



The C-terminal region of Xpc is dispensable for the transcriptional activity of Oct3/4 in mouse embryonic stem cells

Ito, Shunsuke

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6191号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006191>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

The C-terminal region of *Xpc* is dispensable for the transcriptional activity of *Oct3/4* in mouse embryonic stem cells

Xpc の C 末端領域はマウス胚性幹細胞における *Oct3/4* 転写活性に不必要である

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
発生・再生医学
(指導教員：丹羽 仁史 客員教授)
伊藤 俊介

組織特異的転写因子は、塩基配列依存的にゲノムの特定部位に結合し、標的遺伝子の発現を制御している。転写活性化は、転写因子とその転写共役因子(コアクチベーター)との相互作用による転写装置のプロモーターへの呼び込みと、それに次ぐ RNA ポリメラーゼ II(PolII)による転写開始によって行われる。メディエーターコンプレックスは、転写因子とその標的配列、転写装置との結合を補助する転写コアオペレーターである。近年の研究によって、このメディエーターが様々な転写因子と複合体を構成する事によって、スーパーエンハンサーとして機能し、大規模な遺伝子発現制御を担っている事が明らかにされてきた。このような機構は、後生的修飾(エピジェネティック修飾)と共に、組織特異的遺伝子発現を担っていると考えられる。

マウス胚性幹細胞(ES 細胞)では、多能性特異的な遺伝子発現が多く見受けられる。その中でも多能性維持の主体として機能するのが、POU ファミリー転写因子である *Oct3/4(Pou5f1)* であり、多くの多能性関連転写因子の制御を行っている。故に *Oct3/4* の欠損によって細胞は自己複製能と多能性を消失する。*Oct3/4* は、Sry-related HMG box 転写因子である *Sox2* とヘテロダイマーを形成して、標的遺伝子の特異的配列に結合することで、様々な遺伝子の転写制御を行っている。メディエーターは polII をプロモーターに呼び込む事によって *Oct3/4-Sox2* 複合体の遠位のゲノム領域への結合を橋渡しする。このメディエーターの構成因子のノックダウンによって、*Oct3/4* 依存の遺伝子発現の低下がもたらされる事は、メディエーターが *Oct3/4* による遺伝子発現制御に必須である事を示唆している。

Xpc は *Oct3/4* のコアクチベーターとして機能する事が報告されている。*Xpc* 複合体(*Xpc, Rad23B, Cctn2*)はヌクレオチド除去修復を担っている構造体である。マウス ES 細胞においては、*Xpc* 複合体は直接的に *Oct3/4* と結合し、*Nanog* に代表される標的遺伝子の発現を制御している事がその報告によって示された。また ES 細胞において、*Xpc, Rad23b, Cctn2* のノックダウンにより *Oct3/4* 標的遺伝子の発現低下が起こり、自己複製能が損なわれる事が示唆された。しかし、一方では、他報によって *Xpc* ノックアウトマウスが長期生存可能である事、*Xpc* 欠損胚において ES 細胞が樹立可能である事が報告されている。これらの報告は、相反するものであり、未だ議論の余地を残していると言える。

まれに shRNA や siRNA による特定の遺伝子ノックダウンと、相同組み替えを通したゲンターゲティングによるノックアウト(KO)による効果が異なる事がある。例えば、*Rex1(Zfp42)* のノックダウン(KD)は ES 細胞の分化を引き起こすが、*Rex1-null* ES 細胞はキメラ寄与能を持ち、自己複製能を維持したまま正常に増殖可能である事を、我々は過去に報告している。このような KD と KO の効果の違いは、KD によるオフターゲット(標的非特異性)が一つの原因として考えられる。KD の場合、標的遺伝子の発現は速やかに減少するが、KO の場合、胚を樹立する為に長い期間を必要とする為、特定遺伝子の消失に対して、その状態に適応しやすいのではないかとと思われる。同様な現象は、我々の *Rex1-KO* 実験での、*in vitro* の持続的なゲンターゲティングにおいても観測できた。

KO と KD の間におけるこのような表現型の不一致をさける実験系としては、KD の様な速やかな遺伝子発現消失、KO と同様な標的特異性を併せ持つ ES 細胞を使った条件的 KO が最適である。故

に、我々は本研究で ES 細胞における *Xpc* の正確な役割を特定する為に、ES 細胞での条件的 KO を用いた。その結果、*Xpc* は *Oct3/4* による標的遺伝子活性化、および多能性の維持に不必要である事を明らかにした。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2439 号	氏 名	伊藤 俊介
論文題目 Title of Dissertation	<p>The C-terminal region of Xpc is dispensable for the transcriptional activity of Oct3/4 in mouse embryonic stem cells</p> <p>Xpc の C 末端領域はマウス胚性幹細胞における Oct3/4 転写活性に不必要である</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 南 康博 Chief Examiner</p> <p>副 査 匂坂 敏朗 Vice-examiner</p> <p>副 査 橋本 秀樹 Vice-examiner</p>		

