

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460319

研究課題名(和文) 多重プロモーターと選択的スプライシングによるエストロゲン受容体発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of estrogen receptor gene expression by alternative promoter usage and alternative splicing

研究代表者

石井 寛高 (Ishii, Hirotaka)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20445810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体の発現制御機構を解明するため、エストロゲン受容体遺伝子の多重プロモーター構造とその転写産物の選択的スプライシングパターンを解析した。その結果、エストロゲン受容体遺伝子から多数のN末端・C末端欠損型スプライシング変異体が生じることが明らかとなり、さらに一部の變異体は恒常的転写活性化能を示すものが存在した。ホルモン受容体のリガンド非依存的な活性化はホルモン感受性腫瘍の悪性化とホルモン不感受性の獲得に寄与することが知られている。そのため、これら恒常的活性化能を持つスプライス変異体がエストロゲン感受性腫瘍の悪性化とエストロゲン不感受性に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To determine regulatory mechanisms of estrogen receptor gene expression, alternative promoter usage and alternative splicing profiles of the estrogen receptor genes were examined. We identified modular structures of the estrogen receptor genes and several splice variants encoding N- and C-terminally-truncated estrogen receptor proteins. Some C-terminally-truncated estrogen receptor variants exhibited constitutive transcriptional transactivation in transfected cells. Ligand-independent transcriptional transactivation by steroid hormone receptors is deduced to be one of the candidate causes of malignant development of hormone-sensitive tumors. Therefore, our results may provide key mechanistic information explaining the cause of hormone-independent cell overgrowth in estrogen-sensitive tumors.

研究分野：生殖生理学

キーワード：エストロゲン エストロゲン受容体 多重プロモーター 選択的スプライシング スプライス変異体  
恒常的転写活性化 生殖生理学 神経内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンであるエストロゲンは、女性生殖器官の維持・発育のみならず、男性生殖器官や非生殖器官にも影響し、多様な生理学的作用を引き起こすことから現在では「多機能性ホルモン」と認識されている。エストロゲンの受容体であるエストロゲン受容体は、核内ステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写調節因子であり、標的遺伝子の発現をリガンド依存的に調節することでエストロゲンの作用を媒介する。哺乳動物におけるエストロゲン受容体には、Ⅰ型エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER<sub>1</sub>) 及びⅡ型エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER<sub>2</sub>) の異なる遺伝子上にコードされた2種類の核内受容体が存在している。

エストロゲン受容体遺伝子は主に8つのコーディングエクソンから構成されている。これら遺伝子は複数のプロモーターによって制御される多重プロモーターシステムを内包している。さらに、エストロゲン受容体遺伝子の転写産物は複雑な選択的スプライシングを経ることで多様な構造と機能を持つスプライス変異体が生成されることが知られている。

エストロゲンの作用強度はエストロゲンの標的器官が持つエストロゲン受容体の発現量に相関するため、エストロゲンの発現調節機構の解明は、エストロゲン作用を解明する上で非常に重要である。しかし、エストロゲン受容体遺伝子が、複雑な多重プロモーターシステムを持つこと、さらに転写産物が複雑な選択的スプライシングパターンを示すことからエストロゲン受容体の発現調節機構の解明はなかなか進んではいなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題はエストロゲン受容体遺伝子の発現調節機構の解明を目的とし、そのために多重プロモーターシステムを含むエストロゲン受容体遺伝子の構造を同定、さらに、転写産物の選択的スプライシングパターンを解析するとともに、それらスプライシング変異体の機能と発現調節機構への関与を調査した。

## 3. 研究の方法

サブタイプ間及び種間での比較を可能とするため、ヒト、マウス、ラットの ER<sub>1</sub> 及び ER<sub>2</sub> 遺伝子を解析の対象とした。

