

論文の内容の要旨

論文題目 リガンド非存在下における Hsc70
によるエストロゲンレセプターの転写制御機構の解明

指導教官 矢野 哲 助教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 11 年 4 月入学
医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻
氏名 小川智子

<背景> 乳腺や前立腺など、ホルモン依存性の組織が癌化すると、その一部はホルモン依存性腫瘍となる。これらの腫瘍に対してはホルモン療法が有効であるが、治療中にホルモン療法に反応しなくなり、かえって腫瘍が増殖してくること(refractory)がある。一般的にホルモンのような脂溶性リガンドは、核内に移行して核内レセプターと結合することによって、標的遺伝子の転写制御を介し、様々な生理作用を表すことが知られている。これらのことから、ホルモン依存性腫瘍の発症や refractory のメカニズムには核内レセプターが係っている可能性が考えられる。実際、核内レセプターの量的・質的な変化がホルモン依存性腫瘍の発症や refractory 獲得に関与することが、一部のホルモン依存性腫瘍において証明されている。しかしながら、多くのホルモン依存性腫瘍においては、核内レセプターの量的・質的変動は認められていない。したがって、これらホルモン依存性腫瘍の発症には核内レセプターだけではなく他の因子の関与が考えられる。

近年、核内レセプターにリガンド依存的に結合して転写を活性化する転写共役因子がクローニングされつつある。これらは大きな complex を形成しており、

核内レセプターとリガンド依存的に結合することによって周囲のヒストンをアセチル化することにより、転写を活性化する。これらの事実は、核内レセプターではなく、転写共役因子量的・質的変化がホルモン依存性腫瘍の発症や refractory に関与する可能性を示唆している。

そこで、婦人科領域のホルモン依存性腫瘍に係わる核内レセプターである estrogen receptor(ER)に着目し解析した。ER には2つの転写活性化領域が存在し、それぞれ activation function 1(AF-1)、activation function 2(AF-2)と呼ばれている。AF-2 はリガンド結合領域である E 領域内に存在してリガンド依存的な転写活性を持つのに対し、AF-1 は N 末端に位置してリガンド非依存的な転写活性を持つ。しかし、ER 分子全体としてはリガンド存在下のみで転写活性を持つことから、リガンド非存在下において AF-1 の転写活性を抑制する領域が E 領域の中に存在する可能性が考えられるが、その抑制機構については全く明らかになっていない。リガンド非存在下における ER の転写活性促進はホルモン依存性腫瘍の発症と増悪につながると考えられるため、ER のリガンド非存在下における転写活性抑制機構を分子レベルで解明することは、ホルモン依存性腫瘍のより深い理解にとって極めて重要である。

<方法>

- (1) ER の AF-1 活性のみを持つ deletion mutant を作成し、Cos-1 細胞抽出液を用いた Luciferase assay により、リガンドの存否による AF-1 活性を検討した。リガンドとしては 17β -estradiol(E2) 10^{-8} M を用いた。
- (2) リガンド非存在下における AF-1 転写活性抑制領域 (repression domain, RD) を同定した。一方で、リガンド非存在下における ER の相互作用因子を検索するために、HeLa 細胞核抽出液を用いた GST-ER カラムによる精製を行った。リガンド非存在下において特異的に ER に結合した因子を SDS-PAGE によって単離し、アミノ酸シーケンス法によって解析したところ、Hsc70(heat shock cognate protein 70)であることを同定した。
- (3) Hsc70 の ER に対する結合領域を同定する為、Flag タグのついた ER deletion mutants を作成して Hsc70 と共に Cos-1 細胞に co-transfection し、細胞抽出液を作成し、抗 Flag 抗体による IP-Western 法を施行した。
- (4) Hsc70 と ER の細胞内局在を観察するため、GFP タグをつけた Hsc70 を作成し、ER deletion mutants と共に Cos-1 細胞に co-transfection し、免疫染色法によって染色したものを共焦点顕微鏡で観察した。
- (5) ER と Hsc70 が結合した状態で、ER の AF-1 に対する相互作用因子である p300 と結合するか否かを観察する為、ER と Hsc70 を co-transfection した細胞の抽出液を用いて抗 p300 抗体による IP-Western 法を施行した。

