







## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第579号	氏名	渡邊 啓次朗
審査委員会委員	主査氏名	花田俊勝	
	副査氏名	橋本久司	
	副査氏名	波多野 豊	
論文題目 Sp1 upregulates the proximal promoter activity of the mouse collagen $\alpha 1(XI)$ gene( <i>Col11a1</i> ) in chondrocytes (転写因子 Sp1 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)			
論文掲載雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal			
論文要旨 <p>XI 型コラーゲン分子は<math>\alpha 1</math>、<math>\alpha 2</math>、<math>\alpha 3</math> 鎖の 3 つの遺伝子から構成されており、主に軟骨組織においてヘテロトライマー構造を形成している。その中で、XI 型コラーゲン<math>\alpha 1</math> 鎖遺伝子 (<i>Col11a1</i>) は、変異や欠損により Stickler 症候群などの軟骨形成異常を伴う疾患を発症することが知られている。申請者らは、これまで転写因子 NF-Y が <i>Col11a1</i> の基本転写を制御していることを明らかにしたが、その全体像については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、<i>Col11a1</i> の基本プロモーター領域における他の転写因子の関与について検討した。</p> <p>研究対象及び方法について、<i>Col11a1</i> の転写開始点の上流領域を含んだルシフェラーゼコンストラクトを用いて、ラット軟骨細胞 (RCS) に対する基本プロモーター活性を比較検討した。次に、予測された転写因子結合領域に変異を加えたルシフェラーゼコンストラクトを作製し、転写因子結合部位の同定を行った。更に、関与する転写因子について、強制発現実験により <i>Col11a1</i> 遺伝子の基本プロモーター活性に及ぼす効果について解析すると共に、ノックダウン実験による <i>Col11a1</i> の発現量の変化を解析した。</p> <p>実験結果として、これまでに報告した NF-Y 結合部位の下流 (-116&gt;+1) の領域にも基本プロモーター活性が認められ、転写因子の結合に関与する配列 (GC-rich sequence, -96&gt;-67) を見出した。そこで、この領域に変異を加えたコンストラクト (m1; -96&gt;-87, m2; -86&gt;-77, m3; -76&gt;-67) を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行なった結果、3 種類全てのコンストラクトにおいて基本プロモーター活性が低下し、その程度は m2 においてより著明であった。そこでデータベース検索を行った結果、予測される転写因子として Sp1 が見出された。そこで、Sp1 の強制発現実験を行ったところ、-96&gt;-67 の GC-rich sequence を含む部位にのみ基本プロモーター活性の上昇が認められた。加えて、転写因子 Sp1 のノックダウンの実験を行ったところ、ルシフェラーゼアッセイ、RT-PCR とともに活性の低下がみられた。以上の結果より、<i>Col11a1</i> の軟骨細胞における転写調節機構はこれまでに報告した転写因子 NF-Y だけでなく Sp1 の関与が示唆された。</p> <p>本研究は、<i>Col11a1</i> の遺伝子発現制御における NF-Y の役割を明らかにした先行研究をもとに、さらに詳細な解析を行い、Sp1 も <i>Col11a1</i> の遺伝子発現制御に関与することを初めて明らかにした。このため、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>			

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 ①・論	第 579 号	氏 名	渡 邊 啓次朗
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	花田 俊勝 
		副査氏名	楠 厚 久 司 
		副査氏名	沢 多 野 豊 
<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. コラーゲンの産生は、骨端線の閉鎖との関連など女性ホルモンによって調節される可能性はあるか。</li> <li>2. 実験には軟骨肉腫のcell lineを用いているが、正常の軟骨細胞でも同様の制御があることを確認したか。</li> <li>3. GC-rich配列の一般的な機能はなにか。エピジェネティックな調節も考えられるが、CpG islandはこのSp1結合部位に存在するか。</li> <li>4. NF-YとSp1の相互作用はありそうか</li> <li>5. この研究は、歯科口腔外科領域にどのように関わっていると考えられるか。</li> <li>6. XI型コラーゲンのどのような機能が、ケロイドや癌の増殖・浸潤・薬剤耐性に関与するのか？</li> <li>7. ラットの細胞株を使用したのは何故か？ヒトの細胞の方が良いのではないか？</li> <li>8. Sp1のoverexpressionやknockdownした際の細胞の形態や増殖能に変化は見られたか？</li> <li>9. 今後、様々な転写因子の関与が解明されてくると予想されるが、臨床応用に向けてどのような方法で標的となる因子を絞り込むのか？</li> <li>10. 本遺伝子の突然変異について、ヒトではどのような種の変異が生じて病気になっているか。またプロモーター領域の変異は見つかっていないのか。</li> <li>11. ルシフェラーゼアッセイコンストラクトはマウスのゲノム情報より作成しているが、なぜマウスを用いたのか。</li> <li>12. ルシフェラーゼアッセイはプロモーター活性を見る一つの指標であるが、さらにEMSA等により実際にそのDNA配列にSp1が結合するかを確認したか。</li> <li>13. ラットRCS細胞について、これは分化刺激をかけると軟骨に分化できるのか。</li> <li>14. 統計処理とP値の記載がないが、有意差を判定するためどのような統計処理を行ったのか。</li> <li>15. Sp1のoverexpression実験において、Sp1の発現は内在性のSp1に比べてどの程度であったかまた、各サンプル間でのSp1発現の差異についてタンパク質レベルで確認したか。</li> <li>16. Sp1のsiRNAによるknockdown実験において、mRNAレベルだけでなくタンパク質レベルでも効率を確認したか。</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。