の探索を行ない、17個のcDNAを単離した。本研究ではこれらの中から胚発生の時期特異的に発現するRae-1 cDNAクローニングについて、そのコードするタンパク質の機能を明らかにするため、塩基配列構造及び発現を解析した。

【方法】

RAで分化誘導後のF9細胞、各発生段階でのマウス胚及び成熟マウスの各種臓器からグアニジン法でRNAを抽出し、Rae-1 cDNAをプローブとしたノーザンプロット法及びRT-PCR法によりrae-1遺伝子の発現を検討した。完全長cDNAを得るため多数のRae-1 cDNAを単離後、塩基配列を決定した。また、サザンプロット法で遺伝子構造を解析した。さらに、Mycエピトープを付加したRAE-1タンパク質をF9細胞で産生させ、抗-Myc抗体を用いて、RAE-1タンパク質の細胞内局在を調べた。

【結果】

1) Rae-1 mRNAの発現はノーザンプロット法によると、F9細胞をRAで分化誘導後、12時間で検出され、72時間でピークに達した。また成熟マウスの各種臓器や18日胚では発現は検出されず、11日胚、14日胚で検出された。特に11日胚の頭部で高いレベルの発現が示唆された。

2) 完全長Rae-1 cDNAを単離後、全塩基配列を決定、オープン・リーディング・フレームを検索したところ、Rae-1 cDNAは253個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。このタンパク質はリーダー配列、細胞外ドメイン、セリンースレオニンプロリンに富むSTPドメイン、C末端は膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域から構成され、また複数のN-グリコシル化部位、O-グリコシル化部位を含んでおり、糖鎖を持つ膜タンパク質である可能性が示唆された。

3) F9細胞でMycエピトープを持つRAE-1タンパク質を産生させ、RAE-1-Mycタンパク質の局在を

Myc タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法により検討した結果、RAE-1 タンパク質は細胞表面に存在するタンパク質であることを明らかにした。

4) タンパク質データベースの検索から RAE-1 タンパク質は MHC class I と低い相同性を有することを見い出したが、MHC class I 分子の細胞外ドメインは α 1, α 2, α 3 サブドメインよりなるのに対して、RAE-1 は α 1, α 2 様サブドメインのみからなり、 α 3 様サブドメインは含んでいなかった。

5) 完全長 Rae-1 cDNA を単離する過程で、Rae-1 cDNA には、塩基配列で98%前後、コードするアミノ酸配列で92%以上の相同性を示す3種類のcDNA (α , β , γ) が含まれていることを見い出した。更に、サザンブロット法により $rae-1\alpha$, β , γ 遺伝子の存在を確認した。

6) 3種の RAE-1 タンパク質間での塩基置換はアミノ酸置換をもたらすコドン内の第1, 第2塩基の置換が多く、ほとんどの塩基置換がアミノ酸置換をもたらすことから、アミノ酸置換を積極的に選択する機構の存在が示唆された。

7) RT-PCR 法で得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、3種類の $rae-1$ 遺伝子の発現を解析した結果、F 9 細胞では RA により $rae-1\alpha$ 遺伝子の発現が最も強く誘導されたが、11日胚頭部では $rae-1\beta$, γ 遺伝子の発現レベルは $rae-1\alpha$ 遺伝子より高いことが判明した。このことから、 $rae-1\alpha$ 遺伝子と $rae-1\beta$, γ 遺伝子は異なった発現制御を受けていることが示唆された。

【総括】

$rae-1$ 遺伝子は少なくとも3種類のメンバーからなる遺伝子ファミリーを形成しており、MHC class I 分子と弱い相同性を示す細胞表面タンパク質をコードしていることを明らかにした。Rae-1 mRNA の発現は胚発生の時期特異的に検出され、特に11日胚の頭部で強く発現している可能性が示唆された。以上の結果、RAE-1 タンパク質はマウスの発生過程で細胞間相互作用に関与している可能性が考えられ、特に脳形成への関与が推察された。

論文審査の結果の要旨

マウス胚性腫瘍細胞 F 9 はレチノイン酸 (RA) 存在下の培養で遠位内胚葉様細胞へ分化するが、本研究はこの系を用いて単離された、RAで発現誘導される遺伝子に対応するクローニングの一つ Rae-1 cDNA について解析を行なったものである。

Rae-1 mRNA は成熟マウスの各種臓器や18日胚では検出されず、11日胚、14日胚で検出され、特に11日胚の頭部に高い発現が観察された。cDNA の塩基配列から253アミノ酸残基からなるタンパク質をコードすると予想されたが、Myc エピトープを持つ RAE-1 タンパク質を F 9 細胞で発現させた後、抗 Myc 抗体と蛍光抗体法を用いることで、細胞表面タンパク質をコードしていることを明らかにした。また、データベース検索で RAE-1 タンパク質は MHC class I 分子と低い相同性を示すことを見いだした。更に、Rae-1 cDNA には塩基配列で98%前後、コードするアミノ酸配列で92%以上の相同性を示す α , β , γ の3種類があり、RT-PCR 法による解析で、Rae-1 α mRNA と Rae-1 β , γ mRNA は異なる発現パターンを示すことが示唆された。

以上の結果、 $rae-1$ 遺伝子はファミリーを形成しており、マウスの初期発生分化過程で細胞間の相互作用に関与している可能性が考えられる新規の細胞表面タンパク質をコードしていることを明らかにした。この研究は哺乳動物の発生分化の分子機構の解明に貢献するもので学位の授与に値すると考えられる。