

Title	転写共役因子p54nrbによる男性ホルモン受容体転写制御機構の解析
Sub Title	
Author	石谷, 健
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.19-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0019

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

転写共役因子p54^{mb}による男性ホルモン受容体転写制御機構の解析

石 谷 健

内容の要旨

(目的) 性ホルモンに関する基礎研究は1987年に女性ホルモン受容体が発見されて以来、遺伝子・分子レベルの作用機構解明が焦点となった。性ホルモンは転写因子である核内受容体に属する各々特異的な受容体に結合し、性ホルモンと結合した受容体は転写共役因子群と蛋白複合体を形成して標的遺伝子の転写を調節する。したがって、今日では各種性ホルモンの転写共役因子群を同定解析することが、性ホルモンによる生理作用の理解につながると考えられている。核内受容体では転写活性化領域 (AF) がAF-1、AF-2の2領域存在する。とりわけ男性ホルモン受容体 (AR) のAF-1は他の核内受容体と比較して転写活性は高く相同性は低いことからAR特異的な機能を担うと考えられており、AR AF-1領域の転写活性化能を説明できる転写共役因子群の重要性が指摘されている。そこで、本研究では培養細胞由来の核抽出液を材料とした蛋白質精製と生化学的手法を用いて、AR AF-1転写共役因子群の探索と機能解析を試みた。

(方法) ①2種類のタグで標識したAR AF-1蛋白が恒常的に発現する形質転換株をヒト胎児腎細胞株 (HEK293) を用いて作製し核抽出液を得た。②この核抽出液を材料に2段階のタグを認識するカラム精製よりAR AF-1領域に結合する蛋白群を精製した。③精製された蛋白群を構成する各蛋白質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) によって同定し、免疫共沈降法、GST pull-down法、哺乳動物細胞two-hybrid法、ルシフェラーゼレポーター法を用いてAR AF-1転写共役因子機能を解析した。

(結果) 以下の事実を見出した。①上記精製によりp54^{mb} (nuclear RNA-binding protein)、PSF (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor)、PSP1 (paraspeckle protein 1)、PSP2をAR AF-1結合蛋白質群の構成因子として同定した。②免疫共沈降法の結果、in vivoにおいてp54^{mb}はAR AF-1領域と結合した。③GST pull-down法の結果、in vitroの無細胞系でp54^{mb}はAR AF-1領域と蛋白同士が直接結合した。④ルシフェラーゼレポーター法の結果、p54^{mb}はAR AF-1選択的な転写を活性化した。

(結論) p54^{mb}はAR AF-1における転写活性化共役因子として機能することを示した。また、p54^{mb}は複数のスプライシング因子と蛋白複合体を形成し、蛋白複合体として転写とスプライシングにおける協調的な機能を有することを示唆した。

論文審査の要旨

アンドロゲン転写因子である核内受容体に属するARと結合し標的遺伝子の転写を開始させることによって、男性化の促進、骨代謝の調節、前立腺癌の進展など様々な作用を現す。核内受容体がある2つの転写活性化領域のうちAF-1ではホルモン非依存的な転写活性化能を示し、AR AF-1では他の核内受容体と比較して転写活性は高く相同性は低い特徴を有する。近年、AF-2における機能解析から核内受容体の転写制御機構には転写共役因子と呼ばれる蛋白群が必須であることが明らかとなりつつあるが、AR AF-1領域における転写制御機構はほとんど明らかにされていない。AR AF-1においても転写共役因子群が存在し、重要な役割を果たすことが予想される。そこで本研究においてはAR AF-1領域に相互作用する転写共役因子複合体を明らかにすることを目的として、AR AF-1領域に相互作用する転写共役因子複合体の精製を試みた。さらに精製複合体構成因子の同定も行い、これら構成因子がAR AF-1の転写共役因子として機能するか検討した。その結果、HEK293細胞由来の形質転換株核抽出液を材料とした2段階のタグを認識するアフィニティーカラムを用いた精製およびMALDI-TOF/MSを用いた質量分析によりp54^{mb}を含む4種のスプライシング関連蛋白質から構成される複合体を同定した。また、p54^{mb}はAR AF-1の中央領域と直接結合し、AR AF-1の転写を活性化することを示した。

審査ではまず、HEK293細胞を精製材料に用いた理由について質問された。これに対し転写共役因子複合体はAR抗体カラムを用いた精製法では取得困難であり組織を材料に使えない点、ルシフェラーゼアッセイによってAR転写活性化能が認められかつ内在性のARを発現していない点、浮遊大量培養が可能である点から選択に至ったと回答された。次に、精製で取得されたp54^{mb}以外の他の因子におけるAR AF-1転写活性化能に関して質問された。p54^{mb}以外のPSF、PSP1、PSP2いずれも単独でAR AF-1転写活性化能を認めないが、p54^{mb}とヘテロ二量体を形成するPSFはp54^{mb}共存下でp54^{mb}単独の場合よりもさらにAR AF-1の転写を活性化する旨、説明された。最後に本研究の臨床応用における位置づけに関して質問された。これに対し乳癌細胞におけるp54^{mb}発現変化に関する最近の知見をあげて、p54^{mb}によるARの顕著な転写活性化は前立腺癌の進展においても関連する可能性があるとして説明された。今後は幅広い視点で病態を解明し、転写共役因子機能阻害ペプチドの創薬などの臨床応用を検討すべきであるとの助言がされた。

以上、本研究はいくつかの検討を要する課題を残しているものの、p54^{mb}がAR AF-1転写活性化共役因子として機能することを初めて明らかにしたことで、男性ホルモン受容体の新たな転写制御機構を示した点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 野澤 志朗
産婦人科学 吉村 泰典 病理学 岡田 保典
泌尿器科学 村井 勝
学力確認担当者：
審査委員長：吉村 泰典

試問日：平成16年2月17日