

Title	核内レセプター転写共役活性化因子の機能に関する分子生物学的研究
Author(s)	荒井, 重紀
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3184268
DOI	10.11501/3184268
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	あら い しげ き 荒 井 重 紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 6 1 6 5 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	核内レセプター転写共役活性化因子の機能に関する分子生物学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 田中 慶一 教授 土井 健史 教授 花岡 文雄

論 文 内 容 の 要 旨

核内レセプターはステロイドホルモンや脂溶性ビタミンをリガンドとする転写因子であり、これまでに線虫から哺乳類まで50種類をこえる核内レセプター遺伝子が単離されている。核内レセプターを介した転写制御機構として、近年、転写共役因子を介したモデルが考えられている。リガンドと結合していない核内レセプターは転写共役抑制因子(コリプレッサー)と結合し転写を抑制している。一方、リガンドと結合した核内レセプターは転写共役活性化因子(コアクチベーター)と結合し転写を活性化する。現在、核内レセプターのコアクチベーターの候補因子として多数の遺伝子が単離されているが、これらの機能解析は遺伝子導入などの過剰発現系を使用しているため本来の基質以外の分子に働きかけている可能性や内在するコアクチベーターの影響を受けるなどの問題がある。これらの問題を克服する方法の一つとして遺伝子ノックアウト法がある。すなわち、細胞内から解析したい分子を除去したときの影響について解析する手法である。遺伝子ノックアウトは相同組換えを利用し、解析したい遺伝子配列を薬剤耐性遺伝子等に置換することにより行われる。しかし、通常的高等脊椎細胞では相同組換えの頻度が低いためノックアウト細胞を作製することは困難である。ニワトリDT40細胞は現在知られる培養細胞株の中で、相同組換えの頻度が最も高く、遺伝子の機能を細胞レベルで解析するために使用されている。本論文では核内レセプターのコアクチベーターのうち、現在最も解析が行われている p160/SRC ファミリーについてノックアウト細胞を作製し、核内レセプターの転写制御機構におけるこれらの因子の役割について解析した。

DT40細胞を用いて遺伝子をノックアウトするには、解析したい遺伝子のニワトリホモログの情報が必要となる。p160ファミリーは、現在までに ACTR、SRC-1、TIF 2 の一次構造の類似した3種類の遺伝子がヒトとマウスからクローニングされているが、ニワトリにおけるp160ファミリーの存在については明らかにされていない。そこで最初に、ニワトリ p160ファミリーのクローニングを行った。方法としてヒトおよびマウスの p160ファミリーの cDNA 配列を参考に degenerate primer を設計し、ニワトリ脳または DT40細胞より調製した RNA を鋳型として RT-PCR を行った。その結果、DT40細胞から ACTR、TIF 2 のホモログを脳から SRC-1 のホモログが単離され、ニワトリにおいても3種類の p160ファミリーが存在することが示された。それぞれの Open Reading Frame の全長をニワトリ小腸粘膜 cDNA ライブラリーから単離した。単離したクローンの塩基配列を決定し、ヒトとマウスの配列と比較したところ、全体では70-80%の相同性を示した。また、脳、肝臓、DT40細胞における発現パターンをノザンプロット法により解析し、脳では SRC-1 が多く発現しており、DT40細胞では ACTR、TIF 2 が発現しているが、SRC-1

はほとんど発現していないことが示された。

続いて、核内レセプターとニワトリ p160ファミリーの相互作用を酵母 two-hybrid 法により検討した。まず、ヒト、マウス、ニワトリ p160ファミリーの核内レセプター相互作用領域のアミノ酸配列の保存性を比較した結果、核内レセプターとの相互作用に重要と報告されている 3 個の LXXLL 配列 (L はロイシン、X は任意のアミノ酸) NR box 1-3 はニワトリにおいてもほぼ完全に保存されていた。さらに NR box 3 の下流に LXXLL に類似した配列を見出し、NR box 4 と名付けた。この NR box 4 を含む領域および含まない領域についてラットエストロゲンレセプター (ER)、プロゲステロンレセプター (PR)、甲状腺ホルモンレセプター (TR)、ビタミン D レセプター (VDR) とのリガンド依存的な相互作用を酵母 two-hybrid 法により検討した。その結果、ニワトリ p160ファミリーは調べた 4 種類のレセプターとリガンド依存的に結合した。また、NR box 4 を含まない領域では結合力が低下した。これらのことから、ニワトリ p160ファミリーは哺乳類ホモログと同様にリガンド依存的に核内レセプターと相互作用すること、またその結合には NR box 4 が関与することが示された。

続いて、DT40細胞を用いて p160ファミリーのノックアウト細胞を作製した。クローニングした cDNA 配列を参考にプライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅されたゲノム DNA 断片をサブクローニング後、ターゲッティングコンストラクトを作製した。DT40細胞にターゲッティングコンストラクトを遺伝子導入し、薬剤耐性クローンについてサザンブロット解析により相同組換えを確認した。以上の操作により、ACTR ノックアウト細胞、TIF 2 ノックアウト細胞を作製した。作製したクローンについてルシフェラーゼアッセイにより、グルココルチコイドレセプター (GR)、ER、TR、VDR を介した転写制御への影響を解析した。その結果、ACTR ノックアウト細胞は正常細胞とほぼ同様なリガンドに応答した転写活性化能を示すことから ACTR は核内レセプターの転写制御に深く関与していないことが示された。一方、TIF 2 ノックアウト細胞では GR、ER のリガンド依存的な転写活性化能が大きく低下していることが示された。また、TR と VDR については TIF 2 ノックアウト細胞は正常細胞と比較しほぼ同程度の転写活性化能を示し、TIF 2 は核内レセプターのうち ER、GR の転写制御に大きく関与することが明らかになった。また、GR の転写活性化能の低下は TIF 2 を導入することにより回復することから TIF 2 の消失による結果であると考えられる。これらの結果より、本論文ではニワトリ p160ファミリーを単離し、哺乳類と同様な機能を持つことを明らかにし、また DT40細胞をもちいて ACTR ノックアウト細胞、TIF 2 ノックアウト細胞を作製し TIF 2 が GR と ER の転写制御に働いていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

荒井君は、p160ファミリーに属する 3 種類の転写共役活性化因子 (SRC-1、TIF 2、ACTR) の機能についてノックアウト細胞を用いて検討し、以下のような知見を得た。すなわち、ニワトリにおいても哺乳動物と同様の構造・機能を有する p160ファミリーが存在することなどを明らかにした。そして、ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を用いて TIF 2 と ACTR のノックアウト細胞を作製した。両細胞の p160ファミリーの発現量や転写活性化能等について解析し、これら因子の機能上の差異や重複性を明らかにした。

以上の成果は、単にニワトリの 1 細胞株で明らかにした知見だけには留まらず、生物一般におけるホルモンやビタミンの作用機構の一端を解明したものであり、また機能解明研究の一手法を例示したものであり、学術的に高く評価され、博士 (薬学) 学位論文として充分価値あるものと認められる。