

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成13年度博士課程 入学
氏 名 目崎 喜弘
指導教員名 加藤 茂明

論文題目 エストロゲン受容体の新規転写共役因子 BRD4 の機能解析

第一章 序論

女性ホルモンの一種であるエストロゲンは、雌性生殖器官の発育と機能維持に必要なことが古くから知られていたが、近年では、中枢神経系機能、脂質代謝、骨代謝などにおいても重要な役割を担うことが明らかとなっている。さらに、エストロゲンは乳癌や子宮内膜癌などのホルモン依存性癌の発症と増悪をもたらすことや、閉経後のエストロゲン欠乏が骨粗鬆症を引き起こすことも明らかとなっている。

これらのエストロゲン作用の多くは、その特異的な受容体であるエストロゲン受容体（ER）および（ER）を介した標的遺伝子発現制御によって発揮される。ERは核内受容体スーパーファミリーに属するDNA結合性の転写因子であり、N末側から順にA～F領域に分割される。転写活性化領域はAB領域とE領域の2か所に存在し、それぞれAF-1、AF-2と呼ばれている。AF-2はリガンド依存的な転写活性化能を担っている。一方、AF-1はリガンド非依存的な転写活性化能を担い、組織依存的に活性の強さが異なることが知られている。リガンド依存的な転写活性化領域であるE領域はその結晶構造が明らかとなっており、リガンド結合に伴ってE領域内のC末側に位置する12番目のヘリックスが大きく移動し立体構造が変化することが知られている。このようなERによる転写制御には、転写共役因子と呼ばれる一連の蛋白質群が関与することが知られている。主な転写共役因子の種類として、DNAがヒストン八量体に巻き付いたヌクレオソーム構造の制御を行うクロマチンリモデリング複合体群、ヒストンの修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化等）を行うヒストン修飾酵素群、基本転写装置との仲介を担

う DRIP/TRAP 複合体群が知られている。これらの転写共役因子群は各々が独立に機能するのではなく、協調的かつ段階的に標的遺伝子の発現制御に関与していることが知られている。特に最近ではヒストンの化学修飾が暗号となり、転写共役因子複合体群とヒストンとの相互作用を規定するメカニズムは、ヒストンコード仮説として提唱されている。即ち、特定のアミノ酸残基の修飾は、結果として転写の活性化もしくは抑制を導く。核内受容体のリガンド依存的な転写制御では、ヒストンのアセチル化酵素（HAT）が転写共役活性化因子として機能し、ヒストンの脱アセチル化酵素（HDAC）が転写共役抑制因子として機能することが知られている。

このような転写共役因子群によって発揮される ER の転写制御能には組織特異性があることが知られている。この組織特異性のみを目的に転写制御能を引き出す合成リガンドとして、選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）が開発されている。代表的な SERM であるタモキシフェンやラロキシフェンは、女性生殖器に対しては主にアンタゴニスト活性を示す一方、骨や心血管系に対してはアゴニスト活性を示すことが知られている。このような SERM の作用機構として、SERM が ER の E 領域に結合してエストロゲンとは異なる特有の構造変化を引き起こし、SERM 結合選択的な転写共役因子との結合を促進する可能性が示唆されている。実際に SERM 結合 ER が転写共役抑制因子である HDAC 複合体をリクルートし、ER の転写制御を抑制することが知られている。しかしながら、SERM の部分アゴニスト活性を説明する転写共役因子については不明である。そこで本研究では SERM 結合時の ER と選択的に相互作用する転写共役因子群の取得を行い、ER の組織特異的な転写活性化の分子機構の解明を試みた。

第二章 SERM結合時のエストロゲン受容体転写共役因子BRD4の同定

生化学的手法を用い SERM 依存的な ER 転写共役因子群の取得を試みた。FLAG タグ結合 ER を恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立し、各種リガンド処理後、核抽出液中の ER 相互作用因子群の精製を行い、MALDI-TOF/MS による相互作用因子群の同定を試みたところ、ラロキシフェン添加時の相互作用因子としてプロモドメイン蛋白質 BRD4 を見いだした。取得した BRD4 と ER との相互作用様式を GST pull down アッセイと免疫沈降法により検討した結果、ER の AB 領域を介した直接相互作用であり、その結合はタモキシフェンおよびラロキシフェンにより増強されることを明らかにした。さらに BRD4 の ER 転写共役機能をレポーターアッセイにより検討したところ、BRD4 は AF-1 の転写共役活性化因子であり、なおかつタモキシフェンとラロキシフェンの部分アゴニスト活性を促進することが判明した。

第三章 BRD4を介したER 転写活性促進メカニズムの解析

第1節 BRD4プロモドメインのER 転写共役活性化能

BRD4 はアセチル化ヒストンに結合する 2 つのプロモドメインと機能未知の ET ドメインを

有する。BRD4 を介した ER 転写活性化に関与するドメインを調べるため、BRD4 の各種欠失変異体を作成しレポーターアッセイを行ったところ、N 末側プロモドメインが ER 転写活性化に関与することを見いだした。そこで BRD4 プロモドメインがヒストンのどの位置のアセチル化修飾を認識して結合するのかを peptide pull down アッセイにより検討した。その結果 BRD4 は転写活性化に関与するヒストン H4 の K5 および K12 のアセチル化を認識して結合することが判明した。そこで、ER 標的遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化状態を ChIP アッセイにより調べた。その結果、タモキシフェンおよびラロキシフェン添加時にはヒストン H4 の K12 のアセチル化が亢進していることが判明した。

