

腺、副腎、下垂体などの発生・分化と機能維持に重要な Ad4BP/SF-1 の機能を抑制することが知られている。Dax-1 の発現が SF-1 と類似していることや AHC 患者が示す表現型と SF-1 欠損マウスのそれがよく似ていることなどより、これらの受容体は協調して作用すると考えられている。Ad4BP/SF-1 は核蛋白として NLS の存在が報告されているが、Dax-1 には NLS らしい塩基性アミノ酸のクラスターはみられない。

B. 方法

マウス胎児の下垂体における Dax-1 の発現様式を Ad4BP/SF-1 と比較しながら経時的に観察する。マウス native Dax-1 及び β -galactosidase (β -Gal)、His-Tag との融合蛋白質を HeLa 細胞に transient に発現させ細胞内局在を調べる。発現は Dax-1 単独及び Ad4BP/SF-1 との co-expression で解析する。また、Dax-1 の細胞内分布は様々な変異や欠損分子でも解析する。ヒト AHC 患者由来の DAX-1 についてもその細胞内局在と Ad4BP/SF-1 の転写抑制に及ぼす活性を調べる。

C. 研究結果

Dax-1 はその機能的特性から核での存在が推定されており、実際、adult の組織では核における分布が確認されている。しかしながら、マウスの下垂体においてその発生過程で興味のある結果が得られた。すなわち、E18.5 においては、Dax-1 及び SF-1 とともに核に局在したが E10.5 においては Dax-1 は主に細胞質

に観察され、この時期では Ad4BP/SF-1 の発現は観察されなかった。以上の結果より、Dax-1 は Ad4BP/SF-1 の存在下で核に持ち込まれることが示唆された。

次に培養細胞での発現実験を試みた。Native Dax-1, His-tag 及び β -Gal-tag との融合タンパクはすべて細胞質分布を示した。Ad4BP/SF-1 との同時発現で Dax-1 は核に局在した。また、SF-1 の NLS を欠損させたプラスミドでは Dax-1 の核内局在は消失し、heterologous な NLS の存在によりそれが rescue された。以上の結果から Dax-1 は SF-1 の NLS に依存した核輸送が行われていることが明らかになった。なお、この核移行は ER によってもなされることも示された。

さまざまな領域を欠損させた Dax-1 と β -Gal (His-tag) との融合蛋白発現プラスミドと SF-1 との同時発現より、Dax-1 の N 端側に SF-1 と結合して核に移行する活性があることが示された。Dax-1 の N 端側には三回の繰り返し構造があり、それぞれの領域に LXXLL-motif として知られている NR box を一つ保持している。NR box はコアアクチベーターに存在し、このモチーフを介して核内受容体と結合してその転写調節を促進する。そこで、これらのモチーフに変異を導入して SF-1 存在下での核移行能を調べたところ、N 端に最も近い NR box 1 に変異を入れた時のみ SF-1 依存的な核移行が阻害された。従って、Dax-1 の NR box 1 に Ad4BP/SF-1 が結合して核に輸送されることが示された。

核内受容体の VD₃ 受容体の C 端に存在している AF2 ドメインはその核移行にも影響す

ることが示唆されている。そこで Dax-1 の AF2 ドメインに変異を導入し、Ad4BP/SF-1 依存的な核輸送を観察したところ、大幅な低下が観察された。

ヒトの AHC (先天性副腎低形成) は DAX-1 遺伝子異常により生じることが知られている。多くの場合、truncated forms の DAX-1 が生じてその loss of function が観察されている。一方、アミノ酸変異をもたらす変異は主に LBD 領域に観察され、変異による構造変化の結果 N-CoR や Allien などの co-repressor を recruit できなくなり、Ad4BP/SF-1 の転写活性を抑制できなくなることによって考えられている。L466R は AF2 領域中に変異をもつ AHC 患者の変異型 DAX-1 である。そこで、L466R の Ad4BP/SF-1 依存的な核移行活性を観察したところ期待されたように大幅な低下が観察された。Dax-1 の Ad4BP/SF-1 による転写活性阻害にはやはり NR box(LXXLL モチーフ)が関与していることが報告されている。L466R には従って、その転写抑制に関与する領域は retain されていると考えられる。CYP11A-luciferase をレポーターとして抑制活性を正常 DAX-1 と比較すると有意に減少していた。この減少は核移行活性の減少として説明することが出来る。従って、DAX-1 の正常な細胞内局在が変異によりみだされ AHC という遺伝病になることが示された。

D. 考察

性分化関連因子でありステロイドホルモン合成とその抑制に機能している転写因子 SF-1 と Dax-1 が細胞内の局在に相互に関連しあっ

ている結果を明らかにした。転写因子の高度に調節された細胞質・核輸送は本質的な遺伝子発現調節機構であり、このようなシステムに内分泌攪乱物質が影響するかどうかは今後の重要な研究課題である。また、AhR/ARNT システムとの細胞内でのクロストークについての研究が必要となる。ステロイド産生細胞 I-10 にダイオキシンを短時間暴露させると SF-1 で調節されている遺伝子発現の誘導が観察されているので詳細に解析する予定である。

E. 結論

性分化関連因子でありステロイドホルモン合成に関与する Ad4BP/SF-1 は Dax-1 によりその転写レベルが抑制されている。Dax-1 は細胞質蛋白であり、機能的に関連している SF-1 と結合し、その NLS を利用して核内に輸送され転写抑制をしていることが明らかになった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, and M., Morohashi, K. LXXLL-motif and AF2 domain participate in Ad4BP/SF-1 dependent nuclear accumulation of Dax-1. (投稿中)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし