

## 論文審査の結果の要旨

氏名：鈴木 正 敏

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates Twist1 through an E-box element（塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス（bHLH）転写因子 DEC2 は E-box 配列を介して抑制的に Twist1 を調整する）

審査委員：（主査）教授 小方 頼昌  
（副査）教授 渋谷 鑛  
教授 吉垣 純子

塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子である Differentiated embryo chondrocyte 2 (DEC2) は、細胞分化や概日リズム調節に関与する時計遺伝子であると同時に、低酸素応答、細胞周期、細胞増殖、アポトーシスおよび癌化にも関与している。そして、E-box 配列への結合によって標的遺伝子の転写を調節することが明らかになっている。また、bHLH 転写因子の間葉系マーカーである TWIST1 は、上皮間葉転換において重要な役割を果たすと同時に、間葉系細胞の分化抑制に関わることや筋形成および骨形成を含むいくつかの分化系統に関係している。

現在、DNA 結合および bHLH 調節機構内における DEC2 と Twist1 の転写特性は特徴づけられておらず、それらの生物学的な標的は定義されていない。

今回、Twist1 のプロモーター領域で DEC2 応答配列のコンセンサス E-box : CACGTG を同定し、この配列が低酸素応答配列 (HRE) : ACGTG と重複しているのを確認できた。また、ルシフェラーゼ・リポーター・アッセイにより、DEC2 の強制発現は正常酸素条件下および低酸素条件下で有意に Twist1 プロモーター活性を抑制したことを確認し、部位特異的変異誘発研究の突然変異生成コンセンサス E-box 配列では Twist1 プロモーター転写活性を低下させる DEC2 の作用の減少が認められた。

さらに、定量リアルタイム PCR によって DEC2 の過剰発現が Twist1 mRNA 発現を抑制し、siRNA による DEC2 のノックダウンでは、有意に Twist1 mRNA 発現量が増加し、低酸素条件下でより強い増加を認めた。クロマチン免疫沈降分析により、DEC2 を介する抑制が、Twist1 プロモーター領域での E-box 結合によって主に達成されることが認められた。

免疫染色ではマウス舌胎仔組織の発達の過程で、DEC2 と Twist1 は逆のタンパク発現パターンを示すことが認められた。

本研究では、細胞分化を含む生体内における様々な生理現象において、DEC2 が Twist1 の発現を調節することを明らかにした。DEC2 は、細胞機能を調節するメカニズムの重要な因子であると考えられる。

本研究で示された低酸素条件下での知見は、脳および心血管神経系の虚血状態における遺伝子レベル解析の一端を示したものである。今後、虚血後の神経細胞障害や神経再生への遺伝子治療の有効性を期待させるものであり、麻酔学分野に寄与するところが大きく考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成27年1月22日