

論文の内容の要旨

エストロゲン受容体 β 新規転写共役因子 GIOT-4 の同定と解析

指導教員 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

神津 円

<序論>

女性ホルモンのエストロゲンは、女性生殖器を始め、神経、骨、心血管系などの様々な組織において多彩な生理作用を発揮する。エストロゲンの作用は主に、細胞内にある二つのエストロゲン受容体(ER)、ER α とER β を介して発揮される。ER α とER β は生体内での発現が異なっており、*in vitro*の実験や、正常組織と腫瘍組織での発現量の比較などから、ER α とER β はそれぞれに特異的な機能があることが推測されている。ER α ノックアウトマウスは不妊、乳腺発育不全、骨量減少などの、ER β ノックアウトマウスは産仔数減少などの表現型が見られる。しかしER α とER β の特異的な機能を生み出す転写制御機構の違いについてはあまり知られていない。ERは細胞の核内に存在しており遺伝子の転写を制御する転写因子である。ERが転写制御活性を発揮するにはERと相互作用する蛋白質群の働きが必要であり、これらは転写共役因子と呼ばれる。ER α とER β に結合する転写共役因子群は一部異なることが知られているが、ER β 特異的な機能を説明する転写共役因子は同定されていない。本研究ではER β 特異的な機能を解明するために、ER β 転写共役因子複合体の精製を行ってER β の新たな転写共役因子を探索した。

<方法と結果>

FLAG タグを付加した全長のER α 、ER β 蛋白質を安定的に発現する293F細胞株を

樹立した。この細胞を大量培養して核抽出液を調製し、生化学的手法を用いた ER β 相互作用因子の取得を目指した。FLAG アフィニティー精製によって、ER α と ER β に結合する蛋白質群は異なることが明らかになった。ER β 相互作用因子を取得するために、FLAG アフィニティー精製後にグリセロール超遠心密度勾配法を行った。この二段階精製によって、ER β を含む蛋白質複合体が存在する核抽出液の分画を分離した。この分画に含まれる蛋白質を MALDI-TOF/MS によって同定したところ、同定した蛋白質の一つに Gonadotropin-inducible transcription repressor-4 (Gonadotropin-inducible ovarian transcriptional factor-4: GIOT-4) が存在した。GIOT-4 は元来、ゴナドトロピン (性腺刺激ホルモン) 依存性に卵巣で発現する因子として同定・報告された蛋白質である。卵巣では ER α 、ER β が共に発現しているが ER α は主に莢膜細胞内に、ER β は主に顆粒膜細胞内に、それぞれ細胞特異性を持って発現していることが知られている。顆粒膜細胞は ER β を介してエストロゲンが作用する細胞であると同時にエストロゲンを産生する細胞でもある。ノックアウトマウスの研究から、ER β の機能は卵胞発育に重要だと考えられている。ゴナドトロピンによって卵巣の顆粒膜細胞で発現した GIOT-4 が、卵胞発育における ER β の機能に対して何らかの役割を有する可能性を考えて、ER β と GIOT-4 の顆粒膜細胞内での作用を解析することにした。

卵巣顆粒膜細胞由来の培養細胞 KGN 細胞において、GIOT-4 の mRNA が、ゴナドトロピンやエストロゲンによって増加することが RT-PCR 法で確認された。GIOT-4 の蛋白質レベルでの発現も確認しようと試みたが、GIOT-4 の抗体を用いたウエスタンブロットティングでは、細胞内での GIOT-4 蛋白質の発現は確認できなかった。免疫共沈降と GST pull-down の実験結果から、GIOT-4 はリガンド非依存的に ER に直接結合することが明らかになった。ゴナドトロピンによる GIOT-4 の蛋白質レベルでの発現の確認はできなかったが、ER β と GIOT-4 の結合が確認されたため、KGN 細胞にゴナドトロピンを添加して ER β に結合する GIOT-4 蛋白質の存在を調べた。ER β を免疫沈降することによって、ER β に結合する GIOT-4 の蛋白質がゴナドトロピン依存的に増加することが確認できた。ER のレポーターアッセイでは、GIOT-4 が ER の転写活性を促進する ER 転写共役活性化因子であることが明らかになった。また、KGN 細胞をゴナドトロピンで刺激すると ER β の転写活性が上がり、GIOT-4 の RNAi によるノックダウンでその効果が消失したことから、顆粒膜細胞ではゴナドトロピンが GIOT-4 の発現を介して ER β の転写活性を促進していると推測された。

