

所 属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座 (竹家達夫 教授)		
氏 名	小川 英知	提 出	平成11年 1月 7日
題 目	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		
要旨 細胞は、増殖や分化、恒常性維持のために様々なシグナルに応答し遺伝子発現を行っているが、この分子機構を理解するためには、シグナル伝達分子の細胞内局在を考慮した機能解析が必須である。そこで、蛍光蛋白質Green Fluorescent Protein (GFP)を応用して、生細胞内におけるタンパク質動態を解析することを試みた。野生型GFPは高温度感受性を示したので、a)翻訳効率、b)発色団の改良、c)細胞内安定性の3点に着目し、約20種類の変異体を比較検討して温度抵抗性のGFP変異体を得た。本研究では、受容体型転写因子である核内レセプターを経由したホルモンシグナル伝達系をモデルとして、(i)細胞質でリガンドに結合し核へ移行し、(ii)核内で標的遺伝子の転写を制御する、という2段階を経てシグナルを伝達するグルココルチコイドレセプター (GR)に着目して研究を進めた。以下にその結果を示す。 (1) GFP融合タンパク質を用いたステロイドレセプターの細胞内動態の解析系の開発 細胞質から核へのステロイドホルモンのシグナル伝達経路を明らかにするために、GR-GFPの融合タンパク質実験系を構築した。この系を用いて、GRのリガンド依存的な核移行が経時的に観察できることを示した。また、GR-GFPがリガンド識別能、転写活性化能を保持していることを確認した。 (2) グルココルチコイドレセプターの局在制御機構 GRはアミノ末端に転写活性化領域 (AD)、分子中央にDNA結合領域(DBD)、カルボキシル末端にリガンド結合領域(LBD)をコードする。GFPに融合したGR変異体の局在パターンから、DBDは核内保持に、LBDは細胞質保持に重要であることが示唆された。さらにADを欠く変異体の解析から、この転写活性化領域にも細胞質保持能が存在することを明らかにした。また、GR-GFPの核移行を誘導するシグナルとして(a)転写を活性化をするアゴニスト分子(Dexamethasone等)(b)転写を活性化しないアンタゴニスト分子(RU486)(c)細胞外ストレス(熱ショック)を見出した。これらの中で、熱ショックによる核移行は一過的であり、GRは速やかに核から排出され、細胞質に再度保持された。したがって、GRの核保持にはリガンドの結合が重要であると判断した。 GRの細胞質保持およびリガンド結合能維持には、熱ショックタンパク質(HSP90)が関与していると考えられている。また、エスロトゲンレセプター(ER)のリガンド結合能維持にも、HSP90が重要であると考えられているが、GRとHSP90は細胞質に局在が見られるのに対し、ERはリガンド非依存的に核内に局在することから、ERとHSP90の局在には空間的に矛盾が生じる。そこでHSP90のGR、ERに対する細胞質保持能を調べるために、GR-HSP90およびER-HSP90のキメラタンパク質を構築した。			

その結果、GR-HSP90はリガンド添加時にも細胞質に留まったが、ER-HSP90は核へ局在した。従ってHSP90の細胞質保持能力はGRに対して優性であり、ERに対しては劣性であると考えた。これらの結果は、リガンド非添加の状態ではGRは細胞質、ERは核という局在パターンの違いが生じていても、HSP90がそれぞれのリガンド結合能維持に機能しうることを示唆している。

