

転写制御におけるステロイドレセプター の細胞内動態の解析

小川 英知

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座
(竹家 達夫 教授)

平成11年1月7日 提出

目次

序論

材料と方法

第1章 GFP融合蛋白質を用いたステロイドレセプターの細胞内動態解析系の開発

- 1-1 温度感受性耐性GFP変異体の作製
- 1-2 hGRの核移行の経時的観察
- 1-3 hRGの核移行におけるリガンド特異性
- 1-4 hGR-GFP融合蛋白質の転写活性化能
- 1-5 GFP融合蛋白質の特性

第2章 グルココルチコイドレセプターの局在制御機構

- 2-1 GRの核移行誘導因子
- 2-2 GRの核排出
- 2-3 GRの欠失変異体の細胞内局在
- 2-4 GRの細胞内制御に対する仮説
- 2-5 熱ショック蛋白質とステロイドレセプターの局在パターン
- 2-6 GRと熱ショック蛋白質HSP90
- 2-7 GR欠失変異体とHSP90の融合蛋白質の局在パターン
- 2-8 GR-HSP90-GFP融合蛋白質の転写活性化能
- 2-9 ERの細胞内局在制御

第3章 グルココルチコイドレセプターの核内転写複合体の形成機構

- 3-1 GRと介在因子TIF-2の細胞内相互作用
- 3-2 TIF-2のGRへの転写活性亢進作用
- 3-3 TIF-2の細胞内局在パターンとGRの動態変化

- 3-4 RARαも TIF-2 nuclear fociに局在できる
- 3-5 標的配列の局在パターン
- 3-6 TIF-2を足場とする複合体形成
- 3-7 TIF-2 nuclear fociの核内での足場領域と細胞分画化
- 3-8 核マトリックス上での複合体形成
- 3-9 TIF-2の核内複合体形成と核マトリックス結合に関与する領域
- 3-10 核内複合体形成 / 核マトリックス結合と転写亢進作用

第4章 考察

(I) 第1章

GFP変異体

GR-GFP融合タンパク

(II) 第2章

核移行を誘導する因子

GRの局在化制御

GRの細胞質での機能

(i)細胞質での他の因子制御 (ii) 細胞種特異的なGRの制御

(III) 第3章

fociと核内レセプターの相互作用および転写活性化

核内での転写複合体形成

核マトリックスにTIF-2は結合する

TIF-2の機能ドメイン

nuclear foci形成領域と核マトリックス結合領域

(A) nuclear foci形成について (B) 転写活性化について

HAT活性とnuclear foci

第5章 参考文献

序論

生体の基本構造である細胞は、増殖や分化、細胞死や恒常性維持といった生命現象を様々な外界のシグナルによって制御されている。このような外界シグナルとしては、増殖因子、神経伝達物質、ホルモン、ビタミン、熱ショックなどがあげられ、細胞がこれらのシグナルを正確に判断し、遺伝子発現を伴って応答することは生理機能の維持に重要である (Fig. 1-1)。このようなシグナルは、親水性、分子量などの化学的な性質の違いから細胞への進入経路が異なっており、これらのシグナルを受けるため、細胞にはそれぞれに適合したレセプターが必要である。例えば、増殖因子、神経伝達物質、ペプチドホルモンなどの親水性物質は、多くの場合細胞膜を透過できないために、細胞膜にレセプターが存在する必要がある、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミンといった脂溶性物質は細胞膜や核膜を透過できることから細胞質や核などでレセプターがそれらのシグナルを待ち受けることが可能である。このように、さまざまなシグナルを受容するにはそれぞれのシグナルに適応したレセプターが、シグナルを受けるのに最も適した領域に局在することが不可欠である。レセプターが受けたシグナルは、その下流に存在するシグナル伝達分子へと伝えられ、最終的にシグナルの多くは、核内で転写制御因子に伝えられる。転写因子はそれぞれのシグナルに対応した標的遺伝子を様々な介在因子とともに発現を制御している。このようなシグナル伝達分子や転写因子も、レセプターと同様にそれぞれがシグナルの種類や伝達順序に応じて細胞内の最適な場所に局在し機能する必要がある。またシグナルの伝達は経時的に、一定の順序を持って進行すべきものであり、必ず連続的に伝えられるものである。つまり、細胞外からのシグナル伝達経路とその機構を解明するためには、これらの分子が細胞内のどこに局在し、いつ機能しているかを解析することが必須である (Fig. 1-2)。

本研究では、この問題に対してステロイドホルモンの細胞内シグナル伝達機構をモデル系として着目した。ステロイドホルモンとは、性ホルモンと副腎皮質ホルモンの2種に大別され、いずれもコレステロール誘導体で、ステロイド骨格を持つ分子量300程度の脂溶性低分子の総称である。例えばグルココルチコイドホルモンは、糖代謝、ストレス抵抗性、抗炎症反応、免疫抑制作用に関わることが明らかになっており、現在はリュウマチ、喘息、薬物アレルギーなど多くの疾患治療にも用いられ、薬理的にも重要な分子である。このようなステロイドホルモンは、内分泌腺から分泌され、血流によって運搬され遠く離れた標的細胞の機能を調節している。この働きの非常に興味深い点は、体内のほぼすべての細胞がホルモンと接触するにもかかわらず、ごく限られた細胞のみがこのホルモンに応答するという点である。この問題に

対してステロイドホルモンの研究の第一段階は、標的細胞にホルモンが蓄積するといった観察事実から始まった。Jensenらによってトリチウムでラベルしたステロイドホルモンであるエストラジオールが調製され、これを雌ラットに注入すると、標的と考えられていた子宮に長時間保持されていることが判明した。さらにEdelmanは、オートラジオグラフィーを用いて、数分の間にステロイドホルモンが細胞内に蓄積されることを組織切片を用いて明らかにした。この研究はStumpfらによってさらに詳細な解析がなされ、標的細胞にまだ何も変化が認められない短時間に、ステロイドホルモンが核に局在する傾向があることが証明された。この結果は、ステロイドホルモンの作用機構が遺伝情報に関与することを強く示唆し、細胞にはホルモンの受容体（レセプター）が存在するという概念が登場した。この概念によって、細胞膜、核膜を自由に透過するステロイドホルモンが、迅速に細胞内に保持されることや、比較的簡単な構造を持つステロイド分子が、生体内でさまざまな機能を果たすことが説明されるようになった。このような概念上の分子には2つの条件が課せられた。一つにはレセプターはステロイドホルモンそれぞれの標的細胞に特異的に存在し、それ以外の細胞には存在しないこと、二つ目にレセプターはそのホルモンに高い親和性を有し、生理作用の異なる分子には親和性を示さないことである(O'Malley BW, et al., 1976)。このような観点から、トリチウムラベルされたステロイドホルモンを指標に沈降度8-9Sの分子が同定されていたが、1985年にEvansがグルココルチコイドレセプター(GR)を、Chambonがエストロゲンレセプター(ER)のクローニングに成功することで、はじめてステロイドホルモンレセプターの実体が明らかになった(Hollenberg SM, et al., 1985; Green S, et al. 1986)。このようにして、体内で分泌されたホルモンが遠く離れた細胞に作用するには、標的細胞に発現するステロイドホルモンレセプターに結合することが重要であることが明らかになった。

以上のように、これらホルモンの伝達機構の研究は、リガンドを標識することによって常にその局在と時間を手がかりに進められてきた。このようないつ、どこでといった情報が必要なのは、組織レベルでの解析だけでなく、より詳細な細胞内での解析にも重要である。細胞に到着したホルモンがどのように核へ伝えられるのかを理解するために、ステロイドホルモンレセプター分子の空間的、時間的な制御を明らかにすること、さらに細胞内の微細な蛋白質の挙動を解析するために、細胞の生理状態をいかにして反映し観察するかということが重要であると考え、本研究ではGreen Fluorescent Protein (GFP)を用い細胞内でのグルココルチコイドレセプター(GR)分子の動態をモデル系とした細胞内蛋白質の可視化系を構築することから始めた。

GFPはアメリカ・ワシントン州北部沿岸のサンジュアン島フライデーハーバーの海面近くに生息する *Aequorea victoria*（オワンクラゲ）の持つ蛋白質である。*Aequorea victoria*は外からの刺激に対して、photocyteと呼ばれる黄色・球状の細胞組織に存在する発光液が海水中のカルシウムに反応することによ

て緑色の蛍光を発する。この発光液中には2種類の蛋白質が存在することが明らかにされ、一つがGFPでもう一方がエクオリンである。エクオリンは、蛋白質であるアポエクオリンに発光種のセレンテラジンと酸素分子が結合した複合体として存在し、これにカルシウムイオンが結合することでコンフォメーションに変化が起り、セレンテラジンの酸化が開始してエネルギーが生じ、試験管内では465nmの青い光を発する。ところがエクオリンは、*Aequorea victoria*の生体内ではその発光エネルギーを光として放出せず共存するGFPに与える。この現象はRadiationless energy transferと呼ばれおり(Morise et al.,1974)、GFPはこのエネルギーによって励起されて、約508nmの緑色の蛍光を発する。精製した蛋白質の解析からGFPの励起スペクトルは395nmと475nmに極大があり、発光スペクトルは508nmに極大があることが判明している(Morise et al.,1974)。また1992年には遺伝子の塩基配列が決定された(1992, Prasher et al.)。 *Aequorea victoria* は少なくとも3つのGFP遺伝子をもっており、異なる遺伝子に由来する数種類のcDNAがPrasher (1992, Prasher et al.) と井上 (1994, Inouye et al.)によって独立に単離されている。GFPによる蛍光発光の分子機構はまだ完全に明らかではないが、65から67番目のアミノ酸であるセリン (S)、チロシン (Y)、グリシン (G) が環状化し酸素分子による酸化を受けて発色団が形成されると考えられている。(Shimomura O, et al. , 1973 ; Ward et al.,1989)

GFPcDNAの単離によって大腸菌を用いて組み換え蛋白質の合成が可能になった。大腸菌で合成された蛋白質も *Aequorea victoria* から精製したGFPと同様のスペクトルを有するため、異種生物細胞内での発現および蛍光発光の可能性が示唆された(1994, Inouye et al.)。さらに、大腸菌を用いてGFP変異体のスクリーニングも可能であり、目的に応じて有用な変異株を遺伝子操作を用いて得ることが試みられるようになった(Heim., 1994; Yang, T. T.et.al,1998; Siemering, K. R.,1996; Anderson, M. T.,1996)。

GFPの特徴は、エクオリンからのエネルギーを比較的長波長のUV光 (約360-400nm) によって代用することができ、励起された蛋白質が強い蛍光を発することにある。さらに蛍光発光には *Aequorea victoria* 特有の基質を一切使用せず、大腸菌を例にするように他の生物内においても蛍光発光が可能である。これは、 β -ガラクトシダーゼやホタルから単離されレポーターアッセイに広く用いられているルシフェラーゼが酵素として用いられているのとも大きく異なる点である。また蛍光抗体法のように細胞を固定せずに観察が可能であることは、生細胞の蛍光ラベルにとって画期的なメリットである。GFPはそれ自身安定であり固定しても蛍光発光に問題はない。さらにGFPは比較的分子量が小さく(27kDa)、サブユニット構造を持たない単一ペプチドであるため遺伝導入が比較的容易である(Prasher et al.,1992 ; Inouye et al.,1994)。

光学的な側面からも励起光、蛍光がFITC (ex=490nm em=520nm) に類似しているため、新しくGFP用のシステムを構築する必要なくFITC用のフィルターをそのまま使用することで、従来の蛍光顕微鏡を用いての観察が可能である。さらにGFPはFITCなどの蛍光試薬と違い退色が極めて少なく長時間の観察が可能

である(Chalfie et al.,1994)。

1994年になると線虫の特定の細胞で特異的に活性化されるプロモーターの下流にGFPをつないで、生きたまま線虫の細胞ラベルに成功した報告がなされた(Chalfie et al.,1994)。続いてショウジョウバエのRNA結合蛋白質とGFPとの融合蛋白質を用いてショウジョウバエ初期胚におけるこの蛋白質の局在パターンの可視化に成功した報告がなされた(Wang et al.,1994)。このことから、GFPが生体での細胞系譜のマーカ遺伝子およびマーカ蛋白質として、さらに細胞内蛋白質の蛍光タグとして有用であることが示唆された。

本研究では、(I)生細胞における細胞内蛋白質の経時的観察システムを構築するために、GFPの改良および融合蛋白質の細胞内での機能維持について検証した。(II)さらにこのシステムを用いてステロイドホルモンをリガンドとしたグルココルチコイドレセプター(GR)の細胞質から核へのシグナル伝達機構を解析し、GRの細胞質保持機構のモデルを示した。(III)核内でのGRの転写調節機構について検討し、GRの転写複合体の形成とその局在について明らかにした。GFPを用いることにより、従来の手法では検討できなかった細胞レベルでの経時的、空間的なホルモンシグナリングの解析を行い、細胞外からのシグナルが細胞質や核内でどのような機構によって転写応答へと変化されていくかを明らかにした。

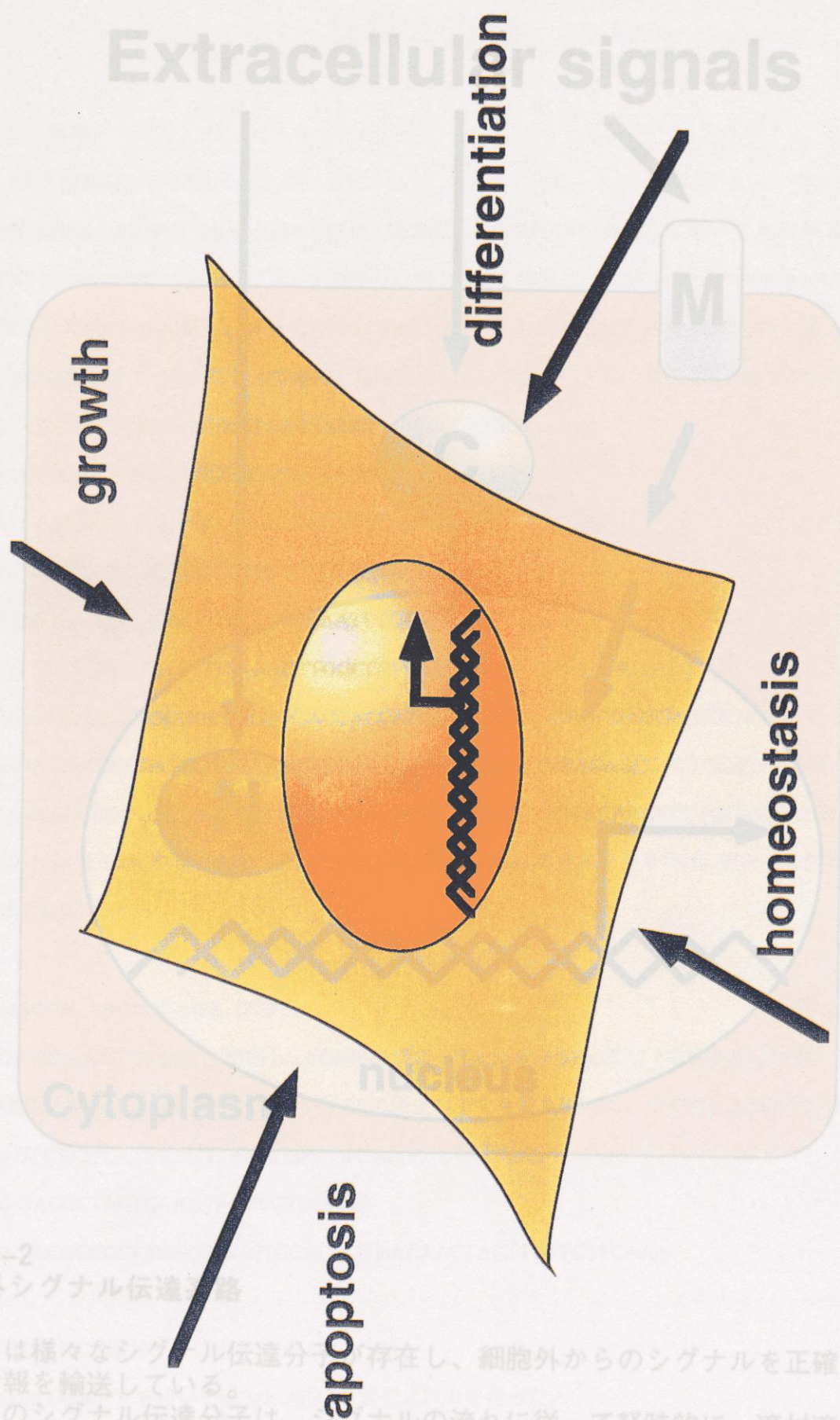


Fig. 1-2
細胞外シグナル伝達経路

細胞には様々なシグナル伝達分子が存在し、細胞外からのシグナルを正確に核まで情報を輸送している。これらのシグナル伝達分子は、シグナルの流れに従って経時的に、適材適所で機能している。

Fig. 1-1
細胞はどのように細胞外シグナルに応答し、遺伝子発現を調節しているのか？

Extracellular signals

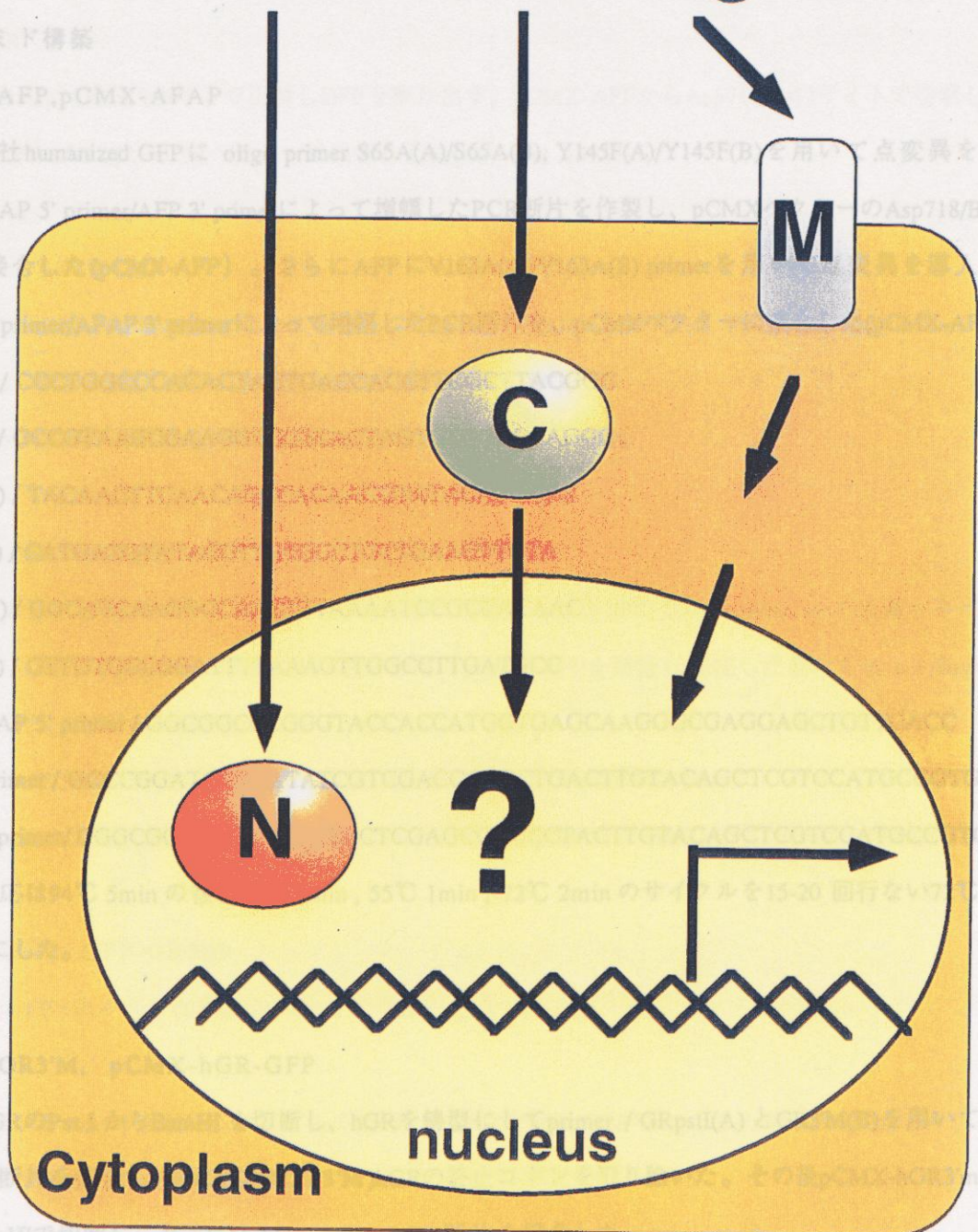


Fig.1-2

細胞外シグナル伝達系路

細胞には様々なシグナル伝達分子が存在し、細胞外からのシグナルを正確に核まで情報を輸送している。これらのシグナル伝達分子は、シグナルの流れに従って経時的に、適材適所で機能している。

材料と方法

プラスミド構築

pCMX-AFP, pCMX-AFAP

Clontech社humanized GFPに oligo primer S65A(A)/S65A(B), Y145F(A)/Y145F(B)を用いて点変異を導入しAFP, AFAP 5' primer/AFP 3' primerによって増幅したPCR断片を作製し、pCMXベクターのAsp718/BamHIサイトに接合した(pCMX-AFP)。さらにAFPにV163A(A)/V163A(B) primerを用いて点変異を導入しAFP, AFAP 5' primer/AFAP 3' primerによって増幅したPCR断片を、pCMXベクターに接合した(pCMX-AFAP)。

S65A(A) / CCCTGGCCCACTAGTGACCACCTTCGCTTACGGC

S65A(B) / GCCGTAAGCGAAGGTGGTCACTAGTGTGGGCCAGGG

Y145F(A) / TACAACCTCAACAGCCACAACGTATACATCATG

Y145F(B) / CATGATGTATACGTTGTGGCTGTTGAAGTTGTA

V163A(A) / GGCATCAAGGCCAACTTTAAAATCCGCCACAAC

V163A(B) / GTTGTGGCGGATTTTAAAGTTGGCCTTGATGCC

AFP, AFAP 5' primer / GGCGGCCCCGGGTACCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCC

AFP 3' primer / GCCCGGATCCTGATATCGTCGACCCGCCTGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG

AFAP 3' primer / CGGCGGATCCTGATATCCTCGAGCCGCCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG

PCRの反応は94℃ 5min の後、94℃ 1min , 55℃ 1min , 72℃ 2min のサイクルを15-20 回行ない72℃を7min の後4℃にした。

pCMX-hGR3'M, pCMX-hGR-GFP

pCMX-hGRのPst I からBamHI を切断し、hGRを鋳型にしてprimer / GRpstI(A) とGR3'M(B)を用いてPCRで増幅した断片を接合し、(pCMX-hGR3'M)hGRの終止コドンを取り除いた。その後pCMX-hGR3'modifyをPml I BamHIで切断し、そこに5' blun GFP PCR断片を接合した。

GRpstI(A) : ACCCTACTGCAGTACTCCTGGATG

GR3'M(B) : CCGCCGCCTAGGACGGTGCACGGTGAAAACACTTTGTCTTCAAA

5' blun GFP PCR断片

primer 5'blunt /AFAP 3' を用いてpCMX-AFAPを鋳型にPCRを行った。

5'blunt /GATATCACGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC

AFAP 3' / CGGCGGATCCTGATATCCTCGAGCCGCCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG

GFP*-GR

GFP-GRをAsp718/Sal Iサイトで切断しGFPを取り出す。pCMX-AFPからAsp718/Sal Iサイトで切断したAFP断片をGFPを切り出したGRベクターに接合した(Ogawa et al.,1995)。

pCMX- hGR550-GFP

primer GRClaI(A)と550-3M(B)によって増幅したfragment をhGR-GFPのCla I -PmlI siteに接合した。

GRClaI(A) : GGAAGGAATGATTGCATCATCGATAAAATTTCG

550-3M(B) : CCGCCGCACGTGGCTATCATATCCTGCATATAACAC

hGR595.3M, hGR595-GFP

pCMX-hGR3MのPstIサイトを切断し、切り出された断片を除去後T7 DNA polymeraseで末端を平滑化した(hGR595.3M)。primer 5'blunt2/ AFAP 3'を用いpCMX-AFPを鋳型に増幅した断片をPmacI/BamHIサイトに接合した(hGR595-GFP)。

5'blunt2 / CCCGAATCGATATCACGTGGCAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC

AFP 3' primer / GCCCGGATCCTGATATCGTCGACCCGCCTGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG

hGR500-GFP/ GFP-GR500

hGR-GFP GFP-GRそれぞれをEcoRI -PmlI で切断し接合した。

Tau-GFP

primer tau1 5'と tau1 3'を用いPCRによって増幅した断片をhGR-GFPのAsp718-PmlI siteへ接合した。

tau1 5':GGAGGAGGTACCACCATGCAGCAGCCTGATCTGTCCAAAGCAG

tau1 3':CGGCGGGTGCCTGGAGGCGGGTCAAAGAGAACGAATTAATGGGGTCC

pCMX-hGRΔAD3M, pCMX-hGRΔAD3M-AFAP

pRS-ΔAD (Hollenberg SM, et al.,1988) からAsp718-PstI断片を切り出し、pCMX-hGR3M, pCMX-hGR-GFPそれぞれのAsp718-PstI切断ベクターへ接合した。

pCMX-HSP90, pCMX-HSP903M, pCMX-HSP90-GFP

pBS-HSP90からHSP90 cDNAを含むAsp718-BamHI断片を切り出しpCMXの同サイトに接合した。

Primer (90aAFL2) / (HSP90a3M)によって増幅したPCR断片をAsp718-Afl2で切断したpCMX-HSP90ベクターに接合した (pCMX-HSP903M)。pCMX-HSP903Mの付加されたPmacIサイトとBamHIサイトを切断し5' blun GFP PCR断片を導入した (pCMX-HSP90-GFP)

(90aAFL2) GAGACCTTAAGGCAAAAGGC

(HSP90a3M) GGCGGATCCCAGGTGTCCGCCGTCTACTTCTTCCATGCGTGA

pCMX-HSP905M-GFP

Primer (90a5M)と90ABGLIIを用いたPCRによって作製した断片をpCMX-HSP90-GFPのAsp718/BglIIに組み込んだ。(pCMX-HSP905M)

(90a5M) GCCGCCGGTACCACCATGCCCGGGCCTGAGGAAACCCAGACCCAA

(90ABGLII) CCAATGCATCTGATGAATTTGAAATGAGCTC

pCMX-hER3M, pCMX-hER-GFP

primerER-Bgl2 / hER3M(B)を用いてhER cDNAを鋳型にPCRを行う。約700bpの断片をBgl2/BamHIで切断し、pCMX-hERの同サイトに導入した(pCMX-hER3M)。この操作によって付加されたPmacIサイト(TAKARA)とBamHIサイトを切断し5' blun GFP断片を接合する(pCMX-hER-GFP)。

pCMX-hGR-HSP90-GFP

pCMX-HSP905M-GFPのAsp718-SmaIサイトを切断したベクターを準備し、pCMX-hGR-GFPから切り出したAsp718-PmacI断片を接合した。

pCMX-hER-HSP90-GFP

pCMX-HSP905M-GFPのAsp718-SmaIサイトを切断したベクターを準備し、pCMX-hER-GFPから切り出したAsp718-PmacI断片を接合した。

pCMX-hGRDAD-HSP90-GFP

pCMX-HSP905M-GFPのAsp718-SmaIサイトを切断したベクターを準備し、pCMX-hGR Δ AD3M-AFAPから切り出したAsp718-PmacI断片を接合した。

pCMX-hGR550-HSP90-GFP

pCMX-HSP905M-GFPのAsp718-SmaIサイトを切断したベクターを準備し、pCMX-hGR550-GFPから切り出したAsp718-PmaCI断片を接合した。

pSG5-TIF-2-flag

pSG5-TIF-2 (Voegel JJ et. al, 1996)をBstXI/BamHIで切断し、primer TIFlag-A /TIFlag-Bを用いてPCRで増幅した約100bp断片を接合した。

TIFlag-A CCAAACCAGCTGCCTGGAATGGATATGATTAAGCAGGAGGGAGACACAACACGGAAATATTGC

TIFlag-B GGCGGCGGATCCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATGCAATATTTCCGTGTTGTGTCTCC

TIF-2欠失変異体

pSG5-TIF-2-ΔPstI

pSG5-TIF-2-flagのPstI サイトで切り出される断片を除去した後に接合した。

pSG5-TIF-2-ΔHAT

PvuIIの限定消化によって3246-4338bpの欠失を行った。

pSG5-TIF-2-ΔPstI/ΔHAT

ΔHATにΔPstIと同様の処理を行った。

pCMX-gal-CID-GFP

pCMX-hGR-GFPをAsp718/PmaCIで切断し、primer set.TIFCID-A/TIFCID-Bを用いてPCRによって増幅したTIF-2のCID(2821-3470bp)を導入し (pCMX-CID-GFP)、その後gal4 DBDをprimer Gal4-ASP/Gal4-3'XSを使用して増幅しAsp718/XbaIサイトに接合した。

TIFCID-A/GGCGGCGGTACCACCATGGGTAACAGTGCTTCTAGACCTACT

TIFCID-B/GGCCGGGGATCCACGTGAAAGTTTGGATCTTGCATGGG

Gal4-ASP/GGCGGCGGTACCACCATGAAGCTACTGTCTTCTATC

Gal4-3'XS/CGGCGGCCCCGGGTCTAGATCCGAAGTCCGGCGATACAGTCAACTG

gal-NMBD-GFP(gal-HAT-GFP)

gal-CID-GFPと同様にTIF-2の(3480-4380bp)の領域を増幅しpCMX-CID-GFPのCIDの代わりにNMBDを導入した後、gal4 DBDをprimer Gal4-ASP/Gal4-3'XSを使用して増幅しAsp718/XbaIサイトに接合した。

HAT-A/GCCGCCTCTAGAATGGGACAGCGGCCTAGTTAT

HAT-B/GGCGGCCACGTGGCCGCCGCAATATTTCCGTGTTGTGTCTCC

pCAGGS-TIF-2-flag

EcoRI/BamHIでTIF-2を含む全長配列を切り出しpCAGGSのEcoRI/BglIIサイトへ接合した。

細胞培養

COS-1 10T1/2 CV-1 Hela いずれの細胞も同様に10% FBS DMEMで通常培養し遺伝子導入前、2日間 10% FBS D-MEM とopti-MEM (GIBCO BRL)を2:8で混合した溶液で培養した。

遺伝子導入

6-8 $\mu\text{g/ml}$ のDNA 溶液と3-6 $\mu\text{g/ml}$ DMRIE-C (GIBCO BRL)を混合し20分静置する。等容量の細胞懸濁液と混ぜ6時間培養する。その後に培養液を交換しさらに36時間培養し解析に用いる。

レポーターアッセイ

COS-1 /CV-1細胞にeffector (pCMX-hGR-GFP など) 50 ng、reporter(MMTV-Luc) 400 ng b-gal (pCMX-bgal well間の遺伝子導入効率補正の為) 300 ng /well の割合で 24well dishを用いてリン酸カルシウム法または、DMRI-C(GIBCO BRL)によって遺伝子導入する。6時間培養後リガンドを加えさらに36時間培養する。ルシフェラーゼ活性をベクターガラクトシダーゼ活性で平均化した値を測定値とし、2-3点の平均値を用い解析を行った。

β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼアッセイ

24穴培養皿あたり1mlのPBSで2回洗浄した後、100 μl の細胞溶解液(25mM Tris- PO_4 (pH7.8), 15% glycerol, 2% CHAPS, 1% Lecithin, 1% BSA, 4mM EGTA, 8mM MgCl_2 , 1mM DTT, 0.4mM APMSF)を加え細胞抽出液を調製した。 β -ガラクトシダーゼアッセイ(Edlund et al.,1985)は、細胞抽出液50 μl に β -ガラクトシダーゼアッセイバッファー(60mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 10mM KCl, 1mM MgCl_2 , 40mM NaH_2PO_4 , 11mM ONPG, 42.9mM β -mercaptoethanol)を100 μl 加え37℃で20分保温した。酵素反応を1M Na_2CO_3 100 μl で停止させ、OD420を測定した。

ルシフェラーゼアッセイはプロメガ社の説明書に従い行なった。細胞抽出液20 μl にルシフェラーゼ活性測定用基質920mM tricine, 1.07mM $(\text{MgCO}_3)4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67mM MgSO_4 , 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270mM coenzyme A, 470mM luciferin, 530mM ATP)を100 μl 加え、活性をルミノメーターで測定した。

in situ DNA binding assay

TIF-2とhGR-GFPまたはhER-GFPをCOS-1細胞に導入し32時間培養する。GR/ERそれぞれのリガンドを添加し15分後にfociを形成している細胞を蛍光で検出しビオチン化したprimer (HRE-A/HRE-B)を等量混合し65°Cで20分間加熱してから2時間室温に静置する。その後DNA probeをpH7.4のPBSまたはTEに懸濁し1 µg/ulになるように希釈した後、核へ注入した。37°Cで2-5時間培養後0.5% tritonXCSKT bufferで一度洗浄し、4%ホルマリン溶液で固定をする。1:50の抗ビオチン抗体で染色し蛍光観察を行った。

核マトリックス分画

主に文献 (van Steensel B et.al., 1995)に従った

6cmまたは10cm培養皿へ遺伝子導入後の細胞を回収し一度PBSで洗浄後CSKTバッファーを加え氷上で3min静置した。

8000回転で30秒遠心した後上清を(A)分画とする。ペレットに対しEXバッファーを加えピペッティングによって攪拌した後氷上で3min静置した。

8000回転で30秒遠心した後上清を(B)分画とした。

さらにペレットに対しDNaseIバッファーを加えピペッティングによって攪拌した後37°Cで30分インキュベートする。8000回転で30秒遠心した後上清を(C)分画とした。

ペレットに対しNaClバッファーを加えピペッティングによって攪拌した後氷上で3min静置する。

8000回転で30秒遠心した後上清を(D)分画とした。

ペレットに対しUREAバッファーを加えピペッティングによって攪拌し(E)分画とした。(A)-(E)の分画を定量的に7.5% SDS-PAGEに泳動し、セミドライブロッターを用いてニトロセルロースメンブレンに転写した(2mA/cm)。特異的抗体およびHRP二次抗体と反応させたのちECL kit (Amesham)を用いてバンドを検出した。

CSK buffer

10mM PIPES (pH 6.8), 100mM NaCl, 300mM sucrose, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM PMSF

CSKT buffer

CSK buffer 0.5% TritonX-100

EX beffer ((NH₄)₂SO₄ buffer)

10mM PIPES (pH 6.8), 100mM NaCl, 300mM sucrose, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM PMSF

Digestion buffer

DNase I 200 unit/ml+ 10mM PIPES (pH 6.8), 50mM NaCl, 300mM sucrose, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA , 1mM PMSF

NaCl buffer

10mM PIPES (pH 6.8), 2M NaCl, 300mM sucrose, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA , 1mM PMSF

Urea buffer

8M Urea, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris. (pH8.0)

in situ 核マトリックス分画

上述と同様のバッファーを培養皿に培養したままの状態に添加した。細胞がはがれやすい場合にはEX バッファー添加時にNaTTを0.5-1.0mM添加し核マトリックス構造を安定化させた(van Steensel B et.al., 1995)。観察前にDAPIかHoechst33342を添加しChromatine DNAが完全に溶出されたのを確認した。

蛍光抗体染色と蛍光観察

4%ホルマリン水溶液を加えて4℃で30分固定した。HanksまたはPBS溶液に最終濃度0.1%のtritonX100を加えたHanksT またはPBSTでよく洗浄した。

メタノールを加え-20度で30分静置後によく洗浄しブロッキングのために1% BSAを溶かしたPBSTを加え1時間以上振盪した。最適濃度の1次抗体を希釈し加え(PCAF/p300 1:50)、室温で1時間振盪したのち3回洗浄した。さらに2次抗体を加え1時間振盪した。よく洗浄した後Hoechst33342またはDAPIを適量添加し10分振とう後PBSで洗浄し観察した。

GFPの場合、遺伝子導入後36~48時間培養し蛍光を観察する。蛍光の観察時には培養液をPBSで洗浄し、opti-MEM を加え観察する。間接蛍光抗体法の場合も染色後PBSに置換し観察する。

ZWISS Axiophoto を用いレンズは水浸レンズ40Xまた63Xを用い、フィルターはFITC、Tex Red、UVのfilter set を用いる(Ogawa et.a,1995;1997)。

免疫沈降法

COS-1細胞にhGR-GFPとTIF-2-flagの発現プラスミドを共発現させ36時間培養する。1 μ MのDexを添加した後2時間培養し細胞を回収する。回収した細胞をPBSで一度洗浄し、抽出バッファーを加え液体窒素で冷却した後氷上でゆっくり融解する。この操作をもう一度繰り返し、15000回転15分遠心した後上清を細胞抽出液として回収する。

