

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大竹 史明

本研究はダイオキシン類の内分泌攪乱作用の分子機構を解析したもので、5章より構成される。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、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。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作用は、各々に対する特異的な受容体型転写制御因子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  $\alpha, \beta$  (ER $\alpha, \beta$ ))を介して発揮されると考えられている。これら受容体を介した転写活性化過程においては、転写共役因子複合体群による多段階の制御が必須である。このような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。AhRによるER $\alpha$ 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。

第二章ではエストロゲン存在下におけるAhRによるER $\alpha$ 抑制機構を検討した。その結果まずER $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 機能抑制はER $\alpha$ 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。

次に第三章では、AhRによるER $\alpha$ 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。

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検出された。さらに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つの主要な複合体に分画された。

これら複合体中、自身のユビキチン化レベルが亢進している複合体の構成成分を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, 7, 13 を同定した。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。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。

最後に第四章では、AhR による ER $\alpha$ 分解亢進に対する CUL4B 複合体の関与を検討した。強発現系及び RNAi 法を用いた検討から、AhR を介して ER $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

以上、本研究では転写制御機構の観点から、生化学的手法を駆使して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。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。