<結果>

(1) ER の RD は 341aa~461aa に存在する

ERのAF-1はリガンド非存在下でも転写活性を示すが、ER分子全体としてはリガンド存在下でのみ転写活性を示すことから、リガンド非存在下においてAF-1の活性を抑制する領域、RDがE領域の中に存在するのではないかと考えた。この領域を同定するために、ERの様々な領域を削ったdeletion mutantを作成し、それぞれの転写活性を測定したところ、341aa~461aaを欠くmutantでは、転写活性が高いことが明らかとなった。この結果は、341aa~461aaの領域がAF-1の活性を抑制する領域、すなわちRDであることを示唆している。

(2) リガンド非存在下においてERにHsc70が結合する

ERがリガンド非存在下において転写抑制因子と結合している可能性を考え、ERにリガンド非存在下で相互作用する因子を検索した。GST-ERカラムを作成し、HeLa細胞核抽出液よりこのカラムにリガンド非存在下でのみ特異的に結合するタンパク質を単離した。このフラクションをSDS-PAGEにて分離しアミノ酸配列を決定したところ、Hsc70であることが明らかとなった。

(3) Hsc70はERのRDに結合する

Hsc70のERに対する結合領域を同定する目的で、ERのdeletion mutantsとHsc70をCos-1細胞に発現させ免疫共沈降法により結合領域を検討した。その結果、ER(1-461)およびER full(E2-)ではHsc70との結合が認められたが、ER(1-282)、ER(1-396)、ER(Δ RD, RDを欠くmutant)およびER full(E2+)では結合が見られなかった。以上のことより、Hsc70のERに対する結合領域は396aa~461aaの領域、すなわちRDであることが判明した。

(4) Hsc70とERを細胞内に発現させ、その細胞内局在を検討した。その結果、RD領域を持たないmutantではERは核内、Hsc70は細胞質に局在していることが明らかになった。一方、RD領域を持つmutantをHsc70と共発現させた場合には、ERと共にHsc70の一部が核内にも存在することが判明した。

(5) Hsc70はAF-1とp300の相互作用を阻害する

RD領域へのHsc70の結合がA/B領域へのp300のrecruitmentを阻害するのではないかと考え、両者の結合を検討した。細胞にERのdeletion mutant、p300、Hsc70を発現させ、免疫共沈降法によりこれらの結合を検討した。その結果、RDを持たないERではp300が、RD領域を持つmutantではHsc70がそれぞれ結合していることが明らかとなった。

<考察>

1 Hsc70はERと核内で結合する。

本研究では、E2非存在下においてERがHsc70と結合することにより、その転写活性が抑制されていることを示した。通常シャペロンコンプレックスは細胞質に存在するが、Hsc70とERの局在を調べた結果、Hsc70はERと共に核内に移行することが明らかとなった。この時にHsc70がHsp90、Hsp40と共に核内で複合体を形成しているか否かは明らかにはなっていない。GST-ERを用いたタンパク質精製ではHsc70しか取得されないことから、Hsc70はHsp90、Hsp40と複合体を形成することなく単量体でERに結合している可能性が高い。したがってHsc70は細胞質ではシャペロンコンプレックスに含まれるが、核内では単独で機能していることが考えられる。

2 Hsc70はERA/B領域とAF-1転写活性化因子の結合を阻害する。

本研究では、リガンド未結合型ERにHsc70が結合することによって、AF-1転写活性化因子であるp300とER A/B領域の結合が阻害されることを示した。他のAF-1転写活性化因子であるp72は、p160、SRAなどと共にp300と複合体を形成していることから、p72のA/B領域への結合がHsc70によって阻害される可能性も考えられる。

3 ホルモン依存性腫瘍とHsc70

主要女性ホルモンであるエストロゲンは、女性生殖器の維持・発達のみならず、ホルモン依存性腫瘍の増悪因子としても知られている。本研究の結果から、Hsc70の消失もしくはHsc70のERとの結合能の低下はERの恒常的な活性化を引き起こすものと考えられる。したがって、上記のようなHsc70の変化はホルモン依存性腫瘍の発症および増悪に関与する可能性が高い。