

# Esrrb binds to Dax1 and corporately regulates self-renewal of mouse ES cells by modulating Oct3/4 activity

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/30259">http://hdl.handle.net/2297/30259</a>

## 【要約】

## 修士課程優秀論文

## マウスES細胞の自己複製維持におけるDax1とEsrrbの相互作用

## Esrrb binds to Dax1 and corporately regulates self-renewal of mouse ES cells by modulating Oct3/4 activity

金沢大学大学院医学系研究科再生分子医学  
(分子病態医学)

浦 西 洸 介

## はじめに

胚性幹細胞 (ES細胞) は哺乳類の発生初期における胚盤胞の内部細胞塊から得られた細胞株であり、体細胞を構成する全ての細胞に分化できる多分化能と、未分化状態を維持したまま増殖する自己複製能を併せ持つ。ES細胞は、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの作製に利用され、様々な遺伝子の個体発生における役割の解明に寄与してきた。その後、ヒトのES細胞が樹立され、失われた臓器や組織などの再生を行う再生医療への大きな期待が抱かれている中、ES細胞を未分化状態のまま大量に培養し、形質を維持したまま増殖させる技術は必須である。そのためにES細胞の自己複製維持機構の研究が重要であると考えられる。

マウスES細胞は培地中にサイトカインLIF (leukemia inhibitory factor: 白血病阻害因子) を加えることによって自己複製が維持でき、LIFシグナルの下流で機能するSTAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), Oct3/4, Sox2などの転写因子が大きな役割を果たしている。以前、当研究室では、STAT3ER融合タンパク質発現ES細胞を樹立した。この細胞は、培地中に4HT (4-ヒドロキシタモキシフェン) を添加することによって誘導的にSTAT3を活性化できるES細胞で、LIF非存在下でも自己複製が可能であり、STAT3の活性は自己複製に必要かつ充分であることを報告している<sup>1)</sup>。一方、Oct3/4の過剰発現のみではES細胞の自己複製は維持されず分化してしまう<sup>2)</sup>。そのため、当研究室ではOct3/4と相互作用し、Oct3/4の転写活性を制御する因子を探索したところ、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子Dax1を得た。Dax1は、個体発生時には性決定や副腎の形成に重要な役割を担っており、マウスES細胞においては未分化状態特異的に発現している因子である。Dax1はES細胞の未分化状態維持に必須であり、その遺伝子発現はSTAT3とOct3/4によって直接制御されている<sup>3)</sup>。Dax1はOct3/4に直接結合し、その転写活性化能を抑制するリプレッサーとして働くことによって、ES細胞の自己複製維持に貢献している。しかしながら、Dax1単独では自己複製を維持することができず、Dax1を過剰発現させるとES細胞は分化してしまう<sup>4)</sup>。そこで本研究では、Dax1と相互作用する因子の探索を遂行し、Dax1とそのパートナー分子を介した自己複製制御機構の解明を目指した。

## 結 果

## Dax1と相互作用を持つ因子の探索

タンパク質間の結合に重要であるDax1のLXXLL領域発

現プラスミドと未分化なマウスES細胞由来のcDNAライブラリーをAH109酵母株に導入し、QDO-SD[Ade, His, Leu, Trp除去]培地とX- $\alpha$ -ガラクトシダーゼによって選択して得られたコロニーからプラスミドを回収し、シーケンズを行った。その結果、Dax1と相互作用を持つ因子として4種類の転写因子 (Esrrb, Rxrb, LRH-1, Nanog) を含む複数の遺伝子が同定された。その中でもEsrrbが高頻度で得られたことから、Esrrbに着目し更なる解析を進めた。Dax1とEsrrbの結合部位の決定とOct3/4-Dax1複合体形成への影響

