（見本）

[課程―２]

審査の結果の要旨

氏名　　○　○　○　○

本研究は高等動物初期発生過程において重要な役割を演じていると考えられる転写因子のネットワークを明らかにするため、マウス胚性腫瘍細胞（P19）をレチノイン酸にて分化誘導する系にて、未分化特異的なエンハンサー活性を示す DNA 断片の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

１．　２つの未分化特異的なエンハンサーの欠損変異株の活性測定及び DNA 塩基配列の解析の結果、２種類の共通する塩基配列を同定した。そのうち一種類はオクタマー配列結合因子と同一(OCTA)っであり、他の一種類はショウジョウバエのホメオボックス蛋白 Engrailed の結合配列に類似(EN)していた。OCTA ないし EN を含む 26 塩基対を 5 個または６個連結させ、SV40 の初期プロモーターを持つ CAT 遺伝子につないだ indicator plasmid(pOCTAcat,pENcat)を用い、CATassay を行ったところ、OCTA 及び EN はともに未分化特異的なエンハンサーとして働きうることが示された。

２．　OCTA 及び EN を持つ DNA 断片を用い、DNasel　footprint　assay を行ったところ、OCTA 及び EN の領域に特異的に蛋白が結合することが示された。OCTA ないし EN を含む２６塩基対を用い、未分化 P19(P19D`)より調整した核抽出液中で、gel　shift assay を行ったところ、これらの DNA に新しいオクタマー結合因子(Oct3)が特異的に結合することが示された。レチノイン酸にて分化誘導した P19(P19D´)より調整した核抽出液中では、Oct3 の結合は認められず Oct3 は P19 において未分化特異的に発現していることが示された。

３．　Oct3 を code する遺伝子(oct3)に由来する cDNA を、既存のオクタマー結合因子との homology を用い、クローニングした。oct3cDNA を in vitro にて転写、翻訳させた産物は、gel shift assay にて Oct3 とほぼ同じ挙動を示した。
DNA　sequencing により、oct3 は、POU　domain を持つ全く新しい遺伝子であることが示された。

４．　P19 において、oct3 は、未分化特異的に発現していること、およびレチノイン酸により特異的かつ急速に発現が抑制されることが Northern blot により示された。Adult mouse の各種臓器及び受精後 10、12、14、１６日の mouse embryo においてはいずれも発現は認められなかった。

５．　oct3 をβ-actin promoter につないだ発現ベクターを pOCTAcat と共に P19D´へ contransfection したところ、pUC と pOCTAcat を cotransfection した場合に比べ、３

倍以上の CAT 活性が認められた。逆に anti-sense oct3 をβ-actin promoter につないだ発現ベクターを pOCTAcat と共に P19D´へ cotransfection したところ、pUC と pOCTAcat を cotransfection した場合に比べ、CAT 活性は 30%に下がった。したがって Oct3 は P19D´において、OCTA を介して、trans activator として働くと考えられた。

以上、本論文はマウス未分化胚性腫瘍細胞 P19 において、未分化特異的に働くエンハンサーの解析から、未分化特異的に働く新しいオクタマー配列結合転写因子 Oct3 の存在を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、発生初期に働くと考えられる、転写因子のネットワーク網の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。