

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 榎 本 喜 久 子

本研究は表皮の分化において重要な役割を果たしていると考えられる hSkn-1a によって変動する下流遺伝子を検索及び解析することによって、分化の初期過程を解明する糸口をつかむことを目的とした。培養液中にドキシサイクリンを添加することによって hSkn-1a の発現を誘導できる HeLa 細胞株 (HeLa/Tet-On/hSkn-1a) を樹立して、hSkn-1a 発現に伴う遺伝子発現の変動を調べ、次の結果を得ている。

1. HeLa/Tet-On/hSkn-1a では、培養液にドキシサイクリン ($2\mu\text{g/ml}$) を加えると、添加 2 時間後から hSkn-1a が発現し、その発現は 4 日目をピークに 6 日目まで高いレベルで維持された。hSkn-1a を誘導した HeLa/Tet-On/hSkn-1a において、顆粒層から有棘層に特異的なマーカー蛋白質である K10 と TG1 の発現が上昇した。また、hSkn-1a の発現に伴い、扁平化して増殖を停止した細胞の出現や培養の倍加時間の延長が起こった。これらの変化から、HeLa/Tet-On/hSkn-1a は hSkn-1a の発現によって分化の過程を歩み出すことが示された。
2. hSkn-1a 発現と共に mRNA 量が増加する遺伝子として、まず、DNA マイクロアレイを利用して 7600 個の遺伝子から出発し、次いで ATAC-PCR 及び RT-PCR によるスクリーニングで 33 個の遺伝子を選んだ。さらに、定量的 RT-PCR によって、hSkn-1a 発現後、速やかに mRNA 量が増加する遺伝子として Connexin 43 (Cx43) と ras homolog gene family, member H (ARHH) を、減少する遺伝子として、Homo sapiens myxovirus resistance 2 (Mx2)、ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS) 及びケラチン 18 (K18) を選び出した。
3. hSkn-1a 下流遺伝子の候補として選び出された Cx43、ARHH、Mx2 についてその

発現制御に対する hSkn-1a の影響を調べるために、ヒト胎盤ゲノムライブラリーよりそれぞれのプロモーター領域を含む DNA 断片を単離し、ホタルルシフェラーゼをつないだプラスミドを作成し、レポーターアッセイを行ったところ、ARHH 及び Mx2 では hSkn-1a によるルシフェラーゼ活性の変動がみられた。レポーターアッセイに用いたこれら 3 つの遺伝子の転写調節領域には、複数の hSkn-1a 結合可能配列が存在しており、hSkn-1a の直接の制御をうけている可能性が示唆された。

以上、本論分はドキシサイクリンにより hSkn-1a を誘導できる細胞株 HeLa/Tet-On/hSkn-1a を用いて、DNA マイクロアレイ、ATAC-PCR、RT-PCR、及び定量的 RT-PCR によるスクリーニングを行った結果、hSkn-1a 下流遺伝子として Cx43、ARHH、Mx2、RALGDS 及びケラチン 18 を選び出し、とくにプロモーター解析を行った Cx43、ARHH については hSkn-1a の直接の制御を受けている可能性が示唆された。本研究は表皮分化の制御システム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。