EsrrbとDax1が哺乳動物の細胞内でどの領域を介して結合しているかを決定するために、Dax1とEsrrbの部位欠損変異体とMBP (マルトース結合タンパク質) との融合タンパク質を作成してHEK293細胞に導入し、プルダウンアッセイにより検証した。ウェスタンブロット法によりシグナルを検出した結果、Dax1とEsrrbは哺乳動物細胞内でも直接結合していることが確認され、Dax1はEsrrbのN末端側の転写活性化領域とC末端側のリガンド結合領域に、EsrrbはDax1のLXXLL結合領域に結合していることが確認された。Dax1はOct3/4とLXXLL領域を介して複合体を形成することが確認されている (図1)。そのため、Oct3/4-Dax1複合体形成に対するEsrrbの作用

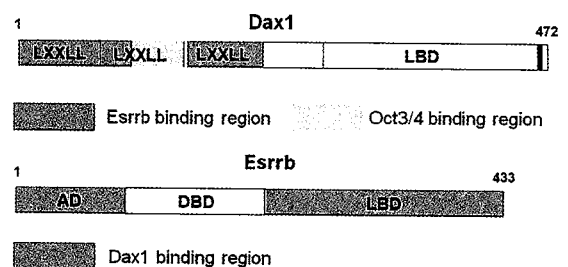


図1. Dax1のEsrrb結合部位はOct3/4結合部位と重なっている

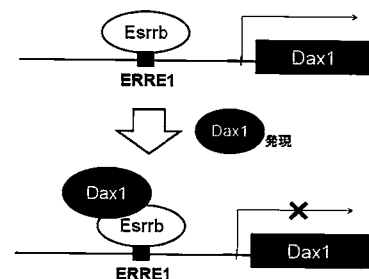


図2. EsrrbによるDax1の発現制御

を検証したところ、Esrrbが発現していない場合ではOct3/4とDax1は直接結合していることが確認されたが、Esrrbの発現量が増えるにつれてDax1はOct3/4から解離し、Esrrbと強く結合する傾向が得られた。

#### EsrrbによるDax1遺伝子の発現制御

Dax1遺伝子上のプロモーター領域にはEsrrb結合配列が2か所 (ERRE1, ERRE2) 存在する。そこで、HEK293細胞とESA3細胞にDax1のプロモーター領域をもつレポーターベクター及び、Esrrb発現ベクター、またはノックダウンベクターを導入して2日間培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ルシフェラーゼ活性はEsrrbの過剰発現では上昇し、ノックダウンによって低下した。また、この結合配列に変異を入れたプロモーター領域を用いてアッセイを行ったところ、ERRE1に変異が入っている場合にのみルシフェラーゼ活性が低下した。そのため、EsrrbはERRE1領域に作用し、Dax1のプロモーター活性を制御していると考えられる。また、EsrrbによるDax1プロモーターに対する転写活性化能はDax1の発現により抑制されることが確認されたことから、EsrrbによるDax1プロモーターの活性化を自らDax1が抑制している可能性が示唆された(図2)。

#### Esrrb発現による内在性のDax1遺伝子の発現変化

Esrrb発現プラスミドをESA3細胞に導入してpuromycinによって薬剤耐性コロニーを選択し、Esrrb過剰発現ES細胞を樹立した。LIF除去によって分化誘導を行ったところ、Dax1の発現量がコントロールの細胞に比べ維持されていることが明らかになった。また、ZHBTC4ES細胞を用いて同様の検証をした。ZHBTC4ES細胞とは、テトラサイクリン (Tet) 誘導型のOct3/4欠損ES細胞株で、この細胞にTetを加えるとOct3/4の発現を人為的に停止することができる。Esrrb過剰発現ZHBTC4 ES細胞を樹立し、Tet添加してOct3/4の発現量を低下させたところ、Dax1の発現量がコントロールの細胞に比べ強く維持され

