

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	㊦ 乙 第 号	論文提出者名	柴田 章夫
論文審査 委員氏名	主査 下郷 和雄 副査 吉村 文信 金森 孝雄		
論文題名	ヒト先天性永久歯欠損症に関連する MSX1 の 核局在についての分子生物学的解析		

インターネットの利用による公表用

脊椎動物における胚発生期の形態形成は、多くの遺伝子により時間的、空間的に制御され、体幹骨の頭尾方向に沿う繰り返し構造は、ホメオボックス遺伝子の *HOX* 遺伝子群により決定する。顎顔面領域も同様に、歯胚の発生制御にホメオボックス遺伝子が関与している。近年、永久歯欠損と遺伝子変異の関連が報告されていることから、永久歯欠損の分子生物学的機序の解明が、歯胚発生、形態形成の制御機序の解明に寄与するものと考えられる。

先天性永久歯欠損症は、先天性に永久歯欠損を認める疾患で、責任遺伝子の一つとしてホメオボックス遺伝子の muscle segment homeobox 1 (*MSX1*) が報告されている。*MSX1* は歯胚形成初期に発現する転写因子で、ホメオドメイン (Homeodomain: HD) という機能領域が、歯胚形成に関わるとされる。*MSX1* をはじめとした転写因子は、核内で活性を示すため、核に移行することが本質的に必須である。本症で報告された HD の欠失する変異で、*MSX1* が核に移行しなくなることから、HD 内に核に移行するために重要な領域、核局在化シグナル (NLS) が存在し、核局在化障害が本症の発症に関わると考えられるが、その詳細は明らかでない。そこで申請者は、*MSX1* の NLS を明らかにし、*MSX1* 遺伝子変異による永久歯欠損症の発症と核局在化障害の関連を検討している。

まず、*MSX1* の NLS を検討するため、野生型、変異型 *MSX1* 発現ベクターを作製し、細胞内で一過性にタンパクを発現させた後、免疫染色にて細胞

内分布を観察している。MSX1 の NLS 候補領域を、予測ソフトを用い決定し、HD 内に挙げた二つの候補領域を、それぞれ N' 側を NLS1、C' 側を NLS2 とした。それぞれの NLS 候補領域を欠失させた検討では、NLS1 欠失変異体は細胞質に優位に分布し、NLS2 欠失変異体では核と細胞質に同等に分布した。この結果から、両者の NLS が MSX1 の核局在化に必要であり、NLS1 が優位に機能していることが明らかになった。また、それぞれの NLS が単独では十分に核へ移行しないことから、NLS1、NLS2 を結合させたペプチドと細胞質タンパクとの融合体を作製し、細胞内分布を検討したところ、核に優位に分布した。この結果は、本来核に移行しないタンパクを、核へ移行させていることから、NLS1、NLS2 が核局在化シグナルとして機能していることを示すものである。また、*MSX1* と他のホメオボックス遺伝子で、NLS の塩基性アミノ酸をコードする配列が他部位より高度に保存されていることから、この領域が HD の機能に重要であるとしている。

次に、申請者は永久歯欠損症の発症と核局在化障害の関連を検討した。対象は、先行研究でこれまでに報告されたヒト非症候群性先天性永久歯欠損症の *MSX1* 遺伝子変異のうち、翻訳領域に存在する 15 種の変異である。結果は、Missense 変異 11 種すべてのタンパクが核に分布し、NLS1 内の変異 R170W、NLS2 内の変異 R217L でも核局在化に影響を認めなかった。また、Nonsense 変異、Frame shift 変異では、HD を完全に失う W139X、G22RfsX168 のシグナルが、細胞質に優位に分布したのに対し、HD の C' 側のみを欠失

した Q187X のシグナルは、核と細胞質に同等に分布した。Missense 変異は NLS 内の塩基性アミノ酸の変異でも核局在化障害を認めないことから、アミノ酸置換の影響を受け難い構造であることが示唆される。また、HD を完全に失う W139X、G22RfsX168 では NLS1、NLS2 を欠失するため、核局在化が障害され、Q187X は NLS2 のみを欠失するため、障害が軽度であることが説明でき、先天性永久歯欠損症の発症と核局在化障害が、関連づけられるとしている。本論文で、MSX1 の HD 内にある二つの NLS が核局在化に重要な領域であることを同定し、ヒト先天性永久歯欠損症の *MSX1* 遺伝子変異と核局在化障害の詳細な関連を明らかにしている。今後は、MSX1 の核局在化障害が引き起こす他の関連遺伝子への影響についての検討が、発症機序の全容解明に必要である。

本論文において、ヒト先天性永久歯欠損症に関連する MSX1 の核局在化シグナルを同定し、本症の *MSX1* 遺伝子変異と核局在化障害の関連を明らかにしたことは、本症の病態解明および正常な歯胚形成に関与する分子作用機序の解明に極めて重要なものであり、口腔外科学のみならず口腔微生物学、口腔生化学ならびに関連諸学科に寄与するところが大きいと考え、博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。