アガロースA/Gビーズに抗Flag抗体とmouseの正常血清をそれぞれ1時間以上4℃で吸着させ、洗浄バッファー

でよく洗浄した。初めに、正常血清を吸着させたビーズを調製した細胞抽出液と混ぜ2時間4℃で緩やかに混合する（ブレイクフリー）。10000回転で1分遠心し上清を回収しビーズは3回洗浄する（非特異的結合のコントロール）。回収した上清に、抗flag抗体を吸着させたビーズを混ぜ2時間4℃で緩やかに混合する。10000回転で1分遠心し上清を回収し（上清サンプル）、ビーズは3回洗浄したのちにペレットサンプルとして回収する。ペレットサンプルは全量の1/2、上清サンプルは全量の1/10を95℃10分間熱した後に遠心して上清を7.5% SDS-PAGEをおこなった。

ウエスタンブロッティング

泳動した SDS-PAGEゲルをセミドライプロッターを用いてニトロセルロースメンブレンに約120分転写した（2mA / cm）。バッファーは SDS-PAGE泳動バッファーに10%のメタノールを加えたものを用いた。転写したメンブレンを1時間以上5%スキムミルクを用いてブロッキングし、特異的抗体を最適濃度に希釈して（GFP 1:1000）添加し1時間室温で振盪する。3回PBSTで洗浄後、HRP二次抗体と1時間反応させ3回PBSTで洗浄する。ECL kit (Amesham) を用いてバンドを発色させX線フィルムに感光させバンドを検出した。

第1章

本研究の初段階として、生細胞内蛋白質の動態を可視化するために、以下の条件を兼ね備えた標識物質を用いなければならないと考えた。(1)標識物質の細胞内毒性が少ないこと。(2)細胞内で標識する際に、細胞が生きたままで基質などが加えられるか、または基質が必要ないこと。(3)標識した蛋白質の機能を阻害しないこと。(4)その標識物質自体に局在性、分泌性などの性質がないこと。(4)細胞内の様々な生理状態の変化においても標識物質が安定であること。(5)標識物質の感度が現在の光学技術で容易に観察できること。(6)標識した細胞を培養したままで長時間観察が可能なこと。

以上の条件を満たすものとして、北米沿岸に生息する *Aequorea victoria* が持つユニークな蛍光蛋白質 Green Fluorescent Protein (GFP)(Morise et al., 1974)を用いた実験系の開発から試みた。

結果

1-1 温度感受性耐性GFP変異体の作製

Green Fluorescent Protein (GFP)を生細胞のマーカー蛋白質として用いるために、哺乳類培養細胞での発現およびその蛍光観察を試みた。COS-1細胞に野生型GFP cDNA(AGP-1;Inouye et.al., 1994)をコードする発現ベクターを一過的に遺伝子導入し、36時間後に蛍光観察を行った。しかし、強力なプロモーターを用いた過剰発現系においても、野生型GFPの蛍光はほとんど検出できなかった(Fig.1-1 A)。そこで発現プラスミドの改善や培養条件など様々なパラメーターを検討した結果、哺乳類細胞において培養温度を一時的に30℃まで低下させると、強い蛍光を検出できることを見出した。そこで、30℃においても活発に分裂を繰り返すことができる魚類細胞にGFPを遺伝子導入し観察すると、低温度培養条件で蛍光を検出した哺乳類細胞よりも著しく強い蛍光を発することが判明した(Ogawa et.al., 1995)。これらの結果はGFPが高温度感受性を示すことを強く示唆した (Lim CR, et al. , 1995; Ogawa H, et al. , 1995; Siemering KR, et al. ,1996; Kimata Y, et al., 1997)。事実、GFPが最初に生体内でマーカー遺伝子として用いられたのは25-30℃で培養できる線虫、ショウジョウバエであり、個体の中でもGFPの蛍光を効率良く検出することができていたことに矛盾しない(Chalfie M et.sl., 1994; Wang S et.sl., 1994)。このようにGFPを発現させている細胞の培養温度を制御するだけで容易に蛍光を検出できたものの、哺乳類細胞において短時間でも培養温度を低下させるのは、細胞の生理状態に大きな影響を与え、本来の分子機能を損なうおそれがある。そこで、37℃

でも強い蛍光を発する温度耐性GFP変異体の作製を試みた。

考慮するパラメーターとして、翻訳効率、発色団の改良、細胞内安定性が考えられ、それらに關与すると考えられる変異をGFPに導入した。変異体の評価は、培養細胞に変異体を発現させ、37℃で顕微鏡により観察される蛍光強度によって判断した。

まずGFPの使用コドンに着目した。オワンクラゲの蛋白質であるGFPのcDNAは、アデニン(A)/チミン(T)を多用したコドンを持つ塩基配列で、この配列ではほ乳類細胞で翻訳効率が著しく低下することが予想される(Haas J et al., 1996)。そこで、アミノ酸配列を変化させずにシトシン(C)/グアニン(G)を中心としたコドンのみを変換したGFP cDNAの発現を数種類試みた(Haseloff 1996; Haas et al., 1996; Yang TT, et al., 1996)。蛍光観察の結果、細胞内で蛍光強度の増加が見られた(Fig.-1-1-B)。この細胞の抽出液を調整しウエスタンブロッティングを行った結果、コドンのみの変換で細胞内の発現量が著しく増加していることが確認できた(DATA not shown)。しかしコドンの変換だけでは、高温感受性は改善されていなかったことから、mRNAの不安定性や翻訳効率で温度感受性を示すのではないことが判明した。そこで次にこのような蛍光の増加は、発色団の改良、細胞内安定性とは独立だと考えられるので、さらに点変異を導入することで蛍光強度の増加を試みた。発色団変異はHeimらによって系統的に導入され、特に発色団内に位置する65番目のアミノ酸に着目し解析が行われている。彼らは大腸菌を用いて蛍光スペクトルの測定、および蛋白質単位量あたりの蛍光強度を測定しているが、培養温度を室温まで低下させて大腸菌体内で発現させているため、温度感受性については検討がなされていない(Heim et al 1995)。そこで、彼らが導入した変異の中でも蛍光強度が強い3種類の変異体、65番目のセリンをスレオニンに置換した(S65T)、アラニンに置換した(S65A)、グリシンに置換した(S65G)を作製し、培養細胞を用いて検討した(Fig.-1-4B)。その結果、いずれの変異体も培養細胞での蛍光観察は可能であったが、これらの変異の中で特にS65Aが37℃で培養した細胞内で発現量が増加し、強い蛍光強度を示すことが判明した(Fig.-1-3-C、Fig.-1-4B)。興味深いことにHeimらの報告で最も蛍光強度の強かったS65Tは、いぜんとして温度感受性を示したのに対し、S65Aは30℃よりもむしろ37℃で強く発現していることが判明した(Fig.-1-4A)。さらにS65Aの励起波長ピークは、現在使用しているFITCフィルターの励起光のピーク470nmに吸収極大をもつことが蛍光測定の結果判明し(DATA not shown)、この変異体が高温耐性だけでなく、より効果的に蛍光を検出できる変異体であることを見出した。また、Cramer EAらなどによって発色団以外の領域への点変異によってもGFPの蛍光強度を増加させることが示され(Heim R et al., 1994; Anderson MT et al., 1996; Cramer EA et al., 1996)、これらの変異は大腸菌内ではGFPの不溶化タンパクの生成を減少させる役割があることが示された(Cramer EA et al., 1996)。さらに同時期に多くのグループがランダムに導入した変異の解析によっても、145番目のチロシン(Y145)もしくは163番目のバリン(V163)といったアミノ酸に変異を導入することで同様の効果

が見られることが示されたので(Anderson MT et. al.,1996; Cramer EA et.al., 1996; Yang TT, et al., 1998)、これらの変異をS65A変異体に導入し、蛍光強度および蛋白質の発現量を検討した。その結果S65A/Y145F/V163Aの変異体は、発現量が増強され、37℃で簡便に蛍光を検出できるようになった(Fig.-1-3-D)。GFPの結晶構造が報告されたので、これらの変異を立体構造上に対応させると、興味深いことに、Y145およびV163は発色団を取り囲む11本の β シート上に位置し、中央部に位置する発色団構造の非常に近傍に位置していることが判明した。この結果は、導入された変異が発色団構造を安定に保ち、さらには構造の核である発色団が安定することでGFPの構造全体をも安定に維持しているのではないかと考えられる(Yang, F.et. al.,1996; Ormo, M.et. al.,1996)。

以上のように独立したパラメーターを分離した上で変異を複数導入し、培養細胞で効率よく強い蛍光を検出できるGFP変異体を構築したので、このGFPを用いて細胞内蛋白質の動態を可視化することを試みた。そこで着目したのは、ホルモンの受容体であり転写因子であるグルコルチコイドレセプター(GR)である。GRはリガンドに結合すると自らがシグナル伝達分子となって核へ移行し、核内ではそのまま転写因子としてDNAに結合し標的配列の転写を制御することが知られている。そこでこれらの機能と細胞内での動態の関与を検討するためにGRとGFPの融合蛋白質を構築した。

1-2 GRの核移行の経時的観察

GRのカルボキシル末端にGFPを融合させCOS-1細胞に遺伝子導入した。血清中に含まれる内在性ホルモンによる影響を除くために、遺伝子導入2日前から培養液を無血清培地opti-MEMで24時間ごとに希釈し、最終的に血清濃度が2.0%になるようにした。この条件で、COS-1細胞に遺伝子導入し36時間後に蛍光像を観察すると、遺伝子導入された細胞の90%以上においてGR-GFPが細胞質に局在しているのが観察された(Fig.-1-5A)。またこの細胞にDexを添加すると、顕微鏡下でGRの細胞質から核への移行が経時的に観察できた(Fig.-1-5B,C)。細胞質から核へは一部の限られた通路ではなく、全体的に浸透していくように移行し、ほぼ15-30分で完了した。

1-3 GRの核移行におけるリガンド特異性

GR-GFPがDex依存的に核移行することを観察できたので、リガンド結合の特異性を調べるために核移行を指標に実験を行った。COS-1細胞にGR-GFPを発現させて、転写活性化剤(アゴニスト)である合成グルコルチコイド、Dexamethasone(Dex)、弱いながらリガンドとして結合するアルドステロン(Aldo)、転写の拮抗阻害剤(アンタゴニスト)RU486、またステロイドホルモンであるが、GRに結合しない β エストラジオール(E2)、また、活性型ビタミンAであるレチノイン酸(RA)をそれぞれ十分量(1 μ M)添加し

た(Fig.-1-6)。リガンド添加前の蛍光パターンと1時間後に同一細胞における蛍光パターンを比較すると、Dex、Aldo、RU486では核移行が観察されたが、E2、RAでは全く核移行は観察されなかった。しかしE2、RAを加えた細胞にさらにDexを加えると同一細胞での核移行が観察されたので、この細胞および発現しているGR-GFPにリガンド応答能が維持されていたことが確認できた(Fig.-1-6)。以上の結果は、GR-GFPは核移行においてリガンド特異性を有し、結合が弱いとされるAldoによっても核移行が確認できることから、この実験系の検出感度が非常に高いことを示している。

1-4 GR-GFP融合蛋白質の転写活性化能

本来、リガンド特異的に核移行したGRは、標的配列に結合して転写を活性化する転写因子である(Beato M, et al.,1995)。そこでGR-GFPの融合蛋白質が核内で転写機能を果たすかを調べるために、グルココルチコイド応答配列(GRE)を含むマウス乳ガンウイルス由来のプロモーター(MMTV-LTR)を組み込んだレポーター遺伝子を用いて活性を測定した。その結果COS-1細胞においてDex濃度依存的な転写活性化が観察され、GR-GFPが細胞内で転写因子として機能することを確認した。この対照としてGFPのみの発現ベクターを用い細胞内における内在活性と比較し、GR-GFPがバックグラウンドに比べ非常に強い活性を持つことが明らかになった(Fig.-1-4)。

以上の結果よりGFPを融合したGRは、細胞内で本来のリガンド特異性および核移行能、さらに転写因子としての機能を有することが示された。

1-5 GFP融合蛋白質の特性

これまでに示したとおり、GFPは融合蛋白質として細胞内動態を可視化する非常に有用なレポーター蛋白質である。しかしGFPを融合した蛋白質が本来の局在または機能を維持するには、GFPをアミノ末端、カルボキシル末端どちらに融合するかが重要な問題である。そこでGRの(1)局在パターン、(2)機能(転写活性化)を指標にアミノ末端、カルボキシル末端融合についてその有用性を検討した。

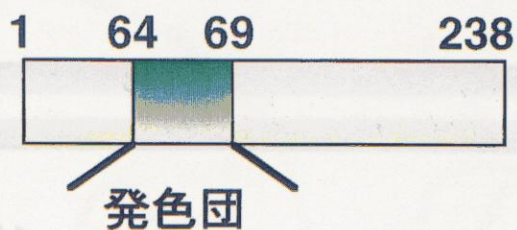
はじめに局在パターンに関してGFPのアミノ末端融合型GR-GFP(Fig.-1-7A,a)とカルボキシル末端融合型GFP-GR(Fig.-1-7B,b)を比較した。その結果、リガンド非添加状態でGR-GFP(Fig.-1-7A,a)は細胞質に局在が明確に見られるのに対して、GFP-GR(Fig.-1-7B,b)は核へのシグナルのリークが多い。これらの細胞抽出液から抗GFP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、GR-GFPは主に全長を有する産物を検出できるのに対し、GFP-GR(Fig.-1-7b)では短いバンドが複数見られた。この結果はGFP-GRの局在パターンは、これら寸断されたバンドのシグナルをも観察していることを意味する。よって局在パターンを明確

にするには、アミノ末端融合型のGR-GFPが優れていることが明らかとなった。

次に転写活性化についてアミノ末端、カルボキシル末端の融合について検討した。それぞれの転写活性化において 10^{-8} Mの数値を100とし、野生型、GR-GFP、GFP-GRのリガンド依存的な転写活性可能を比較すると、野生型およびGFP-GRは 10^{-10} Mからの転写活性化が検出できるのに対し(Fig.-1-8黒、青)、GR-GFPは 10^{-9} Mから転写活性化が検出された(Fig.-1-8赤)。いずれの場合も強い転写活性化能を持つことからGFPがGRの機能全般を阻害しているわけではなく、GFPがGRのカルボキシル末端に何らかの影響を与えたと考えられる。GRのカルボキシル末端領域はリガンド結合部位(LBD)であり、核内レセプターは一般的にリガンド結合にともなって大きく構造変化することが知られている(Renaud JP, et al.,1995)。リガンド濃度による応答性の変化は構造変化を伴うLBDにGFPが結合しているために、リガンドに対する結合親和性に影響を与えたと考えられる。

以上の結果から、GRの(i)核移行シグナルによる局在変化、(ii)LBDに結合するリガンドの特異性、(iii)特異的DNAへの結合を伴った転写活性化能についてGFPはその機能を阻害せず細胞内でのレポーター蛋白質として非常に有用であることが示された。

Wild type GFP



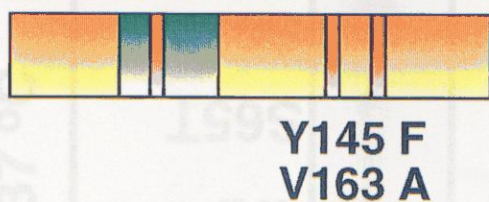
humanized GFP



Chromophore mutation



Other mutations



37 °C

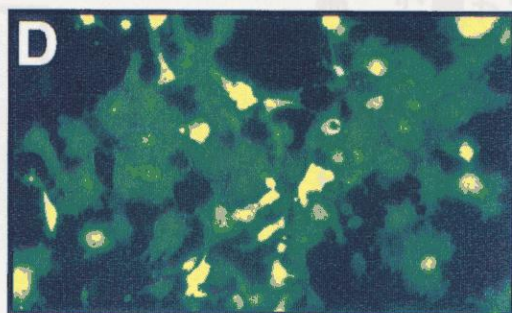
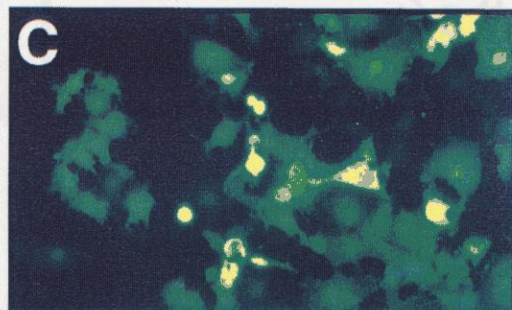
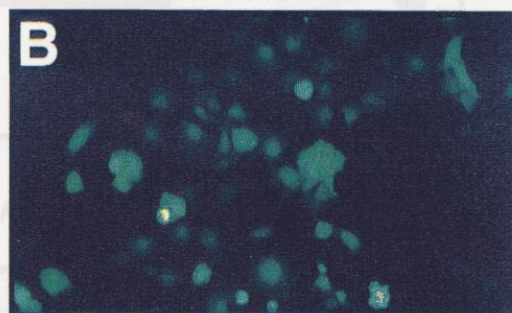


Fig. 1-3
GFP温度耐性変異体の作成

GFPは37°Cで殆ど蛍光を検出できないが(A)、コドンを最適化し(B)発色団(C)およびその他の領域(D)に変異を導入することで、37°Cでも強い蛍光を発する変異体を作成することができた。

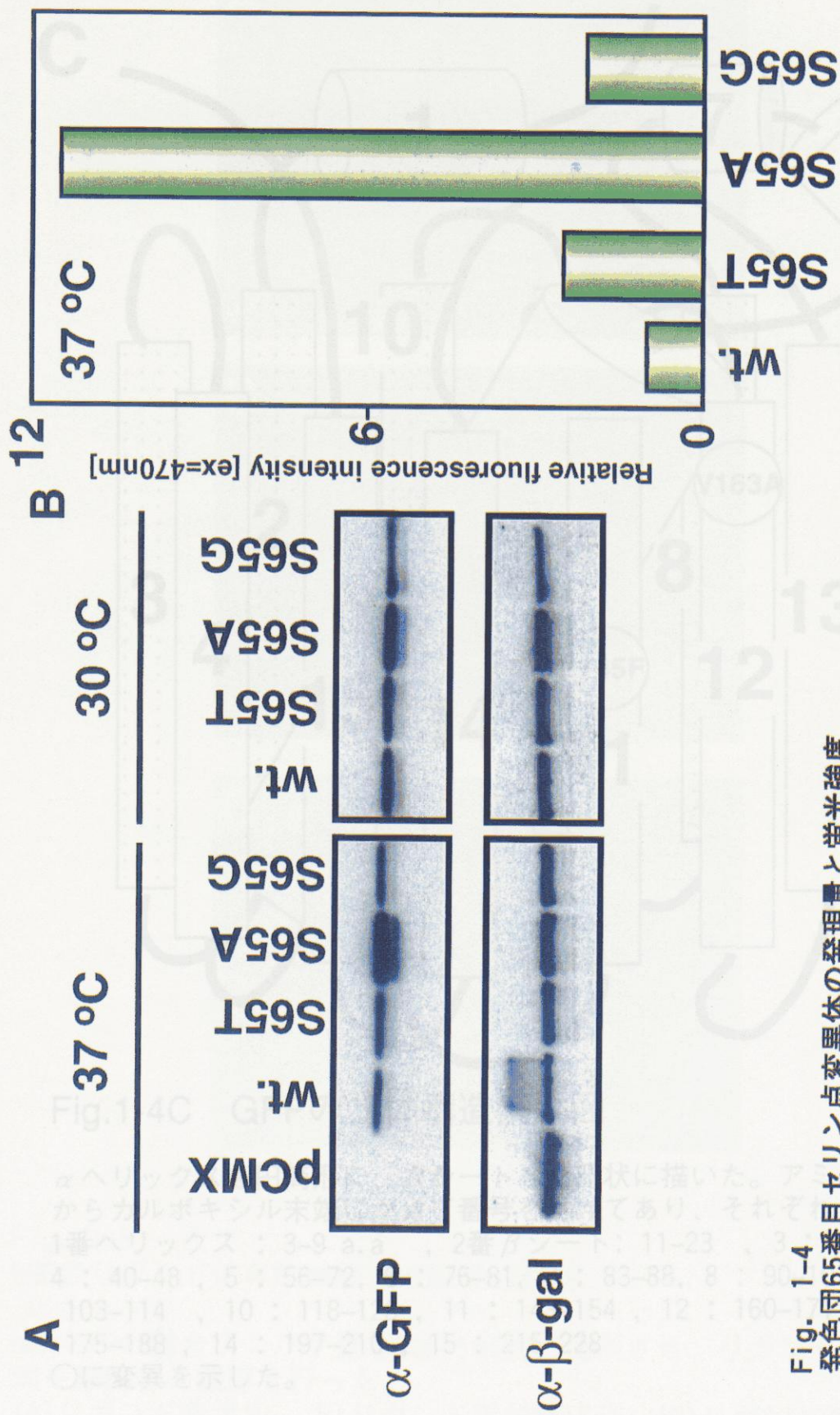


Fig. 1-4

発色団65番目セリン点変異体の発現量と蛍光強度

第65番目セリンにスレオニン(S65T)、アラニン(S65A)、グリシン(S65G)の変異を導入しCOS-1細胞における、37°Cと30°Cの発現量(A)および37°Cでの蛍光強度(B)を検出した。同時に導入したb-galの活性によって各サンプルを平均化した。37°CでS65A変異体は著しい発現の増加が見られた。

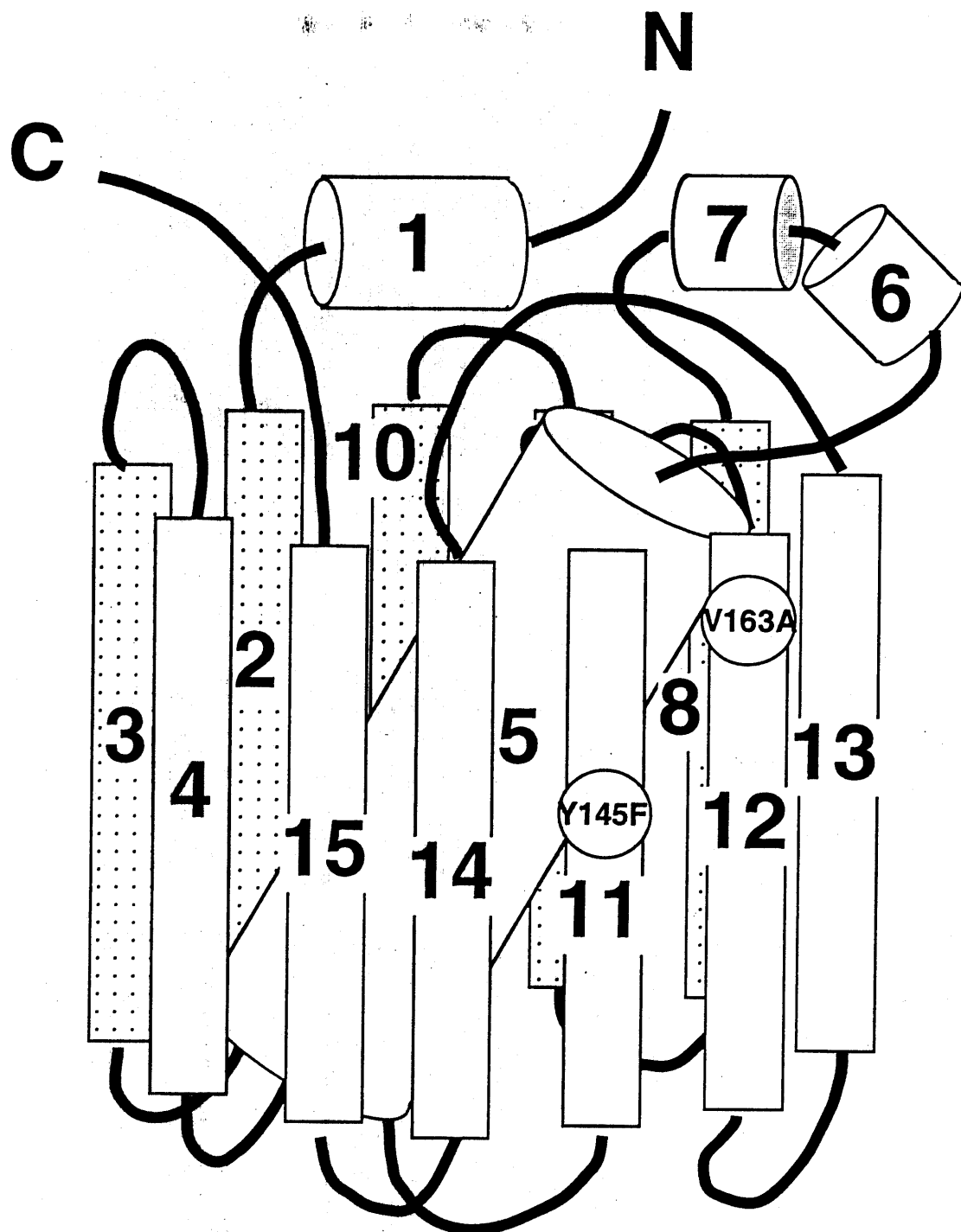


Fig.1-4C GFPの立体構造模式図

α ヘリックスを円筒形に、 β シートを短冊状に描いた。アミノ末端からカルボキシル末端にかけて番号を付けてあり、それぞれ
 1番ヘリックス : 3-9 a.a , 2番 β シート: 11-23 , 3 : 25-38 ,
 4 : 40-48 , 5 : 56-72, 6 : 76-81, 7 : 83-88, 8 : 90-101 , 9 :
 103-114 , 10 : 118-128 , 11 : 143-154 , 12 : 160-171 , 13 :
 175-188 , 14 : 197-210 , 15 : 215-228
 ○に変異を示した。

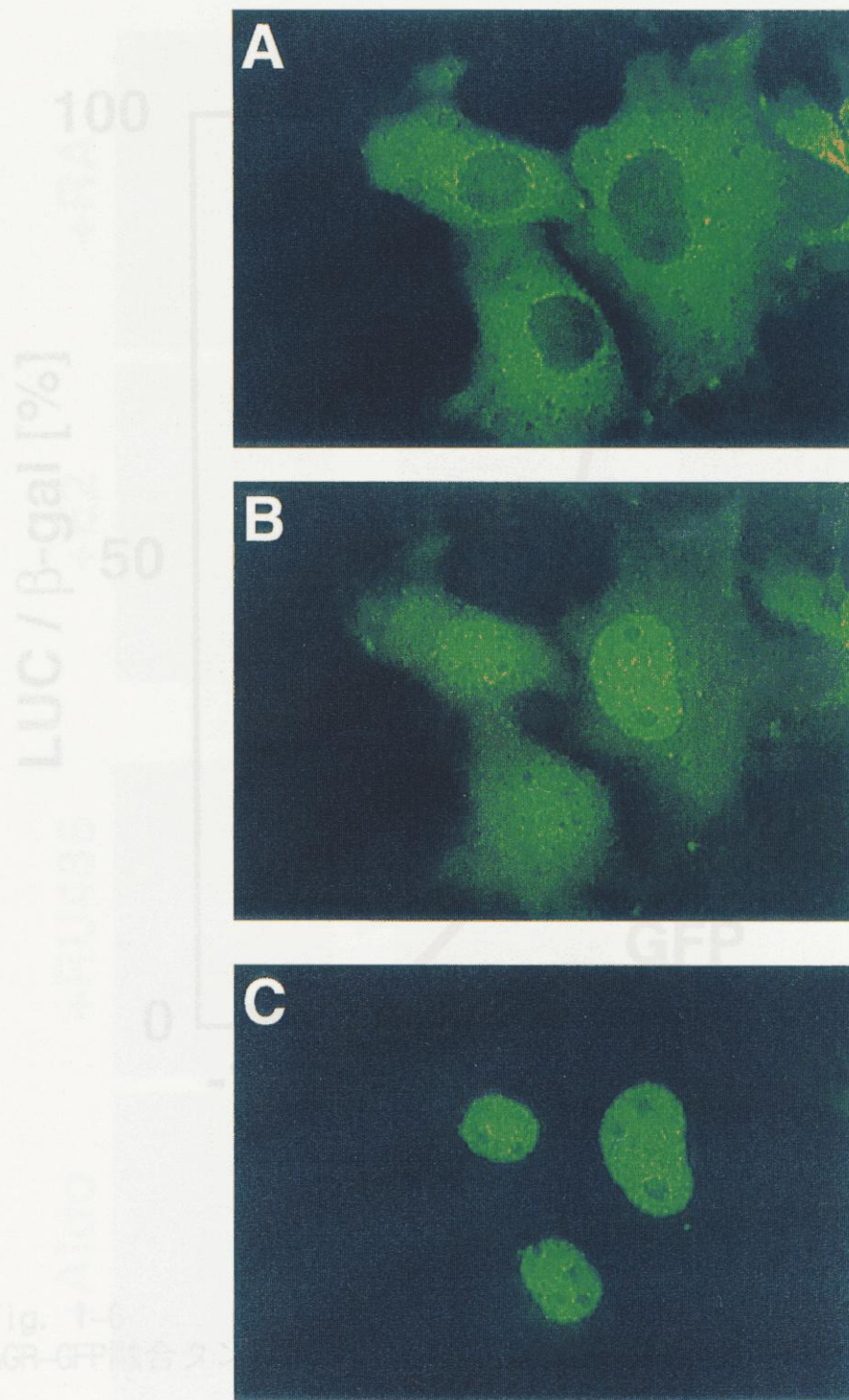


Fig. 1-5
hGR-GFP融合タンパク質

マウス乳ガンウイルス由来のレポーター遺伝子(MMTV-Luc)を用いてレポーターアッセイを行い、hGR-GFP融合タンパク質の転写活性化能

Fig.-1-5

hGRのリガンド依存的核移行の経時的観察

hGR-GFPの融合タンパク質をCOS-1細胞に発現させ、リガンドを添加後同一細胞での観察を行った。

(A) リガンド非添加、(B) リガンド添加後15分、(C) リガンド添加後30分

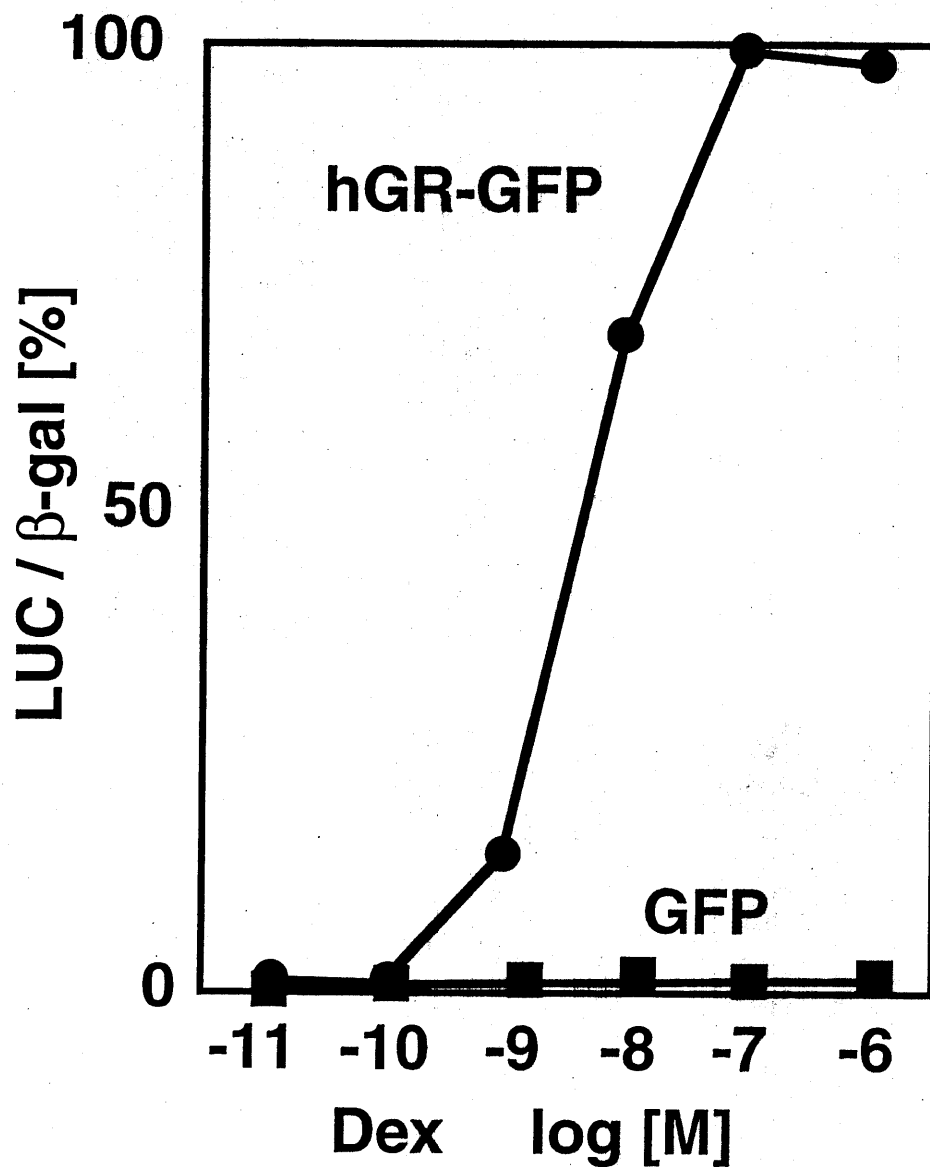


Fig. 1-6
hGR-GFP融合タンパク質の転写活性化能

マウス乳ガンウイルス由来のレポーター遺伝子(MMTV-Luc)を用いてレポーターアッセイを行い、hGR-GFP融合タンパク質の転写活性化能を測定した。

その結果、リガンド (Dex)濃度依存的な強い転写活性化能を得た。

(GFP) GFP発現ベクターのみを対照として用いた。

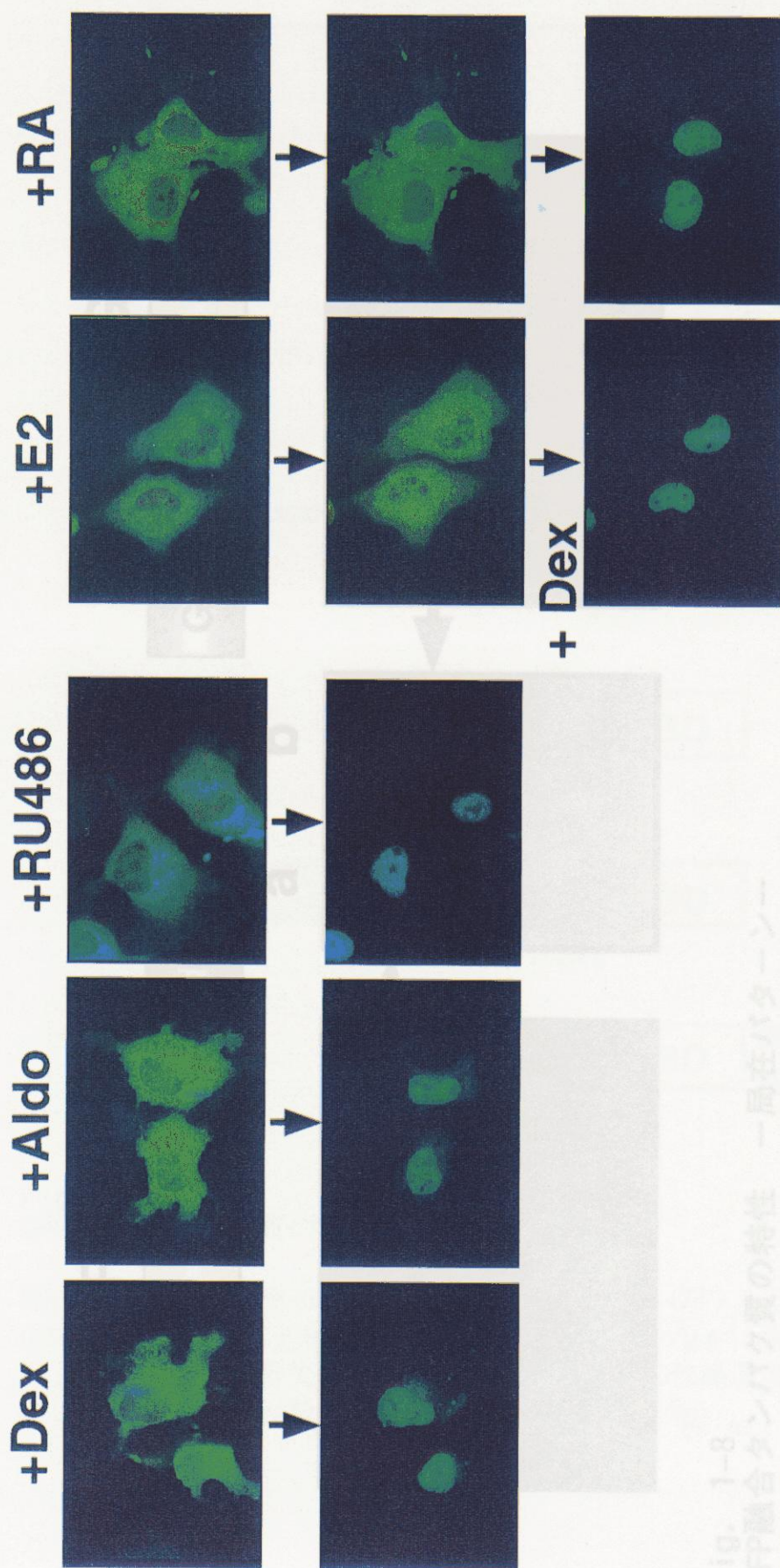


Fig. 1-7

hGR-GFPの核移行を指標としたリガンド結合特異性

hGR-GFPをCOS-1細胞に発現させ、局在パターンを観察する。

各種リガンドを添加し(1 μ M)1時間培養後、同一細胞の蛍光を観察した。Dex、Aldo、RU486では核移行が観察されたが、E2、RAでは局在パターンに変化はなかった。

