

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名：マウス *ELYS* 遺伝子の構造ならびに胎生初期における発現と機能の解析  
(Characterization of the mouse *ELYS* gene and functional analysis of *ELYS*  
in early mouse development)

著者名 : 沖田 圭介  
Keisuke Okita

指導教官 : 転写制御学担当教授  
田賀 哲也

審査委員名 : 資源開発学担当教授 中潟 直己  
幹細胞制御学担当教授 桑 昭苑  
初期発生学担当教授 永測 昭良  
パターン形成学担当教授 横内 裕二

2004年3月

## 【目次】

要旨	... 1
発表論文リスト	... 3
謝辞	... 4
略語一覧	... 5
第1章 研究の背景と目的	... 6
第2章 実験方法	
1. <i>ELYS</i> のゲノム配列の解析	
a) cDNA プロープの調製	... 8
b) ブラークリフティング法によるフィルターの作製	... 9
c) ブラークハイブリダイゼーション法	... 9
d) ファージゲノムの回収・クローニング	...10
2. 転写開始点の決定	...10
3. 染色体マッピング	...11
4. プロモーター解析	
a) レポータープラスミドの構築	...11
b) AGM 分散培養細胞におけるプロモーター活性の測定	...11
5. <i>ELYS</i> ノックアウトマウスの作成	
a) ターゲティングベクター作成	...12
b) ES 細胞への導入	...12
c) 相同組み換えの判定	...13
d) キメラマウスの作成	...13
6. PCR 法による遺伝子型解析	...14
7. 組織学的検索	...14
8. Whole mount in situ hybridization 法	
a) DIG 標識 RNA プロープの作製	...14
b) 胚の前処理	...15
c) in situ hybridization 法	...15
d) DIG の検出	...15
9. 胚盤胞および内部細胞塊の培養	...16

第3章 実験結果	
第1節 <i>ELYS</i> 遺伝子の単離と構造解析	
1. マウス <i>ELYS</i> 遺伝子のゲノム DNA の単離と解析	...17
2. 転写開始点の決定	...18
3. <i>ELYS</i> 遺伝子の遺伝子座の決定	...18
4. <i>ELYS</i> 遺伝子のプロモーター領域の解析	...19
5. <i>ELYS</i> 遺伝子の cis エlement	...19
第2節 <i>ELYS</i> 遺伝子ノックアウトマウスの作成と表現型の解析	
1. <i>ELYS</i> ノックアウトマウスの作成	...20
2. 胎生初期における <i>ELYS</i> ホモ欠損マウスの表現型	...20
3. 初期胚における <i>ELYS</i> mRNA の発現	...21
4. <i>in vitro</i> における <i>ELYS</i> ホモ欠損胚盤胞の解析	...22
第4章 考察	...24
第5章 結語	...29
引用文献	...31
図・表	...35

## 【要旨】

マウスの個体発生において血球細胞の輩出の場は胚体外組織である卵黄嚢に始まり、やがて胎仔本体へと移って行く。この初期造血に関わる因子を同定するために、造血が盛んな時期 (胎生 9.5 日) と低下した時期 (胎生 13.5 日) の卵黄嚢を用いてサブトラクシヨクローニングが行われた。その結果、2243 個のアミノ酸をコードする遺伝子が単離され、*ELYS* (Embryonic Large molecule derived from Yolk Sac) と名付けられた。cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列中には核移行シグナル、核外移行シグナルおよび AT hook と呼ばれる DNA 結合モチーフが認められた。核移行シグナルまたは核外移行シグナルを欠失させた変異タンパク質はそれぞれ細胞質および核に局在した。また、GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインとの融合実験より、*ELYS* には転写活性化能をもつ領域とそれを抑制する領域が存在する事がわかった。以上の結果から、この遺伝子は転写因子ではないかと考えられる。しかし、その生体内での機能については未知の部分が多い。そこで、本研究では *ELYS* ノックアウトマウスの解析を通して、*ELYS* 遺伝子の機能を明らかにすることを目指した。

まず始めに *ELYS* 遺伝子のゲノム構造の解析を行った。マウスの *ELYS* 遺伝子は 36 個のエクソンからなり、ゲノム上では約 60 kbp の領域にまたがって存在していた。すべてのエクソン-イントロンのスプライス部位は GT-AG の法則に従っていた。遺伝子座は第一染色体上のマーカーである D1Mit315 および D1Mit509 の近傍に位置していた。転写開始点は翻訳開始コドンの 670 bp 上流にあるが、典型的な TATA ボックスや CCAAT ボックスは認められなかった。転写開始点を+1 として-1870 から+328 のゲノム領域が胎生期の造血組織である aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域の細胞の培養系において、プロモーター活性を持っていた。欠失変異体を用いた解析より、その転写活性の調節には転写開始点下流の+58 から+328 の領域が重要と考えられた。この部分に NF- $\kappa$ B/c-Rel や GATA-1、-2 および-3 等の転写因子の結合配列が認められたことから、これらの転写因子によって *ELYS* の発現が調節されている可能性を示唆した。

次に得られたゲノム構造の情報を基にして、*ELYS* ノックアウトマウスを作製

した。ELYS ヘテロ欠損体は外見上は特に異常が認められず繁殖も可能であった。しかし、このヘテロ欠損体の雌雄を交配してもホモ欠損体は産まれてこなかった。発生の時期を追って調べてみると、胎生 3.5 日目にはホモ欠損体は正常の形態をした胚盤胞を形成していた。ところが、胎生 7.5 日目にはホモ欠損胚は認められなくなっていた。胎生 5.5 日目の組織切片を調べたところ、胚の吸収像が高頻度に見られた。以上から、ホモ欠損体は造血組織の発生が始まる以前の胎生 3.5 日目から 5.5 日目の間に致死となると考えられる。そこで胎生 3.5 日目の胚盤胞を回収して詳しい解析を行った。野生体およびヘテロ欠損体を *in vitro* で培養すると、胚盤胞を構成する内部細胞塊および栄養外胚葉細胞がそれぞれ特徴的な形態を示して増殖した。それに対し、ホモ欠損体では栄養外胚葉細胞は認められたものの、内部細胞塊様の細胞は認められなかった。さらに *immunosurgery* 法でホモ欠損体の胚盤胞から内部細胞塊のみを単離して培養をしたところ、細胞はアポトーシスを生じた。これらの結果は内部細胞塊の生存あるいは増殖に ELYS が重要な役割を果たしていることを示唆している。一方、この時期の ELYS mRNA の発現は内部細胞塊のみならず栄養外胚葉細胞にも認められた。また、胎生 4.5 日、6.0 日および 6.5 日の胚についても、すべての系譜の細胞に ELYS mRNA の発現が認められた。さらに生体においても様々な臓器で ELYS の発現が確認されている。これらのことから、ELYS は内部細胞塊のみでなく多様な組織において細胞の生存あるいは増殖に重要な役割を果たしている可能性が推察される。

## 【発表論文リスト】

1. Keisuke Okita, Ikuo Nobuhisa, Makiko Takizawa, Masaya Ueno, Naoki Kimura, Tetsuya Taga  
Genomic organization and characterization of the mouse *ELYS* gene.  
Biochem Biophys Res Commun 305. 327-332., 2003
2. Hirofumi Inoue, Ikuo Nobuhisa, Keisuke Okita, Makiko Takizawa, Marie-Josèphe Pébusque, Tetsuya Taga  
Negative regulation of hematopoiesis by the *fused in myeloproliferative disorders* gene product.  
Biochem Biophys Res Commun 313, 125-128., 2004
3. Ikuo Nobuhisa, Makiko Takizawa, Satoshi Takaki, Hirofumi Inoue, Keisuke Okita, Masaya Ueno, Kiyoshi Takatsu, Tetsuya Taga  
Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein.  
Mol Cell Biol 23. 8486-8494., 2003
4. Naoki Kimura, Makiko Takizawa, Keisuke Okita, Osamu Natori, Katsuhide Igarashi, Masaya Ueno, Kinichi Nakashima, Ikuo Nobuhisa, Tetsuya Taga  
Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse foetal haematopoietic tissues.  
Genes Cells 7, 435-446., 2002
5. Masaya Ueno, Katsuhide Igarashi, Naoki Kimura, Keisuke Okita, Makiko Takizawa, Ikuo Nobuhisa, Tetsuo Kojima, Toshio Kitamura, Ulrike Samulowitz, Dietmar Vestweber, Taizo Shimomura, Toshio Suda, Kinichi Nakashima, Tetsuya Taga  
Endomucin is expressed in embryonic dorsal aorta and is able to inhibit cell adhesion.  
Biochem Biophys Res Commun 287. 501-506., 2001

## 【謝辞】

本研究の実施にあたり、終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました熊本大学大学院医学研究科転写制御分野の田賀哲也教授、中島欽一助教授、鹿川哲史助教授、信久幾夫助手に心から感謝いたします。近藤亨先生 (University of Cambridge)、上野将也助手 (金沢大学 がん研究所)、滝沢牧子先生 (群馬大学 血液内科)、井上博文先生 (University of Edinburgh) には同研究室在籍中に多くの御助言および御協力を頂きました。齋木優子さん、金子郁さん、岩木サヨミさん、野口夕紀さん、太田路子さんには日頃から様々な面で研究の補佐をしていただきました。本研究を支えてくださいました同研究室の皆様に御礼申し上げます。

ノックアウトマウスの作成に多大な御協力と御助言を頂いた清成寛先生 (理化学研究所 発生・再生研究センター)、相澤慎一先生 (同所属) に深く感謝いたします。

胎生初期のマウス胚の解析手法を惜しみなく教えてくださった Dr. Jennifer Nichols、Dr. Ian Chambers、Dr. Mia Buehr、Ms. Frances Stenhouse、Dr. Austin Smith (以上 University of Edinburgh) 並びに荒木喜美助教授 (熊本大学 臓器形成分野) に厚く御礼申し上げます。

ノックアウトマウスの飼育管理をしてくださいました熊本大学 生命資源研究・支援センターの皆様に感謝いたします。

本研究は、以上の多くの方々の惜しみない御協力と御厚意の下で行われ、それにより初めて成立したものです。心から御礼申し上げます。

最後に、本研究に尊い命を捧げてくれた動物たちの冥福を祈ります。

## 【略語一覽】

AGM、aorta-gonad-mesonephros (大動脈-生殖隆起-中腎)

BSA、bovine serum albumin

DIG、digoxigenin

DMEM、Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA、ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid

EGFP、enhanced green fluorescent protein

ES細胞、embryonic stem cell (胚性幹細胞)

FCS、fetal calf serum

GMEM、Glasgow minimum essential medium

NCBI、National Center for Biotechnology Information

PBS、phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理的食塩水)

PCR、polymerase chain reaction

RT-PCR、reverse transcription-PCR

SDS、sodium dodecyl sulfate



## 【第1章】 研究の背景と目的

マウスの個体発生において血球細胞の輩出は胚体外組織である卵黄嚢で始まる。この時期には有核赤血球を特徴とする胎仔型造血が行われる。その後、脱核した赤血球を特徴とする成体型造血が、胎仔本体の傍大動脈臓側中胚葉/AGM領域で始まる (Godin et al., 1993; Medvinsky et al., 1993; Cumano et al., 1996)。成体型造血の発達につれて、卵黄嚢における造血活性は胎生 10 日を過ぎた頃から徐々に減少し、胎生 12 日にはほぼ消失する。一方、成体型造血の場合は胎生 12 日頃に肝臓に移り、やがて成体において主要な造血組織となる骨髓および脾臓へと移行する。赤血球、B 細胞や好中球などの血液を構成する多様な血球細胞は造血幹細胞と呼ばれる一種類の細胞より分化・増殖を経て作り出される。その過程では適切な時期に適切な遺伝子の発現が行われ、それぞれの細胞を特徴付けていく。これらの遺伝子発現は細胞種特有の転写因子、コアクチベーター、コリプレッサーなどが造るバランスの上に成り立っていると考えられる。造血発生の過程では Runx-1、GATA-2 あるいは c-Myb などの転写因子が働いていることが知られているが、その全貌は未だ明らかになっていない。

