



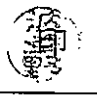



学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 590 号	氏名	張 娟 娟
審査委員会委員	主査氏名	花田 俊勝	
	副査氏名	波野 豊	
	副査氏名	木許 賢一	
<p>論文題目 The pro-$\alpha 1$(V) collagen gene (<i>Col5a1</i>) is coordinately regulated by miR-29b with core promoter in cultured cells (培養細胞において、V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子はコアプロモーターと共同して miR-29b によって調節されている)</p> <p>論文掲載雑誌名 Connective Tissue Research</p> <p>論文要旨 コラーゲンは、細胞外マトリックス(ECM)の主要構成成分であり、体内器官の形成および機能に関与している。フィブリル形成コラーゲンは、I 型、II 型、III 型、V 型、XI 型、XXIV 型および XXVII 型の 7 種類のコラーゲンに会合する 11 の異なるポリペプチドを含んでいる。その中で、V 型コラーゲンはフィブリル形成コラーゲンのマイナーコンポーネントであり、より豊富に存在する I 型コラーゲンのフィブリルに組み込まれ、コラーゲンフィブリルのサイズおよび形状の調節に関与する。他方、マイクロ RNA (miRNA) は、特定の標的 mRNA の 3'-非翻訳領域(3'UTR)に結合することによって転写後調節をする約 18~25 ヌクレオチド長の小さな非コード RNA である。本研究では、<i>Col5a1</i> 遺伝子発現に対する miRNA の転写後調節機構について研究を行った。 [方法]: MC3T3-E1 細胞(骨芽細胞株)および NIH3T3 細胞(線維芽細胞株)を、本研究で使用した。<i>Col5a1</i> 遺伝子における 3'UTR の転写後調節を調べるために、<i>Col5a1</i> のコアプロモーターおよび 3'UTR を含むプラスミドを作製し、遺伝子発現を評価するルシフェラーゼアッセイを行った。さらに、miRNA である miR-29b の認識配列と推定される <i>Col5a1</i> の 3'UTR に変異を導入し、<i>Col5a1</i> 遺伝子発現における miRNA の役割を評価した。また、miR-29b の過剰発現細胞、siRNA を用いた miR-29b ノックダウン細胞、さらに CRISPR / Cas9 システムによる miR-29b ノックアウト細胞を用いて、miR-29b が <i>Col5a1</i> 遺伝子の発現に及ぼす効果を検討した。 [結果]: <i>Col5a1</i> 遺伝子の 3'UTR を含むプラスミドを用いた場合のルシフェラーゼ活性つまり遺伝子発現活性は、MC3T3-E1 および NIH3T3 細胞の両方で有意に減少した。一方、miR-29b の認識部位に変異を導入した場合には活性は増加した。miR-29b の過剰発現では、<i>Col5a1</i> の mRNA およびタンパク質の発現レベルを有意に減少させ、逆に siRNA により miR-29b を減少させると、<i>Col5a1</i> の mRNA およびタンパク質発現が増加した。CRISPR / Cas9 システムによる miR-29b2 ノックアウト細胞においても、<i>Col5a1</i> の mRNA およびタンパク質の発現増強が認められた。またこのノックアウト細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにおいても、<i>Col5a1</i> 遺伝子発現の活性増強が認められた。 [結論]: これらの結果より、miR-29b は、<i>Col5a1</i> 遺伝子の 3'UTR を介して遺伝子発現の転写後調節に重要な役割を担っていることが明らかとなった。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第590号	氏名	張 娟 娟
審査委員会委員	主査氏名	花田俊勝	
	副査氏名	波多野 豊	
	副査氏名	木許 賢一	
<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"> 1. コラーゲン遺伝子ファミリーは多くの遺伝子を含んでいるが、なぜCol5a1に焦点を絞ったのか。 2. Col5a1 遺伝子改変マウスはEhlers-Danlos症候群に類似した特徴的な表現型を呈するが、この遺伝子発現を制御するmiR-29bの遺伝子改変マウスはどうか。 3. Methodの記載で、miR-29b inhibitorとあるのは、これに対するsiRNAのことを意味するのか。 4. miR-29bの過剰発現またはsiRNAによるknockdownの細胞は、プラスミドベクターの一過性発現によるものか、安定発現によるものか。 5. Introductionに、miR-29ファミリーの低下は、様々な線維化の形成に関与していると記載されているが、TGFβ以外で、miR-29ファミリーの低下に関与する因子は知られているか？ 6. miR-29b低下の影響を調べるために、siRNAシステムに加えて、CRISPR/Cas9システムを用いているが、今回の研究の目的において、siRNAシステムのみでは不十分と考えた理由は何か。 7. Fig.1Cにおいて、Col5a1+822/+1662-Luc 群とCol5a1+1/+1662-Luc群との間に差があるように見えるが、差があるのか。もし差があるとすれば、それは何を意味しているか。 8. miR-29bは、様々な細胞の様々な機能に関与しているので、miR-29bを標的とした治療では副作用が出る危険があると思われるがどのように考えるか。 9. α2(V)やα3(V)の3'-UTRにもmiR-29のbinding siteはあるのか。 10. The miR-29 familyについて簡単に説明してください？ 11. mut-Luc の mutation constructs の作成で、Xho I site と Eco RI site を使い分けているのはどうしてか。 12. 各種 plasmids の transfection 試薬が異なっているのは理由があるのか。 13. Fig.5C で示されている miR-29b2-3 cells において、col5a1 WT-Luc の luciferase 活性が Fig.4 の miR-29b siRNA と比較して上昇していないのはどういう理由が考えられるか。 14. TGF-β/smad3 経路は miR-29 をどのように制御しているのか。 <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。