

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 14 年度博士課程 入学
氏名 大竹 史明
指導教員氏名 加藤 茂明

論文題目 ダイオキシン受容体の内分泌攪乱作用を担う新規複合体機能の解析

第一章 序論

近年、様々な環境汚染物質が人体の健康に及ぼす悪影響が懸念されており、中でもヒト及び高等動物の内分泌系を攪乱する可能性のある化学物質が数多く報告されている。これらの化学物質が内分泌系を攪乱する具体的な生体分子機構、感受性を規定する遺伝子基盤の解明は重要な課題である。

ダイオキシン類は発癌促進や免疫異常など様々な毒性作用を有する代表的な内分泌攪乱化学物質である。近年特に、主要な女性ホルモン・エストロゲンに対する攪乱作用が指摘されている。これまでに子宮内膜症増悪などのエストロゲン様作用、子宮重量の減少などのエストロゲン阻害作用の両者が報告されており、ダイオキシン類は異なる条件下でエストロゲン作用を正にも負にも調節し得る可能性があると考えられている。しかしながらその分子機構は大部分が不明であった。

ダイオキシン類とエストロゲンの主たる作用は、各々に対する特異的な受容体であるダイオキシン受容体(Arylhydrocarbon receptor, AhR)及びエストロゲン受容体(Estrogen receptor α,β (ER α,β))を介して発揮されと考えられている。AhRはbHLH/PASファミリーに属し、ダイオキシン類の結合後Arntとヘテロ二量体を形成し標的遺伝子群の転写を調節する。一方、核内受容体スーパーファミリーに属するER α,β はエストロゲン依存的に標的遺伝子群の転写を調節する。これら受容体を介した転写活性化過程においては、p300複合体等によるヒストンアセチル化、DRIP/TRAP複合体による基本転写装置のリクルート、受容体自身のリガンド依存的ユビキチン化とそれに伴うプロテアソーム依存的分解、など多段階の制御が必須である。このような様々な転写制御機能を担う核内複合体群において、ERの機能制御に関与するものは同定されているものの、AhRの転写制御能を担う機能複

合体群については現在まで報告されていない。

そこで本研究では両者の受容体が転写制御因子であることに着目し、ダイオキシン類によるエストロゲン攪乱作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。これまでに、リガンド結合 AhR が ER α に直接結合し、エストロゲン未結合（不活性型）ER α の転写促進能を正に、エストロゲン結合（活性型）ER α の転写促進能を負に制御することを見出した。さらにこの正の制御機構として、ER α に結合した AhR が転写共役因子 p300 をリクルートすることを明らかにした¹⁾。一方、活性型 ER α の転写促進能に対する AhR の抑制作用機構は不明であった。そこで AhR による ER α 転写機能抑制機構を検討し、次にこの抑制制御を担う転写制御複合体の同定を試みた。

第二章 AhR を介したリガンド結合 ER α 機能抑制の分子機構の解析

まずエストロゲン存在下における AhR による ER α 抑制機構を検討した。マウス子宮を用いた *in vivo* 系及び乳癌由来 MCF-7 細胞を用いた *in vitro* 系において、AhR リガンド 3-Methylcholanthrene (3MC) はエストロゲン 17 β -estradiol 依存的な ER α 転写促進能を抑制した。そこで更に MCF-7 細胞を用いてこの分子機構を検討したところ、ER α 蛋白量が 3MC 依存的に減少することが明らかとなった。プロテアソーム阻害剤である MG132 でこの効果が抑制され、ER α のユビキチン化が 3MC 依存的に亢進したこと、また、AhR による ER α 転写機能抑制は MG132 存在下では見られなかったことから、AhR による ER α 機能抑制は ER α のユビキチン・プロテアソーム経路による分解制御を介していることが示された。

さらに AhR 自身のアゴニスト依存的分解の関与を検討した結果、AhR のアゴニスト依存的分解・アンタゴニスト依存的安定化に連動して ER α の分解・安定化が規定されていることが明らかとなった。これらの結果から、アゴニスト結合 AhR が ER α に結合し、AhR にアゴニスト依存的にリクルートされたユビキチンリガーゼが ER α をユビキチン化し能動的に分解することで、ER α 機能を負に制御しているという分子モデルが推測された。

第三章 AhR のユビキチン化依存的分解を制御する複合体の精製と同定

次に、AhR による ER α 分解制御の詳細を解明するために、この分解制御を担うユビキチンリガーゼ複合体の同定を試みた。浮遊 HeLa 細胞にて FLAG タグ付き AhR 安定発現株を取得し、核抽出液からの抗 FLAG アフィニティー精製を行った。

まず生細胞内でリガンド依存的に複合体を形成させる方法の構築を試みた。その結果、3MC 処理した細胞で AhR は高分子量複合体を形成し、さらに p300、TRAP220 など既知の転写共役因子複合体の構成因子が各々固有の複合体サイズにて検出された。

次に、活性化型の転写制御因子は様々な転写制御複合体群と相互作用することが知られているため、これら複合体群を単一複合体に分画することを試みた。グリセロール密度勾

配遠心とイオン交換カラムを組み合わせた結果、AhR 複合体は 5 つの主要な複合体(A~E)に分画された。このうち 2 つは(A):DRIP/TRAP 複合体及び(C):p300 複合体と考えられた。

