

平成 21 年 12 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590198
 研究課題名 (和文) 細胞質に局在する核内受容体転写共役因子 TRAM-1 の新たな機能の解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of nuclear receptor coactivator TRAM-1 which located in cytoplasm.
 研究代表者
 右高 潤子 (MIGITAKA JUNKO)
 聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
 研究者番号：40398962

研究成果の概要：

核内受容体の転写共役因子 p160 ファミリーの一つ、TRAM-1 は、ラット組織において核内のみならず細胞質にも発現が認められる。TRAM-1 の細胞質における働きを調べるために、培養下垂体細胞を用いて TRAM-1 遺伝子の RNAi (遺伝子ノックダウン) を行った。その結果、幾つかのタンパクに TRAM-1 遺伝子ノックダウンで発現量の変化を認めた。これらのタンパクの同定は現在進行中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：内分泌学・転写共役因子

1. 研究開始当初の背景

核内受容体は、ステロイドホルモンをはじめ甲状腺ホルモン、ビタミンA, Dなどのリガンド依存性の転写調節因子であるといわれている。その調節機構は①リガンドが結合した受容体は核内の標的DNA上の応答配列 (HRE) と呼ばれる部位に大抵2量体となって結合する。②すべての遺伝子の転写に必須である「基本転写因子」と呼ばれるタンパクが、標的DNAのプロモータ部位に結合する。③基本転写因子と核内受容体の間に、橋渡しをす

る「転写共役因子」と呼ばれるタンパクが結合し転写の準備が整う。転写共役因子のうち、標的遺伝子の転写を促進する働きのある因子をコアクチベータと呼び、p160はその1種である。

p160は40-50%の相同性のある3つのファミリーから成る。それぞれはSRC-1/Ncoa1 (以下SRC-1)、TIF2/GRIP1/SRC-2/Ncoa2 (以下TIF2)、TRAM-1/AIB1/p/CIP/ACTR/RAC3/SRC-3/Ncoa3 (以下TRAM-1) と呼ばれている。p160のHATと呼ばれる特徴的な部位が、DNA

のヒストンをアセチル化してクロマチン構造をほぐす事で転写促進に働くことが知られている。

研究代表者は、ステロイドホルモンによる制御を受ける臓器の一つとして、雄ラット生殖器（精巣・精巣上体など）を用いて、p160ファミリー各々がどの細胞に特異的に発現しているのか、免疫染色法を用いて調べた。すると、p160ファミリーは転写共役因子として核に発現するという予想に対し、TRAM-1は細胞質に塊状に発現している細胞があることがわかった。(J. Igarashi-Migitaka, et al., Eur J Endocrinol. 2005 153(4):595-604.) その後さらに生殖器以外の組織でも免疫染色による検討を重ねた結果、いくつかの組織においても、TRAM-1が細胞質に塊状に発現していることが確認された。そして一部の臓器では、TRAM-1が核に発現する部位と細胞質に発現する部位の両方を持つ組織があることも判った。

2. 研究の目的

転写共役因子として核内で機能すると考えられていた TRAM-1 が、細胞質にも発現している事から、TRAM-1 が細胞質でどのような働きをしているのか調べることを目的とする。この研究により、細胞内の恒常性維持や、細胞分化・増殖・成長にかかわっている複雑な核内受容体情報伝達メカニズムを、より正確に解き明かす一助となると考えている。

3. 研究の方法

タンパクの相互作用の研究には、抗体を用いた免疫沈降法がよく用いられる。しかし免疫沈降に適した抗ラット p160 抗体が市販されていないため、実験は、RNAi による分子生物学的方法を中心に行う。

研究対象：

再現性および核内受容体の関連面から、ラットの内分泌系培養細胞が適していると考えられる。研究代表者は以前よりラットやヒトの下垂体を用いた内分泌学的研究に携わり、ホルモン受容体について研究を行ってきた。そこで、核内受容体との関連も考察可能なラット下垂体培養細胞株 MtT/S 細胞（埼玉大学理学部・井上金治氏により開発された、プロラクチン・成長ホルモンを合成・分泌する細胞株。）を研究対象候補とした。また TRAM-1 の普通の働きを調べるために、同様の下垂細胞株 MtT/SM も研究対象として使用する。これらの細胞で p160 が 3 種類とも発現し、TRAM-1 が細胞質に塊状に局在している事は、免疫染色により確認した。

