

論文の内容の要旨

論文題目 A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins, acts as an estrogen receptor α AF-1 coactivator with an RNA coactivator, SRA.

和訳 エストロゲンレセプター α の AF-1 特異的な転写共役因子として機能する RNA 結合 DEAD-box タンパク p72

指導教官 武谷雄二教授
東京大学大学院医学系研究科
平成9年4月入学
医学博士課程
生殖発達加齢医学専攻
氏名 渡邊理子

【緒言】 主要な女性ホルモンであるエストロゲンは、女性生殖器官の発育、維持、ホルモン依存性癌の増殖等に深く関与することが知られている。

エストロゲンの生理作用は、その特異的な核内レセプター群（エストロゲンレセプター：ER α 、ER β ）を介した標的遺伝子の転写制御により発揮される。ER の機能領域は、N 末端側から A~F 領域に分割され、転写活性化能は N 末端側の A/B 領域（Activation function-1; AF-1）と C 末端側の E 領域（AF-2）に存在する。AF-1 の転写活性化能は恒常的かつ組織特異的であるが、AF-2 の転写活性化能はリガンド結合依存的である。

一方、近年核内レセプターによる転写開始には、RNA ポリメラーゼ II を中核とした基本転写装置を仲介するような転写共役因子群の存在が必須であることが示されてきた。これまでに、転写共役因子群として、ヒストンアセチル化(HAT)活性を持つ CBP/p300、SRC-1/TIF2/AIB1、PCAF などの因子群及びヒストンアセチル化活性を持たず RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素の構成サブユニットを含む TRAP/DRIP、その他 RNA 転写共役因子、SRA などが明らかになってきた。現在、核内レセプターが仲介する転写系においては、まずレセプターのリガンド結合に伴い HAT 複合体が相互作用しクロマチン構造を緩め、TRAP/DRIP 複合体と共に相互作用することで転写開始複合体が形成されるモデルが提唱されている。

最も解析されている転写共役因子である、SRC-1、TIF2、AIB1 はその相同性からフ

ファミリー(SRC-1 protein family)を形成している。これらは二つの転写活性化ドメイン(AD1、AD2)、核内レセプター結合ドメイン(NID)を有する。AD1 は、CBP/p300 が直接結合することにより、転写活性を持つことが示されたが、AD2 ドメインの転写活性化機構については、不明であった。一方、AIB1 は ER 陽性の乳癌細胞株、乳癌組織において、過剰発現している転写共役因子であることが 1997 年に報告され、転写共役因子とエストロゲン依存性悪性腫瘍との関連が注目された。

本研究では、AIB1 に結合する因子を検索し、解析することにより、ER の転写調節機構をより詳細に解明することを目的とした。

【方法】

1) AIB1 AD2 領域蛋白相互作用因子のスクリーニング

ライブラリーには AIB1 の発現が高いとされているヒト子宮頸部腺癌、HeLa の cDNA ライブラリーを用いた。約 1000 万クローンの酵母ライブラリーよりスクリーニングを行った。

2) AIB1 相互作用因子の解析

①AIB1 相互作用因子と SRC-1 family protein の AD1、AD2 領域、hER α 、 β の AF-1、AF-2 領域との直接の相互作用を GST pull-down 法により検討した。

②エストラジオール(E2)存在下、非存在下における AIB1 相互作用因子と SRC-1 family protein、hER α の核内局在について検討した。AIB1 相互作用因子は GFP(Green fluorescence protein) 融合タンパクを発現させ、hER α 、TIF2 は各々特異的に認識する抗体を用いて染色し、検出した。

③MCF7 細胞内では、ER を介して、内在性遺伝子 pS2 の発現が、E2 依存的に増加することが知られている。そこで、AIB1 相互作用因子を MCF7 に過剰発現させ、pS2 の発現量の変化を Northern blotting により検討し、AIB1 相互作用因子が内在性の ER に対して転写共役因子様の活性を示すか否かを確認した。

④昨年、SRC-1 family protein を含む complex の中に、RNA 転写共役因子として機能する SRA が存在するという報告があった(2)。そこで、我々は、AIB1 相互作用因子が転写共役因子として機能する機構をさらに詳細に解明するため、RNA Gel shift assay にて、AIB1 相互作用因子と SRA との結合を検討した。

