

## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 518 号	氏 名	樋田 真理子
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	津 村 弘 	
	副査氏名	久 保 田 敏 昭 	
	副査氏名	小 林 隆 志 	

論文題目 : Nuclear factor Y (NF-Y) regulates the proximal promoter activity of the mouse collagen  $\alpha 1(XI)$  gene (Col11a1) in chondrocytes.

論文掲載雑誌名 : In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal

緒言 : XI 型コラーゲンは、線維性マイナーコラーゲンに属しており、軟骨組織に限局して発現している。また、 $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 3$  鎖の 3 つの遺伝子の分子型が存在しており、軟骨組織において、ヘテロライマー構造を形成している。XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子は、遺伝子欠損マウスにおいて、軟骨形成不全症を示すことが報告されており、軟骨組織の構築及び機能発現に必要不可欠な分子である。本研究では、マウス XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子の軟骨特異的転写調節機構を明らかにすることを目的として、基本プロモーター領域の同定及びプロモーター活性に関与する転写因子の解析を行った。

方法 : RCS 細胞 (ラット軟骨肉腫由来) 及び ATDC5 細胞 (マウス奇形腫線維芽様細胞由来) を用いた。遺伝子発現を確認するために、RT-PCR を行うと共に、Oligo-nucleotide-capping-RACE 法により転写開始点を決定した。次に、基本プロモーター領域を同定するために、5'側の長さが異なるルシフェラーゼコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、同定した基本プロモーター領域に関与する転写因子について、EMSA により検討した。更に、見出した転写因子の細胞内での結合を明確にするために、Chip assay を行った。最後に、転写因子の結合領域を欠失、変異させたコンストラクトおよびドミナントネガティブ変異体の発現ベクターを用いて、プロモーター領域における転写因子の機能解析を行った。

結果 : XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子の発現は、RCS 細胞及び ATDC5 細胞共に認められ、その発現量は、軟骨での分化を示す RCS 細胞でより高かった。この遺伝子の軟骨における転写開始点は、翻訳開始コドン ATG の -299bp 上流に位置していることが明らかとなった。ルシフェラーゼアッセイにより、基本プロモーター活性は -116~-256 の領域に認められ、-135~-145 の領域に転写因子が結合していることが EMSA により示された。*in silico* の解析により、転写因子 NF-Y の結合部位 (CCAAT box) が予測された。そこで、結合配列に変異を加えたコンペティター及び特異抗体を用いて EMSA を行った結果、結合している因子が NF-Y であることを認めた。更に、Chip assay により、細胞内においても NF-Y が、基本プロモーター領域に結合していることを示した。最後に、基本プロモーター領域内に欠失及び変異を導入したコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、約 40~60% の活性の低下が見られ、さらに、ドミナントネガティブの NF-YA 変異サブユニットの強制発現により、プロモーター活性が抑制されたことから、NF-Y がプロモーター活性を制御していることが明らかとなった。

考察 : NF-Y が軟骨細胞において、マウス XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子の基本プロモーター活性を制御していることが明らかとなった。遺伝子発現は、プロモーター及び組織特異的シスエレメントの複合的な働きによるものであることから、XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子の更なる作用機序の解明のためには、プロモーターと共に、転写を活性するエンハンサーもしくは抑制するリプレッサーといったシスエレメントの解析を進める必要があると考えられる。

本研究は、丁寧な研究を以って、XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子のプロモーターが NF-Y であることを発見し、遺伝子発現の詳細な機構について明らかにしたものであり、今後の研究の発展も期待される。このため、審査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。