Kimura らは、血球細胞における遺伝子発現を制御する分子を探索する目的で、造血が盛んな時期 (胎生 9.5 日) と低下した時期 (胎生 13.5 日) の卵黄嚢を用いてサブトラクシオンクローニングを行った。その結果、2243 個のアミノ酸からなる遺伝子を単離し ELYS (Embryonic Large molecule derived from Yolk Sac) と名付けた (Kimura et al., 2002)。cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列中には核移行シグナル、核外移行シグナルおよび AT hook と呼ばれる DNA 結合モチーフが認められた。核移行シグナルまたは核外移行シグナルを欠失させた変異タンパク質はそれぞれ細胞質および核に局在した。また、GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインとの融合実験より、ELYS には転写活性化能をもつ領域とそれを抑制する領域が存在する事がわかった。ELYS mRNA の発現は胎生期の造血組織に強く、また成体の骨髓においても造血幹細胞に富む細胞集団に認められた。以上の結果から、この遺伝子は造血に関わる転写因子ではないかと考えられた。

しかし、ELYS の発現部位を詳細に検討してみると、成体においては脳、肺、

心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣など造血組織以外の多くの臓器にも発現が認められた。また、血球細胞に限ってみても CD3 $\epsilon$  陽性の T 細胞、B220 陽性の B 細胞および Gr-1 陽性の顆粒球での発現が見られた。このような広範な発現分布は造血組織に限らない ELYS の機能を示唆している。そこで本研究では、ELYS ノックアウトマウスの作成および解析を通して生体における ELYS 遺伝子の機能の理解を目指した。

第 1 節では ELYS 遺伝子を含むゲノム領域を単離し、遺伝子構造を明らかにした。また、その遺伝子座および転写開始点を明らかにし、さらに ELYS 遺伝子の発現制御にかかわる cis エLEMENTの同定を試みた。

第 2 節では得られたゲノム情報を基に ELYS ノックアウトマウスを作製し、その表現型の解析を行った。ELYS ホモ欠損マウスは胎生致死であり、その時期および原因について解析を行った。

## 【第2章】 実験方法

### 1. ELYS のゲノム配列の解析

EMBL3 フェージベクターに C57BL/6 マウスの肝臓由来のゲノム DNA を組み込んだライブラリーを相澤らより供与していただき、ブランクハイブリダイゼーション法を用いて下記のように行った。

#### a) cDNA プローブの調製

プローブの鋳型としてマウス ELYS cDNA (GenBank Accession No. AB059278) より PCR 法を用いて下記の 6 種類の DNA 断片を調製した。それぞれの作成に使用したプライマーについても併せて示す。

ELP12 (12 -164 番目のアミノ酸に相当)

5'- TCCTGCATTTCCCAGAAGTG -3'

5'- TGTCCAACATCAGTCACCAC -3'

ELP265 (265 -444 番目のアミノ酸に相当)

5'- TTCCTGTCCATGCAGTTGCC -3'

5'- GTGATGTGGAGAAGTCCTAC -3'

ELP523 (523 -692 番目のアミノ酸に相当)

5'- GTTGCTGGTCTCCTCTCACC -3'

5'- ACAGGGTAGTTGTAGCGTAG -3'

ELP890 (890 -1040 番目のアミノ酸に相当)

5'- TGAGGCCTGGA ACTTACTGC -3'

5'- GGAAATGCCGATAACGGTTTGGG-3'

ELP1267 (1267 -1445 番目のアミノ酸に相当)

5'- GACTTCCAGCAGAAACTGAG -3'

5'- ATGGAGGTTTCGGCTCTCAAT -3'

ELP1674 (1674 -1842 番目のアミノ酸に相当)

5'- GACACCAGAAGTAAGGAAGC -3'

5'- AGTTTCTTCAGCTGCTGGCT -3'

各 cDNA を鋳型に Rediprime II DNA Labelling System (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, U.S.A.) を用いて  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ] dCTP (40 kBq/ $\mu\text{l}$ , Amersham Biosciences Corp.) で標識し、遊離のラジオアイソトープは MicroSpin G-25 Columns (Amersham Biosciences Corp.) で除去した。得られたプローブの放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC-5121、アロカ、東京) で測定した。

#### b) プラークリフティング法によるフィルターの作製

10 mM  $\text{MgSO}_4$  と 0.2 % maltose を含む 15 ml の LB 培地 (1 % bacto tryptone、0.5 % bacto yeast extract、170 mM NaCl) に大腸菌 (K802 株) を接種し、600 nm の吸光度が 2.0 になるまで 37°C にて振盪培養した。この培養液をファージの宿主菌液として用いた。宿主菌液 600  $\mu\text{l}$  にファージ  $4 \times 10^4$  pfu を加えて、37°C で 15 分間静置し宿主菌にファージを感染させた。これに溶解したトップアガロース (10 mM  $\text{MgSO}_4$  および 0.7 % アガロースを含む LB 培地) 8 ml を混合し、10 mM  $\text{MgSO}_4$  を含む 1.5 % アガロース LB 寒天培地が入った 9 cm x 13 cm の角シャーレに素早く重層した。トップアガロースが固まったことを確認した後、37°C で一晩静置してプラークを形成させた。プラークのできたプレートに、静かにナイロンメンブレンフィルター (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences Corp.) を重ね、プラークを移し取った。この後フィルターを、1.5 M NaCl および 0.5 N NaOH を含む混合液に室温で 5 分間反応させ、次いで 1.5 M NaCl および 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) を含む混合液で室温、10 分間処理した。2 x SSC (1 x SSC; 150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate) で軽く洗浄後、紫外線照射により DNA を固定した。こうしてできたフィルターは使用時まで -30°C で保存した。

#### c) プラークハイブリダイゼーション法

フィルターをハイブリダイゼーション液 [0.5 M  $\text{NaHPO}_4$  (pH 7.2、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  で調整)、1 mM EDTA、7 % SDS] 中で、65°C で 2 時間作用させた後に、 $^{32}\text{P}$  で標識した cDNA プローブを  $1 \times 10^6$  cpm/ml になるように加え、さらに 65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応後、フィルターを 2 x SSC および 0.1 % SDS を含む溶液と 0.2 x SSC および 0.1 % SDS を含む混合液で順次洗浄し、放射線の検出を BAS2000 バイオイメージングシステム (フジフィルム、東京) を用いて行った。陽性シグナルの検出された領域に相当するファージのプラークをと

ッブアガロースごと抜き取り、350  $\mu$ l の lambda dilution buffer [100 mM NaCl、10 mM MgSO<sub>4</sub>、35 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01 % gelatin] に入れた。chloroform を 1 滴加えて攪拌し、静置した。この上清をファージ液として扱った。

#### d) ファージゲノム DNA の回収・クローニング

得られたファージ液を大腸菌に感染させて、同一のプロープで再度ブランクハイブリダイゼーション法を行った (2次スクリーニング)。必要に応じて、再度繰り返し、ファージ液中に目的以外のファージが混ざっていないことを確認した。一部のクローンについては他のプロープに対する反応性についても検討を行った。ファージからのゲノム DNA の回収は Lambda Midi Kit (Qiagen、Valencia、CA、U.S.A.) を用いて行った。その後、適当な制限酵素で切断して、アガロースゲルで電気泳動することにより制限酵素地図を作成した。切断したファージゲノム DNA の一部は pBluescriptII KS (+) ベクターにサブクローニングした。ELYS cDNA 配列を参考に作成したプライマーを用いて、これらのベクターに対して BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、Foster City、CA、U.S.A.) を用いてサイクルシーケンス法を行い、ゲノム配列の一部を決定した。得られた配列と ELYS cDNA 配列の比較からエクソン-イントロンの境界を決定した。

## 2. 転写開始点の決定

マウス ELYS cDNA の 161 -180 bp に相補的なオリゴヌクレオチド 5'-TTACGTACAGCAGGGTCTCT -3'を用いてプライマーエクステンション法で転写開始点の決定を行った。オリゴヌクレオチドの 5'末端を T4 polynucleotide kinase (東洋紡、東京) を用いて  $\gamma$ - [<sup>32</sup>P] ATP (370 kBq/ $\mu$ l、Amersham Biosciences Corp.) で標識し、遊離のラジオアイソトープは MicroSpin G-25 Columns (Amersham Biosciences Corp.) で除去した。胎生 14 日目のマウス胎仔肝臓より抽出した全 RNA 30  $\mu$ g と標識オリゴヌクレオチドを 0.15 M KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3) および 1 mM EDTA を含む反応溶液中で 65°C、1 時間保温した後、徐々に 37°C に冷却することで DNA-RNA の二本鎖の形成を促した。その後、SuperScript II RT (Invitrogen、Carlsbad、CA、U.S.A.) を用いて逆転写反応を行い、

反応産物を 6% ポリアクリルアミドゲルで分離した。対照として T7 Sequencing Mixes (Amersham Biosciences Corp.) を用いて同一のオリゴヌクレオチドから *ELYS* ゲノム DNA のシーケンス反応を行った反応産物も同時に泳動した。ゲルを乾燥させた後、X線フィルム (RU-X、フジフィルム) に -80°C で 1 ヶ月間露光して現像した。

### 3. 染色体マッピング

T31 Mouse/Hamster Radiation Hybrid Panel (Invitrogen) を用いて、*ELYS* の遺伝子座を radiation hybrid 法にて決定した (McCarthy et al., 1997)。PCR 法による検出には以下の二組のプライマーを使用した。mEL1F (5'-AGGGAAGTGGAAACCACGACT-3') と mEL1R (5'-AGCATGTTTGCTTGCTTCGG-3')、および mEL2F (5'-TGGCCAACACGGTTGCAGAT-3') と mEL2R (5'-TCTCGTGAGTATCAGAAGGA-3')。それぞれについて 3 回ずつ試行を繰り返した。得られた結果は The Jackson Laboratory (<http://www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/rhsubmit.html>) へ送り解析していただいた。

### 4. プロモーター解析

#### a) レポータープラスミドの構築

*ELYS* 遺伝子の転写開始点を含む様々な長さのゲノム断片を制限酵素による切断あるいは PCR 法により作成し、ホタル・ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL3-Basic、Promega、Madison、WI、U.S.A.) に組み込んだ。配列はサイクルシーケンス法を用いて確認した。

#### b) AGM 分散培養細胞におけるプロモーター活性の測定

C57BL/6 マウスの胎生 11.5 日目の胎仔より実体顕微鏡下で AGM 領域を採取した。これを 0.25% トリプシン中で 37°C、5 分間消化した後に 15% FCS を含む DMEM で洗浄した。遠心により細胞を回収した後に同培地に再懸濁し、100 ng/ml stem cell factor (PeproTech、London、England)、1 ng/ml basic fibroblast growth factor (R&B Systems、Minneapolis、MN、U.S.A.) および 10 ng/ml oncostatin M (R&B Systems) を加えて、0.1% gelatin で処理した 48 穴プレートに  $0.2 \times 10^5$  ずつ蒔い

た。翌日、Trans IT-LT1 (Mirus, Madison, WI, U.S.A.) 0.3  $\mu$ l を用いてレポータープラスミド 150 ng を細胞に導入した。導入効率の比較のためにヒト伸長因子 1 $\alpha$  遺伝子のプロモータ領域により制御されるシーパンジー・ルシフェラーゼ遺伝子を持つベクター (pEF-Rluc) をホタル・ルシフェラーゼレポーターベクターの 100 分の 1 量加えた。48 時間後に Pikkagene Dual Luciferase Assay System (東洋インキ、東京) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測光にはルミノメーター (MicroLumat LB96P, PerkinElmer, Boston, MA, U.S.A.) を用いた。それぞれの検体についてホタル・ルシフェラーゼ活性をシーパンジー・ルシフェラーゼ活性で割り、検体間の導入効率による差を補正した。何も組み込んでいない pGL3-Basic を用いたときの活性値を 1 として相対値を算出した。

## 5. ELYS ノックアウトマウスの作成

### a) ターゲティングベクター作成

ファージライブラリーより得られた ELYS ゲノム DNA を用いて、第 1 エクソンの BamHI 制限酵素サイトから第 13 エクソンの 5'側イントロンに位置する BamHI 制限酵素サイトまでの約 20 kbp の部分をネオマイシン耐性遺伝子で置換し、pMCDT-A (A+T/pau) ベクターに組み込んでターゲティングベクターとした。

