

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士課程 進学
氏 名： 山本 紋子
指導教官名： 加藤 茂明

論 文 題 目

男性ホルモン受容体転写共役因子の分子遺伝学的研究

はじめに

男性ステロイドホルモン(アンドロゲン)は、雄性生殖器官の形成や発育・維持、更に骨格筋などに対するタンパク質同化作用を示すことが知られている。また、脳の性分化や生殖行動など雄性的行動誘導に必須な因子である。アンドロゲンにはテストステロンやより高活性型の 5α -ジヒドロテストステロン(DHT)が含まれており、いずれも核内受容体ファミリーに属するアンドロゲン受容体(AR)のリガンドとなる。AR は標的遺伝子上流の AR 応答配列(ARE)に結合し、リガンド依存的に、標的遺伝子群の発現調節を行うリガンド誘導性転写調節因子である。AR は A~F の機能領域に分けられており、その転写活性化領域は N 末端側の A / B 領域と C 末端側の E / F 領域内の 2 箇所が存在すると考えられている。前者は AF-1 と呼ばれ、リガンド非依存的でかつ構成的な転写活性化能を示し、後者は AF-2 と呼ばれ、リガンド依存的な転写活性化能を示す。

AF-2 領域は核内受容体間で相同性が非常に高く、リガンド依存的であることから、その機能解析は先行してきた。その結果、AR を含む多くの核内受容体の AF-2 にリガンド依存的に相互作用する転写共役因子として、ヒストンアセチル化活性を有する CBP / p300 や p160 ファミリータンパク質の SRC-1 / TIF2 を含む複合体が同定された。この複合体は、核内受容体と基本転写装置を橋渡しする。また、クロマチン構造を弛緩させることによって、プロモーター領域に転写調節因子を近づける作用を持つもので、共役転写活性化因子(コアクチベーター)に分類されている。しかしながらその発現は普遍的であること、また他の核内受容体のコアクチベーターとして作用することなどから、AR の時期・組織特異的な機能を担うコアクチベーターの存在が予想されている。

一方、AF-1 領域は核内受容体間で相同性は低く、その転写活性化能は細胞種特異的であるこ

とから、核内受容体が個々の特異性を発揮し、機能するための領域であると考えられている。従って AF-1 は、個々の核内受容体-リガンド系が示す多様な生理作用をもたらす主たる機能を担うと考えられる。しかし AF-1 の詳細な機能解析の遅れから、AR AF-1 に作用するコアクチベーターは AF-2 コアクチベーターと同一であるのか、または未知因子であるのかは明らかになっていない。従って、相同性の低い AF-1 に相互作用する転写共役因子を探索することが、アンドロゲンの生理作用メカニズムの解明に大きな手がかりを与えるものと考えられた。

そこで本研究では、AR の転写調節機構を明らかにする目的に AR AF-1 の機能解析、更に AR AF-1 と機能的に相互作用してその転写活性化能に関与する因子の探索を行った。まず AF-2 コアクチベーターである CBP、SRC-1 ならびに TIF2 が AF-1 に及ぼす効果を検討した。さらに AR の特異的な共役因子を探索する目的で、ショウジョウバエにおける、ヒト AR(hAR)のリガンド依存的な転写制御解析の新たな系の確立を行った。ショウジョウバエの有用性は、生活環が短く、高等動物と同じシグナル伝達系を有しており、有用な系統が数多くそろっているため分子遺伝学的解析が可能なことにある。さらに、この系を用いて AR に機能的に相互作用する転写共役因子のスクリーニングを試みた。

1. hAR AF-1 転写活性化領域の解析

1-1. 既知コアクチベーターが hAR AF-1 の転写活性化能に及ぼす影響

AR AF-1 の機能を調べる目的で、核内受容体 AF-2 共通コアクチベーター群の AR AF-1 への作用を解析した。Chloramphenicol Acetyl transferase(CAT)アッセイにて、CBP、SRC-1 ならびに TIF2 と AR AF-1 を COS 細胞内で一過的に発現させ(transient expression assay)、AR 応答配列(ARE)下流の CAT の酵素活性を指標に、AR AF-1 の転写活性化能を測定した。その結果、CBP、SRC-1 と TIF2 の 3 者とも AF-1 の転写活性能を 2-3 倍上昇させた。これより、AF-2 コアクチベーター複合体構成因子群が AF-1 にも相互作用することが明らかとなった。従ってこの複合体は、AF-1 と AF-2 の協調効果において両者の橋渡しの役割を担っていると示唆された。

