

論文の内容の要旨

論文題目 ビタミン D 受容体の組織特異的転写制御機構に関する研究

氏名 山 岡 一 良

第一章 序論

ビタミン D は抗くる病活性を持つ栄養因子として発見された脂溶性ビタミンであり、古くから骨代謝、骨形成の主要調節因子として知られてきたが、他にカルシウム代謝調節や細胞の増殖抑制・分化誘導を調節することも証明されている。1987年にビタミン D 受容体 (VDR) がクローニングされ、一般に、これらのビタミン D の生理作用発現は、活性型の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,25\text{D}$) がリガンド依存性の転写調節因子である VDR に結合し、標的遺伝子の転写を制御することによって発揮されることが明らかとなった。以降 VDR の機能は、細胞培養系などにて研究され、ビタミン D の作用の分子メカニズムが解明されてきた。また、個体レベルでの VDR の機能も VDR 遺伝子欠損マウスなどを用いて解析が進んできている。

ビタミン D の主たる生理作用は、先に述べたとおりカルシウム代謝調節作用と細胞の増殖抑制・分化誘導作用の二つに大別される。カルシウム代謝調節因子としてのビタミン D の標的組織は小腸、骨、腎臓、副甲状腺の四つである。ビタミン D は小腸におけるカルシウム吸収促進、骨からのカルシウム代謝調節因子である副甲状腺ホルモン (PTH) の産生抑制を行う。これらの作用を通じて血中カルシウム濃度を上昇させることが *in vivo* 系の実験を中心に報告されている。細胞の増殖抑制・分化誘導因子としてのビタミン D の標的組織は、皮膚、免疫系細胞、腫瘍細胞などであり、ビタミン D が腫瘍細胞の増殖を抑制し分化を誘導する作用 (非カルシウム作用) も持つことが明らかにされた。以来、皮膚表皮や小腸上皮の細胞増殖分化制御、腫瘍細胞の増殖抑制など様々な細胞系での作用が *in vitro* の実験系から報告されている。このようにビタミン D は、様々な組織において多岐にわたる生理作用を発揮しており、標的組織におけるビタミン D 作用の全貌を理解するためには VDR を介した転写制御機構の理解と、各組織ごとの特異的作用発揮メカニズムを解明することが必須であると考えられる。

VDR は、骨、腎臓、小腸の他に皮膚、脳、筋肉、肝臓等の様々な組織での発現が観察されている。VDR は性ステロイドホルモンであるエストロゲンやアンドロゲンの受容体などとともに核内受容体スーパーファミリーに属

しており、レノイト X 受容体 (RXR) と二量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する正と負のビタミン D 応答配列 (VDRE、nVDRE) を認識し結合することで標的遺伝子の発現を転写レベルで正と負に制御する。その際、TATA box を中心とする巨大複合体である基本転写装置群への相互作用が必須となる。このためにリガンド依存的にタンパク質相互作用によりこれらを仲介し、転写を調節する一群の因子、いわゆる転写共役因子 (コファクター) が存在する。転写活性化のメカニズムは、リガンド未結合時には転写共役抑制因子 (コリプレッサー) が結合し、リガンド結合により受容体の構造変化が生じるとコリプレッサーがはずれ、転写共役活性化因子 (コアクチベーター) がリクルートされると理解されている。このとき VDR に結合したこれらのコアクチベーター複合体は、独立して複数存在することが知られている。まず、WINAC を中心としたクロマチンリモデリング因子複合体をリクルートし、ヌcleoソーム構造変換を誘導する。続いてヒストンアセチル化酵素複合体によりヒストンをアセチル化することでクロマチン構造を弛緩させる。最終的に基本転写装置に働きかけるメディアーター複合体をリクルートして転写を誘導するものと考えられている。以上のように、これら複合体群は転写誘導の各段階で連鎖的に機能するものの、ビタミン D 作用の組織多様性を考えると、VDR による組織特異的な標的遺伝子群の発現制御機構は、コアクチベーター複合体群の使い分け、あるいは組織特異的な未知因子群により調節されていることが予想される。

第二章 ビタミン D 受容体のリガンド依存的な転写活性化機能を支えるコアクチベーター複合体の多様性

核内受容体とコアクチベーター複合体のリガンド依存的な相互作用は、複合体中の特異的な構成因子に存在する LXXLL コンセンサスモチーフと、核内受容体リガンド結合ドメインの C 末端 helix 12 (H12) との物理的な相互作用を介する。核内受容体と複合体群とのリガンド誘導性の相互作用は、この H12 のリガンド結合依存的なシフトによって安定化されることがわかっており、このようなリガンド誘導性の分子基盤については X 線結晶構造解析のレベルで明らかにされている。