### b) ES 細胞への導入

ELYS ターゲティングベクターを制限酵素 Not I により切断して直鎖状にし、HBS [25 mM Hepes (pH 7.05)、137 mM NaCl、5 mM KCl、0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6 mM dextrose] に 60 nM となるように溶かした。ES 細胞 (TT2 株) は 0.25 % トリプシンで処理した後に回収し、HBS に  $2.5 \times 10^7$ /ml となるように懸濁した。エレクトロポレーション用の電極間隙 0.4 cm キュベット (Biorad, Hercules, CA, U.S.A.) にベクター液 0.1 ml と ES 細胞懸濁液 0.4 ml を入れて Gene Pulser (Biorad) で 0.8 kV、3.0  $\mu$ F の条件でエレクトロポレーションを行った。ES 細胞を回収して ES 細胞培地 [GMEM、10 % FCS、0.1 mM 非必須アミノ酸 (invitrogen)、1 mM sodium pyruvate、0.1 mM 2-mercaptoethanol、1000 U/ml leukemia inhibitory factor] で培養し、2 日後より 170  $\mu$ g/ml G418 (invitrogen) を加えてベクターが導

入された細胞を選別した。8日後に薬剤耐性 ES 細胞のコロニーを回収し、相同組み換えの有無を判定した。

#### c) 相同組み換えの判定

回収した ES 細胞を 0.25 % トリプシンで室温、5 分間処理した後に細胞の半分を継代して、残りの半分を PCR 法による判定に用いた。プライマーは 5'-GCACCATACACCACCTGGCCTAGTCTTGCT-3' および 5'-CCTGCTTGCCGAA TATCATGGTGGAAAATG-3' を使用した。TaKaRa LA Taq (宝酒造、東京) を用いて、94°C で 5 分間の後、96°C で 30 秒、68°C で 5 分間のサイクルを 50 回繰り返し、最後に 72°C で 15 分間維持する条件で行った。PCR 反応産物の確認できたコロニーについて培養を続け、細胞数が増えてきたところでサザンプロット法による解析を行った。ES 細胞より調製したゲノム DNA を *NheI* および *SacI* で切断し、ターゲティングベクターに含まれていない 3' 側のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション法を行った。また、ネオマイシン耐性遺伝子部分のプローブを用いてベクターが 1 コピーのみ挿入されていることを確認した。同様にゲノム DNA を *BamHI* で切断して、5' 側のプローブでも確認を行った。

#### d) キメラマウスの作成

相同組み換えを確認できた ES 細胞を ICR マウスの 8 細胞期胚にマイクロマニピュレーターを用いて注入した。翌日まで M16 培地 (95 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.7 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、23.3 mM sodium lactate、0.33 mM sodium pyruvate、5.56 mM glucose、0.4 % BSA、100 U/ml penicillin G、50 µg 力価/ml streptomycin、10 µg/ml phenol red) で培養を続け、胚盤胞に発生したものを偽妊娠マウスの子宮に移植した。生まれた雄のキメラマウスを飼育し、C57BL/6 マウスと交配させることによりヘテロ欠損マウスを得た。本研究で用いた *ELYS* 欠損マウスは少なくとも一度は C57BL/6 マウスと戻し交配を行っており、表現型の解析にはすべて自然交配で得た胚を用いた。マウスを使用した実験に関しては熊本大学動物実験指針および熊本大学組換え DNA 実験安全管理規則に準じて行った。



## 6. PCR 法による遺伝子型解析

*ELYS* ヘテロ欠損マウスを交配して得た新生仔は、生後 2 週から 3 週に尾よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法で遺伝子型を解析した。プライマーは 5'-GTGCCATTATGCCTACCATG-3'、5'-ACCACTTTATTCCATGTCCAC-3' および 5'-CTTCCTCGTGCTTTACGGTA-3' の 3 種を用いた。野生型遺伝子座からは 452 bp、組み換え遺伝子座からは 586 bp の PCR 産物がそれぞれ検出される。胚および培養細胞の野生型遺伝子座の検出には 5'-GCTTATCCTGAATCCAGACTTC-3' と 5'-TGCACCTATGGCACTGCTCC-3' を、組み換え遺伝子座の検出には 5'-GCTCATTCCCTCCCACTCATG-3' と 5'-ACCACTTTATTCCATGTCCACTC-3' をそれぞれプライマーとして用いた。アガロースゲルで電気泳動した後、サザンブロット法を行い PCR 産物の確認を行った。

## 7. 組織学的検索

*ELYS* ヘテロ欠損マウスを交配して、妊娠 5.5 日目に子宮を取り出した。4 % paraformaldehyde を含む PBS で 4°C、一晚固定後、パラフィン (Histosec、Herck、Darmstadt、Germany) に包埋した。4 -6  $\mu$ m 厚の切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

## 8. Whole mount in situ hybridization 法

Whole mount in situ hybridization 法は Rosen らの方法に従って行った (Rosen and Beddington, 1994)。

### a) DIG 標識 RNA プローブの作製

DIG 標識 RNA プローブを *ELYS* mRNA 配列の異なる 2 つの領域に対して作成した。鋳型として ELP12 および ELP1674 を用い、DIG RNA ラベリングミックス (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) を使用してセンスおよびアンチセンスプローブをそれぞれ作成した。Oct-3/4 に対するアンチセンスプローブは Dr. J. Nichols より供与していただいた AGS-122 を鋳型に作成した。

## b) 胚の前処理

各妊娠段階のマウスより胚を採取し、直ちに 4 % paraformaldehyde を含む PBS で固定した。25%、50%および 75% methanol を含む PBS でそれぞれ 4°C、5 分間処理した後に 100% methanol に移して脱水した。これらは使用時まで-30°Cで保存した。

## c) in situ hybridization 法

保存していた胚を 75%、50%および 25% methanol を含む PBS でそれぞれ 4°C、5 分間処理した後に PBT (0.1 % Tween-20 を含む PBS) に移した。再水和した胚は RIPA [150 mM NaCl、1 % Nonidet P-40、0.5 % sodium deoxycholate、0.1 % SDS、1 mM EDTA、50 mM Tris-HCl (pH8.0)] で室温、30 分間の処理を 3 回繰り返した。その後 PG-PBT (4 % paraformaldehyde、0.2 % glutaraldehyde を含む PBT) に移し、室温で 20 分間再固定を行った。PBT で洗浄して、PBT と HB [50 % formamide、5 x SSC (pH4.5)、50 µg/ml heparin、0.1 % Tween-20] を等量ずつ混合した液に 15 分間馴染ませた。HB で洗浄した後に、プレハイブリダイゼーション液 (100 µg/ml tRNA を含む HB) に移して、70°Cで 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次にプレハイブリダイゼーション液に 0.3 µg/ml となるように DIG 標識 RNA プロブ液を加え、ここに胚を移して、ハイブリダイゼーションを 70°Cで一晩行った。反応終了後、胚を HB で 70°C、10 分間洗浄した。さらに RNase buffer [500 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 % Tween-20] で室温、5 分間洗浄した後に、非特異的に結合した RNA プロブを除去するために 50 µg/ml RNaseA を含む RNase buffer に移し 37°Cで 30 分間反応させた。その後、再び RNase buffer で室温、5 分間洗浄した。さらに SSC-FT [2 x SSC (pH4.5)、50 % formamide、0.1 % Tween-20] で室温、5 分間の洗浄を 2 回、次いで 65°C、30 分間の洗浄を 3 回行った。最後の行程が終わった後に、室温に移して 10 分間ほど静置して冷却した。

## d) DIG の検出

十分に冷めてから、TBST [137 mM NaCl、2.7 mM KCl、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 % Tween-20] で室温、5 分間の洗浄を 3 回行った。その後、10 % 非動化ヤギ血清を含む TBST に移して、室温で 1 時間ブロッキングを行った。抗体は

alkaline phosphatase 標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) を 1 % 非動化ヤギ血清を含む TBST で 2000 倍に希釈して用い、4°Cで一晩反応させた。翌日、TBST で室温、5 分間の洗浄を 3 回、30 分間の洗浄を 4 回行った。その後、alkaline phosphate buffer [100 mM NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % Tween-20、100 mM Tris-HCl (pH9.5)] で室温、10 分間の洗浄を 3 回行った。発色反応は 450 µg/ml 4-nitroblue tetrazolium chloride および 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate を含む alkaline phosphate buffer を用いて、室温、遮光下で行った。顕微鏡下で程良く発色が進んだことを確認した後に、1 mM EDTA を含む PBS に胚を移して反応を停止した。一部の胚についてはさらに glycerol で透明化を行って観察した。

#### 9. 胚盤胞および内部細胞塊の培養

ELYS ヘテロ欠損マウスを交配して、妊娠 3.5 日目に子宮を M2 培地 [95 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.7 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>、20.9 mM HEPES (pH7.4)、23.3 mM sodium lactate、0.33 mM sodium pyruvate、5.56 mM glucose、0.4 % BSA、100 U/ml penicillin G、50 µg 力価/ml streptomycin、10 µg/ml phenol red] で灌流して胚盤胞を得た。これを ES 細胞培地に入れ、0.1 % gelatin で処理した 48 穴プレートで 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。内部細胞塊は同様に回収した胚盤胞より immunosurgery 法を用いて以下のように得た。回収した胚盤胞を酸性タイロッド液 [140 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.6 mM CaCl<sub>2</sub>、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5.6 mM glucose (pH 2.5)] で室温、1 分間処理して透明体を溶かした。M16 培地で洗浄後、同培地で 20 倍に希釈した抗マウス血清 (Sigma、St. Louis、MO、U.S.A.) と 37°C、30 分間反応させた。再度洗浄して、M16 培地で 20 倍に希釈した補体を含むモルモット血清 (Sigma) と 37°C、15 分間反応させた。パスツールピペットを用いて、溶解した栄養外胚葉から内部細胞塊を分離して、上記と同様に ES 細胞培地中で培養を行った。栄養外胚葉細胞の溶解液を用いて PCR 法で遺伝子型を判定した。TUNEL 法は In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics) を用いて行った。

## 【第3章】 実験結果

### 第1節 *ELYS* 遺伝子の単離と構造解析

#### 1. マウス *ELYS* 遺伝子のゲノム DNA の単離と解析

マウス *ELYS* 遺伝子のゲノム構造を明らかにするために、*ELYS* cDNA をもとに作成したプローブを用いてゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。最初に  $1 \times 10^6$  のファージブランクを ELP12、ELP265、ELP890 および ELP1674 プローブを用いて調べたところ、それぞれ 4、10、14 および 22 個の陽性クローンを得た。ELP12 より得た陽性クローンのうち 3 個で ELP265 でも陽性シグナルを検出した。これらのクローンは ELP12 から ELP265 までのゲノム領域を含んでいると考えられる。しかし、ELP265、ELP890、ELP1674 から得られたクローンはお互いに他のプローブには結合しなかった。そこで新たに ELP265 と ELP890 の間に ELP523 を、ELP890 と ELP1674 の間に ELP1267 を作成して、上記のクローンをスクリーニングした。その結果、ELP265 と ELP523 の両者に陽性となるクローンが 5 個、同様に ELP523 と ELP890 では 4 個、ELP890 と ELP1267 では 4 個、ELP1267 と ELP1674 では 5 個のクローンが得られた。これらの隣り合う二つのプローブに反応したクローンと、両端の ELP12 および ELP1674 のみに反応したクローンについてさらに解析を続けた。図 1A は解析に用いた代表的なクローンと *ELYS* のゲノム構造を模式的に示したものである。制限酵素による切断パターンの解析、サザンハイブリダイゼーション法による解析および *ELYS* cDNA 配列を基に作成したプライマーによる塩基配列の決定から *ELYS* 遺伝子は 36 個のエクソンを持ちゲノム上に約 60 kbp に渡って存在していることが明らかとなった。第 1 エクソンは 5'非翻訳領域であり、第 2 エクソンに翻訳開始点と予想される ATG 配列が認められた。第 36 エクソンに翻訳終止コドン (TAA) があり、その 224 bp 下流にポリ A 付加シグナル (AATAAA) が認められた。すべての 5'および 3'スプライス部位は GT-AG 法則に従っていた (表 1)。

*ELYS* がゲノム上に 1 コピーの遺伝子であるかどうかをサザンプロットを行

って調べた。マウスのゲノム DNA を BamHI、EcoRI、EcoRV、SacI および SphI のそれぞれの制限酵素で切断し、第 17 エクソンを含むゲノム配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法を行った (図 1B)。いずれの制限酵素を用いた場合でも 1 本のバンドのみが検出され、*ELYS* 遺伝子がゲノム上に 1 コピーであることがわかった。

