

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 曹 再 鉉

胎盤性プロラクチン (PRL) ファミリーに属している複数の胎盤性ラクトジェン (PL) は、妊娠時期に応じて発現しており、組織特異的および時期特異的な転写制御を受けている。ラット胎盤性ラクトジェン rPL-I は、妊娠中期に栄養膜巨細胞のみで発現している。一方、rPL-I と同じく PRL ファミリーに属している rPL-Iv は、rPL-I と cDNA の塩基配列で 90 % 以上の相同性を持ちながらその発現時期が妊娠後期に特異的で、巨細胞と海綿状栄養膜細胞で発現する。本論文は、これら二つの遺伝子の組織特異的および時期特異的な転写制御を DNA メチル化の観点から解析したもので、要約すると以下のようになる。

まず、RT-PCR によって胎盤を含む複数の臓器 (脳、心臓、腎臓、肝臓、筋、卵巣、下垂体、脾臓) における rPL-I および rPL-Iv の発現をしらべ、これらの遺伝子は共に極めて厳密に組織特異的な転写制御を受けていることが明らかになった。次にゲノム構造が調べられ、rPL-I 遺伝子は 5 つのエクソンおよび 4 つのイントロンからなっていることを明らかにした。そして、rPL-I 遺伝子の 5' 上流側 3.5kb もクローニングした。rPL-Iv 遺伝子も翻訳開始点より上流 1.8kb の塩基配列を決定した。興味深いことに、rPL-I および rPL-Iv 翻訳開始コドンの約 700bp 上流域まではお互いに 85 % の相同性があることが明らかになった。また、rPL-I および rPL-Iv の 5' - 上流域に特異的な領域をプローブにして、メチル化感受性酵素 (Hha I) を用いたサザンプロットングを行い、それぞれの上流域は組織特異的に非メチル化状態にあることが明らかになった。

次に DNA メチル化による rPL-I の遺伝子発現機構が集中的に解析された。上流 2.6kb に含まれる 12 ヶ所の CpG の胎盤、肝臓、脳下垂体における各 CpG のメチル化状態を解析し、-189, -1181, 1279, -1309, -1790, -1807, -2309, -2348 にある CpG も胎盤特異的に低メチル化状態であることも明らかになった。これらの CpG 配列を含む領域の、転写活性化における重要性を解析するために、翻訳開始点から様々な長さの 5' 上流域をもつルシフェラーゼ発現コンストラクト (-498Luc, -1069Luc, -1405Luc, -2445Luc および -3365Luc) を作成し、ラット絨毛ガン由来細胞株 Rcho-1 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、全てのコンストラクトが未分化 Rcho-1 よりも分化後の Rcho-1 でより高い活性を示したことから、少なくとも -498bp までの領域に分化依存的に rPL-I の発現を促進できるシスエレメントが存在することが明らかになった。また、-2445Luc は他に較べ分化依存的な発現促進活性が高く、rPL-I 遺伝子 5' 上流 1402 から 2445bp の間に、さらに転写を促進する部位が存在することが示唆された。

rPL-I 遺伝子の発現制御へのメチル化の関与を調べるために、-498Luc, -2445Luc および -3365Luc

をそれぞれ *in vitro* でメチル化し、Rcho-1 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。-498Luc ではメチル化による転写活性への影響が無かったのに対し、-2445Luc、-3365Luc ではメチル化によって発現が有意に抑制された。よって、-498 よりも上流の脱メチル化が rPL-I の転写の活性化に重要だと考えられた。この結果は、サザンブロッティングおよび Bisulfite sequence により得られた結果とよく一致する。メチル化した -2445Luc あるいは -3365Luc と共に、Methylcytosine-binding protein2 (MeCP2) の発現ベクターを強制発現させると、これらの発現はさらに抑制された。この時、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の TSA で細胞を処理すると、転写活性の回復が見られた。

これらの発見は、胎盤特異的な遺伝子発現が DNA メチル化によることを証明しており、組織特異遺伝子発現のエピジェネテックス機構として重要で、応用動物科学領域に貢献しているところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。