

博士論文

新たなビタミン D 受容体共役因子群の機能解析

平成 22 年度進学

東京大学 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

氏名 朝妻知子
指導教員 白髭克彦

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 目次 | 2 |
| 論文の概要 | 5 |
| 略語一覧 | 9 |
| 第一章 序論 | 11 |
| 第一節 緒言 | 12 |
| 第二節 ビタミンDの生理作用 | 13 |
| 第一項 ビタミンDの種類・産生 | 13 |
| 第二項 ビタミンDの生理作用 | 13 |
| 第三節 ビタミンD受容体の作用機構 | 15 |
| 第一項 ビタミンD受容体の生理作用 | 15 |
| 第二項 ビタミンD受容体の分子機構 | 15 |
| 第三項 ビタミンD受容体の遺伝子発現制御機構 | 16 |
| 第四項 ビタミンD受容体の転写以外の経路によるビタミンD作用機構 | 17 |
| 第一項 ユビキチン・プロテアソーム系について | 19 |
| 第二項 ユビキチンリガーゼの多様性 | 19 |
| 第三項 転写因子とタンパク質分解機構の関連性 | 20 |
| 第五節 本研究の目的 | 23 |
| 第二章 | 30 |
| VDR新規相互作用因子 BEND3の機能解析 | 30 |
| 第一節 緒言 | 31 |
| 第二節 材料と方法 | 32 |
| 第一項 材料 | 32 |
| 第二項 方法 | 33 |
| 第一項 BEND3はVDRとリガンド非依存的に相互作用する | 40 |
| 第二項 ビタミンD応答性細胞種の検討 | 40 |
| 第三項 BEND3はVDRの転写共役因子である | 41 |
| 第一項 抗BEND3抗体カラムの作製 | 42 |
| 第二項 BEND3相互作用因子群の同定 | 42 |
| 第三章 新たなVDR共役因子の同定 | 52 |
| 第一節 緒言 | 53 |
| 第二節 材料と方法 | 54 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 第一項 | 材料 | 54 |
| 第二項 | 方法 | 54 |
| 第三節 | GST融合VDRアフィニティー精製によるVDR新規相互作用因子取得の 試み | 59 |
| 第四節 | VDRの転写制御におけるMYSM1の機能解析 | 60 |
| 第一項 | MYSM1はVDRとリガンド非依存的に相互作用する | 60 |
| 第二項 | MYSM1はVDRの転写共役因子である | 60 |
| 第三項 | MYSM1はCyp24a1遺伝子上流のVDR結合領域におけるヒストンH2Aを 脱ユビキチン化する。 | 61 |
| 第五節 | 小括 | 62 |
| 第四章 | ユビキチン修飾を介したVDRの機能解析 | 69 |
| 第一節 | 緒言 | 70 |
| 第二節 | 材料と方法 | 71 |
| 第一項 | 材料 | 71 |
| 第二項 | 方法 | 71 |
| 第三節 | VDR複合体のユビキチンリガーゼ能の評価 | 73 |
| 第一項 | VDRの自己ユビキチン化活性はリガンド非依存的である | 73 |
| 第二項 | VDRの自己ユビキチン化活性は既知E3MDM2より弱い活性である | 73 |
| 第三項 | VDRはリガンド依存的にポリユビキチン化を促進する | 74 |
| 第四節 | VDRによるMYSM1へのユビキチン付加 | 76 |
| 第一項 | VDRのシステインはユビキチン化修飾される | 76 |
| 第二項 | MYSM1は <i>in vitro</i> にてVDRによりポリユビキチン化される | 76 |
| 第三項 | MYSM1は <i>in vivo</i> でユビキチン化される | 77 |
| 第五項 | 小括 | 78 |
| 第五章 | 総合討論 | 87 |
| 第一節 | 本研究の成果 | 88 |
| 第一項 | VDR転写制御におけるBEND3機能の探索 | 88 |
| 第二項 | VDR(A/B/C)をベイトとした相互作用因子の探索 | 90 |
| 第三項 | VDRが有するポリユビキチン化促進能の解明 | 91 |
| 第二節 | 展望I：VDR複合体の分子機構に関する課題 | 93 |
| 第一項 | 複合体としてのBEND3の機能 | 93 |
| 第二項 | 複合体におけるVDRの特異性 | 93 |

| | |
|---|-----|
| 第三節 展望II：ビタミンDの機能におけるVDRによるユビキチン化修飾の意義 | 95 |
| 第一項 ユビキチン付加反応を介したVDRリガンドの生理作用および病理作用の解明 | 95 |
| 第二項 MYSM1に対するユビキチン付加活性の意義 | 96 |
| 第三項 VDRユビキチン付加活性の新たな活性化機構および基質の探索 | 97 |
| 第四節 総括 | 98 |
| 参考文献 | 105 |
| 謝辞 | 110 |

論文の概要

【序論】

脂溶性ビタミン等の脂溶性低分子化合物は、幅広い高次生命現象において極めて重要な役割を担う。これらの生理作用の多くは、リガンド依存的な転写因子である核内受容体群を介して発揮される。ビタミン D はカルシウム代謝調節因子群の 1 つとして古くから知られる脂溶性ビタミンである。カルシウム代謝以外にも、細胞分化・増殖の制御や免疫調節作用等、ビタミン D 標的組織特異的な生理作用を有する。これら作用の多くは核内受容体群の 1 つ、ビタミン D 受容体(VDR)による転写制御を介することが明らかにされており、VDR の転写共役因子群が同定されてきた。一方で、小腸におけるカルシウム吸収に代表されるような、ビタミン D 刺激後数分から 1 時間程度で起こる急速な応答(rapid response)や、組織特異的な生理作用の分子機構については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、生化学的手法を用いて VDR の新規複合体構成因子を同定することにより、未だ解明されていないビタミン D の分子作用機構を明らかにすることを目的にした。

生体内におけるタンパク質の標的特異的な制御機構については、量的および質的な制御の両者が考えられる。例えば、転写因子である VDR はリガンド依存的に転写を制御することで、標的蛋白質の発現量を調節する、量的制御を行う。これに対し、翻訳後修飾関連酵素群との相互作用により標的蛋白質の修飾状態を変化させ、その機能を調節する質的制御を行うことも知られている。そこで、量的、質的の両面から機能制御を行い得るユビキチン・プロテアソーム系に着目した。ユビキチン付加反応は、その種類により、標的タンパク質の分解を促す量的制御を行う他、局在変化や構造変化による質的制御も行う。ユビキチン・プロテアソーム系関連因子が自己ユビキチン化活性を有することに着想して検討を行い、これまでに VDR 複合体が自己ユビキチン化活性を有することを見出していた。そこで、この新規活性を指標に、VDR 新規相互作用因子の取得および、ビタミン D 生理作用における機能の解明を試みた。

【結果】

1. VDR 新規相互作用因子 BEND3 は VDR の転写活性化能を促進する。

これまでの研究において、VDR の複合体をそのユビキチン化活性で分画し、活性の異なる複合体群を取得していた。活性の強い画分より得られた機能未知タンパク質 BEND3 (BEN-domain containing protein 3)について、VDR の機能における影響を検討した。

VDR の既知機能である転写活性化について、レポーターアッセイおよび、内在性標的遺伝子発現量の定量的 PCR により検討を行った。この結果、BEND3 が VDR のリガンド依存的な転写活性化能を促進することを見出した。BEND3 は機能未知ドメインより構成され、分子機能が

不明である。これを明らかにすべく、ビタミン D 応答性細胞であるヒト大腸がん由来 HT-29 細胞を用いて内在性 BEND3 の複合体構成因子同定を試みた。この結果、BEND3 はリガンドの存在に依らず、Splicing factor 3B サブユニットに代表される、RNA プロセッシング関連因子群と複合体を構成することが明らかとなった。

2. VDR 新規相互作用因子 MYSM1 は VDR の転写活性化能を促進する。

これまで VDR 転写共役因子として同定されてきた物の多くは、VDR の C 末側にあるリガンド結合ドメインを用いた精製により取得されてきた。今回、VDR の DNA 結合ドメインを含む N 末側(A/B/C)が複合体構成依存的に自己ユビキチン化活性を発揮することを見出した。よって、GST 融合 VDR(A/B/C)を用いたアフィニティー精製を行い、VDR 新規相互作用因子の同定を試みた。この結果、H2A 脱ユビキチン化酵素である MYSM1 (myb-like, SWIRM and MPN domains 1)を同定した。MYSM1 は VDR と同じく核内受容体スーパーファミリーに属するアンドロゲン受容体の転写共役因子として報告されていたことから、BEND3 と同様、レポーターアッセイと定量的 PCR により MYSM1 の VDR の転写活性化能における影響を検討した。この結果、MYSM1 が VDR のリガンド依存的な転写活性化能を促進することを見出した。MYSM1 は核内受容体リガンド結合ドメイン相互作用モチーフである LXXLL モチーフを有することから、VDR とのリガンド依存的な結合が予想されたが、検討した結果リガンド非依存的に相互作用することが明らかとなった。この結果より、既知転写共役因子群の様なりガンド依存的なリクルートメント以外の制御を受ける可能性も考えられた。

3. MYSM1 はリガンド依存的な VDR ユビキチンリガーゼ活性の基質である可能性がある。

これまで VDR のユビキチン化活性における基質が明らかではなかったため、VDR 自身の検出による自己ユビキチン化活性を指標としていた。VDR の自己ユビキチン化活性については複合体依存性が見られたものの、VDR のリガンド依存性を検出するには至っていなかった。ユビキチン化活性がユビキチンタンパク質に対するユビキチン付加反応であることから、ユビキチンそのものを基質として考え、ユビキチン鎖の検出を行うことで、ユビキチン鎖の伸長を指標にユビキチン化活性を評価できると考えた。

そこで、リガンド処理を行った FLAG-VDR 免疫沈降産物を用い、既知 E3 酵素やリガンド非処理の FLAG-VDR 免疫沈降産物との活性を比較した。この結果、FLAG-VDR はリガンド依存的に、既知 E3 と同程度のポリユビキチン鎖伸長作用を有することを見出した。この結果は、GST 融合 VDR を用いた場合も同様であった。つまり、この方法によって、初めて VDR のユビキチン化活性がリガンド依存的に発揮されることを見出した。

続いて、先に VDR 複合体精製により同定した MYSM1 について、VDR ユビキチン化活性の

基質であるか否か検討を行った。細胞に FLAG-MYSM1 を発現させ取得した FLAG-MYSM1 免疫沈降物に対して、GST タンパク質或いは GST-VDR タンパク質を加えてユビキチン化アッセイを行った。この結果、リガンド処理を行った GST-VDR を加えた場合でのみ、MYSM1 のポリユビキチン化を検出した。この結果は、MYSM1 の脱ユビキチン化活性酵素変異体を用いた場合でも同様であった。

VDR のユビキチン化活性の活性中心を明らかにするために、LC-MS/MS および、修飾解析ソフト MODIRO を用いて VDR のユビキチン化サイトの同定を試みた。この結果、VDR の DNA 結合ドメイン内に存在するシステインを候補サイトとして同定した。この変異体を用いてリガンド処理下で MYSM1 のユビキチン化アッセイを行ったところ、VDR wild type と比べて MYSM1 のユビキチン化が減少した。この結果より、VDR のシステインがユビキチン付加反応の活性中心である可能性が考えられた。

MYSM1 がユビキチン化される意義について検討するために、MYSM1 についてもユビキチン化サイトの同定を試みた。過剰発現させた FLAG-MYSM1 について、リガンド依存的なユビキチン化は検出できなかったものの、ユビキチン化候補サイトを二ヶ所同定した。一ヶ所目は MYSM1 の脱ユビキチン化活性中心である MPN ドメイン内 JAMM モチーフ近傍、二ヶ所目はクロマチン関連ドメインである SWIRM ドメイン内であった。いずれの場所もユビキチン化により MYSM1 の機能を制御する可能性が考えられた。

【総括と展望】

本研究では、ビタミン D の分子作用機構を明らかにするべく、VDR の新規機能に着目した。VDR の自己ユビキチン化活性を指標とした複合体の分画により取得した因子、BEND3 および MYSM1 について、VDR の転写制御能に関与することを見出した。更に MYSM1 に関しては、VDR のユビキチン付加活性の基質である可能性が示唆された。

VDR の自己ユビキチン化活性を指標とすることで、これまでの取得されることのなかった因子を同定することが出来た。特に、この活性がリガンド依存的核内受容体群内では VDR 特異的なものであることから、VDR 特有の相互作用因子、特にビタミン D 刺激においてみられる rapid response や、生理作用の組織特異性に寄与する因子を取得できる可能性が高いと考える。今後、更なる解析により、BEND3 や MYSM1 がビタミン D の生理作用にどのように寄与するのかを検討する必要がある。

今回、VDR の DNA 結合ドメイン内のシステインにおいてユビキチン化を同定した。システインにおけるユビキチン化は、E1、E2、および HECT 型 E3 酵素群特有の結合であり、酵素活性があることが示唆される重要な結果であると考えられる。一方で、このシステインは VDR が DNA に結合する zinc-finger を構成するために不可欠なものであることから、このシステインがユビ