## 2. 転写開始点の決定

*ELYS* 遺伝子の転写開始点をプライマーエクステンション法を用いて検討した。*ELYS* cDNA 配列の+161 から+180 に相補的なオリゴヌクレオチドの末端を放射性同位元素で標識した。*ELYS* mRNA の強い発現が認められている胎仔肝臓より全 RNA を抽出して、標識したプライマーと混合した後に逆転写反応を行った。反応産物をアクリルアミドゲルで分離すると、翻訳開始コドンの 670 bp 上流にあるグアニン塩基に当たる長さに陽性シグナルを検出した (図 2)。他の部位には強いシグナルは認められず、*ELYS* 遺伝子の転写はこの塩基より始まると考えられる。転写開始点の 5'側のゲノム領域には一般的な転写開始シグナルである TATA ボックスや CCAAT ボックスの典型的な配列は認められなかった (図 5)。

## 3. *ELYS* 遺伝子の遺伝子座の決定

染色体上の *ELYS* 遺伝子の位置を radiation hybrid 法を用いて決定した。*ELYS* 遺伝子の異なる部位を増幅するような二組のプライマーを使用して、T31 Mouse/Hamster Radiation Hybrid Panel をスクリーニングした。両方で結果が陽性だったものを“1”、陰性だったものを“0”、一致しなかったものを“R”として表記すると以下のような結果になった。

1100RR0000 0001000100 0000001111 1001001101 10001100R0

0000010000 0000000000 0000010101 0000001000 0111000100

これを The Jackson Laboratory に解析していただいたところ、*ELYS* 遺伝子は染色体上のマーカである D1Mit315 より 18.6 cR<sub>3000</sub> 近位から D1Mit509 の 18.6 cR<sub>3000</sub> 遠位の間に位置した (図 3)。いずれのマーカーも第 1 染色体の 101.6 cM の位置

に存在することから、*ELYS* 遺伝子もその部位に存在すると考えられる。

#### 4. *ELYS* 遺伝子のプロモーター領域の解析

*ELYS* 遺伝子の転写開始点近傍のゲノム領域を用いて *ELYS* の発現制御にかかわるプロモーター領域の同定を行った。解析にはマウスの個体発生において、成体型造血が最初に起こる AGM 領域の *in vitro* 分散培養系を用いた (Mukoyama et al., 1998)。この培養系では胎仔内で起こる多様な血球細胞の分化と増殖を再現する事ができる。また *ELYS* がこの領域で発現していることが報告されている (Kimura et al., 2002)。RT-PCR 法で AGM 分散培養系の細胞において *ELYS* mRNA が発現していることを確認した (結果は省略)。

pGL3-Basic は真核生物のプロモーターおよびエンハンサーを持たないレポーターベクターである。転写開始点を含む *ELYS* のゲノム領域 (-1870 から +328) を、このベクターのルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、AGM 分散培養系の細胞に遺伝子導入した。48 時間後に細胞を溶解して、ルシフェラーゼ活性を測定すると、pGL3-Basic を導入した場合に比べて約 130 倍の活性があった (図 4)。これは、この領域が実際にプロモーターとして働きうることを示す。さらに DNA 上の転写因子の結合領域 (cis エlement) を検索するために、種々の欠損変異体を作成して転写活性の変化を調べた (図 4)。転写開始点の 5'側を -1870 から -10 まで欠損させていったが、-10 から +328 の領域だけでも強い転写活性を持っていた。しかし、さらに 3'側を短くしていくと活性は pGL3-Basic と同程度まで減少していった。転写開始点の 3'側のみを欠損させた -1870 から +58 の領域を持つルシフェラーゼベクターは転写活性を示さなかった。以上の結果から転写開始点下流の +58 から +328 の領域に AGM 分散培養系において *ELYS* の発現を司る重要な cis エlement が存在していることが明らかとなった。

#### 5. *ELYS* 遺伝子の cis エlement

*ELYS* 遺伝子の転写開始点付近の塩基配列を図 5 に示した。TRANSFAC データベースを用いて、予想されるプロモーターおよびエンハンサー部位を TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) で検索した

(Heinemeyer et al., 1998)。 *ELYS* のプロモーター活性に重要な領域 (+58 から +328) には CRE-BP1 (ATF-2)、HSF2、E2F、NF- $\kappa$ B/c-Rel、GATA-1、-2 および-3 の結合配列が認められた。これらの因子により *ELYS* の発現が調節されている可能性が示唆された。

## 第 2 節 *ELYS* 遺伝子ノックアウトマウスの作成と表現型の解析

### 1. *ELYS* ノックアウトマウスの作成

生体における *ELYS* の機能解析を行うために *ELYS* ノックアウトマウスの作成を行った。*ELYS* 遺伝子の第 1 エクソンの一部から第 12 エクソンまでを含む約 20 kbp の部分をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成した (図 6A)。これを ES 細胞に遺伝子導入し、薬剤による選択を行った後に耐性クローンを拾って相同組み替えの有無を調べた。ES 細胞からゲノム DNA を抽出して NheI および Sall で切断し、ターゲティングベクターに含まれない 3'側のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション法で解析した (図 6B)。同様に 5'側およびネオマイシン耐性遺伝子部分のプローブを用いての解析も行った (結果は省略)。ネオマイシン耐性クローン 192 個のうち 3 個のクローンで相同組み替えを確認した。このうち No. 29 と 74 の 2 系統の ES 細胞から *ELYS* 遺伝子欠損を持つヘテロマウスを得ることができた。両系統のマウスは同じ表現型を示した。以下の実験は主に No. 29 系統のマウスを用いて行っている。

なお、*ELYS* の翻訳開始点下流にコドンの読み枠を合わせて *EGFP* 遺伝子をノックインしたマウスも作成したが、残念ながら *EGFP* の発現を確認できなかった。しかし、このホモ変異マウスも上記の 2 系統のマウスと同じ表現型を示した。

### 2. 胎生初期における *ELYS* ホモ欠損マウスの表現型

*ELYS* ヘテロ欠損マウスは外見上特に異常が認められず繁殖も可能であった。そこで、ヘテロ欠損マウスの雌雄を交配させて、産まれてきた 89 匹の新生仔

の遺伝子型を調べた。すると、その中にホモ欠損体は存在しなかった (表 2)。これは ELYS の欠損が胎生致死をもたらすことを示唆する。そこで妊娠後の様々なステージにおいて胚の遺伝子型の検索を行った (表 2)。胎生 3.5 日に子宮の灌流を行い胚盤胞を採取して調べてみると、ほぼメンデルの法則に従った数のホモ欠損胚が見つかった。これらの胚は形態的には正常胚との区別がつかなかった (後述)。しかし、胎生 7.5 日ではホモ欠損体は見つからなかった。また胚の吸収などの異常も認められなかった。着床直後の胎生 5.5 日目に子宮を採取して組織学的に調べてみると、正常の形態をした胚に混じり、胚の吸収像が認められた (図 7)。吸収が高頻度 (30 %、20 例中 6 例) であることから、これらは ELYS ホモ欠損体であると考えられる。従って、ELYS ホモ欠損体は胚盤胞まで発生して、胎生 3.5 日から 5.5 日の間に致死となっていると推察される。

### 3. 初期胚における ELYS mRNA の発現

これまで胎生 11.5 日および 14.5 日における ELYS mRNA の発現部位は知られていたが、発生初期における発現組織は明らかとなっていない。そこで、in situ hybridization 法を用いて、初期胚における ELYS mRNA の発現部位を解析した (図 8)。プローブは ELP12 と ELP1674 の二種類の DIG 標識アンチセンス RNA プローブを用いた。両者で同様のシグナルを検出した。胎生 3.5 日の胚盤胞について調べてみると、ELYS mRNA は内部細胞塊および栄養外胚葉に認められた。さらに妊娠 4.5 日に採取した着床直後の胚盤胞においても栄養外胚葉、内胚葉およびエピブラストのすべての部位において発現が認められた。胎生 6.0 および 6.5 日の胚についても調べたが、同様にすべての細胞に ELYS mRNA の発現が認められた。対照として、それぞれのセンスプローブを用いたが陽性シグナルは検出できなかった。また、胎生 6.5 日の胎子を Oct-3/4 に対するアンチセンスプローブで同様に調べると、Rosner らおよび Scholer らが報告したようにシグナルは原始外胚葉にのみ認められた (Rosner et al., 1990; Scholer et al., 1990)。



#### 4. in vitro における ELYS ホモ欠損胚盤胞の解析

ELYS ホモ欠損マウスは形態的には正常胚と同等の胚盤胞を形成した (図 9A、B)。そこでこの胚盤胞が機能的にも正常であるかどうかについて検討を行った。通常、胚盤胞を ES 細胞培地中で培養すると、透明体を脱出して培養ディッシュに付着し、胚盤胞を構成する内部細胞塊および栄養外胚葉細胞がそれぞれ特徴的な形態を示して増殖する。また、その際に内部細胞塊の一部は内胚葉系の細胞に分化する事が知られている。そこで、ELYS ホモ欠損体の胚盤胞の培養を行ない、経過を観察した (図 9)。ELYS ヘテロ欠損胚は正常胚と同様に内部細胞塊および栄養外胚葉細胞の増殖を見せ、一部の胚については小型で丸い形態を示す内胚葉系の細胞の出現を認めた (図 9A)。これに対して、ELYS ホモ欠損胚は培養 3 日目までは他の遺伝子型の胚と同様の形態を示したが、その後の培養 5 日までに内部細胞塊様の細胞が認められなくなり、栄養外胚葉様の細胞のみが見られるようになった (図 9B)。さらに培養を続けるとこの栄養外胚葉様の細胞も脱落していった。内胚葉系の細胞は培養中のいずれの時期においても認められなかった。これらの表現型を図 9C にまとめた。ELYS ヘテロおよびホモ欠損胚の一部には透明体からの脱出が遅いもの (6 日以上) が見られたが、その後の細胞形態は他のものと同様であった。

内部細胞塊の異常について詳細に解析するために、immunosurgery 法を用いて内部細胞塊のみを採取して培養を行った。妊娠 3.5 日目の子宮より胚盤胞を取り出して透明体を除去した後、抗マウス抗体で処理した。抗体は胚盤胞の最外層に位置する栄養外胚葉細胞にのみ結合し、内部に位置する内部細胞塊までは到達できない。ここに補体を作用させると抗体によって活性化され、結果として栄養外胚葉細胞の溶解を引き起こす。溶けた細胞から内部細胞塊を分離し、ES 細胞培地中で培養を行った (図 10)。野生型および ELYS ヘテロ欠損胚由来の内部細胞塊は培養開始後、すぐに培養ディッシュに付着して盛り上がった細胞塊を形成した (図 10A)。ほとんどの場合、それを取り巻くように丸い臓側内胚葉細胞が存在していた。また、まれに伸展した形態をとる壁側内胚葉細胞も認めた。ホモ欠損胚においても、immunosurgery 法により他の遺伝子型のものと同様の内部細胞塊が得られた。これを培養したが、5 日間の培養期間中に培

養ディッシュへの付着並びに増殖は認められなかった (図 10B)。培養 2 日目に浮遊している内部細胞塊を回収し TUNEL 法により染色すると、陽性シグナルが検出された (図 10C)。このことから、これらの細胞はアポトーシスを起こしていることがわかった。

## 【第4章】 考察

本研究よりマウス *ELYS* 遺伝子は 36 個のエクソンを持ち、ゲノム上に約 60 kbp に渡って存在していることが明らかとなった。また、その遺伝子座は第 1 染色体上のマーカーである D1Mit315 および D1Mit509 の近傍にあった。近年、目覚ましい勢いでマウスゲノムプロジェクトが進んでいる。今後の詳しい解析により多少の変更はあると思われるが、これまでに発表されている概要配列より、この 2 つのマーカーは 5.0 Mbp ある同一のコンティグ (NCBI contig No. NT\_039188) 上に存在することが明らかにされている。さらに *ELYS* はこれらのマーカーの間、D1Mit315 から 0.8 Mbp、D1Mit509 から 1.0 Mbp の位置にあることが示された。これは本研究で得られた結果と一致する。ヒトゲノムについても詳細な解析が進められており、コンティグ (NCBI contig No. NT\_004536) の解析からヒト *ELYS* 遺伝子は第 1 染色体長腕 44 (1q44) に位置していることが明らかにされている。塩基配列の解析からはマウス同様 36 個のエクソンが見つかったが、これについては mRNA の検出、転写開始点およびポリ A 付加位置の決定などの実験を通して確認が必要だと考えられる。

