

ヒト転写調節因子 GCF の cDNA 及び蛋白質一次構造の修正

学位論文内容の要旨

転写調節因子GCF (GC Factor) は、上皮増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子のプロモーター領域のGC-rich配列に結合し、その転写を抑制する因子として報告された。また同時に、その遺伝子cDNAもヒト上皮様癌細胞株A431からクローニングされた。その後GCFは、EGFR遺伝子のみでなく、TGF- α 等その他の増殖因子や増殖因子受容体遺伝子の発現も制御することが示唆されている。また、GCFを過発現させたヒト胃癌細胞ではその増殖が抑制されることが報告されている。GCF蛋白質について特に注目すべきことは、N末端が著しく塩基性に富んでいることである。特に、最初の30のアミノ酸のうち19個がリジンまたはアルギニンであるという、極めてまれなアミノ酸配列となっている。そこで、本研究において、GCF蛋白質のN末側の構造およびそのcDNA塩基配列を再検討することを試みた。

[材料と方法]

1. 細胞：ヒト細胞株A431(上皮様癌細胞)、HeLa(子宮頸癌細胞)、HL60(前骨髄球性白血病細胞)、HFL (肺線維芽細胞)、LCL(Bリンパ芽球様細胞)、Jurkat (Tリンパ性白血病細胞) 及びヒト正常白血球細胞。
2. 5'Rapid Amplification of cDNA End(5'RACE)法：A431細胞等のRNAを抽出した後、GCFに特異的なプライマーを用いcDNAを合成し、これを鋳型としてPCRとNested PCRを行った。
3. RNase Protection Assay：GCFのゲノムDNA断片をプラスミドベクターに組込んで、T3ポリメラーゼによりリボプローブを作成した。これとTotal RNA とをハイブリッド形成させた後、RNase処理を行った。保護された断片を変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して解析した。
4. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)及びゲノムDNAのPCR：GCFの特異的なプライマーまたはOligo dT プライマーを用い、各細胞のTotal RNAからcDNAを合成した。これを鋳型としてPCRを行った。ゲノムDNAは、LCL細胞とA431細胞から精製し、これをPCR に用いた。
5. DNA 塩基配列の決定：RACE産物及びRT-PCR産物等をプラスミドベクターにサブクローニングし、ジデオキシ法により蛍光自動DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。
6. 抗体の作成：Glutathione S Transferase(GST)とGCFとの融合蛋白質 (GST-GCF)を発現するプラスミドを構築した。これを大腸菌株 (HB101) に導入し、大腸菌からGST-GCF蛋白質を精製し家兎に免疫した後、血液を採取した。この免疫血清をGST蛋白により吸収し、これを抗GCF抗体とした。
7. 免疫沈降法とウェスタンブロット法：培養細胞由来蛋白抽出液を抗GCF抗体または免疫前血清と免疫沈降させた。共沈物を8%SDS-PAGEで分離し、メンブレンにブロット後、抗GCF抗体を反応させた。ペルオキシダーゼ標識した抗兎Ig抗体と反応させた後、化学発光法により検出した。

8.免疫蛍光法：A431及びHela細胞をスライドガラスに蒔き、4%パラホルムアルデヒドで処理した。一次抗体（GCF抗体）と反応させた後PBSで洗浄し二次抗体（FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody）を反応させた後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。

[結果]

1. GCF cDNA 5'末端の再決定：

5'RACE法を用いてGCF cDNA の5'末端をクローニングした。この5'RACE産物の塩基配列は、以前に報告されたGCF cDNA の309番目から3'側の塩基配列と一致したが、308番目より5'側は全く異なる配列であった。また、5' RACE産物は、308番目より5'側に新しい31bpを含んでいた。この新しいGCF cDNA の5'末端の塩基配列を確認するために、相当するゲノムDNAの数百塩基対の配列を決定した。その結果、新しくクローニングされた31bpの配列は、以前に報告されたcDNAの309番目に相当するゲノムDNAのすぐ5'側に続いていることが示され、上述のRACEによる結果と一致した。しかし、以前に報告されたGCF cDNA の308番目から5'側の配列は、見い出されなかった。またこの308個の塩基対のcDNAは選択的スプラシングの結果ではないことが示された。A431細胞及びHeLa細胞由来のRNAを用いた RNase Protection Assay の結果は、保護された主なバンドが約180塩基の大きさであり、これはRACEの結果と良く一致した。

2. 以前報告されたGCF cDNA の787番目の"T"は実際には存在しない：

A431細胞由来のRT-PCR産物の塩基配列を決定したところ、以前に報告されたGCF cDNAの787番目の"T"を見い出すことができなかった。その他の細胞株と正常白血球細胞も同様に検討したところ、A431細胞と同じ結果であった。これをさらに確認するため、A431細胞とLCL細胞から回収したゲノムDNAの塩基配列を決定した。その結果、RT-PCRの結果と一致して、787番目の"T"は認められなかった。