タモキシフェンおよびラロキシフェン添加時におけるヒストン H4K12 のアセチル化の亢進に BRD4 がどのように関与しているのかを検討した。その結果、アセチル化されたヒストンを HDAC で脱アセチル化する *in vitro* アッセイ系に BRD4 蛋白質を加えたところ、BRD4 は HDAC 活性を減弱させた。従って、BRD4 はアセチル化ヒストンに結合して HDAC の攻撃から保護する機能のあることが推察された。

第 2 節 BRD4 キナーゼ活性と ER 転写共役活性化能

BRD4 と同じファミリーに属する BRD2 がキナーゼ活性を有する。そこでバキュロウイルス発現系を用いて BRD4 蛋白質を大量調製しキナーゼアッセイを行ったところ、BRD4 のキナーゼ活性を確認することが出来た。さらに、BRD4 によるリン酸化の標的蛋白質を調べたところ、BRD4 は ER およびヒストン H3 を *in vitro* でリン酸化することを見いだした。また、ウェスタンブロットング法により、ヒストン H3 のリン酸化部位は S10 であることが判明した。次に BRD4 のキナーゼ領域を検索したところ、2 つのプロモドメイン、ET ドメインの他に BRD 蛋白質ファミリー間でホモロジーの高い領域が 2 カ所存在した。そこでこれらの領域にトリプルアラニンの変異を導入したところ、リン酸化活性が消失する変異体 289AAA を作成することが出来た。さらにこのキナーゼネガティブ変異体 289AAA においては ER AF-1 転写活性化能が減弱することが判明した。このことから BRD4 が、ER やヒストン H3S10 のリン酸化を介した転写制御に寄与する可能性が示された。これまでに増殖因子刺激による ER 蛋白質の S118 のリン酸化が ER 転写活性促進化に寄与することが知られている(Kato et al., 1995)。従って BRD4 による ER 蛋白質のリン酸化においても ER 転写活性促進に寄与する何らかの制御機構が存在することが推測された。

第 3 節 BRD4 によるクロマチンリモデリング複合体リクルートメント

これまでに BRD4 が転写伸長因子複合体 pTEFb、DNA 複製因子複合体 RFC、ヒトパピローマウイルス E2 蛋白質など様々な蛋白質群と相互作用することが報告されている。そこでリコンビナント BRD4 蛋白質を bait として HeLa 細胞核抽出液から BRD4 相互作用因子群の精製を行

ったところ、SWI/SNF 型クロマチンリモデリング複合体の構成因子である BAF250 に加え、他の主要な構成因子群を検出した。このことから BRD4 のクロマチンリモデリング複合体との相互作用が示唆された。実際にレポーターアッセイにより、BRD4 は SWI/SNF の主要構成因子 Brg1 とともに協調的に ER AF-1 の転写活性を増強することを確認した。

第四章 総合討論

本研究において、ER 恒常発現 HeLa 細胞株を用いた生化学的手法により、SERM 依存的な転写共役活性化因子のひとつとして BRD4 を単離同定した。さらに、その機能を詳細に解析したところ、BRD4 はクロマチンリモデリング複合体をリクルートする機能があることを本研究により明らかにすることができた。これまでにクロマチンリモデリング複合体の ER 標的遺伝子上へのリクルートに関しては、ER の E 領域がクロマチンリモデリング複合体構成因子のひとつ BAF57 を介してリクルートする経路が知られていた(Belandia et al., 2002)。しかしながら、ER の AB 領域は BRD4 を介しクロマチンリモデリング複合体をリクルートすることで組織特異性を発揮する可能性が示唆された。これにより、クロマチンリモデリング複合体は特定の修飾ヒストンを認識して標的遺伝子上にリクルートされるだけでなく、転写制御因子である ER の AB 領域および E 領域の受容体蛋白質両端が介在することで標的遺伝子上にリクルートされる可能性が推察された。

一方、BRD4 がキナーゼ活性を持ちヒストン H3S10 をリン酸化することを明らかにした。ヒストン H3S10 のリン酸化は細胞分裂 M 期の染色体凝集時のみならず、増殖因子刺激が誘導する標的遺伝子の転写活性化の際にも観察されている。このときの H3S10 のリン酸化は H3K14 のアセチル化とそれに続くクロマチンリモデリングを伴うことが知られている。従って BRD4 によるクロマチンリモデリング複合体の ER 標的遺伝子上へのリクルートには、ER -BRD4-クロマチンリモデリング複合体の直接相互作用によるものと、BRD4 によるヒストン修飾を介するものの両方の経路が関与する可能性が考えられた。

Belandia, B., Orford, R. L., Hurst, H. C., and Parker, M. G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J.* *21*, 4094-4103.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* *270*, 1491-1494.