AGM 分散培養系における *ELYS* の発現を調節する cis エlementは転写開始点下流の領域に含まれていた。一般的に、転写の開始を司るコアプロモーターは転写開始点の上流に位置しており、その活性を調節する cis エlementはさらに上流の数 kbp から時には数十 kbp に存在したり、遺伝子領域全体に渡り広く散在したりする事が知られている。しかし、数は少ないが転写開始点の下流にコアプロモーターと cis エlementが存在する遺伝子も報告されている。例えば *von Willbrand factor* 遺伝子は転写開始点を含む-90 から+22 の領域にコアプロモーターを持ち、下流の第 1 エクソン中に血管内皮細胞特異的発現に必須の cis エlementがあることが明らかにされている (Jahroudi and Lynch, 1994)。 *ELYS* もそのような遺伝子の一つであると考えられる。

転写因子のデータベースを検索すると、AGM 分散培養系における *ELYS* のプロモーター活性に重要な領域には既知の転写因子の結合配列がいくつか見つかった。これらのうち HSF2、NF- $\kappa$ B/c-Rel、GATA-1、-2 および-3 については

血球の発生に重要であることが知られている。ヒト赤白血病細胞である K562 細胞は赤血球系あるいは巨核球系の細胞に分化させることができる。Pirkkala らはこの細胞を hemin を用いて赤血球へ分化誘導した時に、HSF2 が活性化することを報告した (Pirkkala et al., 1999)。また逆に、この HSF2 の活性化を抑えると赤血球への分化が阻害されることも示した (Leppa et al., 1997)。NF- $\kappa$ B/c-Rel ファミリーについては機能の類似性のため、ファミリー遺伝子のうち二つを欠損させたマウスにおいて造血組織に重篤な障害が起きることが報告されている。例えば、*RelA* と *NF- $\kappa$ B1* の遺伝子欠損を持つマウスではリンパ球系の細胞の発達阻害が見られ、*NF- $\kappa$ B1* と *NF- $\kappa$ B2* の遺伝子欠損を持つマウスでは破骨細胞と B 細胞の発達障害が見られる (Franzoso et al., 1997; Horwitz et al., 1997)。

Zn フィンガー蛋白質である GATA-1、-2 および-3 の 3 つの蛋白質は血球細胞においてそれぞれ異なる働きをしている。GATA-1 は胎仔型および成体型赤血球と巨核球の最終分化に必要であり、GATA-3 は T 細胞の分化に必要である (Ting et al., 1996; Takahashi et al., 1997, 1998)。これに対して、GATA-2 は成体型造血におけるすべての血球細胞の発生に必須であることがわかっている。実際に GATA-2 遺伝子欠損マウスは胎生 10 日から 11 日に重篤な貧血により致死となる (Tsai et al., 1994)。これらの蛋白質の結合配列が *ELYS* 遺伝子のプロモーター部位に認められたことは非常に興味深く、*ELYS* が造血発生に関わる可能性を示唆する。その一方で、発生初期の胚において *ELYS* mRNA は胚本体および胚体外組織を構成するすべての細胞に発現していた。上記の転写因子のうち HSF2 については胚盤胞において DNA 結合活性をもつことが報告されている (Mezger et al., 1994)。しかし、そのホモ欠損マウスには期待されたような表現型は現れず、正常に出生した (McMillan et al., 2002)。

*NF- $\kappa$ B/c-Rel*、*GATA-1*、-2 および-3 のいずれの遺伝子欠損マウスにおいても、*ELYS* 欠損マウスで見られたような胎生初期の重篤な異常は報告されていない。よって、発生初期における *ELYS* の発現がこれらの転写因子の一つによって特異的に調節されていることは考え難い。上記の因子を含む複数の、あるいは上記以外の転写因子によって調節されているのではないだろうか。その候補としては *ELYS* 遺伝子の転写開始点下流の領域に結合配列の認められた CRE-BP1 および E2F が挙げられる。しかし、

発生の時期や組織によって *ELYS* 遺伝子が異なるプロモーターを使い分けている可能性もあり、発現調節機構については今後さらに詳しい解析が必要であろう。

*ELYS* 遺伝子の一部をネオマイシン耐性遺伝子で置換して *ELYS* 欠損マウスを作成した。この *ELYS* ホモ欠損マウスは胎生初期に致死であった。妊娠 3.5 日目に子宮より胚盤胞を採取すると、そこには期待される数のホモ欠損胚が存在していた。また、この胚盤胞を *in vitro* で培養すると 2 日目までにほとんどのものが透明体を脱出して、培養ディッシュへ付着した。これらのことから、ホモ欠損胚は胚盤胞まで発生し、その多くは着床しているものと考えられる。通常、マウスの胚盤胞は妊娠 4.5 日頃に着床する。そこで、その直後の妊娠 5.5 日目に胚を子宮ごと取り出して形態を観察した。すると正常な胚に混じり、脱落膜中に異常な形態の胚が高頻度に見られた。妊娠 7.5 日では、これらの異常な胚は認められず、またホモ欠損胚も検出できなかった。これらを総合して考えると *ELYS* ホモ欠損胚は大半のものが着床するものの致死となり、すみやかに吸収されていると考えられる。

致死という重篤な表現型に対して、*ELYS* ホモ欠損胚は胎生 3.5 日目の胚盤胞まで目立った異常が認められない。この理由としては、*ELYS* 蛋白質が胚盤胞の時期までは必要ではないか、あるいは必要ではあるが母親由来の *ELYS* mRNA もしくは蛋白質が存在しており十分に代償できていたということが考えられる。この点については *ELYS* ホモ欠損胚盤胞において *ELYS* mRNA の有無を *in situ* hybridization 法で、あるいは蛋白質の有無を *ELYS* 特異抗体を用いて検討する予定であり、現在 *ELYS* に対するペプチド抗体の作成を進めている。

*ELYS* ホモ欠損胚が致死となる原因を解明するために、*in vitro* において解析を行った。ホモ欠損胚の胚盤胞を培養すると、透明体を脱出して培養ディッシュに付着するものの、栄養外胚葉様の細胞のみが認められ、内部細胞塊様細胞の増殖は見られなかった。この原因として二つの可能性が考えられた。一つは内部細胞塊が単に細胞死を起こしているというものであり、もう一つは内部細胞塊が栄養外胚葉へと分化転換しているために見かけ上内部細胞塊様の細胞が認められないというものである。前者の例としては細胞周期を制御する *Chk-1*

あるいは *ATR* の遺伝子欠損胚が挙げられ、これらの胚盤胞を培養すると *ELYS* 欠損胚と同様の表現型を示すことが報告されている (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000; Takai et al., 2000)。また、後者の例としては内部細胞塊および ES 細胞の未分化性維持に重要な役割を果たす *Oct-3/4* および *Sox2* の遺伝子欠損胚でやはり同様の表現型が報告されている (Nichols et al., 1998; Avilion et al., 2003)。ES 細胞は内部細胞塊より樹立される細胞株であり、内部細胞塊と同等の能力を持ち、生体を構成するすべての細胞に分化することができる。培養条件下で多分化能を保持したまま、未分化状態で増殖させることが可能である。この未分化状態の維持に *Oct-3/4* や *Sox2* などの転写因子のバランスが重要であると考えられている。例えば *Oct-3/4* の発現量がわずか 1.5 倍に増加するだけで ES 細胞は上皮様細胞に分化し、逆に発現が消失すると栄養外胚葉様の細胞へと分化する (Niwa et al., 2000)。内部細胞塊についても同様であり、*Oct-3/4* 遺伝子欠損胚盤胞から内部細胞塊を分離して培養すると、その細胞は栄養外胚葉様の細胞形態を取ることが報告されている (Nichols et al., 1998)。そこで *ELYS* ホモ欠損胚の内部細胞塊の分化状態について調べるために、胚盤胞より内部細胞塊を採取して培養を行った。しかし、*ELYS* 欠損胚から得られた細胞は培養ディッシュに張り付かず、TUNEL 法によりアポトーシスを起こしていることがわかった。この結果は *ELYS* が内部細胞塊の細胞の生存あるいは増殖に必須の因子であることを示唆する。残念ながら *Chk-1* あるいは *ATR* の遺伝子欠損胚の内部細胞塊のみを培養した時の表現型について報告はないが、その遺伝子の機能を考えると *ELYS* と同様の結果が予想される。今回得られた *ELYS* 欠損胚の表現型を考えると、*ELYS* は *Oct-3/4* や *Sox2* などのように内部細胞塊の分化を調節するのではなく、*Chk-1* や *ATR* のように細胞の生存や増殖に重要な因子ではないかと考えられる。また、胚盤胞における *ELYS* の発現部位は内部細胞塊だけではなく、栄養外胚葉細胞にも認められた。このことから *ELYS* が内部細胞塊特異的な機能を持つと考えるよりも、各細胞に共通する機能を持つと考える方が妥当だと思われる。

*ELYS* mRNA の発現は胎生 3.5 日、4.5 日、6.0 日および 6.5 日の胚において胚体外・胚体内を問わず、すべての系譜の細胞に認められた。さらに生体におい

ても様々な臓器で ELYS の発現が確認されている。本研究の結果を併せて考えると、ELYS は多様な細胞において生存あるいは増殖という重要な過程の一役を担っている可能性がある。細胞増殖に伴う分裂の過程は、cyclin および cyclin dependent kinase に代表される細胞周期制御因子によって調節されている。G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> および M 期の各期に働く蛋白質はこれらの因子の下に厳密な発現制御を受けている。例えば転写因子である E2F1 は cyclinE の下流において G<sub>1</sub>/S 期に働く蛋白質の発現を制御することが知られている(DeGregori et al., 1995)。ELYS 遺伝子のプロモーター部位にこの E2F1 の cis エレメントが認められたことは大変興味深い。ELYS はそのアミノ酸配列中に核移行シグナル、核外移行シグナル および AT hook と呼ばれる DNA 結合モチーフが認められており、転写因子として働くことが予想されている。この点を考慮すると、ELYS が細胞周期の制御に関わる転写因子である可能性も考えられる。一方で、ELYS が細胞の維持に関わっている可能性もある。グルコーストランスポーターの 1 つである GLUT8 を機能阻害した胚盤胞ではアポトーシスが起ることが報告されている(Pinto et al., 2002)。このような細胞の生存あるいは維持に直接的に必要な遺伝子の発現制御を ELYS が行っているとも考えられる。ELYS mRNA はマウス線維芽細胞である NIH3T3 およびヒト肝癌細胞株である HepG2 にも認められた。これらの細胞を in vitro のモデル系として利用し、機能解析を進めていく予定である。また、yeast two-hybrid 法を用いて ELYS に結合する蛋白質のスクリーニングを現在進めている。これらの実験により、ELYS の機能が今後より詳細に明らかになるであろう。

## 【第5章】 結語

*ELYS* は胎生 9.5 日目の卵黄嚢よりクローニングされた遺伝子である。in vitro における解析の結果からは、*ELYS* が細胞質と核を行き来する転写因子である可能性が示された。しかし、その機能については未知の部分が多い。そこで本研究ではこの *ELYS* 遺伝子の生体における機能を明らかにするために 1) *ELYS* 遺伝子を単離し、その構造解析を行った。また、2) *ELYS* 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、表現型の解析を行った。

1) については以下の事柄を明らかにした。

- ・マウスの *ELYS* 遺伝子は 36 個のエクソンからなり、ゲノム上で約 60 kbp の領域にまたがって存在していた。
- ・すべてのエクソン-イントロンのスプライス部位は GT-AG の法則に従っていた。
- ・遺伝子座は第 1 染色体のマーカである D1Mit315 および D1Mit509 近傍に位置していた。
- ・転写開始点は翻訳開始コドンの 670 bp 上流のグアニン塩基であった。その 5'側には典型的な TATA ボックスや CCAAT ボックスは認められなかった。
- ・AGM 分散培養系において *ELYS* 遺伝子の発現調節領域は転写開始点下流 (+58 から+328) に存在した。この領域には転写因子である CRE-BP1 (ATF-2)、E2F、HSF2、NF- $\kappa$ B/c-Rel、GATA-1、-2 および-3 の結合配列が認められた。