3. GCF cDNAの中に見い出された114bpの新しい塩基配列：

GCF cDNA 全ての部分についてRT-PCRを行って塩基配列を決定したところ、以前に報告されたcDNAの851番目と852番目との間に114bpからなる新しい配列を見い出した。これは、ヒト正常白血球細胞を含む数種の細胞由来のRNAで確認された。A431とLCL細胞から回収したゲノムDNAの塩基配列を調べた結果、GCF cDNAの851と852番目に対応するゲノムDNAにも、新しく見出された114bpからなる配列が認められることが確認できた。GCF cDNAのその他の部分については、以前に報告された塩基配列と一致した。

4. 修正されたGCFアミノ酸配列：

本研究で修正された野生型GCF cDNA は、2661個の塩基対よりなり、GCF蛋白質については781個のアミノ酸からなる。以前に発表されたものに比べてN末の部分のアミノ酸約200個が全く異なっていた。新しい翻訳開始点に近くの塩基配列(CTCGGCCATGG)はKozakのコンセンサス配列と良く一致した。またDNAと蛋白質データベース検索の結果によると、修正されたGCFに対して、以前に報告されたGCFの他に高いホモログは存在しなかった。

5. 抗GCF抗体の特異性とGCF蛋白質の細胞内局在：

作成した抗GCF抗体が検出した細胞蛋白質は、ほぼ100Kd位であった。また、免疫吸収実験結果により、この抗体の活性は、GCFを特異的に認識するものであることが示された。この抗体を用いてGCF蛋白質の細胞内局在を免疫蛍光法にて検討した。その結果HeLa細胞とA431細胞共に核内に強い染色像が認められた。

[結論]

本研究では、既に発表されている遺伝子のGCF cDNA とその遺伝子産物のアミノ酸配列に著しい誤りがあることを明らかにした。遺伝子の機能を明らかにするためにはそのcDNA及び蛋白質のアミノ酸配列に誤りがないことが必須であり、本研究は近年のゲノム

プロジェクトを初めとする生物学研究に対する一つの警告と考えることができる。本研究により明らかになったGCF cDNA は2661個の塩基対よりなり、コードされるGCF蛋白質は781個のアミノ酸からなる核蛋白質であった。修正されたGCF cDNA とアミノ酸配列に基づいて、この核蛋白質の本来の機能を明らかにすることが可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

ヒト転写調節因子 GCF の cDNA 及び蛋白質一次構造の修正

転写調節因子GCF (GC Factor) は、上皮増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子プロモーター領域のGCに富んだ配列に結合し、その転写を抑制する因子として報告された。しかし報告されていたGCF蛋白質の1次構造は、N末端が著しく塩基性に富む極めてまれなアミノ酸配列からなっていた。本研究では、GCF蛋白質のN末側の構造およびそのcDNA塩基配列を再検討し、野生型GCFの全cDNAの塩基配列とその蛋白質のアミノ酸配列を決定した。まず、5' RACE法やRNase protection assayによりGCFの5' 末端を決定したところ、以前に発表されていたcDNAの308番目より5' 側の塩基配列は検出されなかった。またそれにかわって新たな31bpの塩基配列が同定された。同時に正常細胞を含む複数の細胞のRNA由来RT-PCR産物を用いてGCFの塩基配列を解析したところ、以前に発表されているcDNAの787番目のTは、実際には存在しなかった。さらに、851と852番目の塩基の間には114塩基よりなる新たな配列が、正常細胞を含む複数の細胞で見い出された。このcDNA塩基配列の結果は、Genome DNAの塩基配列とも一致することが明らかになった。修正されたGCF cDNAは2661個の塩基対よりなり、コードする蛋白質は781個のアミノ酸からなっていた。次に、家兎にGCF蛋白質を免疫し、分子量約100kDaの蛋白質を特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用いた免疫蛍光法により、修正されたGCF蛋白質の細胞核内の局在が確認された。本研究により明らかになったGCF cDNAは2661個の塩基対よりなり、コードされるGCF蛋白質は781個のアミノ酸からなる核蛋白質であった。

審査に当たっては、副査西教授より、1. 修正前のGCF cDNA配列で3種類の誤りがみられた理由としてどのようなことが考えられるかについて、2. 新たに作製した抗体を用いた結果とすでに報告されている成績の異同について、質問があった。申請者はこれらの質問に対してほぼ適切な回答をおこなった。さらに副査守内教授より、1. 修正されたGCF蛋白質のDNA結合活性など転写調節因子としての性質について、2. 修正された

GCF蛋白質に結合する蛋白質について、質問があった。発表者はこれらの質問に対してほぼ満足すべき回答をおこなった。また主査葛巻からの修正GCFの機能についての質問に対しても回答をなし得た。

この論文は、既に発表されている遺伝子GCF cDNAとその遺伝子産物のアミノ酸配列に著しい誤りがあることを明らかにし、新たな核蛋白質をコードする遺伝子を再クローニングしたことで評価される。今後修正されたGCF cDNAとアミノ酸配列に基いた、この核蛋白質本来の機能が明らかになることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、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（医学）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。