キチン化された VDR については DNA 結合能の欠落或いは減弱が予想され、VDR のユビキチン化活性と転写活性は同時に発揮できないと推測する。よって、VDR が有するこれら機能に関しては何らかの切り替え機構が存在すると思われる。更なる解析により、VDR の転写制御とユビキチン付加反応の関連性を明らかにできれば、ビタミン D の分子作用機構に新たな作用経路を提案できると考える。

略語一覽

AF-1/2: activation function-1/2

AhR: Aryl hydrocarbon receptor

APC/C: anaphase-promoting complex/ cyclosome

AR: androgen receptor

bHLH: basic helix loop helix

CUL: Cullin

D₃: 1 α 25(OH)₂D₃

DBD: DNA binding domain

DDB: Damaged-DNA binding protein

E1: ubiquitin activating enzyme

E2: ubiquitin conjugating enzyme

E3: ubiquitin-protein ligase

E6-AP: E6-associated protein

ER: Estrogen receptor

HECT: homologous to E6AP carboxyl terminus

LBD: ligand binding domain

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

Nedd4: neural precursor cell expressed developmental down-regulated gene 4

PAS: Per-Arnt-Sim

PCAF: p300/CBP associated factor

PI3: phosphoinositide 3-kinase

PKC: protein kinase C

PXR: Pregnane X receptor

RAR: Retinoic acid receptor

RING: really interesting new gene

RNAP II : RNA polymerase II

RXR: Retinoid X receptor

SCF: Skp1-Cul1-F-box protein

SUG1: suppressor for Gal1

SXR: steroid and xenobiotic receptor

TR: thyroid hormone receptor

Ub: ubiquitin

UbcH: ubiquitin-conjugating enzyme H

VDR: vitamin D receptor

VDRE: vitamin D receptor response element

WT: wild type

第一章 序論

第一節 緒言

ビタミン D は、カルシウム代謝調節因子として、主に小腸、腎臓、骨組織において生理作用を発揮する。加えて、細胞分化・増殖に関する作用が広範な組織において報告されている。

このようなビタミン D の作用は、ビタミン D 受容体(VDR)の転写機能を介した経路により発揮されることが知られている。しかしながら、ビタミン D の作用の中には極めて短い時間で応答が起こる rapid response が存在し、これらは VDR の転写制御能だけでは説明できない。VDR の分子機能については転写以外に知られておらず、このような作用経路の実体については未だ解明されていない。

ユビキチン・プロテアソーム系は標的タンパク質選択的なタンパク質分解システムである。基質特異性を担うのはユビキチンリガーゼ(E3)であり、一般に、基質認識能や酵素活性を有するサブユニット群から成る複合体として機能する事が知られている。VDR の新たな分子機能の候補として、タンパク質分解制御機構に着目した。これまでに核内受容体の相互作用因子として、プロテアソームのサブユニットや E3 が報告されており、ユビキチン経路が核内受容体の機能に関わっている可能性が示唆されている。このことから、VDR の転写制御以外の分子機能として、VDR がユビキチン・プロテアソーム経路の一端を制御する可能性を検討することとした。これまでの研究により、VDR が自己ユビキチン化活性を有することが明らかとなった。また VDR 複合体の分画により、自己ユビキチン化活性の強い複合体を濃縮することが可能であった。

序論では、まずビタミン D の生理作用及び VDR の生理作用機序について、次に転写因子がユビキチンリガーゼ活性を有する可能性について概説する。以上を踏まえて、E3 ユビキチンリガーゼとしての VDR の分子機構の解明を試みる本研究の目的について述べる。

第二節 ビタミン D の生理作用

ビタミン D は脂溶性ビタミンの 1 つである。その生理作用についてはカルシウム代謝の調節制御の他にも、主に培養細胞を用いた解析により、細胞増殖・分化制御、免疫応答制御など多岐に渡ることが明らかとなってきた(Figure 1-1 A)¹⁻³。特にカルシウム代謝調節に関しては、不足によりくる病を招くなど、代替不可能な役割を有している。そこで本節ではカルシウム代謝の観点から、ビタミン D の生理作用について概説する。

第一項 ビタミン D の種類・産生

ビタミン D には側鎖の違いにより、ビタミン D₂ から D₇ が存在する。特に活性が高く、自然界に多く存在するのが D₂ および D₃ である。D₂ の多くは食物(シイタケ)、サプリメントなど外因性の物に由来し、D₃ は紫外線を浴びることにより皮膚で合成される内因性の物が主流である。最も強力な活性本体は 1α,25(OH)₂D₃ である(Figure 1-1 B)。1α,25(OH)₂D₃ 合成の第一ステップは紫外線および熱によるビタミン D 前駆体からビタミン D₃ への変換であり、この反応は補酵素などの生物学的反応は関与しない、物理化学的な反応である。この後、ビタミン D₃ は数段階の水酸化を受けて活性型へと生合成される。この整合性の制御を担うのが 25 水酸化酵素、1α-水酸化酵素(CYP27A1)および 24 水酸化酵素(CYP27B1)である(Figure 1-1 C)。活性型ビタミン D₃ はそうでないものと比べて非常に強い活性を有するために、その血中濃度は一定値をとるように厳密に制御されている。特に、腎臓における 1α-水酸化酵素と 24 水酸化酵素は、活性型ビタミン D₃ 産生の最終段階を厳密に制御する鍵酵素である⁴。

第二項 ビタミン D の生理作用

ビタミン D の主たる作用は、カルシウム代謝調節作用と細胞の増殖・分化制御作用の 2 つに大別される(Fig. 1-1 A)。カルシウム代謝調節因子としてのビタミン D の標的組織は、小腸、骨、腎臓、副甲状腺の 4 つである。ビタミン D が副甲状腺における別の代表的カルシウム代謝調節因子、副甲状腺ホルモン(PTH)と共に血中カルシウム濃度を一定に維持する作用機序を以下に述べる(Figure 1-1 D)。血清カルシウム濃度が低下すると、PTH の分泌が速やかに促進される。PTH は骨吸収を促進すると共に、活性型ビタミン D の産生を促進する。活性型ビタミン D は腸管からのカルシウム吸収を促進すると共に、PTH と協調的に遠位尿細管からのカルシウム再吸収を促進する。このように、PTH は比較的急速な骨からのカルシウム動員、腎遠位尿細管からのカルシウム再吸収等により短期的かつ選択的なカルシウム濃度上昇作用を有する一方で、活性型ビタミン

D は主に腸管に対する作用による長期的なカルシウムのバランスを制御する^{1,3,5}。一方、ビタミン D の分化誘導作用については、骨髄細胞のマクロファージへの分化²、リンパ球⁶や皮膚表皮細胞⁷、小腸上皮細胞の増殖・分化制御⁸、腫瘍細胞の増殖抑制⁹など様々な細胞系での作用が報告されている。これらビタミン D の有するカルシウム代謝調節作用と細胞の増殖・分化制御作用は協調的であり、骨組織や小腸では、ビタミン D が細胞の増殖・分化を制御することでカルシウム代謝を調節していると考えられている。

第三節 ビタミン D 受容体の作用機構

ビタミン D の生理作用は、主にビタミン D 受容体(VDR)を介して発揮されている。VDR は核内受容体スーパーファミリーに属するビタミンD等のリガンド依存的な転写因子であり、60 種以上存在するビタミン D 標的遺伝子の多くは、VDR の転写制御により行われている。以下に、カルシウム代謝制御の観点からビタミン D 及び VDR の生理作用と、その転写制御機構を概説する。

第一項 ビタミン D 受容体の生理作用

ビタミン D の生理作用は、VDR を介して発揮される。ビタミン D をリガンドとする核内受容体は、現在の所 VDR しか知られていない。VDR は古くは腎近位尿細管細胞、小腸上皮細胞、骨芽細胞、副甲状腺主細胞などの古典的なビタミン D 標的器官に見出された。現在では、免疫系細胞、皮膚、骨格筋、膵臓、心筋、下垂体、精巣、卵巣等非常に広範な臓器に分布していることが報告されている¹。しかしながら、VDR の発現とビタミン D 作用の相関が明確でない組織も存在する。

全身 VDR ノックアウトマウスは雌雄共に成体まで成長することから、VDR を介したビタミン D 情報伝達経路は胚発生期の骨形成には必須ではないことが証明されている。しかしながら、離乳時期である 3 週以後、血中カルシウムやリンの低下が認められ、これに起因した顕著な成長障害が見られることから、離乳後のカルシウム恒常性維持機構にビタミン D-VDR が必須であることが示唆されている(Figure 1-2 A)¹⁰。

第二項 ビタミン D 受容体の分子機構

VDR は核内受容体スーパーファミリーに属する。核内受容体タンパク質群は、それぞれの構造と機能の類似性から N 末端より A/B、C、D、E/F の 4 つの機能領域に分けられる(Figure 1-2 B)。核内受容体の転写活性能は A/B 領域と E/F 領域の 2 箇所が担っており、A/B 領域は恒常的転写活性能を有するのに対し、E/F 領域はリガンド依存的な転写促進能を有し、それぞれ Activation Function-1 (以下 AF-1)、Activation Function-2 (AF-2) と呼ばれる。A/B 領域の相同性は低く受容体に固有である。VDR の A/B 領域は 24 アミノ酸から成り、他の受容体と比較すると極めて短い、N 末の 3 アミノ酸を欠失させると VDR の転写活性能が落ちることから、他の受容体と変わらず転写活性能があると考えられている¹¹。E/F 領域は受容体間で保存性が高い。ここにはリガンド結合領域(以下 LBD)が存在し、転写共役因子複合体がリガンド依存的に LBD に結合することで AF-2 活性が促進される。核内受容体の LBD は 12 個の helix 構造から構成されており¹²、リ

ガンドの結合依存的に 12 番目の helix (helix12) がシフトすることでコアアクチベーターとの相互作用表面が形成されることが知られている¹³。VDR の helix12 を欠損させた変異体においては転写活性が失われる¹⁴。C 領域は DNA 結合ドメイン(以下 DBD)を含む領域であり、核内受容体間で高度に保存された 2 つの Zinc Finger を有する。この領域において、VDR は特異的 DNA 配列を認識・結合する。D 領域は蝶番のような役割として考えられ、ヒンジ領域とも呼ばれるが、核移行シグナルとして機能するという報告もある¹⁵。

VDR は標的遺伝子への結合時にレチノイド X 受容体(以下 RXR)とヘテロダイマーを形成する。VDR と同様、RXR とヘテロダイマーを形成する核内受容体として、レチノイン酸受容体(以下 RAR)、甲状腺ホルモン受容体(以下 TR)等が知られている。リガンド結合 VDR は、RXR とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーター上に存在する特異的 DNA 配列、Vitamin D Receptor response element (VDRE)に結合する。VDRE は基本モチーフである AGGTCA が 3 或いは 4 塩基のスペーサーを挟んで直列にリピートした配列である。

第三項 ビタミン D 受容体の遺伝子発現制御機構

VDR による転写制御は、転写共役因子複合体群とのリガンド依存的な複合体形成による。この転写制御において、VDR は転写共役因子複合体群の適切な標的遺伝子上へのリクルートを規定する役割を担っている。つまり、VDR の転写機能は、相互作用する転写共役因子複合体群の性質により調節されると考えられている。

転写共役因子複合体群は転写を促進させるコアアクチベーター複合体群と、転写を抑制するコリプレッサー複合体群とに大別される。VDR はリガンド依存的に転写活性化能・抑制能の両方を発揮する。更に、リガンド未結合の VDR/RXR ヘテロダイマーがコリプレッサーをリクルートした状態で VDRE に結合している場合もあると報告されている(Figure 1-2 C)。

転写共役因子複合体群はその機能の違いにより、クロマチン構造変換を担う複合体群とメディエーター複合体群に大別される(Figure 1-3 A)。これらの複合体群により核内受容体の転写機能は段階的に制御される。まず、前者の複合体群が VDR を介して協調的にプロモーター領域周辺のクロマチン構造の密度を制御する。転写活性化の差異にはクロマチン構造の弛緩を担う因子群が相互作用する。これにより、後者の複合体群による基本転写装置のプロモーター上へのリクルートが可能となり、転写反応が開始される。転写抑制の際には、クロマチン構造の凝縮を担う因子群が相互作用する。

前者の複合体群は、ヒストン修飾酵素複合体群と、クロマチン構造変換因子複合体群

に分類される(Figure 1-3 B)。ヒストン修飾酵素複合体は、ヒストンへの化学修飾の付加あるいは除去を担う複合体である。ヒストンの化学修飾は N 末端領域に多く見られ、アミノ酸残基特異的なアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化等が知られている。ヒストンには多様な組合せの修飾がなされる。この組合せは”ヒストンコード”と呼ばれ、転写を始めとする核内イベントを担う因子群の認識コードとして機能している。VDR と相互作用するヒストン修飾酵素群としては、ヒストンアセチル化酵素(HAT)複合体である CBP/p300 複合体や、SRC-1 (NCoA-1)複合体等が知られている¹⁶。HAT 以外にコアクチベーターとして VDR と相互作用するヒストン修飾酵素群は現段階では同定されていない。

