

審査の結果の要旨

氏名 土屋 富士子

妊娠、分娩などに伴う子宮および乳房の発達や癌化、骨代謝、心血管系の機能調節、細胞のアポトーシスなど、エストロゲンの体内でのさまざまな作用を持つことが知られている。これらの作用機序の発現機構を解明する目的にクローニングされたエストロゲン応答遺伝子であり、かつヒトにおいて癌細胞に強く発現しており、癌の浸潤に関係していると示唆される EBAG9 の機能解析のため、マウスの EBAG9 のゲノムと cDNA のクローニングを行い、その構造を同定した。また、マウスでの各臓器での発現やエストロゲン応答性、細胞の増殖に対する作用を示した。

以下に研究結果の要点を示す。

1. マウスの EBAG9 の cDNA は 1454bp で、ORF は 642bp、213 アミノ酸より構成されていた。蛋白には、そのアミノ酸配列により、膜を通過する膜貫通領域と蛋白間の結合に関与すると考えられているコイルドコイルドメインが存在することが予想された。ヒトとマウスにおける EBAG9 のアミノ酸レベルの相同性は 98% であり、両種間で保存されていることが示された。
2. マウスの EBAG9 のゲノムは約 30kb の長さであり、7 つのエクソンより構成されていた。そのうち、膜貫通領域は exon2 に、コイルドコイルドメインは exon7 に存在していたことが示された。
3. 同定された EBAG9 のアミノ酸配列を用いて EBAG9 蛋白を合成し、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作成した。精製した抗体がヒトとマウス両方の EBAG9 を認識することを確認した。
4. マウスの各臓器を用いてノザンブロットとウエスタンブロットを行い、RNA レベルとアミノ酸レベルでの EBAG9 の発現を調べた。RNA レベルでは心臓、肝臓、精巣で、アミノ酸レベルでは脳、膵臓、肝臓、肺、腎臓、精巣や発育中の胎児などで、EBAG9 が強く発現していることを示した。

5. 卵巣切除後 2 週間のマウスに 17β -estradiol を投与し、マウス子宮でのエストロゲンによる EBAG9 の発現の増加をウエスタンブロット法と *in situ* hybridization によって示した。
6. 生物化学的な EBAG9 の働きを調べるために EBAG9 の合成蛋白とともに NIH3T3 細胞を培養したところ、細胞増殖抑制作用を示した。

以上、本研究において、実験に必須であるマウスの EBAG9 のゲノムと cDNA のクローニングを行い、ヒトとマウスの EBAG9 を認識し得るポリクローナル抗体を作成した。また、EBAG9 はある種の細胞において増殖抑制作用を持つエストロゲン応答遺伝子であることが判明した。本論文はエストロゲンの体内での作用機序、特にエストロゲンと細胞増殖抑制や癌化の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。