研究方法：

ラット下垂体細胞株 MtT/S および MtT/SM 細胞は埼玉大学・井上金治氏より譲り受けた。これらの細胞の TRAM-1 遺伝子を RNAi によってノックダウンし、その影響を受けて変化したと考えられるタンパク・細胞内小器官を検索し、そこから TRAM-1 の機能を推察する。

また予備実験として、ゴルジ体シス側タンパクに対する抗体と TRAM-1 抗体を用いた免疫 2 重染色を行ったところ、下垂体細胞の TRAM-1 の局在部位は、ゴルジ体と一致している可能性があることが判った。そこで TRAM-1 とゴルジ体との関わりについても考察を行いたい。

(1) 合成 siRNA による方法

まず最も一般的な方法である合成 siRNA を用いた方法を検討した。ノックダウンのターゲットであるラット TRAM-1 mRNA の塩基配列 (NCoA3, GenBank XM_215947) から siRNA として適した塩基配列をソフトウェア (Block it RNA designer, Invitrogen) を用いて 4 種類の Stelth RNA (Invitrogen) を合成した。これらを導入試薬 Lipofectamin RNAi max を用いて MtT 細胞へのトランスフェクトを試みた。いくつかの条件検討を行ったが、本方法では導入は困難であると判断し、ベクターを用いた方法に切り替えることにした。

(2) レンチウイルスを用いた方法

ベクター系の方法には多数あり、その中から、多くの哺乳類細胞に有効であり、長期のノックダウン効果が得られるといわれているレンチウイルスを用いた系を検討した。また、解析に使用する下垂体培養細胞株は、MtT/SM の 1 種類に絞り実験を行った。

① レンチウイルスベクターへの miRNA 発現カセットの組み込み

キット Block-it HiPerform Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP (Invitrogen) を用いて作製した。このキットを用いることで、安全なレンチウイルスを作製することが可能である。目的細胞へウイルスが感染すると細胞に miRNA 発現ベクターが組み込まれ、miRNA が発現し RNAi (目的遺伝子のノックダウン) が起こる。

まずラット TRAM-1 mRNA の塩基配列からこの方法に適切な miRNA 塩基配列をソフトウェア (Block it RNA designer, Invitrogen) を用いて検索し、A、B、C、D の 4 種類の配列を得た。それぞれの配列について 1 本鎖 DNA を合成し、相補的な配列同士でアニーリングを行い、2 本鎖 DNA オリゴ A、B、C、D を作製した。2 本鎖 DNA オリゴは pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRvector に連結

処理を行い、大腸菌に導入してこのベクターを増幅し、精製して **Expression clone** とした。プロモータはCMVプロモータを選択し、キットの説明に従い各種の処理を経てA、B、C、Dの最終産物 expression plasmid DNA を作成した。また、コントロール用DNAとしてキットに付属の、どの遺伝子とも交差しない配列のDNAを用い、同様の処理を行った。なお expression plasmid DNA の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法によりシーケンサー (ABI 3100 AVANT) で確認した。

② レンチウィルスの作製

control および A~D までの合計5種類の expression plasmid DNA と ViraPower packaging mix を細胞導入試薬 Lipofectamine 2000 を用いて 293FT 細胞にトランスフェクションした。48 時間培養後、293FT 細胞から放出されたウイルス粒子を含む細胞培養液を回収した。培養液は、細胞の破片などを除くためにフィルターを通した。さらに遺伝子導入効率を高めるために、培養液を超速心機にて2時間遠心し、ウイルス粒子を沈殿させて濃縮処理を行った。沈殿は100ulのPBSで懸濁して4℃で一晩放置した。これを培養液 DMEM/F12 にて10倍に希釈したものを、細胞感染用ウイルス液とした。

ウイルスの作成中は汚染・感染の起こらないよう適切な感染防止策を行った。なお作製したウイルスは、目的の細胞に感染した後消滅し、増殖・感染する危険性は無い様に設計されている。

③ ウイルスの感染と細胞の処置

6 穴細胞培養用プレートまたはスライドチャンバーに 2×10^5 個/ml で MtT/SM を培養し、翌日 control、A~D のウイルスを感染させる。一晩培養後培地を変え、4 日後、ウイルスが感染してベクターが導入された細胞を抗生物質 Blastcidin によって選択開始する。3-4 日おきに培地を交換し、14 日後、ウイルスの感染した細胞のみが選択的に残ったところでそれぞれの処理を行った。