(Dex): デキサメサゾン (Aldo): アルドステロン (RU486) GRの拮抗阻害剤 (E2): エストラジオール (RA): レチノイン酸

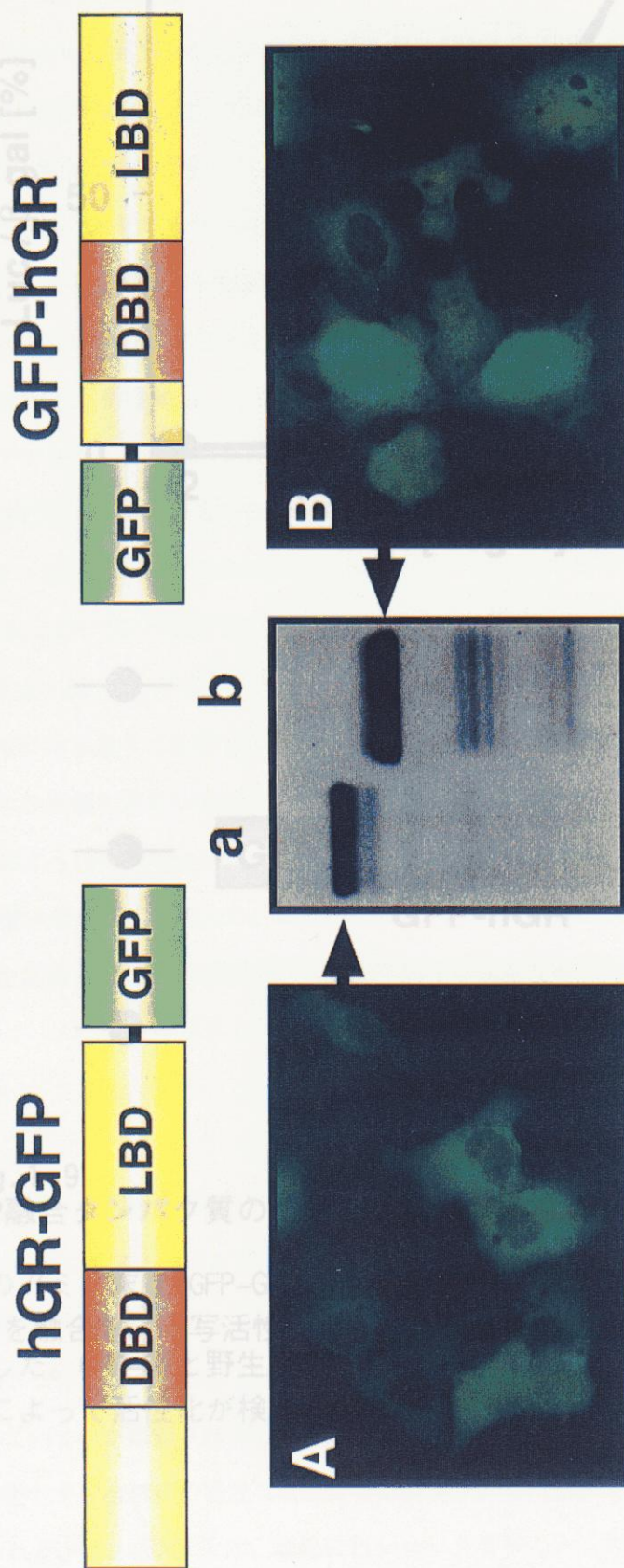


Fig. 1-8
GFP融合タンパク質の特性 ー局在パターンー

GRのアミノ末端(GFP-GR)、カルボキシル末端(GR-GFP)、それぞれにGFPを融合し局在パターンを比較した。さらに、細胞抽出液から抗GFP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行いバンドパターンも検討した。GFP-GRは発現量が多く蛍光強度が高いが(B,b)、局在パターンはGR-GFPの方が明確であり、GFP抗体で全長のバンドが主に検出される(A,a)。

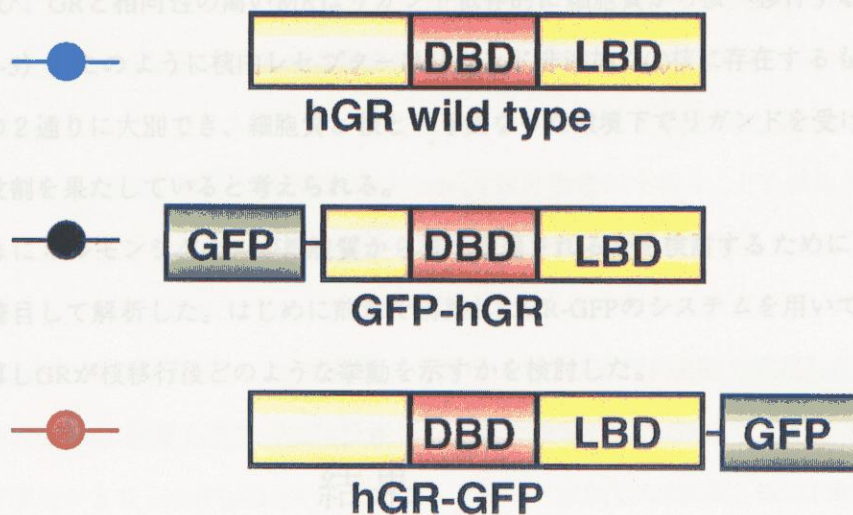
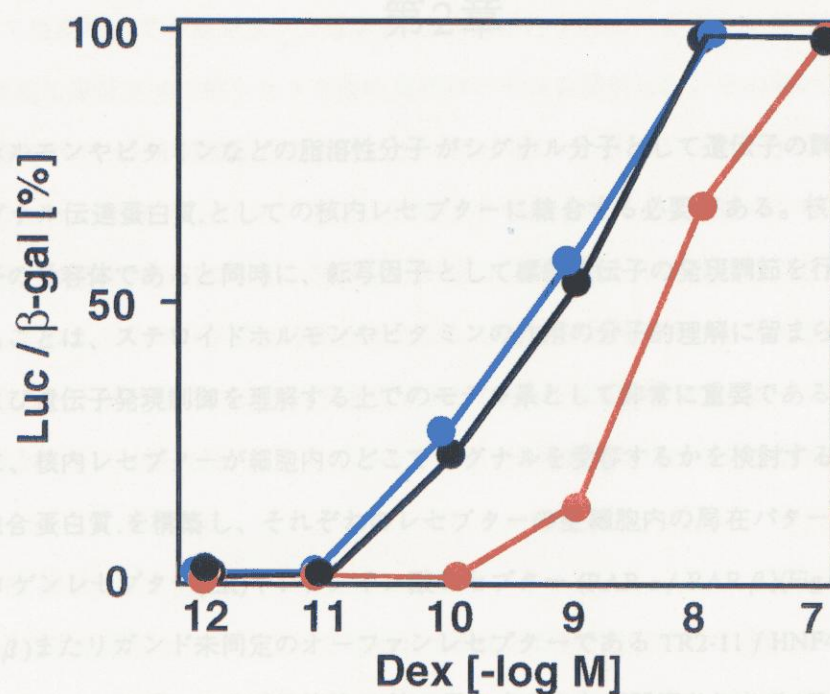


Fig.1-9

GFP融合タンパク質の特性 —転写活性化能—

GRのアミノ末端(GFP-GR)、カルボキシル末端(GR-GFP)、それぞれに GFPを融合し、転写活性化能をリガンド濃度 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ を100%として比較した。GFP-GRと野生型GRに比べGR-GFPは、約10倍高濃度のリガンドによって活性化が検出された (hGR-GFP $1 \times 10^{-9} \text{M}$)。

第2章

ステロイドホルモンやビタミンなどの脂溶性分子がシグナル分子として遺伝子の調節をするには、細胞内におけるシグナル伝達蛋白質としての核内レセプターに結合する必要がある。核内レセプターはこれらシグナル分子の受容体であると同時に、転写因子として標的遺伝子の発現調節を行っている。この分子機構を理解することは、ステロイドホルモンやビタミンの作用の分子的理解に留まらず、細胞内のシグナル伝達機構および遺伝子発現制御を理解する上でのモデル系として非常に重要である。

まずはじめに、核内レセプターが細胞内のどこでシグナルを受容するかを検討するために、核内レセプターとGFPの融合蛋白質を構築し、それぞれのレセプターの生細胞内の局在パターンを検討した。その結果、エストロゲンレセプター(ER)やレチノイン酸レセプター ($RAR\alpha$ / $RAR\beta$)(Fig.-2)、甲状腺ホルモンレセプター($TR\beta$)またリガンド未同定のオーファンレセプターである TR2-11 / HNF4 / COUP / Tlx など多くの核内レセプターは、リガンド非添加状態で核に局在することが観察された(DATA not shown)。一方、前述のようにGRおよび、GRと相同性の高いMRはリガンド依存的に細胞質から核へ移行する様子が観察された(Fig.-2-1, Fig.-1-5)。このように核内レセプターはリガンド非添加で(a)核に存在するものと、(b)細胞質に存在するものの2通りに大別でき、細胞質と核という異なった環境下でリガンドを受け取ることによって、それぞれの役割を果たしていると考えられる。

本章では、どのようにホルモンシグナルが細胞質から核へ伝達されるかを検討するために、GRの細胞内局在の制御機構に着目して解析した。はじめに前章で構築したGR-GFPのシステムを用いて、どのような因子が核移行を誘導しGRが核移行後どのような挙動を示すかを検討した。

結果

2-1 GRの核移行誘導因子

GRは先に用いたアゴニストリガンドDex、また転写の拮抗阻害剤(アンタゴニスト) RU486を添加しても同様に核へ移行する(Fig.-2-1 A,B,C,D)。GRのリガンド分子によるこのような核移行は、添加するリガンド濃度を増加させると、高濃度になるにつれて細胞質へ残留するGR-GFP分子が減少し、核へ移行する分子が増加していくのが観察される。このような核移行のパターンは、同一濃度のリガンドを添加した個々の細胞を比較しても核移行の程度にばらつきが少なく、どの細胞もほぼ一様にリガンドが作用しているように観察された(Fig.-2-2A)。一方、細胞に熱ショックを与えることによって、GR蛋白質が核分画で

検出されるようになることが、Sanchez ER.によって示されている (Sanchez ER.,1992)。そこで、GR-GFPを用いて生細胞内でも熱ショックによるGRの核移行が検出できるかを試みた。GR-GFPの融合蛋白質をCOS-1細胞に発現させて熱ショック前の局在パターンを観察した。その後42℃で2時間培養したのち同一細胞の局在パターンを観察したところ、GR-GFPの核への移行が観察できた(Fig.-2-1 E,F)。しかしこのような熱ショックの場合、リガンドによる核への移行と異なり、GR-GFPを発現している細胞の10-20%程度は核への移行が検出できず、核へ移行が認められる個々の細胞を比較してもGR-GFPの局在パターンは混在しており、リガンド添加の場合と比較して細胞ごとのばらつきが大きかった(Fig.-2-2B)。これらの観察事実は、リガンドによるGRの核移行が各GR分子のリガンド結合に一義的に依存したものであるのに対し、熱ショックは細胞のストレス応答を介する2次的な現象であることを示唆するものである。

2-2 GRの核排出

GRはリガンド分子や熱ショックによって核移行することが観察されたが、核へ移行したGRがその後どのような挙動を示すのかを調べるために、細胞をリガンド添加、熱ショック後、15分ごとに観察した。その結果、リガンド存在下ではGRは核に保持されたままだが、熱ショックで核移行を誘導した場合、2時間以内に核から細胞質へシグナルが排出されるのが観察された(DATA not shown)。熱ショックによる核移行の程度は前述の通り細胞によってまちまちであり、細胞集団として平均的な挙動を把握するのは困難である。そこで熱ショックによるGRの核移行と排出の挙動にindexを設け数値化を行うことを試みた。indexは、細胞質に完全に局在している場合を0%とし、細胞質から核へ均一に局在しているときと50%、核に大部分が局在している場合は80%、完全に核へシグナルが局在し細胞質にシグナルが検出できない時を100%とした。無作為に選定した視野の写真を撮影し、100細胞以上を数値化して核移行の過程を解析した(Fig.2-3-B)。その結果、熱ショックでindexに換算し平均約60%核移行し、その後移行したGRのシグナルがほぼ完全に排出されていくことが明らかとなった(Fig.-2-2A)。このときリガンド添加したGRは、ほぼ100%核移行し、その後6時間たっても核へ留まることが観察された(DATA not shown)。このように熱ショックによる核移行はリガンドに比べ一過的であり、排出されたGRは再度リガンド分子を添加すると核移行できることから(DATA not shown)、GRが容易に初期状態へ戻ることも示唆される。これらの結果から、GRの熱ショックによる核移行は、細胞状態によって応答能が異なる点、細胞内での保持能力が弱いなど、核内で転写を厳密に制御するには疑問点が多い。この点からGRが核内で転写因子として機能を理解する上で、リガンドによるGRの制御を解析することが重要であると考えた、そこでGRがリガンドによってどのように核移行を制御されているかを検討するために、GRの欠失変異体を作製し検討した。

2-3 GR欠失変異体の細胞内局在

前述のとおりGFPをGRのアミノ末端側、またはカルボキシル末端側に融合しても、リガンド依存的な核移行が観察された(Fig.-2-4A,B)。GRは、アミノ末端に転写活性化領域(AD)、分子中央部にDNA結合領域(DBD)、カルボキシル末端にリガンド結合領域(LBD)が同定されているが、リガンドが結合することによってLBDがGRの局在をどのように制御しているのかを明らかにするために、LBDの一部を欠く変異体を作製しそれらの局在パターンを検討した。その結果GR595、GR550、GR500はリガンド非依存的に常に核へ局在していることが観察された(Fig.-2-4C,D,F)。このことからリガンドに結合していないLBDが、GRの核へ移行を阻害していること、GRの核移行シグナルがそれ単独では核移行能を常に維持していることが明らかになった。一方アミノ末端のAD領域を欠失する変異体 Δ ADは、大部分が核へ局在し細胞質に一部が局在した(Fig.-2-4G Dex(-))。この細胞質に局在していたシグナルは、リガンド添加によって完全に核へ移行するのが観察された(Fig.-2-4G Dex(+))。この結果からGRをリガンド非添加状態で細胞質に厳密に保持するには、アミノ末端が必要であることも見いだした。また、蛍光強度が非常に弱いために図中に示していないがLBD-GFPが細胞質に局在すること、さらにADのみ、または転写の活性中心であるtau1のみでも細胞質に局在し、両者ともリガンド添加しても核移行は誘導されなかったことから(Fig.-2-4H)、核移行シグナルは中央部のDBD付近に存在することが示唆された。興味深いことに、GR500のカルボキシル末端にGFPを融合したGR500-GFPは、GFP-GR500が恒常的に核移行するにも関わらずリガンド添加後も細胞質に保持された(Fig.-2-4E,F)。このことは核移行シグナルに結合し、細胞質から核へ輸送する因子の結合がGFPによって構造的に阻害されたのだと予想される。

2-4 GRの細胞内局在制御に対する仮説

これらの欠失変異体の結果からFig.-2-5に示した2つの仮説が導かれる。i)GRはLBDによる立体構造障害によって細胞質から核へ移行するのに必要な核移行シグナル領域(NLS)を覆われることで、細胞質に受動的に留まっている。リガンドは、LBDの構造変化を誘導しこの立体障害を排除するため核移行シグナルが活性化される。(ii)リガンド非存在下でもNLSは活性を維持しているが、細胞質のアンカー因子がGRを積極的に保持しており、リガンド依存的にGRはそのアンカー因子から解離することによって核へ移行する。ここではまず(ii)の仮説から検証した。

2-5 熱ショック蛋白質とステロイドレセプターの局在パターン

ステロイドレセプターは、一般にLBDを介してシャペロン分子であるHSP90、HSP70、HSP56等を含む複合体に結合している(Akner G, et al., 1995; Pratt WB., 1993)。in vitroで精製されたHSP90の結合していないGR蛋白質はリガンド結合能を失っているのに対し、HSP複合体が結合することでリガンド結合能が回復

することから、HSP90は非活性型ステロイドレセプターのリガンド結合能維持に重要であると考えられている (Dittmar KD, et al., 1997; Bresnick EH. et. al., 1989; Pratt WB., 1993; Catelli, M. G. 1985; Scherrer, L. C., 1990)。GRが細胞質に局在するのには、積極的にGRを保持する蛋白質が存在しているのではないかと考え、その候補の一つとしてHSP90に着目して、GRに対しての細胞質保持能力を検討した。

2-6 GRと熱ショック蛋白質.HSP90

はじめにHSP90とGFP融合蛋白質を構築し細胞内局在パターンを観察した。その結果HSP90-GFPのシグナルは細胞質へ局在していることが判明した(Fig.-2-1E,F)。この結果よりリガンド非添加時のGRとHSP90の局在パターンが一致したことから、これら両者が複合体を形成していることが示唆された。

HSP90はリガンド依存的にGRのLBDから解離することが知られている(Pratt WB., 1993)。この過程がGRの細胞質から核への移行に重要であると考え、リガンドを添加してもGRからHSP90が解離しないようにするために、両者の融合蛋白質 (GR-HSP90-GFP) を構築した。リガンド非添加状態でGR-HSP90-GFPは細胞質に局在し(Fig.-2-6A,C)、そこにDexを $1 \mu\text{M}$ 加え24時間培養した。このような充分量のリガンドで充分時間培養しても、GR-HSP90-GFPは核へほとんど移行しなかった(Fig.-2-7A)。GRとHSP90-GFPが途中で分断されていないことは、GRのAD領域を認識する抗体を用いて融合蛋白質を染色しカルボキシル末端に融合されたGFPのパターンと比較し、両者が一致することから確認した(Fig.-2A,B,D)。

2-7 GR欠失変異体とHSP90の融合蛋白質.の局在パターン

このようにGR-HSP90-GFPがリガンドを添加しても核へ移行しない原因を検証するために、Fig.-2-4 示した欠失変異体の中から細胞質保持能が低下した ΔAD と、リガンド非依存的に核へ局在したGR550と用いてHSP90-GFPとの融合蛋白質を構築し、局在パターンを検討した。すると、 ΔAD -HSP90-GFPはリガンド添加前ではGR-HSP90-GFPと同様に細胞質に局在したが(Fig.-2-8A, C)、リガンド添加後観察すると核への局在が観察された(Fig.-2-8D)。このことは ΔAD -HSP90-GFP融合蛋白質のLBDがリガンド結合能を維持していること、HSP90分子が結合した状態でもGRは核移行できる能力を持つことを示唆し、さらにGR-HSP90-GFPが核移行できなかったことからAD領域が細胞質保持に重要であることを意味している。さらに、GR550単独で局在パターンを観察すると、常に核に局在したのに対し(Fig.-2-4E)、GR550にHSP90と融合したGR550-HSP90-GFPは常に細胞質に保持された(Fig.-2E,F)。このことはGR550-GFPではGFPを融合してもGR550-GFPのように核移行が阻害されることはないので、HSP90-GFPを融合した場合も核移行シグナルに対して構造的な障害が要因であるとは考えにくく、むしろHSP90との結合およびADに作用する因子によって積極的に細胞質に保持されているものと考えられる。以上の結果から、GRがLBD

を介してHSP90と結合する領域に細胞質保持シグナル1(RTS1)を持ち、アミノ末端のADにはHSP90と等価の細胞質保持シグナル2(RTS2)が存在することが想定できる。これらのシグナルRTS1とRTS2の保持能力の和は、核移行シグナルに対して優性で、GRを細胞質に保持することができる。しかしどちらか一方のRTSでは核移行シグナルが優性で、その結果GRは核移行する。野生型GRではリガンド依存的にLBDからHSP90が解離するので、その結果GRはRTS2が一つとなり核へ移行する。細胞質保持シグナルRTS1とRTS2によるGRの局在制御は前述の仮説(ii)に対して矛盾しない。

2-8 GR-HSP90-GFP融合蛋白質の転写活性化能

ΔAD-HSP90-GFPはリガンド依存的に、核移行を誘導されることが観察されたので、核内でΔAD-HSP90-GFPが転写因子として機能できるかを検討した。前述のレポーター遺伝子MMTV-LTR-Lucをもちいてレポーターアッセイを行った。その結果、非常に弱いΔAD-HSP90-GFPはリガンド依存的に転写活性化能を持つことを見いだした(Fig.-2-9上段)。ここにリガンド依存的にGRのLBDに結合する転写介在因子であるTIF-2を導入すると、この転写活性化能が亢進された(Fig.-2-9下段、第3章参照)。このことは、融合蛋白質が本来のGRと同様の構造を持ち、DNA結合能、リガンド結合能を維持していることを示唆している。

2-10 ERの細胞内局在制御

GRの核移行に必要なDBDはステロイドレセプター間で高く保存されている。またリガンド結合能維持においては、いずれのレセプターもHSP90との結合が必須である(Meng Xet. al.,1996; Joab Iet. al.,1984;Bohen SP.,1995)。しかしFig. -2-6の結果からもGRと同じステロイドレセプターに属するERはGRが細胞質に局在するのに対し、リガンド非添加の状態でも核に局在する。この結果はHSP90に結合したERの局在が、GR/HSP90複合体と異なることを意味する。そこでもしERが、細胞質で生合成された後にHSP90と結合するのなら、ERの局在パターンから考えて、ERがHSP90の核移行を誘導すのではないかという仮説を立てて、GRとERそれぞれとHSP90-GFPをCOS-1細胞に共発現し、HSP90-GFPの局在パターンに変化が生じるかを検討した。GRとHSP90-GFPを発現させた細胞では、HSP90のシグナルは完全に細胞質のみに見られたが、ERとHSP90-GFPを発現させた細胞では一部の細胞で、HSP90-GFPのシグナルが核へリークしているように見られた(DATA not shown)。しかしこの実験条件では、内在性のHSP90の発現量が圧倒的に多いことから、GRとERの局在パターンに優位な差が検出しにくい。そこで、ERもGRと同様にHSP90と直接結合させるために、融合蛋白質、(ER-HSP90-GFP)を構築し、細胞内局在パターンを検討した。前述したようにERはリガンド非添加の状態でも核へ局在する(Fig.-2-6B)が、ER-HSP90-GFP融合蛋

白質の局在パターンを観察すると70%以上の分子が細胞質に局在しており(Fig.2-10C)、リガンドを添加すると細胞質に局在していたER-HSP90-GFPが、核へ移行するのが観察された(Fig.2-10D)。この結果は Δ AD-HSP90-GFPと同じようにHSP90を一分子つれて細胞質からリガンド依存的に核移行できることを意味し、ERにはGRのようなRTS2がないためにHSP90と結合しているにも関わらず、リガンド非添加の状態においても核へ局在できるのだと考えられる。

以上の結果より、GRはリガンド非添加の状態で2カ所の細胞質保持シグナル(RTS)により細胞質に保持されていると考えられる。RTS1はリガンド依存的に解離するHSP90が結合し、RST2には現時点では不明であるが何らかの細胞質保持因子に結合していると考えられる。これら2分子の細胞質保持能はGRの核移行シグナルよりも優勢であるが、どちらか単独では核移行シグナルが優性となるためにGRはリガンドに結合に伴って核へ移行する。一方ERもHSP90に結合しているがRTS2が無いためにリガンド非添加の状態でも核へHSP90をつれて移行している。これらの結果はGRとERそれぞれのリガンド結合能維持にHSP90の結合が必須であることを考慮に入れても矛盾しない結果である。

hGR-GFP

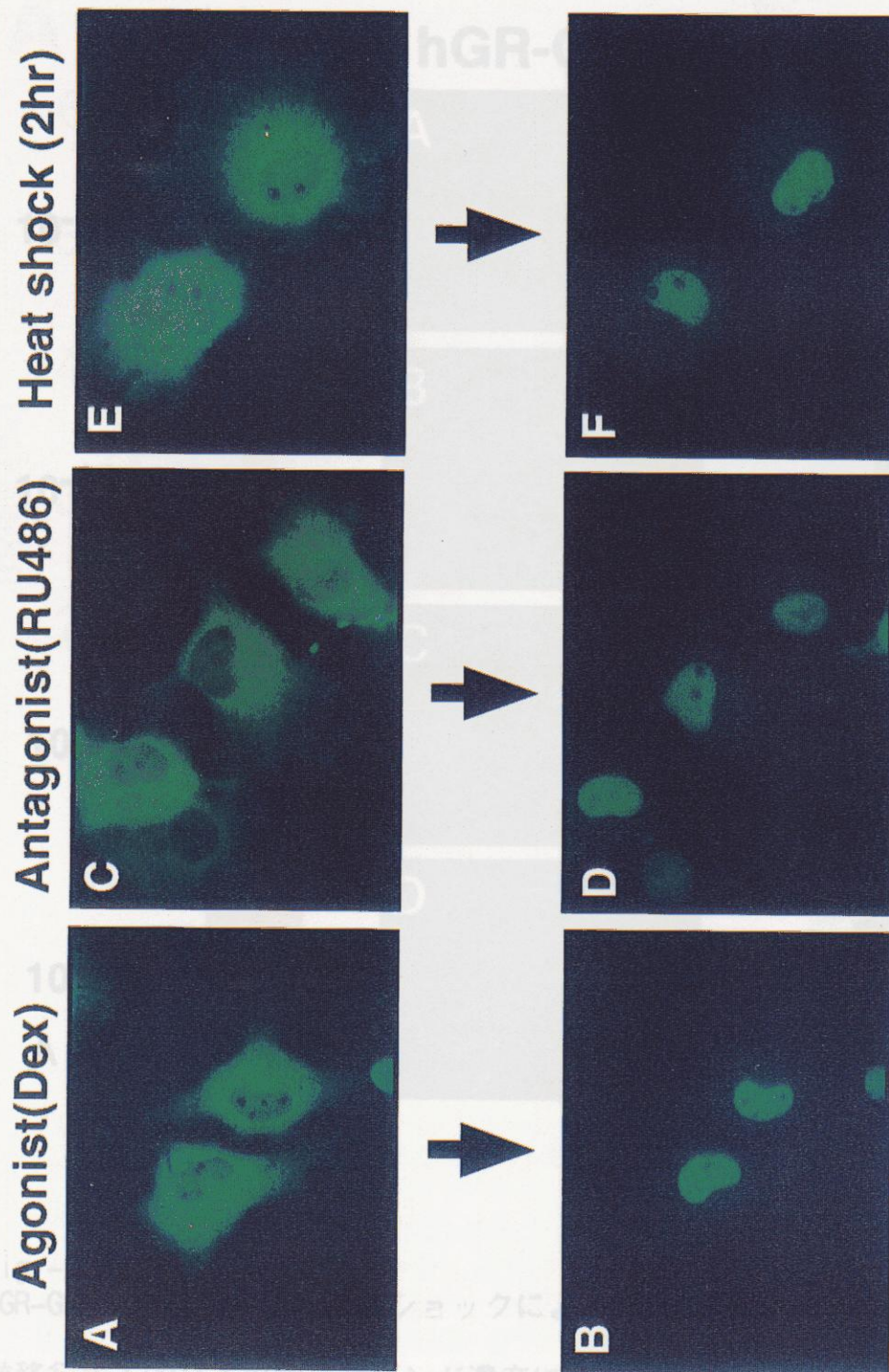


Fig. 2-1
hGRの核移行を誘導する因子

hGR-GFPを用いてGRの核移行を誘導する因子を検討した。転写活性化のアゴニスト(Dex)(A,B)、およびアンタゴニスト(RU486)(C,D)、さらに42℃、2時間の熱ショックによっても(E,F)核移行が誘導された。

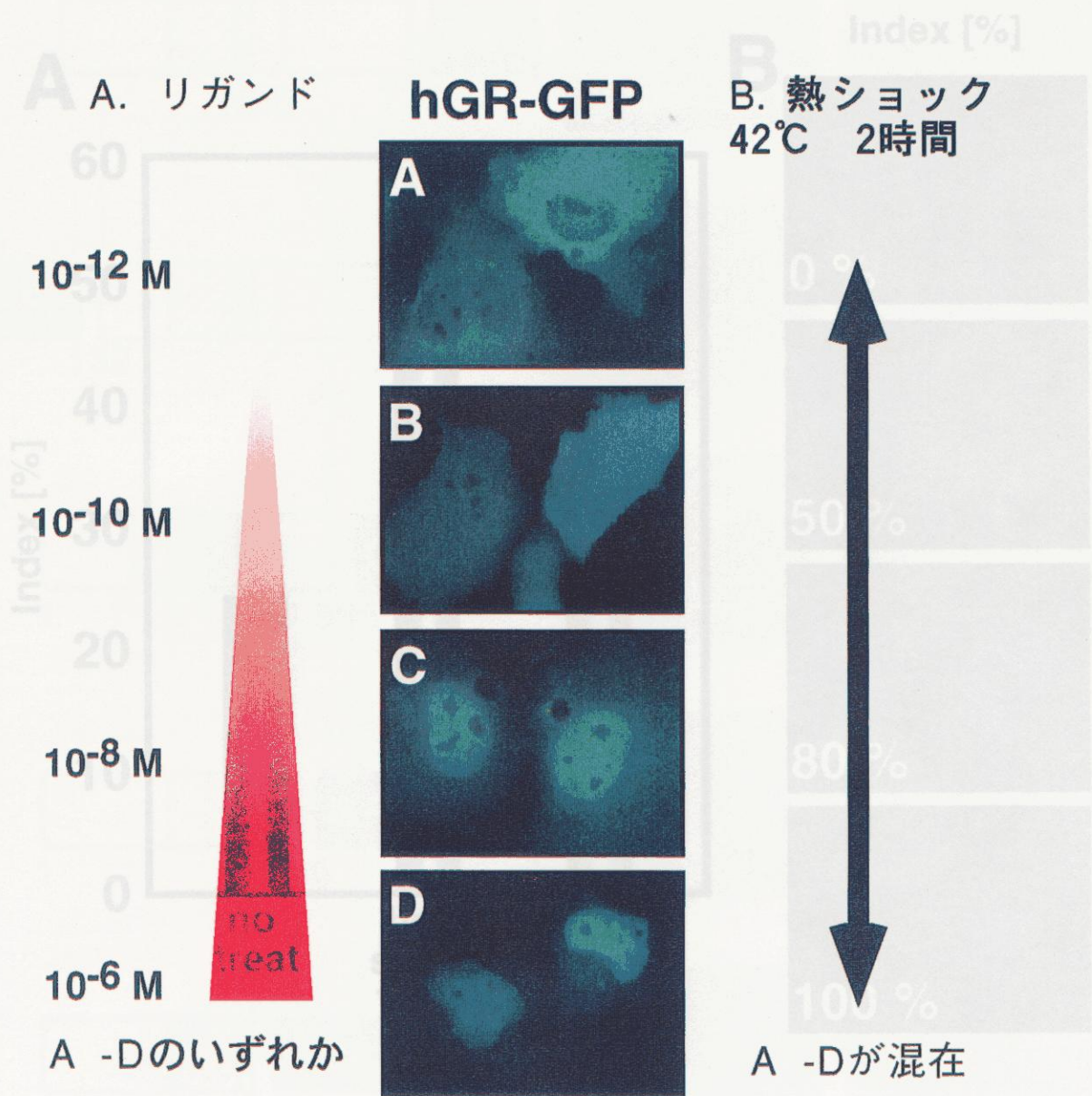


Fig.-2-3
 hGR-GFPの熱ショックによる核移行の数値化

Fig.-2-2
 hGR-GFPのリガンドまたは熱ショックによる核移行度

核移行するGR分子の数はリガンド濃度に依存して増加する。
 従って特定のリガンド濃度において、細胞ごとのGR局在パターンは、
 ほぼ一定である(A)
 一方、熱ショックによつては、個々の細胞ごと核移行度が異なり一定ではない。
 写真は希釈したリガンドを添加後2時間培養し典型的な像を撮影した。

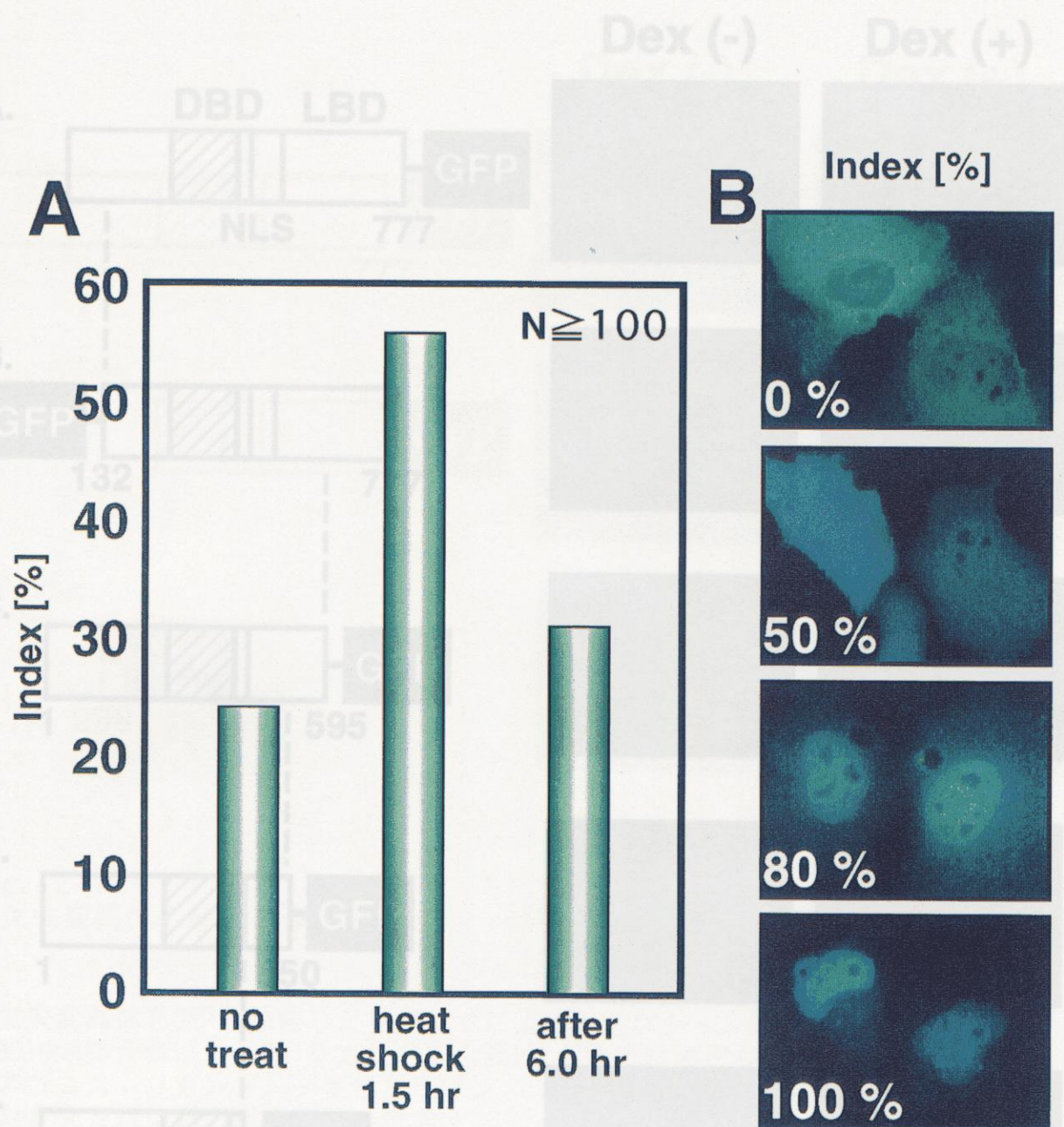


Fig.-2-3
hGR-GFPの熱ショックによる核移行の数値化

GRは細胞集団として、約半数が熱ショックによって核移行し、そのシグナルは6時間で完全に排出される。

A:Bを指標として、100細胞以上を観察し数値化した。

90分の熱ショックで約55%のGR-GFPが核へ移行する様子が見られた。

6時間後に、そのシグナルはすべて排出される。

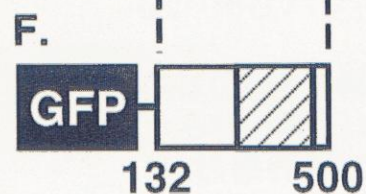
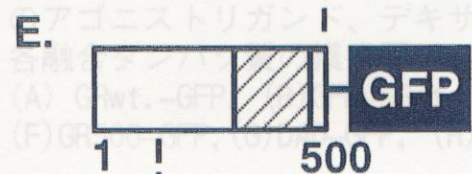
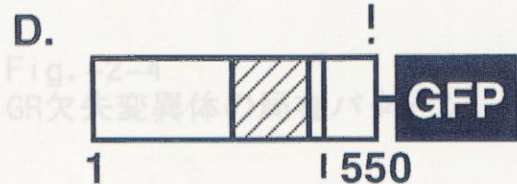
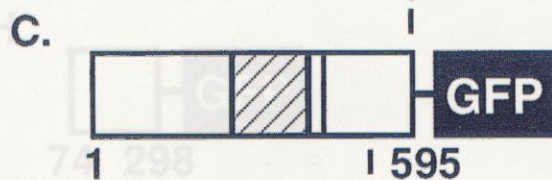
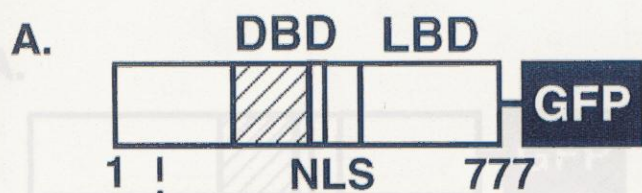
B:核移行インデックス

