

学 位 論 文 題 名

ブタ子宮エストロゲンレセプターのリン酸化に関する研究

学位論文内容の要旨

緒 言

エストロゲン（E₂）はエストロゲンレセプター（ER）を介してその生理作用を発現することが知られている。E₂とERの複合体は標的遺伝子上のエストロゲン感应部位（estrogen responsive elements : ERE）とよばれる特異的な部位に結合して転写を制御するが、ERによる転写制御のメカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。ERはプロテインキナーゼの基質になると考えられていることから、E₂-ER複合体による転写制御のERのリン酸化が関与していることが予測される。本研究ではERリン酸化の性質及びその生理的意義を明かにするため、ブタ子宮の細胞質画分から heparin-Sepharose 及びモノクローナル抗 ER 抗体を用いた免疫沈澱より得た ER 標品を用いリン酸化反応の生化学的な特徴を解析した。

実験方法

1. ERの精製

ブタ子宮の細胞質画分に30%飽和の硫酸を加え、得られた沈澱を40mM Tris-HCl (pH7.5) - 1 mM DTT-0.5mM PMSF (TDP buffer)-175mM KCl 5 ml に溶解し Sephadex G-25カラム (2.5×10cm) を用い、脱塩後、[³H] E₂ (100nM と heparin-Sepharose (2 ml) を加え 4℃で一晩混合した。試料をカラムにつめ洗浄後175mM から500mM の KCl 濃度勾配を含む TDP buffer を用い ER を溶出した。放射能をもつピークを集めその溶液を 5 % glycerol - 0.1mM EDTA - 0.1% NP-40 - 72.5mM KCl を含む TDP buffer になるように調整した (heparin-Sepharose 画分)。次に同 buffer で平衡化したモノクローナル抗 ER 抗体と結合させた protein A-Sepharose を 1 / 6 倍容加え一晩インキュベートし得られた沈澱を最終 ER 標品として用いた。E₂ 結合能は Dextran-Charcol 法で、タンパク質濃度は Bradford 法で測定した。Laemmli の方法に従い10%SDS-PAGE 後銀染色を行った。モノクローナルラット抗ヒト ER 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

2. ER のリン酸化

ER 標品 $69\mu\text{l}$ (0.53mM dimeric ER を含む) を 10mM 2 価金属イオン (Mg^{2+} 又は Ca^{2+}) と 33nM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP を加え 4°C で 120 分間インキュベートし、反応液に 10mM 非標識 ATP を加え反応を停止した。未反応の ATP を十分洗浄後 SDS-PAGE を行ない、オートラジオグラフィーを行なった。

3. リン酸化アミノ酸残基の同定

Cooper の方法に従い、試料 ER をリン酸化後 6N HCl を加え加水分解し高圧薄層電気泳動を行ないオートラジオグラフィーで検出した。

4. ER と ERE の結合の測定

PGEM-7 Zf (+) の Sma I 部位に ERE ($5' - \text{CCAGGTCAGAGTGACCTGAGC-TAAAATAACACATTCAG} - 3'$) を 2 つ連結したフラグメントを挿入したプラスミド (Z1 6F10) から制限酵素 (EcoR I, Hind III) を用いて ERE を含む 104base pair の部位を切出し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP と polynucleotide kinase を用い標識 ERE を調製した。非標識 ATP でリン酸化した ER の heparin-Sepharose 画分と調製した標識 ERE を用い、ER とエストロゲン感受部位 (ERE) との結合を Gel retardation assay により検出した。

結 果

1. ER の精製

ER 標品の SDS-PAGE では主要な分子量を 63K と他に 70K の 2 つのバンドが認められ、そのウェスタンブロットィングではタンパク質染色に相応した位置にバンドが認められた。