これら複合体中、ER α を含んでおり、かつ、自身のユビキチン化レベルが亢進している複合体(B)の構成成分を更に TOF-MS にて同定した。その結果この画分から SCF 型ユビキチンリガーゼである cullin ファミリーに属する Cullin4B (CUL4B)、機能未知の Transducin-beta-like 3 (TBL3)、未知因子である KIAA0982/WDR37、Cullin 4A 相互作用因子として知られる Damaged DNA binding protein 1 (DDB1)、及び 26S プロテアソームを構成する 19S regulatory particle (PA700)中の成分である regulatory subunit 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 10, 13 を同定した。

そこで確証を得るため GST-CUL4B (N-terminal)をベイトとして HeLa 細胞核抽出液から結合因子を精製したところ、DDB1 やユビキチン鎖伸長因子 E4B と共に TBL3 が同定された。実際、胎児腎臓由来 HEK293F 細胞においても CUL4B, DDB1, TBL3, WDR37 は AhR と免疫沈降で複合体を形成した。siRNA により内因性遺伝子発現量を減少させる RNAi 法を用いて TBL3 または WDR37 をノックダウンすると AhR と CUL4B との相互作用が消失したことから、これら 2 つの因子は CUL4B を AhR にリクルートする役割を有すると考えられた。さらに、TBL3, WDR37 は AhR の C 末端転写活性化領域と GST-pulldown assay にて直接相互作用した。

第四章 AhR 機能及び AhR を介したエストロゲン経路制御における CUL4B 複合体の役割の解析

次に、3MC により誘導される AhR のユビキチン化依存的分解への CUL4B 複合体の関与を検討した。HEK293F 細胞において CUL4B, TBL3, WDR37 を強発現させると、AhR の 3MC 依存的分解及び細胞内でのユビキチン化が亢進した。また、*In vitro* 系において TBL3 免疫沈降産物は自己ユビキチン化活性を有していたことから、これら因子が AhR のユビキチン化依存的分解を担っていると考えられた。

そこで、AhR との相互作用により促進される ER α 分解亢進に対する CUL4B 複合体の関与を検討した。HEK293F 細胞での ER α 及び AhR 強発現下において、CUL4B、TBL3、WDR37 を発現させると、協調的に ER α の分解を促進した。一方、MCF-7 細胞においてこれら内因性因子を RNAi 法によりノックダウンしたところ、ER α の 3MC 依存的分解が減弱されることが明らかとなった。この結果から、3MC で活性化した AhR を介して ER α をユビキチン化する経路はこの複合体が主に担っていることが示唆された。

最後に、AhR を介した ER α 転写機能抑制に対する CUL4B 複合体の関与をレポーターアッセイにより検討した。その結果、3MC 依存的な ER α 転写機能抑制はこれら因子の強発現により亢進し、ノックダウンにより減弱することが明らかとなった。これらの結果から、今回取得した CUL4B 複合体は AhR と ER α の抑制的なクロストークを担う複合体であると

考えられた。

第五章 総合討論

1. AhR による ER 機能抑制機構としてのユビキチン化経路の同定

本研究では、AhR による ER α 転写機能抑制は ER α のユビキチン化依存的分解促進を介していることを明らかにした。従って、AhR は ER α に対して転写共役因子のリクルートとユビキチンリガーゼのリクルートという二種類の作用を発揮し、両者のバランスにより正負両方向の機能制御が生じていると考えられた。

2. AhR による ER 機能抑制を担う転写制御複合体の同定

次に本研究において、リガンド依存的に生細胞内で形成された種々の AhR 相互作用核内複合体を分画・精製する方法を確立し、AhR と ER α とのクロストークを担うユビキチンリガーゼ複合体を同定した。複合体構成因子群の発現量依存的に AhR を介した ER α 機能制御が亢進・減弱することから、この複合体が AhR によるエストロゲンシグナル制御を規定することが示唆された。AhR を介したダイオキシン類の毒性の一部は、他クラスの転写制御因子を介したシグナル経路とのクロストークによって発揮されると考えられている。CUL4B 複合体はこのようなクロストークを仲介する複合体として初めての例である。

3. 本研究の成果と今後の課題

これまでダイオキシン類の内分泌攪乱作用として、エストロゲン様に働くという報告・エストロゲン作用を阻害するという報告の両方があり謎に包まれていた。本研究を踏まえるとダイオキシン類のエストロゲン攪乱作用は、体内エストロゲン濃度や、CUL4B 複合体構成因子群の発現量・活性強度の組織ごと・個体ごとの差異によって規定される可能性がある。今後、ノックアウトマウスの作製により、子宮や乳腺などのエストロゲン標的組織において実際にこれら因子がダイオキシン類のエストロゲンシグナル制御に関わっているか否かを検討する必要がある。

また、今回 AhR に相互作用する複数の複合体の分取に成功した。これら複合体はエストロゲン攪乱作用以外にも AhR の多様な毒性作用を仲介する可能性があり、今後の解析は興味深い。

以上、本研究では転写制御機構の観点からダイオキシン類によるエストロゲン攪乱作用の分子機構を解析し、ダイオキシン類の多様な毒性機構の一部を転写制御複合体レベルで明らかにした。本研究は、環境汚染物質がヒトの健康に及ぼす影響の分子機構と関与する遺伝子的基盤の解明の一端を担うものである。

1) Ohtake, F. *et al.* Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor, *Nature*, 423, 545-550 (2003)