(0%): 核の輪郭がはっきりと観察できシグナルが核から抜けて見える状態

(50%): 細胞質と核のシグナルが等量で核の輪郭が不鮮明な状態

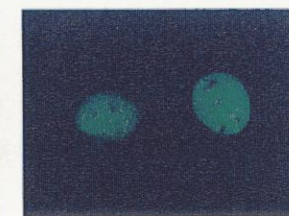
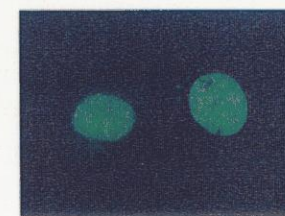
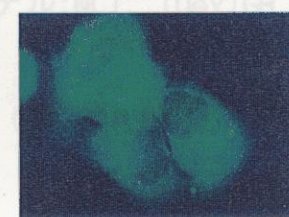
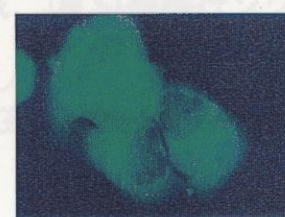
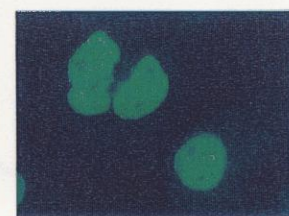
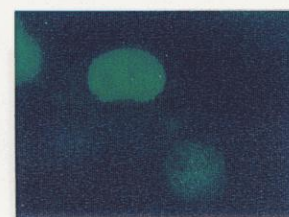
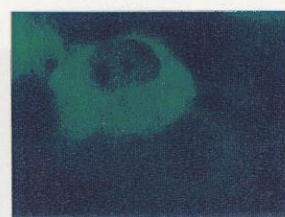
(80%): 細胞質よりも核のシグナルが強く核の輪郭が鮮明に見える状態

(100%): シグナルがほとんど核に局在し細胞質の形状が判断できない状態



Dex (-)

Dex (+)



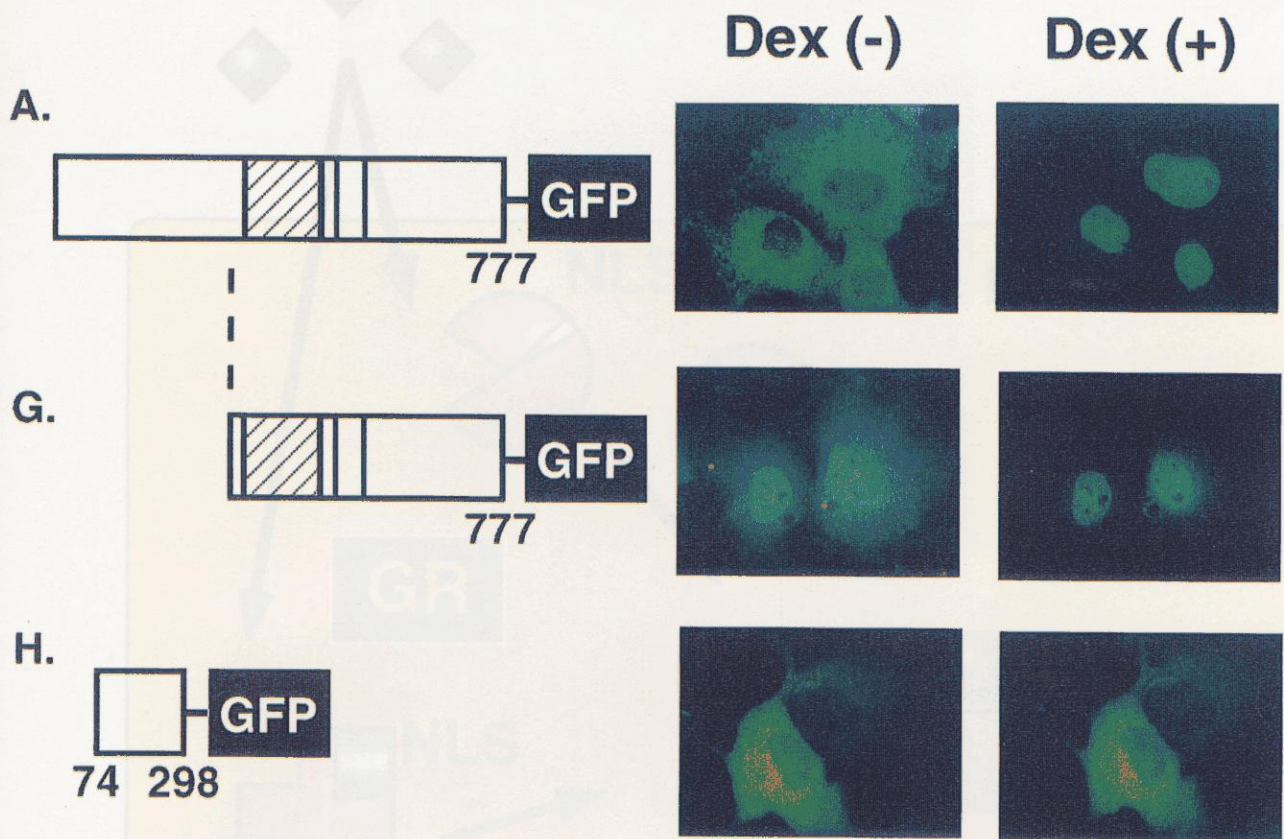


Fig.-2-4
GR欠失変異体の局在パターン

GR欠失変異体をGFPと融合し、リガンドによる局在パターンの変化を観察した。
(DBD)DNA結合領域、(LBD)リガンド結合領域、(NLS)核移行シグナル;NL1、(Dex)GR
のアゴニストリガンド、デキサメサゾン

各融合タンパク質の模式図下の数字はアミノ酸番号を示す。

(A) GRwt.-GFP, (B) GFP-GRwt., (C) GR595-GFP, (D) GFP-GR550, (E) GFP-GR500,
(F) GR500-GFP, (G) DAD-GFP, (H) tau1-GFP

Fig. 2-5
GRの局在パターン制御に対する仮説

GRはDBDに核移行シグナル(NLS)を有する。GRがリガンド依存的に細胞質から核へ移行するには、どのような制御が働いているのか？

(i)核移行シグナルをブロックしているためにGRは核移行しない

(ii)GRは細胞質に積極的に保持されて核移行しない。

という2つの仮説が考えられる。

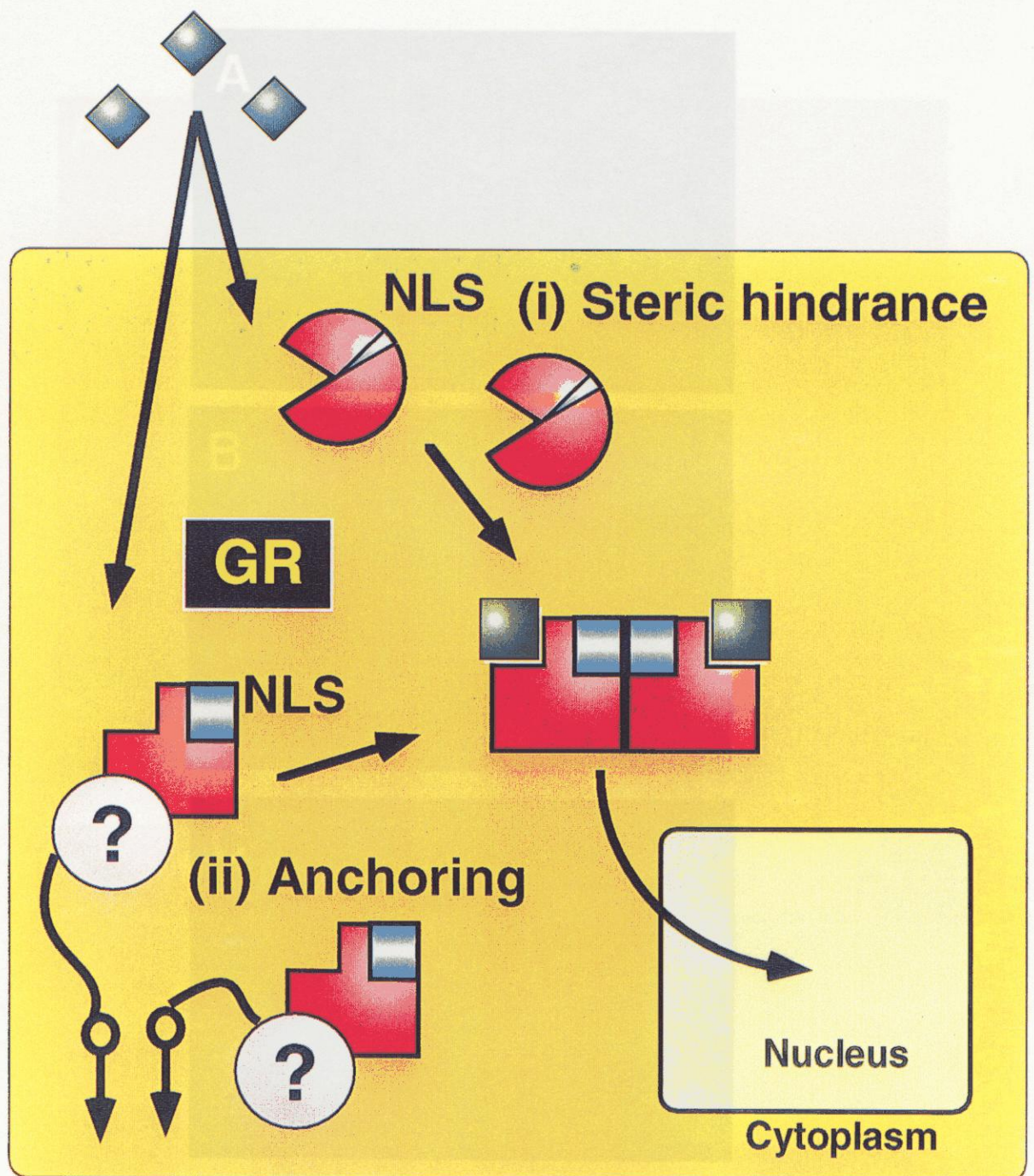


Fig. 2-5

GRの局在パターン制御に対する仮説

GRはDBDに核移行シグナル(NLS)を有する。GRがリガンド依存的に細胞質から核へ移行するには、どのような制御が働いているのか？

(i)核移行シグナルをブロックしているためにGRは核移行しない

(ii)GRは細胞質に積極的に保持されて核移行しない。

という2つの仮説が考えられる。

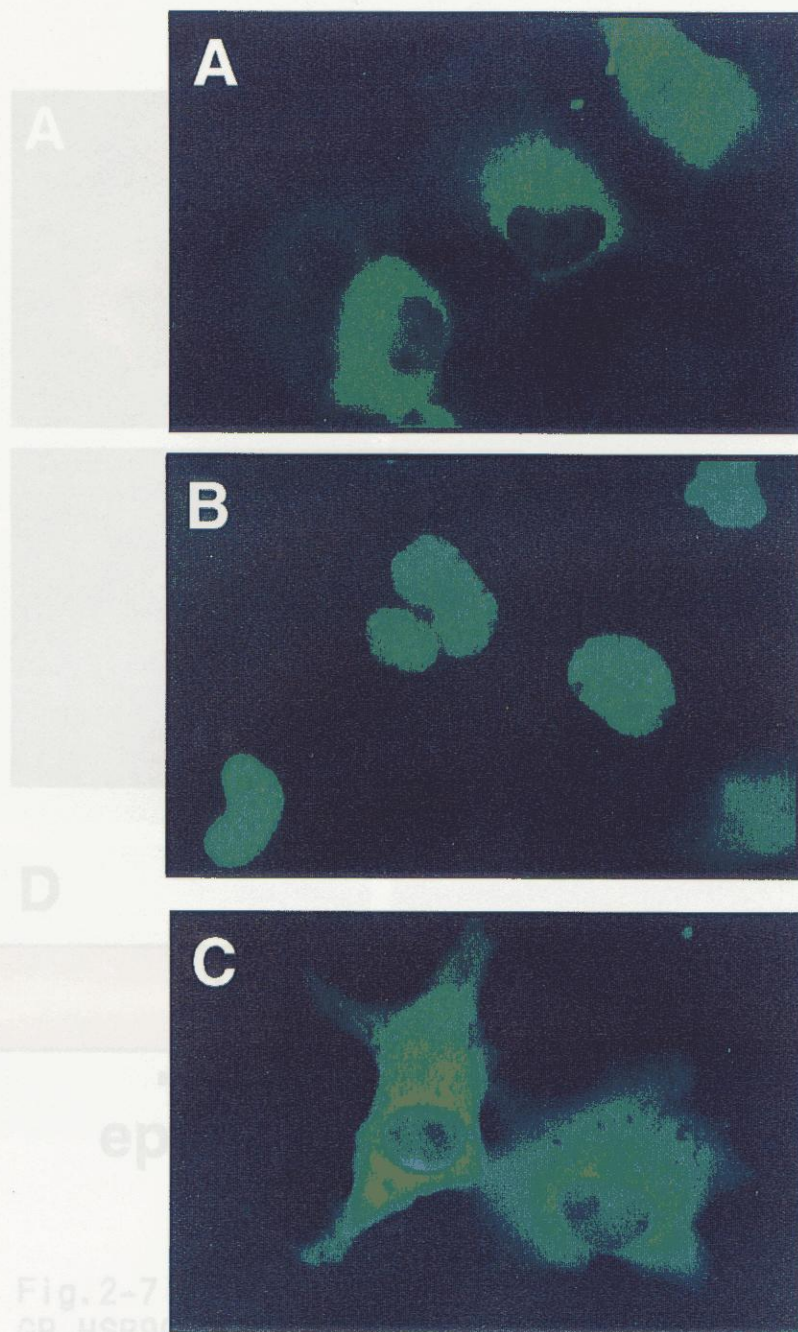


Fig.2-6 M Dexを添加し24hr培養後固定して、抗GFP抗体で染色した。
GRとERリガンド非存在下でのHSP90-GFPとの局在パターンの違い

GR-GFP(A), ER-GFP(B), HSP90-GFP(C)の融合タンパク質を構築しCOS-1細胞に発現させた。

リガンド非添加の状態、GRとHSP90は細胞質に局在したが(A)ER(B)は核に局在が観察された。

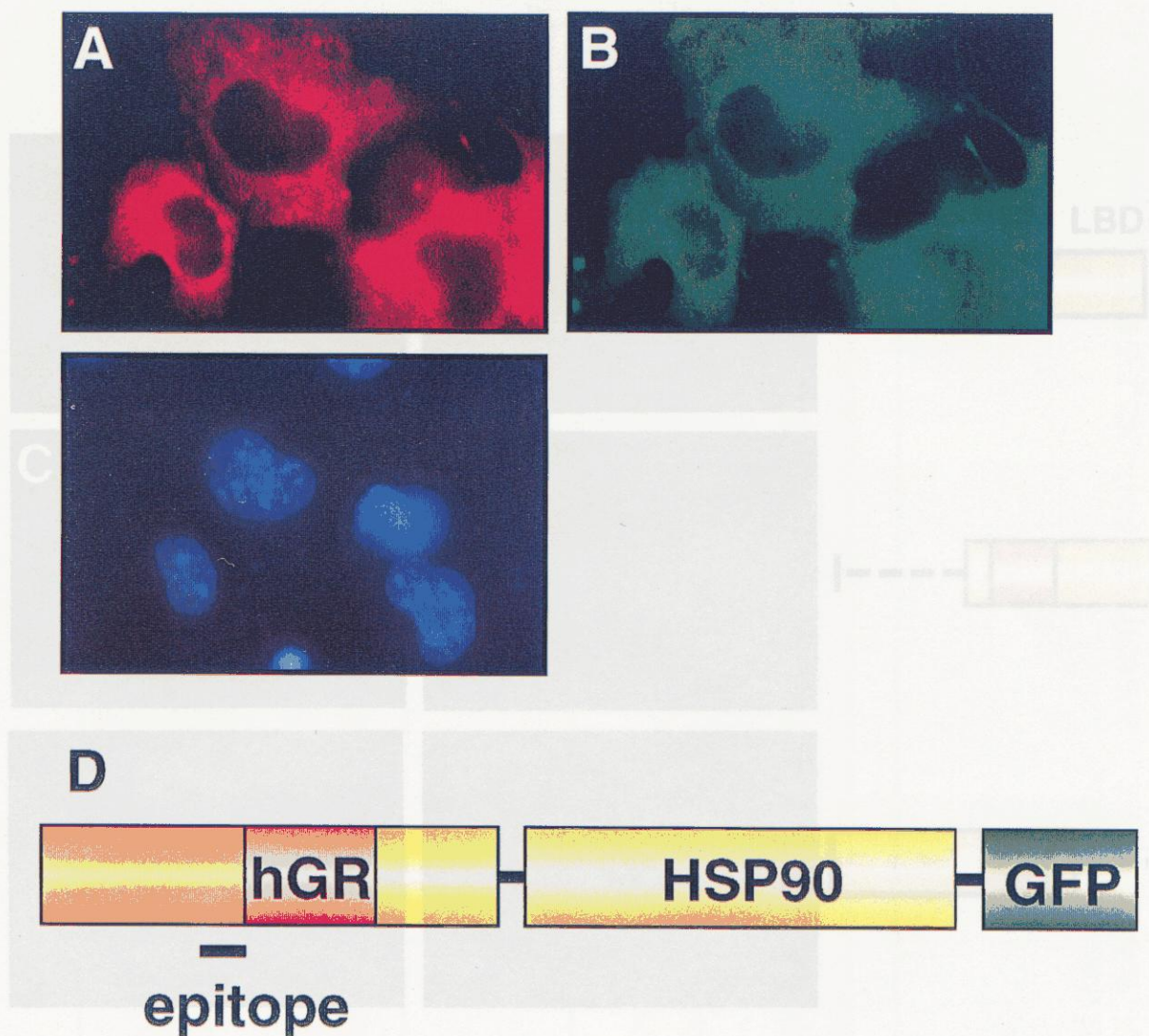


Fig.2-7

GR-HSP90-GFPの融合タンパク質は、リガンドを添加しても細胞質に局在する。

1 μ M Dexを添加し24hr培養後固定して、抗GR抗体で染色した。抗体染色とGFPの染色パターンが同一であることから、このシグナルは融合タンパク質全長である。

(A) 抗GR抗体(epitope)

(B) GFP蛍光像

(C) クロマチンDNA(DAPI)

(D) GR-HSP90-GFP融合タンパク質模式図

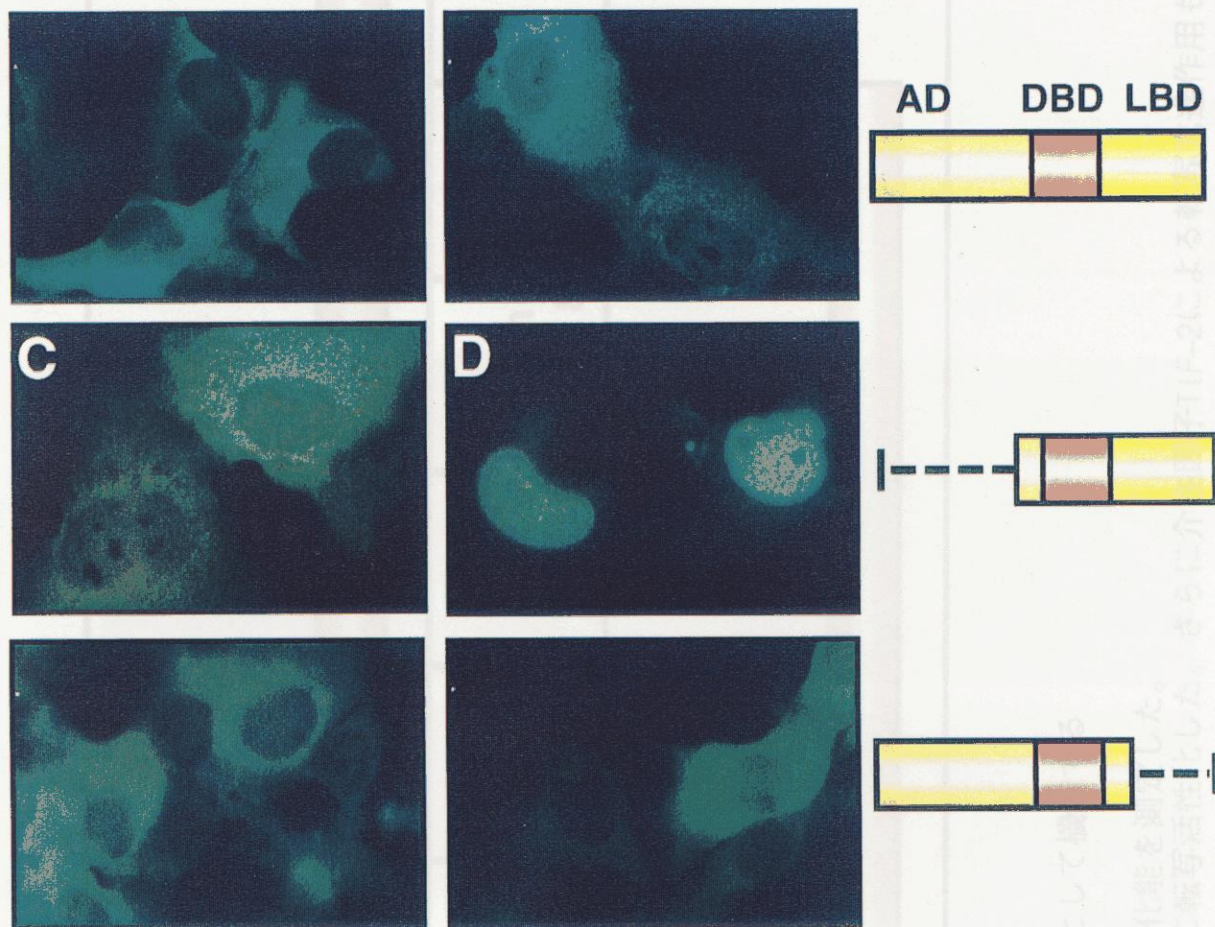


Fig. 2-8
GR欠失変異体とHSP90の融合タンパク質の
リガンド依存的な局在パターン変化

DAD-HSP90はリガンド依存的に核へ移行するが、
GR550とHSP90の融合タンパク質では、核へ移行しない

- (A, B) : GRwt.-HSP90, (C, D) : DAD-HSP90,
(E, F) : GR550-HSP90
(A, C, E) : リガンド非添加, (B, D, F) 1 μ M Dex 16hr

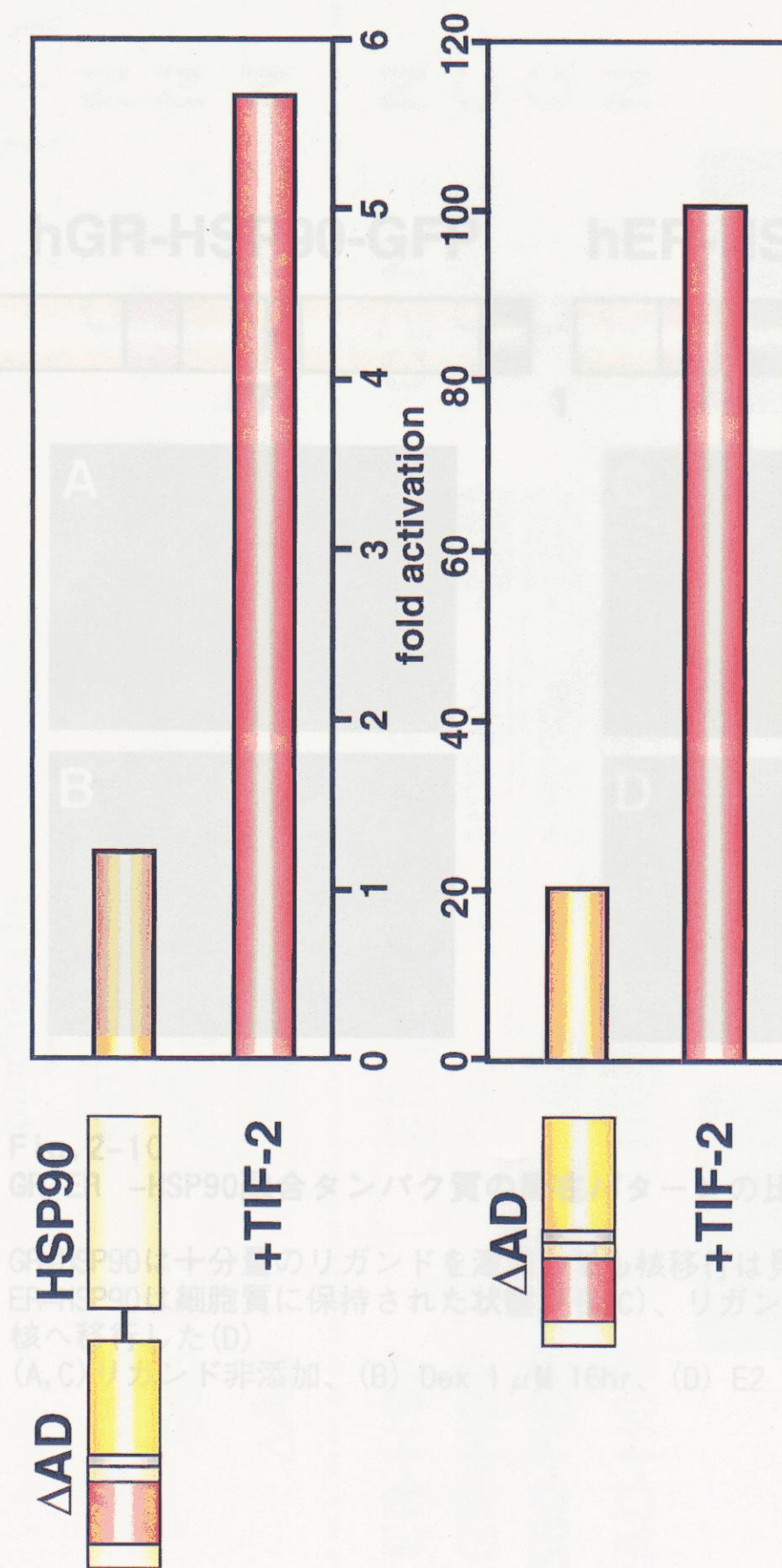


Fig.2-9

DAD-HSP90融合タンパク質は、核内で転写因子として機能する

MMTV-Lucをレポーター遺伝子として、転写活性化能を測定した。

その結果、DAD-HSP90は核内でリガンド依存的に転写活性化化した。さらに介在因子TIF-2による転写亢進作用も見られた。

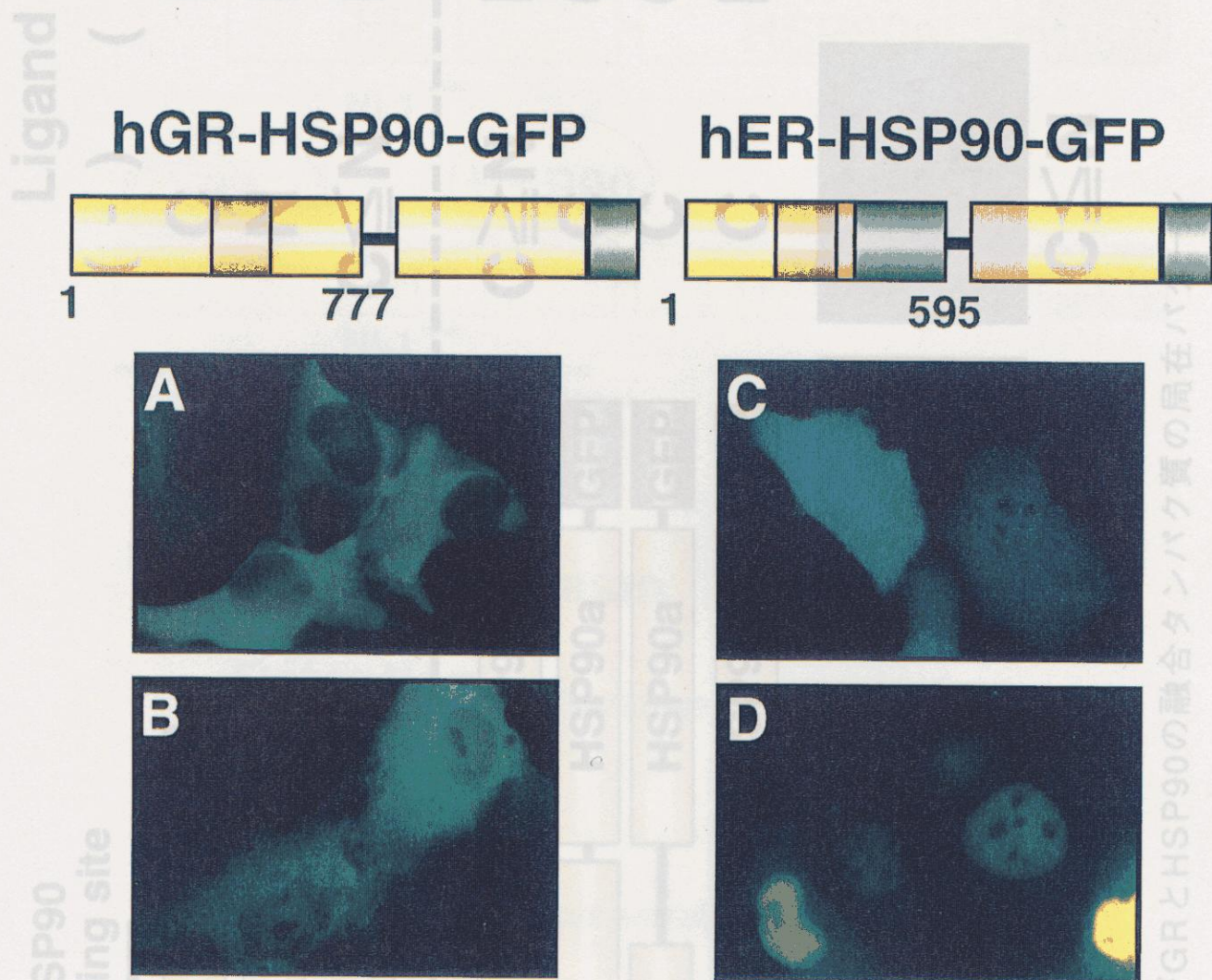


Fig.2-10

GR/ER -HSP90融合タンパク質の局在パターンの比較

GR-HSP90は十分量のリガンドを添加しても核移行は見られないが(A,B)、ER-HSP90は細胞質に保持された状態から(C)、リガンド依存的に核へ移行した(D)

(A,C)リガンド非添加、(B) Dex $1\mu\text{M}$ 16hr、(D) E2 $1\mu\text{M}$ 16hr

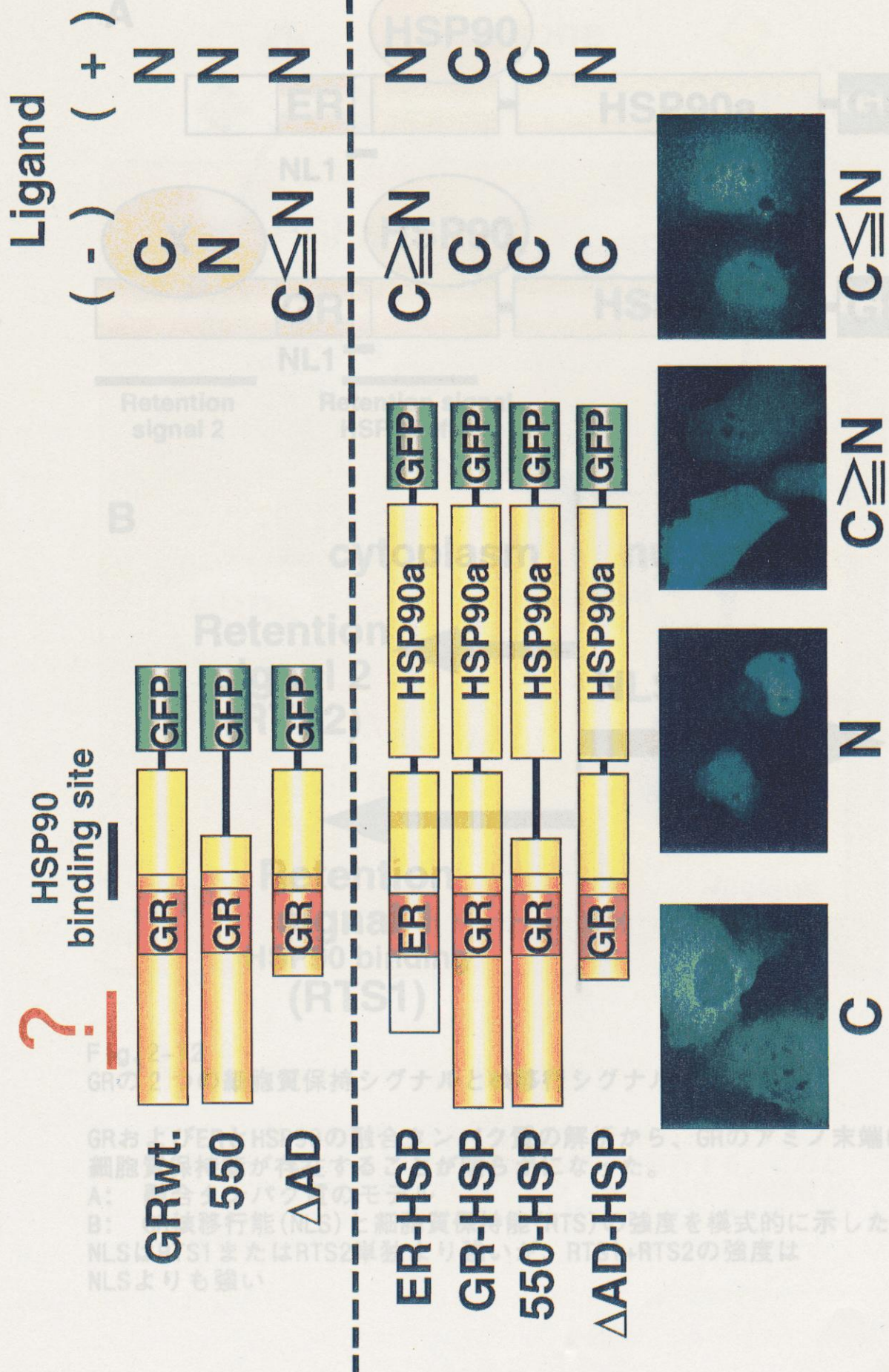


Fig.2-11

GRの欠失変異体とERおよびGRとHSP90の融合タンパク質の局在パターン

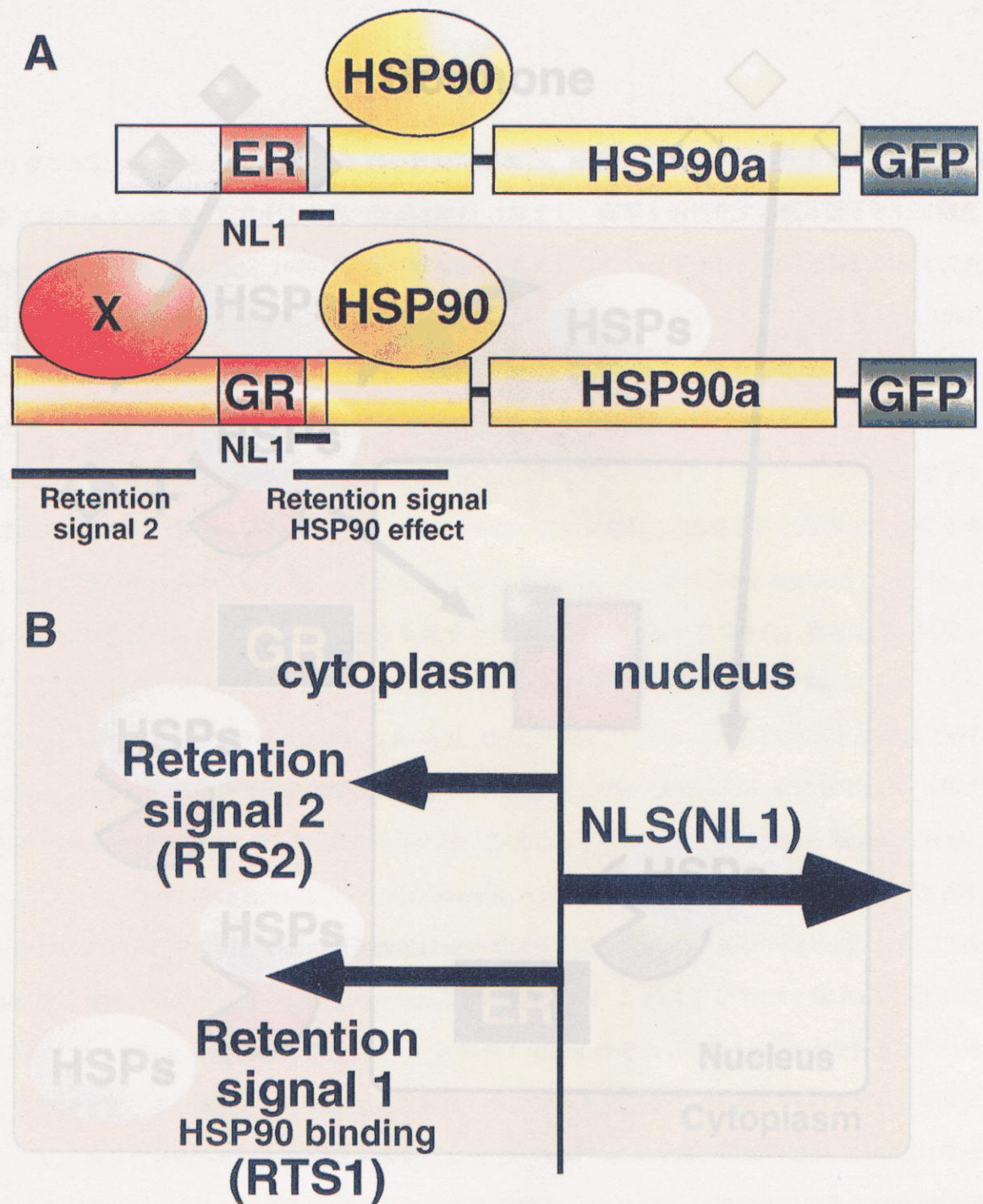


Fig. 2-12

GRの2つの細胞質保持シグナルと核移行シグナル

GRおよびERとHSP90の融合タンパク質の解析から、GRのアミノ末端に細胞質保持能が存在することが明らかになった。

A: 融合タンパク質のモデル

B: GR核移行能(NLS)と細胞質保持能(RTS)の強度を模式的に示した
NLSはRTS1またはRTS2単独より強いが、RTS1+RTS2の強度はNLSよりも強い

