

審査の結果の要旨

氏名 神津 円

本研究は、生体内で多彩な生理機能を発揮するエストロゲンの受容体の一つ、エストロゲン受容体 (ER) β についての分子機構の解明を試みたものである。ER β が転写共役因子と複合体を形成して標的遺伝子の転写を制御するという点に着目して、ER β の新たな転写共役因子を探索、同定をしており、以下のような結果を得た。

1. 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 細胞株を樹立して大量培養を行い、生化学的手法を用いて ER β 相互作用因子複合体の精製を行った。ER β の新規相互作用因子として GIOT-4 を同定した。
2. GIOT-4 はゴナドトロピン (性腺刺激ホルモン) によって卵巣で発現する蛋白質であるとされていたため、卵巣顆粒膜細胞由来である KGN 細胞を用いて、GIOT-4 の mRNA がゴナドトロピンとエストロゲンによって増加することを RT-PCR 法で確認した。免疫共沈降と GST pull down の実験によって、GIOT-4 はリガンド非依存的に ER に直接結合することが示された。
3. ER β は卵巣顆粒膜細胞内に発現し、卵胞発育に重要な機能を発揮すると考えられているため、卵巣顆粒膜細胞における ER β と GIOT-4 の作用を解析した。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と、KGN 細胞において、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いう結果が得られた。
4. 精製の結果から、SWI/SNF 複合体の構成因子である Brg-1 が ER β 、GIOT-4 と複合体を形成している可能性が考えられた。免疫共沈降実験を行ったところ、Brg-1 と、SWI/SNF 複合体の別の構成因子 Ini-1 が GIOT-4 の存在下で 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が GIOT-4 を介して Brg-1 を ER β に強く結合させることが明らかになった。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、卵巣の顆粒膜細胞に発現した 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によって 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。
5. GIOT-4 の生体内での機能をより明確にするために、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 の遺伝子について ChIP アッセイを行った。ER β と GIOT-4 を KGN 細胞に発現させると、GIOT-4 の存在によって、ER β と SWI/SNF 複合体によるこの二つの標的遺伝子の転写が促進される、という結果が得られた。また、KGN 細胞をゴナドトロピンで刺激すると、ER β 、Brg-1、Ini-1 のプロモーターへの結合が強まり転写が促進されるという同様の現象が認められた。
6. ゴナドトロピンを投与したマウスの卵巣では GIOT-4 の mRNA が増加しており、同

時にアロマターゼとアクチビンβAのmRNAも増加した。この卵巣を用いてChIPアッセイを行ったところ、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ERβ、Brg-1の結合が強まり、遺伝子の転写が促進されることが示された。

以上、本論文はエストロゲン受容体(ER)βの新規転写共役因子GIOT-4が、Brg-1を含むSWI/SNF複合体をERβにリクルートすることでERβの転写活性を促進し、その結果、卵胞発育に重要な遺伝子の発現を促進するという機能があることを明らかにした。

今回の研究で、卵胞が成熟・分化して排卵するまでの過程において、ゴナドトロピンとエストロゲンがERβを介して卵胞発育を促進するという生理機能の分子機構の一端が解明されており、学位の授与に値するものと考えられる。