

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 18 年度博士課程 進学
氏名 岡田麻衣子
指導教官 加藤茂明

論文題目 新たな女性ホルモン受容体共役因子群の機能解析

第一章 序論

エストロゲンは広範な臓器を標的として生理作用を発揮する主要な女性ホルモンである。中でも、女性生殖器の発達・維持は、性差を規定する主要な生理作用の一つである。エストロゲンは第二次性徴期、妊娠時、月経周期に応じて増加し、乳腺や子宮などの女性生殖器の発達・成熟を司っている。いずれの生理作用も、エストロゲンに応じた急速な標的組織の細胞増殖に起因する。従って、エストロゲン依存的な細胞増殖の分子機構の解明は、エストロゲンの生理作用を理解する上で必要不可欠である。

エストロゲン受容体 ($ER\alpha/\beta$) は、このようなエストロゲンの生理作用を担う最も重要な因子である。ER は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、エストロゲン依存的な標的遺伝子発現制御を行うことでその生理作用を発揮すると考えられている。このような ER の転写活性化能はクラスの異なる転写共役因子複合体群により制御されることが明らかになりつつある^{1,2}。従って、新たな複合体群の探索・解析は、エストロゲンによる細胞増殖作用機構の解明の分子基盤となることが期待される。

生体内の細胞は、その機能に応じた細胞周期を進行させることで増殖するが、その主たる制御機構は、Cyclin タンパクファミリーの細胞周期依存的なタンパク発現制御である。ユビキチン・プロテアソーム系がこの主な制御を担っており、周期的に Cyclin タンパク群を分解している。しかしながら、エストロゲンの細胞増殖作用と細胞周期制御との関連や、その分子機構は未知である。

以上より、本研究では細胞周期に応じた $ER\alpha$ の機能に着目して新規 $ER\alpha$ 相互作用因子群の同定を試みた。本研究ではこれら因子群の機能解析を通じて、エストロゲン依存的な新規細胞増殖制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。

第二章 細胞周期依存的なER α の転写制御機構の解析

各細胞周期におけるER α の転写活性化能を検討するため、同調培養系を用いてエストロゲン依存的なER α の転写活性化能を検討した。その結果、エストロゲン依存的な転写活性化能は細胞周期依存的に変動することが示された。エストロゲン依存的なER α の転写活性化能はS期には強く、M期には低下することが示された。そこで、生化学的手法を用いて、M期ER α 相互作用因子群を精製・同定した。その結果、M期におけるER α 転写活性を抑制する因子群として、NuRD型クロマチン構造変換因子複合体の構成因子群を同定した。以上より、ER α の転写活性化能には細胞周期依存性が存在し、M期にはその転写活性化能が減弱していることが明らかとなった³。

第三章 エストロゲンによる細胞周期進行制御機構の解析

エストロゲンによる細胞増殖促進作用は、エストロゲン結合型ER α により誘導される標的遺伝子群を介してG1期からS期の進行が促進されることで発揮されると考えられている。しかしながら、細胞周期の各ステージにおけるエストロゲン作用は未知である。加えて、転写機能の低下しているER α のM期における役割も不明である。そこで本章では、エストロゲンによる各細胞周期進行作用に着目し、ER α の新規機能の探索を試みた。

はじめに、各細胞周期の進行に対するエストロゲンの影響を検討した。エストロゲン依存的な増殖能を有するER α 陽性乳癌細胞株、MCF7細胞を用いた。その結果、エストロゲンはER α を介してM期からG1期の進行を促進することを見出した。M期からG1期への移行には、Cyclin B1のタンパク分解が必須である。そこでまず、エストロゲンがM期におけるCyclin B1のタンパク分解制御を調節する可能性を検討した。その結果、M期におけるCyclin B1のタンパク量がエストロゲン及びER α 依存的に減少することを見出した。この反応はプロテアソーム阻害剤より抑制されることから、Cyclin B1はユビキチン・プロテアソーム経路によりタンパク分解レベルで制御されていることが示された。以上より、M期にはエストロゲンによるCyclin B1タンパクの分解制御機構が存在することが明らかとなった。