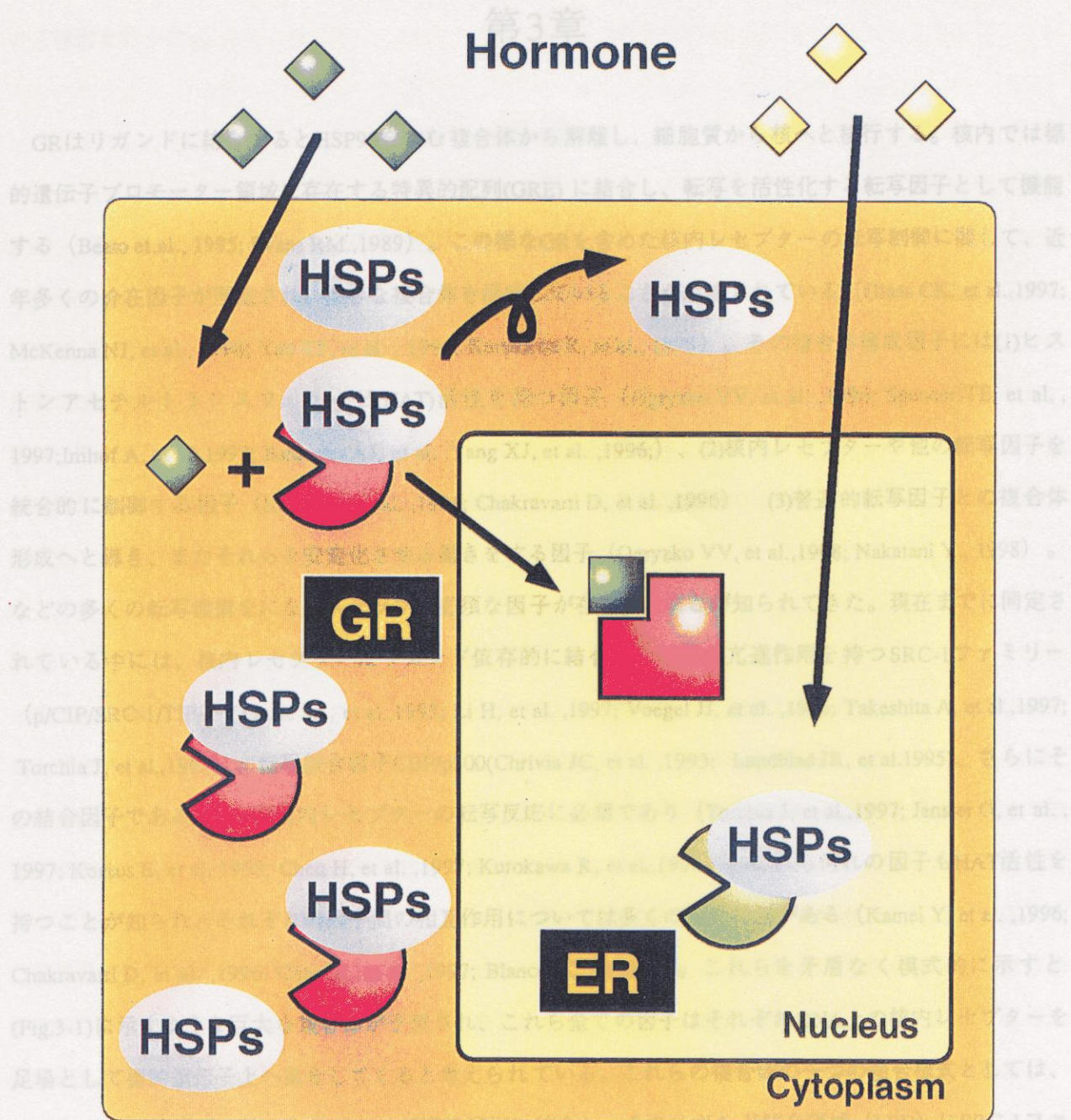


Fig. 2-13

GRとERの局在パターンとHSP90の結合

HSP90は単独で細胞質に局在する、GRはHSP90と結合することで細胞質に保持されるが、ERは単独で核へ移行する。このときERはHSP90を核へ運んでいくことができる。GR、ER両者とも局在パターンは異なるが、HSP90と結合することでリガンド結合能を維持している。

第3章

GRはリガンドに結合するとHSP90を含む複合体から解離し、細胞質から核へと移行する。核内では標的遺伝子プロモーター領域に存在する特異的配列(GRE)に結合し、転写を活性化する転写因子として機能する(Beato et al., 1995; Evans RM., 1989)。このようなGRを含めた核内レセプターの転写制御に関して、近年多くの介在因子が同定され、大きな複合体を形成していることが示唆されている(Glass CK, et al., 1997; McKenna NJ, et al., 1998; Yao TP, et al., 1996; Kurokawa R, et al., 1998)。その複合体構成因子には(1)ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性を持つ因子(Ogryzko VV, et al., 1996; Spencer TE, et al., 1997; Imhof A, et al., 1997; Bannister AJ, et al., Yang XJ, et al., 1996;)、(2)核内レセプターや他の転写因子を統合的に制御する因子(Kamei Y, et al., 1996; Chakravarti D, et al., 1996) (3)普遍的転写因子との複合体形成へと導き、またそれらを安定化させる働きをする因子(Ogryzko VV, et al., 1998; Nakatani Y., 1998)などの多くの転写機構をになうステップに必須な因子が存在することが知られてきた。現在までに同定されている中には、核内レセプターにリガンド依存的に結合し、転写の亢進作用を持つSRC-1ファミリー(p/CIP/SRC-1/TIF-2)(Onate SA, et al., 1995; Li H, et al., 1997; Voegel JJ, et al., 1996; Takeshita A, et al., 1997; Torchia J, et al., 1997)、転写統合因子CBP/p300(Chrivia JC, et al., 1993; Lundblad JR, et al., 1995)、さらにその結合因子であるPCAFが核内レセプターの転写反応に必須であり(Torchia J, et al., 1997; Jenster G, et al., 1997; Korzus E, et al., 1998; Chen H, et al., 1997; Kurokawa R, et al., 1998)、これら何れの因子もHAT活性を持つことが知られ、それぞれの因子間の相互作用については多くの研究報告がある(Kamei Y, et al., 1996; Chakravarti D, et al., 1996; Chen H, et al., 1997; Blanco JC, et al.)。これらを矛盾なく模式的に示すと(Fig.3-1)に示すような巨大な複合体が予想され、これら全ての因子はそれぞれDNA上の核内レセプターを足場として標的遺伝子上へ集合してくると考えられている。これらの複合体の一つの結合様式としては、リガンドを受け取った核内レセプターが標的配列に結合し、そのリガンド結合領域(LBD)にSRC-1ファミリーが結合する。SRC-1ファミリーはCBP/p300との結合領域(CID)を持ち、CBP/p300は基本転写因子群の一部を含む巨大複合体を形成している因子PCAFと結合することができる。恐らくはこの複合体が普遍的転写因子と相互作用を持ち転写反応を押し進めていると考えられている。しかし、これらの因子間の結合はCBP/p300やPCAFがそれぞれ直接核内レセプターに結合できるなど(Kamei Y, et al., 1996; Chakravarti D, et al., 1996; Blanco JC, et al.)、非常に複雑である(Fig.3-2)。

このような多くの因子を含んだ転写複合体がどの様に秩序だって核内で形成し、複雑な相互作用様式を保っているのかを明らかにするために、GRの相互作用因子GRIP-1として同定され、その後多くの核内レ

セプターのコアクチベーターとして同定されたTIF-2(Hong H, et al. ,1996,1997; Voegel JJ, et al. ,1996)を用いて検討を行った。

結果

3-1 GRと介在因子TIF-2の細胞内相互作用

分与されたTIF-2がリガンド依存的にGRと結合するかどうかを確認するために、COS-1細胞にGRとTIF-2を遺伝子導入し免疫沈降法を用いてその結合を検出した。COS-1細胞にプラスミド比にして1:2の比率でGR-GFPとTIF-2-Flagを発現させリガンド(Dex $1\mu\text{M}$)添加後2時間培養し細胞抽出液を調製した。抗Flag抗体を用いてTIF-2をagaroseA/Gビーズへ吸着させSDS-PAGEしウエスタンブロッティングを行い抗GFP抗体を用いてGRを検出した。その結果GRはリガンド依存的にTIF-2と共沈し、TIF-2はGRと細胞内で結合していることが確かめられた(Fig.3-3A)。

3-2 TIF-2のGRへの転写活性化亢進作用

次にGRの転写活性化に対するTIF-2の効果についてレポーターアッセイによって検討した。TIF-2は核内レセプターのLBDにリガンド依存的に結合することが知られている(Voegel JJ, et al. ,1996; Hong H, et al. ,1996,1997)(Fig.3-3A)。そこで構成的な転写活性化ドメインを欠くGRの変異体(ΔAD)を用い、リガンド依存的な転写活性化を検出するのに最適化した条件でTIF-2の作用を調べた。レポーターは、マウスの乳ガンウイルスのプロモーターであるMMTV-LTR-Lucを用いた。その結果、 ΔAD は細胞内でリガンド依存的に転写活性化を持ち、その活性はTIF-2によって約10倍に亢進される(Fig.3-3B)。一方のリガンドを転写活性化のアンタゴニスト(RU486)を用いると、このようなTIF-2の亢進作用はみられない(Fig.3-3B)。これらの結果から、リガンド依存的な相互作用によってTIF-2はGRと結合し、その転写活性化能を亢進できるが、アンタゴニストによってはTIF-2と結合することが出来ないために、亢進作用が検出されないと考えられる。さらに ΔAD のみによっても若干の転写活性化能がみとめられることから、内在性のコアクチベーターが存在するが、発現量は ΔAD に比べ十分でないことが示唆される。このようなアゴニスト依存的なTIF-2の転写活性化亢進作用が、GRの細胞内での挙動にどのような作用を示しているかを検討するために、GRおよびTIF-2を細胞内に遺伝子導入し細胞内局在を観察した。

3-3 TIF-2の細胞内局在パターンとGRの動態変化

FlagタグをもつTIF-2をGRと同時に遺伝子導入し間接蛍光抗体法によって検出すると、リガンドの有無

に関わらず核内でTIF-2が小構造体 (nuclear foci) を形成しているのが観察された(Fig.-3-4B,E,H)。リガンド非存在下でTIF-2が過剰発現している細胞でもGRの局在は変化せず細胞質に観察された。ここにリガンドを添加するとアゴニストに結合したGRは核移行し、この nuclear fociへと集合するが(Fig.-3-4E)、アンタゴニストによってもGRは核移行をするものの(Fig.-3-4G)、nuclear fociに集合することなく均一な核内分布を示すことが観察された(Fig.-3-3H)。これらの結果より、レポーターアッセイによって得られた転写活性化の亢進作用はTIF-2のnuclear fociへの局在と相関があり、このnuclear fociは少なくともアゴニスト依存的なGRの構造を認識出来ることが判明した。さらに、nuclear fociはマウス10T1/2細胞、CV-1細胞、Hela細胞、NIH3T3細胞、3T3L1細胞など多くの細胞でも形成されることを見いだしたので(Fig.-3-5)、nuclear foci形成に必要な細胞内の条件や因子が普遍的に存在することが示唆された。

3-4 RAR α もTIF-2nuclear fociに局在できる

TIF-2のnuclear foci上にはGRの他に、少なくとも甲状腺ホルモンレセプター(TR)、レチノイン酸レセプター(RAR)、レチノイドXレセプター(RXR)、ミネラルコルチコイドレセプター(MR)、エストロゲンレセプター(ER)が局在できることが観察された(Fig.3-6,3-8B)。GFP-RAR α をCOS-1細胞に導入しレチノイン酸を添加した後に同一細胞で経時的に観察すると、核に均一に局在していたRAR α が、30分以内にTIF-2に集合していく過程を観察することができた(Fig.3-6)。さらにRAR α に対してのアゴニスト、アンタゴニストをそれぞれ添加しTIF-2との局在パターンを比較すると、アゴニストによってRAR α はTIF-2へ集合するが(Fig.3-7A-C)、アンタゴニストによっては、先ほどのGRの結果と同様にTIF-2nuclear fociへの局在化は見られなかった(Fig.-3-7D-F)。

3-5 標的配列の局在パターン

このように核内レセプターはそれぞれのアゴニストによってTIF-2nuclear fociへ集合することができ、レポーターアッセイによって観察される転写活性化能と相関がある。このことは多くの核内レセプターの転写反応がTIF-2上で行われていることを予想させる。もしリガンドによって制御された転写反応がこのnuclear foci上で起こっているのならば、核内レセプターごとのDNA結合配列が、特異性にTIF-2上に集合すると考えられる。核内レセプターのDNA結合能および認識能は、非常に特異性が高く配列上にホモ二量体もしくはヘテロまたはホモ二量体として結合していることが報告されている (Perlmann T, et al., 1996)。そこでGRのホモダイマーが結合できる結合配列(GRE)(Liu W, et al., 1995)を核へ導入し、その局在パターンと特異性について検討した。GRまたはERをそれぞれTIF-2と遺伝子導入し培養した後に、ビオチンラベルしたGREを核内にマイクロインジェクションし、それぞれのリガンド添加後2時間培養した後に、抗ビ

オチン抗体で染色を行った。その結果、ER/TIF-2のnuclear foci上にはGREのシグナルは検出できないが(Fig.-3-8B,D)、その条件下でGR/TIF-2のnuclear fociにはGREが局在することが観察された(Fig.-3-8A,C)。このことは、TIF-2上でGRは特異的なDNAに対し結合能を有し、おそらくはホモ二量体を形成して結合していることを示している。

3-6 TIF-2を足場とする転写複合体形成

TIF-2によって形成されるnuclear fociの機能を類推するために、そのfociにどのような内在の因子が含まれているかを間接蛍光抗体法によって検討した。転写統合因子p300および基本転写因子の構成因子TAFを含む巨大複合体を形成しているPCAFを特異的抗体を用いて検出した。その結果、TIF-2を導入していない細胞ではp300、PCAFともに核内で均一に染色されるが(Fig.-3-9A,G)、TIF-2のnuclear fociを形成している細胞ではp300、PCAFともに完全にnuclear foci上に局在が観察された(Fig.-3-9D,K)。よってTIF-2によって内在のp300、PCAFがnuclear foci上へ集合していることが明らかになった。次にこの複合体が転写反応に特異的であるか、また核のどのような領域を用いて集合しているかを検討するために、COS-1細胞に発現している複製に関与するSV40T(Fig.3-10D)、核内でPODと呼ばれる小構造体を形成している白血病病因遺伝子産物PML(Fig.3-10A)、核内レセプターを含む多くの転写抑制機構に関与するSMRT(Fig.3-10G)とTIF-2との局在パターンを検討した。その結果PMLおよびSMRTは核内で小構造体を形成しているものの、TIF-2のnuclear fociとは数及び大きさも異なり、局在する核内領域も異なっていることが観察された(Fig.-3-10A,G,C,I,J)。またp300と結合が報告されているSV40Tは、同様の条件下で核内で不均一なパターンを示しTIF-2のnuclear fociとは異なった核内分布として観察された(Fig.-3-10D)。これらのことより、TIF-2のnuclear fociには転写機能に必須な因子p300、PCAFを含む複合体の基点となり、それらは核内でも転写反応に特異的な領域を占めていることが判明した。特に転写抑制機構に関与するSMRTと局在パターンが異なることから核内レセプターの抑制機構複合体と転写活性化機構複合体は、異なる領域に局在し制御されていることが示唆された(Fig.-3-10J)。

3-7 TIF-2nuclear fociの核内での足場領域と細胞分画化

TIF-2はSMRTやPMLとも異なった領域に局在していることがわかったが、これは核内のどのような領域を用いているかを検討するために細胞の分画化を行った。核マトリックスを分画化する定法に従って0.5% tritonX100(A) 250mM硫化アンモニウム(B) 200 unit DNAaseI (C) 2M NaCl(D)で処理し最終分画を核マトリックス(E)とした(Capco et.al 1982; Fey et.al. 1986; He et.al 1990)。それぞれの分画を定量的にSDS-PAGEを行いTIF-2、SMRT、PMLの抗体を用いウエスタンブロッティングによって検出した。以前の報

告からPMLは核マトリックス分画に検出されることが示されていたが、この手法によってもPMLは核マトリックス分画へ残留した(Fig.-3-11,PML)(Chang KS, et al.,1995; Boddy MN, et al.,1997)。一方SMRTは核内で小構造体を形成しているが、完全に可溶画分に存在した(Fig.-3-11,SMRT)。このような条件下でTIF-2を分画化したところ完全に核マトリックス分画へシグナルが検出された(Fig.-3-11,TIF-2)。

このことからTIF-2は、核マトリックスに強く結合し、これらの構造体を介して複合体を形成していると考えられる。そこで核マトリックス分画においてもTIF-2は複合体を形成しているかを検討した。

3-8 核マトリックス上での複合体形成

細胞分画のウエスタンブローディングの結果から、核マトリックスまたは、それらに結合できる因子へ強く結合していることが判明したが、その状態でTIF-2はどのような局在パターンを示すかを検討した。TIF-2を発現させたCOS-1細胞およびHela細胞を培養したまま状態で、同様の分画化処理を行った。その結果、クロマチンDNAが溶出された状態 (Hoechst33342またはDAPIで染色されない状態) でも(Fig.-3-12F,H)、TIF-2は核内でnuclear fociを形成していることが判明した(Fig.-3-12B,D)。このことからTIF-2は核マトリックスを足場にして、クロマチンDNA非依存的にnuclear fociを形成していることが示唆された。

3-9 TIF-2の核内複合体形成と核マトリックス結合に関与する領域

TIF-2は核内複合体形成と核マトリックス結合という2種類の活性を持つことが示唆されたので、TIF-2上のどの領域が、このような機能を担っているかを検討した。TIF-2は、アミノ末端に潜在的なDNA結合領域であるbHLH-PASドメインをもち、ここに核移行シグナルが存在する。また中央部に核内レセプター相互作用領域(NID)とCID、HAT領域をもつことが知られている(Voegel JJ, et al.,1996,1998)。TIF-2を大きく3つの領域に分け、(Fig.-3-13)で示すような欠失変異体を作製し、各変異体に対して通常に固定しnuclear foci形成を検討し、さらに核マトリックス処理後のTIF-2の残留について検討した。bHLH-PASドメインだけ (Δ Pst Δ HAT) では、nuclear foci形成、マトリックス結合は見られないが(Fig.-3-13D,H)、CID領域後半部分を含むカルボキシル末端領域が存在する (Δ Pst) と核マトリックスへの結合が見られた(Fig.-3-13C)。このときの核内局在パターンは、大きく分けて2種類見られ、一つは核内で均一に局在しているもの、もう一つは核内で2-3個の非常に大きな凝集塊を作っているのが観察された(Fig.-3-13G)。これらはともに核マトリックスに残留することから、カルボキシル末端領域が核マトリックス結合に必要であることが判明した。凝集塊ができる仕組みとしては、未だに不明であるが、何らかの細胞内状態の変化 (たとえば細胞分裂) によってマトリックス蛋白が一時的に核膜から遊離することでTIF-2がそれを取り込んで凝集塊を作ってしまう等の可能性が考えられる。一方全長のTIF-2では、多くのタンパク相互作用

によって、このようなことがおきないように何らかの制御が働いていると考えられる。

一方nuclear foci形成はこれらの欠失変異体ではいずれも見られないため(Fig.-3-11F,G,H)、全長にわたる高次構造が重要か、すべての変異体で分断されているCIDが必要であると考えられる。これらの可能性を検討するためにCIDを含む941-1157番アミノ酸(261アミノ酸)を切り出し、核移行を誘導するためにGal4のDNA結合領域をつないだ融合蛋白質を構築した(Fig.-3-14F)。この融合蛋白質を細胞内で発現させたところ、核内でnuclear foci様の小構造体の形成が観察され(Fig.-3-14B)、興味深いことにこの領域だけで内在のp300と複合体を形成していることが判明した(Fig.-3-14C)。CIDによって小構造体は形成されることが明らかとなったが、 Δ HATでは核マトリックスへの結合も見られないのに対し、 Δ Pstだけで核マトリックスに結合できることから、核マトリックス結合に関して、カルボキシル末端領域のどのドメインが重要であるかを検討した。CIDを含まない1157-1464番アミノ酸領域をGal4のDNA結合領域とつないだ融合蛋白質を構築し、CIDと細胞に遺伝子導入し核マトリックス処理を行い比較した。その結果、CIDが完全に溶出される条件で、1157-1464番アミノ酸領域は核内で非常に微少な顆粒状に局在した。そこで核マトリックスに結合するにはHATを含む307アミノ酸で十分であると判断し(Fig.-3-15C)、この領域を核マトリックス結合領域(NMBD)として同定した。

このことは、CIDでnuclear fociに関与する核内因子を集合させ、NMBDによって核マトリックスに結合し足場を提供していることを意味し、このような結果から、TIF-2には独立に核マトリックスに結合するための領域と核内複合体形成を形成する領域が含まれており、おそらくはそれぞれが別々の因子との相互作用を通じてnuclear fociを形成していると考えられる。

3-10 核内複合体形成 / 核マトリックス結合と転写亢進作用

TIF-2のCIDとNMBDは、ともにTIF-2のnuclear foci形成に必須な領域であるが、これらの領域はGR /TIF-2によって得られた転写活性化亢進作用に対し、どのような影響を持つかをレポーターアッセイによって検討した。(Fig.-3-3B)で示した転写の亢進作用に対し、CIDまたはNMBDをプラスミド量でTIF-2の1.5倍量導入すると、約10倍の亢進活性がNMBDで1.5-2.0倍まで低下し、CIDでは完全に阻害することができた(Fig.-3-16)。これらの結果は、CIDとNMBDが転写活性化の亢進作用にともに重要であることを示唆している。nuclear foci形成に着目して同定した領域であるCIDとNMBDが、転写活性化でも重要な役割を示したことから、nuclear foci形成は転写活性化と密接な相関を持ち、nuclear foci形成を指標にすることで、核内の転写活性化機構を評価する実験系として有用であると考えられる。

以上の結果から、TIF-2は核内でNMBDを介し核マトリックス上に結合しており、CIDを足場としてp300やPCAFなどと複合体前駆体を形成するための足場蛋白質として機能すると予想される。核内レセプター

はリガンドを受け取ると、標的遺伝子上の特異的配列と結合し、この複合体へと誘導され転写開始複合体を形成し転写を活性化すると考えられる。

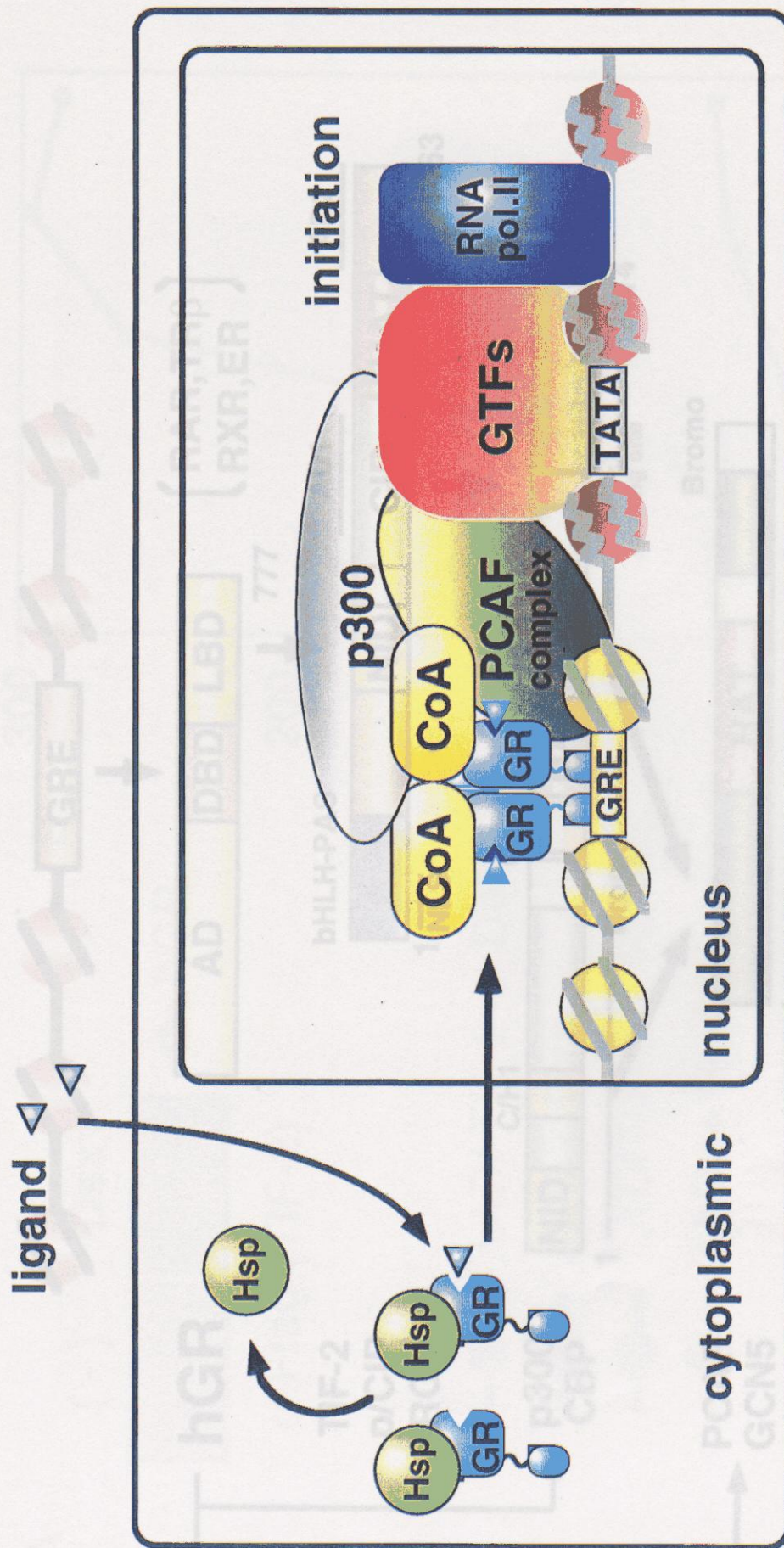


Fig. 3-1

核内レセプターの転写制御に関する巨大複合体形成のモデル

クロマチンDNA上にグルココルチコイドレセプター (GR) がホモ 2 量体で結合する。これを足場に介在因子が誘導され、転写巨大複合体が形成される。

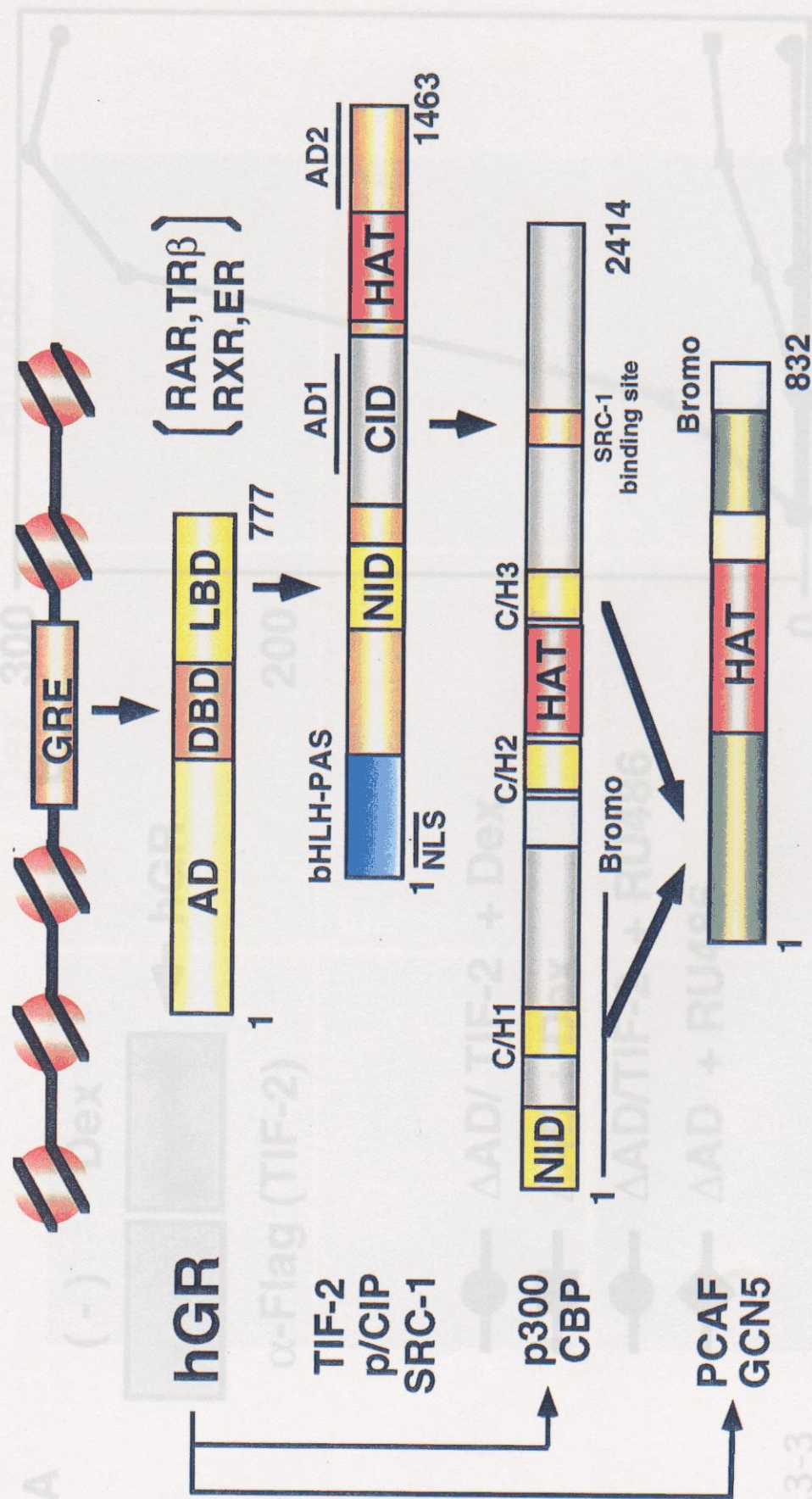


Fig. 3-2
核内レセプターと介在因子の相互作用様式

核内レセプターはリガンドによって活性化され標的配列に結合すると、LBDを介してp160(SRC-1)ファミリーと結合する。さらにp160ファミリーのCIDを介して転写統合因子p300/CBPと結合し、PCAF等を介して転写開始複合体の形成していると考えられている。矢印はこれまでに報告のある相互作用。(HAT)ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、(NID)核内レセプター相互作用領域、(CID)p300/CBP相互作用領域、模式図下の数字はアミノ酸番号を示す。

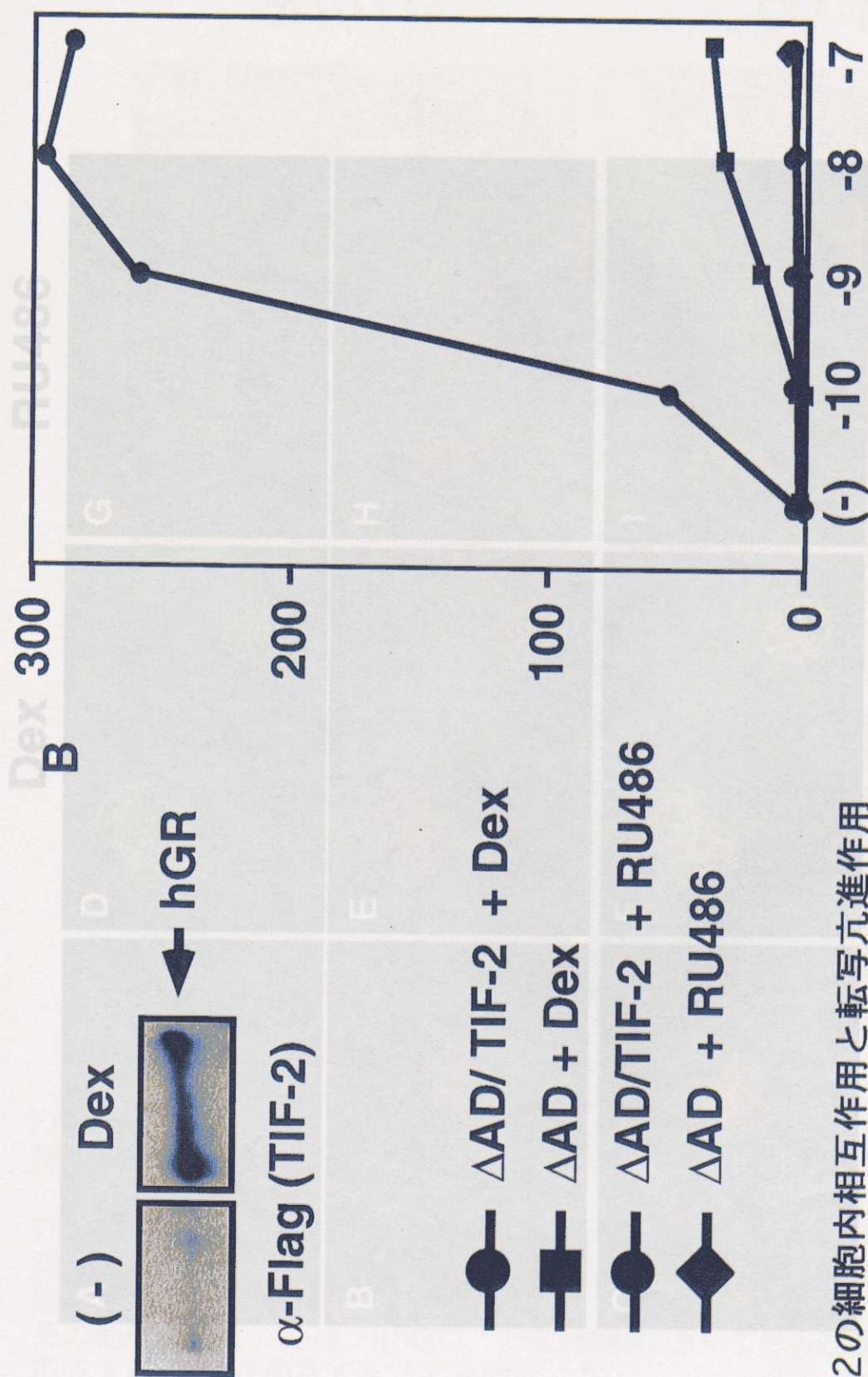


Fig.3-3

GRとTIF-2の細胞内相互作用と転写亢進作用

A: GRとTIF-2(Flag)をCOS-1細胞に発現させて抗Flag抗体を用いて免疫沈降法によって検出した。GRはTIF-2とリガンド(アゴニスト)依存的に共沈した。

B: マウス乳がんウイルス由来のレポーター(MMTV-LTR-Luc)を用いてGRのアミノ末端変異体ΔADの転写活性化能とTIF-2による亢進作用を検出した。

TIF-2はアゴニスト(Dex)依存的に転写の亢進作用を持つが、アンタゴニスト(RU486)では、それらの活性はまったく見られない。(Dex) GRのアゴニスト、(RU486) GRのアンタゴニスト