一方クロマチン構造変換因子複合体群は、ヌクレオソーム配列の再構成を担う複合体である。活性の中心となるクロマチン構造変換因子は DNA 依存性 ATPase ドメインを有しており、ATP 依存的にヌクレオソーム配列の伸縮反応を行う。クロマチン構造変換因子が有する ATPase ドメインの種類により、SWI/SNF 型、ISWI 型、NuRD 型複合体等に分類できる。核内受容体の転写共役因子として、SWI/SNF 型及び ISWI 型はコアクチベーター、コリプレッサーの両方、NuRD 型はコリプレッサーの機能を有すると考えられている。なお、NuRD 型複合体はクロマチン構造変換活性だけでなく、HDAC 活性を有する。VDR は、SWI/SNF 型クロマチン構造変換複合体である PBAF 複合体の構成因子である BAF60a、BAF180 と相互作用することが知られている¹⁷。

このように、VDR はコアクチベーターと複数の複合体を形成することが明らかとなっている。一方で、ビタミン D の多様な生理作用を鑑みると、未解明の分子作用が推測される。例えば、ケラチノサイトにおいては、分化の前後で VDR 複合体の構成因子が DRIP/TRAP を中心としたメディエーター複合体から、HAT 活性を有する SRC-p160 複合体へと変化することが明らかになっている¹⁸。このように、転写制御の観点からも、細胞の分化状態や組織の違いにおいて、特異性のある複合体の使い分けが行われていると考えられる。

第四項 ビタミン D 受容体の転写以外の経路によるビタミン D 作用機構

以上のような VDR の転写制御能を介した作用に対して、ビタミン D は異なる作用機序を有することが分かっている¹⁹。例としては、腸管でのカルシウムの取り込み促進が挙げられ、秒・分単位の応答を示すことが知られている²⁰。このような即応的な作用については、通常数時間から数日を要する転写制御機構のみでは説明できない。このような rapid response の例としては他に、骨芽細胞における電位開口型のカルシウムイオン、塩化物イオンチャネルの制御、軟骨や上皮細胞における PKC、PI3 キナーゼの活性化、

膵臓におけるインスリン分泌制御、白血病細胞の細胞分化に関わる MAPK の活性化等が挙げられる(Figure 1-4 A)²¹。ビタミン D による機能については、これまでに、大きく分けて以下の 2 説が述べられている¹⁹。

1 つ目に、細胞膜上に存在するレセプターがビタミン D の機能を介すると報告されている。これまでに、ビタミン D が高濃度で結合する画分がニワトリ小腸の細胞膜において見出された²²。発見された膜画分へのビタミン D 結合率はビタミン D 濃度依存的であり、ビタミン D 結合率依存的にカルシウム輸送が惹起されることの 2 点から、ビタミン D の作用を仲介する機構が膜画分に存在することが示唆された。しかしながら、現在のところ、ビタミン D を受容する膜タンパク質は同定されていない。

2 つ目に、VDR がビタミン D の全ての作用を仲介するという報告がある。これは、VDR ノックアウトマウスの解析から、骨芽細胞におけるカルシウムイオンチャネルを介したカルシウム輸送、塩化物イオンの輸送による膜電位の変動といったビタミン D 依存的な急速な作用は VDR を必要とすると結論されている²³。

以上の 2 つの報告より、ビタミン D の急速な作用が VDR 以外の膜レセプターを介する可能性と、VDR を介する可能性の両者が推測される(Figure 1-4 B)。また一方で、VDR と同様に核内受容体スーパーファミリーの 1 つである ER は細胞膜内側に存在するチロシンキナーゼレセプターまたは、G-タンパク質共役レセプターを結合することが知られている²⁴。従って、ER が有するようなモデルによって、VDR が膜上に存在する可能性も考えられる。

このように、ビタミン D の作用機序については、未だ検討の余地が多く残されている。これまで、VDR ノックアウトマウスを用いた解析により、ビタミン D の生理作用のほとんどが VDR に介されると考えられてきた¹⁰。しかし、ビタミン D の急速な作用については、VDR を介する分子メカニズムが解析されていない。これらを踏まえると、現在の最大の課題は、VDR において転写制御以外の分子機能が見出されていないことである。この課題の解明を試みることで、ビタミン D の転写以外の作用を仲介するレセプターの本体の有無、リガンドに対する長期的あるいは即応的な作用における分子機序の相互関係などの疑問を明らかにできる可能性があると考えられる。

第四節 ユビキチン・プロテアソーム経路

前節に述べたように、ビタミン D の生理作用の多くは VDR を介した転写制御により発揮されるものの、rapid response を引き起こす経路については未解明である。転写制御以外のシグナル伝達経路の 1 つとしてユビキチン・プロテアソーム系が挙げられる。本節では、VDR がユビキチン・プロテアソーム系を制御することで、ビタミン D の即応的な作用を介する可能性について概説する。

第一項 ユビキチン・プロテアソーム系について

ユビキチン・プロテアソーム系は標的タンパク特異的なタンパク質分解を担う制御機構である²⁵。ユビキチンは分子量 8 kDa の低分子タンパクであり、標的タンパクのリジン残基を介して共有結合することにより、標的タンパクを修飾する。標的タンパク質に付加されたポリユビキチン鎖の形状により、標的タンパクの運命が異なることが明らかにされつつある。ユビキチンの 48 番目のリジンを介したポリユビキチン鎖は、26S プロテアソームの識別シグナルとなる。このようにしてユビキチン化されたタンパク質のみが 26S プロテアソームにより選択的に分解され、ユビキチンは標的タンパク質から取り除かれ再利用される²⁶。対して、ユビキチンの 63 番目のリジンを介したポリユビキチン鎖は、タンパク質結合ドメインとして機能し、シグナル伝達や DNA 修復に関与する。また、モノユビキチン化はタンパク質の局在シグナル、内在化シグナルとして機能する事も知られている。

ユビキチン修飾系は、ユビキチン活性化酵素(以下 E1)、ユビキチン結合酵素(以下 E2)、ユビキチン転移酵素(ユビキチンリガーゼ)(E3)という一連の酵素群のカスケードにより行われる^{25,27}。まず、E1 酵素が ATP 依存的にユビキチンを共有結合し、これを E2 に受け渡す。ユビキチンリガーゼ(E3)は E2 による基質への付加反応の触媒として機能するものと、E2 よりユビキチンを受け取り、自身で基質にユビキチンを付加するものが存在する。このユビキチンリガーゼの機能の違いは、活性を担うドメインの機能の違いに起因する。前者は、RING フィンガーまたは RING フィンガー類似構造である U-box を有するユビキチンリガーゼであり²⁸、後者は HECT ドメインを有するユビキチンリガーゼである²⁹。

第二項 ユビキチンリガーゼの多様性

現在、哺乳類において E1 は 1 個、E2 は数 10 個のオーダーであるが、E3 は 1000 種類以上存在し、基質特異性は E3 により規定されると考えられている。前述した様に、

E3はその有するドメイン機能により二種類に大別される。

RING型ユビキチンリガーゼは単体で機能するものと複合体で機能するものに大別される。単体で機能するユビキチンリガーゼは、RINGフィンガードメインに結合したE2酵素から、基質認識領域で結合した標的タンパク質へのユビキチンの転移を促進する³⁰。約500種類ほど存在すると考えられており、代表的なものとしては、p53を標的とするMdm2や、自身を標的とするBRCA1等が知られている³¹。複合体を形成して働くものとしては、構成因子ごとにその機能が特化している³²。この複合体は主に、E2酵素をリクルートするRINGフィンガータンパク質、複合体の構築を担うプラットフォームタンパク質、基質特異性を担う基質識別タンパク質及びプラットフォームタンパクと基質識別タンパクの仲介タンパク質の4つのサブユニットから構成されている。代表的なものとして、SCF複合体やAPC/C複合体が知られており、哺乳類では数百は存在すると考えられている³³。U-boxはRINGフィンガーと相同性が極めて高いドメイン構造を有している。

HECT型ユビキチンリガーゼは哺乳類では約60種類あると考えられている。HECT型ユビキチンリガーゼは、HECTドメインに結合したE2からユビキチンを自らのシステイン残基にチオエステル結合した後に、標的蛋白質のリジン残基に結合させる³⁴。その代表的な因子としては、E6-APタンパクが知られている³⁵。HECT型ユビキチンリガーゼは主に単体で機能すると考えられている。

更に、これら2種のユビキチンリガーゼの他に、p300、PCAFなどに代表される、共通ドメインを有さない非典型的ユビキチンリガーゼが報告されている³⁶。これらは、分解の標的基質は不明であるが、自己E3活性を検出する事によりユビキチンリガーゼであると証明されたものである。さらにDDB2のように、DDB1-CUL4複合体の基質認識サブユニットとして機能しながらも、自己ユビキチン化を受け分解されるという、ユビキチンリガーゼでありながら自身が基質でもあるという例も知られている³⁷。以上のように、ユビキチン修飾系の主要分子であるユビキチンリガーゼが多様性を有する事が明らかとなりつつあり、自己E3活性の検出が、ユビキチンリガーゼであることの1つの指標として捉えられている。

第三項 転写因子とタンパク質分解機構の関連性

核内受容体の相互作用因子のスクリーニングから、プロテアソームのサブユニット³⁸やユビキチンリガーゼ³⁹、E2酵素⁴⁰といった因子が取得されたという報告を始め、ユビキチン・プロテアソーム系が転写制御に関わっている可能性がこれまでに多く報告されている。転写制御におけるユビキチン・プロテアソーム系の意義については不明な点

が多いものの、主に(1)転写制御因子の活性化後の分解とサイクル形成、(2)転写抑制因子の分解による転写活性化の開始、の2つの段階で転写制御過程に関わっていると考えられる。

(1)に関しては、これまでに様々な核内受容体がリガンド依存的に分解されることが明らかとなった。これまでに ER、PR、GR、TR、RAR、PPAR について、リガンド依存的にユビキチン化が亢進し、プロテアソームにより分解を受けることが示された^{41,42,43}。更に核内受容体以外にも、CBP などのコアクチベーターや、RNA Pol II なども転写活性化に伴いユビキチン化依存的な分解を受けることが示されている。

(2)に関しては、これまでに転写制御を担う転写抑制因子複合体がプロテアソーム依存的な分解を受けることが報告されている⁴⁴。この報告によれば、TBL1、TBL1XR1 は転写活性化時に NCoR の分解を促進する。これにより、転写抑制因子複合体をプロモーター上から解離させることで転写活性化を促進する分子機構が提示された。

また、これら以外の知見として、bHLH/PAS 型転写因子であるダイオキシン受容体(以下 AhR)⁴⁵ がリガンド依存的な E3 活性を有するという事が報告された⁴⁶。以前から、ダイオキシン類が男性ホルモン・女性ホルモン作用を攪乱する事は報告されていたが、そのメカニズムは不明であった⁴⁷。また、リガンド結合により活性化したエストロゲン受容体(以下 ER α)、アンドロゲン受容体(以下 AR)に対する AhR の抑制効果は、転写レベルでは説明がつかず、転写制御を介さない未知の機構の存在が示唆されていた。そこで、リガンド結合 ER α 、AR に対する AhR の抑制効果についてその分子作用機構を検討したところ、転写因子である AhR がリガンド依存的な E3 ユビキチンリガーゼ活性を有した。リガンドによる AhR の活性化は ER α 、AR の mRNA 量を変化させることなくタンパク質量を減少させる事、このタンパク質減少は 26S プロテアソームを介する事が明らかとなった。AhR は CUL4B を含む E3 ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニットとして機能しており、タンパク質分解を直接制御した。これまでリガンド依存的な転写制御系が知られていたのに対し、ユビキチン化の制御機構としては一般的に基質のリン酸化等の翻訳後修飾が代表的であった。AhR が E3 ユビキチンリガーゼ活性を有することは、転写因子がユビキチンリガーゼとして転写制御系とタンパク質分解系の両者において標的特異性の決定に関わる初めての事例であり、脂溶性リガンドがユビキチンリガーゼを直接制御する新規シグナル伝達経路をも明らかにしたものである。

核内に存在する転写因子が転写のみならずタンパク質分解をも制御する事が発見された事により、核内受容体が担う生理作用の一部が、特異的タンパク質分解という新たなリガンドシグナル伝達機構を介して発揮される可能性が考えられた。そこで、AhR と同じくリガンド依存性転写制御因子である核内受容体群が、同様に E3 ユビキチンリガ

ーゼ複合体としてリガンド情報の伝達に関与している可能性が考えられた。

これまでの研究において、リガンド依存的な核内受容体群について、それぞれの自己ユビキチン化活性の検討を行ったところ、VDR の免疫沈降産物が自己ユビキチン化活性を有することが明らかとなり、ユビキチンリガーゼとして機能することが示唆された。そこで、VDR がユビキチン化活性を発揮することで、これまでに分子機構が不明であったビタミン D の生理作用を仲介する可能性が考えられた。