2) については以下の事柄を明らかにした。

- ・*ELYS* ホモ欠損マウスは胎生 3.5 日から 5.5 日の間に致死となっていた。
- ・胎生 3.5 日目の胚盤胞を培養すると、栄養外胚葉細胞は認められたが、内部細胞塊様の細胞は認められなかった。
- ・ホモ欠損胚盤胞の内部細胞塊のみを単離して培養を行ったが、細胞はアポトーシスを起こした。



- ・ ELYS mRNA は胎生 3.5、4.5、6.0 および 6.5 日目の胚のすべての細胞で発現していた。

胎生初期から成体にかけて ELYS mRNA は広範な組織で発現している。ノックアウトマウスにおける重篤な表現型は、ELYS が生体機能について重要な遺伝子産物であることを示している。この分子の機能を明らかにすることにより、細胞機能ひいては生体の成り立ちの理解へとつながるだろう。

## 【引用文献】

- Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-140.
- Brown E J and Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14: 397-402.
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I (1996) Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86: 907-916.
- DeGregori J, Kowalik T, Nevins J R (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15: 4215-4224.
- Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores E W, Brown K D, Leonardi A, Tran T, Boyce B F, Siebenlist U (1997) Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 11: 3482-3496.
- Godin I E, Garcia-Porrero J A, Coutinho A, Dieterlen-Lievre F, Marcos M A (1993) Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364: 67-70.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel A E, Kel O V, Ignatieva E V, Ananko E A, Podkolodnaya O A, Kolpakov F A, Podkolodny N L, Kolchanov N A (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26: 362-367.
- Horwitz B H, Scott M L, Cherry S R, Bronson R T, Baltimore D (1997) Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappaB-deficient fetal liver cells. *Immunity* 6: 765-772.
- Jahroudi N and Lynch D C (1994) Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol Cell Biol* 14: 999-1008.
- Kimura N, Takizawa M, Okita K, Natori O, Igarashi K, Ueno M, Nakashima K,

- Nobuhisa I, Taga T (2002) Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse foetal haematopoietic tissues. *Genes to Cells* 7: 435-446.
- Leppa S, Pirkkala L, Saarento H, Sarge K D, Sistonen L (1997) Overexpression of HSF2-beta inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J Biol Chem* 272: 15293-15298.
- Liu Q, Guntuku S, Cui X S, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower L A, Elledge S J (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-1459.
- McCarthy L C, Terrett J, Davis M E, Knights C J, Smith A L, Critcher R, Schmitt K, Hudson J, Spurr N K, Goodfellow P N (1997) A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. *Genome Res* 7: 1153-1161.
- McMillan D R, Christians E, Forster M, Xiao X, Connell P, Plumier J C, Zuo X, Richardson J, Morgan S, Benjamin I J (2002) Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol* 22: 8005-8014.
- Medvinsky A L, Samoylina N L, Muller A M, Dzierzak E A (1993) An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364: 64-67.
- Mezger V, Rallu M, Morimoto R I, Morange M, Renard J P (1994) Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev Biol* 166: 819-822.
- Mukoyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan P J, Kim H, Kogo H, Tsuji K, Nakahata T, Miyajima A (1998) In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8: 105-114.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391.

- Niwa H, Miyazaki J, Smith A G (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.
- Pinto A B, Carayannopoulos M O, Hoehn A, Dowd L, Moley K H (2002) Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol Reprod* 66: 1729-1733.
- Pirkkala L, Alastalo T P, Nykanen P, Seppa L, Sistonen L (1999) Differentiation lineage-specific expression of human heat shock transcription factor 2. *Faseb J* 13: 1089-1098.
- Rosen B and Beddington R (1994) Detection of mRNA in whole mounts of mouse embryos using digoxigenin riboprobes. *Methods Mol Biol* 28: 201-208.
- Rosner M H, Vigano M A, Ozato K, Timmons P M, Poirier F, Rigby P W, Staudt L M (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345: 686-692.
- Scholer H R, Dressler G R, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P (1990) Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *Embo J* 9: 2185-2195.
- Takahashi S, Komeno T, Suwabe N, Yoh K, Nakajima O, Nishimura S, Kuroha T, Nagasawa T, Yamamoto M (1998) Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo. *Blood* 92: 434-442.
- Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, Suwabe N, Hayashi N, Yanai N, Nabesima Y, Yamamoto M (1997) Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem* 272: 12611-12615.
- Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima Y A, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M (2000) Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 14: 1439-1447.

Ting C N, Olson M C, Barton K P, Leiden J M (1996) Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384: 474-478.

Tsai F Y, Keller G, Kuo F C, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt F W, Orkin S H (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371: 221-226.

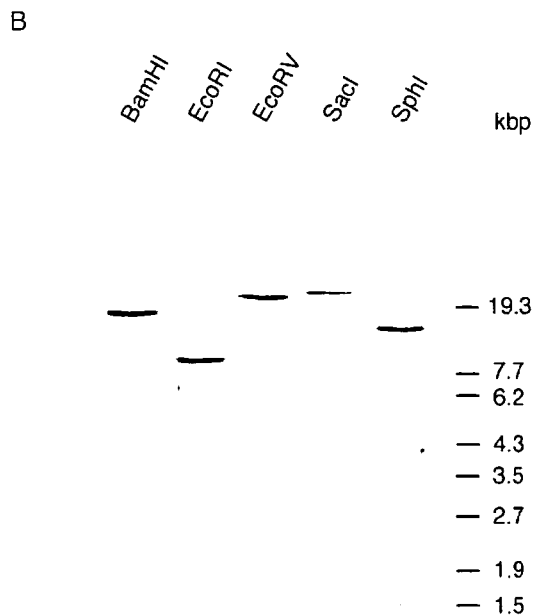
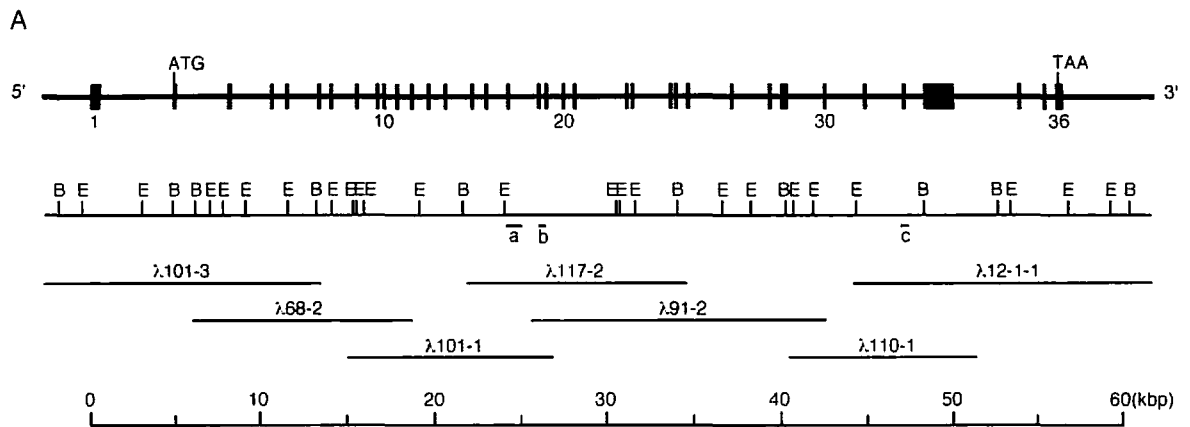


図1 ELYSのゲノム構造

(A) ELYSのゲノム構造の模式図。黒い四角はエクソンを、それらをつなぐ線はイントロンをそれぞれ示す。エクソンは5'側から番号を付けた。翻訳開始コドン(ATG)および翻訳終止コドン(TAA)はそれぞれ第2エクソンおよび第36エクソンに存在した。下には制限酵素地図と解析に用いた代表的なファージクローンについて記した。制限酵素部位については以下のように略した。B, BamHI; E, EcoRI。サザンハイブリダイゼーション法に用いたプローブ部分(a)と遺伝子座の決定に用いた部分(b, c)についても記した。解析した塩基配列はGenBankのAccession No. AB081482からAB081498に登録した。

(B)マウスのゲノムDNA(10  $\mu$ g)を図に示した制限酵素で切断した後、第17エクソンを含むELYSゲノムプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション法を行った。

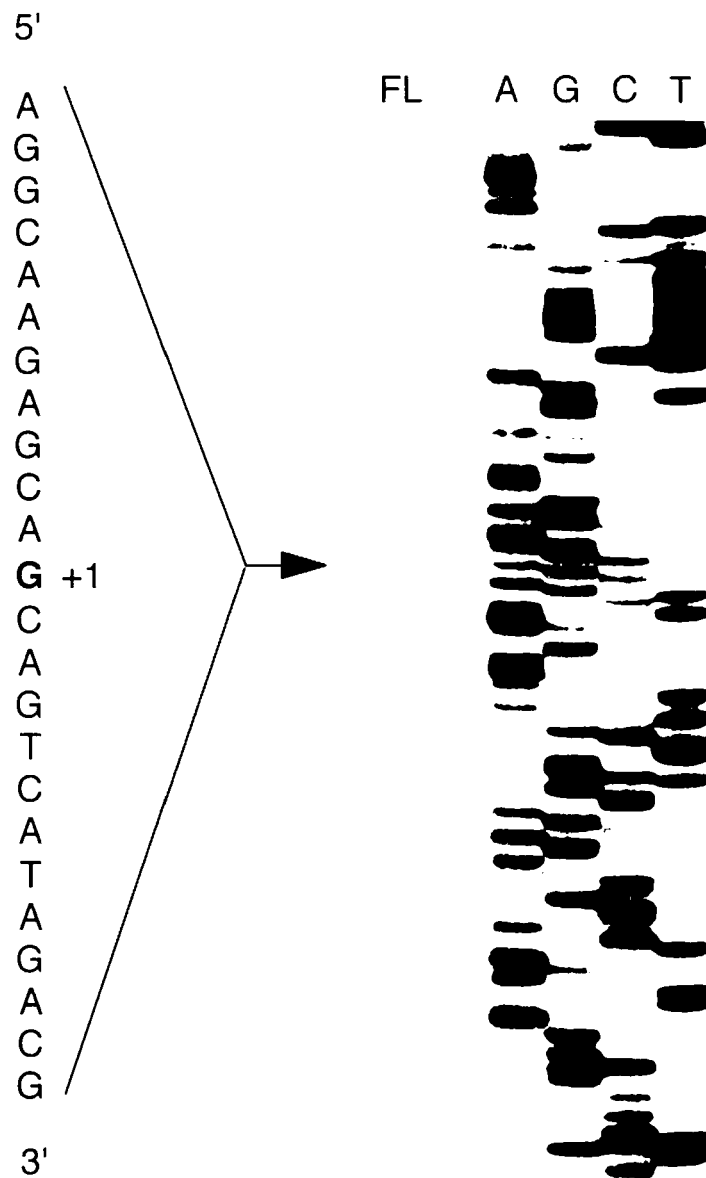


図2 ELYSの転写開始点

ELYS cDNAの+161から+180に相補的なオリゴヌクレオチドの末端を放射性同位元素で標識してマウス胎仔肝臓(FL)の全RNAと混合した後に逆転写反応を行った。その後、反応産物を8%ポリアクリルアミドゲルで分離した。A、G、CおよびTのレーンには同一のオリゴヌクレオチドを用いて行ったELYSゲノムDNAの塩基配列解析産物を流した。翻訳開始点の670bp上流に位置するグアニン塩基に相当する部分にバンドが検出された。

