

論文内容の要旨及び審査結果の要旨

受付番号 医博甲第 2476 号
論文審査担当者

氏名 浦西 洗介
主査 河崎 洋志
副査 平尾 敦
村松 正道



学位請求論文

題名 Dax1 Associates with Esrrb and Regulates Its Function in Embryonic Stem Cells.

(Dax1 は胚性幹細胞において Esrrb と結合し、その機能を制御している)

掲載雑誌名 Molecular and Cellular Biology, 2013 年 第 33 巻 2056-2066 頁

マウス胚性幹(ES)細胞は自己複製能と多分化能という二つの特徴を有しており、これらは Oct3/4 を中心とする転写因子ネットワークによって制御されている。核内受容体 Dax1 もそのネットワークに属する重要な一因子であり、2009 年には Oct3/4 と直接相互作用し、Oct3/4 の活性を適切に保つ機能や、Dax1 の適切な活性の維持は ES 細胞の自己複製において必須であることが報告されている。本研究は、Dax1 と相互作用する新規因子の探索と相互作用機序の解明を目的として行われた。

Dax1 と相互作用する因子を Yeast Two Hybrid 法によって探索したところ、核内受容体 Esrrb が得られた。ES 細胞における Esrrb の発現パターンを確認したところ、Dax1 と同様に LIF 除去による分化誘導や Oct3/4 のノックアウトによって発現量が減少した。次に Dax1 と Esrrb の結合領域を調べるために Dax1 と Esrrb の部位欠損変異体を作成し、MBP pull-down assay を行ったところ、Dax1 は Esrrb の AF-1 領域(1-92 アミノ酸)及び AF-2 領域(212-433 アミノ酸)に結合していること、Esrrb は Dax1 の LXXLL モチーフに結合することが明らかとなった。また、Dax1 と Esrrb は Oct3/4 と相互作用するタンパク質として知られているため、これらの因子が三量体を形成するかを Pull-down assay で検討したところ、Dax1 は Oct3/4 と Esrrb の発現量によって結合する相手を変えている可能性が示唆された。

また、Esrrb は転写因子として知られているため、Esrrb による Dax1 遺伝子の発現制御の有無を検証した。Dax1 遺伝子のプロモーター領域を探索したところ、Esrrb 結合配列(ERRE)と思われる配列が 2 箇所(ERRE1, ERRE2) 存在していた。そこで、ERRE を含むプロモーター領域を用いて Luciferase assay を行ったところ、ES 細胞において Dax1 プロモーター活性は Esrrb の過剰発現によって上昇し、発現抑制によって低下した。また、Esrrb による Dax1 プロモーターの活性化は Dax1 自身によって抑制されることも明らかになった。次に、Esrrb がどちらの ERRE に作用しているかを調べるために、ERRE に変異をいれた Dax1 プロモーターを用いて検証したところ、ERRE1 に変異を持つプロモーターでのみ活性が低下した。また、Esrrb の DNA 結合能を検証するために、ビオチン化 DNA Pull-down assay と ChIP assay を行ったところ、in vitro, in vivo の両方で Esrrb が Dax1 プロモーターの ERRE1 に結合することが確認された。次に Dax1 と Esrrb の結合の生理的意義を検証するために、Dax1 と Esrrb の結合の阻害を行い、それによって起こる遺伝子発現の変化を QRT-PCR で確認した。Esrrb 過剰発現 ES 細胞において変異型 Dax1 の発現や Dax1 ノックダウンを行うことにより、Dax1 と Esrrb の結合を阻害した結果、双方で Gata6 や Dab2 といった内胚葉系マーカー遺伝子の有意な上昇が見られた。

以上、本論文では ES 細胞内において Dax1 と Esrrb は negative-feedback loop を形成し、Esrrb の活性を一定に保つことによって内胚葉系への分化を抑制し、ES 細胞の自己複製維持に寄与している可能性を報告しており、学位に値すると評価された。