

学位論文題名

An upstream NF-Y-binding site is required for transcriptional activation from the hst promoter in F9 embryonal carcinoma cells
(F9 胎児性癌細胞において hst 遺伝子プロモーターの活性化は遺伝子の
上流に存在する NF-Y 結合配列に依存する)

学位論文内容の要旨

線維芽細胞増殖因子遺伝子群の一員であるhst(k-FGF, FGF-4)は胎児の発生初期、及び胎児性腫瘍細胞に限局して発現している。hst遺伝子を発現している胎児性腫瘍細胞の代表であるF9細胞株においては、遺伝子の3'側の遠位に存在するオクタマー配列（エンハンサー）によってhst遺伝子の発現が促進されることがすでに明らかにされている。私はクロラムフェニコールアセチル転移酵素（CAT）遺伝子をレポーター遺伝子として用い、hstのプロモーター領域にあってオクタマー（エンハンサー）と協調して遺伝子転写活性を促進するシス要素を研究した。

方法

1. hstの-172/+106までのRmaI/ApaI断片をR/S（-172/-97）、S/F（-96/-20）、F/H（-19/+31）、H/A（+32/+106）の4つのDNA断片に分割し、それぞれをプローブにしてゲルシフト法（EMSA）でF9の核蛋白質との結合を解析した。
2. R/S（-172/-97）断片を用いてメチル化干渉法（MIA）により蛋白質と結合するDNA塩基を解析した。
3. MIAの結果に基づいて、Y（-152CCCCCGGCCCTGATTGGCAGGCGG-129）オリゴヌクレオチド、およびその変異オリゴヌクレオチドYm（CCCCCGGCCCTtcgTGGCAGGCGG）を合成した。他方、マウスの主要組織適合抗原クラスII遺伝子に存在するNF-Y結合CCAAT配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し、ゲルシフト法（EMSA）でF9核蛋白質を解析した。
4. Yに結合する核蛋白質を同定するためにNF-Yに対する抗体を用いて、ゲルシフト法（EMSA）を行なった。
5. hstの-172/+106までのRmaI/ApaI断片をプロモーターとし、3'にエンハンサー配列を持つCATレポーター遺伝子を構築してF9細胞に導入してhst遺伝子プロモーターの活性を調べた。この際に、YのCCAAT配列に突然変異を入れ、転写因子NF-Yとの結合の意義を明らかにした。

結果

1. EMSAで、R/Sは未分化F9の核蛋白質と1つのバンドを形成した。
 2. メチル化干渉法 (MIA) による解析では、この核蛋白質はCCAATのコア配列を中心としてR/Sに結合していることが示された。
 3. MIAの結果にもとずいて、Yオリゴヌクレオチドを合成してF9核蛋白質と反応させて、EMSAを行った。F9では単一のバンド (YU) が出現した。このバンドは過剰のYによって競合されたが、変異オリゴヌクレオチドY_mによっては競合されなかった。
 4. EaオリゴヌクレオチドはF9核蛋白質と反応してYUと同じバンドを形成した。このバンドはYによって消失した。
 5. Yと蛋白質によって生じたバンドYUはNF-Yに対する抗体を結合し、EMSAにおいて、バンドがさらに遅く泳動された (supershift)。このことは、Yと結合した蛋白質がNF-Yであることを証明している。
 6. CCAATアッセイの結果、Yに突然変異を入れたhstのRmaI/ApaI断片にはプロモーター活性がなかった。
 7. 以上の結果から、F9細胞株においてhstプロモーターからの遺伝子転写促進のためには、NF-Y認識配列とオクタマー結合配列の両者が必要であると結論された。
- hst遺伝子は当初癌遺伝子として発見された発生分化に関連する遺伝子である。その遺伝子転写機構の一部を解明することは、地球上の多細胞生物における形態形成の解明に役立つであろう。また、遺伝子の下流にあるオクタマー配列と共同で転写促進をするプロモーター結合因子を研究するときに、この実験系は有用と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 島 豊

副 査 教 授 堀 浩

副 査 教 授 柿 沼 光 明 (免疫科学研究所)

