

氏名(本籍)	なかむらやすひろ (千葉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第4427号
学位授与年月日	平成19年3月23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	The combination of ubiquitous transcription factors AP-1 and Sp1 directs keratinocyte-specific and differentiation-specific gene expression <i>in vitro</i> (普遍的に発現する転写因子 AP-1 と Sp1 の組み合わせが <i>in vitro</i> において遺伝子の表皮角化細胞特異的および表皮角化細胞分化特異的発現を規定する)
主査	筑波大学教授 医学博士 川上 康
副査	筑波大学教授 医学博士 大塚 盛男
副査	筑波大学教授 医学博士 原 晃
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)

表皮最外層の角層は、生体を物理的、化学的、生物学的有害事象から保護する重要な機能を担う。角層は表皮角化細胞の分化(角化)によって形成され、角層の構成蛋白であるロリクリン、インボルクリン、フィラグリンは表皮上層の分化角化細胞特異的に発現する組織および細胞分化特異性の高い発現様式をとる分子である。近年、これらの表皮構成蛋白の発現は、NF- κ B、C/EBP、Sp1、AP-1、AP-2などの転写因子によって制御されていることが明らかとなり、特にSp1とAP-1の結合認識配列は多くの表皮構成蛋白遺伝子のプロモーター領域に見出されている。しかし組織特異的および角化細胞分化特異的発現を制御する正確な機序は解明されていない。

本研究では、ほとんど全ての細胞種に発現している ubiquitous factor である Sp1 と AP-1 が、遺伝子発現に表皮特異性を与え得るか否か、与えているとしたらいかなる機序によるものかを明らかにすることを目的とし、ロリクリン遺伝子から離れて、AP-1、Sp1 の両者が遺伝子の分化特異的発現に不可欠であるという仮説に基づき、AP-1 と Sp1 の結合認識配列のみを含み、その周辺のロリクリンプロモーター領域の遺伝子配列を random sequence に入れ換えた各種の人工的 DNA 断片を作成し、マウス未分化・分化培養角化細胞および発生源の異なる各種培養細胞に遺伝子導入して転写活性を解析した。

(対象と方法)

転写因子 AP-1、Sp1 を単独、繰り返し、あるいは両方などの結合認識配列を含み、その周辺のロリクリンプロモーター領域の遺伝子配列を random sequence に入れ換えた DNA 断片を人工的に作成し、ゲルシフト法でマウス角化細胞核蛋白中の AP-1、Sp1 が結合認識配列に結合するかを確認した。これらの DNA 断片をルシフェラーゼレポーターおよび β ガラクトシダーゼ上流に組み込んだレポーターベクターを作成し、未分化角化細胞および分化角化細胞に導入してルシフェラーゼアッセイおよび β ガラクトシダーゼ染色を行い、転写因子が *in vitro* で細胞分化特異的発現を規定しているかを解析した。これらのレポーターベク

ターを発生起源の異なる各種培養細胞に遺伝子導入してルシフェラーゼアッセイおよび β ガラクトシダーゼ染色を行い、転写因子が *in vitro* で組織特異性を規定しているかを解析した。

(結果)

①転写因子 AP-1, Sp1 は人工的プロモーターの結合認識配列に特異的に結合した。ゲルシフト法にて AP-1, Sp1 の結合認識配列のみを含む人工的 DNA 断片でも, AP-1, Sp1 共に結合を示すバンドが見られ, コンセンサス配列および AP-1 抗体, Sp1 抗体を用いた競合反応でバンドの消失ないしフレームシフトが見られた。

② AP-1, Sp1 双方の組み合わせが遺伝子導入した表皮分化角化細胞のルシフェラーゼ活性上昇に必要不可欠であった。AP-1, Sp1, あるいは両者を含む各種 DNA 断片を含むルシフェラーゼベクターの中で, AP-1, Sp1 両者を含むベクターのみが分化角化細胞に遺伝子導入したときのみ wild type (ロリクリンプロモーター領域の配列を含むベクター) に近い高いルシフェラーゼ活性がみられた。

③ AP-1, Sp1 双方の組み合わせが遺伝子導入した表皮分化角化細胞の β ガラクトシダーゼ染色の発色に必要不可欠であった。Sp1, AP-1 あるいは両者を含む DNA 断片を含む β ガラクトシダーゼベクターの中で, AP-1, Sp1 両者を含むベクターのみが分化角化細胞に導入したときのみ wild type と同程度に青染された。

④ AP-1, Sp1 の近接した配列が遺伝子導入した表皮分化角化細胞のルシフェラーゼ活性上昇に必要であった。両配列間に各種の長さの遺伝子配列を挿入した DNA 断片をルシフェラーゼベクターに組み込んで, 分化角化細胞に導入した。AP-1 と Sp1 が挿入遺伝子により離れると, 転写活性は wild type に比べ低下した。

(考察)

本研究では, ロリクリン由来配列を含まない純粋な人工的プロモーターが, 角化細胞の分化特異性と細胞(組織)特異性を示した。すなわち, ほぼ全ての細胞種に発現している ubiquitous factor 同士の組み合わせが, 角化細胞という極めて限局した遺伝子発現を規定しているという一見矛盾した結果が得られた。このことは, 遺伝子の臓器特異的, 分化特異的発現が, 「臓器特異的転写因子」によって制御されているわけではなく, 普遍的に存在する転写因子の組み合わせによって規定されるという事実を明らかにしたものである。また, AP-1 と Sp1 の認識配列が近接した位置にないと転写活性化能がなくなることから, 2つの因子の相互作用が転写活性化に必須である。AP-1 は細胞の分化状態, 刺激・活性化により, 発現レベルやリン酸化状態が大きく変動することが知られており, Sp1 ファミリーとの組み合わせも変化することが予測される。これらの組み合わせの変化が, 組織特異的, 分化特異的遺伝子発現を規定している可能性がある。

(結論)

普遍的因子である Ap-1 と Sp1 相互の組み合わせが, 遺伝子の表皮角化細胞特異的および表皮角化細胞分化特異的発現を規定することが *in vitro* で示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究により, 細胞種や細胞の分化段階における, AP-1 ファミリー構成メンバーと Sp1 ファミリー構成メンバーの違い, リン酸化等の修飾様式の違いが, 多様な組み合わせを生み, 遺伝子発現の多様性を制御している可能性が示唆された。この研究を通じて, 生体分子の組織特異性, 細胞分化特異性が特異的転写因子だけでなく, 普遍的転写因子により規定されている可能性が示され, 表皮蛋白の中で角質の主要構成蛋白であるロリクリンの組織特異性, 組織特異性制御機構のみならず, 生体全体の組織特異性, 組織特異性遺伝子発現の分子モデルとなり得る優れた研究成果である。

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。