

審査の結果の要旨

氏名 渡邊理子

エストロゲンはエストロゲンレセプター(ER)を介し、女性生殖器官の発育、維持や生殖機能をはじめ、ホルモン依存性癌の増殖や骨代謝等に広く関与する。ERの分子メカニズムを解明することは、これらの現象を理解するために重要である。最近、ERをはじめとする核内レセプターが機能するためには、レセプターと基本転写装置を仲介する転写共役因子が重要であることがわかってきた。本研究では、ERの新たな転写共役因子をYeast Two-hybrid systemを用いてスクリーニングし、得られた因子を分子生物学的手法で詳細に解析することにより、以下の結果を得た。

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た。ER α AF-1特異的な転写共役因子とえて報告されているDEAD-box蛋白p68と高い相同性を持っていた。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。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. GST pull-downの結果、p72は全てのSRC-1 family proteinのAD2領域、ER α のAF-1領域と相互作用し、AD1領域、ER α のAF-2領域およびER α のいずれの領域とも相互作用しなかった。
3. 細胞内局在の検討では、3者とも核内に存在したが、エストロゲン (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。
4. p72をMCF7に過剰発現させたところ、エストロゲン標的遺伝子であるpS2のmRNAの発現がさらに増加した。

5. RNA Gel shift assayにて、SRAとp72が複合体を形成することを証明した。
6. 免疫共沈降法により、細胞内でp72、SRC-1 family protein、ER 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。
7. luciferase assayの結果、p72はRAR、RXR、VDR、TR、PPAR、AR、MR、GR、ER 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、ER α の転写活性化能を促進した。そこで、ER 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ER α の転写活性化能をTIF2、SRAと協調して上昇させた。

以上、本論文は、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、その結合因子としてRNA結合蛋白p72を見い出した。さらに、これがSRC-1 family protein、SRAと協調して、新たなクラスのER 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。本研究での、転写共役因子の解析は、生殖器機能におけるエストロゲン作用の分子メカニズムを明らかにしたのみならず、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と考えられ、学位の授与に値すると考えられる。