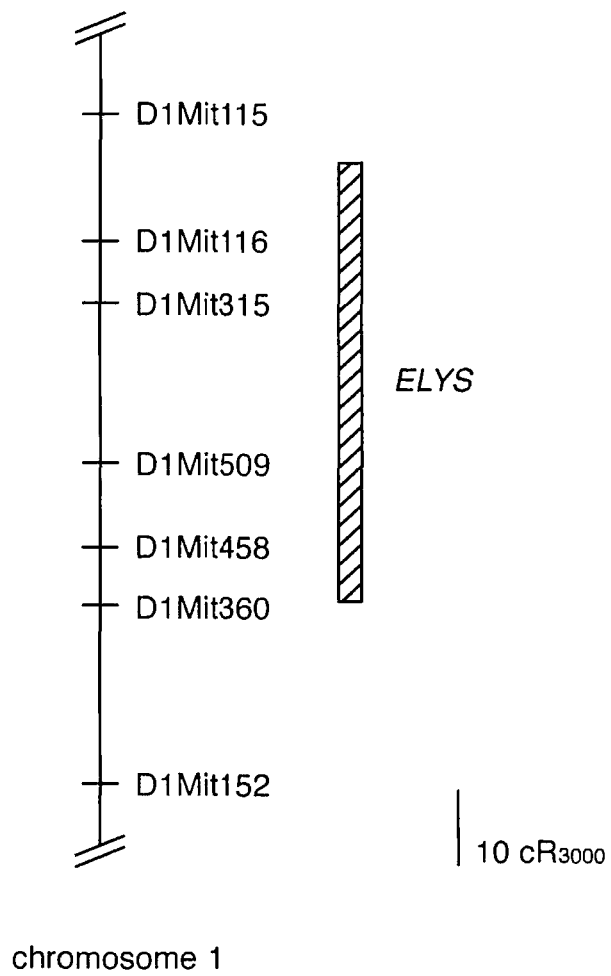


図3 *ELYS*の遺伝子座

マウス第1染色体上にある*ELYS*遺伝子近傍のマーカーを示す。1 cR<sub>3000</sub>は計算上、約98 kbpである。



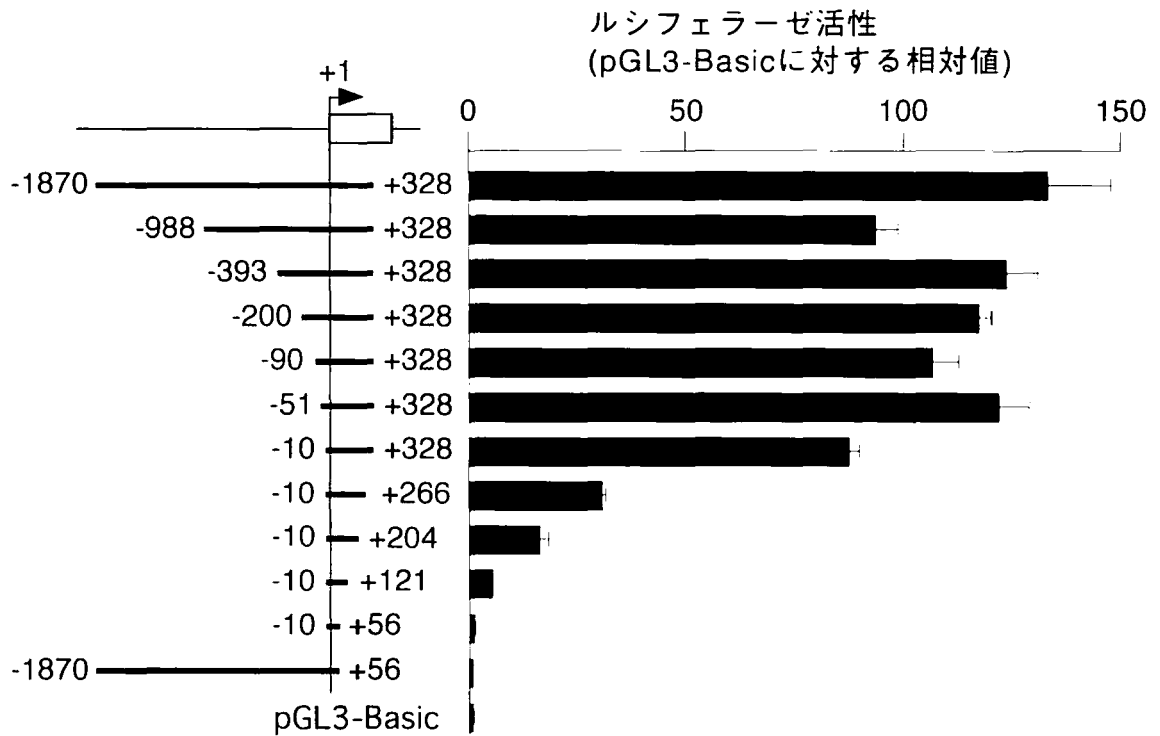


図4 AGM分散培養系を用いたELYSPromoter領域の解析

レポータープラスミド(pGL3-Basic)にELYS遺伝子の転写開始点を含む様々な領域を組み込み、AGM分散培養系の細胞に遺伝子導入した。グラフはpGL3-Basicを用いた時のルシフェラーゼ活性に対する相対値を示す。



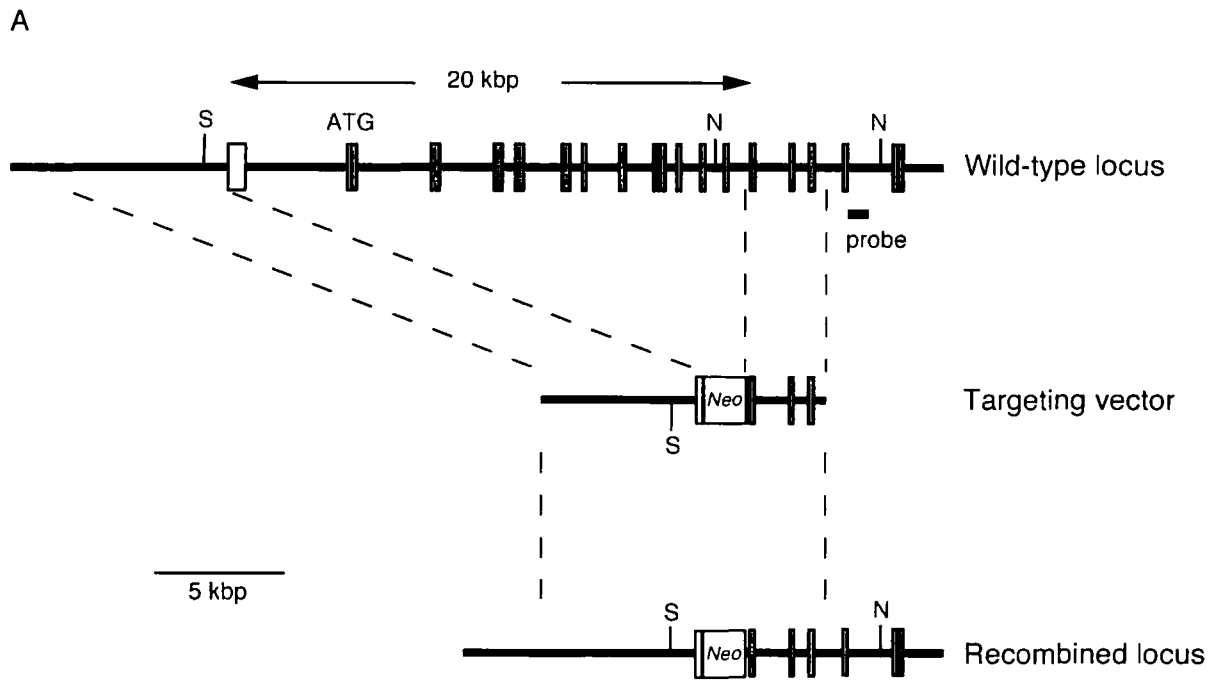


図6 ELYSノックアウトマウス作成

(A) ELYS遺伝子の野生型の遺伝子座、ターゲティングベクターおよび相同組み替え後の遺伝子座を模式的に示した。(B) 遺伝子導入後に得られた薬剤耐性ES細胞より調製したゲノムDNAを用いて行ったサザンハイブリダイゼーション法の結果を示す。N, NheI; S, Sall

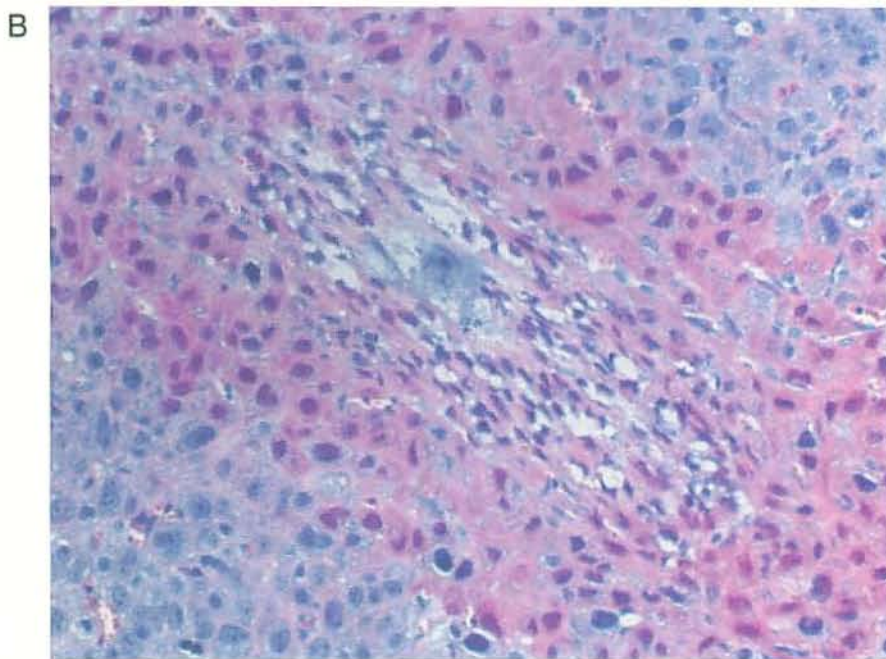
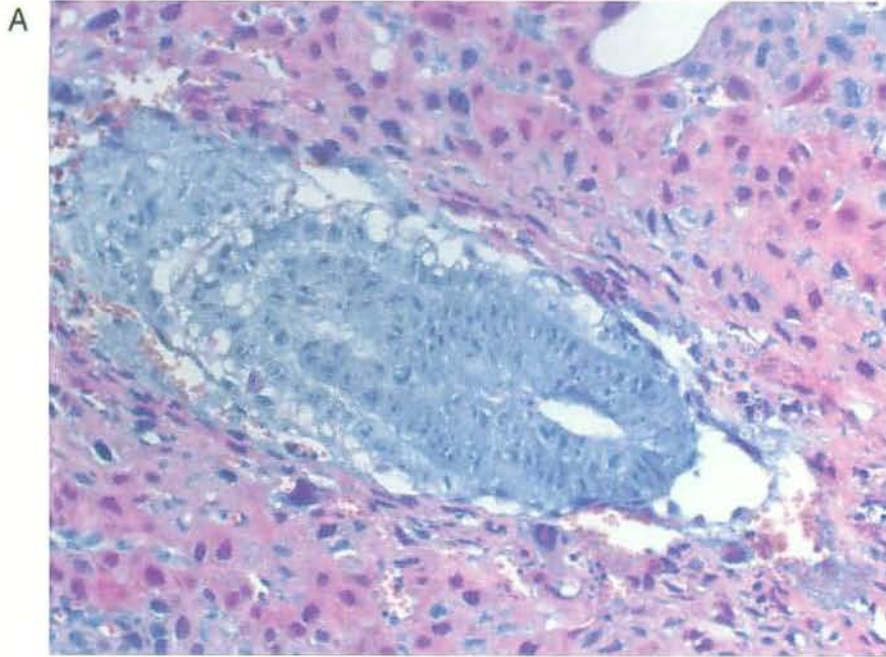


図7 胎生5.5日目の胚の組織像

ELYSヘテロ欠損マウスを交配して、妊娠5.5日目に子宮を摘出し切片を作成した。図はヘマトキシリン-エオジン染色したものを示す。(A)正常胚の一例。(B)調べた脱落膜 20カ所のうち6カ所でこのような異常な形態が認められた。



図8 胎生初期のELYS mRNAの発現

(A)ELYSに対するantisense probeを用いて、図に示した時期の胚をwhole mount in situ hybridization法で調べた。(B)コントロールとしてELYSに対するsense probeおよびOct-3/4に対するantisense probeを使用して、胎生6.5日目の胚を同様に処理した。