Dex

RU486

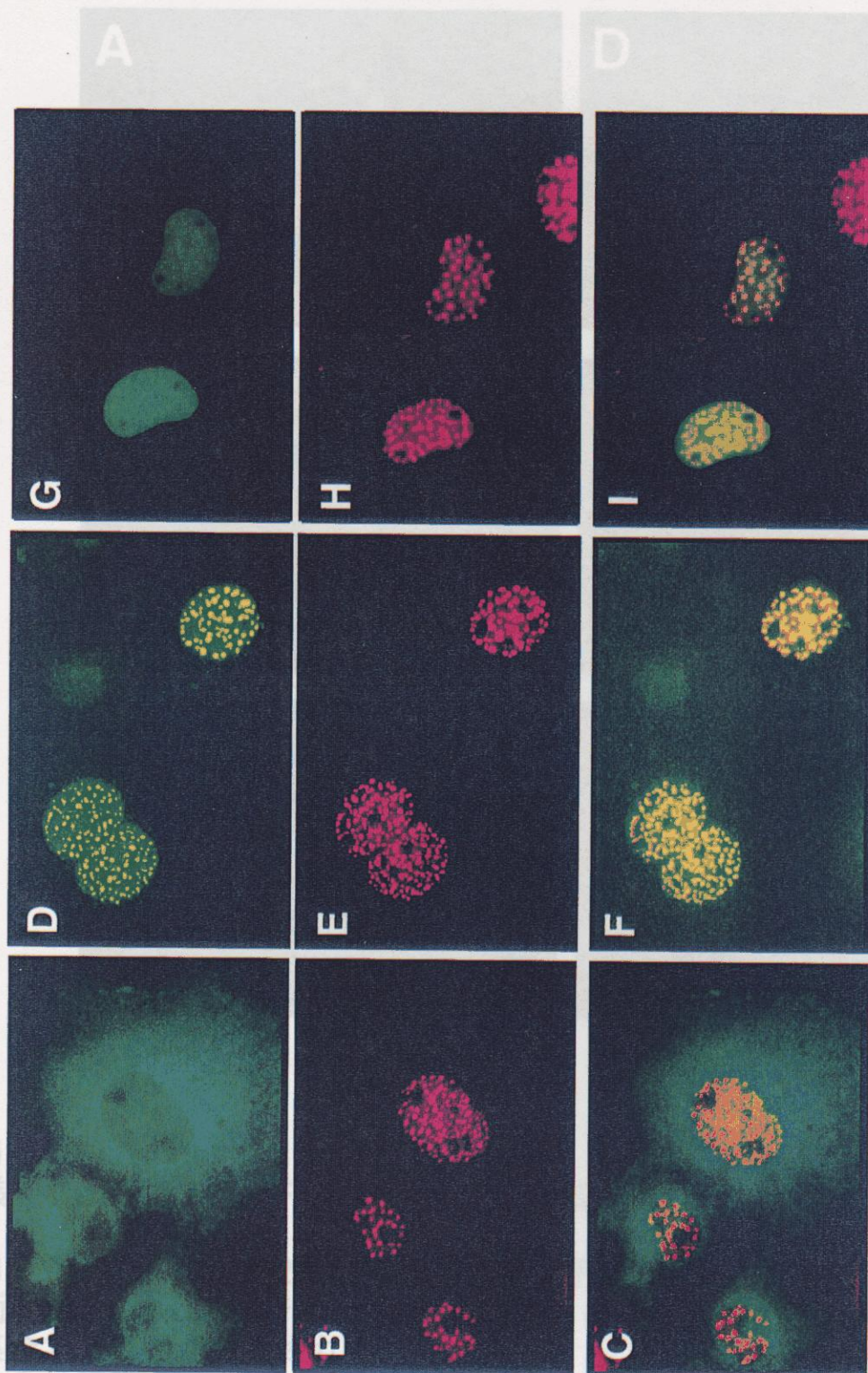


Fig. 3-4

TIF-2のnuclear fociにGRはアゴニスト依存的に集合する

TIF-2とGRの発現ベクターをCOS-1細胞に導入しGRはGFP、TIF-2はFlag抗体によって検出した。

TIF-2はリガンド非依存的に核内でnuclear fociを形成し(B, E, H)

GRはアゴニスト(Dex)依存的に核移行しnuclear fociに集合した(D)。

(A, B, C) リガンド非添加、(D, E, F) アゴニスト(Dex)を添加し1時間培養後固定、(G, H, I) アントゴニスト(RU486)を添加し1時間培養後固定

(A, D, G) hGR-GFPの局在パターン、(B, E, H) 抗Flag抗体によるTIF-2の局在パターン、(C, F, I) 二重染色像

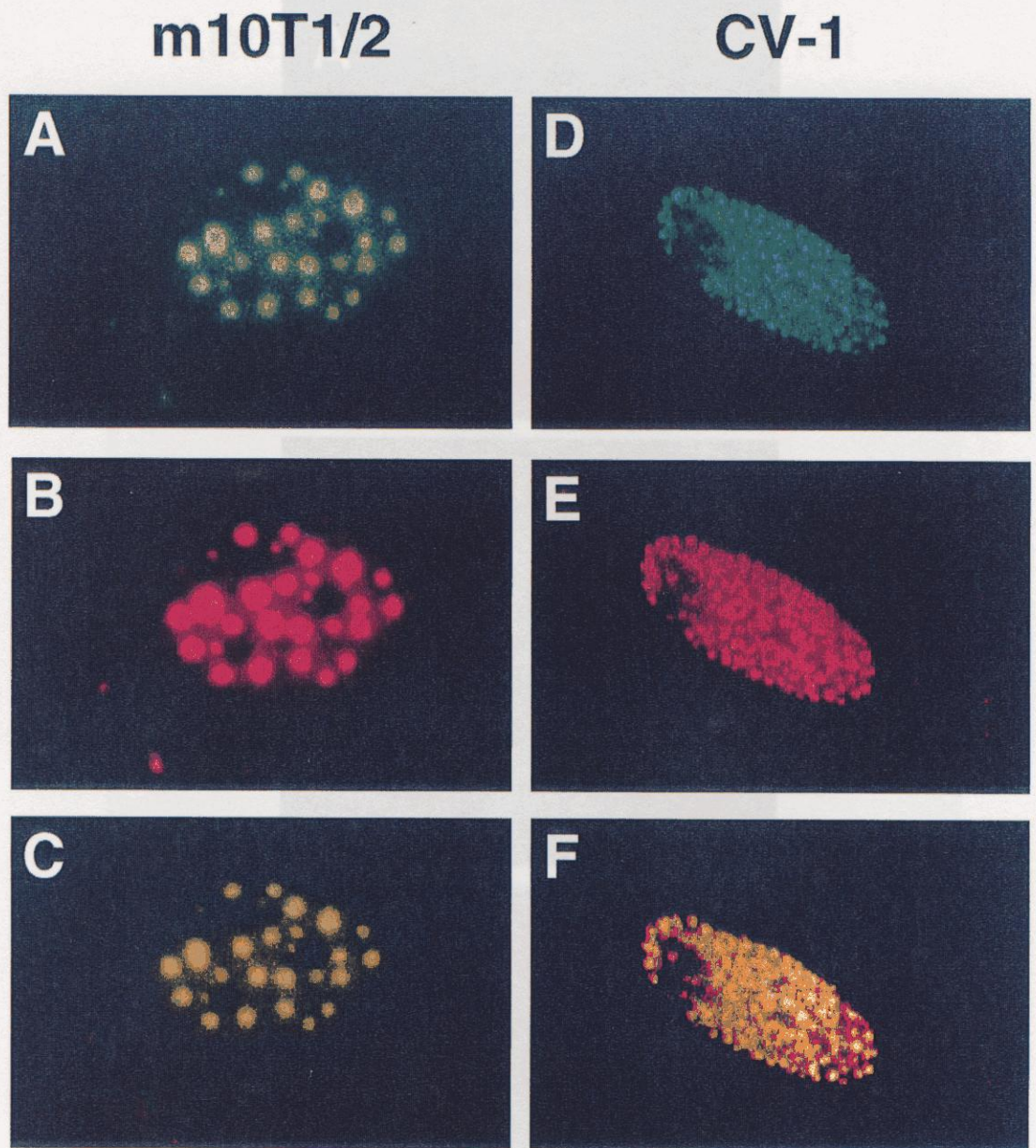


Fig. 3-5

様々な細胞種でのTIF-2nuclear foci形成

TIF-2をマウス10T1/2, CV-1細胞に遺伝子導入し局在パターンを検討した。両細胞ともnuclear fociを形成し、GRはこのfociヘアゴニスト依存的に集合することが観察された。

その他細胞では、Hela, NIH3T3, 3T3L1細胞においてもnuclear fociが形成され、hGRが局在することを確認した。

RAHはリガンド非添加状態の核内で均一なパターンとして観察されたが、レチノイン酸の添加によってTIF-2への集合することが観察された。

at-RA
10 min

at-RA
30 min

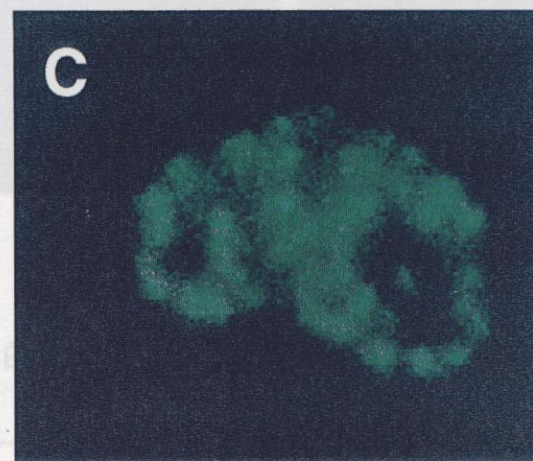
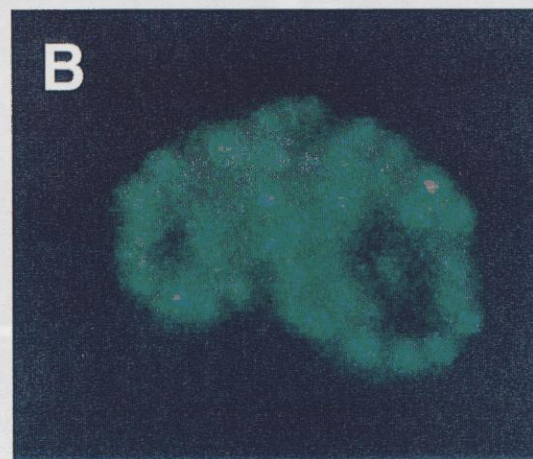
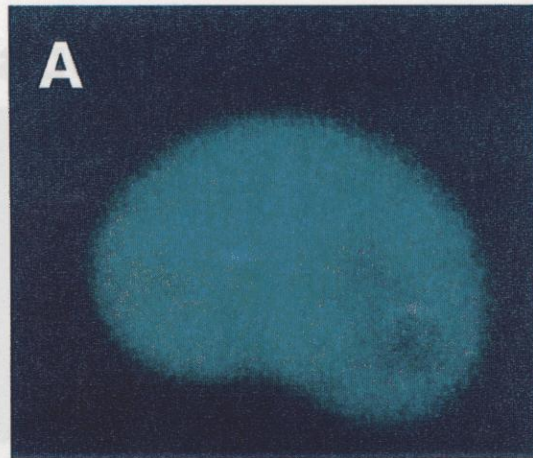


Fig. 3-7

RARαはアゴニスト依存性

GFP-RARαとTIF-2をCOS-

とアンタゴニストリガンドを添加した場合、TIF-2と2重染色を行った。

TIF-2がnuclear fociを形成している核内で、アゴニストを添加した場合は

RARのTIF-2への集合が観察されたが、アンタゴニストを添加した細胞では

RARαはTIF-2へ同一核内におけるRARαのTIF-2への集合過程

GFP-RARαの融合タンパク質とTIF-2をCOS-1細胞に発現させて、
リガンド添加後経時的に核内局在パターンを観察した。
RARαはリガンド非添加状態の核内で均一なパターンとして
観察されたが、レチノイン酸の添加によってTIF-2への
集合することが観察された。

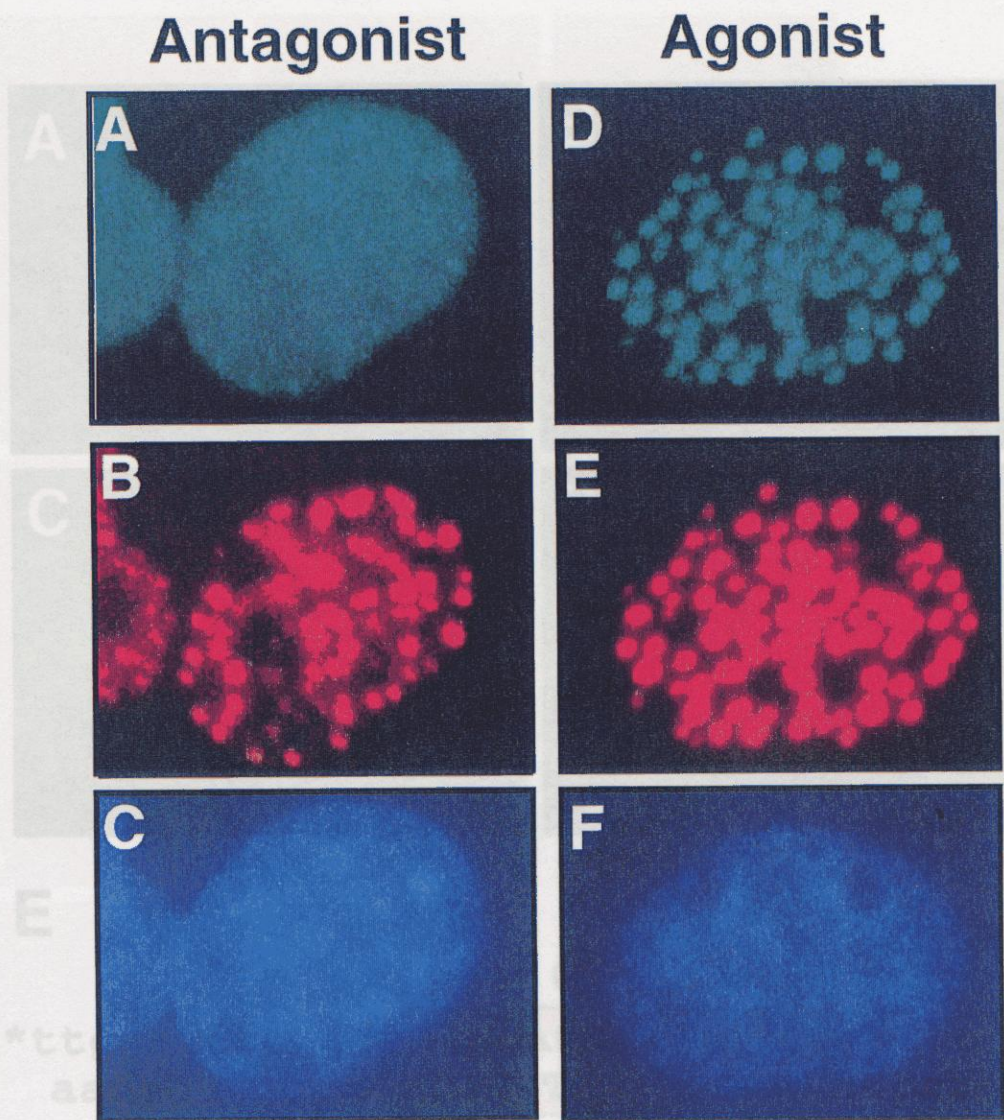


Fig. 3-7

RARαはアゴニスト依存的にTIF-2に集合する

バイオチン化したCREはTIF-2 nuclear fociよりGR特異的に局在する。

GFP-RARαとTIF-2をCOS-1細胞に発現させてアゴニストリガンドとアンタゴニストリガンドを添加し30分培養後、TIF-2と2重染色を行った。TIF-2がnuclear fociを形成している核内で、アゴニストを添加した場合はRARのTIF-2への集合が観察されたが、アンタゴニストを添加した細胞ではRARαはTIF-2に集合は観察されなかった。

(E) 導入したバイオチン化CRE、**バイオチン、矢印は6塩基のコンセンサス配列

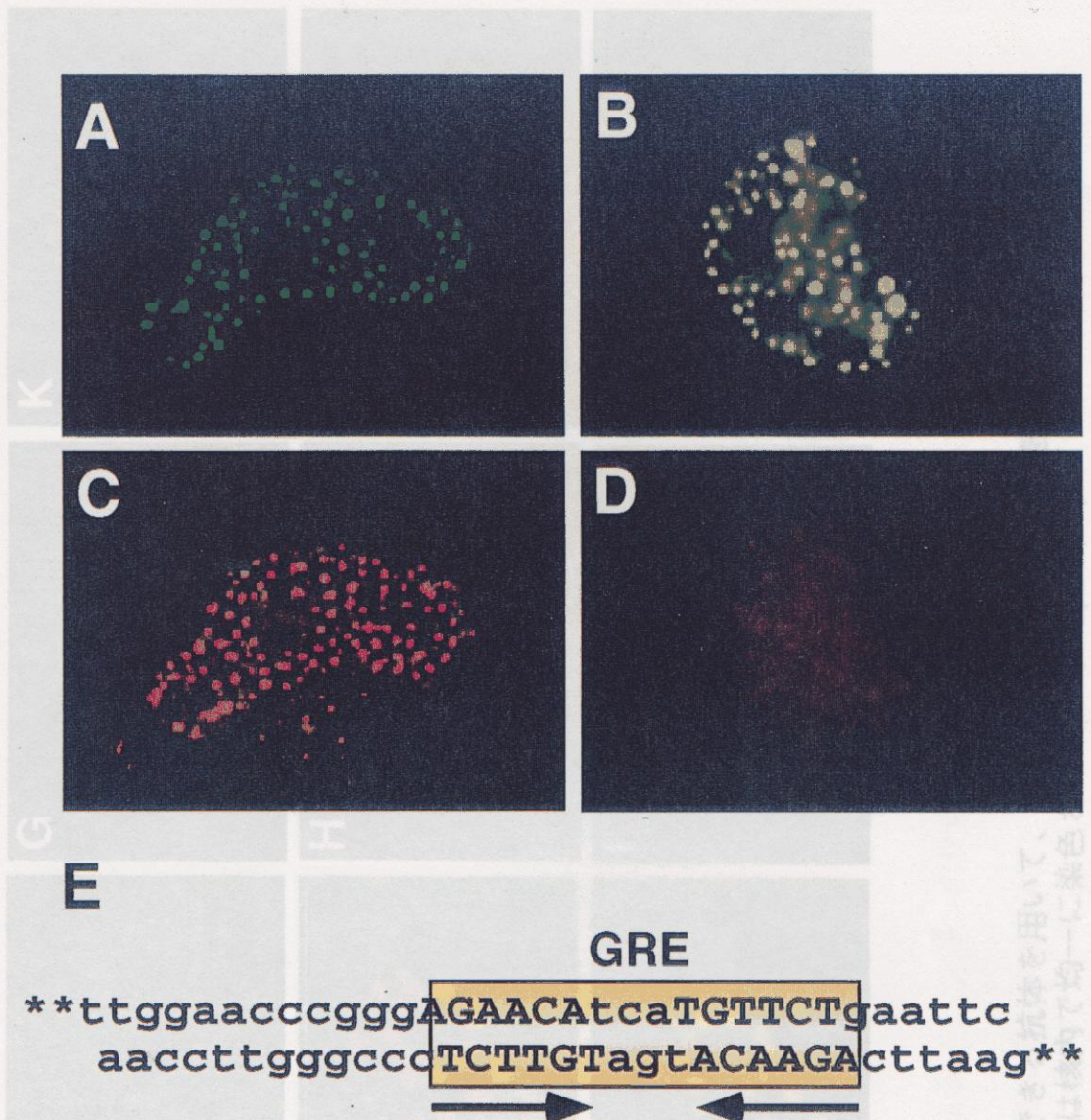


Fig. 3-8

ビオチン化したGREはTIF-2nuclear foci上にGR特異的に局在する。

hGR/TIF-2、hER/TIF-2のnuclear fociへビオチン化したGREを核へマイクロインジェクションし抗ビオチン抗体で染色した。

(A)hGR/TIF-2、(B)hER/TIF-2、(C)hGR/TIF-2に局在したGRE、

(D)hER/TIF-2nuclear foci上に特異的なシグナルは検出できなかった。

(E)導入したビオチン化GRE、**ビオチン、矢印は6塩基のコンセンサス配列

PML

SV40T

SMRT

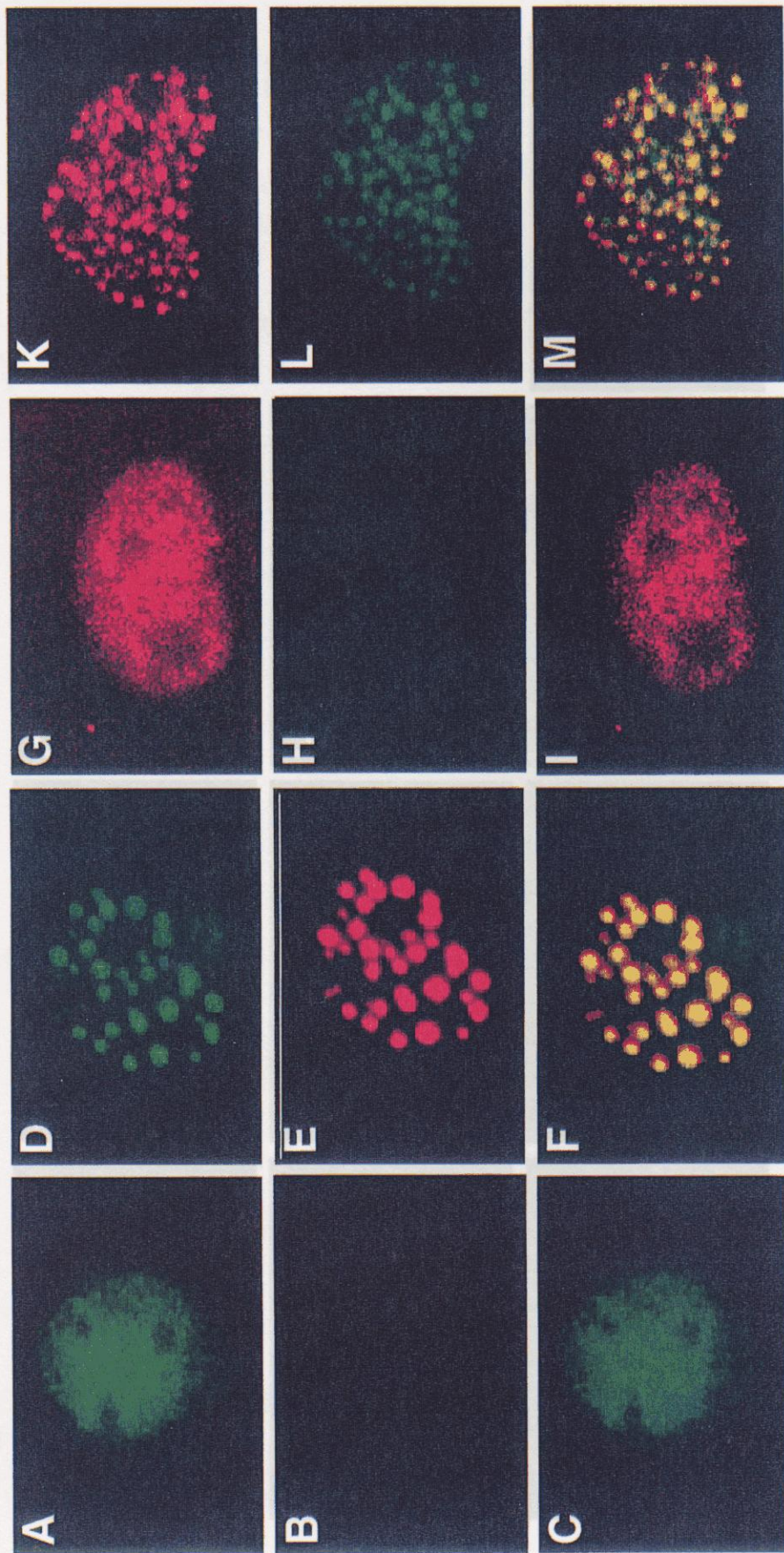


Fig. 3-9

TIF-2複製体構成因子

TIF-2複製体構成因子SV40T/SMRTとの局在パターンの比較

内在のp300/PCAFそれぞれを認識できる抗体を用いて、TIF-2との局在パターンを比較した。p300/PCAFともにTIF-2非存在下では核内で均一に染色されるが(A-C, G-H)、TIF-2存在下ではp300, PCAFともにTIF-2のnuclear foci上に誘導される(D-F, K-L) (A, D) p300染色像 (B, E, H, L) TIF-2の染色像 (C, F, I, M) 2重染色像

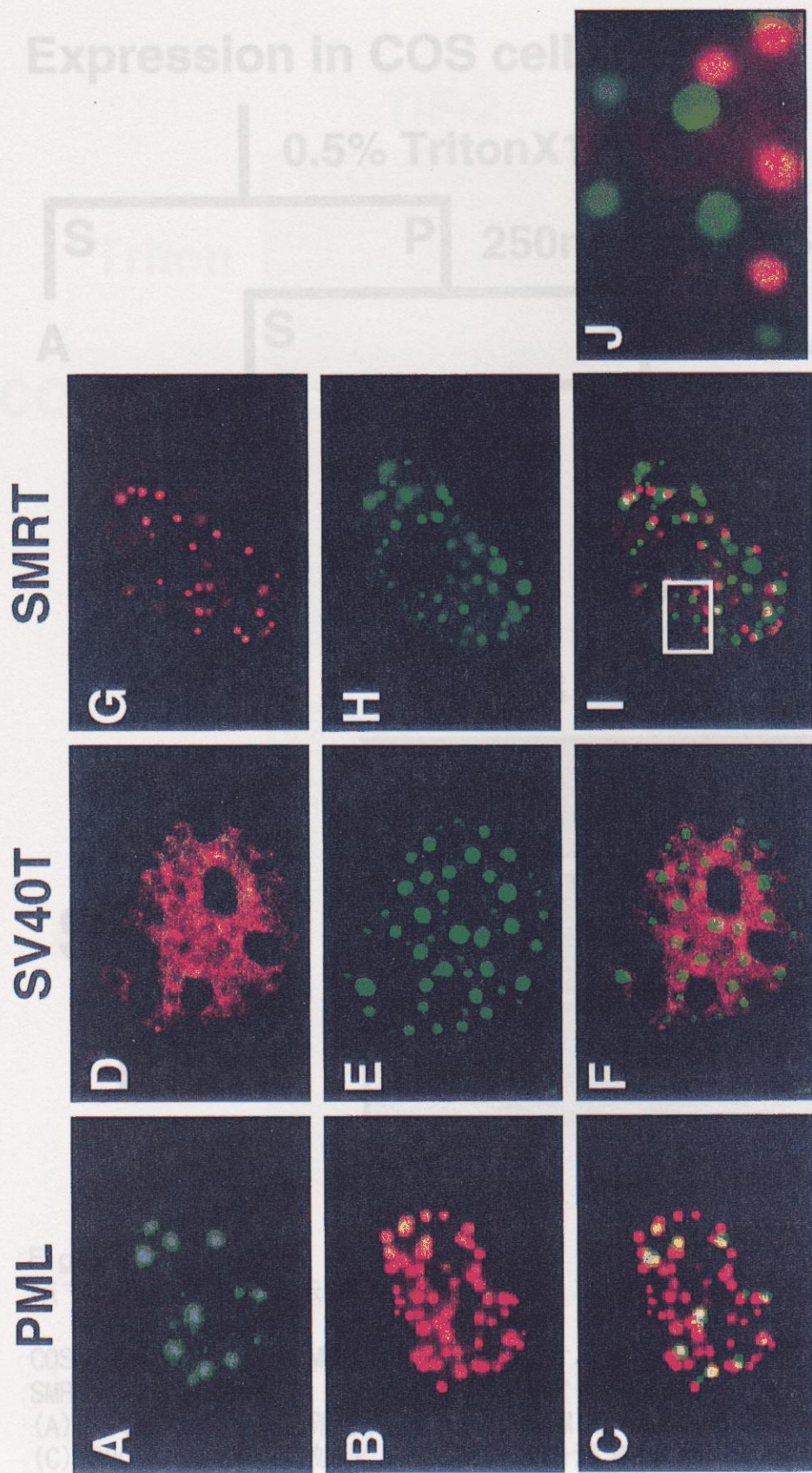


Fig. 3-10
TIF-2nuclear fociとPML/SV40/SMRTとの局在パターンの比較

TIF-2と白血病遺伝子産物PML、複製に関与するSV40T、核内レセプターの転写抑制因子SMRTとTIF-2の局在パターンの比較を行った。
PML(A), SV40T(D), SMRT(G)のパターンはTIF-2(B,E,H)のパターンに誘導されず、異なった領域に局在した。(J)は(I)の白線部拡大図。

Expression in COS cells

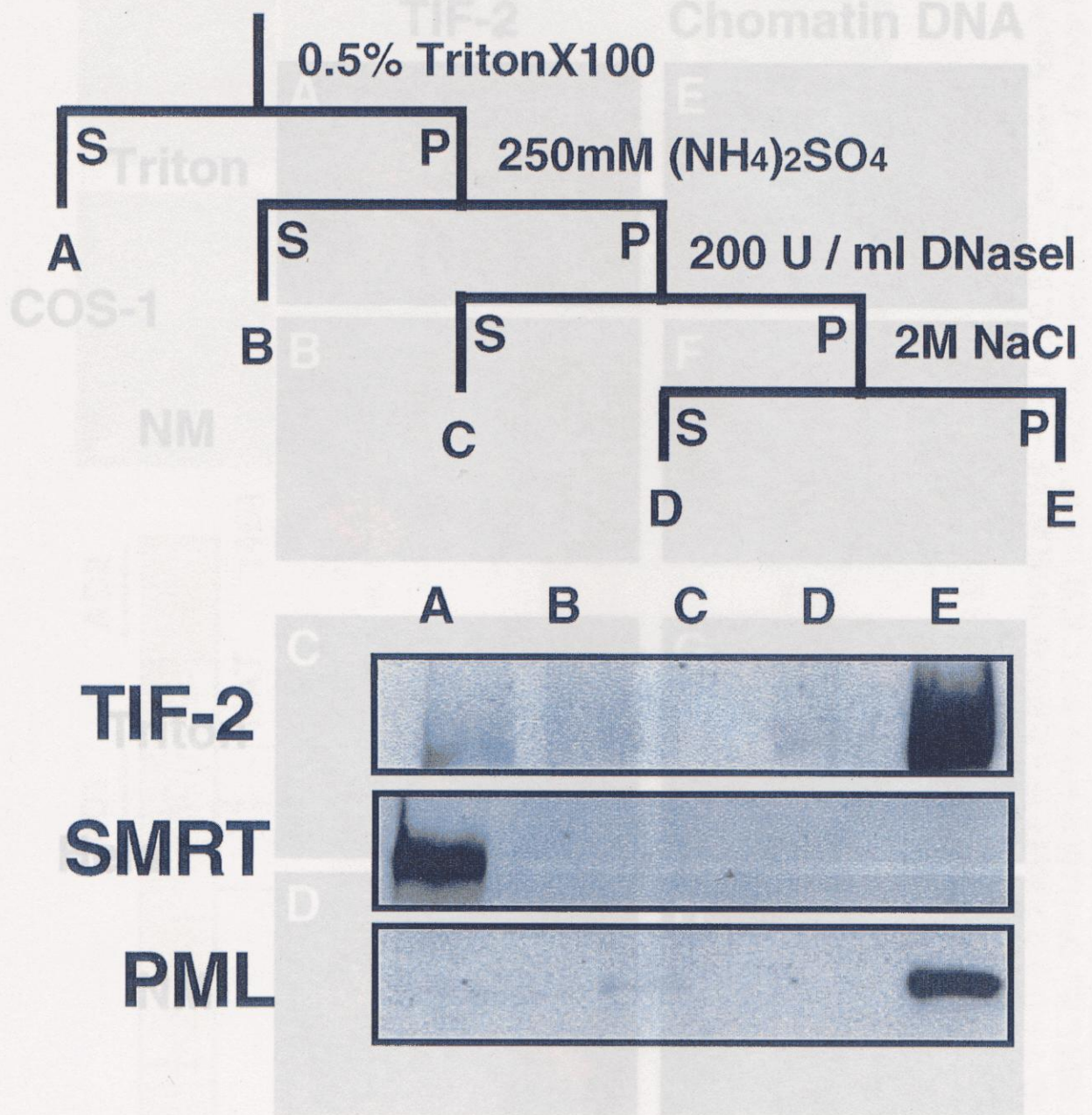


Fig.3-11

核マトリックス分画法によるTIF-2、PML、SMRTの比較

COS-1細胞にTIF-2、SMRT、PMLを発現させ、核マトリックス分画処理を行った。
SMRTは可溶化画分に、PMLとTIF-2は核マトリックス分画へシグナルが検出された。

(A)TritonX100 0.5%溶液処理、(B)250mM 硫酸アンモニウム処理、
(C) 200 u/ml DNaseI処理、(D) 2M NaCl溶液処理、(E)核マトリックス分画

(N.M.)核マトリックス分画処理した後に固定 (B, D, F, H)

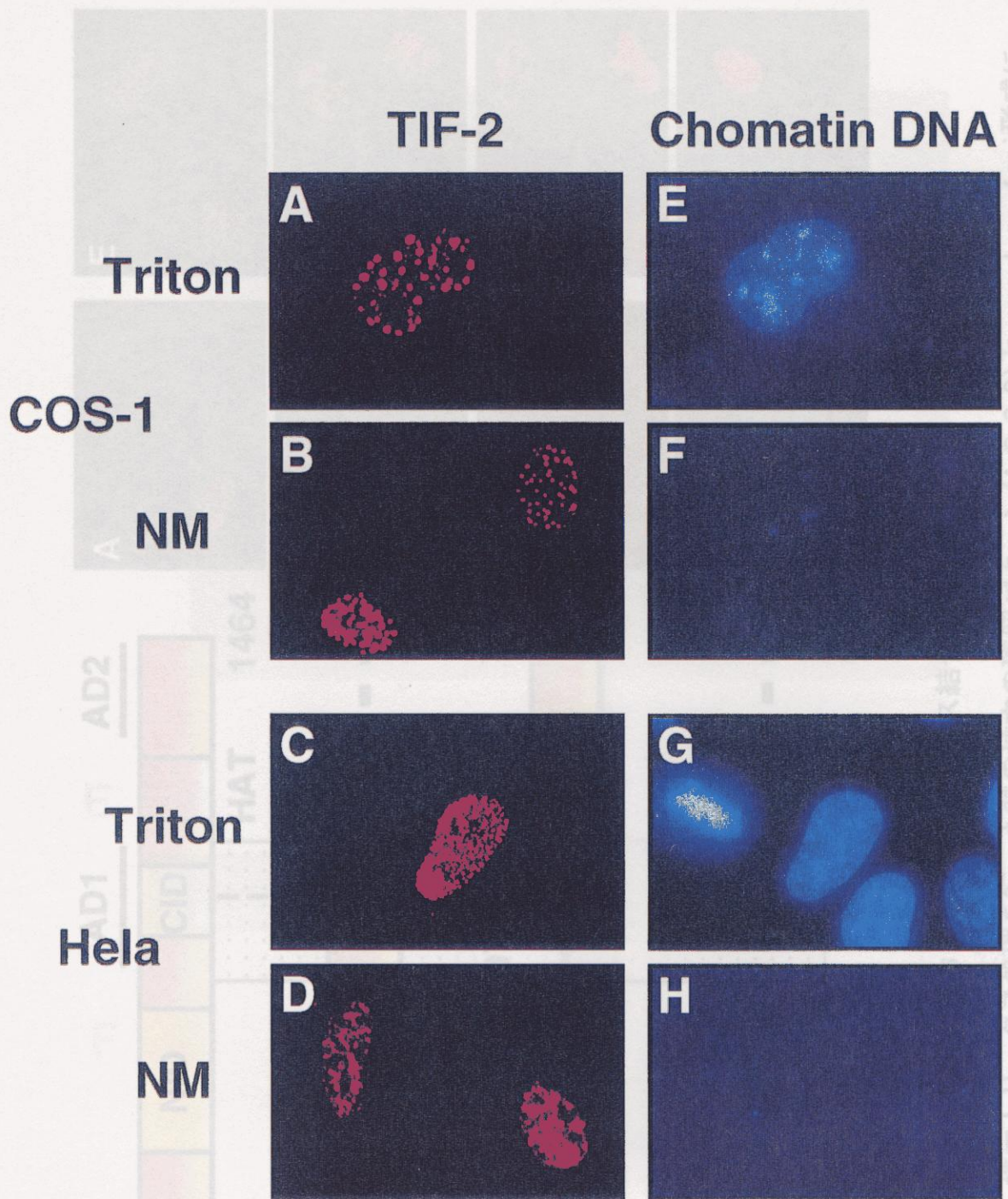


Fig.3-12
*in situ*によるTIF-2発現細胞の分画化

COS-1細胞、Hela細胞にTIF-2を発現させ、培養状態で核マトリックス分画処理を行った。TIF-2はクロマチンDNAが溶出された状態(F, H)でも核内でnuclear fociを形成し残留した(B, D)。

(Triton)0.5%のTritonX100溶液処理で固定(A, C, E, G)

(N.M.)核マトリックス分画処理した後に固定 (B, D, F, H)