2. ER のリン酸化

i) 2 価金属イオン要求性

2 価の金属イオン非存在下ではリン酸化は全くみられず、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 存在下で分子量 63K と 120K にリン酸化によるバンドが認められた。分子量 120K はタンパク質染色では検出されず、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP によるリン酸化反応でのみ検出されることから、 63K ER のリン酸化に伴いその ER が凝集したものと考えられるがその詳細は不明である。またこれらのリン酸化は非標識 ATP の添加及び試料の 70°C 、3 分間の加熱で完全に消失した。

ii) 2 価金属イオンの濃度依存性

Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を加え ER と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP にインキュベート後 ER への $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ のとりこみを測定すると、イオンの濃度に依存してリン酸化は増加し、 Mg^{2+} では 10mM 、 Ca^{2+} では 0.1

mM ではほぼ最大となった。

iii) リン酸化反応の時間依存性と ATP 濃度依存性

反応はほぼ60分まで時間依存性に増加した。また加えた ATP の濃度に依存して反応は増大し、ATP に対する K_m は Mg^{2+} 存在下で $0.19 \mu M$ と Ca^{2+} 存在下で $0.16 \mu M$ と算出された。

3. リン酸化アミノ酸残基の同定

Mg^{2+} 又は Ca^{2+} の存在下でリン酸化されたアミノ酸残基は共にセリンと同定された。

4. E 2 の ER リン酸化に対する影響と DNA 結合能

Mg^{2+} 又は Ca^{2+} 存在下ともに E 2 存在下の方が非存在下の場合よりもリン酸化は著明に増強した。また ER と ERE の結合は ER がリン酸化された場合にのみ見られ、リン酸化されない ER は ERE とは結合しなかった。

考 察

ER がプロテインキナーゼの基質になることはこれまでの種々の報告からほぼ一致した見解であるが、ER 自身がキナーゼ活性を有するか否かについては未だ意見の統一は得られていなかった。本研究で用いた ER 標品は抗 ER 抗体を用いて免疫沈澱させたものであり、他のプロテインキナーゼの混在の可能性は低く、従って本研究で認められたリン酸化は ER 自身が持つ内因キナーゼ活性によるものと考えられる。またタンパク質の構造解析から ER は ATP 結合部位を有すると推測されており、このことも ER 自身がキナーゼ活性をもつ本研究の結果を支持している。

本研究での ER のリン酸化は顕著なイオンの特異性は見られなかったが、イオンの至適濃度については Mg^{2+} では $10mM$ 、 Ca^{2+} では $0.1mM$ という結果が得られた。一般的に細胞内では Mg^{2+} と Ca^{2+} の濃度はそれぞれ約 $5mM$ と $0.1 \mu M$ であることから、生理的には Mg^{2+} によるリン酸化がおこるものと考えられる。

また本リン酸化反応は ATP 濃度に依存し、その K_m は $0.16 \mu M - 0.19 \mu M$ であった。本研究で試料とした ER 標品は抗 ER 抗体を介して protein A-Sepharose に拘束されている条件はあるが、ATP に対する十分高い親和性を有することが示された。

ER リン酸化の生理的意義についてチロシン残基のリン酸化がリガンドとの結合に重要であると報告されている。この報告を考慮すると本研究で用いた最終 ER 標品は E 2 結合能を持つのでチロシン残基は既にリン酸化されているものと予測される。本研究ではこの ER 標品のセリン残基が E 2 存在下でさらにリン酸化されること、リン酸化された ER は ERE との結合能が著

明に増加することを明かにした。このことからセリン残基のリン酸化はE 2-ER 複合体が標的遺伝子中の ERE に結合して転写を調節する過程に関与するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 牧 田 章

副 査 教 授 西 信 三

研究目的

エストロゲン (E 2) とエストロゲンレセプター (ER) の複合体は標的遺伝子上のエストロゲン感応部位 (ERE) とよばれる特異的な部位に結合して転写を制御するが、そのメカニズムに ER のリン酸化が関与していることが予測される。そこで本研究では ER リン酸化の性質及びその生理的意義を明かにするためブタ子宮より得た ER 標品を用いリン酸化反応の生化学的な特徴を解析した。