(3) GRの核内転写複合体の形成機構

アゴニストリガンドによって核へ移行したGRは、転写活性化因子として機能する。そこで、コアクチベーターとして知られているTIF-2タンパク質に着目し、GRによる転写活性化の過程を解析した。はじめに免疫沈降法とレポーターアッセイによって、GRとTIF-2がリガンド依存的に相互作用し、転写活性を亢進させることを確認した。TIF-2はヒストンアセチラーゼ活性(HAT)を持つことや、他の介在因子とも結合することが知られているので、この亢進作用と細胞内動態との関与を調べるために、核内の局在パターンを検討した。その結果、TIF-2が形成している核内小構造体(nuclear foci)へGRがリガンド依存的に集合することを見出した。このnuclear fociへの局在は、GRアゴニスト依存的に形成されるが、アンタゴニストの場合には核移行のみでnuclear fociへの集合は誘導されない。またGRの欠失および点変異体の解析から、リガンド依存的な転写活性化に必要なLBD末端のAF-2領域も、nuclear fociへの局在に必要であることを明らかにした。さらにGRの標的配列も、GR依存的にnuclear foci上に局在することから、GRはDNA結合能、2量体形性能を維持した状態でnuclear fociに局在していることが判明した。これは、GRおよびTIF-2が集合するnuclear fociで活発に転写が行われることを示唆している。さらにnuclear fociに共存する因子を調べた。すると多くの転写制御の統合因子であるp300、また基本転写因子群に含まれるTAFを含む巨大複合体を形成していることが知られるPCAFとも局在パターンが一致した。一方核内レセプターの転写抑制に関与するSMRTや、白血病病因遺伝子PMLは核内で小構造体を形成するものの、nuclear fociとは核内で占有する領域が異なっていた。またDNA複製に関与するSV40Tは、同様の染色条件では核内で均一に染色され局在が異なった。この結果はTIF-2が転写活性化に必須な因子群をnuclear fociへ誘導する活性を持つこと、他の核内レセプター(RAR TR β RXR)もアゴニスト依存的にnuclear foci上に局在することから、このfociが核内レセプターの転写を統合的に制御している複合体であることが考えられる。次にnuclear fociが、核内のどこに局在しているかを調べるために分画化処理を行った。すると、TIF-2は核マトリックス分画に検出され、*in situ*の解析から核マトリックス上でfociを形成していることが明らかになった。これらのことからTIF-2は、核内で核マトリックス上の特定領域に結合し、p300等の転写統合因子を介して巨大転写複合体を形成する足場を提供していると判断した。

以上より、転写複合体が標的遺伝子上に核内レセプターを足場として形成される従来のモデルと異なり、核マトリックス上に巨大転写複合体の前駆体が形成され、そこにリガンドを受けたGRが自らの標的遺伝子を誘導することで転写反応が活性化されるというモデルを提示した。転写反応に関与するこれらの因子群は、核内で近傍に存在することで時間的にも空間的にも効率化し、DNA結合性の転写因子は、標的遺伝子を特異的にこの複合体へ運び入れることで、秩序だった制御を行っていると考えられる。

本研究では、GFPの改良を行い融合タンパク質を用いた実験系を構築し、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様に転写応答へと変化されていくかを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小川 英知

本研究では、受容体型転写因子である核内レセプターを経由したホルモンシグナル伝達系をモデルとして、(i) 細胞質でリガンドに結合し核へ移行し、(ii) 核内で標的遺伝子の転写を制御する、という2段階を経てシグナルを伝達するグルココルチコイドレセプター (GR) に着目して研究を進めている。

(1) GFP融合タンパク質を用いたステロイドレセプターの細胞内動態の解析系の開発

細胞質から核へのステロイドホルモンのシグナル伝達経路を明らかにするために、GR-GFPの融合タンパク質実験系を構築した。この系を用いて、GRのリガンド依存的な核移行が経時的に観察できることを示した。また、GR-GFPがリガンド識別能、転写活性化能を保持していることを確認した。

(2) グルココルチコイドレセプターの局在制御機構

GRはアミノ末端に転写活性化領域 (AD)、分子中央にDNA結合領域(DBD)、カルボキシル末端にリガンド結合領域(LBD)をコードする。GFPに融合したGR変異体の局在パターンから、DBDは核内保持に、LBDは細胞質保持、及びADも細胞質保持能が存在することを明らかにした。また、GR-GFPの核移行を誘導するシグナルとして (a)転写を活性化をするアゴニスト分子(Dexamethasone等) (b)転写を活性化しないアンタゴニスト分子(RU486) (c)細胞外ストレス(熱ショック)を見出した。これらの中で、熱ショックによる核移行は一過的であり、GRは速やかに核から排出され、細胞質に再度保持された。したがって、GRの核保持にはリガンドの結合が重要であると判断した。

(3) GRの核内転写複合体の形成機構

コアクチベーターTIF-2タンパク質に着目し、GRによる転写活性化の過程を解析している。免疫沈降法とレポーターアッセイによって、GRとTIF-2がリガンド依存的に相互作用し、転写活性を亢進させることを確認した。次に、TIF-2が形成している核内小構造体(nuclear foci)へGRがリガンド依存的に集合すること、リガンド依存的な転写活性化に必要なLBD末端のAF-2領域も、nuclear fociへの局在に必要であることを明らかにした。多くの転写制御の統合因子であるp300、また基本転写因子群に含まれるTAFを含む巨大複合体を形成していることが知られるPCAFとも局在パターンが一致した。一方核内レセプターの転写抑制に関与するSMRTや、白血病病因遺伝子PMLは核内で小構造体を形成するものの、nuclear fociとは核内で占有する領域が異なっていた。またDNA複製に関与するSV40Tは、同様の染色条件では核内で均一に染色され局在が異なった。

以上のように、本論文はグルココルチコイドレセプターの局在の制御機構と核内転写複合体の形成機構を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。