

学位論文題名

エストロゲン受容体 $\alpha$ に対するユビキチンリガーゼ  
estrogen responsive finger protein (EFP)の機能解析

学位論文内容の要旨

エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) はエストロゲンと複合体を形成し、転写因子として標的遺伝子の転写を活性化することで生殖器の発達や乳癌や子宮体癌の腫瘍形成に関与する。ER $\alpha$  は核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンド依存性に DNA に結合して転写活性を起こす。ER $\alpha$  はリガンドが結合すると立体構造を変化させ二量体を形成し、コアクチベーターと複合体を形成する。その複合体はヒストンをアセチル化することで、さまざまな標的遺伝子の転写調節領域に存在するエストロゲン応答エレメント (ERE) に作用し転写を活性化する。

ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞内タンパク質の分解システムであり、細胞周期制御、シグナル伝達、癌抑制遺伝子の発現調節、転写調節などの機能に関与している。ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1) にトランスファーされ、ユビキチン結合酵素 (E2) を介してユビキチンリガーゼ (E3) によって認識されている基質タンパク質に付加される。基質タンパク質上にポリユビキチン鎖が形成されると、基質タンパク質はプロテアソームにより分解される。また、ユビキチン化はタンパク質分解だけではなく、DNA 修復、エンドサイトーシス、アミノ酸輸送等の機能にも関与する。近年、いくつかの核内受容体において、ユビキチン化が転写活性化に重要であることが示唆されている。ER $\alpha$  もエストロゲン依存性に分解され、その分解はプロテアソーム阻害剤で阻害される。ER $\alpha$  はユビキチン-プロテアソームシステムで分解されることにより、受容体の発現レベルや転写活性レベル及び活性時間を調節することが推測されている。ER $\alpha$  はエストロゲン依存性に転写活性を促進するが、エストロゲンが結合すると、ER $\alpha$  の半減期は約 3 時間に短縮する。しかし、現在までエストロゲン存在下で ER $\alpha$  と結合し、その転写活性や分解制御に関与する E3 は同定されていない。

申請者は ER $\alpha$  を特異的にユビキチン化する E3 として estrogen responsive finger protein (EFP) を同定し、その生化学的及び細胞生物学的解析を行った。efp 遺伝子は ERE を有する ER $\alpha$  の標的遺伝子の一つであり、エストロゲン投与により EFP タンパク質の発現レベルが増加する。EFP は、N 末端に RING finger domain を持ち、細胞周期の G2 停止を引き起こす 14-3-3 $\sigma$  のタンパク質分解を引き起こす E3 であることが以前に報告されている。また、efp 遺伝子ノックアウトマウスはエストロゲン低反応性であり、EFP はエストロゲン依存性細胞増殖と生殖器官の発育に不可欠と報告されている。

EFP と ER $\alpha$  の結合を HEK293T 細胞内で解析したところ、EFP は ER $\alpha$  と特異的に結合した。また EFP と ER $\alpha$  のリコンビナントタンパク質を混合し、抗 EFP 抗体で免疫沈降し、抗 ER $\alpha$  抗体でウエスタン解析を行ったところ、両者の結合が確認された。さらに、酵母ツーハイブリッド法により、エストロゲン (17 $\beta$ -estradiol) 依存性に両者の結合が促進されることが判明した。したがって、EFP と ER $\alpha$  は他の要素 (17 $\beta$ -estradiol やアダプター分子など) なしでも結合し得るが、17 $\beta$ -estradiol 存在下においてその結合がさらに増強されることが確認された。また、EFP が E3 であるかを検討するために、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行ったところ、

・ EFP は E3 として機能し、E2 として Ubc4 や UbcH5c を使用することが判明した。さらに RING フィンガードドメインを欠損させた EFP ( $\Delta$ RING) と、システインをアラニンに置換した EFP (C8A) の変異体の E3 活性を検討したところ、両者とも E3 活性の減弱もしくは消失が認められ、酵素活性には RING フィンガードドメインが必要であることが判明した。さらに *in vitro* ユビキチン化アッセイにおいて EFP が ER $\alpha$  を直接ユビキチン化することが判明した。また、HEK293T 細胞内での *in vivo* ユビキチン化アッセイにおいて、EFP の存在で ER $\alpha$  のユビキチン化が促進され、細胞内においても EFP が ER $\alpha$  をユビキチン化することが確認された。さらに、EFP が ER $\alpha$  の安定性に与える影響をパルス-チェイス法によって解析したところ、EFP ( $\Delta$ RING) を過剰発現させた場合に ER $\alpha$  の分解速度の遅延が認められ、細胞内において EFP が ER $\alpha$  の分解に関与することが明らかとなった。

EFP が ER $\alpha$  の転写活性に与える影響を調べるためにルシフェラーゼアッセイを行ったところ、EFP の過剰発現により *ERE* 転写活性が上昇した。また、EFP ( $\Delta$ RING) を過剰発現させた場合には転写活性の抑制が認められ、ドミナントネガティブ効果がみとめられた。EFP がどのような機序で転写活性に影響を与えているかを検討するために、コアクチベーターの一つである Tip60 との関係について検討した。その結果、EFP (WT) の存在下で、Tip60 と ER $\alpha$  の結合の促進が認められ、一方、EFP (C8A) の過剰発現の場合は両者の結合が抑制された。したがって、EFP は Tip60 と ER $\alpha$  の結合を促進することで、*ERE* の転写活性を促進することが示唆された。