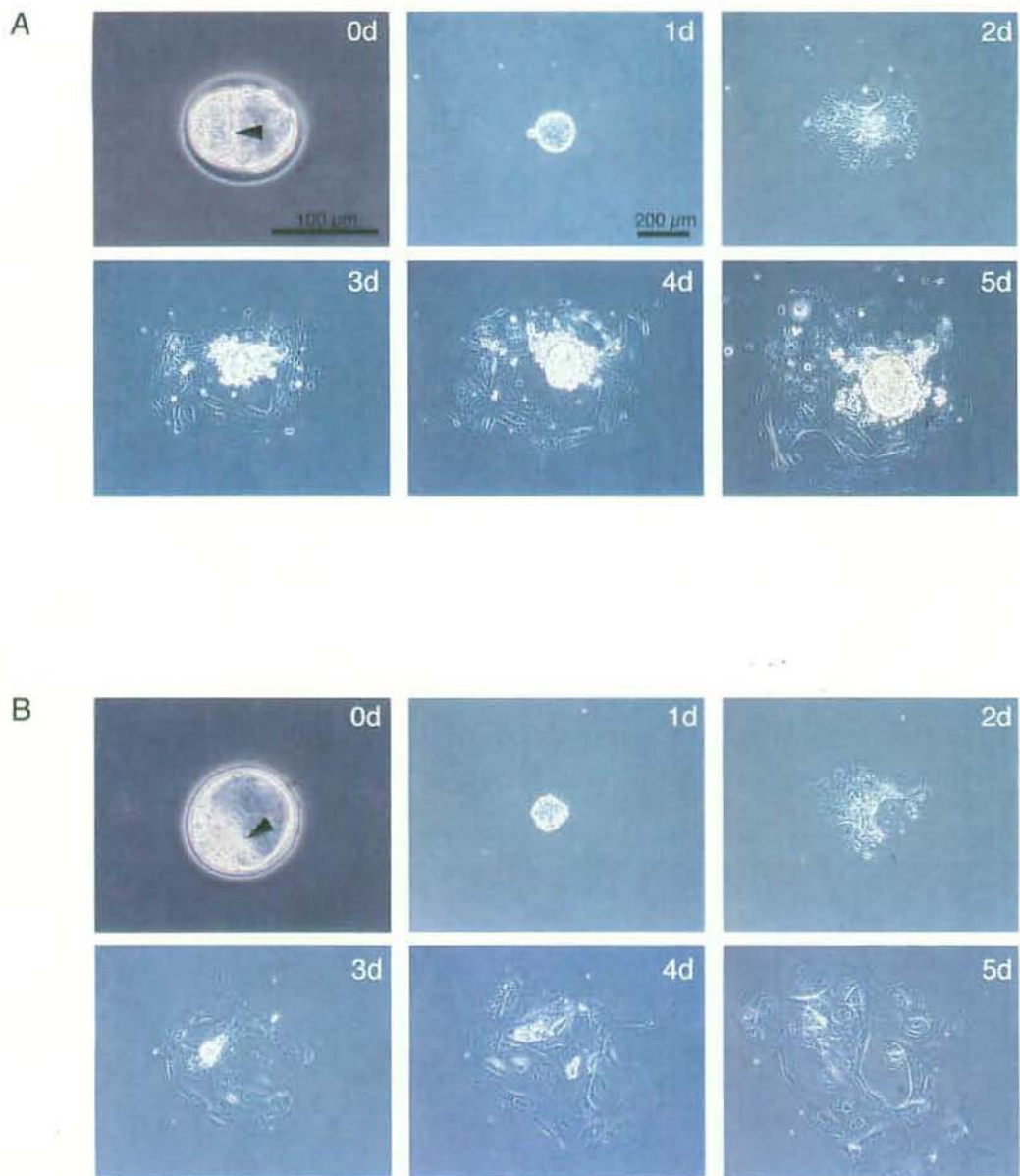


図9 培養した胚盤胞の形態

ELYSヘテロ欠損マウスを交配させて、妊娠3.5日目に子宮より胚盤胞を採取して培養を行った。野生型(A)およびホモ欠損型(B)のそれぞれ一例を示す。各写真の右上の数字は培養日数を表す。0dの写真のみ強拡大で示した。それ以外の日数の写真はすべて同じ倍率である。培養開始時にはいずれの胚盤胞にも内部細胞塊(矢頭)が認められる。培養が進むと野生型の胚では内部細胞塊、それを取り巻く内胚葉細胞と栄養外胚葉が見られるが、ホモ欠損型の胚では栄養外胚葉様の細胞のみが認められる。

C

表現型	遺伝子型		
	+/+	+/-	-/-
内部細胞塊 + 栄養外胚葉	15	25	0
栄養外胚葉のみ	0	0	10
付着の遅延	0	1	2

### 図9 培養した胚盤胞の形態

(C)培養に用いた胚盤胞の遺伝子型を調べたもの。すべての野生型およびヘテロ欠損型の胚では内部細胞塊の増殖が認められたが、ホモ欠損型の胚では培養2日目までに培養ディッシュに付着した10例すべてにおいて内部細胞塊の増殖が認められなかった。



B

遺伝子型	細胞増殖	
	あり	なし
+/+	7	0
+/-	17	0
-/-	0	9
不明	0	1

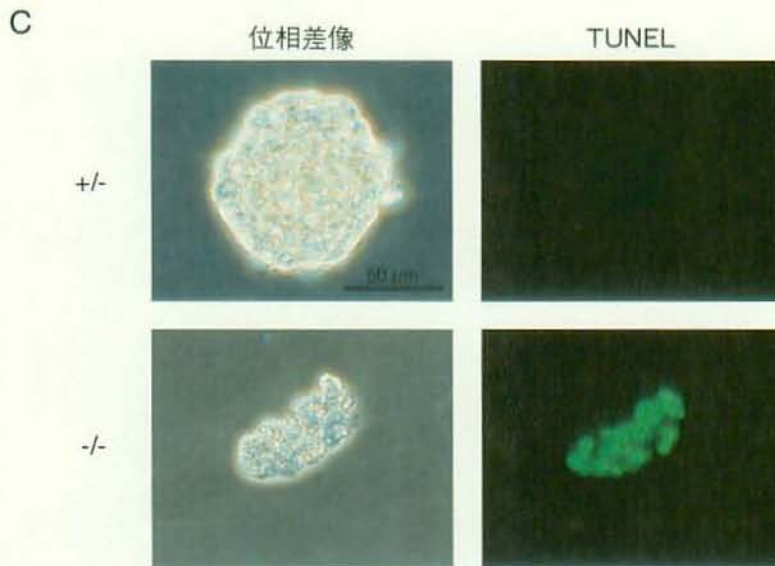


図10 内部細胞塊の培養

(A) *ELYS*ヘテロ欠損マウスを交配させて得られた胎生3.5日目の胚盤胞から、immunosurgery法で内部細胞塊を分離した。これを5日間培養すると、野生型およびヘテロ欠損型の胚では内部細胞塊と内胚葉細胞の増殖が認められた。写真はヘテロ欠損体の一例。各写真の右上の数字は培養日数を表す。*ELYS*ホモ欠損型の胚では内部細胞塊は分離できるものの、その後の付着および増殖が認められなかった。(B)結果を表にまとめたもの。(C)培養2日目にヘテロ欠損体(上段)およびホモ欠損体(下段)の細胞塊を回収し、TUNEL法を行った。写真はすべて同じ倍率である。



番号	エクソンの長さ (bp)	5'配列	3'配列	イントロンの長さ (kbp)
1	663		GCGGGCTCAG gtaggggtggggaaccgcagg	4.0
2	128	ttttttaaaaatatttacag	TGGCAGTATG TTTGCTGCAG gtaagtaacattgttgaaga	3.3
3	254	ctttttttcttctccatag	GGAAAAATGG TCCTGGAAGG gtagtactatattaagatgc	1.9
4	181	aatcccattctggatcctag	GTAACAGCTA GAGGCATCAG gtaattcatctgtttgttac	0.7
5	208	tcttgtctttttggttttag	ACCTTGAAGT TGAAAAGAGA gtaagtataatTTTTTctct	1.7
6	117	tgtgactttgtttgttttag	ATACTATACA CACAAGATAG gtcagtatgcctgtgcttct	0.6
7	85	gtaatttctctttcttcag	TGAAGGGGAT TTTATATGAG gtaagtggttattagtctat	1.4
8	151	ctgcatgttttatgttgcag	GGATTAGAAT ATGAGAGAAG gttggttaaaagtactctta	1.2
9	133	ttgtttttctttctggcag	CTCTGTCTCC ATTCTTTAAG gtagtattactatgttttct	0.1
10	182	tttaaaactttttcttctag	ATCAGGAGAA TTTAATTTTG gtaagtattttcataaattt	0.6
11	62	aaaatctttttcttttaag	ATGCCACTTG TCAGAAGGAG gtagtatgcattaacaact	0.9
12	129	gactaatttttctattacag	ACTTTGACAT TTTAAGTCAA gtagacatttaactttttt	0.8
13	91	tttttttaaacatggttttag	GAAGAACAAT ATAATAGAAG gtaacagtttctactttgtaa	0.9
14	90	tttctttcaatacaataag	AACAACCAAA GATAGGCTTT gtaagtatgaagctggtatt	2.3
15	141	gttgtattttatctttgaag	GTGTGCCGCT ACTGAGAGAG gtagtactttatacaaatg	0.7
16	105	gtgttaattcttctttctag	GACTGGTGGG GAAGGCTTAG gtaacgtagttaatgtatga	1.2
17	94	aactttaatcaaacctccag	ATGATGCTCT GCTCACCCAG gtagcagcagcctgactaca	1.9
18	124	taatgtttcccatgttgcag	AGGGAAGTGG TAGCATCCAC gtaggtcacagtgacacgga	0.1
19	57	tttatcttctccttttatag	GCATTACTTG ACATGCTATT gtagcctttaaacttttact	1.0
20	147	ttaatgcttttttttaaag	ACCATTTATT TGACTATGAG gtaagtaactcacttggaaat	0.5
21	188	aacacttcattgttttgcag	AATGGTTTAG TTTTAAATAG gtaagtacatcttaaaaata	2.9
22	145	aactttggtagctgatttcag	ATGCATGGTT CACTGAGCAG gtaatcactgaccagtaga	0.1
23	132	atctgcttggcttctcctag	GAATGCTTAG TAATCTCATG gtagtattaatgttgtctca	2.1
24	151	ctttattatgtatttaataag	AGTGATCGTG TTTTATGAAG gtaagatttcattgtagaat	0.2
25	151	ctgtattttgttttttaag	TTTCTAGACC TTTTAAACAG gtagtcttttcttaacttt	0.6
26	108	tgagtattttttctttgtag	TCCTAAAACA GAATTTCTAG gtaggactgtcctgaacaat	2.4
27	193	ctatttgtatttaattacag	ATTACTGGAT CATAGTTAAG gttagtattacctgcctagt	2.0
28	204	ctctttgctcttcatcatag	AAAGCTAAAT GACTGATAGA gtaagtttgataagcaaac	0.5
29	418	tgcacttttcttaatttcag	GCTACAGATG AAACAAATAG gtaggaattctttgtacata	2.1
30	100	cttatctgtgtggcttacag	GCACGGGAGA TCTGTGAAGG gtaagctctggagcagagga	2.2
31	95	gtgcatttctgttctcaag	GGAACCTCC CACAAAGAGT gtagtatcatttagggctt	2.2
32	206	ttgtctgtctggttttccag	CTGTGGCCAA CGAGATTCAT gtaaaaatattactttttta	1.1
33	1762	ttaccttaactcatttttag	CTAATTGGAT AAATCAAAG gtagtttagttttattcattt	3.6
34	134	tgtttcctgcttgccttttag	CTGAGAACAT AGGTGAACTG gtaaggaaggcatgaaaaca	1.3
35	77	tttaaatcttaaccatag	GAGAGTGACC GAGCAAGCAG gtagcagcactagccccat	0.7
36	420	tgactgtatctttctttcag	AAACACAGGA GTTAAATAAACTACTGTAAAGT	

表1 ELYS遺伝子のエクソン-イントロン配列

エクソンの配列を大文字で、イントロンの配列を小文字で示した。ポリA付加配列と予想される塩基を下線で示した。第36エクソンの長さはスプライス部位より予想されるポリA付加配列までを表す。

	遺伝子型			
	+/+	+/-	-/-	不明
胎生 1.5日*	4	9	3	1
胎生 3.5日	7	14	9	3
胎生 7.5日	10	18	0	1
胎生 8.5日	3	6	0	3
胎生11.5日	6	6	0	1
胎生12.5日	6	9	0	2
新生仔	27	62	0	0

\* 胎生1.5日目の2細胞期胚を培養して得られた胚盤胞について調べた。

## 表2 遺伝子型の解析

ELYSヘテロ欠損マウスの交配により得られた胚の遺伝子型をPCR法によって調べた。