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

組織特異的転写因子は、塩基配列依存的にゲノムの特定部位に結合し、標的遺伝子の発現を制御している。転写活性化は、転写因子とその転写共役因子(コアクチベーター)との相互作用による転写装置のプロモーターへの呼び込みと、それに次ぐ RNA ポリメラーゼ II (PolII) による転写開始によって行われる。メディエーターコンプレックスは、転写因子とその標的配列、転写装置との結合を補助する転写コアクチベーターである。近年の研究によって、このメディエーターが様々な転写因子と複合体を構成する事によって、スーパーエンハンサーとして機能し、大規模な遺伝子発現制御を担っている事が明らかにされてきた。このような機構は、エピジェネティック修飾と共に、組織特異的遺伝子発現を担っていると考えられる。

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) では、多能性特異的な遺伝子発現が多く見受けられる。その中でも多能性維持の主体として機能するのが、POU ファミリー転写因子である *Oct3/4* (*Pou5f1*) であり、多くの多能性関連転写因子の制御を行っている。故に *Oct3/4* の欠損によって細胞は自己複製能と多能性を消失する。*Oct3/4* は、Sry-related HMG box 転写因子である *Sox2* とヘテロダイマーを形成して、標的遺伝子の特異的配列に結合することで、様々な遺伝子の転写制御を行っている。メディエーターは polII をプロモーターにリクルートし *Oct3/4-Sox2* 複合体の遠位のゲノム領域への結合を橋渡しする。このメディエーターの構成因子のノックダウンによって、*Oct3/4* 依存的遺伝子発現の低下がもたらされる事は、メディエーターが *Oct3/4* による遺伝子発現制御に必須である事を示唆している。

Xpc は *Oct3/4* のコアクチベーターとして機能する事が報告されている。*Xpc* 複合体 (*Xpc, Rad23B, Ctn2*) はヌクレオチド除去修復を担っている構造体である。マウス ES 細胞においては、*Xpc* 複合体は直接的に *Oct3/4* と結合し、*Nanog* に代表される標的遺伝子の発現を制御している事がその報告によって示された。また ES 細胞において、*Xpc, Rad23bCtn2* のノックダウンにより *Oct3/4* 票的遺伝子の発現低下が起こり、自己複製能が損なわれる事が示唆された。しかし、一方では、他報によって *Xpc* ノックアウトマウスが長期生存可能である事、*Xpc* 欠損胚において ES 細胞が樹立可能である事が報告されている。これらの報告は、相反するものであり、未だ議論の余地を残していると言える。

まれに shRNA や siRNA による特定の遺伝子ノックダウンと、相同組換えを通したジーンターゲットによるノックアウト (KO) による効果が異なる事がある。例えば、*Rex1* (*Zfp42*) のノックダウン (KD) は ES 細胞の分化を引き起こすが、*Rex1*-null ES 細胞はキメラ寄与能を持ち、自己複製能を維持したまま正常に増殖可能であることを、申請者の所属研究室より報告している。このような KD と KO の効果の違いは、KD によるオフターゲット (標的非特異性) が一つの原因として考えられる。KD の場合、標的遺伝子の発現は速やかに減少するが、KO の場合、胚を樹立する為に長い期間を必要とする為、特定遺伝子の消失に対して、その状態に適応しやすいのではないかと考えられる。同様な現象は、

Rex1-KO 実験での *in vitro* の持続的なジーンターゲットイングにおいても観測できた。

KO と KD の間におけるこのような表現型の不一致をさける実験系としては、KD の様な速やかな遺伝発現消失、KO と同様な標的的特異性を併せ持つ ES 細胞を使った条件的 KO が最適である。そこで、申請者は本研究において、ES 細胞における *Xpc* の正確な役割を特定する目的で、ES 細胞での条件的 KO を用いた。その結果、*Xpc* は Oct3/4 による標的遺伝子活性化、および多能性の維持に不必要であることを明らかにした。

本研究は ES 細胞における Oct3/4 による標的遺伝子の転写活性化における *Xpc* の役割について、ES 細胞での誘導型条件的 KO を用いて研究したものであるが、*Xpc*、特にその C 末端領域が DNA 修復に必要なものの、Oct3/4 による標的遺伝子活性化、及び多能性維持に不必要であることをはじめて明らかにしたもので、価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。