次に GIOT-4 が ER β の転写共役活性化能を発揮する分子機構を考えた。ここで二段階精製後の ER β を含む分画に、GIOT-4 と共に Brg-1 が含まれていたことに着目した。ER などの転写因子が DNA に結合するためには、クロマチンリモデリング複合体と総称される転写共役因子複合体のグループの一つがクロマチン構造を弛緩させることが必要である。Brg-1 はクロマチンリモデリング複合体の一つ、SWI/SNF 複合体の構成因子である。二段階精製の結果から、GIOT-4 の ER β 転写共役活性化に、Brg-1 を有する SWI/SNF 複合体が関与する可能性を考えた。ER と GIOT-4 を細胞内で発現させて免疫共沈降実験を行ったところ、GIOT-4 の存在下で Brg-1 と、SWI/SNF 複合体の別の構成因子 Ini-1 が ER に強く結合することが明らかになった。KGN 細胞ではゴナドトロピンやエストロゲンの刺激で Brg-1 が ER β に強く結合し、GIOT-4 のノックダウンによってその結合が消失した。レポーターアッセイでは、Brg-1 と GIOT-4 が協調して ER β の転写活性を促進したが、GIOT-4 のノックダウンによってその効果が消失した。従って、GIOT-4 は Brg-1 を含む SWI/SNF 複合体を ER β にリクルートすることで ER β の転写活性を促進しているのではないかと推測できた。

これらの因子が、遺伝子の転写が起こる時に実際に複合体を形成するのかを確認するために、ゴナドトロピンと ER の両方の標的遺伝子として知られるアロマターゼとアクチビン β A の遺伝子で ChIP アッセイを行った。ER β と GIOT-4 を KGN 細胞に発現させたところ、GIOT-4 の存在によって、ER β と Brg-1 の標的遺伝子のプロモーターへの結合が強くなること、ヒストン H4 のアセチル化が亢進していることが分かった。ヒストン H4 のアセチル化は遺伝子の転写の亢進状態を示すので、GIOT-4 によって ER β と SWI/SNF 複合体による標的遺伝子の転写が促進される、と結論した。この実験で Ini-1 と GIOT-4 のプロモーターへの結合は確認できなかったが、KGN 細胞へのゴナドトロピン刺激によって、ER β 、Brg-1、Ini-1 のプロモーターへの結合が強まり、ヒストン H4 のアセチル化が亢進することが確認できた。

これまでの結果がマウスの卵巣でも再現できるか、ゴナドトロピンを投与したマウスを用いて実験した。RT-PCR で、ゴナドトロピン投与による卵巣での GIOT-4 の mRNA の増加を確認し、同時にアロマターゼとアクチビン β A の mRNA も増加することを確認した。この卵巣を用いて ChIP アッセイを行った。マウスへのゴナドトロピン投与によってアロマターゼ遺伝子のプロモーターへの ER β 、Brg-1 の結合が強まり、遺伝子の転写が促進されることが明らかになった。

<結論>

ER β 転写共役因子複合体の精製によって、ER β の新規転写共役活性化因子 GIOT-4 を同定した。GIOT-4 はゴナドトロピンによって卵巣で発現し、Brg-1 を含む SWI/SNF 複合体を ER β にリクルートすることで ER β の転写活性を促進し、アロマターゼやアクチビンなどの卵胞発育に重要な遺伝子の発現を促進した。また GIOT-4 は自身がエストロゲンによって発現する ER の標的遺伝子でもあることから、GIOT-4 は卵胞発育過程の後半に見られる中枢と卵巣のポジティブフィードバック作用において重要だと考えられる。卵胞が成熟・分化して排卵するまでの過程において、GIOT-4 は ER β の転写共役活性化因子として作用し、ER β に卵胞発育促進の機能を発揮させるという役割を果たしているものと推測できる。

今回の実験では、マウスでの GIOT-4 のノックダウンができていない。GIOT-4 の生体での機能を更に調べるためには、ノックアウトマウスの作出や卵巣組織への RNAi 導入などで、卵巣組織での実験をさらに進める必要がある。また、GIOT-4 は ER α に対しても転写共役活性化因子であることから、卵胞発育以外の機能についても解析する価値があると考えられる。