

氏名(本籍)	馬場典子(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第514号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位論文題目	Expression and regulation of RB1CC1 in developing murine and human tissues

(発達過程のマウス及びヒト組織におけるRB1CC1の発現と調節)

審査委員	主査 教授 木村 博
	副査 教授 大路 正人
	副査 教授 松末 吉隆

論文内容要旨

※整理番号	519	(ふりがな) 氏 名	ばん ば のり こ 馬 場 典 子
学位論文題目	Expression and regulation of RB1CC1 in developing murine and human tissues (発達過程のマウス及びヒト組織における RB1CC1 の発現と調節)		
<p>【背景と目的】 <i>RB1CC1</i> (<i>RB1</i>-inducible coiled-coil 1)は本学で同定された新規の分子で、<i>RB1</i> (<i>retinoblastoma 1</i>)遺伝子の発現調節に関与する。乳癌では 10~20%に <i>RB1CC1</i> 遺伝子の機能消失が関与しており、癌抑制の機能を持つ。一方、成熟マウスの筋骨格系組織や神経、腎尿細管において <i>RB1CC1</i> と <i>RB1</i> の発現が密接に関わっており、ヒト embryo の筋骨格組織の発達過程でも細胞の成長と最終分化の制御に <i>RB1CC1</i> が重要な機能を果たしていることが推測されている。しかしながら、その情報は十分でなく、機能についても不明な点が多い。そこで、様々な組織の増殖と分化を評価するのに有用である embryo を用いて <i>RB1CC1</i> 蛋白の発現を解析した。さらに、マウス及びヒトにおける <i>RB1CC1</i> 遺伝子の発現調節について検討を加えた。</p> <p>【方法】 (1) 発達過程のマウス及びヒト胎芽・胎児組織における <i>RB1CC1</i> 発現の検討：受精後 4.5~18.5 日のマウス embryo での <i>Rb1cc1</i> と <i>Rb1</i> の発現をみるため、Northern blot にて解析を行った。次に、<i>RB1CC1</i> 蛋白と <i>RB1</i> 蛋白の局在を明らかにするために免疫組織化学染色を行った。受精後 10~17 日の C57BL6 マウス embryo、fetus、そして、胎生 4~8 週のヒト embryo のパラフィン切片を作成し、抗 <i>RB1CC1</i> 特異血清、抗 <i>RB1</i> モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、<i>RB1CC1</i>、<i>RB1</i> の発現を検討した。さらに、<i>RB1CC1</i> mRNA 発現を確認するため、マウスとヒト各々に特異的な cRNA プローブを作成し、<i>in situ</i> hybridization を行った。(2) <i>RB1CC1</i> 遺伝子発現調節の検討：マウス、ヒト <i>RB1CC1</i> 発現調節を解析するため以下の実験を行った。マウス、ヒト各々の <i>RB1CC1</i> 遺伝子 promoter 領域をクローニングし、これの変異体を作成し、<i>RB1CC1</i> promoter を含む luciferase vector を作成した。各 vector を lipofection 法によりマウス線維芽細胞株 NIH3T3 とヒト胎芽腎細胞株 HEK293T に導入し、48 時間後に luciferase assay を行い検討した。</p> <p>【結果】 (1) 発達過程のマウス Northern blot 解析にて、<i>Rb1cc1</i> は発生早期、受精後 4.5 日より発現し、発達過程を通じ強く発現していることが解った。<i>Rb1</i> は受精後早期には発現を</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

ほとんど認めないが、胎生 10.5 日以降に発現が上昇することが明らかとなった。組織学的解析によると、胎生 11 日のマウス、胎生 6 週のヒト embryo 共に RB1CC1 発現は筋骨格組織、神経組織に特に強いことが明らかとなった。RB1CC1 は主に細胞質に発現していたが、マウス embryo 骨格組織において、ヒト embryo では発現の少なかった未分化細胞にも Rb1cc1 の発現がみられた。マウス embryo 神経系組織の解析においては、より未分化な細胞では Rb1cc1 は細胞質に局在していたが、神経節のような分化した細胞では核にその発現局在が移行する所見を得た。発達過程において Rb1cc1 の細胞内局在が変化することが示唆された。In situ hybridization 法での Rb1cc1 mRNA の発現と局在も免疫組織学的検討を裏付けるものであった。(2) RB1CC1 遺伝子の promoter 活性はヒトよりもマウスでより強く、共に Exon 1 のすぐ上流約 300bp を含む領域が core promoter と考えられた。Exon 1 の上流約 300bp から Intron 1 の一部を含むと promoter 活性が抑制されることもわかった。また、マウスに比べヒトのほうがこの領域の promoter 活性がより抑制されていることも明らかとなった。

【考察】発達過程のマウス及びヒト組織における RB1CC1 発現解析の結果、組織の発達段階により RB1CC1 の細胞内局在が変化し、組織・器官の分化に何らかの役割を果たすことが示唆された。また、RB1CC1 遺伝子発現調節の検討の結果、RB1CC1 遺伝子の promoter 活性はマウスでより強く、ヒトにおける発現調節・抑制はマウスより厳密に行われている可能性が示唆された。ヒト RB1CC1 の Intron 1 領域はマウスの対応領域より長く、E12 や E47 などの転写因子と結合する E box 配列を認める。E47 は他の basic-helix-loop-helix 転写因子と二量体を形成し、E box と結合することで、ヒトの多くの組織において growth arrest や分化調節に関与している。ヒトで RB1CC1 promoter 活性が抑制され、厳密に調節されているのは、Intron 1 にある 2 つの E box サイトに E47 が結合することによる可能性が示唆された。

【結論】RB1CC1 は発達過程の胎児組織においてマウスで広汎かつ強い発現を示した。また、発達過程においては、その分化段階により、細胞内局在が変化することも明らかとなった。さらに、ヒト RB1CC1 発現は、ヒト特有の塩基配列と転写因子の結合により、マウスより厳密に抑制的にコントロールされていることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	519	氏名	馬場 典子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p><i>RBICC1</i> は癌抑制機能を持つことが知られているが、正常細胞における機能は不明な点が多い。本研究は、発達過程のマウス・ヒト組織を用いて増殖と分化に関わる <i>RBICC1</i> の機能を検討し、更にマウス・ヒトにおける <i>RBICC1</i> 遺伝子の発現調節について検討したものである。</p> <p>発現解析の結果、<i>Rblcc1</i> はマウスにおいて、mRNA レベルでも蛋白レベルでも発生早期から広汎かつ強い発現を示すことが明らかとなった。また、発達過程のマウス・ヒト組織において、その分化段階により <i>RBICC1</i> の細胞内局在が変化することが示唆された。更に、遺伝子発現調節の検討の結果、ヒト <i>RBICC1</i> の発現は Intron 1 にあるヒト特有の塩基配列により、マウスより厳密で抑制的な調節を受けていることが示唆された。</p> <p>本研究は、細胞の分化段階により <i>RBICC1</i> の細胞内局在が変化することと、ヒトにおけるその発現調節の厳密性とを初めて報告し、本分子の機能の多様性を示唆したものである。従って、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(平成18年2月6日)			