また、臨床検体を用いて子宮内膜癌での EFP の発現について検討したところ、類内膜腺癌 Grade 1 及び 2 において EFP の比較的高い発現が確認された。

今回の研究で EFP の新たな機能として、ER $\alpha$  の分解と転写制御に関与する E3 であることが判明し、*ERE* における転写に対してポジティブフィードバック作用を有することが示された。このことは、EFP が複数の段階（細胞周期制御や転写制御など）でホルモン依存性腫瘍の形成及び悪性化に関与している可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 櫻 木 範 明  
副 査 教 授 笠 原 正 典

## 学位論文題名

### エストロゲン受容体 $\alpha$ に対するユビキチンリガーゼ estrogen responsive finger protein (EFP)の機能解析

エストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ ) はエストロゲンと複合体を形成し、転写因子として標的遺伝子の転写を活性化し、生殖器の発達やホルモン依存性癌（乳癌や子宮体癌など）の腫瘍形成に関与することが知られている。本学位論文は、ER $\alpha$ を特異的にユビキチン化するユビキチンリガーゼ E3、estrogen responsive finger protein (EFP)を同定し、生化学的及び細胞生物学的解析を行ったものである。EFPはER $\alpha$ と直接結合し、その結合はエストロゲン依存性に増強した。さらに、*in vitro* ユビキチン化アッセイにおいて EFP は ER $\alpha$ をユビキチン化した。また細胞内に EFP を過剰発現させると、ER $\alpha$ のユビキチン化を促進した。そのユビキチン化は、リジン 48 を介したポリユビキチン鎖形成であり、そのユビキチン鎖をプロテアソームが認識し ER $\alpha$ を分解に導くことが判明した。また EFP はエストロゲン依存性に、ER $\alpha$ の転写活性を促進させることも明らかとなった。この転写促進のメカニズムは、EFP による ER $\alpha$ のユビキチン化を認識して、コアクチベーターの一つである Tip60 が ER $\alpha$ に結合することに起因することも判明した。また、各進行度の子宮体癌の組織検体に対してウエスタンブロット解析による EFP の発現レベルの検討を行ったところ、正常子宮内膜と癌組織で発現の相違が認められた。したがって、今後臨床医学的に乳癌や子宮体癌などのホルモン依存性癌において、EFP の分子レベルでの解析をすることの重要性が示唆された。

口頭発表において、笠原正典教授より、EFP はエストロゲン依存性に ER $\alpha$ をユビキチン化するユビキチンリガーゼとして初めての発見か、EFP に着眼した理由は何か、TRIM family protein のなかでエストロゲン応答領域を持つタンパク質は EFP のみか、EFP ノックアウトマウスの表現型から考えると ER $\alpha$ のユビキチン化には他のユビキチンリガーゼの関与が考えられるのか、ER $\alpha$ のユビキチン化による分解は、細胞内の DNA 上で起こる反応と考えていいのかなどの質問があった。これらの質問に対し、EFP はエストロゲン依存性に ER $\alpha$ をユビキチン化するユビ

キチンリガーゼとして今回が初めての発見であり、TRIM family protein のなかで、エストロゲン応答領域を持つタンパク質は EFP のみであり、そのため本研究において EFP に注目したということ、EFP のノックアウトマウスでもエストロゲンの作用のすべては消失しないことから EFP 以外にも ER $\alpha$  をユビキチン化するユビキチンリガーゼは存在する可能性があること、ER $\alpha$  のユビキチン化による分解は細胞内の DNA 上で起こる反応かどうかは不明だが、多くの転写因子の分解は DNA 上で認められる可能性が高いと考えられているが、統一した見解は難しいことを回答した。ついで櫻木範明教授より、エストロゲンの反応は臓器特異的であるがそのメカニズムについて EFP の関与はあるのか、タモキシフェンなどのエストロゲン受容体アンタゴニストの作用と、ユビキチン化や EFP に関係はあるのか。EFP のドミナントネガティブ型を今後治療に応用できるのかなどの質問があった。これらの質問に対しては、EFP は多くの組織に発現しているタンパク質であり、EFP の作用でエストロゲンの臓器特異的な作用を説明するのは困難であり、タモキシフェンの作用については今回検討していないが EFP の関与が否定できないこと、さらに、EFP のドミナントネガティブを今後治療に応用できる可能性があることを回答した。さらに、畠山鎮次教授より、今回の研究を確実にするために不足している点は何かと質問があり、EFP をノックダウンさせた場合の ER $\alpha$  の転写や分解に対する実験の必要性を回答した。

この論文は、北海道医学雑誌で高く評価され、今後、臨床でのホルモン依存性腫瘍における予後規定因子としての役割や、ホルモン依存性腫瘍の発癌の解明、及び治療の方面で期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学資を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。