④ ウイルスの力価計算

細胞は6穴培養プレートに播いた。選択14日後、10%アルコールを含むクリスタルバイオレット染色液で生細胞を染色し、細胞数からウイルスの力価を算出した。

⑤ リアルタイムPCR

RNA抽出試薬を用いて細胞からmRNAを回収し、逆転写処理してcDNAを作製し、PCR用サンプルとした。ラット SRC-1、TIF2、TRAM1/AIB1 に対する特異的プライマーを合成し、ABI Prism 7000 を用いて SYBR Green による定量的リアルタイムPCRを行った。

⑥ SDS-PAGE およびウェスタンブロット

細胞をタンパク抽出用溶液に懸濁し、超音波による細胞の破壊の後、遠心後上清をサンプルとした。サンプル中のタンパク濃度は Bradford 法で測定した。

SDS-PAGE には7-20%のポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いた。またウェスタンブロット用のSDS-PAGEは7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

ウェスタンブロットは、セミドライ法により PVDF 膜にタンパクを転写し、スキムミルクで非特異的結合を防いだ後 TRAM-1 に対する抗体を用いて行った。発色は NBT/BCIP を用いて行った。ポジティブコントロールは β -Tubulin に対する抗体を用いて行い、D A B で発色した。

⑦ 蛍光免疫染色による観察

MtT/SM細胞に目的のRNAが導入されたことは、蛍光顕微鏡下でGFPが緑色に発色していることで確認できる。

細胞はスライドチャンバー培養した。抗生物質による選択後、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定処理を行った。固定後、PBSで洗浄して免疫染色のサンプルとし、染色後、蛍光顕微鏡 (Axioskop, Zeiss) および共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META (Zeiss) を用いて観察を行った。

p160 の染色: 0.1% Triton-X100 で処理後 1% BSA で非特異的結合を防止、1次抗体として Anti-TRAM-1 を一晩反応させた。次に2次抗体としてビオチン化 Anti-mouse IgG、続いて蛍光色素 Alexa594 ラベルされたストレプトアビジンを反応させた。

ゴルジ体の染色: 一次抗体としてゴルジ体シス側タンパク特異的抗体 GM130 を用いた。p160 との2重染色を行うために、この抗体に蛍光色素 Alexa488 をキット (Molecular probes) を用いてラベルし、この抗体を p160 の染色に続いて反応させた。

⑧ 二次元電気泳動

14日間培養したMtT/SM細胞に抽出液RIPAを加えてタンパク抽出を行った。1000mgのタンパク量分の溶液に10倍量のアセトンを加えてアセトン沈殿を行い、これに電気泳動用試薬を加え泳動サンプルとした。1次元目の等電点電気泳動のpHは4-7で行った(泳動は業者に依頼。)

4. 研究成果

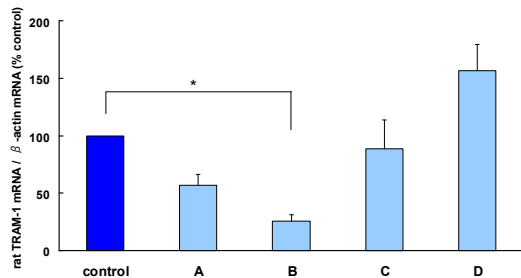
MtT/SM細胞にウイルスが感染し、ベクターが導入された事は、抗生物質Blastcidinを培地に添加しても生きている細胞があること、及びGFPの発色により確認された。しかし、予想以上にGFP発色強度が弱く、ま

たウイルス力価は平均 4.3×10^3 TU/ml であり、目標の 1/100 であった。この事から全体的に miRNA 発現が弱い、すなわち RNAi (目的遺伝子のノックダウン) の効果が低めであることが予想されたが、この原因は不明であった。しかしながら、TRAM-1 遺伝子のノックダウンにより、幾つかのタンパクの発現量に変化が観察された。

(1) リアルタイム PCR

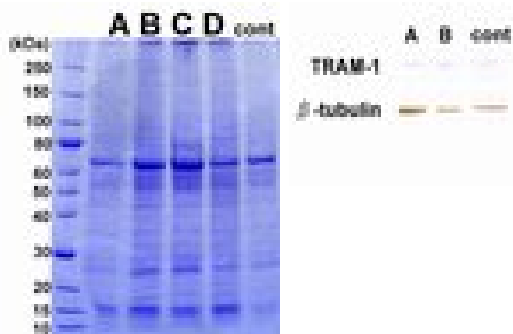
RNAi による MtT/SM 細胞中 TRAM-1 mRNA 量の変化について検討した。

