




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ① 課 ・ 論	第 号	氏 名	ウ ユンフエン
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	藤 邊 誠 	
	副査氏名	片 岡 晶 志 	
	副査氏名	伊 波 英 克  印	
<p>論文提出者氏名 ウ ユンフエン</p> <p>論文題目 : The Sp1 and CBF/NF-Y Transcription Factors Cooperatively Regulate the Mouse Pro-α3(V) Collagen Gene (<i>Col5a3</i>) in Osteoblastic Cells.</p> <p>論文掲載紙名 : Acta Medica Okayama</p> <p>論文要旨</p> <p>Fibrillar collagen には major type の I, II, III と minor type の V, XI があり V は I と、XI は II とともに発現しそれぞれの fibril assembly の size や shape を制御している。type V には α1, α2, α3 鎖があり本研究ではこの α3 鎖遺伝子について RTPCR で発現を、Real-time RTPCR で発現量を、oligo-nucleotide-capping RACE で転写開始点を調べた後、当該遺伝子 promoter 領域の様々な長さのもの及びそれらに変異や欠損を導入したものを luciferase 遺伝子に結合した constructs の作成による luciferase assay を阻害物質との組み合わせで行ったり、EMSA、CHIP assay 等により発現調節機構について解析した。</p> <p>その結果、この遺伝子は osteoblast 系の細胞で発現し、軟骨細胞系の細胞では発現が認められなかった。その主要な転写開始点は翻訳開始 ATG の 102bp 上流に位置し、そこを起点に-337 から+1 の間の領域が basal transcriptional activity にとって重要であり、さらにその領域の中でも-194 から-186 の部分の GC-rich domain に Sp1 が、-134 から-130 の部分の CCAAT box に CBF/NF-Y が結合して transcription を regulate していることが示唆された。ただし luciferase assay では-59 から 92 があれば osteoblast 系の細胞で 40% 程度の transcription activity が残っているのに対し、軟骨細胞系の細胞では認められないことの機序の解明、ひいては Sp1 と CBF/NF-Y は共通に発現しているにもかかわらず、マウス V 型コラーゲン α3 鎖遺伝子が軟骨細胞系では発現せず、osteoblast の系で発現するという特異的発現機構については解明に至っていない。</p> <p>本研究はマウス V 型コラーゲン α3 鎖遺伝子の骨芽細胞における転写調節機構について解析し CBF/NF-Y 及び Sp1 が協調して、プロモーター領域に作用し遺伝子の転写調節に関与していることを証明したもので、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 ウ ユンフェン

論 文 題 目

The Sp1 and CBF/NF-Y Transcription Factors Cooperatively Regulate the Mouse Pro- α 3(V) Collagen Gene (*Col5a3*) in Osteoblastic Cells.

(転写因子 Sp1 及び CBF/NF-Y は骨芽細胞におけるマウス V 型コラーゲン α 3 鎖遺伝子の発現を協調して調節する。)

要 旨

緒言: コラーゲンは臓器形成に重要である。コラーゲン線維形成に関与するコラーゲン分子には I、II、III、V、XI 型コラーゲンがある。その中で V、XI 型コラーゲンは量的には少ないが、線維の中心部に存在し、線維の直径を調整している。V 型コラーゲンは I 型コラーゲンの存在する線維に見られ、 α 1、 α 2、 α 3 鎖よりなり、その組み合わせにより、 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ 、 $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ 等の分子型がある。 α 1 鎖、 α 2 鎖の遺伝子異常はイーラーズ・ダンロス症候群を引き起こす。 α 3 鎖は胎盤等に発現していることが知られているが、発生段階において骨形成に関与し、その N 末端領域には骨芽細胞特異的な接着活性を有する。本研究ではマウス V 型コラーゲン α 3 鎖遺伝子の骨芽細胞における転写調節機構について解析した。

方法: ①細胞を培養し、mRNA 及び核抽出物を調整した。②遺伝子発現をみるために RT-PCR、real-time RT-PCR を行った。③転写開始点を決定する為に oligo-nucleotide capping RACE 法を行った。④遺伝子の転写活性をみるためにルシフェラーゼアッセイを行った。⑤DNA 結合因子を解析するためにゲル

シフトアッセイを行った。⑥in vivoでのDNA・因子の結合をみるためにCHIPアッセイを行った。

結果：RT-PCRの結果、この遺伝子は骨由来細胞であるROS17/2.8及びMC3T3E1細胞で発現がみられ、軟骨由来細胞であるRCS細胞には発現はみられなかった。また、real-time RT-PCRの結果、成熟型であるROS17/2.8細胞で発現が多かった。oligo-nucleotide capping RACE法の結果、主要な転写開始点は翻訳開始点ATG上流、-102 bpに位置していた。5'側の様々な長さを含むルシフェラーゼコンストラクトを作製して、ルシフェラーゼアッセイを行った。基本プロモーター活性は-337～+1の領域に認められた。この領域における転写因子を同定するために、ゲルシフトアッセイを行った。-200～-181、-140～-121の二領域に因子が結合することがわかった。コンピューターサーチ及び特異抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより、これらの因子がSp1・Sp3及びCBF/NF-Yであることを同定した。実際、これらの因子がin vivoでこの領域に結合していることをCHIPアッセイで確かめた。次に、この二領域がプロモーター活性に関与しているか調べるために、この領域を欠失或いは変異させたコンストラクトを作製し、プロモーター活性を調べた。その結果、各々約30%及び50%程度の低下がみられた。さらに、Sp因子の阻害剤であるMithramycinAを用いると、Sp1・Sp3の結合を抑制し、変異CBF-B/NF-YAサブユニットを強制発現させると、CBF/NF-Yの結合を抑制し、プロモーター活性が低下した。最後に、Sp1及びSp3の強制発現を行ったところ、Sp1ではプロモーターの活性が増加したが、Sp3ではプロモーター活性への影響は認められなかった。

考察及び結語：遺伝子の転写調節において、多くの因子が関与している。本研究において、骨芽細胞におけるマウスV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子において、CBF/NF-Y及びSp1が協調して、プロモーター領域に作用していることを証明した。これまでにもCBF/NF-YはI型やV/XIコラーゲン遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写活性に重要な役割をはたしていることが報告されている。また、Sp1も種々の遺伝子のプロモーター活性に重要であることが報告されている。この二つの因子は普遍的に存在する因子であるが、今回の結果は、この二つの因子がマウスV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の近位プロモーター領域に結合し、骨芽細胞における基本的な転写に必須であることを示している。