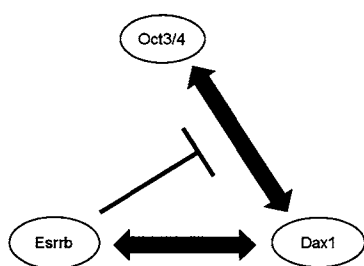


図3. Oct3/4, Dax1, Esrrbの相互作用モデル

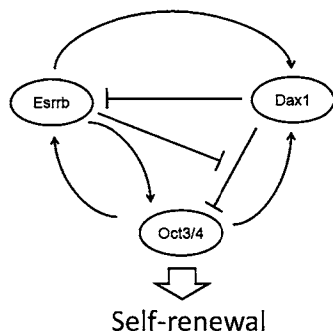


図4. 未分化なES細胞内におけるOct3/4, Dax1, Esrrbのネットワーク

ていることを見出した。加えてESA3細胞にEsrrbのRNAiを導入し、内在性Esrrbの発現を抑制したところ、Dax1の発現量の低下が見られた。これらの結果から、Dax1の発現をEsrrbが正に制御していることが示唆された。

#### 考 察

マウスES細胞において、Dax1とEsrrbは未分化状態特異的に発現している。Esrrbの過剰発現によりLIF除去による分化の遅延が認められたことから、Esrrbの転写活性化能がES細胞の自己複製に貢献していると考えられる。また、EsrrbはOct3/4やNanogといったES細胞の自己複製に関与している遺伝子の発現を促進することが知られており<sup>9)</sup>、さらにEsrrbとOct3/4は相互作用し未分化特異的遺伝子の発現を促進している。一方で、Oct3/4の過剰な活性はES細胞の分化を誘導することから、Dax1がEsrrbの転写活性化能を抑制することでOct3/4の活性を制御していると考えられる。Esrrbの発現によって、LIF非存在下でのCdx2, brachyury Tといった分化マーカーの抑制が見られた。この抑制はEsrrbによって、その発現量がある程度維持されているDax1によるものである可能性が示唆される。Dax1を介した分化の抑制としてDax1がプロモーター領域などに結合し、直接的に制御することや、他の因子をDax1が集積させることによってヒストンやクロマチンの制御を行わせるという間接的な抑制が存在することが推測される。実際にDax1がbrachyury T遺伝子のプロモーター領域に結合していることや、PRC複合体の構成因子とDax1が直接結合できることが明らかとなっている。そのため、今後はDax1によるChIP-seqを行い、Dax1の標的配列を決定し、直接の標的を明らかにすることや、酵母ツーハイブリッドで得られた他の因子との相互作用がどのような機序を以て自己複製維持に貢献しているかを検討する必要がある。

#### 結 語

未分化なマウスES細胞において、Dax1と相互作用する因子としてEsrrbを同定し、EsrrbがOct3/4に直接制御されていること、Dax1とEsrrbがそれぞれLXXLLモチーフと転写活性化領域、リガンド結合領域で相互作用していること、EsrrbはOct3/4とDax1のLXXLL領域を介した複合体形成を競合的に阻害すること(図3)、EsrrbがDax1のプロモーター領域に作用することによって発現を促進していること、そのEsrrbの転写活性化能をDax1が抑制していることを見出した。以上のことから、Dax1とEsrrbは相互作用することにより、適切なOct3/4の活性化状態を維持し、ES細胞の自己複製維持に貢献していると考えられる(図4)。

#### 参 考 文 献

- 1) Matsuda et al. EMBO J. 1999 18(15): 4261-9
- 2) Niwa H et al. Nat Gene. 2000 24: 372-6
- 3) Sun et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008 372: 91-6
- 4) Sun et al. Mol Cell Biol. 2009 16: 4574-83
- 5) van den Berg et al. Mol Cell Biol. 2008 19: 5986-95

#### Profile

2009年3月 香川大学農学部生命機能科学科卒業  
 2011年3月 金沢大学大学院医学系研究科修士課程 修了  
 同年4月～ 金沢大学大学院医学系研究科博士課程 在学中

