

Title	転写因子Runx2およびIkzf1によるOdd-skipped related 1 遺伝子の発現調節機構
Author(s)	山内, 理司
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49783
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

- [32]

氏

名 山 内 理 言

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)

学 位 記 番 号 第 22854 号

学位授与年月目 平成21年3月24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 転写因子 Runx2 および lkzf1 による 0dd-skipped related 1 遺伝子の発

現調節機構

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 大嶋 隆

(副杳)

教 授 天野 敦雄 講 師 斎藤 正寛 講 師 山田 聡

論文内容の要旨

【研究目的】

Odd-skipped 遺伝子はショウジョウバエや線虫の体節形成に関与する pair-rule 遺伝子の一つであり、哺乳類におけるその相同遺伝子 Odd-skipped related (Osr)遺伝子には Osr1, Osr2 の 2 つのサブタイプが存在している. Osr2 の個体発生過程における役割として硬組織形成への関与が報告されているが、 Osr1 の果たす機能は未だ不明であり、その発現調節機構も解明されていない. そこで本研究では、 Osr1 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的とし、 Osr1 遺伝子のプロモーター解析を行った.

【試料および方法】

1. 0sr1 プロモーター領域のクローニングおよび段階的欠失プロモーターの作製. マウス 0sr1 遺伝子のプロモーター領域約 4.7kb を LATaq ポリメラーゼを用いて PCR クローニングした. さらに、制限酵素サイトを利用し、その 5'側を段階的に 欠失させたプロモーター断片を作製した. これらの断片は pGL3-basic ルシフェラーゼレポーターと結合させ、レポーターベクターを構築した.

2. プロモーター活性の測定

24 時間培養したマウス未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 にレポーターベクターをトランスフェクションし, さらに 48 時間培養した. 培養後, Dual-Luciferase reporter assay system を用いて Luciferase 活性を測定し、0sr1 プロモーター活性を評価した. さらにプロモーター領域への結合が予想される既知の転写因子を同細胞に過剰発現させ、同様に 0sr1 プロモーター活性への影響を評価した.

3. 転写因子認識配列への変異導入.

Osr1 プロモーター上の転写因子である Runx2 および Ikzf1 認識配列に QuikChange II site directed mutagenesis kit を用いて変異を加えた. 得られた 変異型プロモーターRunx2 mut および Ikzf1 mut を C3H10T1/2 細胞にトランスフェクションし, 転写因子認識配列変異の Osr1 プロモーター活性活性への影響を検討した.

4. 転写因子 Runx2 および Ikzf1 の 0sr1 プロモーターへの結合 [ChIP assay].

C3H10T1/2 細胞および マウス筋芽細胞 C2C12 細胞を 80%コンフルエントまで培養し、細胞の DNA とクロマチンをホルマリン固定した後、超音波処理にて DNA を 250bp 程度に断片化した. 断片化した DNA に対して抗 Runx2 抗体、抗 Ikzf1 抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈した Runx2 および Ikzf1 認識配列を PCR 法にて検出した.

- 5. 0sr1 プロモーター上の特異的認識配列への Runx2, Ikzf1 の結合 [EMSA]. FITC 標識した 0sr1 プロモーター上の Runx2, Ikzf1 認識配列を化学合成し, リコンビナント Runx2, リコンビナント Ikzf1, C3H10T1/2 細胞核抽出液, C2C12 細胞核抽出液とそれぞれ反応させた後, 電気泳動を行いバンドシフトを検出した.
- 6. 骨分化期における 0sr1 遺伝子の発現解析.

C3H10T1/2 細胞およびマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を骨形成因子 BMP (500 ng/ml) を含む培地中で3日あるいは7日間培養した後,培養細胞の全 RNA を抽出し RT-PCR により Osr1 遺伝子および骨分化マーカーの発現評価を行った.

【結果】

- 1. マウス 0sr1 遺伝子プロモーター領域には GATA1, CP-2, Ikzf1, Nkx-2.5, Runx1 および Runx2, Sry, C/EBP などの認識配列の存在が認められた.
- 2. 5' 側段階的欠失プロモーターを用いたレポーターアッセイにより, 0sr1 遺伝子プロモーター領域には正の制御領域 (-741~-144bp) および負の制御領域 (-1651~-742bp) の存在が認められた.
- 3. 種々の転写因子 (Runx2, Ikzf1, CP-2, Nkx2.5, CdxA, Oct-1) を過剰発現させた ところ, Runx2 および Ikzf1 が Osr1 プロモーター活性を抑制することが示された.
- 4. 0sr1 プロモーター上の Runx2 または Ikzf1 認識配列に変異を導入した変異型プロモーターでは、Runx2 および Ikzf1 の過剰発現によるプロモーター活性の抑制は認められなかった。
- 5. ChIP assay において Runx2 および Ikzf1 は 0sr1 プロモーター上のそれぞれの認識 配列付近との結合が検出された.
- 6. EMSA においてリコンビナント Runx2, および Ikzf1, さらに核抽出液のいずれに おいてもバンドシフトが検出され, Osr1 プロモーター上の Runx2, Ikzf1 認識配列 への結合が確認された.

7. BMP の添加による骨分化誘導実験において添加後3日の時点でBMP 添加群では無添加群と比較して0sr1 遺伝子の発現が抑制されていた.

【考察】

以上の結果から、Runx2 および Ikzf1 が 0sr1 遺伝子プロモーター領域に結合し、0sr1 遺伝子の発現を抑制している可能性が示された. また、BMP 添加による骨分化誘導実験の結果から、0sr1遺伝子が骨分化初期に抑制的な機能を有していることが示唆された.

論文審査の結果の要旨

本研究は、ショウジョウバエの体節発生に関与する Odd-skipped 遺伝子の哺乳類におけるホモログであるマウス Osr1遺伝子に焦点をあて、その発現調節機構および骨芽細胞分化過程における役割を解析したものである。その結果、骨芽細胞の分化に必須な転写因子である Runx2 およびリンパ球の分化に重要な転写因子である Ikzf1 によって、Osr1遺伝子プロモーター活性が制御されることが示された。さらに、Osr1遺伝子の骨芽細胞の分化への関与も示唆された。これらの知見は骨組織の発生・分化メカニズムを明らかにする上で貴重な示唆を与えるものであり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認める.