それら遺伝子の5'、3'側の遺伝子構造を同定するためヒト、マウス、ラットの total RNA から Rapid amplification of cDNA end (RACE) 用 cDNA を作成した。さらに、コード領域の確認や選択的スプライシングパターンや変異体の発現パターンを解析するため、RT-PCR 用の cDNA を作成した。

RACE、RT-PCR 用 cDNA から増幅した産物はクローニングベクターに組み込み、遺伝子配列

を確認するとともに、ゲノム上にマッピングすることで ER<sub>1</sub> 及び ER<sub>2</sub> 遺伝子の新規構造を同定した。

新規に同定したスプライス変異体は動物細胞発現ベクター内に組み込み、不死化細胞株に導入することで機能解析を行った。5'-非翻訳領域変異体に関しては、ルシフェラーゼ発現ベクター内に組み込み、ルシフェラーゼ活性を指標に5'-非翻訳領域が転写後調節に与える影響を調査した。N末端・C末端欠損型変異体に関してはコード領域を動物細胞発現ベクター内に組み込み、それらの転写活性化能に関してエストロゲン応答配列を含むレポーター遺伝子と共に動物細胞に導入することでレポーター遺伝子の活性化を指標に解析を行った。

## 4. 研究成果

5'-RACE 法によるエストロゲン受容体遺伝子の5'-非翻訳領域の解析の結果、エストロゲン受容体遺伝子が従来考えられていた以上に複雑な多重プロモーターシステムを持つことが判明した。さらに、種特異的プロモーターが存在し、それらは特に特定の臓器に高い発現を示すことが見出された。また、遺伝子の5'-領域にはプロモーター特異的5'-非翻訳リーダーエクソンのみならず多数の5'-非翻訳中間エクソンが存在しており、5'-非翻訳中間エクソンが選択的に挿入されることで多数の5'-非翻訳領域変異体が産生されていた。これら選択的挿入はプロモーター特異的に引き起こされることから、選択的プロモーター使用と選択的スプライシング間の関連性が見出された。

多様なエストロゲン受容体遺伝子の5'-非翻訳領域が転写後調節に与える影響をルシフェラーゼ発現ベクターを用いて解析したところ、5'-非翻訳領域は翻訳効率に影響を与えていることそして5'-非翻訳領域への中間エクソンの挿入は翻訳効率の低下に関与することが判明した。

さらに、ER<sub>1</sub> 遺伝子ではプロモーター特異的にコーディングエクソンがスプライシングされ、N末端欠損型変異体をコードした mRNA が産生されることがわかった。これら、N末端欠損型 ER<sub>1</sub> 変異体の産生パターンはヒト、マウス、ラットで保存されており、さらに変異体の機能をエストロゲン応答配列を含有するレポーターベクターを用いて解析したところ、単独ではリガンド依存的に転写活性化を示す一方で全長型 ER<sub>1</sub> の転写活性化を著しく抑制することを見出した。また、N末端欠損型 ER<sub>1</sub> 変異体の転写活性化能は細胞のコンテキストに依存しており、細胞のコンテキストによっては全長型とは著しく異なる転写活性化を示した。

3'-RACE 法により、エストロゲン受容体遺伝子の構造を調べたところ、従来はイントロン領域と考えられていた場所に多数の選択

的終末エクソンや中間エクソンが存在することが判明し、さらに、それらを選択的に利用することで多数のC末端欠損型変異体が産生されることを見出した。C末端欠損型変異体はリガンド結合領域を欠損しているためリガンド依存性を消失していたが、変異体の中には恒常的活性化能を示すものが存在した。

ステロイドホルモン受容体の恒常的活性化は、ホルモン感受性腫瘍の悪性化やホルモン不感受性増殖に関連するとされており、C末端欠損型エストロゲン受容体変異体がエストロゲン感受性腫瘍の悪性化やエストロゲン不感受性増殖に関与する可能性が示唆された。

