

京都大学	博士 (医学)	氏名	菌 隆
論文題目	<b>THRAP3 interacts with and inhibits the transcriptional activity of SOX9 during chondrogenesis</b> (THRAP3 は軟骨発生の際に SOX9 と結合し、その転写活性を抑制する)		
(論文内容の要旨) <p>序説：Sry box 9 (SOX9)は軟骨発生において、軟骨細胞の増殖・分化・細胞外マトリックス形成に関わる重要な転写因子である。SOX9 は転写複合体を構成することが知られており、本研究では、SOX9 転写複合体の中に転写関連因子 Thyroid hormone receptor associated protein 3 (THRAP3)が存在し、SOX9 の転写活性を抑制することを明らかにした。</p> <p>方法：Sox9 遺伝子座に FLAG-HA タグをノックインしたマウスを作成した。軟骨組織を用いて FLAG タグにて免疫沈降法を行い、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)により Sox9 転写複合体を形成する蛋白質を同定した。ATDC5 細胞の軟骨分化過程における Thrap3 の発現レベル、siRNA を用いて Thrap3 をノックダウンした場合の Sox9 遺伝子、II 型コラーゲン <math>\alpha 1</math> 鎖(Col2a1) 遺伝子の発現レベルを解析した。軟骨細胞特異的 Col2a1 レポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにて SOX9 遺伝子単独発現群、SOX9・THRAP3 遺伝子共発現群でレポーター活性を比較検討した。野生型マウス成長軟骨板および ATDC5 細胞において THRAP3 および SOX9 の組織学的及び細胞内局在を免疫染色を用いて解析した。さらに C3H10T1/2 細胞を用いて免疫沈降を行い、SOX9 と THRAP3 の結合部位を検討した。最後に、クロマチン免疫沈降法を行い Col2a1 遺伝子のエンハンサー領域に SOX9、THRAP3 が結合しているかを検討した。</p> <p>結果：LC-MS/MS にて 24 の転写関連蛋白質を同定し、本研究では THRAP3 に注目した。ATDC5 細胞では、Thrap3 遺伝子の発現レベルは 10 日目が最大で、以後は低下した。siRNA を用いて Thrap3 遺伝子をノックダウンすると、Sox9 遺伝子の発現に有意な変化はなく、一方 Col2a1 遺伝子の発現は上昇した。レポーターアッセイでは、SOX9 遺伝子単独発現群で上昇した Col2a1 のレポーター活性が、SOX9・THRAP3 遺伝子共発現群では有意に低下した。マウス上腕骨成長軟骨板において Sox9 蛋白質と Thrap3 蛋白質はいずれも増殖層および前肥大細胞層の軟骨細胞核内に存在した。ATDC5 細胞においても、いずれも核内に存在した。免疫沈降法で両者の結合領域を検討したところ、SOX9 蛋白質のプロリン・グルタミン・セリンリッチドメインと、THRAP3 蛋白質のアミノ酸 165 から 597 の領域で結合することが明らかになった。クロマチン免疫沈降法では、Col2a1 遺伝子の軟骨特異的エンハンサー領域に SOX9 蛋白質、THRAP3 蛋白質ともに結合していることが明らかになった。</p> <p>議論：以上の結果から、THRAP3 は軟骨の発生段階で SOX9 と結合し、その転写活性を抑制することが明らかになった。従来、SOX9 転写複合体の同定は in</p>			

vitro の系で行われていたが、本研究では in vivo においてより生理的な条件で SOX9 転写複合体を精製した。軟骨細胞における THRAP3 の機能に関する報告は本研究が初めてであり、軟骨発生の分子メカニズムに新しい知見を見出し、今後、THRAP3 が軟骨疾患に対する治療標的になりうると期待される。

(論文審査の結果の要旨)

SOX9 は軟骨細胞の増殖、分化、細胞外マトリックス形成に関わる遺伝子特に COL2A1 の転写因子である。SOX9 依存性の転写複合体についての研究は行われてきたが、その全容はまだ解明できていない。本研究は、THRAP3 が SOX9 転写複合体を構成する転写関連因子の一つであることを仮説とし、その機能を解析することである。SOX9 遺伝子座に FLAG タグをノックインしたマウスの肋軟骨の液体クロマトグラフィー質量分析から、THRAP3 が SOX9 転写複合体に含まれることが示された。軟骨前駆細胞株である ATDC5 細胞で THRAP3 を抑制すると、SOX9 の発現は変わらず、SOX9 の標的遺伝子である COL2A1 の発現が上昇した。HEK293 細胞でのレポーターアッセイでは、THRAP3 と SOX9 を強制発現させると、SOX9 単独発現の場合と比較して COL2A1 のレポーター活性が低下した。以上の結果から、THRAP3 が SOX9 の転写活性に抑制的に働く SOX9 転写複合体の一つであることが明らかになった。軟骨細胞での THRAP3 の役割についての報告は初めてであり、今後 THRAP3 が軟骨疾患に対する治療標的になりうると期待される。

以上の研究は軟骨細胞における THRAP3 の機能の解明に貢献し、軟骨発生の分子メカニズムの解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 ( 医学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 11 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。