

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲口 乙口 口修 第 <b>385</b> 号	氏名	Ryna Dwi Yanuaryska
審査委員	主査 吉本 勝彦 副査 岩本 勉 副査 福井 清		

題目

Sp6 regulation of *Rock1* promoter activity in dental epithelial cells

(歯原性上皮細胞におけるSp6タンパク質によるRock1遺伝子プロモーター活性の制御)

要旨

Sp6はSP/KLFファミリーに属する転写因子の一つであり、歯の発生においてエナメル芽細胞の分化での形態形成に必須の因子である。しかしながら、その分子機構については未だ良く分かってはいない。以前の研究で、Sp6の下流の標的遺伝子の一つとして、*Rock1*遺伝子が同定されている。*Rock1*の役割として、細胞骨格や極性に係わることが知られており、エナメル芽細胞の分化においても、極性構築に関わることが指摘されている。そこで、学位申請者は、エナメル芽細胞において、Sp6による形態分化の調節を明らかにする目的で、Sp6による*Rock1*遺伝子転写制御機序について研究を行った。

まず、材料として用いるラット*Rock1*遺伝子について、その転写開始点の解析を行った。GenBankに報告されているヒト、マウス、ラットの*Rock1*遺伝子5'領域の比較検討から、ラットの転写開始点は未だ特定されていないことが判明したので、*Rock1*遺伝子5'末端を同定した。その結果、*Rock1*遺伝子はTATA-lessプロモーターで、典型的なGCリッチな構造を有し、多数の転写開始点を有することを見出した。そして、転写開始点の上流で最もGCリッチな領域A(転写開始点の最も5'側を+1とすると、-249から+10)を含む断片を標的にしたChIP-PCR法でSp6の特異的な結合が確認できた。次に、*Rock1*遺伝子プロモーター活性についてルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイによってSp6の*Rock1*遺伝子プロモーターに対する効果を評価した。この結果、Sp6が*Rock1*遺伝子プロモーター活性に対してA領域依存的に増強効果を示した。一方、同じSpファミリーのSp1には、むしろプロモーター活性に関して抑制的に働いた。さらに、GC部位に結合するmithramycinによる阻害実験から、Sp6による*Rock1*プロモーター増強活性の抑制が見られるのに対して、Sp1では変化が認められなかった。この際、*Rock1* mRNAを調べたところ、mithramycinはSp6による転写産物の増加を特異的にキャンセルすることを確認した。さらに、A領域内のSpファミリーの結合部位と考えられるGCリッチな部位に変異を導入して、レポーターアッセイを行ったところ、GCリッチな部位の2カ所での変異で特異的にSp6によるレポーター活性の増強が喪失することを見出した。またChIP-PCR法によって、特異的な結合を確認し、レポーター活性の喪失は、変異によってSp6結合が消失したためと判断された。

以上の結果、本論文の著者はSp6によって*Rock1*遺伝子プロモーターの活性増強が起こることを明らかにし、Sp6がエナメル芽細胞において形態形成に係わることを示すことで、歯の発生過程における役割に関する知見を提供した。このことは、歯の再生技術においても制御手法の開発の点で新たな視点を提供するものと考えられる。従って、本研究は歯科医学の発展に寄与するところが極めて大であり、本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと考えられる。