第五節 本研究の目的

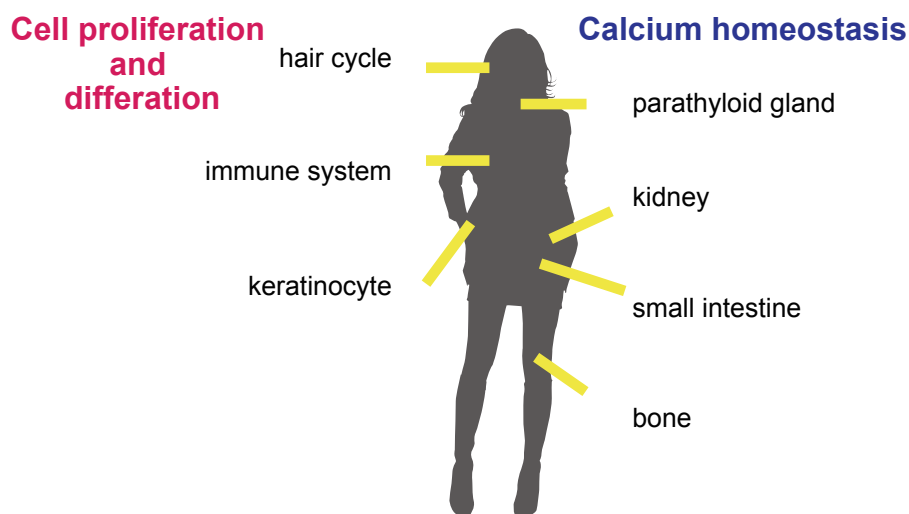
ビタミン D の生理作用は多岐にわたり、その多くが VDR の転写制御能を介して発揮することが明らかとなっている。しかしビタミン D の多様な生理作用に伴う複合体群の使い分けをはじめとする分子機構や、rapid response を引き起こす経路の実体は、未だ不明である。

これまでの研究において、VDR を含む一部の核内受容体の免疫沈降産物が自己ユビキチン化活性を有することが明らかとなった。この結果から、VDR の E3 ユビキチンリガーゼとしての機能が、ビタミン D の作用経路と関与することが推測された。VDR は E3 ユビキチンリガーゼの既知ドメインである RING フィンガーや HECT ドメインは有さないものの、複合体を形成して E3 活性を発揮する可能性や、E2 酵素との直接的な相互作用により、単体で非典型 E3 ユビキチンリガーゼとして機能する可能性がある。

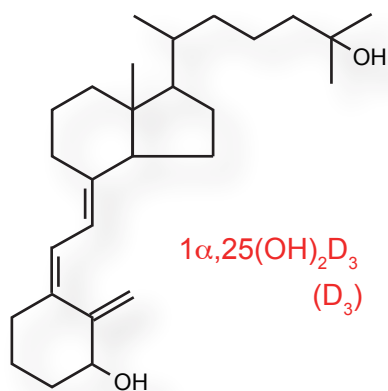
そこで本研究では、VDR の自己ユビキチン化活性を指標とした新規相互作用因子の同定を試み、ビタミン D の新たな作用機構の一端の解明を目的とした。更に、VDR の有する E3 ユビキチンリガーゼとしての分子機構の解明を試みた。

A

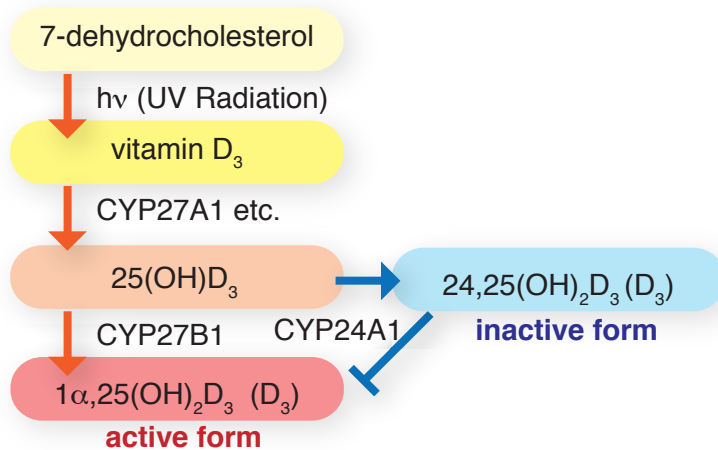
Main target tissues of Vitamin D



B



C



D

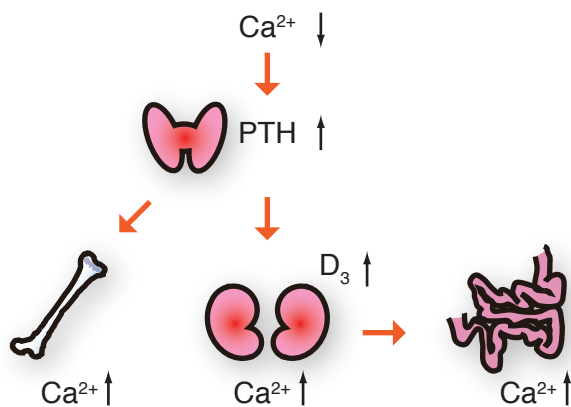


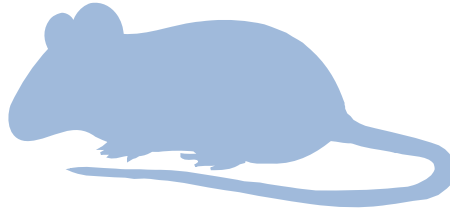
Figure 1-1 ビタミン D の生理作用

(A) ビタミン D の主な生理作用はカルシウム代謝と細胞増殖・分化に大別され、生体内各組織を標的とする。(B) $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (D_3) の構造：ビタミン D 代謝産物の中で最も強い生理活性を有する。(C) D_3 の生合成経路。(D) 血中カルシウム低下時のカルシウム吸収促進機構。血中カルシウム濃度の低下に伴い分泌される副甲状腺ホルモン (PTH) の作用により、 D_3 が合成される。

A

Cell proliferation / differentiation

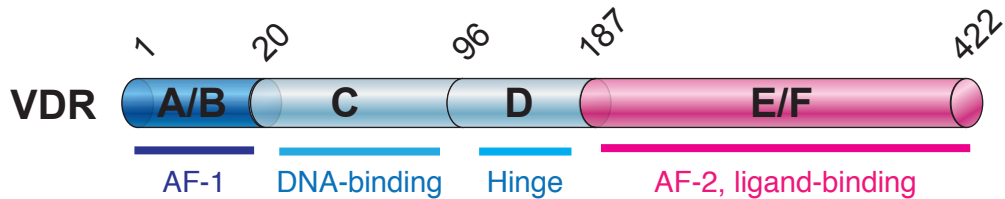
infertile
alopecia
accelerated mammary gland
muscle weakness



Calcium homeostasis

growth retardation
disrupted mineral homeostasis
skeletal defects

B



C

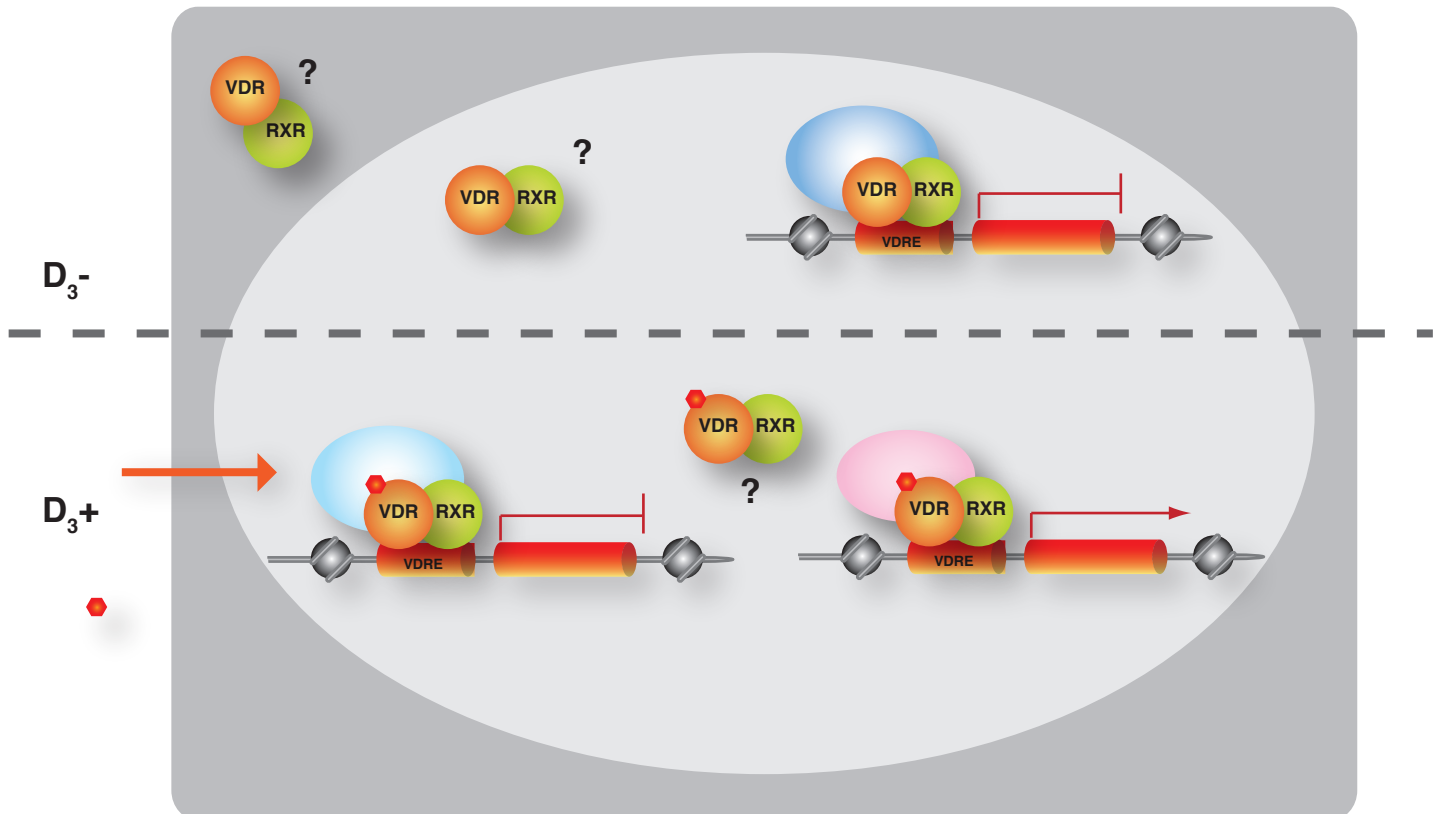
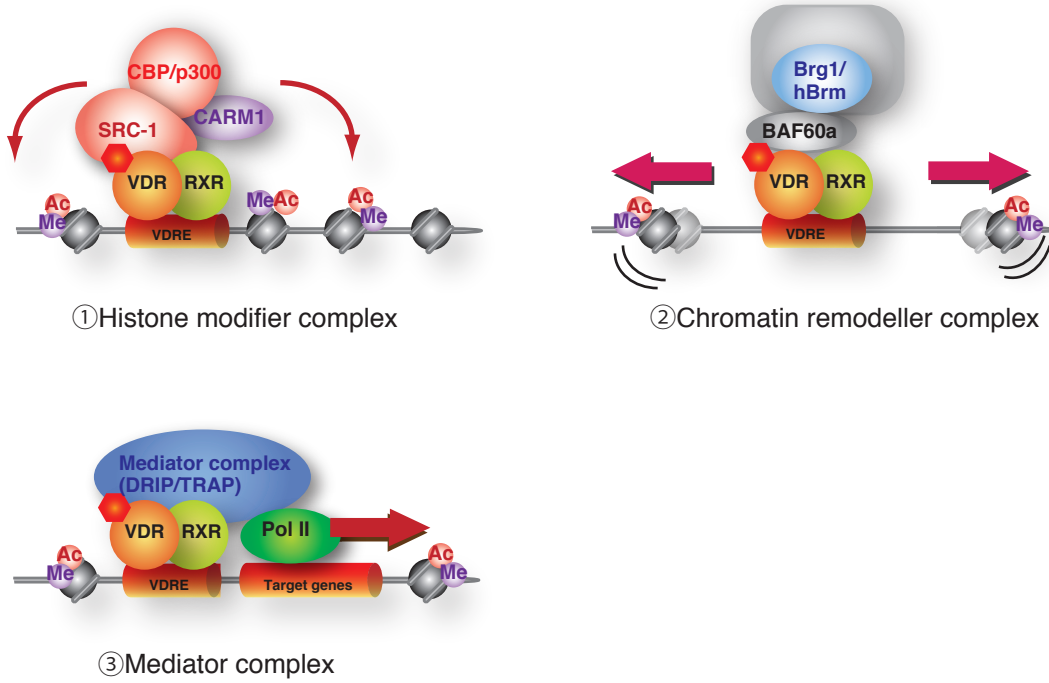