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 ①・論	第 518 号	氏 名	樋田 真理子
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	津 村 弘
		副査氏名	久 保 田 敏 昭
		副査氏名	小 林 隆 志
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Stickler と Marshall 症候群では具体的にはどのような臨床所見がみられるのか。</li> <li>2. Type XI コラーゲンの役割について説明せよ。</li> <li>3. Type XI コラーゲンが Type II コラーゲンと共に重合してコラーゲン線維の直径を制御していると述べられているが、具体的にどのように制御しているのか。</li> <li>4. 実験に使用した細胞に rat chondrosarcoma と mouse prechondrocyte を選択した理由を説明せよ。</li> <li>5. これらの細胞は、軟骨基質を分泌するのか。</li> <li>6. 転写開始点を決めるのに用いた 5'-RACE 法において、2種類のプライマー-mCol11a1R1 と mCol11a1R2 を用意しているが、どのように使い分けたのか。</li> <li>7. RT-PCR で用いられた Col11a1 遺伝子に対するプライマー配列はラットとマウスで共通の配列なのか。</li> <li>8. dual Luciferase Reporter assay の原理について説明せよ。</li> <li>9. Deletion analysis で長さの異なる分子を用いてプロモーター活性を見ているが、どのように作成したのか。</li> <li>10. “CCAAT(ATTGG sequence) box which is a potential bindings site for the transcriptional factor NF-Y.” の文章に関して、他の分子ではなく NF-Y であると判断した理由を説明せよ。</li> <li>11. レポーターアッセイの遺伝子導入効率は、ラット RCS 細胞とマウス ATDC5 細胞で同じぐらいの導入効率であったか。また、レポーター活性が ATDC5 細胞より RCS 細胞の方が高くなったのは、RT-PCR の結果と一致して、軟骨の分化段階を反映していると考えられるか。</li> <li>12. 本研究の結果の臨床応用として考えられることを述べよ。</li> <li>13. 様々な細胞における NF-Y の発現様式を説明せよ。また、NF-Y の発現を上昇させるような刺激やシグナル伝達経路は知られているのか。</li> <li>14. Type XI コラーゲンを構成する <math>\alpha 1</math>、<math>\alpha 2</math>、<math>\alpha 3</math> をそれぞれ別のプロモーターが発現を制御する意味はどのようなことが考えられるか。</li> <li>15. NF-Y が異なる細胞種（軟骨細胞と線維芽細胞）において異なるコラーゲン遺伝子の発現を調節していることが明らかになってきた。共通の転写因子が、状況に応じて異なる遺伝子発現を制御するには、cis-エレメントによる調節に加え、エピジェネティックな制御も考えられるか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 樋田 真理子

## 論 文 題 目

Nuclear factor Y (NF-Y) regulates the proximal promoter activity of the mouse collagen  $\alpha 1$ (XI) gene (*Col11a1*) in chondrocytes

(転写因子 NF-Y は、軟骨細胞において、マウス XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子の基本プロモーター活性を制御する。)

## 要 旨

緒言: XI 型コラーゲンは、線維性マイナーコラーゲンに属しており、その発現量は少ないが、軟骨組織に局限して発現している。また、 $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 3$  鎖の 3 つの遺伝子の分子型が存在しており、軟骨組織において、ヘテロライマー構造を形成している。XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子は、遺伝子欠損マウスにおいて、軟骨形成不全症を示すことが報告されており、軟骨組織の構築及び機能発現に必要不可欠な分子である。そこで、本研究では、マウス XI 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子の軟骨特異的転写調節機構を明らかにすることを目的として、基本プロモーター領域の同定及びプロモーター活性に関与する転写因子の解析を行った。

方法: 遺伝子発現を確認するために、RT-PCR を行うと共に、Oligo-nucleotide-capping-RACE 法により転写開始点を決定した。次に、基本プロモーター領域を同定するために、5'側の長さが異なるルシフェラーゼコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、同定した基本プロモーター領域に関与する転写因子について、Electrophoresis Mobility Shift Assay(EMSA)により検討した。

更に、見出した転写因子の細胞内での結合を明確にするために、Chip assay を行った。最後に、転写因子の結合領域を欠失、変異させたコンストラクトおよびドミナントネガティブ変異体の発現ベクターを用いて、プロモーター領域における転写因子の機能解析を行った。

結果：XI型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の発現は、RCS細胞（ラット軟骨肉腫由来）及びATDC5細胞（マウス奇形腫線維芽様細胞由来）共に認められ、その発現量は、軟骨での分化を示すRCS細胞でより高かった。この遺伝子の軟骨における転写開始点は、翻訳開始コドンATGの-299bp上流に位置していることが明らかとなった。ルシフェラーゼアッセイにより、基本プロモーター活性は-116~-256の領域に認められ、-135~-145の領域に転写因子が結合していることがEMSAにより示された。*in silico*の解析により、転写因子Nuclear Factor Y(NF-Y)の結合部位(CCAAT box)が予測された。そこで、結合配列に変異を加えたコンペティター及び特異抗体を用いてEMSAを行った結果、結合している因子がNF-Yであることを認めた。更に、Chip assayにより、細胞内においてもNF-Yが、基本プロモーター領域に結合していることを示した。最後に、基本プロモーター領域内に欠失及び変異を導入したコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、約40~60%の活性の低下が見られ、さらに、ドミナントネガティブのNF-YA変異サブユニットの強制発現により、プロモーター活性が抑制されたことから、NF-Yがプロモーター活性を制御していることが明らかとなった。

考察及び結語：本研究では、転写因子NF-Yが軟骨細胞において、マウスXI型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の基本プロモーター活性を制御していることが明らかとなった。遺伝子発現は、プロモーター及び組織特異的シスエレメントの複合的な働きによるものであることから、XI型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の更なる作用機序の解明のためには、プロモーターと共に、転写を活性するエンハンサーもしくは抑制するリプレッサーといったシスエレメントの解析を進める必要があると考えられる。