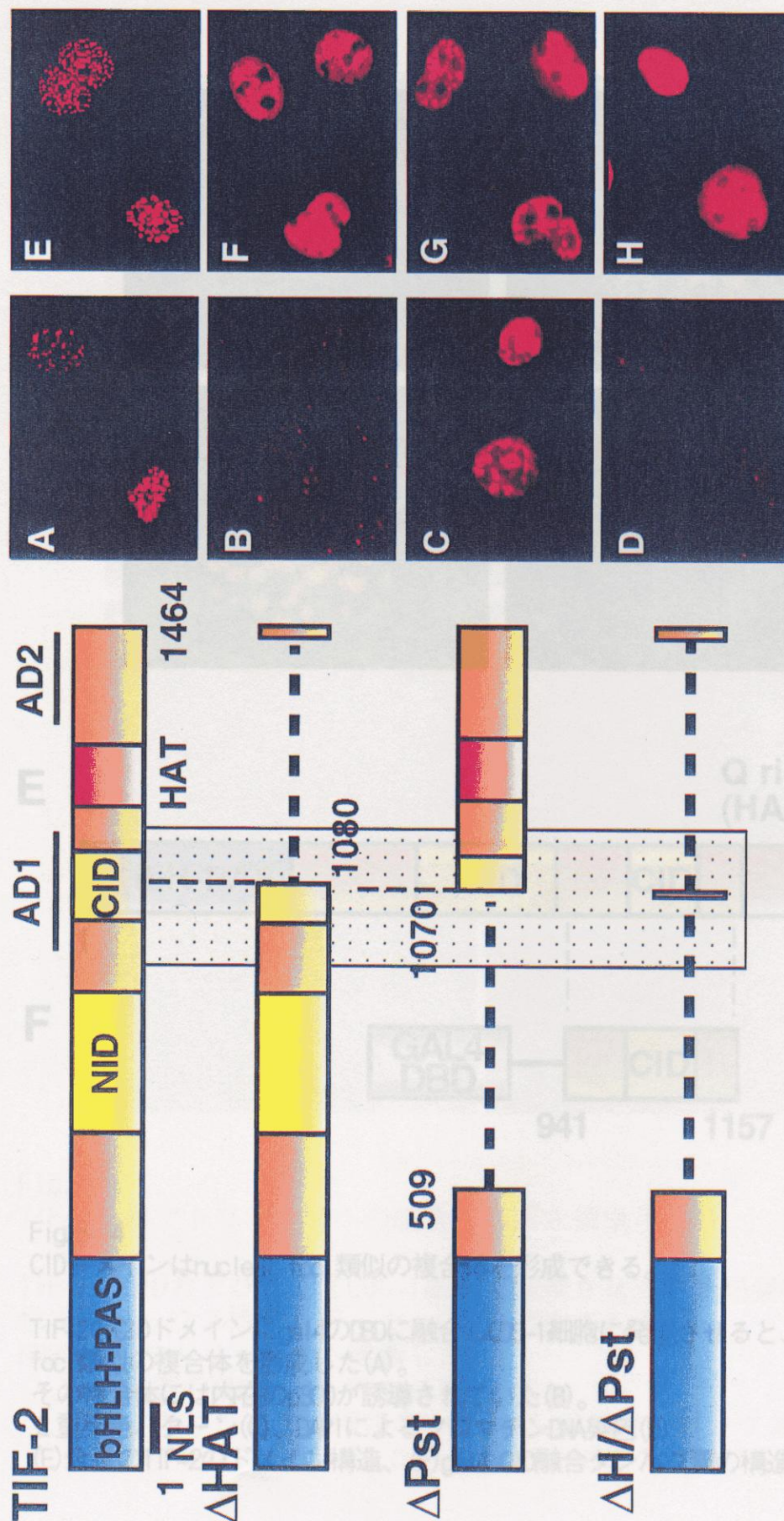


Fig. 3-13

TIF-2欠失変異体による、nuclear foci形成および核マトリックス結合領域の同定

TIF-2の欠失変異体を作製し核マトリックス処理を行った時の核内の残留パターン(A,B,C,D)と、nuclear foci形成にパターン(E,F,G,H)について検討した。DPstは核マトリックスに結合したが、nuclear fociはこれらいずれの変異体でも形成でなかったために、[]の領域が重要であると考えられる。

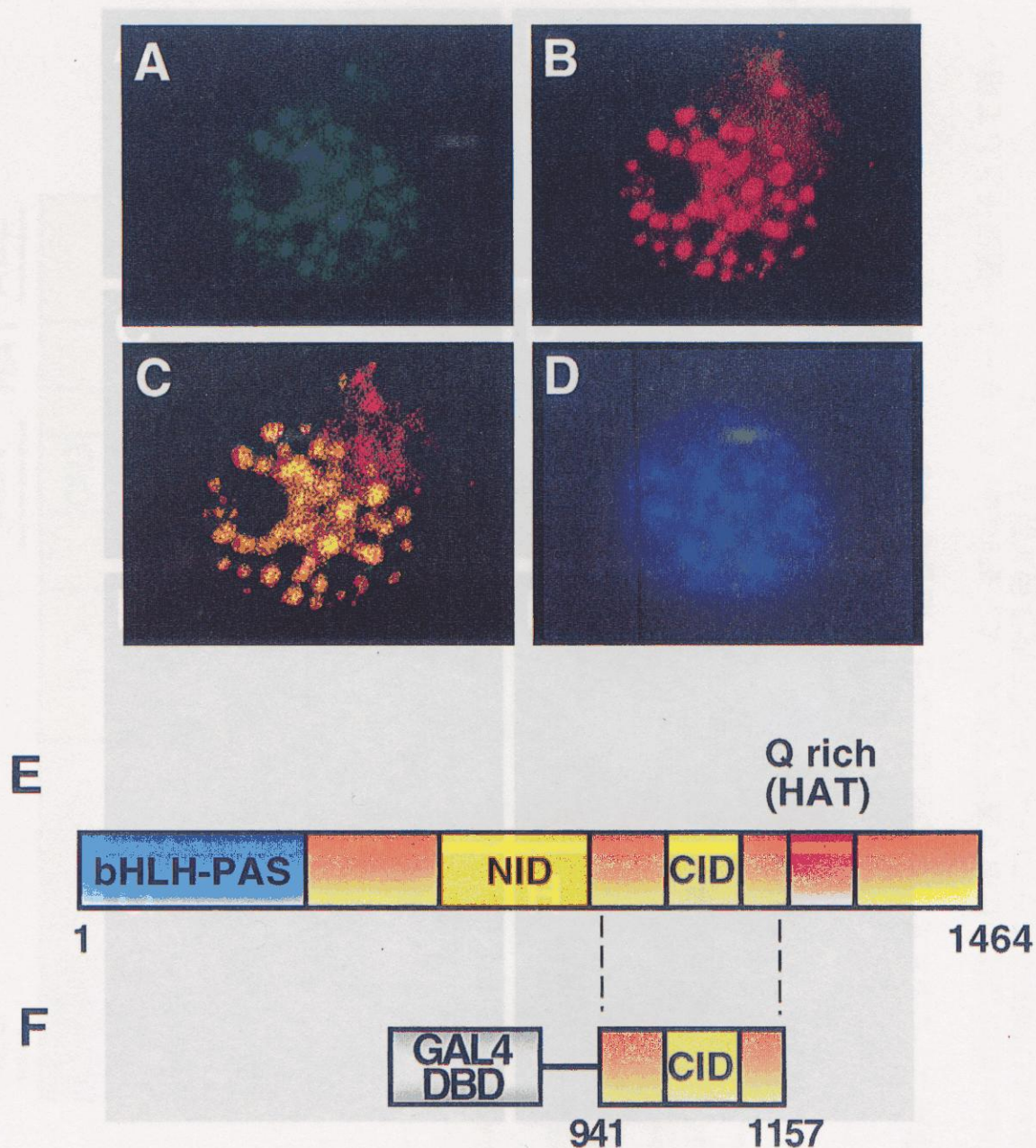


Fig. 3-15

Fig. 3-14

CIDドメインはnuclear foci類似の複合体を形成できる。

TIF-2の核マトリックスへの結合に必要な領域(NMED)

TIF-2のCIDおよびNMEDをCOS-1細胞に発現させ、36時間培養後、

TIF-2のCIDドメインにgal4のDBDに融合しCOS-1細胞に発現させると、核内でnuclear

foci類似の複合体を形成した(A)。

その複合体には内在のp300が誘導されていた(B)。

2重染色パターン(C)、DAPIによるクロマチンDNA染色(D)

(E)全長のTIF-2のドメイン構造、(F)gal4-CID融合タンパク質の構造

リックス処理後のCID。

IAの染色像

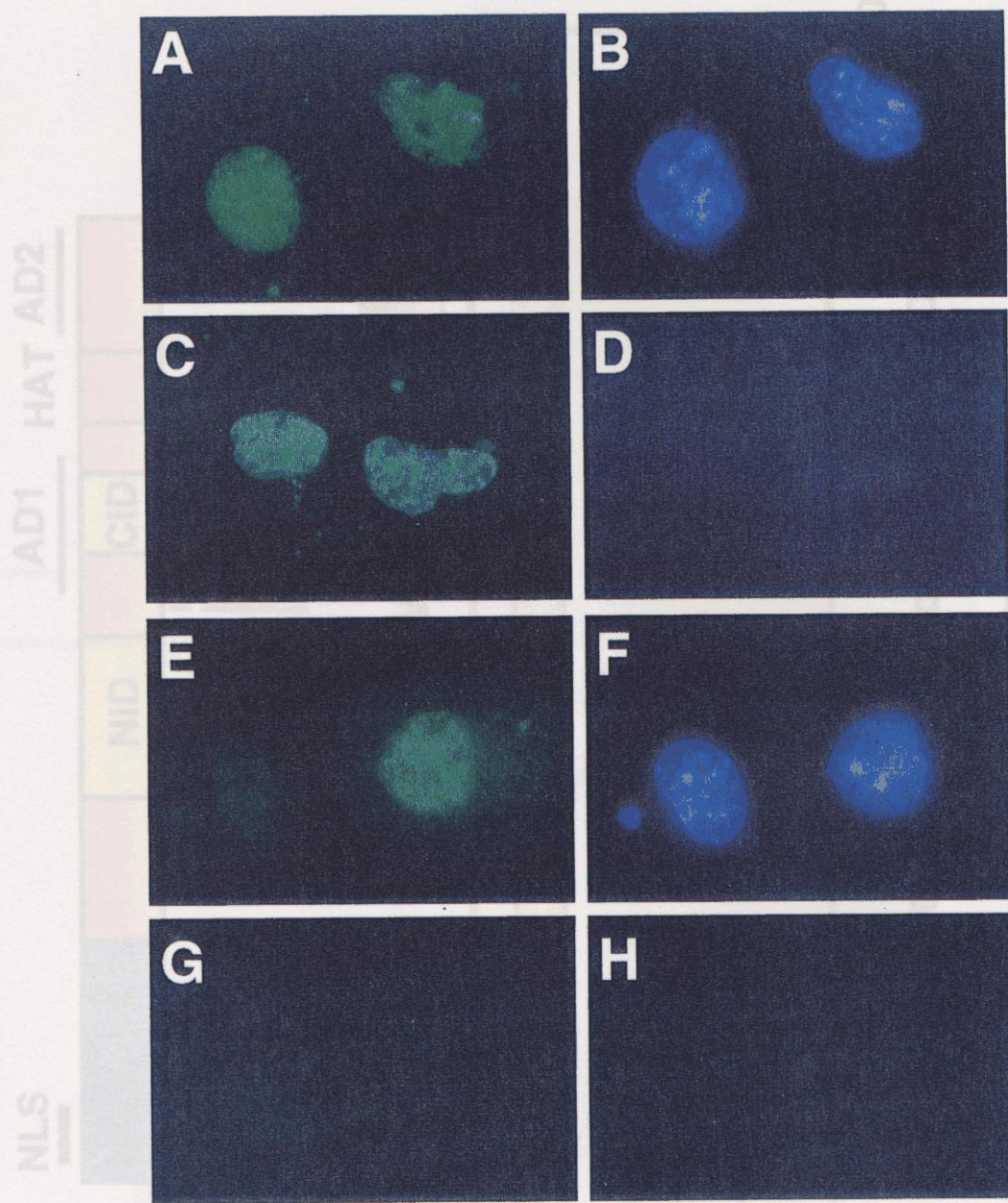


Fig. 3-15
TIF-2の核マトリックスへの結合に必要な領域(NMBD)

TIF-2のCIDおよびNMBDをCOS-1細胞に発現させ36時間培養後、核マトリックス処理を行った。CIDは溶出されるが、NMBDは核マトリックスへ残留した。

(A, B) 未処理のNMBD、(E, F) 未処理のCID、
(C, D) 核マトリックス処理後のNMBD、(G, H) 核マトリックス処理後のCID。
(A, C, E, G) GFPシグナル、(B, D, F, H) DAPIによるクロマチンDNAの染色像

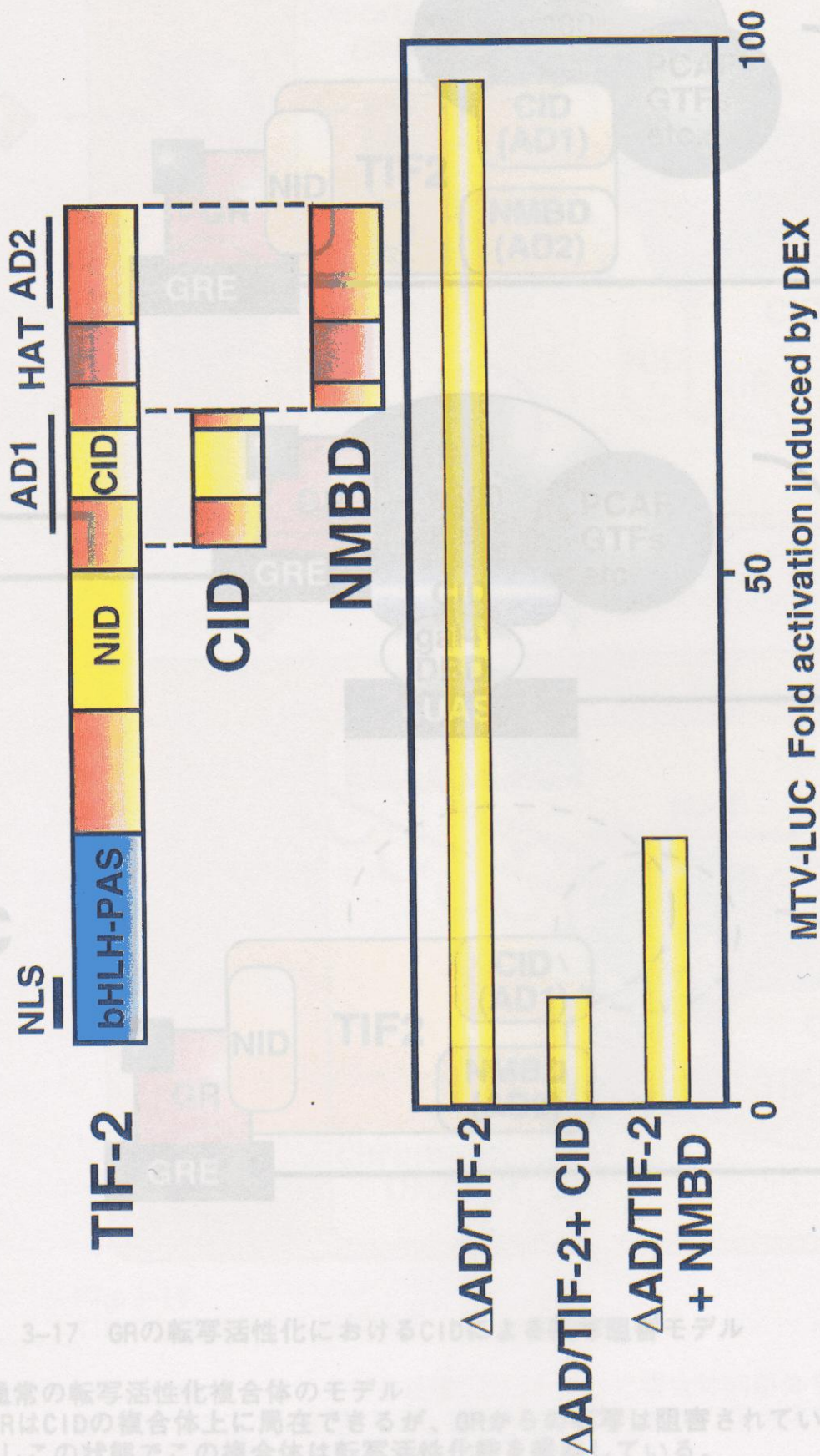


Fig. 3-16

TIF-2のGRに対する転写亢進作用は、CIDまたはNMBD領域によって阻害される

GR: TIF-2: CIDまたはHAT/AD2をplasmid比1:2:3の比率で遺伝子導入した。MTV-Lucをレポーター遺伝子として用いて、転写活性化能を測定したところ、CIDおよびNMBDによってTIF-2の転写亢進作用が阻害された。CIDによってCBP/p300との相互作用阻害、NMBDによって核マトリックスへの結合阻害が起こったためと考えられる。

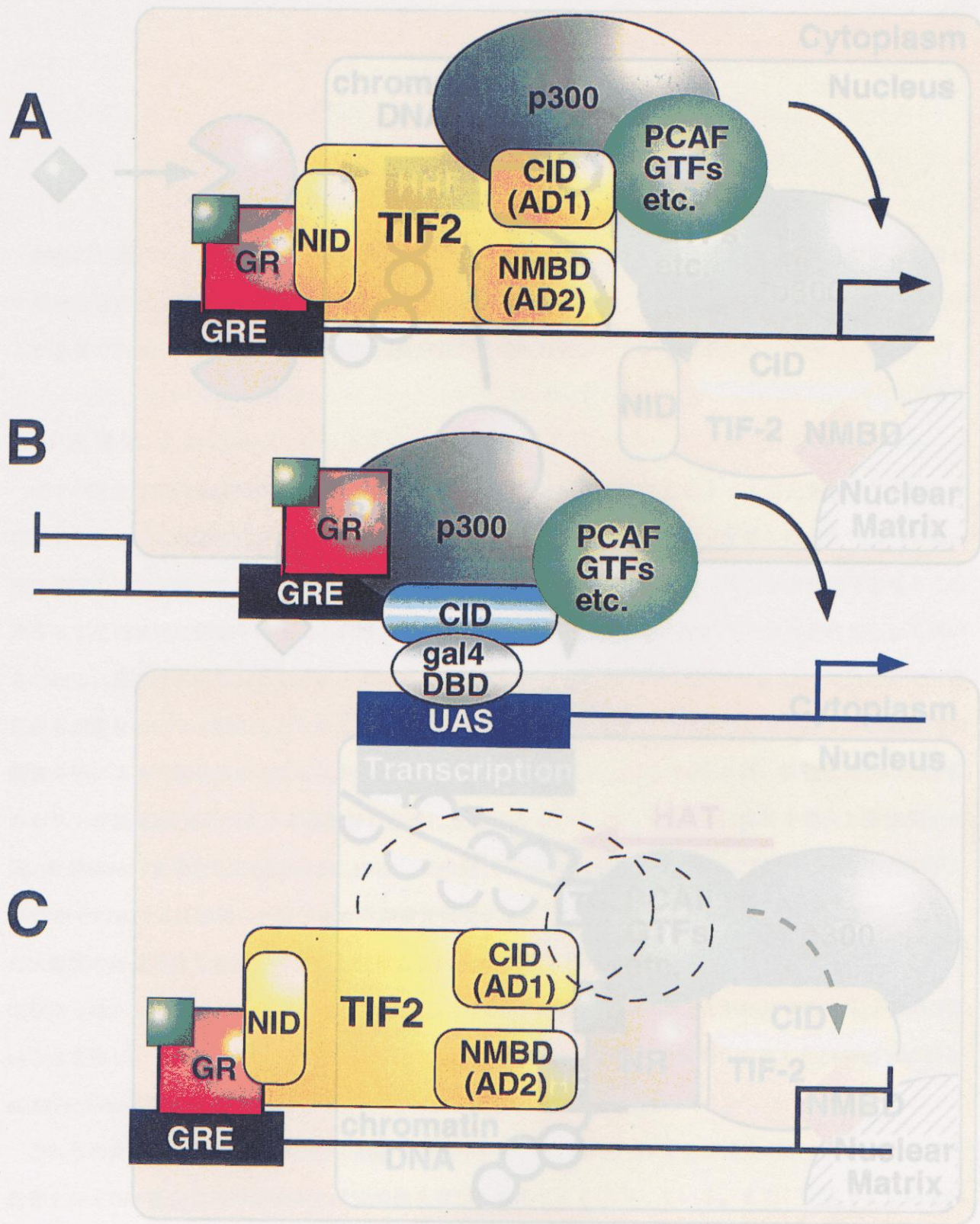


Fig. 3-17 GRの転写活性化におけるCIDによる転写阻害モデル

- (A) 通常の転写活性化複合体のモデル
 (B) GRはCIDの複合体上に局在できるが、GRからの転写は阻害されている。しかしこの状態でこの複合体は転写活性化能を維持している。
 (C) gal-CIDの発現している細胞ではGR/TIF-2上にp300/PCAFをリクルートできない。形成している標的遺伝子の転写を活性化する。

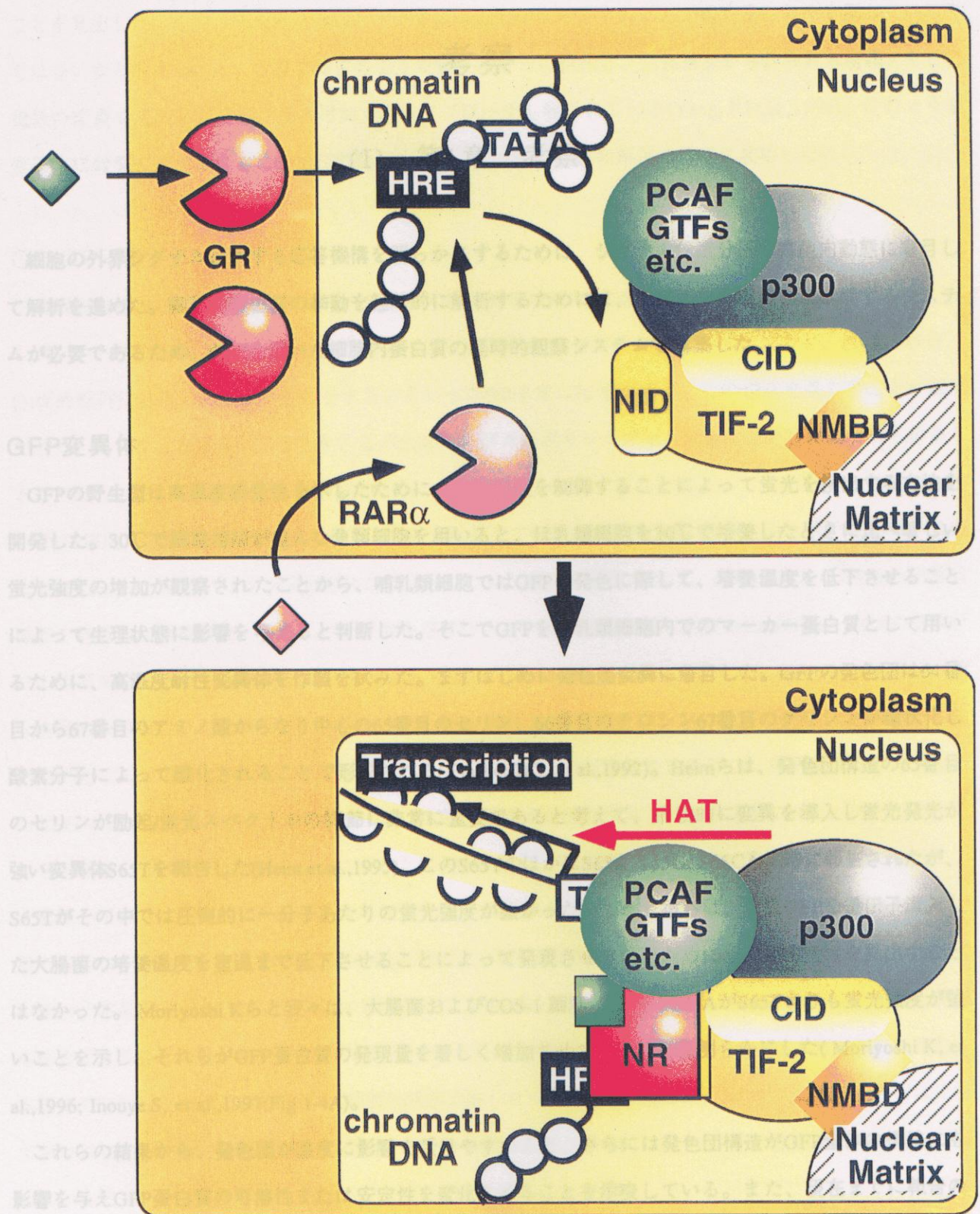


Fig.3-18

TIF-2を足場とする転写複合体モデル図

TIF-2は核マトリックスを足場にCIDを介して複合体前駆体を形成している。GRはアゴニストに結合すると自らの標的配列をこの複合体まで輸送し、転写開始複合体を形成する。この複合体はTIF-2, p300, PCAFのもつHAT活性を駆使してクロマチン構造を形成している標的遺伝子の転写を活性化する。

考察

(I) 第1章 考察

細胞の外界シグナルに対する応答機構を明らかにするために、シグナル伝達分子の細胞内動態に着目して解析を進めた。細胞内蛋白質の挙動を経時的に解析するためには、生細胞を非破壊的に観察するシステムが必要であるため、GFPを用いた細胞内蛋白質の経時的観察システムを構築した。

GFP変異体

GFPの野生型は高温感受性を示したために、培養温度を制御することによって蛍光を検出する方法を開発した。30℃で細胞増殖が盛んな魚類細胞を用いると、ほ乳類細胞を30℃で培養したときに比べ著しい蛍光強度の増加が観察されたことから、哺乳類細胞ではGFPの発色に際して、培養温度を低下させることによって生理状態に影響を与えると判断した。そこでGFPを哺乳類細胞内でのマーカー蛋白質として用いるために、高温耐性変異体を作製を試みた。まずはじめに発色団変異に着目した。GFPの発色団は64番目から67番目のアミノ酸からなり中心の65番目のセリン、66番目のチロシン67番目のグリシンが環状化し酸素分子によって酸化されることで形成される(Prasher DC, et al.,1992)。Heimらは、発色団構造の65番目のセリンが励起/蛍光スペクトルの調節に非常に重要であると考えて、系統的に変異を導入し蛍光発光が強い変異体S65Tを報告した(Heim et.al.,1995)。このS65TのほかにS65A, S65G, S65Cも同時に報告されたが、S65Tがその中では圧倒的に一分子あたりの蛍光強度が強かった。しかし彼らは、変異GFPを遺伝子導入した大腸菌の培養温度を室温まで低下させることによって発現させていたために、温度感受性を見出すことはなかった。Moriyoshi Kらと我々は、大腸菌およびCOS-1細胞においてS65AがS65Tよりも蛍光強度が強いことを示し、それらがGFP蛋白質の発現量を著しく増加させていることを明らかにした(Moriyoshi K, et al.,1996; Inouye S, et al.,1997;Fig 1-4A)。

これらの結果から、発色団が温度に影響を受けやすいこと、さらには発色団構造がGFP全体の構造にも影響を与えGFP蛋白質の可溶性または安定性を変化させることを示唆している。また、現在までに報告のあったランダム変異導入による蛍光強度の増強を行った変異体を比較し、励起蛍光波長が変化せずに蛍光強度が増強しているものを選定した(Anderson, M. T.et.al.,1996; Cramer, A et.al.,1996; Heim, R.et.al.,1994)。その結果、発色団以外の特定のアミノ酸(Y145,V163など)は変異が導入されることによって、37℃での発現量が増加することが観察され、発色団の変異と独立に特定の励起、蛍光波長をもった変異体を増強する

ことを見出した。このような変異体はGFPの立体構造をサポートすることで発現量の増加を担っているのではないかと考えられる。現在ではこのような変異体からの情報と、立体構造から得られる情報をもとに複数の変異を導入し、蛍光強度の増加を図るアプローチも取られている(Yang, F.et.al.,1996)。このような変異体に対する概念をもとにGFPの変異導入を試み、高温耐性変異体の作製に成功した。

GR-GFP融合タンパク

高温耐性GFPを用いてGRの細胞内動態を可視化するために、GR-GFP融合蛋白質を構築し検討した。レポーターアッセイと局在パターンの観察により、1) リガンドと特異的に結合し、(2)核へ移行、(3)標的配列に結合し転写を活性化をする。といったGR本来の転写因子としての機能を果たすことが証明できた。このような結果は、GFPをアミノ末端およびカルボキシル末端どちらに融合した場合にも得ることができた。(Ogawa et.al ,1995,1997)。

GRは細胞内で様々な因子と相互作用し機能を果たしていると考えられるが、GR融合蛋白質を用いた研究ではCarey, K. L.らがリガンド依存的な核移行について独立に検討を加え、生細胞におけるGRの核移行機能を経時的に観察した。さらに、一般的な核移行シグナルの輸送機構に必要なRanGTPaseがGRの核移行にも重要であることを生細胞を用いた実験系で示した(Carey, K. L, 1996)。このことからGRの核移行機構も典型的な核移行シグナルを介したキャリアー蛋白質によって担われていることを示唆している。また核内の挙動に関しては、Htun, H.によってリガンド依存的なGRの転写活性に着目し、染色体上に取り込まれたMMTV-LTR-Lucレポーター遺伝子をGFP-GR融合蛋白が活性化することが示された(Htun, H., 1996)。これらの報告は、実際にGFP-GRがクロマチン構造を形成した標的配列を認識し、転写を活性化できることを意味しており、GFP-GRが核内でクロマチン転写に関与する因子と相互作用できることが考えられる。彼らもGRのアゴニスト依存的な核内小構造体形成を観察しているが、その形成機構については検討していない。本研究ではGR-GFPがリガンド依存的にLBDを介して介在因子TIF-2によって形成される複合体とも結合できることが明かにし、核内で転写複合体を形成していることが観察された(第3章参照)。また、本研究で作製したGR-GFPがリガンド非添加状態で熱ショック蛋白質(HSP90)と結合することも田中らによって示されており(旭川医大、田中ら:私信)、GR-GFPは細胞質や核において本来の機能をほぼ完全に維持していると考えられる。

(II) 第2章 考察

GFPによる細胞内蛋白質の可視化システムを用いて、GRの細胞質から核へのシグナル輸送機構の解析を行った。はじめにGRがどのようなシグナルによって核へ誘導されるかを検討した。

核移行を誘導する因子

GR-GFPは転写活性化のアゴニストであるDex、アンタゴニストであるRU486だけでなく、熱ショックによっても核移行が誘導された。熱ショックによつては、HSF (Heat shock transcriptional factor)やHSP70が核移行することが知られている。しかしこれらの移行に要する時間は15-30分とGRの移行時間である90-120分に比べ短い。GRのように遅効性の核移行としては、Mukai HらによってPKNが90min 42℃の条件下で核移行することが報告されている(Mukai H et.al., 1996)。GRやPKNはHSFやHSP70等のような即効性の熱ショック応答ではなく、細胞応答に伴った2次的な現象であることが予想される。GRが熱ショックによって核移行が誘導される原因として以下の仮説が立てられる。

- (i) 熱ショックによってGR自身が構造変化を起こし核移行シグナルが活性化される。
 - (ii) GRに結合している因子 (HSP70など) の核移行に伴った。
 - (iii) 熱ショックを受けた細胞内で、核移行を誘導するような新たなシグナル (リガンド) が合成された。
 - (iv) 細胞質への保持機構が解除された。
- (i)の仮説のように熱ショックセンサーがGR上に存在すると考えるには、熱ショックによる核移行は、リガンド添加の場合に比較して、応答する細胞がまばらであり、核移行の割合が熱ショックを受けた細胞ごとの感受性の違いを反映しているように観察されたので、直接GRに熱が作用しているとは考えにくい。また(ii)の仮説のようにHSP70のような即効性の核移行因子に結合しGRが移行するとは、あまりにも応答が遅効性のために、つれられて核移行したようにも観察されなかった(Yang, J., 1994)。むしろ(iii)のように核移行を誘導できるリガンド様の2次的産物が熱ショックによって生成され、それによって移行すると考えるか、(iv)の仮説のように、GRを積極的に細胞質に保持している能力が何らかの原因で低下することによって、核移行が誘導されるとも考えられる。このような熱ショックによるGRの核移行は速やかに核から排出されるため核内で転写機構をになっているとも考えにくく、実際にどのような機能を果たしているかは現時点で不明である。もしも転写活性化ではなく、GRが何らかの因子を核内へ運搬するような働きであれば、熱応答因子の核移行に比べて遅効性であるこのような時間的ずれは、生理現象として非常に興味深い制御である。

GRの局在化制御

GR欠失変異体の解析から、DBDが核内保持に、LBDは細胞質保持に機能していることを明らかにした。核への局在化に関しては、PicardとYamamoto によってratGRの欠失変異体の解析からNL1 (497-524アミノ酸) ,NL2(540-795アミノ酸)とよばれる2ヶ所の核移行シグナルが同定されている(Picard D.,1988)。NL1はnucleoplasminにみられるbipartite型の典型的な核移行シグナルで、LaCasseらはクロスリンク法によりNL1の領域に分子量60、76KDaの蛋白質が検出されることを示している(LaCasse EC, et al.,1993)。このクロスリンクのパターンはSV40Tの核移行シグナルと同様であったことから、これら2種類の蛋白質の核移行には同じ蛋白質が作用していると考えた。一方CareyらによってSV40Tの核移行に必要なRan/TC4GTPaseが、GRにも必要なことが示され(Carey KL, et al.,1996)、GRの核移行シグナルNL1にはimportin α/β などのキャリアー蛋白質が結合すると予想される(Savory JGA, et al.,1999)。細胞質の保持に関してはW.B.Prattらによってリガンド結合以前のGRLBDにHSP90が結合することが証明され、GRは核移行シグナルをHSP90によって覆われることで細胞質に留まるというモデルが提唱されている(Pratt WB, et al.,1997)。このモデルに対して、NL1直後に融合したGFPによって核移行が阻害されたGR500-GFP(Fig.-2-4E; GR500-GFP)は、GFPによってNL1へのキャリアー蛋白質の結合を阻害したと考えれば、Prattのモデルに一致する。しかし、アミノ末端のAD領域を欠いた Δ AD変異体は、リガンド非添加でもほとんどが核に局在することから(Fig.-2-4G)核移行シグナルをHSP90が阻害しただけでは、厳密な局在制御には十分でないことを示唆している。GRと欠失変異体 Δ AD、GR550とHSP90の融合蛋白質の解析の結果、HSP90がLBDに結合することと、アミノ末端のRTS1とが協調的に作用し、細胞質保持を行っていることが明らかになった(Fig.-2-11, 12)。この結果は今までGRの局在パターンがHSP90の結合によって制御されていたモデルに対して、もう一つのRTS2を設定することで、Fig. 2-5に示した仮説(ii)を強く指示するものであり、より厳密な局在パターン制御機構を提唱するものである(Yang, J.,1996; Pratt WB, et al.,1997。Prattのモデルを指示する結果としてKang KI, et al. らはHSP90に核移行シグナルを融合することでGRがリガンド非添加でも核へ局在できるようになること、GRにも核移行シグナルをもう一つ付加しHSP90が核へ局在できるようになることを示した(Kang KI, et al. ,1994; Leclerc P, et al. ,1998)。これらの結果も、今回提唱した2つのRTSと核移行シグナルによるバランスによってGRの局在が制御されているモデルに対して矛盾はない。

GRの細胞質での機能

これまでの結果からも、GRの細胞質への保持は厳密に制御されているが、細胞質でGRが局在する理由については、ほとんど明らかになっていない。核内レセプターのリガンドである脂溶性ホルモン、ビタミン

ンは細胞膜、核膜を自由に透過できるため、核内レセプターの多くが核内で保持されていることは、核移行というステップを省くことができ合理的に見える。このことから考えてもADとLBDの2ヶ所を用いて局在を厳密に制御していることから、GRの細胞質保持には積極的な理由が予想される。仮説としては、(i)細胞質での他の因子制御。(ii)細胞種特異的なGRの制御 が考えられる。

(i)細胞質での他の因子制御

GRは様々な転写因子の活性化阻害効果が知られており、抗炎症作用や免疫抑制作用などに寄与していることが示されている。それらの現象に関与する代表的な因子としてはNF κ -B, AP-1があげられる(De Bosscher K, et al., 1997; Kerppola, T. K. et al., 1993)。しかし、いずれの場合もGRのリガンド依存的にこれらの転写活性化に対して抑制効果を発揮することから、これらの因子と細胞質で相互作用し抑制効果が発揮されるというよりは、リガンドを受け核移行後に作用していると考えられる。このようなリガンド依存的な抑制効果の中で、Xiao N.らによって、GRがHSP70のプロモーター上でHSF1の転写活性化をリガンド非依的に抑制することが示された(Xiao N, et al., 1997)。HSP70の局在パターンが主に細胞質であること、GRのリガンドを添加すると抑制効果が阻害されることから、この制御が細胞質で行われていると考えられる。しかしこの実験系では細胞質に遊離したHSP70が枯渇するまでGRを発現させることで、HSFのHSP70プロモーターに対する転写活性化が見られることから、細胞内でこのような転写制御が実際に行われているかには不明な点も多い。