⑤細胞内での結合を検討するため、AIB1 相互作用因子、SRC-1 family protein、hER α 各抗体を用いて免疫共沈降を行った。さらに、免疫沈降物の中に SRA が含まれることを証明するために、免疫沈降物から RNA を抽出し、SRA 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

⑥P72 の様々な核内レセプターの転写系に対する影響を luciferase assay を用いて検討した。

【結果】

- 1) スクリーニングの結果得られた 44 のポジティブクローンについてシーケンスを行いアミノ酸配列を解析した結果、RNA 結合蛋白 p72、1 クローン、preferentially expressed antigen of melanoma PRAME、36 クローン、Human transmembrane receptor precursor PTK7、3 クローン、その他細胞質存在蛋白 4 クローンが同定された。これらを動物細胞発現ベクター(pcDNA3)に組み込み、Luciferase assay を行い、AIB1 の転写促進能を増強したクローンとして p72 を選出した。p72 は、DEAD-box という RNA 結合モチーフを持ち、RNA 結合を介して RNA ヘリケース活性をもつ蛋白として知られている。遠藤らは DEAD-box 蛋白 p68 が hER α Ser118 のリン酸化依存的に hER α と相互作用し、hER α AF-1 の転写共役因子として働くことを報告した(1)。 p72 は DEAD-box モチーフをもつ蛋白のファミリーのなかで、p68 とのみ高い相同性を持つ。また、ER α A/B ドメインの MAP kinase によるリン酸化により内在性に結合する蛋白を、MCF7 の核抽出液を用いた Far-Western 法で確認したところ、およそ 120、72、68 kDa の 3 つの蛋白が、リン酸化された ER α A/B ドメインに結合するものとして検出された(梶広による)。この結果から、DEAD-box 蛋白 p72 と p68 が ER α の結合物である可能性が示唆された
- 2) ①GST pull-down の結果、p72 は全ての SRC-1 family protein の AD2 領域、hER α の AF-1 領域と相互作用し、AD1 領域、hER α の AF-2 領域および hER β のいずれの領域とも相互作用しなかった。②細胞内局在の検討では、3 者とも核内に存在したが、E2 非存在下においてはこれらの局在は完全には重複せず、E2 存在下において局在はほぼ一致した。③p72 を MCF7 に過剰発現させたところ、pS2 の発現がさらに増加した。④RNA Gel shift assay にて、SRA と p72 が複合体を形成することを証明した。⑤免疫共沈降法により、細胞内で p72、SRC-1 family protein、hER α が同じ complex に含まれることが、さらに、免疫沈降物の中に SRA が含まれることを RT-PCR で示した。⑥luciferase assay の結果、p72 は RAR、RXR、VDR、TR、PPAR、AR、MR、GR、hER β などの核内レセプターの転写活性化能にはほとんど影響を与えなかったが、hER α の転写活性化能を促進した。そこで、hER α の各転写促進領域(AF-1、AF-2)への影響を検討した結果、p72 は AF-1 活性を亢進したが、AF-2 には効果がなかった。さらに、p72 は hER α の転写活性化能を TIF2、SRA と協調して上昇させた。

【考察】

本研究においては、SRC-1 family protein AIB1 に相互作用する転写共役因子をスクリーニングし、その結合因子の機能を詳細に解析することによって hER α の転写調節機構を解明することができた。このように、転写共役因子を解析することは、ER をはじめとする核内レセプターの機能を解明する重要な糸口となり得る。

今後、臨床において、ホルモン依存性、非依存性疾患と核内レセプターとの関係を解明する上で、転写共役因子の発現量、組織分布等の解析が期待される。

【まとめ】

SRC-1 family protein AIB1 に相互作用する転写共役因子をスクリーニングし、その結合因子として RNA 結合蛋白 p72 を見い出した。p72 は SRC-1 family protein、RNA 転写共役因子 SRA と直接結合し、核内で複合体を形成した。さらに、p72 は SRC-1 family protein、SRA と協調して hER α AF-1 特異的な転写共役因子として機能することを明らかにした。

参考文献

- (1) Endoh, H. et al. (1999) Mol. Cell. Biol. 99, 5363-72.
- (2) Lanz, R.B. et al. (1999). Cell 97, 17-27.