

Title	Estrogen Regulation of the Insulin-like Growth Factor I Gene Transcription Involves an AP-1 Enhancer
Author(s)	馬屋原, 豊
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39015
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	うま や はら 馬屋原 豊
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11782 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Estrogen Regulation of the Insulin-like Growth Factor I Gene Transcription Involves an AP-1 Enhancer (エストロゲン応答性インスリン様成長因子 I (IGF-I) 遺伝子発現制御 における AP-1 エンハンサーの関与)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 倉智 嘉久 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

IGF-I は, GH 作用を媒介する endocrine effector として機能するのみならず, 全身の様々な組織で種々の刺激により産生され autocrine/paracrine effector としても機能する。中でも骨芽細胞, 子宮や一部の乳癌等においては, IGF-I は estrogen 応答性に産生され, その増殖, 分化に重要な役割を演じることが知られている。このことは閉経後の骨粗鬆症や女性生殖器腫瘍の増殖にも関連し, 従ってその発現調節機構は臨床的にも注目される。

今回, 私は, estrogen 受容体 (ER) を外来性に発現させた HepG2 細胞を用い, 鶏 IGF-I 遺伝子をモデルとして, この IGF-I 遺伝子の estrogen 応答性発現機構について解析を試みた。

【方法ならびに成績】

- ① estrogen 応答性測定系の作成: 元来 ER を持たない HepG2 細胞に human ER 発現ベクター (HE0) をリン酸カルシウム法により transient に transfect したところ, hormone binding assay で 2.2 fmol/mg protein の ER 発現を認めた。
- ② 鶏 IGF-I 遺伝子調節領域の estrogen 応答性: ①の ER 外来性発現 HepG2 細胞に, 鶏 IGF-I 遺伝子調節領域を luciferase 遺伝子の 5' 上流に組み込んだ reporter gene construct を transfect して estrogen 応答性を検討した。その結果, 600bp の調節領域のプロモーター活性は 10^{-6} M estradiol の添加により 8.6 倍に増加した。
- ③ fusion plasmid の転写開始部位の決定: estrogen 応答性に活性化される reporter gene construct の転写開始部位を 5' RACE 法を用いて決定した。その結果, 鶏の筋細胞における IGF-I の転写開始部位とほぼ一致しており, estrogen 応答性が IGF-I 本来の promoter により生じることが示された。以上②③の結果より, 鶏 IGF-I 遺伝子 600bp の調節領域に何らかの estrogen に応答する cis-acting element が存在することが示された。
- ④ estrogen responsive element (ERE) 非存在の証明: 塩基配列検索の結果, 鶏 IGF-I 遺伝子 600bp の調節領域に ERE に一致する部位は認められなかった。唯一, ERE と 70% 相同性を持つ部位が存在したが, この部位に PCR 法を用いた site-directed mutagenesis により mutation を導入しても, estrogen 応答性は変化せず, この ERE 類似部位は ERE として機能しないことが示された。このことから, 同 600bp の調節領域は, いわゆる ERE を欠くにも関わらず estrogen 応答性を有することが明らかとなった。
- ⑤ estrogen 応答性における AP-1 結合部位の重要性: 先に, 同 600bp 領域に AP-1 結合部位の存在を認めている。

文献的にこの AP-1 結合部位が estrogen 応答性に関与している可能性が考えられたため、同様の手法によりこの AP-1 部位に mutation を導入したところ estrogen 応答性は全く失われ、同 AP-1 部位が estrogen 応答性に死活的に重要であることが示された。

⑥ AP-1 部位への蛋白結合の変化：ER 発現 HepG2 細胞より全細胞抽出物を抽出し、同 AP-1 部位を含む 20bp の領域をプローブとした gel-shift assay を行った。その結果、estrogen 添加により AP-1 部位への特異的蛋白結合の増加が認められた。なお、この gel-shift complex に含まれる蛋白は特異的抗体を用いた実験 (⑩に記載) により c-Fos, c-Jun であることが示された。

⑦ c-fos, c-jun mRNA 量および蛋白量の変化の検討：Northern blot および Western blot 解析の結果、estrogen 添加前後で、ER 発現 HepG2 細胞における c-fos, c-jun mRNA 量、或いは c-Fos, c-Jun 蛋白量は変化せず、estrogen による c-Fos, c-Jun に対する何らかの翻訳後修飾がこの情報伝達に関与するものと考えられた。

⑧ ER の DNA-binding domain の必要性の検討：DNA-binding domain を欠く変異 ER 発現ベクター (HE11) を HepG2 細胞に発現させ、estrogen 応答性に対する影響を検討した。その結果、変異 ER 発現 HepG2 細胞では estrogen 応答性は殆ど消失し、ER の DNA-binding domain がこの情報伝達に必須であることが示された。

⑨ de novo 蛋白合成の必要性の検討：cycloheximide を用いて蛋白合成を阻害した ER 発現 HepG2 細胞において、estrogen 応答性の AP-1 部位への蛋白結合の変化を検討した。その結果、estrogen 応答性に生成される gel-shift complex は cycloheximide 投与によっても変化が認められず、この情報伝達の過程に de novo 蛋白合成は不必要であることが示された。

⑩ AP-1 部位へ estrogen 応答性に結合する蛋白の同定とその結合機構の解析：estrogen 応答性に生成される gel-shift complex の移動度を TPA 応答性に生成される complex と比較するとともに、c-Fos, c-Jun および ER に対する特異抗体が complex 生成に及ぼす影響を検討した。その結果、estrogen 応答性に生じる complex と TPA 応答性に生じる complex は移動度が等しく、ともに c-Fos および c-Jun に対する抗体の添加によって減弱したことから、その構成成分は同一で、Fos-Jun 複合体よりなると考えられた。ところが、estrogen 応答性に生じる gel-shift complex のみが抗 ER 抗体の添加によっても減弱し、Fos-Jun 複合体が estrogen 応答性に AP-1 へ結合するためには intact な estrogen-ER 複合体が同時に存在することが必須であることが示唆された。

【総括】

IGF-I 遺伝子の enhancer/promoter が estrogen 応答性に活性化されることが示され、estrogen 作用の direct な mediator としての IGF-I の重要性が裏付けられた。さらに、この IGF-I 遺伝子の estrogen 応答性発現に AP-1 結合領域、及び c-Fos/c-Jun の翻訳後調節を介するユニークな機構が関与することが示され、このような機構の存在は、estrogen 作用の多様性を生む背景を成すものであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

インスリン様成長因子 I (IGF-I) は、子宮や骨芽細胞などにおいてエストロゲン応答性に発現し、その増殖、分化に関与している。しかしながら、IGF-I 遺伝子がエストロゲン応答性に発現するメカニズムについては明らかではない。

本研究では、鶏 IGF-I 遺伝子をモデルとして、エストロゲン受容体を外来性に発現させた HepG2 細胞系を用いて、同遺伝子の 5' 隣接領域のエストロゲン応答性の有無と、それを生むメカニズムが検討された。その結果、鶏 IGF-I 遺伝子の 5' 隣接領域が、同領域に存在する AP-1 エンハンサーを介したユニークな機構によりエストロゲン応答性を発揮し得ることが示され、このような機構が、同遺伝子の生理的なエストロゲン応答性に関与する可能性が示唆された。

以上のように、本研究はエストロゲン応答性 IGF-I 遺伝子発現のメカニズム解明に道を開くものであり、論文としての意義は高いと考える。