

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 増田 芳子

骨の機能には、形態形成、抗重力といった物理的機能以外に、カルシウム代謝など生理的機能があり、脊椎動物に必須な組織である。骨機能の維持に必要な骨代謝は形成と吸収により成立し、それぞれ特異的な細胞の機能を介して行なわれる。しかしながら、この骨代謝のバランスが崩れると成長障害や多くの骨疾患を引き起こすため、骨代謝の正常維持機能機構を理解することは極めて重要な課題である。

本研究は骨形成を担っている骨芽細胞に着目し、骨芽細胞の分化初期に発現する転写制御因子を対象とした。この転写制御因子の機能を担う新規転写共役因子を検索、同定・解析することで、骨芽細胞分化の分子機序の解明を試みたものである。

第1章は序論であり、第2章では BMP 処理による骨芽細胞様細胞株における転写制御因子の発現を検討し、最も初期に発現し、機能未知な転写制御因子群遺伝子について検討した。その結果、骨芽細胞の分化に必須である Cbfa1 より初期に BMP により誘導されたホメオボックス遺伝子 Dlx5 を見出した。これら転写制御因子群の発現時期に差があることから、BMP シグナル伝達経路において別々の発現制御を受け、異なる分子機能を有することが推測された。次に、Dlx5 による転写制御をコラーゲン I 型遺伝子プロモーターの Dlx 応答配列 (DlxRE) を組込んだレポータープラスミド pDlxRE を用い、Dlx5 を強制発現した細胞により転写機能を調べた。その結果、Dlx5 の転写促進能が見出した。そこで、Dlx5 の欠失変異体を作成し、転写活性化領域を検索した結果、N 末端領域に存在することが確認できた。

第3章では、Dlx5 の転写活性化領域に結合し、Dlx5 の機能を制御する共役因子を yeast two-hybrid スクリーニングにて検索を行なった。その結果、長さの異なる重複した塩基配列を持つ複数クローンが取得され、これらはいずれも同一の新規遺伝子 Dlxin-1 をコードしていた。Dlxin-1 は、中央部にトリプトファン、グルタミン、プロリンを基本骨格とする配列が繰返される特徴的な領域を持ち、またこの領域が Dlx5 結合領域 (DlxBD) であった。Dlxin-1 は胎生期から普遍的に発現し、BMP よりその発現制御を受けない遺伝子であった。Dlxin-1 タンパクは Dlx5、Dlx7、Msx2 のほか Dlxin-1 自身とも結合を示したことから、Dlxin-1 は多量体を形成し、Dlx5 と直接、間接的に結合すると推定された。

第4章では Dlxin-1 が Dlx5 の転写に与える影響を検討するため、最も Dlxin-1 の発現量の低い HT1080 細胞株を使用して転写機能を解析した。ホメオボックスを欠損させた Dlx5 変異体と

Dlxin-1 を同時に発現させると転写が上昇した。また、Dlxin-1 の添加により Dlx5 の転写機能が亢進したが、Dlxin-1 自身には転写活性化能は認められなかった。

以上の結果から、Dlx5 は DlxRE に結合後、その N 末端領域に Dlxin-1 が結合し、更に未知なる転写共役因子群が会合することで転写が活性化される可能性が示唆された。

以上本研究では、転写制御因子 Dlx5 の機能を解明し、新規転写共役活性化因子を単離すると共に、その機能を解明した。これらの観察から、骨芽細胞の分化過程においては複数の因子が協同的かつ複雑な制御機構の存在が予想され、今回得られた知見を基に、更に詳細な骨芽細胞の分化機構が明らかになるものと期待される。

以上の本論文は複雑な骨芽細胞分化制御機構の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。