C末端欠損型エストロゲン受容体変異体の恒常的活性化機構を解明するため、人工的にC末端を欠失させた変異体を作成し、それら機能を解析した。エストロゲン受容体のC末端領域はリガンド結合ドメインを形成しており、さらにそれは11個のヘリックス(H1, H3-12)から形成されている。さらに、H3, H5, H12のヘリックスがリガンド依存的活性化に重要であり、リガンド結合に伴うH12の位置変化によりH3, H5の相互作用状態が変わり活性化状態に変化することが知られている。人工的に作成したC末端欠損型変異体の機能解析からC末端からH5までの欠損により恒常的活性化が引き起こされることが判明した。コアクチペーターp300との導入実験からC末端欠損型変異体はH5の欠損によりコアクチペーターと相互作用可能な活性化状態に変換されることが明らかとなった。

#### 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6件)

1. Nagamoto S, Iijima N, Ishii H, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Matsuo I, Nakagawa S, Takashima N, Shigeyoshi Y, Sakamoto A, Ozawa H. (in press) Establishment of an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanisms. *Neuroscience letter*  
doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.005.  
(査読有)

2. Hattori Y, Ishii H, Munetomo A, Watanabe H, Morita A, Sakuma Y, Ozawa H. (2016) Human C-terminally truncated ER variants resulting from the use of alternative exons in the ligand-binding domain. *Molecular Cellular Endocrinology*, 425:111-22.  
doi: 10.1016/j.mce.2016.01.026.  
(査読有)

3. Matsuo I, Iijima N, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Ishii H, Sakamoto A, Ozawa H. (in press) Characterization of sevoflurane effects on Per2 expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic nucleus in transgenic rats. *Neuroscience Research*  
doi: 10.1016/j.neures.2015.11.010.  
(査読有)

4. Munetomo A, Ishii H, Miyamoto T, Sakuma Y, Kondo Y. (2016) Puerperal and parental experiences alter rat preferences for pup odors via changes in the oxytocin system. *Journal of Reproduction and Development*. 62(1):17-27.  
doi: 10.1262/jrd.2015-046.  
(査読有)

5. Hattori Y, Ishii H, Morita A, Sakuma Y, Ozawa H. (2015) Characterization of the fundamental properties of the N-terminal truncation ( exon 1) variant of estrogen receptor in the rat. *Gene*, 571(1):117-25.  
(査読有)

6. Ishii H, Kobayashi M, Munetomo A, Miyamoto T, Sakuma Y. (2013) Novel splicing events and post-transcriptional regulation of human estrogen receptor E isoforms. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 133: 120-128.  
doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.027.  
(査読有)

[学会発表](計23件)

1. 服部裕次郎、石井寛高、渡部寛、森田明夫、小澤一史. C末端欠損型エストロゲン受容体 変異体の恒常的活性化機構の解析 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、郡山、2016年3月

2. 渡部寛、石井寛高、高橋謙治、高井信朗、小澤一史. 変形性膝関節症の滑膜ステロイド受容体発現量はBMIと逆相関する。第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、郡山、2016年3月

3. 友利裕二、飯島典生、日沼州司、天野千絵、石井寛高、託見健、高井信朗、小澤一史. 表面電荷の違いによるリポソームの細胞内動態の解析 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、郡山、2016年3月

4. 石井寛高、服部雄一郎、渡部寛、小澤一史. C末端欠損型エストロゲン受容体 変異体の恒常的活性化機構の解明 第42回日本神

経内分泌学会 第 23 回日本行動神経内分泌学会 合同学術集会、神戸、2015 年 9 月

5. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. ラットエストロゲン受容体 遺伝子の exon 1 変異体の機能解析 第 42 回日本神経内分泌学会 第 23 回日本行動神経内分泌学会 合同学術集会、神戸、2015 年 9 月

