

Title	軟骨細胞分化過程における新規転写調節因子Znf219の役割の解明
Author(s)	滝川, 陽子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49229
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	たき かわ よう こ 滝 川 陽 子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21940 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	軟骨細胞分化過程における新規転写調節因子 Znf219 の役割の解明
論文審査委員	(主査) 教授 米田 俊之 (副査) 教授 高田 健治 准教授 島袋 善夫 講師 佐藤 淳

論文内容の要旨

〈目的〉

内軟骨性骨化は、凝集した未分化間葉系細胞が、前軟骨細胞、軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと分化し、石灰化を経て骨へと置換される過程である。このような軟骨細胞の分化は軟骨細胞特異的な転写因子群により制御され、分化初期には Sox9、Sox5、Sox6、分化後期には Runx2 が必須の役割を果たしていることが知られている。このうち Sox9 は様々な転写調節因子と結合し、転写ファクトリーと呼ばれる巨大なタンパク複合体を形成することにより、II型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質の発現を制御することが示されている。しかし、Sox5、Sox6 以外に Sox9 と転写ファクトリーを形成する構成因子はほとんど同定されておらず、また Sox9 による転写ファクトリー形成の詳細および軟骨細胞分化の制御機構に関しても不明である。本研究においては、Sox9 転写ファクトリーの新たな構成因子を同定し、その分子の軟骨細胞分化における役割について検討すると共に、Sox9 による軟骨細胞分化の分子制御メカニズムの解明についても検討を行った。

〈実験方法〉

1. 細胞

未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、BOSC23 細胞ならびにマウス胎児肢芽細胞は、DMEM/10%FBS 培地中で培養した。

2. アデノウイルス作製

アデノウイルスベクターに Flag 標識した Sox9 あるいは Myc 標識した検索対象遺伝子 cDNA を組み込んだ後、パッケージング細胞 293 に感染させ、同細胞内で相同組み換えにより得られたアデノウイルスを回収した。

3. Sox9 転写ファクトリー構成因子同定

軟骨細胞株 ATDC5 より完全長 cDNA 発現ライブラリーを作成し、Sox9 の標的遺伝子である II 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性を指標にスクリーニングを行った。

4. mRNA 発現解析

臓器あるいは細胞より、全 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行った。また、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によりマウス胚における mRNA の発現を検索した。

5. 細胞内局在検討

C3H10T1/2 細胞に DsRed 標識した Sox9 および Venus 標識した検索対象遺伝子発現プラスミドをトランスフェクションし、固定、DAPI による核染色後、蛍光顕微鏡下にて観察した。

6. 未分化間葉系細胞およびマウス胎児肢芽細胞の軟骨細胞分化誘導

C3H10T1/2 細胞およびマウス胎児肢芽細胞を BMP2 存在下で培養し、II 型コラーゲン、アグリカン、XI 型コラーゲンの発現およびアルシアンブルー染色を指標に評価した。

〈結果〉

1. Znf219 遺伝子の同定

スクリーニングの結果、約 50 個の陽性クローンを分離した。それらの中から、転写制御に関与する構造を有し、新規性の高い分子を探索した結果、Zinc finger domain を 9 つ有する Znf219 を同定した。

2. Znf219 の発現の検討

in vitro で Znf219 はマウスの軟骨組織、心臓・膵臓および精巣など Sox9 が重要な役割を担っている組織において高量に発現していた。さらに、*in vivo* において Znf219 はマウス胚の肢芽に高発現し、その発現部位は Sox9 および II 型コラーゲンとほぼ一致した。また、C3H10T1/2 細胞における Sox5 および Sox6 の過剰発現は Znf219 の発現を上昇させた。

3. Znf219 と Sox9 との関連

Znf219 と Sox9 は物理的に結合し、核内で Sox9 と共局在した。また、Znf219 は II 型コラーゲンプロモーター領域の CCCC 配列に結合し、そのプロモーター活性を促進した。さらに、Sox9 によりこの効果は増強された。

4. 軟骨細胞分化における Znf219 の役割

Sox9 は C3H10T1/2 細胞の軟骨細胞分化を誘導し、Znf219 は Sox9 の軟骨細胞分化誘導作用を増強した。ドミナントネガティブ Znf219 は、Sox9 誘導性の軟骨細胞分化を抑制した。C3H10T1/2 細胞およびマウス胎児肢芽細胞に BMP2 を作用させた場合、アルシアンブルー染色陽性の軟骨細胞が増加し、軟骨細胞分化の促進が見られ、ドミナントネガティブ Znf219 はこれを抑制した。また、microZnf219 によるノックダウンは、Sox9 誘導性の軟骨細胞分化を抑制した。一方、Znf219 は BMP2 により誘導される初代培養軟骨細胞およびマウス胎児肢芽細胞の石灰化には影響を及ぼさなかった。

〈結論〉

本研究において新たに同定された Znf219 は、Sox9 と転写ファクトリーを構成し、協調して軟骨特異的遺伝子の転写活性および発現を促進し、軟骨細胞分化を制御することが明らかとなった。本研究の結果は、内軟骨性骨化の制御機構の理解に貢献すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は生体の骨格形成に深く関与する内軟骨性骨形成の分子メカニズムを解明する目的で、軟骨分化において重要な役割を果たす転写因子 Sox9 と転写ファクトリーを構成する新たな転写因子の同定とその役割を検討したものである。

その結果、Sox9 と結合して転写ファクトリーを構成する新規の転写因子 Znf219 を同定し、Znf219 は Sox9 と協調して軟骨特異的遺伝子の発現を高め、軟骨細胞分化を促進することが示された。これらの知見は、生体の骨格発達制御、あるいはその異常に対する治療を考える上で有用な科学的情報を提供するものであり、博士（歯学）の授与に値すると認める。