

審査の結果の要旨

氏名 牛田 正宏

本研究は脊椎動物における軟骨細胞増殖・分化のマスター分子である SOX9 の上流シグナルを探索し、得られた新規上流シグナルによる SOX9 の転写制御機構および軟骨形成における機能を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト及びマウスの SOX9 プロモーターの塩基配列を転写開始点から約 1kbp 上流まで相同性比較検討を行い、NFAT, AP-1, NF- $\kappa$ B, Sp-1, CREB/ATF, CCAAT, GATA のモチーフに一致している、あるいは高度に類似している配列を高度保存領域内に同定した。次いでこれらのモチーフに結合することが予測される転写因子群を SOX9 プロモーター活性化分子の候補として、それぞれの発現ベクターを作成し、SOX9 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイによるスクリーニングを行った結果、NF- $\kappa$ B ファミリー分子である RelA が強力に SOX9 プロモーターを活性化することが示された。
2. 成長板軟骨における発現パターンを組織免疫染色法にて確認した結果、RelA、SOX9 共に静止軟骨細胞層および前肥大軟骨細胞層～肥大軟骨細胞層において強く共発現している傾向が見られた。これは生体内の軟骨細胞増殖・分化において RelA と SOX9 が相互作用を持つことを示唆するものである。
3. SOX9 プロモーターを 5' 末端から段階的に配列を短くしたものを組み込んだレポーターベクターを作成し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。DNA の導入は HeLa 細胞および ATDC5 細胞に行った。RelA による活性化は SOX9 の転写開始点より -289 bp から -202 bp の間、さらに -202bp から -127 bp の間の 2 領域で減弱が見られ、その傾向は HeLa 細胞、ATDC 細胞いずれにおいても同様であった。したがってこの 2 つの領域内に RelA の応答領域が存在すると考えられた。
4. いずれの領域に真の RelA 応答部位が存在するのかを調べるために遠位エレメント (-289bp から -203bp) と近位エレメント (-202bp から -128bp) をそれぞれタンデムに繰り返すコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行い RelA 応答性を確認した。その結果、遠位エレメントのタンデムコンストラクトに対してのみそのコピー数依存的に RelA 応答性が増強することが判明した。したがって -289bp から -203bp の間に RelA 応答領域が存在することが示唆された。実際にこの領域の中には先に同定した NF- $\kappa$ B 結合モチーフ様配列(TGGAAGTCCC)が -252bp から -243 bp に存在し、これは SOX9 近位 1kb プロモーター内で唯一 NF- $\kappa$ B 結合モチーフ(HGGARNYYCC) に完全に一致するものであった。
5. さらに NF- $\kappa$ B 結合モチーフを含む、-265bp から -227bp の 39bp を用いて結合領域の絞込みを図った。モチーフ内に変異を加えたもの (-249G→T, -243C→A) を作成し、変異型コンストラクトおよび野生型コンストラクトを 3 回までタンデムにつないでルシフェラーゼアッセイを行ったところ、コピー数依存的な RelA 応答性の活性化は変

6. EMSA 法によりインビトロ翻訳にて作成した RelA タンパクが NF- $\kappa$ B 結合モチーフを含む 39bp のプローベおよびモチーフ外変異プローベと複合体を形成することを確認した。しかしモチーフ内変異プローベとの複合体形成は見られなかった。この複合体は 100 倍濃度の非標識野生型プローベおよびモチーフ外変異プローベにより競合阻害されたがモチーフ内変異型プローベでは競合阻害が見られなかった。さらにこの複合体は抗 RelA 抗体を加えることによりスーパーシフトした。以上の結果から RelA が SOX9 プロモーターの NF- $\kappa$ B 結合モチーフに特異的に結合することが示された。
7. クロマチン免疫沈降法を行ったところ、ウサギ IgG 抗体ではバンドが見られず抗 RelA 抗体を用いたときのみバンドが確認され、また NF- $\kappa$ B 結合モチーフから離れた PCR プライマーセットではバンドが見られないことから SOX9 プロモーターの NF- $\kappa$ B モチーフを含む領域と、RelA との特異的な結合が示された。この結果から、より生体内に近い条件下においても RelA タンパクが SOX9 プロモーターに結合することが示された。
8. 代表的な軟骨細胞分化マーカーである SOX6 および COL2A1 の近位プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、HeLa 細胞、ATDC 細胞のいずれを用いてもやはり RelA が強力に SOX6 と COL2A1 のプロモーターを活性化した。リポフェクションにより一過性に RelA を過剰発現させた HeLa 細胞において SOX6、SOX9、COL2A1 の内因性 mRNA レベルの上昇が見られた。しかしこれは未分化 ATDC5 細胞では再現できなかつた。次いでレトロウイルスを用いて RelA を安定発現する細胞株を作成し培養を行った。マウス初代軟骨細胞に RelA を安定導入すると SOX6、SOX9、COL2A1 の内因性 mRNA レベルの上昇に加えてアルシアンブルー染色および ALP 染色により、染色性の亢進が見られた。これは未分化 ATDC5 細胞では再現できなかつたが、インシュリンとリンを添加して後期分化まで誘導した ATDC5 細胞を培養したところ、SOX6、SOX9、COL2A1 の内因性 mRNA レベルの上昇が見られ、染色性の亢進および ALP 活性の上昇も認められた。以上の結果から限定的ではあるが RelA の軟骨分化促進作用が示された。

以上、本論文は軟骨形成マスター分子である SOX9 の上流分子として NF- $\kappa$ B ファミリー分子である RelA を同定し、その SOX9 転写制御メカニズムおよび軟骨形成促進作用を示したものである。本研究はこれまで知見の限られていた SOX9 の誘導シグナルの理解を深め、軟骨形成に関わる分子ネットワークの解明につながるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。