6. 永本盛嗣、飯島典生、相川優子、石井寛高、肥後心平、託見健、安齋めぐみ、坂本篤裕、小澤一史. 株化培養細胞を用いた in vitro 吸入麻酔薬作用解析実験系の確立 第 42 回日本神経内分泌学会 第 23 回日本行動神経内分泌学会 合同学術集会、神戸、2015 年 9 月

7. 永本盛嗣、飯島典生、石井寛高、託見健、肥後心平、坂本篤弘、小澤一史. 麻酔薬の作用機序の研究のための株化細胞を用いた in vitro での実験系の確立. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会、神戸、2015 年 3 月

8. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. 新規ヒトエストロゲン受容体 変異体の同定と転写活性化機構の解明. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会、神戸、2015 年 3 月

9. 石井寛高、服部裕次郎、小澤一史. ヒト精巣におけるエストロゲン受容体の発現制御機構の同定. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会、神戸、2015 年 3 月、

10. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. 新規ヒトエストロゲン受容体 変異体の同定と機能解析. 第 41 回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2014 年 11 月

11. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. 新規ヒトエストロゲン受容体変異体の同定と機能解析. 第 24 回臨床内分泌代謝 Update、大宮、2014 年 11 月

12. 石井寛高、服部裕次郎、小澤一史. ヒトエストロゲン受容体 の多重プロモーター機構と 5'-非翻訳領域の選択的スプライシングパターンの同定. 第 41 回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2014 年 10 月

13. 友利裕二、飯島典生、日沼州司、平井政彦、石井寛高、託見健、高井信朗、小澤一史. リボソームの細胞内に関する形態学的解析 培養細胞内での局在解析から. 第 55 回日本組織細胞学学会学術総会、松本、2014 年 9 月

14. Hiroataka Ishii, Yujiro, Hattori, Hitoshi Ozawa. Characterization of alternative promoter usage and alternative splicing profiles of the estrogen receptor gene in the human. The International Congress of Neuroendocrinology 2014, Sydney, Australia, 2014 年 8 月

15. Yujiro, Hattori, Hiroataka Ishii, Akio Morita, Hitoshi Ozawa. Identification of novel estrogen receptor variants in the human. The International Congress of Neuroendocrinology 2014, Sydney, Australia, 2014 年 8 月

16. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. 新規ラット C 末端欠損型エストロゲン受容体 変異体の局在・機能解析. 第 87 回日本内分泌学会学術集会、福岡、2014 年 4 月

17. 友利裕二、飯島典生、日沼州司、平井政彦、石井寛高、託見健、高井伸朗、小澤一史. 培養細胞によるリボソーム取り込みメカニズムの解析. 第 119 回日本解剖学会総会、宇都宮、2014 年 3 月

18. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. 新規ラット C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha 変異体の同定. 第 119 回日本解剖学会総会、宇都宮、2014 年 3 月

19. 荒井勇樹、石井寛高、小林牧人、小澤一史. GT1-7 細胞におけるアセチルコリン受容体の発現・機能解析. 第 119 回日本解剖学会総会、宇都宮、2014 年 3 月

20. 石井寛高、服部裕次郎、小澤一史. ラット N 末端欠損型エストロゲン受容体の局在・機能解析. 第 119 回日本解剖学会総会、宇都宮、2014 年 3 月

21. 石井寛高、小澤一史. 精巣特異的ヒトエストロゲン受容体 alpha 変異体の 5'-非翻訳領域は翻訳効率を著しく低減する. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会、宮崎、2013 年 10 月

22. 服部裕次郎、石井寛高、森田明夫、小澤一史. 新規ラット C 末端欠損型エストロゲン受容体 alpha 変異体の同定と機能解析. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会、宮崎、2013 年 10 月

23. 荒井勇樹、石井寛高、小林牧人、小澤一史. GT1-7 細胞におけるアセチルコリン受容体の発現解析. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会、宮崎、2013 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nms.ac.jp/nms/kaibou2/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

石井 寛高 (Ishii, Hirotaka)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20445810