(ii) 細胞種特異的なGRの制御

今回の実験では、COS-1細胞を用いてGRの細胞内局在について検討したが、同様の実験を他の細胞でも行くとマウス乳癌由来のC127細胞はCOS-1細胞と同じく比較的細胞質への保持能力が強いものに対して(Htun, H., 1996; DATA not shown)、CV-1細胞はGRの細胞質保持能が著しく弱く、リガンドを加えなくとも殆どの場合核でのシグナルが観察される。このパターンはCOS-1細胞における Δ ADの局在パターンに類似している(DATA not shown)。これらの原因として、CV-1細胞は血清中の内在性リガンドを細胞内に保持する能力が強く、十分に細胞からのぞけていない可能性も考えられる。しかし、この条件下でレポーターアッセイ行っても転写の活性化は全く見られないことから、もう一つの可能性として、ADに作用するRTS2結合因子が、細胞種特異的であることも考えられる。HSP90は普遍的に、そして大量に細胞内に発現していることから、GRのLBDにHSP90が結合し細胞質保持を制御しているRTS1の作用は、おそらくどの細胞においても共通の機構であると予想される。しかし、細胞種においてGRの局在パターンが異なるのは我々のCV-1の結果の他にも、MartinsらによってCHO細胞でリガンド非結合のGRが核へ局在すること

を述べている(Martins VR, et al. ., 1991; Brink M, et al.,1992)。このことからアミノ末端のRTS2を介してGRの局在パターンが細胞種特異的に制御されるのではないかと考えられる。

細胞質保持と核排出

このようにGRの細胞局在を制御するRTSについて考察してきたが、GRが細胞質に局在するには、細胞に積極的に保持される以外に、核から常に排出される結果として、細胞質に存在する可能性も考えられる。近年MAPキナーゼなどに核から細胞質に積極的に排出するシグナルが同定されnuclear export signal:NESと呼ばれている。GRのRTS2付近にこのシグナルと同等のものを仮定すると細胞質へ保持と考えていた機構が、積極的に核から細胞質へ排出されているとしても矛盾はない。本研究において熱ショックによって核へ移行したGRが、短時間に細胞質へ排出されることを観察している (Fig. 2-4)。GRの分子量から推定される大きさは(GR-GFP 約120KDa)、核膜孔を自由拡散で透過できる大きさ(約60KDa)から比べれば2倍近く大きい。このことからGRが核から積極的に排出される機構が関与しているとも考えられる。ごく最近、核排出阻害剤leptomycin Bを添加することによってリガンド非添加状態のGRが核に蓄積することがSavoryらによって観察されている。この結果はGRが頻繁に細胞質から核へ往復輸送されている可能性を示唆しているが、核排出に必要な領域はGR上に特定されていない(Savory et al.,1999)。今回の研究からGRのアミノ末端にNESが存在する可能性も考慮に入れたが、現時点の結果からは細胞質保持、核排出のどちらにGRアミノ末端のRTS2が機能するかは確証がなく、今後検討の必要がある。

本研究では、GFPを蛍光タグとして用いることで単一の生細胞でGRの挙動を観察し、GRの局在制御に関して固定や抗体の浸透処理などによる人為的な局在パターン変化を避け、細胞内の蛋白質本来の挙動を追跡することが出来た。しかしこれらの観察事実は大多数の分子の挙動の観察であって、特定の分子がどのような過程を経て動いてきたかを明らかにするには至らなかった。例えば、GR分子が細胞質に局在している場合、細胞質に保持されたままであったのか、細胞質から核へ移行後すぐに排出されて細胞質に局在が観察されているのかは、分子の動きを追跡することが必要であると考えられる。現在精製した蛋白質であれば、一分子を蛍光顕微鏡で観察することが可能となってきた。今後は、様々なタンパク分子が共存する生細胞内で、従来よりも高感度な蛍光分子の検出が必要であり、それらのシステムの開発が期待される。

(III) 第3章 考察

fociと核内レセプターの相互作用および転写活性化

TIF-2が核内でnuclear fociを形成することおよび、多くの転写関連因子がこのnuclear fociに集合することを観察した。コアクチベーターと核内レセプターの相互作用については、主に酵母や動物細胞を用いたtwo-hybrid法や免疫沈降法、GSTプルダウン法などによって解析されている(Voegel JJ, et al.,1996; Chen H, et al.,1997; Ding XF, et al.,1998)。J.J. Voegelらは、細胞内でTIF-2と核内レセプターの相互作用を可視化するために、COS-1細胞にTIF-2の核移行シグナル欠失変異体と核内レセプターのRAR α , ER, PRそれぞれとを共発現させ、リガンドを添加後のTIF-2変異体の局在パターンを観察した。その結果いずれのレセプターの場合も、リガンド依存的にTIF-2変異体の核移行がみられ、このことから細胞内でTIF-2と核内レセプターはリガンド依存的に結合できることを示した。またLeeらは、RIP140が核内で特異的なドットパターンを示し、そのドット上にTR2が局在することから、RIP140とTR2が核内で相互作用することを示した(Lee CH, et al.,1998)。我々はTIF-2が核内でfociを形成することを利用し、核内レセプター(GR/MR/ER/TR/RAR)が転写活性化剤(アゴニスト)依存的にfociへ局在し(Fig.-3-7)、転写抑制因子であるCOUPは同一核内に共存していても、fociに局在しないことを見いだした(DATA not shown)。GRにおいて、この結果はレポーターアッセイの転写亢進作用と一致する(Fig.-3-3B)。さらにマイクロインジェクションによって導入したGRの結合配列をもつDNAプローブは、GR依存的にTIF-2のfoci上に局在が見られ、核内レセプターは特異的結合配列をもつ標的遺伝子(レポータープラスミド)をリガンド依存的に核内の特定領域へ運搬することが可能であることを示している(Fig.-3-8)。このことは核内レセプターがDNA結合能や2量体形成能を有した転写因子としてTIF-2のfoci上に局在していることを示唆している。これらの結果は、コアクティベーターと核内レセプターの相互作用を可視化しているだけでなく、核内レセプターのfociへの局在と転写活性化能には密接な相関があることを示した。このシステムはGRの核移行と転写活性化という今まで分離してみることの出来なかった過程をコアクティベーターとの結合過程を可視化することによって可能とした。

核内での転写複合体形成

この実験系では、TIF-2が核内で形成しているnuclear fociは単一分子で形成されたものではなく、転写に関与する因子を多く含んでいることを明らかにした。特に我々はTIF-2とp300,PCAFが同一foci上に存在していることを見だし、TIF-2がp300,PCAFが積極的に転写複合体前駆体を形成を誘導していると考えら

れる(Fig.-3-9)。これらの結果は、TP.YaoらによってSCR-1とp300が核内でfociを形成し局在しているという観察事実(TP.Yao et. al.,1996)、またN.J.McKennaらのgel filtration法をもちいた分画化によってSRC-1 TIF-2 p300などが同一複合体に存在していることと一致している(N.J.McKenna et. al.,1998)。しかし、N.J.McKennaらは、SRC-1/p300とPCAFは同一の分画に検出できないことを指摘している。彼らは、いくつかの小単位複合体が核内で存在し、それぞれが転写の素過程における機能単位として順番に結合し、転写反応を進めていると説明している。我々の結果では、それらの因子は同一のfoci上に観察されるので、N.J.McKennaらによって同定された小単位複合体は相互作用の強弱によって小単位として検出されたもので、空間的には核内で同一領域に存在していても矛盾はないと考えられる。事実、p300とPCAFやTIF-2とp300などの相互作用は細胞内で十分検出できていることから、それほど時間的に短く、不安定であるとも考えにくい。また介在因子間の相互作用は、ある一つの因子について複数の因子が、同一の相互作用領域を介して結合するといった、従来の一対一の結合解析では捉えられない相互作用関係である。例えばp300、TIF-2両者ともに核内レセプターのリガンド結合ドメインに結合することが示されており、リガンド結合ドメインを欠くと転写活性化が誘導されなくなが、これら非常に大きい分子が何の制御もなく一つの領域に同時に結合しているとは考えにくい。おそらくは、N.J.McKennaらの指摘のように過程ごとに小単位複合体が存在し順序よく結合が入れ替わることが予想されるが、それらが核内で衝突だけで制御されるとも考えにくく、むしろ我々の観察のようにある限られた範囲に集められることで秩序だった相互作用を繰り返す転写工場を形成していることが合理的であろうと考えられる。

また、TIF-2欠失変異体の解析からCBP/p300相互作用領域が複合体形成に必要な十分な領域であることが明らかになったが(Fig.-3-14、後述)、CBP/p300はAP-1, CREB, STAT, SV40T, E1A など転写や複製と行った多くの機構に参与する因子と相互作用し、それぞれの機構を統合的に制御していることが示唆されている。我々の結果からもC-junがそのfociに局在していることから、TIF-2によって集合したp300には他の多くの因子が結合した状態で集合していると考えられる。現在、複製開始点や組換え開始点が、転写因子の結合配列やプロモーター領域と一致することから、これらの統合的制御を行う巨大機能複合体の存在が想定される。このような多機能複合体としてnuclear fociが機能出来るかは不明であるが、*少なくともこのnuclear fociは、転写反応が核内で統合的に制御されていることを示唆するものであり、核内での転写工場の存在を支持する結果である (Jackson DA et.al)。

核マトリックスにTIF-2は結合する

核マトリックス上では、転写や複製など核で起こる複合体形成を伴う多くの現象が制御されていると考えられている。核マトリックス上でPre-mRNAが検出されるだけでなく、多くの転写因子が存在すること

が示されており、核内レセプターの多くも核マトリックスに結合するという報告ある。(Barrack 1987; Getzenberg 1990; Bourquin, J. P. et al., 1997; Patturajan, M. et al., 1998) 特にステロイドレセプターは組織およびガンダ特異的に核マトリックスとの結合が報告されており (Kirsch, T. M. et al., 1986; Kaufmann, S. H. et al., 1986;)、組織特異的な、アクセプター蛋白質が核マトリックス上に存在することが示唆されている。実際にプロゲステロンレセプターにおいては、SchuchardらによってRBF-1,-2 (receptor binding factor-1,-2)が、グルコルチコイドレセプターにおいてはhnRNP Uが同定されている (Eggert, M., 1997; Schuchard, M., 1991; Lauber, A. H. et al., 1995)。しかし、これらが核マトリックス上で起きる転写反応に関与するは不明な点が多い。我々は、核内レセプターのコアクティベーターTIF-2が核マトリックスに強固に結合することを示したが (Fig.-3-11)、これが核マトリックスに直接に結合するのか、何らかのアクセプター蛋白質を介しているかは不明である。しかし、p300などTIF-2が発現していないと可溶化される蛋白質がTIF-2発現条件下では核マトリックス上へ残留しnuclear fociを形成することから (DATA not shown)、核内レセプターを含む転写複合体の中でも、より核マトリックスへの相互作用が強いことが予想される。核内レセプターの転写活性化に関与する因子では、SWI/SNF複合体構成因子Bmや活性の中心であるRNAポリメラーゼIIが、核マトリックスへ結合することが報告されている (Reyes JC, et al., 1997; Bourquin JP, et al., 1997; Patturajan M, et al., 1998)。これらの因子の他に核内で小構造体を形成し核マトリックスに結合するPMLは、TIF-2のnuclear fociには積極的に集合しなかった。LaMorteらによってPMLとCBPが同一小構造体に集合する事が報告され、TIF-2のnuclear fociへ集合するp300とではCBPの核内局在パターンが異なることが示唆された (LaMorte VJ, et al., 1998)。このような観察事実はBex Fによってもなされており、p300とCBPは非常に相同性が高いものの、核内では別々の機能を担う転写統合因子として働く可能性もある (Bex F, et al., 1998)。核マトリックス近傍に存在するのか、もしくはそれ自身がアクセプター蛋白質であるかは不明であるが、1994年にニワトリ赤血球からマトリックスを分画化しHAT活性を測定したグループが、核マトリックス分画に70%以上の活性が存在することを報告しており、HAT活性をもつTIF-2が複合体を形成しマトリックス上に残留していることは過去の報告と矛盾しない。これらの観察事実は、核内レセプターの転写工場が、TIF-2を足場蛋白質として、核マトリックスの特定領域に形成されていることを示唆している。

TIF-2の機能ドメイン

TIF-2はSRC-1(NcoA),p/CIP(RAC3 ACTR)とSRC-1またはp160とよばれるファミリーを構成しているが、このファミリーはいずれもbHLH-PASドメイン、核内レセプター結合領域、CBP/p300との結合領域、HAT

活性領域をもつ。これらSRC-1ファミリーは核内レセプターに結合し転写の亢進作用を示すが、その作用は報告によってかなりの増減が見られる。我々は、GRの恒常的転写活性化ドメインを欠失した変異体を用いることでTIF-2の転写亢進作用を明確に示した。この系を用いてもACTRやSRC-1に関しては、若干の亢進作用は認められるもののTIF-2と比較すると微々たる効果しか見られなかった(DATA not shown)。今回は培養細胞を用いたレポーターアッセイでの評価であり、発現量、細胞内内在因子の影響など多くの実験的要因による影響が大きいので、一概に細胞内での転写活性化亢進作用の強弱は評価できない。しかし、N.J.McKennaらによってもTIF-2とSRC-1が細胞内で複合体を形成していること、我々の結果からTIF-2だけで複合体形成を誘導できることなどから、TIF-2はSRC-1ファミリー同士のオリゴマー複合体を形成する能力をもち、複合体形成の足場タンパクとして機能するとも考えられる。TP.YaoらN.J.McKennaらは非常に高い相同性を示すbHLH-PASドメインが、オリゴマー複合体形成に関与しているのではないかと述べている。しかし、これらの領域は転写亢進作用、レセプターとの相互作用に必要ではないことも示している(Yao TP, et al., 1996; N.J.McKenna, 1998)おり、今回の欠失変異体の結果でもnuclear foci形成および複合体形成にはbHLH-PASドメインが直接必要ではなかった。けれども後述するCID領域だけではnuclear foci形成の効率が著しく低下することから、bHLH-PASドメイン領域が別の因子と相互作用する可能性も考えられ、DNA結合領域としても機能できる可能性があることから、核内の配置に重要な役割を果たす可能性も示唆される。

nuclear foci形成領域と核マトリックス結合領域

(A) nuclear foci形成について

TIF-2の欠失変異体を用いた実験から、CIDを含む941-1157番目のアミノ酸領域(261アミノ酸)でp300を誘導し複合体を形成できること、HATおよびAD2を含む1157-1464番目のアミノ酸(307アミノ酸)領域(NMBD)で核マトリックスに結合するのに十分であることがわかった(Fig. 3-14, 15)。さらに、CIDは核マトリックス分画への残留もできないことからCIDのドットパターンは、核内で浮遊していることを意味する。これはTIF-2全長とCIDのnuclear foci形成について比較すると、実験系が一過的発現で単純には比較できないが、TIF-2全長とCIDを別々に遺伝子導入し、一定時間で観察するとTIF-2は90%以上がnuclear fociを形成しているのに対し、CIDは約30-60%の細胞でのみドットパターンを検出することができる。このことはCIDはドットパターンを形成する効率がTIF-2に比べ劣る事を意味し、bHLH-PASドメインもしくは、NMBDの核マトリックスへの結合が、核内でnuclear fociを効率よく形成するのに重要であることを示唆している。これらの結果からCIDは自然衝突によって複合体を形成しているのに対し、TIF-2全長は核マトリッ

クス上で何らかの因子との相互作用によって効率的にnuclear foci形成が行われているのではないかと考えられる。

(B) 転写活性化について

CIDおよびNMBDは、TIF-2のGRに対する転写亢進作用を著しく阻害した。特にNMBDは、OnateらによるSRC-1のカルボキシル末端が、ドミナントネガティブとして作用する領域と一致する(Onate SA, et al.,1995)。CIDはCBP/p300と結合することが知られており、GR/標的配列とp300および基本転写因子機構の相互作用を阻害することにより転写活性に影響を与えていると考えられる。しかしGRは、SRC-1ファミリーを経由しなくともp300/CBPあるいはPCAFと直接結合しうることが、亀井ら、およびChakravartiらによって報告されており(Kamei Y, et al., 1996; Chakravarti D, et al.,1996)、我々の実験からもp300を含むCIDによって形成されたドットパターン上に、GRが局在できることを見出している(DATA not shown)。この結果は、NIDを持たないTIF-2によって形成される複合体にGRが誘導されることを示し、GRがp300/CBPあるいはPCAFへと結合することを示唆していると考えられる。これはp300/CBPに対して核内レセプターは2つの経路から直接またはSRC-1ファミリーを介して相互作用するが、CIDによってGRの転写活性化能が完全に阻害されることから、GRがp300/CBPに直接結合する経路においては、核内で転写活性を持つことが出来ないと考えられる(Fig.3-17B)。興味深いのはCIDにgalのDNA結合ドメインが接合し、gal4の結合部位を含んだレポーター遺伝子によって転写活性化を測定すると非常に高い転写活性化を検出でき、CIDの複合体が転写活性化を持つことを意味している。つまりCIDによってp300/CBPやPCAFが不活性化されたわけではなく、SRC-1ファミリーからの転写経路のみを遮断したことを示すものである(Fig.3-17参照)。p300/CBPに存在する核内レセプターとの相互作用領域のように、転写活性化に対して重要とされない領域がどのような意味を持つかは不明であるが、一つの可能性として、多くの因子が一つの作用面を共有する場合、他に結合領域がないとその複合体が頻繁に解離してしまうと考えられる。巨大複合体は、複数の相互作用面に対し少ない構造変化で、それぞれの因子と相互作用することで近傍に集合体を形成していると考えられる。このように一見無意味に見える相互作用面であっても、核内で効率良く転写複合体を形成するには重要な役割をなしているものが存在するとも考えられ、このような複数の因子を統合的に観察するシステムは転写複合体を解析するにおいては不可欠であると考えられる。

一方NMBDと相互作用する因子は同定されていないが、我々の結果では、核マトリックスとTIF-2の結合にNMBDが必要なことから、相互作用するのは核マトリックスもしくはそのアクセプタータンパクであると予想される。*in vitro*の実験系においてSRC-1が転写活性化亢進作用を持つことから(Jenster G, et al.,1997)、核マトリックスのアクセプタータンパクが転写反応に対し直接必須なのではなく、核内の特定

領域を規定することで局所的に分子の濃度を上昇させて核内での相互作用能を飛躍的に上昇させているのではないかと考えられる。

HAT活性とnuclear foci

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性は、多くの場合精製したヒストンにアイソトープラベルしたアセチルCoAを混合し、アイソトープラベルのヒストンへの取り込みによって評価される。核内レセプターに關与する転写複合体には、上記の方法によってCBP/p300,PCAF, SRC-1ファミリーにHAT活性が同定されている。このように複数のHAT活性化存在する理由は明らかではないが、これらそれぞれのHATは、単なる機能重複ではなく基質選択性または機能分担を行っているのではないかと予想される。黒川らは、CBP,PCAFの点変異および特異的抗体を用いた研究で、RARとCREBの転写系では、RARの転写活性化には、PCAFのHAT領域が必須でCBPのHAT領域を必要としないこと、一方CREBでは逆にCBPのHATが必要なのに対し、PCAFのHATを必要としないことが示され、SRC-1のHAT活性の欠失はどちらの転写機能にも影響を与えないことを報告した(Korzus E, et al.,1998)。これらの結果は、CBPとPCAFのHAT活性に機能的な分担が存在すること予想させる。しかし、この実験系ではレポータープラスミドに対しての作用であるために、クロマチン構造をとった標的遺伝子に対しSRC-1のHATが必要でないかは不明である。確かにSRC-1のHAT活性はp300/PCAFに比べ弱いことが示されているが、核内レセプターに結合するSRC-1ファミリーはレセプターのDNA結合によって、基質であるヒストンの非常に近傍まで誘導されることが予想され、これによって必要な領域を限定し、標的ヒストンをアセチル化できるのではないかと考えられる。逆に強いHAT活性を持つPCAFは転写複合体形成部位から離れた位置でのヒストンのアセチル化を行うことができるため比較的広範囲のアセチル化に寄与すると考えられる(Krumm A, et al.,1998)。現在それぞれのヒストンに対して、アセチル化状態のみを認識する抗体が報告されている。我々のnuclear fociを用いた実験系でこのアセチル化ヒストン抗体を用いれば、nuclear foci近傍でヒストンのアセチル化反応が検出できると考えられる。さらにこの系にTIF-2、p300、PCAFなどそれぞれのHAT領域点変異体を用いれば、どのHATがヒストンをアセチル化しているかを可視化できるのではないかと考えられる。また、このアセチル化反応に対しては基質が、ヒストンではなく他の因子である可能性もある。p53(Gu W, et al., 1997; Sakaguchi K, et al.,1998)やGATA-1(Boyes J, et al.,1998)はアセチル化されることでDNAへの結合が安定化する事が報告されており、核内レセプターや他の複合体構成因子がアセチルされることで複合体の形成様式に変化が生じることも考慮に入れる必要がある。TIF-2、p300、PCAFなどのHAT領域点変異体が、nuclear foci形成に何らかの影響が生じるかは興味深い。今回の結果から同定したNMBD内にもHAT活性領域が含まれていることから、核内の領域を決定することに関与している事も考えられる。

第5章 参考文献

- Akner, G., Wikstrom, A. C. et al. (1995). Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules *J Steroid Biochem Mol Biol.* 52, 1-16.
- Anderson, M. T., Tjioe, I. M. et al. (1996). Simultaneous fluorescence-activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 8508-11.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase *Nature.* 384, 641-3.
- Beato, M., Herrlich, P. et al. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot *Cell.* 83, 851-7.
- Bex, F., Yin, M. J. et al. (1998). Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300 *Mol Cell Biol.* 18, 2392-405.
- Blanco, J. C., Minucci, S. et al. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator *Genes Dev.* 12, 1638-51.
- Boddy, M. N., Duprez, E. et al. (1997). Surface residue mutations of the PML RING finger domain alter the formation of nuclear matrix-associated PML bodies *J Cell Sci.* 110, 2197-205.
- Bohen, S. P. (1995). Hsp90 mutants disrupt glucocorticoid receptor ligand binding and destabilize aporeceptor complexes *J Biol Chem.* 270, 29433-8.
- Bourguet, W., Ruff, M. et al. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α *Nature.* 375, 377-82.
- Bourquin, J. P., Stagljar, I. et al. (1997). A serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II *Nucleic Acids Res.* 25, 2055-61.
- Boyes, J., Byfield, P. et al. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation *Nature.* 396, 594-8.
- Bresnick, E. H., Dalman, F. C. et al. (1989). Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor *J Biol Chem.* 264, 4992-7.
- Brink, M., Humbel, B. M. et al. (1992). The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm *Endocrinology.* 130, 3575-81.
- Carey, K. L., Richards, S. A. et al. (1996). Evidence using a green fluorescent protein-glucocorticoid receptor chimera that the Ran/TC4 GTPase mediates an essential function independent of nuclear protein import *J Cell Biol.* 133, 985-96.

- Catelli, M. G., Binart, N. et al. (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein *Embo J.* 4, 3131-5.
- Chakravarti, D., LaMorte, V. J. et al. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling *Nature.* 383, 99-103.
- Chalfie, M., Tu, Y. et al. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression *Science.* 263, 802-5.
- Chang, K. S., Fan, Y. H. et al. (1995). The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix *Blood.* 85, 3646-53.
- Chen, H., Lin, R. J. et al. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300 *Cell.* 90, 569-80.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P. et al. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP *Nature.* 365, 855-9.
- Cramer, A., Whitehorn, E. A. et al. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling *Nat Biotechnol.* 14, 315-9.
- Dalman, F. C., Scherrer, L. C. et al. (1991). Localization of the 90-kDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition *J Biol Chem.* 266, 3482-90.
- De Bosscher, K., Schmitz, M. L. et al. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 13504-9.
- Ding, X. F., Anderson, C. M. et al. (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities *Mol Endocrinol.* 12, 302-13.
- Dittmar, K. D. and Pratt, W. B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation *J Biol Chem.* 272, 13047-54.
- Eggert, M., Michel, J. et al. (1997). The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U *J Biol Chem.* 272, 28471-8.
- Evans, R. M. (1989). Molecular characterization of the glucocorticoid receptor *Recent Prog Horm Res.* 45, 1-22; discussion 22-7.
- Fukuda, M., Asano, S. et al. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal *Nature.* 390, 308-11.
- Fukuda, M., Gotoh, Y. et al. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase *Embo J.* 16, 1901-8.
- Galigniana, M. D., Scruggs, J. L. et al. (1998). Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton [In Process Citation]

Mol Endocrinol. 12, 1903-13.

Glass, C. K., Rose, D. W. et al. (1997). Nuclear receptor coactivators Curr Opin Cell Biol. 9, 222-32.

Green, S., Walter, P. et al. (1986). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA J Steroid Biochem. 24, 77-83.

Haas, J., Park, E. C. et al. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein Curr Biol. 6, 315-24.

Haseloff, J. and Amos, B. (1995). GFP in plants [published erratum appears in Trends Genet 1995 Sep;11(9):374] Trends Genet. 11, 328-9.

Haseloff, J., Siemering, K. R. et al. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 2122-7.

Heim, R., Prasher, D. C. et al. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 12501-4.

Heim, R., Cubitt, A. B. et al. (1995). Improved green fluorescence [letter] Nature. 373, 663-4.

Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer Curr Biol. 6, 178-82.

Hollenberg, S. M., Weinberger, C. et al. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA Nature. 318, 635-41.

Hong, H., Kohli, K. et al. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 4948-52.

Htun, H., Barsony, J. et al. (1996). Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 4845-50.

Imhof, A., Yang, X. J. et al. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases Curr Biol. 7, 689-92.

Inouye, S. and Tsuji, F. I. (1994). Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein Febs Lett. 341, 277-80.

Inouye, S., Ogawa, H. et al. (1997). A bacterial cloning vector using a mutated Aequorea green fluorescent protein as an indicator Gene. 189, 159-62.

Jackson, D. A. and Cook, P. R. (1995). The structural basis of nuclear function Int Rev Cytol. 125-49.

Jenster, G., Spencer, T. E. et al. (1997). Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 7879-84.

Joab, I., Radanyi, C. et al. (1984). Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct

receptors of four steroid hormones *Nature*. 308, 850-3.

Kamei, Y., Xu, L. et al. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors *Cell*. 85, 403-14.

Kang, K. I., Devin, J. et al. (1994). In vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 340-4.

Kaufmann, S. H., Okret, S. et al. (1986). Binding of the glucocorticoid receptor to the rat liver nuclear matrix. The role of disulfide bond formation *J Biol Chem*. 261, 11962-7.

Kerppola, T. K., Luk, D. et al. (1993). Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro *Mol Cell Biol*. 13, 3782-91.

Kimata, Y., Iwaki, M. et al. (1997). A novel mutation which enhances the fluorescence of green fluorescent protein at high temperatures *Biochem Biophys Res Commun*. 232, 69-73.

Kirsch, T. M., Miller-Diener, A. et al. (1986). The nuclear matrix is the site of glucocorticoid receptor complex action in the nucleus *Biochem Biophys Res Commun*. 137, 640-8.

Korzus, E., Torchia, J. et al. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions *Science*. 279, 703-7.

Krumm, A., Madisen, L. et al. (1998). Long-distance transcriptional enhancement by the histone acetyltransferase PCAF *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 13501-6.

Kurokawa, R., Kalafus, D. et al. (1998). Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes *Science*. 279, 700-3.

LaCasse, E. C. and Lefebvre, Y. A. (1991). Nuclear and nuclear envelope binding proteins of the glucocorticoid receptor nuclear localization peptide identified by crosslinking *J Steroid Biochem Mol Biol*. 40, 279-85.

LaMorte, V. J., Dyck, J. A. et al. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 4991-6.

Laubert, A. H., Sandhu, N. P. et al. (1995). Nuclear matrix acceptor binding sites for steroid hormone receptors: a candidate nuclear matrix acceptor protein *Int Rev Cytol*. 162B, 337-76.

Leclerc, P., Jibard, N. et al. (1998). Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein (Hsp90 α) and glucocorticosteroid receptor (GR) *Exp Cell Res*. 242, 255-64.

Lee, C. H., Chinpaisal, C. et al. (1998). Cloning and characterization of mouse RIP140, a corepressor for nuclear orphan receptor TR2 *Mol Cell Biol*. 18, 6745-55.

Li, H., Gomes, P. J. et al. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 8479-84.

- Lim, C. R., Kimata, Y. et al. (1995). Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1 *J Biochem (Tokyo)*. 118, 13-7.
- Liu, W., Wang, J. et al. (1995). Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 12480-4.
- Liu, L., Scolnick, D. M. et al. (1999). p53 sites acetylated In vitro by PCAF and p300 are acetylated In vivo in response to DNA damage [In Process Citation] *Mol Cell Biol*. 19, 1202-9.
- Lundblad, J. R., Kwok, R. P. et al. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP *Nature*. 374, 85-8.
- McKenna, N. J., Nawaz, Z. et al. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 11697-702.
- Mendel, D. B., Bodwell, J. E. et al. (1986). Glucocorticoid receptors lacking hormone-binding activity are bound in nuclei of ATP-depleted cells *Nature*. 324, 478-80.
- Meng, X., Devin, J. et al. (1996). Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localization: dimer disruption does not impede 'in vivo' interaction with estrogen receptor *J Cell Sci*. 109, 1677-87.
- Morise, H., Shimomura, O. et al. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea* *Biochemistry*. 13, 2656-62.
- Moriyoshi, K., Richards, L. J. et al. (1996). Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP *Neuron*. 16, 255-60.
- Nakatani, Y. (1998). [Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex] [In Process Citation] *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 43, 2079-86.
- O'Malley, B. W., Schwartz, R. J. et al. (1976). A review of regulation of gene expression by steroid hormone receptors *J Steroid Biochem*. 7, 1151-9.
- Ogawa, H., Inouye, S. et al. (1995). Localization, trafficking, and temperature-dependence of the *Aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 11899-903.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L. et al. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases *Cell*. 87, 953-9.
- Ogryzko, V. V., Kotani, T. et al. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex *Cell*. 94, 35-44.
- Onate, S. A., Tsai, S. Y. et al. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily *Science*. 270, 1354-7.
- Ormo, M., Cubitt, A. B. et al. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein *Science*.

Patturajan, M., Wei, X. et al. (1998). A nuclear matrix protein interacts with the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II *Mol Cell Biol.* 18, 2406-15.

Perlmann, T., Umesono, K. et al. (1996). Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors *Mol Endocrinol.* 10, 958-66.

Picard, D., Salser, S. J. et al. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor *Cell.* 54, 1073-80.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K. et al. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein *Gene.* 111, 229-33.

Pratt, W. B., Jolly, D. J. et al. (1988). A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex *J Biol Chem.* 263, 267-73.

Pratt, W. B., Czar, M. J. et al. (1993). The hsp56 immunophilin component of steroid receptor heterocomplexes: could this be the elusive nuclear localization signal-binding protein? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 46, 269-79.

Pratt, W. B. and Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones *Endocr Rev.* 18, 306-60.

Renaud, J. P., Rochel, N. et al. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid *Nature.* 378, 681-9.

Reyes, J. C., Muchardt, C. et al. (1997). Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix *J Cell Biol.* 137, 263-74.

Sackey, F. N., Hache, R. J. et al. (1996). Determinants of subcellular distribution of the glucocorticoid receptor *Mol Endocrinol.* 10, 1191-205.

Sakaguchi, K., Herrera, J. E. et al. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade *Genes Dev.* 12, 2831-41.

Sanchez, E. R. (1992). Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor *J Biol Chem.* 267, 17-20.

Sanchez, E. R., Hu, J. L. et al. (1994). Potentiation of glucocorticoid receptor-mediated gene expression by heat and chemical shock *Mol Endocrinol.* 8, 408-21.

Savory, J. G. A., Hsu, B. et al. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-Mediated Nuclear Localization of the Glucocorticoid Receptor *Mol Cell Biol.* 19, 1025-1037.

Scherrer, L. C., Dalman, F. C. et al. (1990). Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex *J Biol Chem.* 265, 21397-400.

Scherrer, L. C., Picard, D. et al. (1993). Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90 *Biochemistry*. 32, 5381-6.

Schuchard, M., Subramaniam, M. et al. (1991). Nuclear matrix localization and specific matrix DNA binding by receptor binding factor 1 of the avian oviduct progesterone receptor *Biochemistry*. 30, 9516-22.

Shimomura, O. and Johnson, F. H. (1973). Exchange of oxygen between solvent H₂O and the CO₂ produced in *Cypridina* bioluminescence *Biochem Biophys Res Commun*. 51, 558-63.

Siemering, K. R., Golbik, R. et al. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein *Curr Biol*. 6, 1653-63.

Spencer, T. E., Jenster, G. et al. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase *Nature*. 389, 194-8.

Sullivan, W. P. and Toft, D. O. (1993). Mutational analysis of hsp90 binding to the progesterone receptor *J Biol Chem*. 268, 20373-9.

Takeshita, A., Cardona, G. R. et al. (1997). TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1 *J Biol Chem*. 272, 27629-34.

Tang, Y. and DeFranco, D. B. (1996). ATP-dependent release of glucocorticoid receptors from the nuclear matrix *Mol Cell Biol*. 16, 1989-2001.

Tang, Y., Getzenberg, R. H. et al. (1998). The DNA-binding and tau2 transactivation domains of the rat glucocorticoid receptor constitute a nuclear matrix-targeting signal *Mol Endocrinol*. 12, 1420-31.

Torchia, J., Rose, D. W. et al. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function *Nature*. 387, 677-84.

van Steensel, B., van Haarst, A. D. et al. (1991). Binding of corticosteroid receptors to rat hippocampus nuclear matrix *FEBS Lett*. 292, 229-31.

van Steensel, B., Jenster, G. et al. (1995). Domains of the human androgen receptor and glucocorticoid receptor involved in binding to the nuclear matrix *J Cell Biochem*. 57, 465-78.

Voegel, J. J., Heine, M. J. et al. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors *Embo J*. 15, 3667-75.

Wang, S. and Hazelrigg, T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis *Nature*. 369, 400-03.

Yang, J. and DeFranco, D. B. (1994). Differential roles of heat shock protein 70 in the in vitro nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen *Mol Cell Biol*. 14, 5088-98.

Yang, J. and DeFranco, D. B. (1996). Assessment of glucocorticoid receptor-heat shock protein 90 interactions in

vivo during nucleocytoplasmic trafficking Mol Endocrinol. 10, 3-13.

Yang, T. T., Cheng, L. et al. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein Nucleic Acids Res. 24, 4592-3.

Yang, X. J., Ogryzko, V. V. et al. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A Nature. 382, 319-24.

Yang, F., Moss, L. G. et al. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein Nat Biotechnol. 14, 1246-51.

Yang, T. T., Sinai, P. et al. (1998). Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein J Biol Chem. 273, 8212-6.

Yao, T. P., Ku, G. et al. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300 Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 10626-31.

謝辞

本研究は、京都大学梅園和彦教授の指導のもと行いました。研究を行うにあたり、梅園教授には生物学を何も知らない私に、制限酵素の使い方から研究に対する考え方まで、すべてを教え叱咤激励していただきました。辛抱強くご指導くださったこと深く感謝致します。本当にありがとうございました。

奈良先端大学院大学、安田罔雄教授、竹家達夫教授には博士後期課程に進学するに当たり研究する機会を与えていただいたことを感謝いたします。また様々な助言いただきましてありがとうございました。

関西総合通信研究所、平岡泰先生、原口徳子先生には本研究に欠かすことの出来ない顕微鏡システムを借らせていただいただけでなく、顕微鏡の観察についてご指導いただきありがとうございました。

Ruth T Yu博士、Felix Grun博士には、的確なアドバイスをいただいたり本当にありがとうございました。つたない語学力の私の言葉にいつも耳を傾けてくださってありがとうございます。

井上 敏さんには、本研究のはじまりとなるプラスミドを分与していただいただけでなく、様々な点で、違った視線からの確かつ正確なアドバイスをいただきました。ありがとうございます。

原健二先生には、本論文には記載することは出来ませんでしたが、レチノイン酸レセプターを用いたニワトリ胚の肢芽形成機構の解析では、非常に多くのことを教えていただきました。スタンスの違うものの見方で本論文作成に当たりましてもご意見頂きまして本当にありがとうございました。

橋本主税先生、井上邦夫先生には的確なアドバイスを頂きましてありがとうございました。

荻野 肇先生には、いつも身近な存在でいて下さり、試薬の作り方から研究の姿勢まで本当にいろいろ教えてくださいました。ありがとうございます。

村田卓也先生には、一年上の先輩とは思えないくらいの知識と経験からいつも相談にのっていただき、私の目標する先輩でいてくださいました。ありがとうございます。

梅園研究室秘書の和田久美子さんおよび安田研究室の明楽直美さんには研究を滞ること無く進めるにあたり大変ご助力いただきました。また梅園研究室前秘書の田中喜代子さんには仕事の面だけではなく、精神面でも暖かく見守っていただきありがとうございました。

奈良先端大学院大学安田研究室のみなさん、京都大学梅園先生研究室のみなさん、本当にありがとうございました。

最後に、博士後期過程進学を許し最後まで支えてくれた家族に感謝致します。

1999年1月29日 小川 英知