Figure 1-2 ビタミン D 受容体 (VDR) の生理作用及び分子作用機構

(A) VDR ノックアウトマウスの表現型。D₃ の作用が補完されないため、細胞の分化不全や低カルシウム血症に起因する表現型が見られる。(B) VDR のドメイン構造：N 末端側から、リガンド非依存的な転写活性 (AF-1) を有する A/B 領域、DNA 結合を担う C 領域、核移行に関連する D 領域、リガンド依存的な転写活性 (AF-2) を有する E/F 領域からなる。数字はアミノ酸番号を示す。(C) D₃ の有無による VDR の細胞内での局在と分子作用機構。リガンド非存在下では細胞質に局在するともいわれている。常に RXR と二量体を構成するか否かもわかっていない。

A



B

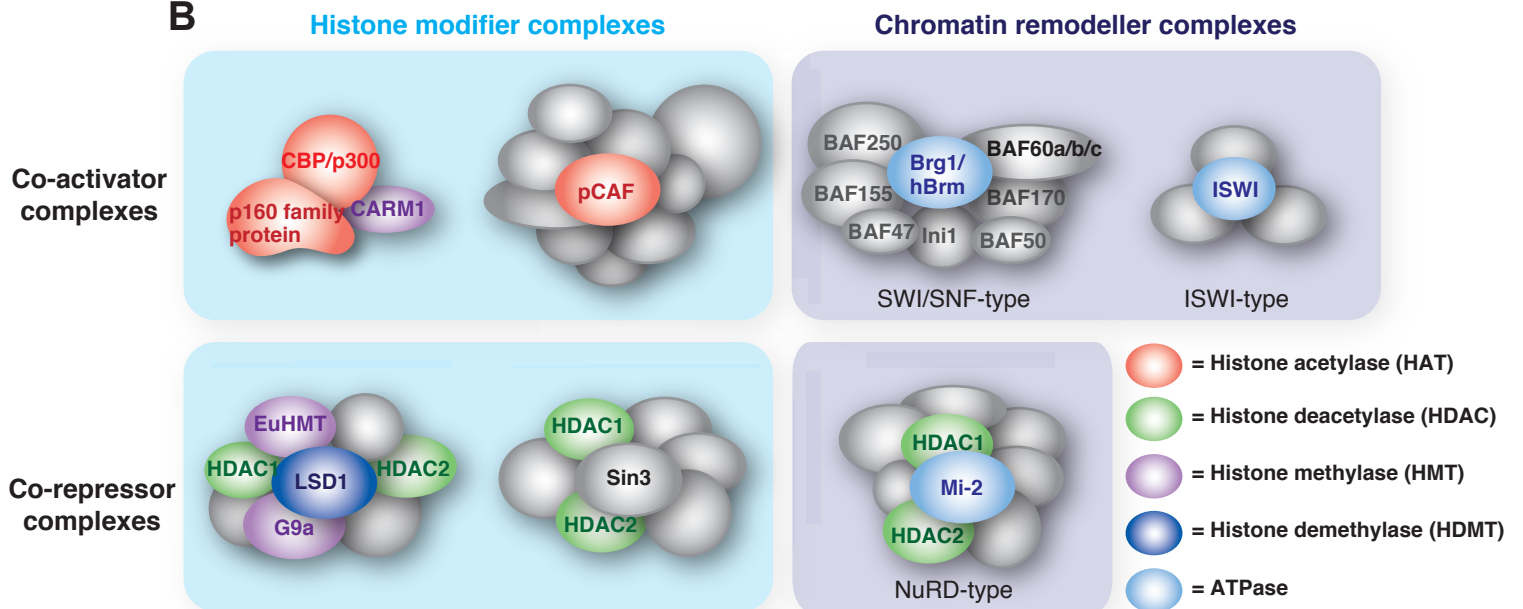


Figure 1-3 転写共役因子群を介した転写制御機構

(A) 転写共役因子複合体群を介したビタミン D 依存的な VDR の転写活性化機構。①まず、HAT 複合体や HMT 複合体等のヒストン修飾酵素複合体群が、標的遺伝子付近のヒストンを修飾する。②ヒストン修飾を認識して、クロマチン構造変換因子複合体群がリクルートされる、これにより、プロモーター周辺のクロマチン構造が弛緩される。③メディエーター複合体が基本転写装置をプロモーター上にリクルートして、標的遺伝子の発現が誘導される。(B) 主要な転写共役因子複合体の種類。上段：コアクチベーター複合体、下段：コリプレッサー複合体、左列：ヒストン修飾酵素複合体、右列：クロマチン構造変換複合体。

A Rapid responses mediated by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

| Organ, cell, or system | Response studied |
|--------------------------|---|
| Intestine | Rapid transport of intestinal calcium PKC activation |
| Colon | PKC activation |
| Osteoblasts | Ca^{2+} channel opening Cl^- channel opening |
| Parathyroid cells | Phospholipid metabolism |
| Keratinocytes | Alteration of PKC subcellular distribution |
| Pancreatic β cells | Ca^{2+} signaling Insulin secretion |

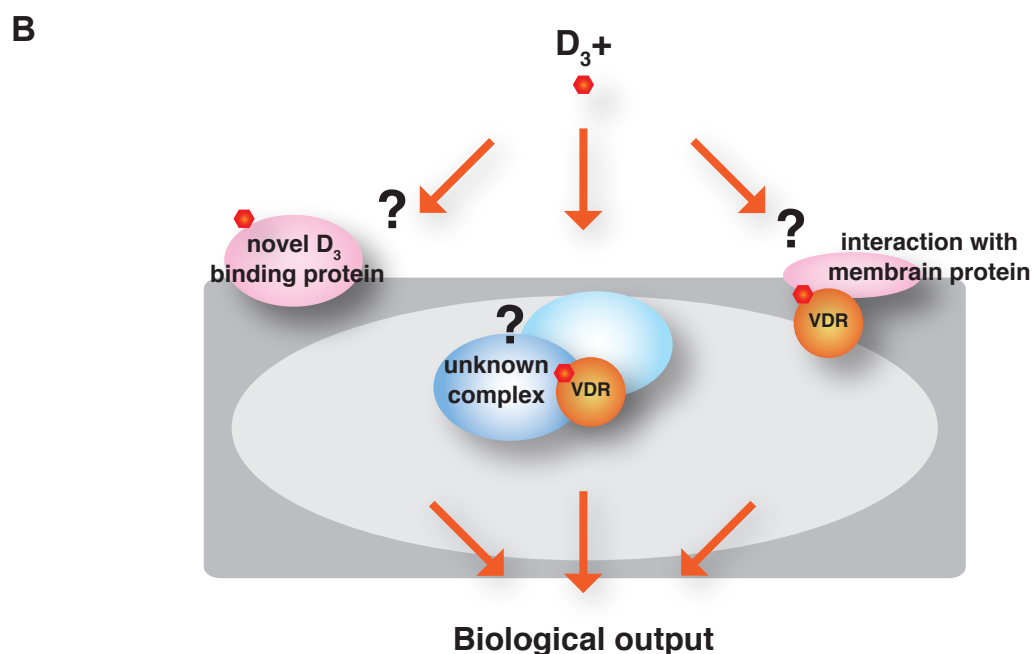


Figure 1-4 転写以外のビタミン D 作用機構

(A) ビタミン D に対する即答的な応答 (rapid response) の例。多様な組織においてみられる。このような反応にかかる時間は数秒から 1 時間程度であり、数時間以上を要する転写制御機構とは異なる機構を介すると考えられている。(B) rapid response の分子機構としては、VDR を介する経路 (核内 VDR の新規相互作用因子の存在、あるいは VDR が膜上に発現する可能性が論じられている)、介さない経路 (新規ビタミン D 受容タンパク質の存在) の両者が予想されている。VDR ノックアウトマウスの解析結果より、少なくとも VDR を介する例が存在することは明らかとなっている。

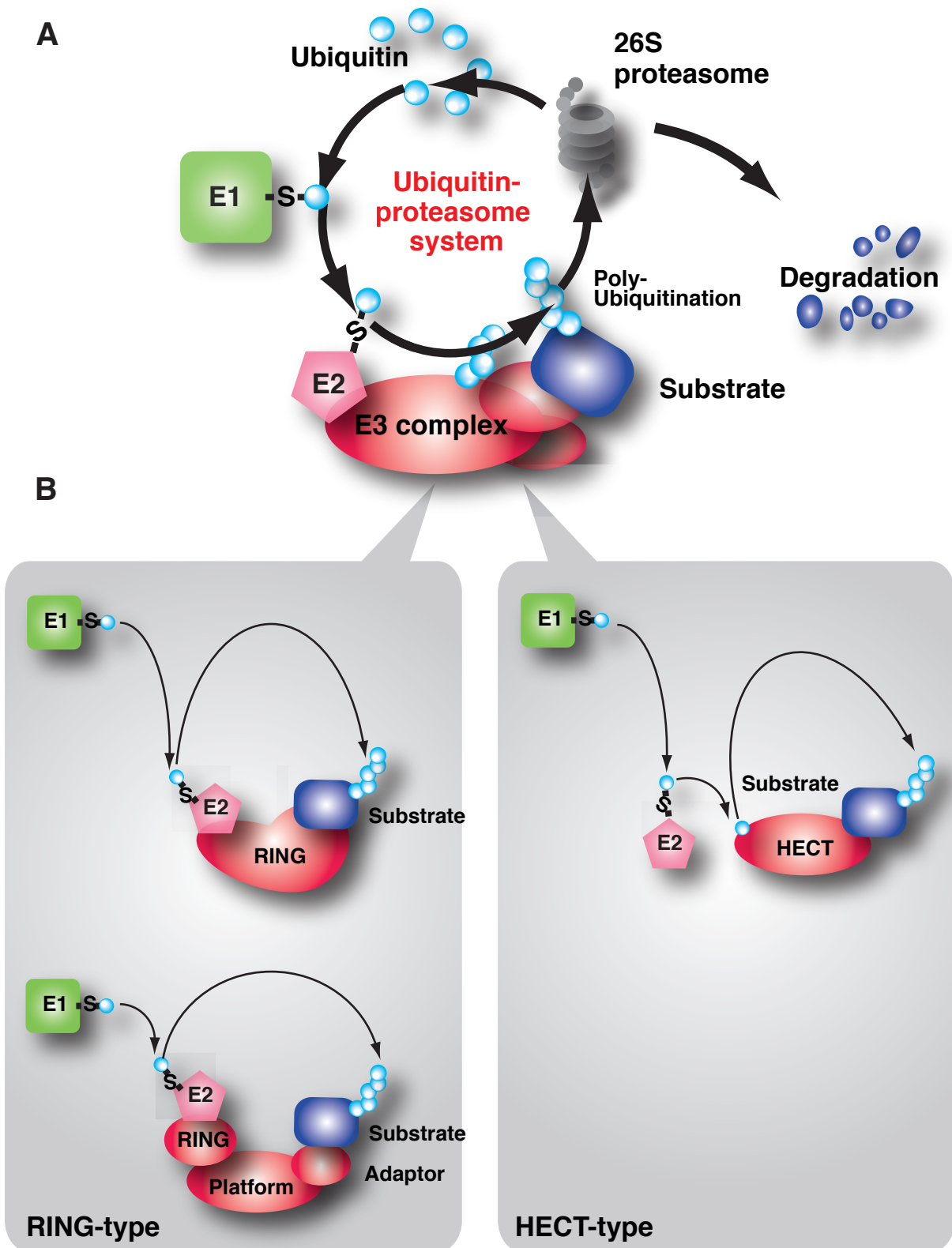


Figure 1-5 ユビキチン・プロテアソーム系

(A) ユビキチン-プロテアソーム経路はE1、E2、E3の3つの酵素群からなる。これらの酵素群はE1から順にユビキチンを受け渡し、基質にユビキチンを付加する。ポリユビキチン化された基質はプロテアソームによりオリゴペプチドへと分解される。使用されていたユビキチンは互いのイソペプチド結合を切断され、再利用される。(B) 基質特異性を担うE3酵素は、RING型とHECT型に大別される。RING型には、RING-finger 或いはU-box等のRING-finger likeドメインを有し、単体或いは複合体として基質へユビキチンを付加する。HECT型は単体で機能するもののみが知られている。