TRAM-1 mRNA の発現量は、4 種類の目的配列うち 2 種 (A, B) は、コントロールに比べて 40-20% の発現率まで低下し、TRAM-1 遺伝子ノックダウンが成功したことが確認できた。また、他の p160 ファミリーである SRC-1、TIF2 mRNA には変化がなかった。



(2) SDS-PAGE およびウェスタンブロット

SDS-PAGE では、ノックダウンにより発現量に変化したタンパクの有無は不明であった。また遺伝子ノックダウン効果の見られた A・B について行ったウェスタンブロットでは、MtT/SM 中 TRAM-1 タンパクの大幅な減少は観察できなかった。



(3) 免疫染色

A の TRAM-1 蛍光免疫染色の結果を以下に示す。

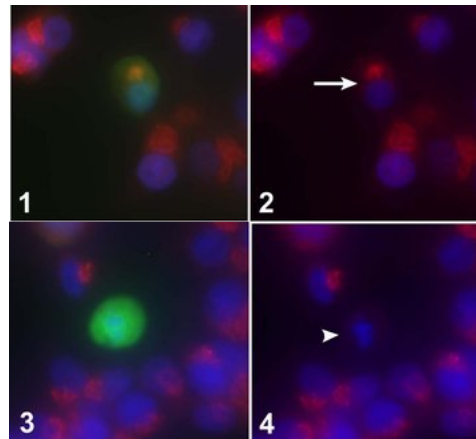
GFP 強陽性 MtT/SM 細胞の一部で TRAM-1 陰性が確認された。赤：TRAM1 青：細胞核 緑：GFP

1・3：GFP、TRAM-1、核の 3 色重ね合わせ像

2・4：TRAM-1 と核のみ表示

矢印：TRAM-1 の発現が弱い細胞 矢じり：

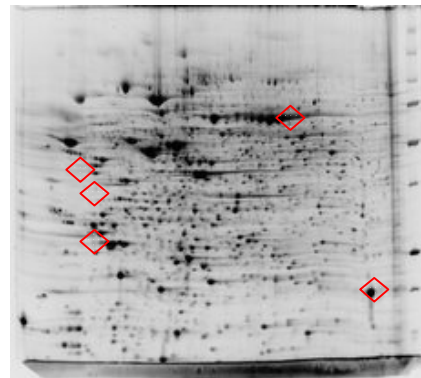
TRAM-1 がほぼ消失した細胞



MtT/SM 細胞における細胞質 TRAM-1 の免疫染色陽性部位はゴルジ体と一致する。従って TRAM-1 のノックダウンは、ゴルジ体の形態や機能に何等かの影響を与える可能性があると考えたが、免疫染色による結果からは、ゴルジ体の形態変化は観察できなかった (写真なし)。

(4) 二次元電気泳動

A の二次元電気泳動結果を以下に示す。



control およびサンプル A のタンパクのスポットはそれぞれ約 2000 個得られた。control とサンプル A の泳動結果を重ね、TRAM-1 ノックダウンにより蓄積量 (発現量) が変化したスポットをソフトウェアにより解析したところ、少なくとも 8 スポットに増減の変化が確認できた (◇：うち、5 個を示す)。

本研究期間中には、TRAM-1 とゴルジ体の関わりについては免疫染色を行うのみに留まったが、現在、詳細を調べるために電子顕微鏡による観察も進行中である。また TRAM-1 ノックダウンにより発現量に変化したタンパクについて、質量分析による同定までは至らなかったが、今後は TRAM-1 mRNA 量が減少したサンプル A および B についてさらに二次元電気泳動と質量分析を行い、タンパクの同定と TRAM-1 の機能の考察を進めたいと考え

ている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①清水祐一郎、竹下彰、田口学、大山健一、竹内靖博、山田正三、五十嵐 (右高) 潤子、佐野壽昭 非機能性下垂体腺腫像を呈した silent thyrotroph adenoma の特徴とソマトスタチン受容体サブタイプ2・5 発現の検討、ホルモンと臨床、56 巻冬季増刊 p. 57-65(2008)、査読無し

[学会発表] (計 1 件)

①竹下彰、五十嵐 (右高) 潤子、鯉淵典之、竹内靖博 ミトタンはステロイドゼノバイオティク受容体 SXR を介して CYP3A4 を誘導する 第 82 回日本内分泌学会、2009 年 4 月 23 日、前橋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右高 潤子 (MIGITAKA JUNKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：40398962

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし