

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770181

研究課題名(和文)脂溶性リガンド作用における核内受容体の標的的特異的分解機構の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a ligand-dependent protein degradation system

研究代表者

岡田 麻衣子 (Okada, Maiko)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00572330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新たなリガンド作用機序の一端として、『リガンド依存的な標的基質特異的なタンパク分解機能』の解明を試みた。具体的には、エストロゲンをモデルとし、新たな分解基質の同定及び機能解析を行った。その結果、エストロゲン依存的なタンパク分解基質として細胞分裂期(M期)制御因子を同定し、エストロゲンがタンパク分解促進を介して、M期制御に関与することが示唆された。

本研究は新たなエストロゲンシグナルの作用機序を提示するものであり、エストロゲンが従来の標的遺伝子発現系に加え、タンパク分解系という二つの経路で生体内の標的タンパク質発現制御を担うことが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to reveal the novel mechanism of fat-soluble ligands regulating the proper protein expression, "Ligand-dependent protein degradation system" was investigated. Estrogen focused on as a ligand, the identification and functional analysis of the degradation substrates in an estrogen signaling was performed. As a result, the mitotic key regulator was degraded through Ubiquitin-proteasome system in an estrogen-dependent manner. moreover, it was shown that estrogen accelerated transition from mitosis to G1 phase. These results suggest that estrogen is related in the mitotic regulations through promoting the degradation of mitotic reulator at M phase.

This study shows that estrogen regulates target proteins level through two pathway, the protein degradation related in M/G1 phase and well known gene expression pathway in G1/S phase, providing a new insight into the mechanism of the estrogen signaling.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク分解

1. 研究開始当初の背景

生体内の恒常性維持や組織形成において細胞環境に応答したゲノム情報の発現が不可欠である。正確なゲノム情報の発現には、細胞内で実質的な機能を担うタンパク群の選択的かつ量的・質的な発現制御が必須である。近年、シグナル依存的な質的制御機構の一端が、タンパク翻訳後修飾の網羅的解析により明らかになりつつある。一方で、シグナル依存的、特にリガンド依存的なタンパク質の量の制御機構については不明な点が多い。

性ホルモンをはじめとする脂溶性低分子物質の多くは、選択的なゲノム情報の発現に必須である。これらは主に核内受容体群のリガンドとして受容され、適宜細胞内シグナルに変換される。従来核内受容体群はリガンド依存的な転写因子として解析されており、遺伝子発現制御の観点から脂溶性低分子リガンドの作用機序の解明がなされてきた。しかしながら、これらの作用機序だけでは説明ができないリガンドの生理作用・病理作用が存在することから、未解明のリガンドシグナル経路が存在することが示唆されている。

近年、植物において、リガンド依存的な受容体型タンパク分解機構が示されており、脊椎動物においても同様の機構が存在する可能性が示唆されている。さらに、申請者のこれまでの研究過程より、核内受容体に属するエストロゲン受容体 ER がタンパク分解カスケードの一端を担う特定の E3 リガーゼと一過的に複合体を形成し、その酵素活性制御を調整することが見出されている。

2. 研究の目的

本研究ではエストロゲン/エストロゲン受容体をモデルとした、『脂溶性生理活性物質依存的なタンパク分解機構の解析』を目的とした。具体的には、以下の二点である。

(1) エストロゲン応答細胞株を用いた分解基質の同定

エストロゲンの主要な標的組織として、乳腺及び子宮内膜が知られている。これらの組織において、エストロゲンは顕著な増殖促進作用を示すことが知られている。また、これらの作用は、ER 陽性乳がん組織においても同様である。そこで、ER 陽性乳がん細胞株である MCF7 を用いて、ER/E3 複合体の基質同定を試みた。

(2) エストロゲン作用における ER タンパク分解機能位置づけ

エストロゲンによる細胞増殖促進作用に焦点をあてる。また、ヒト乳がん組織を用いて分解基質及び E3 リガーゼのタンパク発現様式を検討した。

以上二点を主軸として、内因性脂溶性生理活性物質によるタンパク分解制御機構の提示を目的とした。また、本研究をモデルとすることで、今後、他の脂溶性リガンド・核内受容体群の生理作用機構解明への応用を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、エストロゲン応答性を有する ER 陽性乳がん細胞株 MCF7 を用いて、affinity 精製及びエストロゲン作用の両側面から、ER/E3 リガーゼ複合体による分解基質の探索を行った。候補因子群について、*in vivo*, *in vitro* ubiquitination assay 及びタンパク発現定量を行い、エストロゲン応答性の分解基質であるか否かを評価した。また、分解基質の細胞内機能と従来のエストロゲン作用との関連性を検討することで、新たなエストロゲン作用機序の解明を試みた。具体的には下記の方法を行った。

(1) エストロゲン依存性分解基質群の探索

アフィニティー精製により ER/E3 複合体の内因性相互作用因子群の取得を行った。取得因子を、TOF-MS または LC-MS/M に供し相互作用因子群の網羅的同定を行った。これらの分解基質候補群について、エストロゲン依存的なタンパク量の変動を検討した。変動の確認された因子については、*in vivo/vitro* ユビキチン化アッセイについて検討した。

また、エストロゲンによる細胞増殖制御機構の観点から、細胞周期制御因子を中心にエストロゲン依存的なタンパク量の変動を検討した。その際に、プロテアソーム阻害剤を用い、その変動がユビキチン-プロテアソーム経路を介したタンパク分解によるかを検討した。

(2) エストロゲン作用におけるタンパク分解機能の位置づけ

(1) で同定した分解基質の機能と、エストロゲン作用との接点を検討した。特に、エストロゲンによる標的組織細胞の増殖促進における標的タンパク分解の関連性を検討した。

また、エストロゲン依存性タンパク分解機構が、エストロゲン依存性疾患の一つである乳癌と関連する可能性を検討した。乳癌治療において、エストロゲン受容体のアンタゴニストが使用されるが、その過程における分解基質の発現変動の検討を試みた。

4. 研究成果

(1) エストロゲン依存性分解基質群の探索

アフィニティー精製を用いた ER/E3 酵素の本研究により、脱リン酸化酵素複合体、E3 リ

ガーゼ、クロマチン制御因子群、細胞骨格タンパク群などが同定された。これらの因子はいずれも、ER 及びパートナーである E3 酵素の作用因子としては初めて同定された因子である。しかしながら、これらの因子群に関してエストロゲン依存的なタンパク量の変動は観察されなかった。以上のことから、これらの因子群は ER または E3 酵素の機能制御因子であることが示唆された。さらに、プロテアソーム阻害剤を用いてアフィニティー精製段階における基質消化を阻害して同定を試みた。その結果、エストロゲンかつ阻害剤依存的に E3 酵素との相互作用が増強するタンパク群の存在が確認されたが、タンパク同定には至らなかった。

そこで、エストロゲン作用の観点から、分解基質の同定を試みた。既に、分解基質の候補として細胞分裂期(M 期)制御タンパクを見出している。そこで、細胞分裂期制御タンパクを中心に、M 期関連因子群のエストロゲン依存的なタンパク変動を検討した。その結果、確かに細胞分裂期制御タンパクがエストロゲン依存的かつユビキチン-プロテアソーム依存的に分解されることが示された。また、このエストロゲン依存性の分解は、ER のアンタゴニストや E3 酵素のノックダウンにより減弱した。また、検討段階ではあるものの、エストロゲンにより、M 期から G1 期への移行を司るタンパク群の量的変動が観察され、新たなエストロゲン依存性分解基質の候補を見出した。

続いて、上記因子群が ER/E3 酵素による直接的な分解基質であるかを検討した。その結果、*in vitro* において細胞分裂期制御タンパクは E3 酵素と直接結合することが確認された。E3 酵素のモチーフ解析を行ったところ、N 末端領域に多数の結合モチーフがあることが確認され、これらの領域が基質認識に必要である可能性が示唆された。また、これまでに種々の因子群の混在が予測される ER/E3 酵素の免疫沈降産物を用いて、細胞分裂期制御タンパクに対するユビキチン付加反応を検討してきた。そこで、これらの反応系で確認されたユビキチン付加反応が、確かに ER/E3 酵素に依存するかを確認するために、*in vitro* ubiquitination assay 系の再構築を行った。バキュロウイルス発現系を用いて、ER 及び E3 タンパクを取得した。

これらのタンパク群及び細胞分裂期制御タンパクを用いた結果、エストロゲン依存的な細胞分裂期制御タンパクのユビキチン化が確認された。

以上より、評価系の向上をはかり、細胞分裂期制御タンパクが確かに ER/E3 による分解基質であることを証明した。

また、他の分解基質候補群に関しては、プロテアソーム依存的な分解抑制が確認され次第、同様の系に供するようにリコンビナントタンパクの調整を進めている。

(2) エストロゲン作用におけるタンパク分解機能の位置づけ

(1) において同定した細胞分裂期制御タンパクの分解は後続の細胞周期(G1 期)への進行に重要であることが知られている。一方で、エストロゲンは ER 陽性の標的組織において G1 期から S 期への細胞周期の進行を促進することで説明されているが、他の細胞周期への影響は不明であった。

以上の分解基質とエストロゲン作用の知見を踏まえ、M 期制御におけるエストロゲンの影響を検討した。具体的には、Thymidine block から release した MCF7 細胞を用いて、エストロゲン添加群と非添加群との細胞周期の進行過程を FACS により測定した。その結果、エストロゲン添加により M 期から G1 期への移行が促進されることが見出された。同実験系において細胞分裂期制御タンパクのタンパク量をモニターしたところ、エストロゲン添加群において M/G1 移行期におけるタンパク減少の促進が観察された。

また、免疫染色法により、M 期前中期のマーカーであるリン酸化型細胞分裂期制御タンパクを検出したところ、エストロゲン枯渇により M 期前中期の割合が増加すること、及びこれらの細胞におけるタンパク量が増加することが示唆された。

以上の結果から、エストロゲン受容体陽性細胞においては、エストロゲンは従来の遺伝子発現制御に加え、細胞分裂期制御タンパクのタンパク分解を介した M 期制御を担う可能性が示唆された。

本研究により、エストロゲンによるゲノム情報の発現機構が、従来の遺伝子発現制御だけでなくタンパク分解機能という二つの側面から構成されていることが示唆された。

培養細胞レベルで観察された結果が、エストロゲンの病理作用に反映さるかを検討するために、ヒト乳癌組織切片を用いたリン酸化型細胞分裂期制御タンパクの検出をすすめている。培養細胞においてはエストロゲン依存的な細胞分裂期制御タンパク分解は乳癌治療で用いられる ER アンタゴニストにより抑制されることが確認されている。従って、アンタゴニスト投与群の組織切片では M 期全中期の細胞が蓄積すると考えられ、今後投薬の効果の指標となる可能性を見出している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

学会名：The 35th Naito conference on

“ The Ubiquitin-Proteasome System From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles ”

発表者：岡田麻衣子

発表標題：A mitotic estrogen receptor complex acts as an E3 ubiquitin ligase

発表年月日：2013年7月9日～12日

発表場所：シャトレゼガトーキングダムサッポロ

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

聖マリアンナ医科大学大学院 医学研究科
応用分子腫瘍学

[http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/
/index.html](http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 麻衣子 (Okada, Maiko)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・助教

研究者番号：00572330

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：