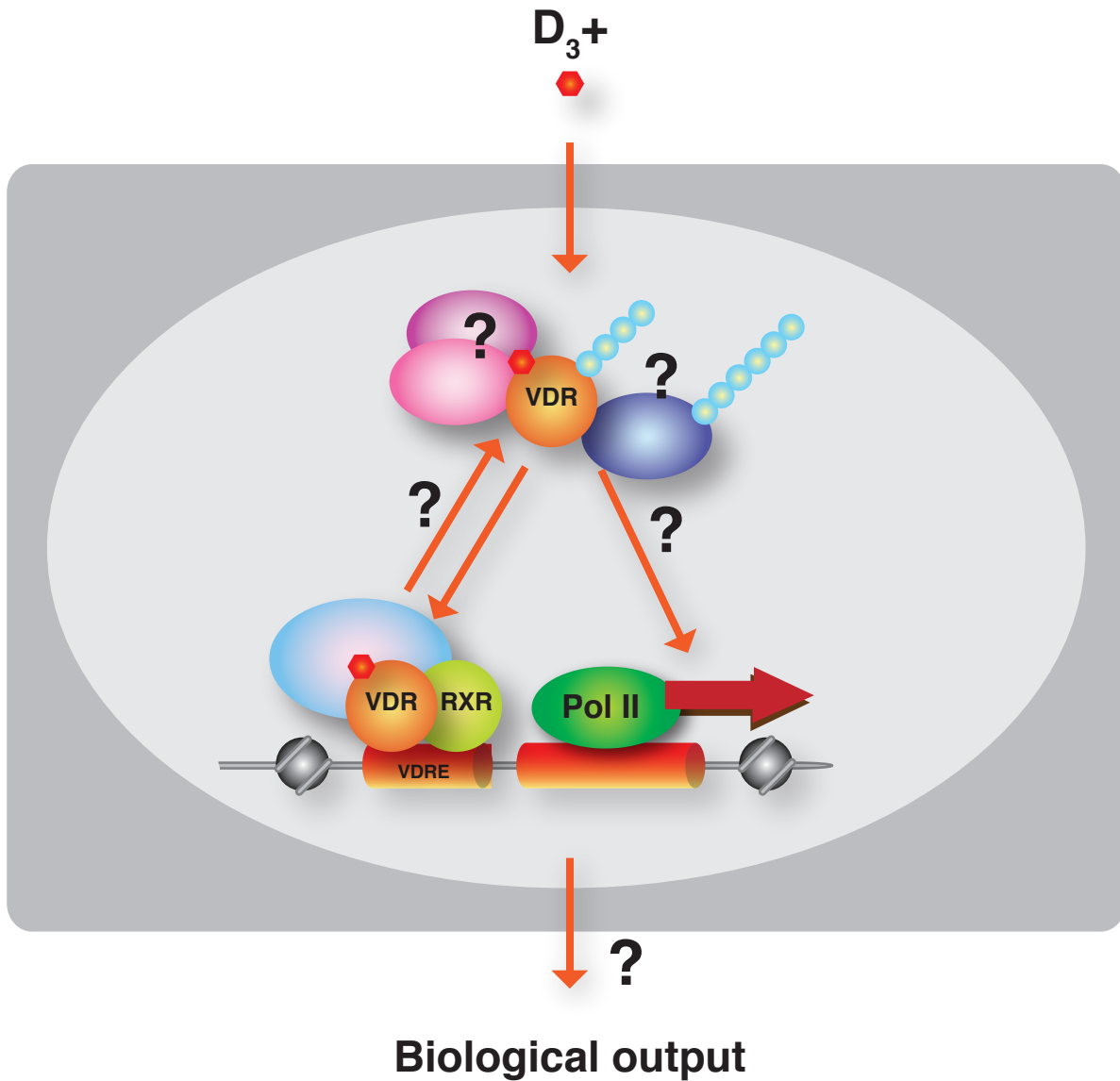


Figure 1-6 本研究の目的

これまでに、VDR 複合体が自己ユビキチン化活性を有することを見出してきた。そこで本研究では、VDR の有する自己ユビキチン化活性を指標に複合体精製を行い、VDR 転写制御複合体の使い分けや、rapid response の分子機構など、ビタミン D の未知作用機序の一端を解明しようと試みた。また、VDR の自己ユビキチン化活性について、評価を行った。

第二章

VDR 新規相互作用因子 BEND3 の機能解析

第一節 緒言

ビタミン D 受容体(VDR)は核内受容体スーパーファミリーに属する、活性型ビタミン D やリトコール酸を始めとするリガンド依存的な転写因子である。VDR はこれらリガンド依存的に転写共役因子複合体群と複合体を形成することで、標的遺伝子の発現制御機構を行うことが知られている。ビタミン D の生理作用の多くは、VDR を介した転写活性化能により発揮されると考えられてきた。一方で、ビタミン D 依存的な生理作用の中には、ビタミン D 摂取後数分～1時間程度のものも存在する。このようなビタミン D の急速な反応の作用経路については未解明である。

これまでの研究において、リガンド依存的な核内受容体群のうち、VDR が強い自己ユビキチン化活性を有することが明らかになった。先行研究において同定された VDR 複合体構成因子が全て転写関連因子であること理由として、メディエーターなど、VDR の主な相互作用因子群に目的の相互作用因子が隠されている可能性を考えた。そこで、見出した自己ユビキチン化活性を指標に VDR 複合体を分画し、活性の強い画分から新規相互作用因子の同定を試みた結果、機能未知タンパク質 BEND3 を同定した (Fig 2-1)。

そこで第二章では、新たに同定した VDR 相互作用因子 BEND3 について、VDR の生理作用における機能解析を行った。

第二節 材料と方法

第一項 材料

1. プラスミド

F-HA-BEND3 : FLAG-HA-pcDNA3 に human BEND3 全長を挿入したもの。

VDR : pSG5 ベクターに rat VDR 全長を挿入したもの。

DR3-TATA promoter : pGL3 ベクターに、オリゴ DNA として合成した DR3 型 VDRE 配列(5'-agA GGT CA^t gaA GGA CA-3')を直列に 3 つ挿入し、その直後に TATA 配列(5'-ctc gag tct ggg TAT Ata-3')を挿入したものの。

DR3-TK promoter : pGL3 ベクターに前述の VDRE と、thymidine kinase 遺伝子の core promoter を挿入したもの。

2. 抗体

①ウエスタンブロッティング

一次抗体

BEND3 : Rabbit polyclonal antibody, Atlas antibodies (HPA017891)を 1:1000 で使用。

VDR : Rat monoclonal antibody (Clone 9A7γ.E10.E4), Neomarker (#RT-200-P)を 1:500 で使用。

Tubulin

Pol2 : Mouse monoclonal antibody, abcam (ab817)を 1:1000 で使用。

HDAC1 : Mouse monoclonal antibody, Cell Signaling (10E2)を 1:1000 で使用。

H3 : Rabbit polyclonal antibody, abcam (ab1791)を 1:1000 で使用。

ubH2A : Rabbit monoclonal antibody, Cell Signaling (D27C4)を 1:1000 で使用。

Actin : Goat polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology (I-19)を 1:1000 で使用。

二次抗体

Rabbit : Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP: Dako Cytomation (P0448)を 1:10000 で使用。

Rat : Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / HRP: Dako Cytomation (P0450)を 1:10000 で使用。

Mouse : Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP: Dako Cytomation (P0448)を 1:10000 で使用。

Goat : Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins / HRP: Dako Cytomation (P0160)を 1:10000 で使用。

②免疫沈降

BEND3 : Rabbit polyclonal antibody, Atlas antibodies (HPA017891)を使用。

VDR : Rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology (C-20)を使用。

3. 薬剤

ビタミン D : Calcitriol(和光純薬)をフィルター滅菌した純エタノールにて 10^{-3} M となるように溶解・分注し、これをストックとした。細胞には、これを更に純エタノールで 10^{-5} M に希釈した物を、培地中の終濃度が 10^{-8} M となるように添加した。

プロテアソーム阻害剤 : MG132 (Calbiochem)を DMSO にて 10^{-2} M となるように溶解・分注し、これをストックとした。assay では終濃度 10^{-5} M で使用した。

プロテアーゼ阻害剤 : Protease inhibitor Cocktail set III (Calbiochem)を 1000~2000 倍に希釈して assay 等に使用した。

4. siRNA

siCtrl : Dharmacon Inc.の(D-001210-02-20)を用いた。

以下は invitrogen 社のデザイン済み Stealth RNAi™より選択した。

siBend3#1 : 5'-UCCAGUUGCUUCUUGUUGCAAGCCC-3'

5'-GGGCUUGCAACAAGAAGCAACUGGA -3'

siBend3#2 : 5'-UUUCCAAGGAAACAUGUCCACUCCC-3'

5'-GGGAGUGGACAUGUUUCCUUGGAAA-3'

siBend3#3 : 5'-CACCUUGGCUGUGUCUACAGGACAA-3'

5'-UUGUCCUGUAGACACAGCCAAGGUG-3'

第二項 方法

1. 細胞培養

HEK293 細胞の培養には High Glucose DMEM 培地(Dulbecco's modified Eagle's medium; D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (Wako)に 10%の Fetal bovine serum; FBS (JRH biosciences)と 1% Antibiotic-Antimycotic (GIBCO)を加えたもの)を、HT-29 細胞、MG-63 細胞、SW480 細胞の培養には Low Glucose DMEM 培地(上記 High Glucose DMEM 培地において、(High Glucose)を(Low Glucose)に置き換えたもの)を使用した。FBS は 30 分間 50°C で非動化処理した物を用いた。リガンド処理を伴う実験を行

う際は、前日より phenol-free の DMEM (SIGMA) とチャコール処理済みの FBS を用いた。培養は 37°C、5% 二酸化炭素雰囲気下で行った。細胞の継代は、0.5% Trypsin-EDTA (GIBCO) を PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) で 10 倍希釈した物を用いて行い、2 日に一度、新しい培地中に希釈して継代した。

2. トランスフェクション

① プラスミド DNA の導入

HEK293 細胞へのプラスミド DNA の導入には、Lipofectamine 2000 を使用し、実験は付属説明書に従った。簡単な手順は以下の通りである。

プラスミド DNA、Lipofectamine 2000 reagent をそれぞれ OPTI-MEM に希釈し、5 分間室温で静置した。静置後、これらを混合し、更に 20 分間室温で静置した。この間に細胞の培地を OPTI-MEM に交換した。調製した DNA-カチオン性脂質複合体を細胞に滴下し、4 時間後に血清入りの培地に交換して適当な時間(24-48 時間)培養し、サンプル調製を行った。

HT-29 細胞へのプラスミド DNA の導入には、XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) を使用した。簡単な手順は以下の通りである。

OPTI-MEM で上記トランスフェクション試薬を希釈し、15 分間室温で静置後、適量のプラスミド DNA を添加した。更に 30 分間室温で静置し、細胞に滴下後、適当時間(24-48 時間)培養してサンプル調製を行った。

② siRNA の導入

siRNA の導入には、Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) を用いた。実験は付属説明書に従って行った。以下に簡単な手順を示す。

siRNA、RNAiMAX Transfection Reagent をそれぞれ OPTI-MEM で希釈し、室温で 10 分間静置した。その後、両者を混合し、更に室温で 30 分間静置した後、細胞に滴下した。適当時間(36 時間以上)培養し、サンプル調製を行った。

3. 細胞分画

ここでは、small scale (10 cm dish 3 枚分程度まで)での核/細胞質分画法を示す。全ての試薬に MG132、P.I.Cocktail を加えて行った。細胞を PBS で回収し、2,000 rpm で 5 分遠心し、上清を除いた。目測で細胞量(packed cell volume)をはかり、細胞の 5 倍量の Hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES pH=7.5、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl) に懸濁した。この際、泡立たないように注意した。氷上に 15 分以上静置し、Trypan blue (SIGMA) により染色して細胞が膨張したことを確認した後、10 % IGEPAL CA-630 (SIGMA) を全液量

100 ml に対して 6 ml 添加して 10 秒間ボルテックスした。再度 Trypan blue 染色により細胞膜の破碎を確認した後、即座に 10,000 rpm で 30 秒間遠心した。この上清を細胞質画分とし、全液量の 0.003 倍の 5 M NaCl と、0.1 倍の glycerol を加えた。細胞核ペレットを Hypotonic lysis buffer で 3 回洗浄した後、細胞核ペレット量の 2/3 倍の Extraction buffer (20 mM HEPES pH=7.5、1.5 mM MgCl₂、0.42 M NaCl、0.2 mM EDTA、25% glycerol) を加え、4°C で 15-30 分ボルテックスした。この際も、泡立たないように注意した。13,000 rpm で 5 分遠心後、上清を核抽出画分とし、milliQ 水と 3×Dilution buffer (90 mM HEPES pH=7.5、30 mM NaCl、3 mM EDTA、5% glycerol、1.5% NP-40) を等量ずつ加えた。残ったペレットについて、等量の Chromatin buffer (20 mM HEPES pH=7.5、100 mM KCl、2 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、300 mM Sucrose、0.1% TritonX100) に懸濁し、ソニケーションにかけた後、14,000 rpm で 5 分間遠心した。この上清をクロマチン画分とした。

4. ウェスタンブロッティング法

得られたサンプルに 3×SDS-sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、200 mM DTT、4% SDS、0.2% Bromophenol blue、20% glycerol) を加えて 95°C ヒートブロックにて 5 分間加熱したものを泳動サンプルとした。

