

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 核タンパク HEXIM1 による遺伝子発現制御機構の解明

指導教官 森本幾夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 久田哲也

(背景・目的)

グルココルチコイドは視床下部-下垂体-副腎系の末梢エフェクター分子として副腎皮質より分泌されるステロイドホルモンで、ストレス応答や恒常性維持、生命維持に必須のホルモンである。また、合成グルココルチコイドは抗炎症薬、免疫抑制薬などとして様々な疾患の治療に用いられている。しかし、これらの薬理作用以外に多くの臓器でその作用が過剰に発現し、消化性潰瘍、骨粗鬆症、糖尿病などの副作用が生じる。グルココルチコイドの作用は、グルココルチコイドレセプター (GR) を介して発揮されるが、GR はほぼ一種類で、全身のほぼすべての臓器に存在することから、その作用と副作用の分離が困難である。GR は核内レセプタースーパーファミリーに属する DNA 結合型転写因子であり、転写活性化領域(AF-1)、DNA 結合領域(DBD)、リガンド結合領域(LBD)/転写活性化領域(AF-2)などのドメイン構造をとる。既知の GR 依存性遺伝子転写制御の機構の 1 つは、GR の標的遺伝子の特定の塩基配列 glucocorticoid response element (GRE) 結合を介したものである。リガンド未結合の場合に細胞質に存在する GR は、リガンド結合に伴い核に移行して GRE に結合し、引き続き転写共役因子をリクルートし、RNA polymerase II などとの複合体を形成し

て標的遺伝子の転写を正に制御する。しかし、生体においてグルココルチコイドにより発現が上昇する遺伝子には GRE を有さない遺伝子も多数存在することから、GR と GRE の結合を介さないで GR 依存性の転写を制御する経路の存在が考えられている。

HEXIM1 は血管平滑筋細胞において分化誘導剤 hexamethylene bisacetamide で発現誘導される核タンパク質として同定された。HEXIM1 の N 末端領域はプロリンに富み機能が未知の領域であり、C 末端領域はロイシンジッパー様構造をとり二量体形成に参与する可能性が示唆されている。HEXIM1 の中央の領域は塩基性アミノ酸に富み核局在シグナル(NLS)として機能する。その後、HEXIM1 は 7SK small nuclear RNA (7SK snRNA)を介して positive transcription elongation factor b (P-TEFb)と複合体を形成し、転写伸長反応に重要な RNA polymerase II の C 末端領域のリン酸化を抑制することが明らかになった。細胞内における HEXIM1 の分子数は P-TEFb のそれに比べて過剰であると推定され、我々の予備的成績からも、HEXIM1 は P-TEFb 以外の経路を介して転写を調節することが示唆された。そこで、HEXIM1 結合タンパクを網羅的に解析し、HEXIM1 のはたらきを明らかにすることを目的として本解析を行った。

(結果)

HEXIM1 結合タンパク質を GST pull-down 法および質量解析により探索したところ、HEXIM1 は P-TEFb 以外に PSF、p54nrb、GR などと結合する可能性が示唆された。GST-HEXIM1 および抗 HEXIM1 抗体で沈降し、Western blot 法で確認したところ、HEXIM1 は GR と RNA 非依存性に結合した。また、抗 CDK9 抗体による免疫沈降法およびグルセロール密度勾配法による解析から、GR は HEXIM1/7SK snRNA/P-TEFb 複合体に含まれないことが明らかになった。

GR と HEXIM1 の結合に参与する領域を GST pull-down 法により解析したところ、HEXIM1 は中央の NLS を介して、GR は LBD を介して各々と結合することが示された。HEXIM1 の NLS は便宜上 3 つの塩基性アミノ酸クラスターとして分けることができるため、これらの変異体を用いて解析すると、HEXIM1 NLS の N 末側 1/3 が 7SK snRNA と、C 末側 2/3 が GR とそれぞれ結合すると考えられた。HEXIM1 NLS において GR と 7SK snRNA の結合領域は異なるものの、GR LBD は HEXIM1 と 7SK snRNA の結合を用量依存性に阻害した。

HEXIM1 のグルココルチコイド応答性遺伝子発現に与える影響について解析した。グルココルチコイド応答性レポーター遺伝子発現の dexamethasone (DEX)刺激による誘導は、HEXIM1 の過剰発現により抑制され、siRNA による HEXIM1 発現抑制より促進された。7SK snRNA のアンチセンスにより P-TEFb 阻害の効果を除いても HEXIM1 は GR 依存性転写を抑制することから、HEXIM1 は P-TEFb 阻害および GR との相互作用を介した 2 つの経路で GR 依存性転写を制御すると考えられた。次に、HepG2 細胞において DNA microarray により解析した全 5,288 遺伝子のうち 135

