

氏 名 水 崎 博 文

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第694号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 *Dax-1* Gene Transcription is Regulated by Wnt4 in the Female Developing Gonad

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 長濱 嘉孝
教授 上野 直人
教授 高田 慎治
教授 諸橋 憲一郎

論文内容の要旨

Dax-1 (NR0B1) is an orphan nuclear receptor acting as a suppressor of Ad4BP/SF-1 (NR5A1), and as an anti-Sry factor in the process of gonadal sex differentiation. The roles of these nuclear receptors in the differentiation of the gonads and the adrenal cortex have been established through studies of the mutant phenotype in both mice and humans. However, the mechanisms underlying transcriptional regulation of these genes remain largely unknown. Here, Mr. Mizusaki examined the relationship between *Dax-1* gene transcription and the Wnt4 pathway. Reporter gene analysis revealed that *Dax-1* gene transcription was activated by β -catenin, a key signal-transducing protein in the Wnt pathway, acting in synergy with Ad4BP/SF-1. Interaction between β -catenin and Ad4BP/SF-1 was observed using yeast two-hybrid and *in vitro* pull-down assays. The region of Ad4BP/SF-1 essential for this interaction consists of an acidic amino acid cluster, which resides in the first helix of the ligand binding domain. Mutation of the amino acid cluster impaired transcriptional activation of *Dax-1* as well as interaction of Ad4BP/SF-1 with β -catenin. These results were supported by *in vivo* observations using *Wnt4* gene disrupted mice, where *Dax-1* gene expression was decreased significantly in sexually differentiating female gonads. Mr. Mizusaki thus concludes that Wnt4 signaling mediates the increased expression of *Dax-1* as the ovary becomes sexually differentiated.

論文の審査結果の要旨

哺乳類における性はXとY染色体の組み合わせで決定されるが、これを受けて生殖腺の性分化が進むことが知られている。雄への性決定がY染色体上のSryの発現によって開始することが明らかにされてきたが、一方雌の決定に関する分子メカニズムは不明であった。

これまでにX連鎖性副腎皮質機能低下症の原因遺伝子として単離されたDax-1は、抑制型転写因子として知られており、その遺伝子の転写活性化は性腺と副腎の分化に必須な転写因子Ad4BP/SF-1による正の制御を受けていることが明らかになっていた。一方、Wnt-4遺伝子破壊マウスの胎仔卵巣において、野生型では発現が抑制されている 3β -HSDやCyp17の発現が上昇することが報告された。一般に、Wntシグナルは標的遺伝子の転写を活性化することから、本論文出願者は、野生型の胎仔卵巣ではWnt-4シグナルは抑制型転写因子であるDax-1の発現上昇を通じ、 3β -HSDやCyp17の発現を抑制しているのではないかと考えた。

培養細胞を用いた転写アッセイにおいて、Ad4BP/SF-1によって活性化されたDax-1遺伝子の転写活性は、Wntのシグナル伝達因子である β -カテニンの添加により相乗的に増加するという結果を得た。また、yeast two-hybrid screeningによってAd4BP/SF-1の相互作用因子として β -カテニンが同定され、両者が転写複合体を形成していることが示唆された。相互作用部位を詳細に検討した結果Ad4BP/SF-1のリガンド結合領域に存在するヘリックス1の酸性アミノ酸クラスターが β -カテニンとの相互作用に重要であることが明らかになった。これらのin vitroの結果は、Dax-1遺伝子がAd4BP/SF-1に依存するWnt-4シグナルの標的遺伝子であることを強く示唆するものであった。更に、in vivoでもこのような制御が働いていることを確認するためにWnt4遺伝子破壊マウスの胎仔生殖腺におけるDax-1の発現を検討したところ、雌胎仔生殖腺においてDax-1の著しい発現低下を認めた。以上の結果から雌胎仔生殖腺におけるDax-1遺伝子の転写がWnt4シグナルの制御を受けているものと結論された。

本論文はマウス生殖腺の性分化メカニズムを遺伝子レベルで解析したものである。特に雌生殖腺の分化に関与していることが知られていたDax-1とWnt4遺伝子の関係を明らかにすることを通じ、これまであまり議論されることがなかった雌生殖腺の分化メカニズムの一端を解き明かしたものであった。

本論文出願者、水崎博文に出願論文内容を口頭で30分説明させた。研究内容は良くまとまっており、口頭発表も研究内容の説明を的確に行なうものであった。その後、論文内容に関し30分の質疑を行なった。質疑は本研究分野の基礎的知識を問うものから、極めて専門的な知識を問うものまで様々であったが、いずれの質問に対しても的確な応答がなされた。また、本論文は国際誌に印刷中であり、英語に関する能力も備わっていると判断された。以上の結果から、本論文は学位取得に相応しいと判断する。