続いて、この反応がER α の直接作用か否かを免疫沈降法により検討した。その結果、ER α がCyclin B1と相互作用すること、ER α と相互作用するCyclin B1はエストロゲン依存的にポリユビキチン化されることを見出した。そこで、*in vitro*ユビキチン化アッセイにより、M期ER α 自身がユビキチンリガーゼ複合体を形成する可能性を検討した。その結果、M期に形成されるER α 複合体はCyclin B1を基質とするユビキチンリガーゼ活性を有することを見出した。以上より、M期ER α はCyclin B1との相互作用を介して、エストロゲン依存的なタンパク分解制御を行う可能性が示唆された。

そこで、M期特異的ER α ユビキチンリガーゼ活性を仲介する活性中心因子及び活性制御因子群の探索を行った。抗ER α 抗体カラムを作成し、内在性ER α の相互作用因子群の精製系を確立した。この系を用いてM期に同調したMCF7細胞抽出液より、多数のM期ER α 相互作用因子群を同定した。これら相互作用因子群の一つとして、UBE3Cタンパクを同定した。UBE3Cは機能未知因子であるが、HECTドメインを有することからユビキチンリガーゼであることが予測される。そこで、免疫沈降法によりUBE3CとER α 及びCyclin B1との相互作用を検討した。その結果M期において三者は複合体を形成していることが明らかとなった。

以上の結果より、エストロゲンがM期からG1期への細胞周期進行促進作用を有することが示された。さらに、ER α がM期特異的にユビキチンリガーゼ複合体を形成してタンパク分解制御を行うことにより、このようなエストロゲン作用が発揮される可能性が示唆された。

第四章 エストロゲン依存的な増殖促進作用を担うM期特異的ER α ユビキチンリガーゼ複合体の同定及び機能解析

エストロゲン依存的な Cyclin B1 の分解における UBE3C の機能を解析するため、FLAG-tag 融合 UBE3C を恒常的に発現する MCF7 細胞株を樹立した。ER α 複合体のユビキチンリガーゼ活性は M 期特異的であることから、まず、UBE3C と ER α との相互作用を検討した。その結果、両因子の相互作用は M 期特異的であることを見出した。また、M 期 UBE3C 複合体を FLAG-M2 agarose を用いたアフィニティー精製により取得し、グリセロール密度勾配遠心法によりサイズ分画を行ったところ、UBE3C は ER α と複合体を形成することが示された。さらに、UBE3C/ ER α 複合体が CCNB1 を基質とするユビキチンリガーゼであることが、*in vivo/vitro* にて明らかになった。

次に、UBE3C/ ER α 複合体のユビキチンリガーゼ活性における ER α の機能を検討した。M 期の UBE3C、ER α タンパクを 293F 細胞から調整した。これらのタンパクを用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行ったところ、各々のタンパク単体では活性を有しなかったが、UBE3C と ER α の両因子共存下では Cyclin B1 がユビキチン化された。従って、ER α は、UBE3C による CCNB1 のユビキチン化において、アダプタータンパクとして機能することが明らかとなった。

これまで、M 期のタンパク分解制御はリン酸化・脱リン酸化による迅速な反応により制御されることが知られている。第三章において、M 期 ER α 相互作用因子として UBE3C と共に脱リン酸化酵素である PP2A 複合体が同定されている。そこで、PP2A 複合体がエストロゲン依存的な Cyclin B1 の分解に関与する可能性を検討した。PP2A 複合体特異的な脱リン酸化活性阻害剤であるオカダ酸の処理により、エストロゲン依存的な Cyclin B1 の分解及び M 期 UBE3C 複合体の *in vitro* でのユビキチンリガーゼ活性が抑制された。さらに、オカダ酸を処理により UBE3C と ER α との相互作用が減弱することが示された。以上より、PP2A 複合体はエストロゲン依存的な Cyclin B1 の分解を正に制御する因子であることが示された。またその作用機序として、PP2A 複合体が、M 期 UBE3C/ ER α の複合体形成を促進する可能性が示唆された。

