

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名  唄 花子

妊娠・着床過程、特に胚盤胞の子宮内膜との子宮内コミュニケーションや接着過程の研究において反芻動物は優れたモデルとなりうると考えていた。しかし、研究にあたり、ウシの栄養膜細胞における遺伝子発現の知見はあまりなかった。そこで、ウシの栄養膜細胞における遺伝子発現を調べるため、ウシ栄養膜細胞 CT-1 および非栄養膜細胞 MDBK (ウシ腎臓由来細胞株) を用いて DNA マイクロアレイを行った。その結果、ウシ栄養膜細胞 CT-1 特異的に発現する転写因子 GATA を見出した。

転写因子 GATA ファミリーは、GATA1~GATA6 からなり、それぞれが発生過程において重要な役割を果たす。Gata2、Gata3 遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究では胎盤特異的遺伝子の発現低下をもたらすが、致死に至るのは 10.5 日-11.5 日であり、初期 (着床前) の栄養膜細胞の発達には関与しないと考えられてきた。しかしながら、近年、GATA3 が栄養膜細胞の分化および遺伝子発現制御に関与すると報告された。そこで、本研究では、反芻動物の着床期胚における転写因子 GATA の発現を精査するとともに、ウシ栄養膜細胞における機能の解析を行った。

第 1 章では反芻動物の着床期胚における転写因子 GATA の発現を精査することを目的として研究を行った。着床期のウシ胚 (妊娠 17 日、20 日、22 日、それぞれ着床前・着床時・着床後) およびヒツジ胚 (妊娠 15 日、17 日、21 日、それぞれ着床前・着床時・着床後) における GATA1、GATA2、GATA3、IFNT の発現を RT-PCR 法、Real-time PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。着床期のウシ胚において GATA1、GATA2、GATA3、IFNT の mRNA 発現が確認できた。GATA2、GATA3 mRNA は IFNT mRNA と同様に、着床前の胚では高い発現を示し、着床後には低下していた。一方、GATA1 mRNA の発現は着床後に増加していた。同時期のヒツジ胚においても、これら mRNA およびタンパクは同様の発現動態を示した。また、同日齢のヒツジ子宮・胚の組織切片を用いて GATA1、GATA2、GATA3 の発現を免疫染色法にて確認した。これらのタンパクは着床期ヒツジ胚の栄養膜細胞に局在していた。GATA1、GATA3 は核に、GATA2 は核および細胞質の両方に存在していた。続いて、GATA1 発現コンストラクト (pSG5-Gata1) を作製し、ウシ栄養膜細胞 F3 への導入により、GATA1 の発現が GATA2、GATA3 mRNA の発現に与える影響を調べた。その結果、pSG5-Gata1 導入により F3 細胞における内在性 GATA2 mRNA の発現が低下した。このことから、GATA2 の発現は GATA1 により抑制されることが示唆される。

反芻動物の着床期において GATA 因子の発現が確認できたことから、これらの転写因子が反芻動物の栄養膜細胞においても着床前に何らかの働きを担うことが示唆される。特に、栄養膜細胞における GATA1 の発現については、反芻動物、他の動物とも報告のない新知見である。

第2章では、反芻動物の着床期に転写因子 GATA2、GATA3 が *IFNT* 遺伝子発現に与える影響を検討した。まず、*IFNT* を発現するウシ栄養膜細胞 CT-1 および *IFNT* を発現しない非栄養膜細胞 (EF, oCG, MDBK, Bie, EEC, STR) を用いて *GATA1*、*GATA2*、*GATA3* および *IFNT* mRNA 発現を検証した。また、GATA2 および GATA3 発現コンストラクト (pSG5-*Gata2*, pSG5-*Gata3*) を作製し、ウシ *IFNT* 遺伝子の発現調節領域を組み込んだルシフェラーゼ・レポーター (*IFNT*-reporter) とともに、ウシ非栄養膜細胞 EF (耳由来繊維芽細胞) に強制発現し、*IFNT* 遺伝子の転写活性に与える影響を検討した。その結果、pSG5-*Gata2*、pSG5-*Gata3* 導入により *IFNT* 遺伝子の転写活性が上昇した。これは、GATA2、GATA3 の発現が非栄養膜細胞の *IFNT* 遺伝子発現環境を誘導しうることを示唆している。また、クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 法により、CT-1 細胞における内在性の GATA2、GATA3 の *IFNT* 遺伝子上流域への結合状態を確認した。その結果、CT-1 細胞における *IFNT* 遺伝子の発現調節領域および ORF に GATA2 および GATA3 の結合が確認できた。また、*IFNT* 遺伝子上流域に存在する GATA 結合サイトに変異を入れたところ、GATA による *IFNT* 遺伝子の転写活性の上昇効果は見られなくなった。さらに、*GATA2* siRNA および *GATA3* siRNA を CT-1 へ導入し、GATA2、GATA3 の発現を抑制した条件下で、CT-1 細胞における内在性 *IFNT* の発現を確認した。その結果、*GATA2* の siRNA 導入により CT-1 細胞における内在性 *IFNT* mRNA 発現も低下した。このことから、これら因子は *IFNT* 遺伝子の発現調節領域に存在する GATA 結合サイトを介して *IFNT* 遺伝子の転写を調節することにより発現調節を行うことが示された。

本研究により、反芻動物の着床期における胚・栄養膜細胞において転写因子 GATA1、GATA2、GATA3 の発現を明らかにした。また、転写因子 GATA2、GATA3 は反芻動物の妊娠認識物質である *IFNT* 遺伝子の栄養膜細胞特異的な発現制御に関与することも明らかにした。

これらは、ウシ栄養膜細胞の性質および *IFNT* 遺伝子発現制御を明らかにする上で有用な知見である。特に、反芻動物の栄養膜細胞においては、GATA1、GATA2、GATA3 が共発現していることから、これらはより複雑に相互作用しながら機能し、栄養膜細胞の遺伝子発現および遺伝子発現環境の調節に関与すると考えられる。本研究では、反芻動物の妊娠認識に必須である *IFNT* 遺伝子への発現制御への関与を明らかにしたが、GATA 因子は他の栄養膜細胞特異的な因子群も調節していると考えている。妊娠の成立には個々の遺伝子発現調節はもちろん、多くの栄養膜細胞因子群が正常に発現・機能することが重要である。したがって、今後これら因子が妊娠・着床期においてどのように哺乳動物共通あるいは反芻動物特異的な働きを持つかを明らかにすべきだと考える。

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。