SDS-PAGE にて展開したタンパク質は、Mini trans-blot cell (Bio-RAD) を用いて PVDF 膜 (Immobilin Transfer Membrane (Millipore)) に転写した。これを Blocking buffer (PBS-T (PBS(-) に 0.1% となるよう Tween-20 を添加したもの) / 3% non-fat-dry milk) に室温にて 1 時間或いは 4°C にてオーバーナイトで震盪させて、以後の抗体反応における非特異的反応を防いだ。このメンブレンと PBST で適当に希釈した一次抗体を室温で 1.5 時間或いは 4°C にてオーバーナイトで反応させ、PBST でメンブレンを 5 分 3 回洗浄した。この後、PBST で希釈した HRP 標識二次抗体と室温で 45 分間或いは 4°C にてオーバーナイトで反応させた。再びメンブレンを PBST で 5 分 3 回洗浄した。ECL western blotting detection system (GE healthcare) を用いた化学発光を行い、BioMax XAR film (Kodak) に露光させて現像した。フィルムではなく冷却 CCD システムを用いた場合には、Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore) を用いて発光を行い、LAS-4000 (FUJI FILM) で検出を行った。機械の操作は付属説明書通りに行った。

5. 免疫沈降法

全ての試薬に MG132 及び P.I.Cocktail を加えて行った。細胞 10 cm dish 一枚分につき、PBS 3 ml で細胞を洗浄した後、TNE buffer (10 mM Tris-HCL (pH 7.8)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40) 1 ml でピペッティングを行うことで細胞をエッペンに回収した。

30-60 分間、4°C にてエッペンを緩やかに回転させ、細胞を溶解した後、実験によってはソニケーションにより DNA を破碎した。12,000 rpm で 15 分間遠心して不溶性画分を除去した上清を細胞抽出液として取得した。得られた細胞抽出液を Protein assay kit (Bio-Rad) に供し、タンパク濃度を測定して TNE buffer によりサンプル間のタンパク濃度を合わせた。この細胞抽出液の一部を input 用を取得した。免疫沈降に用いる抗体を 10 cm dish 一枚分につき 1.5-2.0 µg 加え、4°C にて 1-2 時間攪拌した後、TNE buffer で平衡化した Dynabeads® protein A (invitrogen) を 30 µl 加え、30 分-1 時間 4°C にて攪拌した。エッペンを磁気ビーズスタンドに回収し、上清を除去後、更に TNE buffer で 3 回洗浄し、目的の免疫沈降産物を得た。

6. Real-Time PCR 法

12 well plate に細胞をまき、適切な処理・培養の後、ISOGEN Kit (Nippon Gene) 或いは RNeasy (Qiagen)、Nucleospin® RNAII (Macherey-Nagel) を用いて RNA を抽出した。1 well あたり 15 µg 程度の RNA が抽出できた。抽出した RNA を 100 – 250 ng/µl に調製し、計 1-2 µg をテンプレートにして PrimeScript® RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写反応を行った。反応は取扱説明書に従って行った。Real-Time PCR は KAPA SYBR® FAST qPCR Kits (Kapa Biosystems) 及び Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用いて行った [Hold: 95°C 30 sec, {Denature: 95°C 5 sec, Anneal/Extend: 63°C(Gapdh, Cyp24a1)、60°C (Trpv6, Bend3) 30} × 50 cycle]。蛍光は FAM を使い、Anneal/Extend における蛍光を検出し、データを収集した。PCR 終了後、データ解析を付属ソフトにより行った。解析方法としては、 $\delta\delta C_t$ 法を用い、Gapdh にて補正を行ったものを、更に適した条件で補正し、グラフにした。用いたプライマーの配列を以下に示す。

Gapdh : 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'

5'-ATGAGTCCTTCCACGATACC-3'

Cyp24a1 : 5'-ATGAGCACGTTTGGGAGGAT-3'

5'-TGCCAGACCTTGGTGTTGAG-3'

Trpv6 : 5'-CCTCAAGCCCAGGACCAAATAAC-3'

5'-TCTACCAGCAGGATGATGATAGCC-3'

Bend3 : 5'-GCGTGATGACTGCTACGACT-3'

5'-AAGCTGTCCTCCACCTTGAC-3'

7. ルシフェラーゼアッセイ

転写活性化能を測定するレポーターアッセイの方法として、Dual-luciferase Reporter

assay system (Promega)を使用した。特徴として、細胞内に二種類のレポーター酵素を発現させることにより、目的の活性と内部標準の活性の両者を同時測定できる。目的の活性にはホタルルシフェラーゼ反応を、内部標準の活性にはウミシイタケルシフェラーゼ反応を用いた。

細胞はトランスフェクション時に 50%コンフルエントになる様、前日に 12 well dish に継代した。評価する転写因子や共役因子をコードするプラスミド(0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ VDR、0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ F-RXR、0.1-0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ F-HA-BEND3)、ルシフェラーゼレポーター遺伝子(0.3 $\mu\text{g}/\text{well}$ DR3-TATA (or TK) promotor、0.002 $\mu\text{g}/\text{well}$ CMV-Renilla luciferase vector)を細胞にトランスフェクションした。3-4 時間後にチャコール処理済み FBS を添加した phenol-red free の DMEM 培地に交換した。更に 12 時間後にビタミン D を添加し、24 時間培養した細胞をサンプルとして用いた。

8. 抗 BEND3 抗体 resin によるアフィニティー精製

①抗 BEND3 抗体 resin の作製

ローリテンションチューブ(Accist)を用いた。10 cm dish 一枚あたり 2 μg の抗体を BC100 (20 mM HEPES (pH=7.6)、10% Glycerol、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.05% Tween) で 50 倍希釈した。Dynabeads® protein A を 10 cm dish 一枚あたり 30 μl 用意し、BC100 で洗浄した。希釈した抗体液に Dynabeads を加え、4°C にて一晚攪拌した。BC100 で 3 回洗浄し、0.2 M Triethanolamine pH=8.3 で 2 回洗浄してから Coupling buffer (0.2 mM Triethanolamine に 20 mM DMP: Dimethylpielimidate を加えたもの)を加え、室温にて一時間攪拌して架橋反応を行った。この反応液の pH が 8.2 以下だと架橋率が低下するので注意する。反応後、50 mM Tris-HCl (pH=7.5)で 15 分間室温震盪することで反応を停止し、BC100 で 3 回洗浄してから、0.1 M glycine-HCl (pH=2.0)で架橋されていない抗体分子を洗い流した。その後、直ちに 50 mM Tris-HCl (pH=8.0)で洗浄して中和した。

抗体の架橋効率の確認

架橋前、架橋後の抗体—ビーズ複合体を 2 ml ずつサンプリングしておく。また、ビーズによる抗体の回収効率を確認するため、BC100 で希釈した抗体液と、これをビーズに結合した後の上清も同様にサンプリングした。これらのサンプルに SDS loading buffer を加えて 95°C で 5 分間ボイルした。遠心して上清を SDS-PAGE にて展開後、銀染色にて可視化した。架橋前のサンプルでは、55 kDa 及び 25 kDa の分子量に抗体の IgG heavy chain、light chain を示すバンドが検出される。架橋後のサンプルで、これらのバンドが検出されないことを確認した。また、サンプルにケラチン等のタンパクのコンタミネ

ーションがないことを確認した。

②抗 BEND3 抗体 resin を用いた BEND3 相互作用因子群の精製

フィルターを通してゴミを除去した細胞抽出液と、作製した抗 BEND3 抗体 resin 又は IgG resin をコンタクトさせ、4 °C で 2 時間攪拌した。その後 resin 未結合のタンパクを含む細胞抽出液を除去し、resin を TNE buffer で 3 回洗浄した。洗浄液を綺麗に除去してから、0.1 M glycine-HCl (pH=2.0)を加えて 37°C で 15 分間静置し、溶出を行った。5 分おきにタッピングを行った。これを 2 回繰り返す、resin より複合体群を含む様出液を得た。

9. 銀染色

銀染色は市販の銀染色 II キット(Wako)又は Silver quest staining kit (Invitrogen)を用いた。前者のキットの方が検出感度が高いため、このキットを用いて精製産物の一部(少量)と BSA を染色し、目的タンパク質群のタンパク量を見積もった。後者のキットは、従来の銀染色法で生じるタンパク修飾反応が最小化しており、トリプシンによるタンパク消化を阻害しない様に最適化されている。このため、質量分析器に供するサンプルはこの方法により染色した。

10. ゲル内トリプシン消化

9.で述べた様に Silver quest staining kit を用いてタンパクを可視化し、ラップを敷いたガラス板上で解析するバンドをメスにより切り出した。ゲル片は 2-3 等分し、500 ml low retention tube(アシスト)に入れた。まず、ゲル片を脱色した後、室温にて acetonitrile 内に 15 分間静置し、脱水を行った。この際、2-3 度タッピングによる攪拌を行った。上清を取り除き、ゲル片を遠心乾燥機(Taitec)にかけ、乾燥させた。乾燥させたゲル辺に Reduction buffer (10 mM DTT、100 mM NH_4HCO_3)を 56°Cにて 1 時間反応させ、分子内ジスルフィド結合の還元を行った。反応液を除いた後、Alkylation buffer (55 mM iodoacetoamide、100 mM NH_4HCO_3)を加えて遮光し、45 分間室温にて反応させた。この反応によりシステイン残基はカルバミドメチル化され、ジスルフィド結合の再反応を防いだ。

続いて、トリプシン消化前のゲル片の洗浄を行った。視認できるほこり等はチップ等を使い、この洗浄操作で全て除去した。まず、 NH_4HCO_3 を加えて 15 分間静置し、Buffer 置換を行った。次に、acetonitrile を加えてゲル片を脱水した。これを更に 2 回繰り返す、SpeedVac により完全に乾燥させた。タンパク量に合わせた濃度の Trypsin buffer (3-25 ng/ml Trypsin gold (sequence grade, Promega), 50 mM NH_4HCO_3)を 5 μl 加え

て3分間静置し、ゲル片を膨潤させる。この操作で、**Trypsin** がゲル片内部に取り込まれる。ここに10 μ l の50 mM NH_4HCO_3 を加え、6時間、37°Cで反応させた。

20 μ l の20 mM NH_4HCO_3 を加え、室温で20分間震盪し、消化ペプチド断片を溶液中に溶出させた。ペプチド溶液を回収した後、このゲル片に20 μ l の**Extraction Buffer** (5% formic acid、50% acetonitrile)或いは蟻酸を含まない50% acetonitrileを加え、再び室温で20分間震盪した。この操作を3回繰り返す、ゲル片が十分に脱水されていることを確認した。脱水が不十分な時は、溶出操作を再度行うと良い。

得られた80-100 μ l のペプチド溶液を、**SpeedVac**により蒸発乾固させた。蒸発に伴って溶液が凍ってしまう場合は、30°C程度に保温しながら蒸発させると良い。1時間程で乾固を確認後、2% acetonitrile、0.1% formic acid 或いは **Buffer A** 22 ml に再溶解し、15,000 rpm で10分間遠心を行い、上清をLC-MS/MS サンプルとした。なお、ペプチドが効率良くイオン化できる様、上清が酸性であることを確認した。

11. LC-MS/MS

LTQ velos-Orbitrap ETD instrument (Thermo Fischer scientific)を用いて調製サンプルを測定し、MS/MS スペクトルを得た。得られた MS/MS スペクトルを **Protein discover** (Thermo Fischer scientific)にて解析し、タンパクデータベース検索エンジンである **SEQUEST** にてスペクトルを評価した。また、タンパクの同定には **NCBI human protein database** を用いた。fix modification の欄には、Carbaidomethyl cystein を入力した。

第三節 VDRの転写制御におけるBEND3の機能解析

第一項 BEND3はVDRとリガンド非依存的に相互作用する

まず、BEND3の局在を検討した。これまでの研究において、過剰発現したBEND3が核に多く局在することを見出していたので、今回は内在性のBEND3について、検討を行った。まず、細胞免疫染色法により検討した。市販の抗体を用いて免疫染色を行った結果、特異的な発光が検出できなかった。続いて、HT-29細胞を細胞質、核、クロマチン、不溶性画分に分画し、取得したそれぞれの抽出液についてウェスタンブロッティングを行った。この結果、過剰発現したものと同様、BEND3は核内に多く局在した(Fig 2-2A)。この結果より、BEND3はVDRと類似した局在を示しており、核内において相互作用すると推測された。そこで、FLAG-HA-BEND3およびVDRを過剰発現したHEK293細胞および、過剰発現を行わないHT-29細胞を用いてビタミンD依存的なBEND3とVDRの相互作用の検出を試みた(Fig 2-2BC)。この結果、過剰発現系において、BEND3とVDRのリガンド非依存的な相互作用を検出した。また、HT-29を用いた内在性での結合の検討については、抗VDR抗体で免疫沈降を行った際に、コントロールであるIgGにはない特異的なバンドをBEND3の位置に検出した。

