【257】

氏　名（国籍）	許（しゅい）　雪珠（しゅえじゅ）（中国）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 3804 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Yin-Yang 1 Negatively Regulates the Differentiation-Specific Transcription of Mouse Loricrin Gene in Undifferentiated Keratinocytes. （転写因子 Yin-Yang 1　は未分化ケラチノサイトにおいてマウス―ロリクリン遺伝子の分化特異的発現を負に制御する）

主　査	筑波大学教授	医学博士	宮内　卓
副　査	筑波大学教授	医学博士	原　晃
副　査	筑波大学講師	医学博士	遠藤隆志
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	原　尚人

論文の内容の要旨

目　的：

本研究は表皮角質層の皮膚バリヤー機能の維持に重要な役割を果たしている cornified cell envelope（CE）の主要構成成分であり，表皮角化細胞の分化特異的，組織特異的マーカー分子であるロリクリンの発現制御の解析を通じて，表皮分化（角化）の分子制御機構を明らかにすることを目的とする。

対象と方法：

1. プラスミドの作製：

ロリクリン遺伝子の上流 1.5kb の転写調節領域と 1.1kb の第一イントロンからなる 2.6kb の DNA 断片をルシフェラーゼ・ベクター pGL3-basic に組み込み野生型レポーターとし，さらにこの野生型レポーターの 1.5kb の転写調節領域とイントロン領域に種々の変異を導入し，変異型レポーターを作製した。

2. 細胞培養及び transfection，luciferase asaay：

マウス新生児から分離した表皮ケラチノサイトを培養し，ポリアミンを担体として上記野生型レポーターと変異型レポーターを transient transfection した。さらに培地のカルシウム濃度を 0.12mM（high Ca）に上昇するカルシウム・スイッチを用いて in vitro で分化を誘導した細胞（分化ケラチノサイト）と，そのままカルシウム濃度 0.05mM（low Ca）で培養した細胞（未分化ケラチノサイト）から，細胞抽出液を調整し，dual-luciferase assay により Iuciferase 活性を測定した。

3. ゲルシフト・アッセイ

分化及び未分化ケラチノサイト核抽出蛋白と ^{32}p でラベルした probe を incubate し，その DNA/protein complex を形成させたのち，polyacrylamide gel electrophoresis（PAGE）を行い，ゲルを乾燥後，オートラジオグラフィーした。

5. 組織免疫蛍光染色法：

マウス新生児から皮膚組織切片を作製し，抗 YY1 抗体を用いて蛍光染色した。

6. Immunoblotting analysis：

transfection 後の分化及び未分化ケラチノサイトから全細胞抽出蛋白および核抽出蛋白を調整し，SDS-PAGE 後，ニトロセルロース膜に転写し，抗 YY1 抗体，各種ケラチン抗体と incubate 後，オートラジオグラフィーした。

結　果：

1. ロリクリン遺伝子第一イントロンに種々の変異を導入したコンストラクトによるレポーター・アッセイの結果，ロリクリン遺伝子第一イントロン内にケラチノサイトにおいてロリクリンの発現を負に制御する negative element を見出した。
2. ゲルシフト・アッセイにより，この negative element には転写因子 YY1 が結合していることを明らかにした。
3. CMV プロモーター下流に YY1 cDNA を配置した発現ベクター（pCMV-YY1）による YY-1 のケラチノサイト内過剰発現は，ロリクリンの発現を強力に抑制した。このことにより，YY1 は機能的にロリクリンの発現を抑制することが確かめられた。
4. YY-1 は，in vivo でも in vitro でも未分化ケラチノサイトに優位に発現し，ケラチノサイトの分化に伴い発現が低下した。すなわち YY1 の発現は，ロリクリンと対称的であった。
5. YY-1 のケラチノサイト内過剰発現により，未分化マーカーである K5, K14 の発現は影響を受けなかったが，分化マーカーである K1，K10 および最終分化マーカーであるインボルクリン，ロリクリンの発現は抑制された。

結　論：

転写因子 YY1 は，ロリクリンの分化特異的発現制御過程において，未分化ケラチノサイトにおける発現抑制に重要な役割をはたしていると考えられるが，単にロリクリン遺伝子の発現制御にとどまらず，ケラチノサイトを未分化状態に維持するのに必要な因子である可能性がある。

審　査　の　結　果　の　要　旨

ロリクリンの発現は，表皮ケラチノサイトの分化にリンクした発現パターンをとる。すなわち，表皮下層の未分化ケラチノサイトでは発現が見られず，上層の分化ケラチノサイトのみで発現する。このことは，分化ケラチノサイト内でのロリクリン遺伝子発現の活性化とともに未分化ケラチノサイト内でロリクリン遺伝子発現の抑制が起こっていることを示唆する。本研究では，転写因子 YY1 が表皮で発現していることを初めて明らかにし，さらにその発現は分化依存的で，表皮基底層の未分化ケラチノサイトのみに発現していた。YY1 は機能的にロリクリンの発現を抑制することも示し，その未分化ケラチノサイトに限局する発現とあわせると，未分化ケラチノサイト内でロリクリン遺伝子発現の抑制することにより，ロリクリンの分化特的発現制御に関わっていることを示した。さらに，YY1 は，ロリクリン遺伝子のみならずケラチノサイトの分化マーカー遺伝子であるインボルクリン・ケラチン 1，10 の発現を抑制し，未分化マーカー遺伝子であるケラチン 5，14 の発現には影響を与えなかったことから，ケラチノサイトの分化そのものを制御している可能性が示唆された。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。