VDR による遺伝子発現制御の組織特異性を追求するにあたり、本研究では VDR が多種多様な転写コレギュレーター複合体群を必要とするかどうかの可能性検討を実施した。この課題に対して、VDR の H12 におけるアミノ酸配列に関する一連のアラニン変異体を作成し、2 種のクラスのコアクチベーター複合体 (DRIP/TRAP、ならびに p160/CBP 複合体) がこれら VDR 変異体の転写活性に与える影響について調べた。VDR H12 点変異体の中には、DRIP/TRAP 複合体における相互作用因子との結合能を選択的に消失しているにもかかわらず、なおリガンド誘導性の転写活性化能を有するものがあつた。また、別の変異体のひとつは、調べた 2 種のコアクチベーターいずれとも相互作用することができないもののリガンド依存的な転写活性を保持しているものが存在した。したがって、得られた結果を総合すると、本検討より多様な既知/未知のコアクチベーター複合体が VDR のリガンド誘導性の転写活性化機能を支えていることが示唆された。

第三章 ビタミン D アナログ、TEI-9647 の培養血清によって誘導されるアゴニストからアンタゴニストへの変換

最近では、SRMs とよばれる選択的核内レポーター遺伝子の開発にも進歩が認められている。SRMs は、標的遺伝子プロモーター、細胞の状態、あるいは標的組織に応じてアゴニスト、あるいはアンタゴニストの活性を選択的に発揮する。合成 VDR リガンドの組織特異的作用に対しては、細胞もしくは組織特異的な VDR の転写活性化調節が大きく寄与していると考えられるが、SRMs の選択的な作用を担う分子メカニズムについては依然として不明な点が多く残されている。そこで本研究では、合成 VDR リガンドのひとつであり VDR アンタゴニストとして認識されている TEI-9647 について、その VDR 転写調節能における性状解析を行い、VDR の分子種差、および細胞培養中の血清濃度に依存した該化合物のアンタゴニスト、あるいはアゴニスト活性について検討、解析を行った。

TEI-9647 と ZK159222 の選択的転写活性について、主にレポーターアッセイを用いて細胞培養条件によって活性が変化する化合物の特性について解析した。血清濃度の低い培養条件下では TEI-9647 は VDR を介した転写を活性化し、一方で通常の高血清濃度下では hVDR/hRXR α を介する 1,25D の転写活性化に対して用量依存的な阻害作用を示すアンタゴニストとして作用した。また、この結果は、レポーターのプロモーター領域に VDR 共通認識配列である DR3 エlementを用いても同様に観察されることから、プロモーターの構造や特徴に依存したものではないと考えられた。そこで TEI-9647 と ZK159222 によるこのコアクチベーターと VDR との相互作用に対する培養血清濃度の影響を調べてみたところ、無血清条件下では TEI-9647 は p160 コアクチベーターのリクルートを促進し、TRAP220 はリクルートしないということが見いだされた。この点より、TEI-9647 の血清濃度依存的な VDR 転写調節能は、VDR コアクチベーターの特異的なリクルートによって発揮されると推測された。

第四章 ビタミン D 受容体の新規標的遺伝子の同定

VDR 標的遺伝子の発現制御機構やその遺伝子産物の生理機能を明らかにすることは、VDR の組織特異的な転写制御機構を理解する上で極めて有用であると考えられる。そこで本研究では VDR の新たな標的遺伝子の検索を試みた。

ヒト気道 cDNA より Human airway trypsin-like protease (HAT) 遺伝子のクローニングを行い、その一次構造とコードする推定アミノ酸配列の特徴、ならびにヒト組織での発現分布について検討した。そして 1,25D、AtRA、Dex といったそれぞれ VDR、RAR (レチノイン酸受容体)、GR (グルココルチコイド受容体) の各核内受容体リガンドによる HAT 遺伝子発現変動を RT-PCR にて検討した。ヒト肺胞上皮細胞 A549 では本遺伝子の発現量は低く、またレスポンスも悪いものの、AtRA および 1,25D での HAT 遺伝子の発現亢進が認められた。一方、ヒト骨肉腫由来細胞 HOS では酸化ストレス下において Dex の発現抑制効果が観察された。これら 2 種の細胞株での検討より、HAT 遺伝子の VDR、RAR、GR による細胞種特異的な発現制御機構の存在が示唆された。