1-2. hAR AF-1 内の転写活性化コア領域の同定

AF-1 内に存在する特定の転写活性化領域を同定するため、様々な AF-1 内の欠損変異体を作製し、それらの転写活性能を CAT アッセイにて調べた。さらにそれらを用いて CBP と TIF2 の相互作用領域の同定を行った。その結果、144-251a.a.が転写活性化領域であることが明らかとなった。TIF2 との相互作用部位は AF-1C 末端側の 405-556a.a.領域内に存在し、一方 CBP は AF-1 内の転写活性化領域を含む 144-418a.a.の広範囲な領域において作用することが明らかとなった。

従って本研究により、AF-1 内の転写活性化コア領域が 144-251a.a.内に同定でき、この領域に相互作用する AF-1 コアクチベーターの存在が示唆された。また CBP は、転写活性化領域に作用する未知因子と協調的に相互作用する因子である可能性が考えられた。

2. ショウジョウバエでの hAR の発現及び転写系の確立

同定した hAR AF-1 転写活性化領域に結合する転写共役因子のスクリーニング法の確立をショウジョウバエにて試みた。そこで最初に、ショウジョウバエにおいて hAR のリガンド依存的な転写活性

化評価系の確立を行った。

2-1. hAR 発現トランスジェニックショウジョウバエの作出

ショウジョウバエでの組織特異的な hAR の発現は、エンハンサートラップ法と酵母転写因子 GAL4 システムによる hAR 遺伝子発現誘導系を組み合わせた方法を用いた。すなわち、エンハンサートラップ法により作製された組織特異的 GAL4 発現系統のハエ(ドライバー)と、GAL4 結合エンハンサー配列(UAS)の下流につないだ hAR cDNA をもつハエ系統(UAS-AR)とを掛け合わせる。次世代のハエ(GAL4-AR)では、GAL4 遺伝子発現パターンに従って、hAR の発現の誘導が期待される。具体的には、embryo ならびに larva の体節での GAL4 発現を可能にするハエ系統 Ptc (patched)-GAL4 ドライバーと UAS-AR を掛け合わせた。UAS-AR ショウジョウバエは、P 転移酵素遺伝子を有するハエの embryo に、P 因子と呼ばれるトランスポゾンに hAR 遺伝子を組み込んだプラスミドをインジェクションして数系統のハエを作出した。ショウジョウバエのゲノム上における hAR 遺伝子の挿入部位は、第 2 あるいは第 3 染色体上に組み込まれた。

GAL4-AR のハエを用いて hAR の発現確認を行ったところ、ノザン解析では約 2.7 kb の hAR 転写産物が確認され、またウエスタン解析では約 110 kDa の hAR タンパク質のバンドが検出できた。さらに免疫染色においては、embryo の体節において hAR タンパク質の期待される発現パターンを観察できた。

2-2. ショウジョウバエでの hAR リガンド依存的な転写系の確立及び AF-1 活性の検出

次に、ハエで発現させた hAR の転写活性能の評価系の確立を行った。まず、上流に ARE を有する GFP レポーター遺伝子を導入した ARE-GFP トランスジェニックを作出した。これと GAL4-AR とを掛け合わせ、リガンドを含むエサを与えて次世代のハエの embryo ならびに larva で GFP の発現を調べた。GFP の発現は hAR のリガンド依存的な転写活性能を反映する。その結果、Ptc と Hh(hedgehog)ドライバーを使用し体節に沿って、あるいは Elav(embryonic lethal, abnormal vision) ドライバーを使用しはしご状神経系や脳等の神経系に hAR を発現させ、アゴニストである DHT 投与した個体群において、上記組織特異的に GFP の発現が観察された。一方、アンタゴニストの hydroxy flutamide 投与群では hAR の発現は見られるものの、GFP の発現は見られなかった。従ってアゴニスト依存的に GFP の発現が観察されたことにより、ショウジョウバエ内で発現させた hAR はリガンド依存的な転写活性能を有することが明らかとなった。

