

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 目崎 喜弘

女性ホルモン的一种であるエストロゲンは、雌性生殖器官の発育と機能維持、中枢神経系機能、脂質代謝、骨代謝などにおいて重要な役割を担うことが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。さらに、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、タモキシフェンやラロキシフェンなどの、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。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ている。

第一章の序論に引き続き、第二章では、生化学的な手法を用いSERM依存的なER転写共役因子群の取得を試みている。具体的には、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により相互作用因子を同定している。その結果、ラロキシフェン添加時のER相互作用因子としてプロモドメイン蛋白質BRD4を見いだしている。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ている。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を明らかにしている。

第三章では、BRD4を介したER転写活性促進メカニズムを検討している。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ている。また、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ている。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を明らかにしている。さらに、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を明らかにしている。一方、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、BRD4 がキナーゼであることを明らかにしている。また、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ている。さらに、キナーゼネガティブ変異体を作成し、BRD4 のリン酸化活性が、ER 転写活性促進に寄与する可能性を明らかにしている。これら BRD4 蛋白質自身が持つ ER 転写共役活性化メカニズムに加え、BRD4 相互作用因子群による ER 転写共役活性化メカニズムについて検討している。その結果、SWI/SNF 型クロマチンリモデリング複合体の構成因子群が、BRD4 と相互作用することを明らかにしているさらにレポーターアッセイにより、BRD4 が、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ている。

本論文は、SERM 依存的な ER AF-1 転写共役活性化因子 BRD4 を単離同定し、ER の AF-1 転写活性化能の分子機構の一端を解明するものであった。今後、ER の組織特異的な転写活性化機構の理解に大きく貢献するものと期待される。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。