

Title	Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I and represses receptor-dependent transcription.
Sub Title	Ubc9はchicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor Iと結合し、受容体依存性の転写活性を抑制する
Author	小林, 佐紀子(Kobayashi, Sakiko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.7-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050302-0007

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.

Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I and represses receptor-dependent transcription.

(Ubc9はchicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I と結合し、受容体依存性の転写活性を抑制する)

小林 佐紀子

内容の要旨

副腎皮質において、ステロイド17 α -水酸化酵素 (CYP17) は、糖質コルチコイド産生の鍵となる酵素である。これまで私どもは、マウス副腎皮質Y-1細胞において、CYP17遺伝子の転写が、核内受容体COUP-TFIにより抑制されること、またクッシング症候群副腎腺腫において、CYP17の過剰発現とCOUP-TFIの低発現があることを見いだしてきた。本論文では、COUP-TFIによるCYP17発現調節の分子機構を明らかにするために、yeast two-hybrid systemを用いて、ヒト副腎腺腫cDNAライブラリーからCOUP-TFI結合蛋白のスクリーニングを行なった。

COUP-TFIの新規結合蛋白として、Ubiquitin-conjugating enzyme 9 (Ubc9) を同定した。Ubc9は、small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) による蛋白修飾 (SUMO化) におけるSUMO-1 conjugating enzymeとしての機能が報告されている。Ubc9とCOUP-TFIの結合は、yeastに加えて、*in vitro* glutathione-S transferase-pulldown法でも確認された。さらに、共焦点顕微鏡による検討では、COS-1細胞の核内でCOUP-TFIとUbc9が共存し、免疫共沈降法にて細胞内での複合体形成が確認された。次に、N末端およびC末端欠変異体を用いた結合部位の検討の結果、Ubc9のC末端 (アミノ酸59-158) と、COUP-TFIのC末端 (アミノ酸383-403) の結合を認めた。Northern blotによる組織分布の検討では、COUP-TFI、Ubc9共に広く分布し、特に副腎皮質、精巣、卵巣などのステロイド産生組織に高発現を認めた。

次に、COS-1細胞を用いたtransient transfection法により、Ubc9の機能解析を行った。Ubc9は、COUP-TFIと共発現させた場合、CYP17レポーター活性の転写抑制にはたらくCOUP-TFIの新規corepressorであることが示された。また、Ubc9をGal4転写因子のDNA結合部位との融合蛋白 (Gal4-Ubc9) として発現させた結果、Ubc9は内因性に転写抑制部位を有していたが、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬のtrichostatin A処置により、Gal4-Ubc9による転写抑制は変化を示さず、trichostatin A感受性HDACの直接的な関与は少ないと考えられた。さらに、Ubc9のSUMO化活性欠変異体C93Sは、野生型と同様にCOUP-TFIによる転写抑制を示した。以上の結果より、Ubc9は、SUMO化活性とは独立したCOUP-TFIのcorepressorとしての機能を持つことが明らかとなった。

論文審査の要旨

副腎皮質に存在する17 α -水酸化酵素 (CYP17) は、糖質コルチコイドの産生に関与する鍵となる酵素である。このCYP17の発現調節に核内受容体であるchicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI) が重要であり、CYP17遺伝子の転写抑制に働くことが示唆されている。この転写抑制に何らかのcorepressorが関与している可能性があることから、当研究者は、yeast two-hybrid systemを用いてヒト副腎腺腫のcDNAライブラリーからCOUP-TFI結合蛋白のスクリーニングを行い、新規結合蛋白としてubiquitin-conjugating enzyme (Ubc9) を同定した。このUbc9とCOUP-TFIの結合は、yeastに加えて、*in vitro* glutathione-S transferase-pulldown法でも確認された。共焦点顕微鏡でCOUP-TFIとUbc9がCOS-1細胞の核内に共存し、免疫沈降法で細胞内での複合体形成が確認された。COUP-TFIとUbc9の結合部位の検討では、COUP-TFIのC末端とUbc9のC末端との結合を認めた。さらにUbc9の生体内の分布に関して、副腎皮質、性腺などのステロイド産生組織に強く発現していることを認めた。Ubc9の機能解析では、Ubc9がCYP17レポーター活性の転写抑制に働くCOUP-TFIの新規corepressorであり、SUMO化活性とは独立して機能を発揮することが明らかにされた。

このような研究に関して、Ubc9がCOUP-TFIの新規corepressorであることをyeast two-hybrid systemだけでなく、*in vitro* glutathione-S transferase-pulldown法でも確認しており、さらに結合部位についても詳細な検討がなされており、Ubc9がCOUP-TFIのcorepressorとして間違いないと考えられた。共焦点顕微鏡による観察、また免疫共沈降法により、COS-1細胞の核内にCOUP-TFIとUbc9が共存すること、また細胞内で複合体が形成されることが示されたが、写真のとり方に問題があり、もう少し明瞭な写真が示されるべきであったとされた。

この研究で最も注目された点は、Ubc9の生体の分布状態と副腎皮質の各ゾーンでの発現状態である。Ubc9は広汎な組織分布を示すが、副腎皮質と性腺に特に高発見がみられた点が注目された。当研究者は、ステロイド産生と関係しているとしたが、今回は性腺での検討はなされておらず、今後の検討課題とされた。またUbc9が副腎皮質球状層に強く発現していたことから、CYP17ばかりでなく、CYP11Bとの関係も検討すべきであるとされた。

Ubc9がCOUP-TFIのcorepressorとして働き、CYP17の発現に抑制的に働くことから、臨床的には、アルドステロン産生腺腫、Cushing症候群やpreclinical Cushing症候群、さらに非活動性副腎腺腫でのUbc9が注目された。当研究者らの検討では、Cushing症候群の腺腫のみで発現の低下を認め、他の腺腫での変化は少なく、その意義の検討は今後の課題とされた。

以上のように、本研究ではCYP17の転写抑制に働くCOUP-TFIの新規corepressorとしてUbc9を同定したことから、今後のこの領域の研究発展に大きく貢献する論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
医化学 末松 誠 泌尿器科学 村井 勝
先端医科学 河上 裕
学術確認担当者：
審査委員長：末松 誠

試問日：平成17年 1月20日