学 位 論 文 題 名

An upstream NF-Y-binding site is required for transcriptional activation from the *hst* promoter in F9 embryonal carcinoma cells
(F9 胎児性癌細胞において *hst* 遺伝子プロモーターの活性化は遺伝子の
上流に存在する NF-Y 結合配列に依存する)

線維芽細胞増殖因子遺伝子群の一員である *hst* (*k-FGF*, *FGF-4*) は胎生初期、及び胎児性腫瘍細胞に局限して発現している。*hst* 遺伝子を発現している胎児性腫瘍細胞の代表である F9 細胞株においては、遺伝子の 3' 側の遠位に存在するオクタマー配列 (エンハンサー) によって *hst* 遺伝子の発現が促進されることがすでに明らかにされている。申請者はクロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) 遺伝子をレポーター遺伝子として用い、*hst* のプロモーター領域にあってオクタマー (エンハンサー) と協調して遺伝子転写活性を促進するシス要素を解析した。用いた実験方法は次のとおりである。

1. *hst* の -172/+106 までの *RmaI*/*ApaI* 断片を R/S (-172/-97)、S/F (-96/-20)、F/H (-19/+31)、H/A (+32/+106) の 4 つの DNA 断片に分割し、それぞれをプローブにしてゲルシフト法 (EMSA) で F9 の核蛋白質との結合を解析した。

2. R/S (-172/-97) 断片を用いてメチル化干渉法 (MIA) により蛋白質と結合する DNA 塩基を解析した。

3. MIA の結果に基づいて、Y (-152CCCCCGGCCCTGATTGGCAGGCGG-129) オリゴヌクレオチド、およびその変異オリゴヌクレオチド Ym (CCCCCGGCCCTtcgTGGCAGGCGG) を合成した。他方、マウスの主要組織適合抗原クラス II 遺伝子に存在する NF-Y 結合 CCAAT 配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し、ゲルシフト法 (EMSA) で F9 核蛋白質を解析した。

4. Y に結合する核蛋白を同定するために NF-Y に対する抗体を用いて、ゲルシフト法 (EMSA) を行なった。

5. *hst* の -172/+106 までの *RmaI*/*ApaI* 断片をプロモーターとし、3' にエンハンサー配列を持つ CAT レポーター遺伝子を構築して F9 細胞に導入して *hst* 遺伝子のプロモーター

の活性を調べた。この際に、YのCCAAT配列に突然変異を入れ、転写因子NF-Yとの結合の意義を調べた。

得られた実験結果は次のとおりであった。

1. EMSAで、R/Sは未分化F9の核蛋白質と1つのバンドを形成した。
 2. メチル化干渉法（MIA）による解析では、この核蛋白質はCCAATのコア配列を中心としてR/Sに結合していることが示された。
 3. MIAの結果にもとずいて、Yオリゴヌクレオチドを合成してF9核蛋白質と反応させて、EMSAを行った。F9では単一のバンド（YU）が出現した。このバンドは過剰のYによって競合されたが、変異オリゴヌクレオチドYmによっては競合されなかった。
 4. EaオリゴヌクレオチドはF9核蛋白質と反応してYUと同じバンドを形成した。このバンドはYによって消失した。
 5. Yと蛋白質によって生じたバンドYUはNF-Yに対する抗体を結合し、EMSAにおいて、バンドがさらに遅く泳動された（supershift）。このことは、Yと結合した蛋白質がNF-Yであることを証明している。
 6. CCAATアッセイの結果、Yに突然変異を入れたhstのRmaI/ApaI断片にはプロモーター活性がなかった。
 7. 以上の結果から、F9細胞株においてhstプロモーターからの遺伝子転写促進のためには、NF-Y認識配列とオクタマー結合配列の両者が必要であると結論された。
- hst遺伝子は当初癌遺伝子として発見された発生分化に関連する遺伝子である。その遺伝子転写機構の一部を解明することは、地球上の多細胞生物における形態形成の解明に役立つものと期待される。
- 審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。