最後に、UBE3C/ ER α 複合体が、エストロゲン依存的な細胞増殖に与える影響を検討した。siRNA を用いた UBE3C のノックダウン法により、UBE3C はエストロゲン依存的な M 期/ G1 期移行の促進に必要であることを見出した。さらに、UBE3C はエストロゲン非存在下の細胞増殖には関与しないが、エストロゲン依存的な細胞増殖促進に必要であることが示された。

以上の結果より、エストロゲンによる M 期から G1 期への進行促進作用は、M 期特異的に形成される、UBE3C/ ER α ユビキチンリガーゼ複合体を介して発揮されることが示された。

第五章 総合討論

1. 細胞周期依存的な ER α の転写活性化能及びユビキチンリガーゼ活性の同定

本研究では、ER α がエストロゲン依存的な転写因子であるだけでなく、エストロゲン依存的なユビキチンリガーゼ複合体の一構成因子として機能することを見出した。細胞周期依存的に機能が変換することを見出した。ER α は G1/S 期には転写活性化共役因子群と複合体を形成し、M 期にはユビキチンリガーゼ構成因子と複合体を形成する。これまでに、ER α は多数の複合体を形成することが報告されてきたが、本研究では、ER α が細胞周期依存的に異なる複合体を形成することで、その機能を変換させることを初めて見出した。

2. M期特異的UBE3C/ER α ユビキチンリガーゼ複合体の同定

本研究ではCyclin B1タンパクがER α を介してエストロゲン依存的に分解されることを見出した。さらに、ER α のエストロゲン依存的なユビキチンリガーゼ活性を担う因子UBE3Cを同定した。UBE3CはHECT型ユビキチンリガーゼの一つである。HECT型ユビキチンリガーゼは、一般に単体で機能することが知られている。しかし、本研究によりUBE3CによるCyclin B1へのユビキチン化反応にはER α が必要であることが明らかとなった。従って、タンパク分解制御機構において、ER α はアダプタータンパクとして機能すると考えられる。以上より、転写制御機構及び分解制御機構の両方で、ER α はエストロゲン依存的な標的タンパク特異性を規定する役割を担うことが新たに示唆された。

3. 新規エストロゲン依存的増殖制御機構の同定と今後の展望

本研究では、エストロゲン依存的な細胞増殖がG1/S期移行の促進作用に加え、M/G1期移行の促進作用に起因することを見出した。さらに、前者の制御がER α による転写制御機構によるのに対し、後者の制御はER α によるタンパク分解制御という、ER α の新規機能に起因することが明らかになった。以上より、エストロゲン依存的な細胞増殖機構の一つとして、細胞周期に応じた“転写機能”から“分解機能”へのER α 機能変換という新しい分子機構が存在する可能性が示唆された。今後は、UBE3Cのノックアウトマウスを作製することで、エストロゲン標的組織における、タンパク分解制御を介したエストロゲン増殖作用の重要性を検討していく必要がある。一方で、エストロゲン依存的な細胞増殖機構の解明は乳癌などのホルモン依存性疾患に対する新規治療法の開発の基盤となる。従って、UBE3Cが乳癌の増悪に関与するか否かを個体レベルで検討し、エストロゲンの病理作用の一端を解明することが重要な課題である。

以上、本研究では、細胞周期依存的なエストロゲン受容体機能を介した女性ホルモンの細胞増殖作用機構の一端を明らかにすることができた。

<Reference>

1. Takezawa, S., Yokoyama, A., Okada, M., Fujiki, R., Iriyama, A., Yanagi, Y., Ito, H., Takada, I., Kishimoto, M., Miyajima, A., Takeyama, K., Umesono, K., Kitagawa, H., Kato, S. A cell-cycle dependent co-repressor mediates photoreceptor cell-specific nuclear receptor function. *EMBO J.* **26**, 764-74. (2007)
2. Ohtake, F., Baba A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 562-6. (2007)
3. Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S. Switching of chromatin-remodeling complexes for oestrogen receptor-alpha. *EMBO Rep.* **9**, 563-8. (2008).