実験成績

1. ER 標品の調製

ブタ子宮の細胞質画分から heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィー及びモノクローナル抗 ER 抗体を用いた免疫沈殿により最終 ER 標品を得た。10% SDS-PAGE では主要な分子量63Kと70Kの2つのバンドが認められた。モノクローナルラット抗ヒト ER 抗体を用いたウエスタンブロッティングではタンパク質染色に相応した位置にバンドが認められた。

2. ER のリン酸化

ER 標品69 μ l を10mM 2価金属イオン (Mg^{2+} 又は Ca^{2+}) と33nM [γ - ^{32}P] ATP を加え4℃で120分間インキュベートし、反応液に10mM 非標識 ATP を加え反応を停止した。未反応の ATP を十分洗浄後 SDS-PAGE を行ない、オートラジオグラフィーを行なった。

i) 2価金属イオン要求性

2価の金属イオン非存在下ではリン酸化は全くみられず、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 存在下で分子量63Kと120Kにリン酸化によるバンドが認められた。分子量120Kはタンパク質染色では検出されず、

[^{32}P] ATP によるリン酸化反応でのみ検出されることから、63K ER のリン酸化に伴いその ER が凝集したものと考えられるがその詳細は不明である。またこれらのリン酸化は非標識 ATP の添加及び試料の 70°C 、3 分間の加熱で完全に消失した。

用いた ER 標品は抗 ER 抗体を用いて免疫沈澱させたものであり、他のプロテインキナーゼの混在の可能性は低く、従って本研究で認められたリン酸化は ER 自身が持つ内因性キナーゼ活性によるものと考えられる。またタンパク質の構造解析から ER は ATP 結合部位を有すると推測されており、このことも ER 自身がキナーゼ活性をもつ本研究の結果を支持している。

Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を加え ER への [^{32}P] のとりこみを測定すると、イオンの濃度に依存してリン酸化は増加し、 Mg^{2+} では 10mM 、 Ca^{2+} では 0.1mM でほぼ最大となった。

一般的に細胞内では Mg^{2+} と Ca^{2+} の濃度はそれぞれ約 5mM と $0.1\mu\text{M}$ であることから、生理的には Mg^{2+} によるリン酸化がおこるものと考えられる。

iii) リン酸化反応の時間依存性と ATP 濃度依存性

反応はほぼ60分まで時間依存性に増加した。また加えた ATP の濃度に依存して反応は増大し、ATP に対する k_m は Mg^{2+} 存在下で $0.19\mu\text{M}$ 、 Ca^{2+} 存在下で $0.16\mu\text{M}$ と算出された。試料とした ER 標品は抗 ER 抗体を介して protein A-Sepharose に拘束されている条件はあるが、ATP に対する十分高い親和性を有することが示された。

3. リン酸化アミノ酸残基の同定

Cooper らの方法に従い、試料 ER をリン酸化後 6N HCl を加え加水分解し高圧薄層電気泳動を行ないオートラジオグラフィーで検出した。 Mg^{2+} 又は Ca^{2+} 存在下でリン酸化されたアミノ酸残基は共にセリンと同定された。

4. E 2 の ER リン酸化に対する影響と DNA 結合能

Mg^{2+} 又は Ca^{2+} 存在下ともに E 2 存在下の方が非存在下の場合よりもリン酸化は著明に増強した。ERE を 2 つ連結したフラグメントを挿入したプラスミドから制限酵素を用いて ERE を含む 104base pair の部位を切出し、標識 ERE を調製した。非標識 ATP でリン酸化した ER の heparin-Sepharose 画分と調製した標識 ERE を用い、ER と ERE との結合を Gel retardation assay により検出した。ER と ERE の結合は ER がリン酸化された場合にのみ見られ、リン酸化されない ER は ERE とは結合しなかった。

本研究では ER 標品のセリン残基が E 2 存在下でリン酸化されること、リン酸化された ER は ERE との結合能が著明に増加することを明かとした。このことからセリン残基のリン酸化は E 2-ER 複合体が標的遺伝子中の ERE に結合して転写を調節する過程に関与するものと思わ

れる。

以上、本研究はエストロゲンレセプターのリン酸化の性質およびその生理的意義を明かにしたものであり、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認定された。