一方、同様の解析により AF-1 のみを有する hAR 欠変異体を発現する個体を解析したところ、リガンド非依存的な GFP の発現が観察された。そこで、動物細胞を用いて同定した AF-1 内の転写活性化コア領域の機能を調べるため、AF-1 欠損変異体発現個体を作成し、転写活性能を検討した。その結果、欠損変異体発現個体において GFP 蛍光の減少(80%)が観察されたことにより、ハエ個体においても動物細胞内で同定した転写活性化コア領域が AF-1 機能に重要であることが明らかとなった。

以上、ショウジョウバエにおいてリガンド依存的な転写活性化機能を有する hAR の発現系の確立に成功した。さらに、*in vitro* 細胞系でのみ hAR は AF-1 活性が認められていたが、*in vivo* 個体系においても hAR AF-1 機能の存在を初めて証明できた。これら hAR の転写活性能は、ショウ

ショウバエの内在性転写共役因子が機能していると考えられた。従って、この系は hAR の転写共役因子の探索に有効であると判断した。

3. ショウジョウバエコアクチベーターと hAR の機能的相互作用

3-1. ショウジョウバエコアクチベーター欠損変異体が hAR の転写活性化能に及ぼす影響

hAR 転写活性能に関与するショウジョウバエ内在性の転写共役因子を探索する目的で、ショウジョウバエにおいて同定されているコアクチベーターの欠損変異体を用いて検討した。その結果、ショウジョウバエ CBP(*dCBP*)の変異体(*nejire*)と hAR 発現個体から得られた次世代のハエでは、リガンド依存的な GFP 発現量は約半分に低下した。さらに AF-1 発現個体と *nejire* をかけ合わせた次世代のハエにおいても GFP 発現量は減少した。以上より、*in vivo* における hAR 全長ならびに AF-1 の転写活性能に dCBP が必須であることが明らかとなった。

3-2. ショウジョウバエ培養細胞を用いた *in vitro* での相互作用の検討

ショウジョウバエ培養細胞株の Schneider 細胞を用いて、dCBP の hAR ならびに hAR AF-1 転写活性能への効果を調べた。その結果、dCBP は濃度依存的かつリガンド依存的に hAR 及び hAR AF-1 の転写活性化能を上昇させた。従って、dCBP は *in vitro* においても hAR の機能において必須であることが判明した。

4. まとめ

本研究では、外因性 hAR ならびに hAR AF-1 発現ショウジョウバエの作出に成功し、この系を利用して、ショウジョウバエ内における hAR の転写活性化、特に hAR AF-1 機能に dCBP が必須であることが明らかとなった。共役因子は複合体として作用するため、hAR の転写活性化には dCBP 単独で作用したとは考えにくい。従って本法を用いて、hAR ならびに AF-1 に作用する新たな転写共役因子の探索が可能であると考えられた。

長年の研究により、ショウジョウバエには有用な系統がそろっている。中でも、ハエ染色体の各々異なる一部の領域を欠損している変異体が 200 種存在し、全染色体を網羅するこれら変異体群を総称して *deficiency kit* という名で知られている。これらと hAR 発現個体とをかけ合わせ、生まれた *embryo* 内において GFP 発現を評価することで、hAR 転写共役因子を分子遺伝学的に同定することが可能である。次に、そのヒトホモログを検索・単離し、動物細胞内で hAR 転写共役因子としての機能解析が可能になるものと考えられる。

さらに系を改良することで、hAR を介したリガンド依存的な毒素因子誘導系で産卵数や生存率を評価すること、または hAR を介する増殖因子誘導系による表現型を調べることで、hAR 転写共役活性化または抑制化因子の同定が可能であると考えられる。このようにショウジョウバエを利用する最大の利点は、ゲノム解読がほぼ終了しデータベースが整っているため、cDNA 単離が比較的簡単であることに加えて、*in vitro* 実験系とは異なり個体での本来の生理機能を直接的に観察できる点にある。

今後、本スクリーニング系を用い新規 hAR 転写共役因子を探索することで、アンドロゲンの AR を介した転写調節機構が分子レベルで解明されるものと期待している。