遺伝子で DEX 刺激により mRNA 発現量が増加し、HEXIM1 を過剰発現させるとこのうち 93% の 125 の遺伝子でその発現量増加が抑制された。このグルココルチコイド応答遺伝子の ACE2、ADH1A、SGK2 の各 mRNA 発現を RT-PCR 法で確認したところ、同様に DEX 刺激による発現量の増加が、HEXIM1 過剰発現によって抑制された。これらの結果より、グルココルチコイド応答性遺伝子発現は HEXIM1 の発現量によりレシプロカルな制御を受けることが明らかになった。

HEXIM1 による GR 依存性転写活性抑制のメカニズムを明らかにするために、HeLa 細胞における HEXIM1、GR、代表的なコアクチベーターの TIF2 の細胞内局在を免疫蛍光法で調べた。DEX 刺激により核移行した GR は多くの場合 TIF2 と、一部は HEXIM1 と共局在していた。HEXIM1 と TIF2 は核内でその局在は一致しておらず各々別個のコンパートメントに存在すると考えられた。HEXIM1 を過剰発現させたところ、GR/TIF2 から構成されるドット状の局在が減少し、GR/HEXIM1 によると思われる局在に変化した。そこで HEXIM1 の GR と TIF2 の相互作用に及ぼす影響を免疫沈降法で解析した。HeLa 細胞を DEX で刺激すると TIF2 と GR の結合は増加し、HEXIM1 過剰発現によりその増加は抑制された。これらの結果より、GR は HEXIM1 に結合することにより、TIF2 と物理的に相互作用することが不可能になる可能性が示唆された。

(考案)

HEXIM1 は NLS において、N 末端側 1/3 が 7SK snRNA と、C 末端側 2/3 が GR と、それぞれ直接結合することが明らかになった。7SK snRNA と GR は HEXIM1 NLS において結合部位は異なるものの GR の LBD は、HEXIM1 の NLS と 7SK snRNA の結合を阻害する。これらのことから HEXIM1 は NLS において GR と 7SK snRNA と排他的に結合し、この独立した 2 つの因子のもつ制御機構のクロストークを果たしている可能性が考えられる。

GR は LBD を介して、HEXIM1 と結合することが示唆された。GR LBD は疎水性のポケット構造をとり、リガンドの結合により構造が変化すると考えられている。HEXIM1 と GR LBD の結合に関して、現時点でリガンドの要求性は認められないことから、HEXIM1 は GR の LBD の比較的構造がソリッドな部分、例えば N 末端側と結合する可能性が考えられる。GR の LBD は古典的なステロイドレセプター間で相同性が高く、他のステロイドレセプターと HEXIM1 の相互作用に関しても究明される必要がある。

本研究では、HEXIM1 は GR の核内局在を制御することで、GR の転写活性を抑制する可能性が示された。GR/HEXIM1 複合体は TIF2 などが集合している転写開始複合体から離れたコンパートメントに存在するため、リガンド存在下においても標的遺伝子のプロモーターに GR がリクルートされず、TIF2 などのコアクチベーターとも相互作用しない可能性が示唆された。この仮説が正しければ、HEXIM1 は GR による他の転

写因子とのタンパク質-タンパク質間相互作用による遺伝子発現制御も抑制する可能性がある。

GRがHEXIM1との結合によりそのP-TEFb抑制を解除するのであれば、GRの標的遺伝子という概念が大きく変化する。この仮説が正しければP-TEFbにより制御されているクラスII遺伝子の発現がGRにより制御を受けることになる。心筋細胞において、エンドセリン-1がP-TEFbの複合体から7SK snRNAを遊離させ、CDK9の活性化を誘導することで、心筋細胞の肥大を起こすことが報告されている。また、HEXIM1に相同なCLP-1欠失マウスは著明な左室肥大を合併する。したがって、臨床上、クッシング症候群患者やグルココルチコイド投与時に見られる心肥大発現にこのようなGR-HEXIM1-P-TEFbのシステムの破綻が関与している可能性もあり、今後の重要な研究課題である。

(結語)

HEXIM1はP-TEFb阻害とGRとのタンパク質-タンパク質結合を介してグルココルチコイド応答性遺伝子発現を抑制することが明らかになった。また、GRがHEXIM1との結合を介してそのP-TEFb抑制を解除してクラスII遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が考えられた。