第二項 ビタミンD応答性細胞種の検討

VDR複合体構成因子の機能を明らかにするにあたり、ビタミンD依存性を検出することは至上命題ともいえる。用いる培養細胞によっては、VDRの発現量が少なすぎるなどの理由により、ビタミンD依存性が見られず、得られた複合体構成因子の機能の評価には適さないものがある。ビタミンDの標的組織およびVDRの発現組織に由来する細胞種について、代表的なビタミンD標的遺伝子であるビタミンD代謝酵素Cyp24a1のmRNA量を指標とし、ビタミンD応答性を評価した。評価した細胞は、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、ヒトVDRを恒常的に発現する細胞株であるHEK293-hVDR細胞、ヒト大腸ガン由来HT-29細胞、SW480細胞、ヒト骨芽腫由来MG63細胞の6種類である。この結果、HEK293細胞においてはリガンド依存性が見られず、HEK293-hVDR細胞においてもリガンド依存性が2倍程度に留まった。これに対し、他の3種類の細胞については内在性VDRの活性のみでリガンド添加により10倍以上のCyp24a1の発現上昇が検出された。特にHT-29細胞は同量のテンプレートcDNAに対してCyp24a1の発現量が他の3種よりも多かったため、今後はこの細胞を用いて研究を行うこととした。

第三項 BEND3 は VDR の転写共役因子である

BEND3は機能未知タンパク質であり、そのドメインからも機能を予測できないことから、まずはVDRの転写活性化に寄与するか否かを検討した。まず、HEK293細胞にVDR/RXR複合体およびBEND3を過剰発現してレポーターアッセイを行った。この結果、BEND3の発現量依存的なVDRの転写活性可能促進が検出された (Fig 2-3A)。続いて、HEK293細胞において内在性のBEND3をノックダウンした状態でVDR/RXR複合体などを導入してレポーターアッセイを行い、BEND3の効果を検討した (Fig 2-3B)。この結果、予想と反してBEND3のノックダウンによりVDRのリガンド依存的な転写活性化能が促進された。より内在性に近い状態でBEND3の機能を調べるため、HT-29を用いて検討を行った。この際、VDR/RXR複合体の過剰発現は行っていない。この結果、BEND3のノックダウンにより、ビタミンD依存的な転写活性化能が抑制された。更に、内在性BEND3をノックダウンした状態でCyp24a1の転写量を検討した (Fig 2-3C)。この結果、やはりBEND3のノックダウンに伴いビタミンD依存的なCyp24a1転写量上昇は抑制された。以上の結果より、BEND3はVDRのリガンド依存的な転写共役因子であると結論した。

第四節 BEND3複合体精製の試み

第一項 抗 BEND3 抗体カラムの作製

まず、抗 BEND3 抗体カラムの作製を行った。免疫沈降法に用いた抗 BEND3 抗体を Dynabeads protein A に吸着させた後、DMP (dimethylpimelimidate)を用いて架橋した(Fig 2-5A)。コントロールとして rabbit IgG も同様にビーズへ架橋した。SDS 含むサンプリングバッファーと共にボイルすると、架橋前の抗体-ビーズ複合体ではビーズより乖離した抗体が検出された一方で、架橋後のサンプルでは抗体の乖離は検出されなかった。従って、抗 BEND3 抗体、IgG は共に効率良くビーズへと架橋されたと考えられる。

抗 BEND3 抗体カラムが作製できたため、このカラムを用いて、Figure 2-5B に示すスキームで HT-29 細胞内在性 BEND3 相互作用因子群の精製を試みた。精製産物を SDS-PAGE で展開後、銀染色法およびウェスタンブロットティング法で可視化した。この際、BEND3 複合体を効率良く取得するために、抗体カラムと細胞抽出液のインキュベーション時間を検討した(Fig 2-5CD)。この時間が長ければ、細胞抽出液中の BEND3 を多く吸着できる一方で、IgG でも見られる非特異性のバンドが増えてしまう。今回、インキュベーションを 1 時間と 24 時間で検討した。この結果、24 時間インキュベートすることで細胞抽出液中の BEND3 を殆どカラムに吸着させることができたが、IgG カラム側での溶出液でも多くのバンドが出てしまい、抗 BEND3 抗体カラム特異的なバンドを見つけることが困難であった。一方でインキュベート時間を 1 時間にした場合では、抗 BEND3 抗体カラム特異的なバンドを数本検出することが出来た。従って、この方法で BEND3 複合体の精製を行い、複合体構成因子の同定を試みた。

第二項 BEND3 相互作用因子群の同定

第一項で検討に用いたサンプルで得られた複合体を SDS-PAGE に展開し直し、得られたバンドを切り出してトリプシン消化したものを LC-MS/MS に供して相互作用因子群の同定を試みた。この結果、ベイトである BEND3 の他に、約 150 kDa 付近に位置するバンドから splicing factor 3B のサブユニット群を同定した。しかしながら、他のバンドに関しては全体的にスコアが低く、因子の同定に至らなかった。

そこで、複合体の量を増やして同定結果の改善を試みた。変更点としては、精製に用いる HT-29 細胞を 10 cm dish 1 枚分から、4 枚分に増量した。また、抗体カラムより得られた溶出液について、SDS-PAGE 展開前に膜濃縮を行った。なお、ビタミン D 依存的な転写活性化能の作用機構を明らかにするため、精製を行う一時間前にリガンド処理を行い、リガンドの有無による BEND3 複合体の構成因子の変化の検出も試みた。

方法を改善した結果、BEND3 複合体構成因子群のバンドをより濃く検出することが可能であったが、リガンド依存的なバンドの検出には至らなかった。抗 BEND 抗体カラムのレーンに濃く見えた 8 本のバンドを切り出し、LC-MS/MS に供した。コントロールとして、IgG のレーンからも同じ高さの部分からゲルを切り出し、非特異的なペプチドの除外を行った。この結果、やはり約 150 kDa 付近から再現良く splicing factor 3B のサブユニット群が同定され、RNA やテロメア結合タンパク質も好スコアで同定された。RNA スプライシングが転写の活性化に寄与することはこれまでに報告があり、BEND3 はこれら因子の足場となる可能性が示唆された。一方、ミオシンやキネシンなど、分子モータータンパク質も高いスコアで同定された。これら因子についても、核内における多岐に渡る機能が報告されている⁴⁸。

以上より、BEND3 が細胞内において何らかの複合体を構成する可能性が示唆された。

第五節 小括

本章では、以前取得した VDR 複合体構成因子の 1 つ、BEND3 について、VDR の機能における役割の解明を試みた。BEND3 の機能についてはこれまでに詳細な報告が無く、ドメインについても機能未知であったため、まずは転写の観点から VDR と BEND3 の関与を検討した。

BEND3 は主に細胞の核内に発現しており、リガンド非依存的に VDR と結合することを見出した。また、ビタミン D 応答性細胞において、BEND3 は VDR の転写活性化能を促進することを見出した。そこで、BEND3 の複合体構成因子の同定を試みた結果、RNA 編集関連因子群および、分子モータータンパク質を取得した。これら因子群が転写に関与することが知られていることから、BEND3 がこれらの機能を介して VDR の転写活性化能を促進していると推測した。

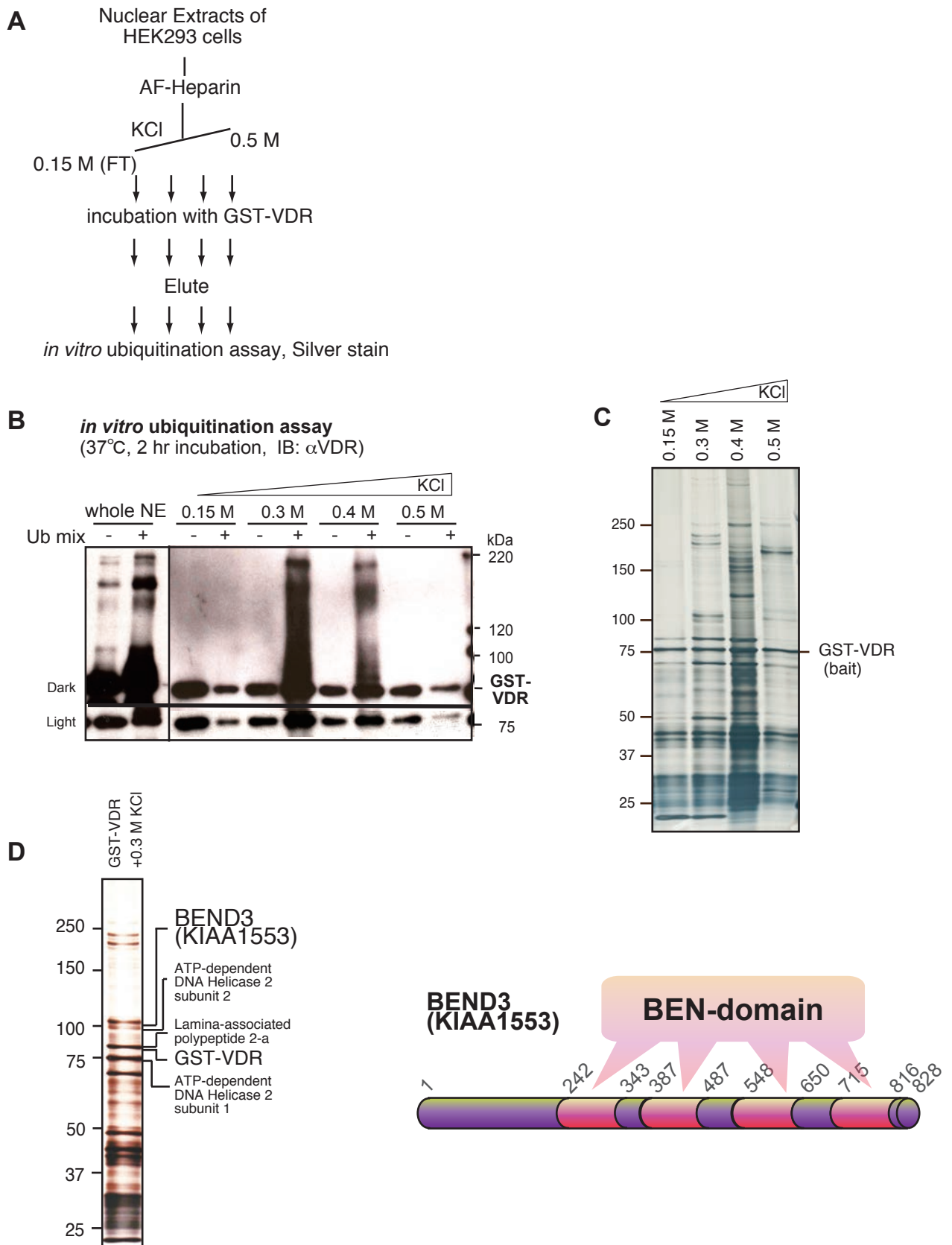


Figure 2-1 修士論文までの研究結果 (BEND3 の同定)

修士論文では、VDR の自己ユビキチン化活性に着目し、VDR の新規相互作用因子の同定を試みた。(A) VDR 複合体精製方法：群特異的 AF-heparin カラムを用いて核抽出液を分画した後、それぞれの画分を GST-VDR とインキュベートすることで複合体の分画を図った。(B) 分画した各複合体群の自己ユビキチン化活性の検出：0.3 及び 0.4 M KCl で溶出した画分で得られた複合体において強い自己ユビキチン化活性を検出した。(C) 銀染色による分画した各複合体を可視化：0.3 M KCl 溶出画分において相互作用因子が少なく、活性が濃縮されたと予想した。(D) VDR 相互作用因子の同定：0.3 M KCl 溶出画分で得られた相互作用因子を MALDI-TOF/MS で同定した。同定された因子のうち、機能未知タンパク質 BEND3 に着目した。BEND3 は機能未知ドメインである BEN-domain により構成される。

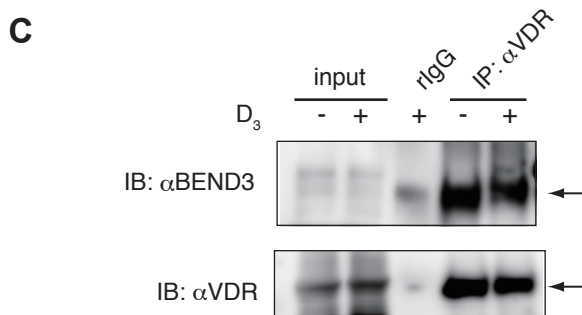
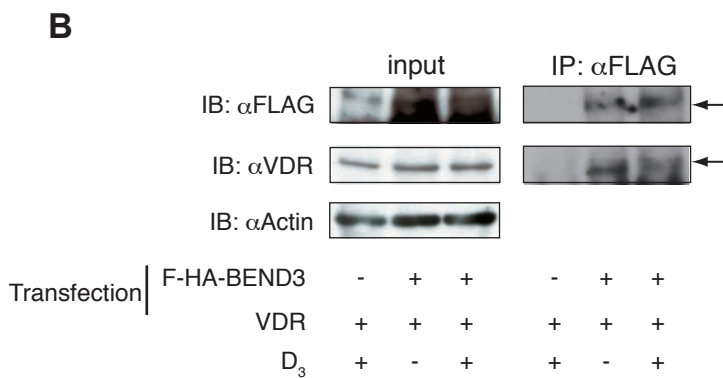
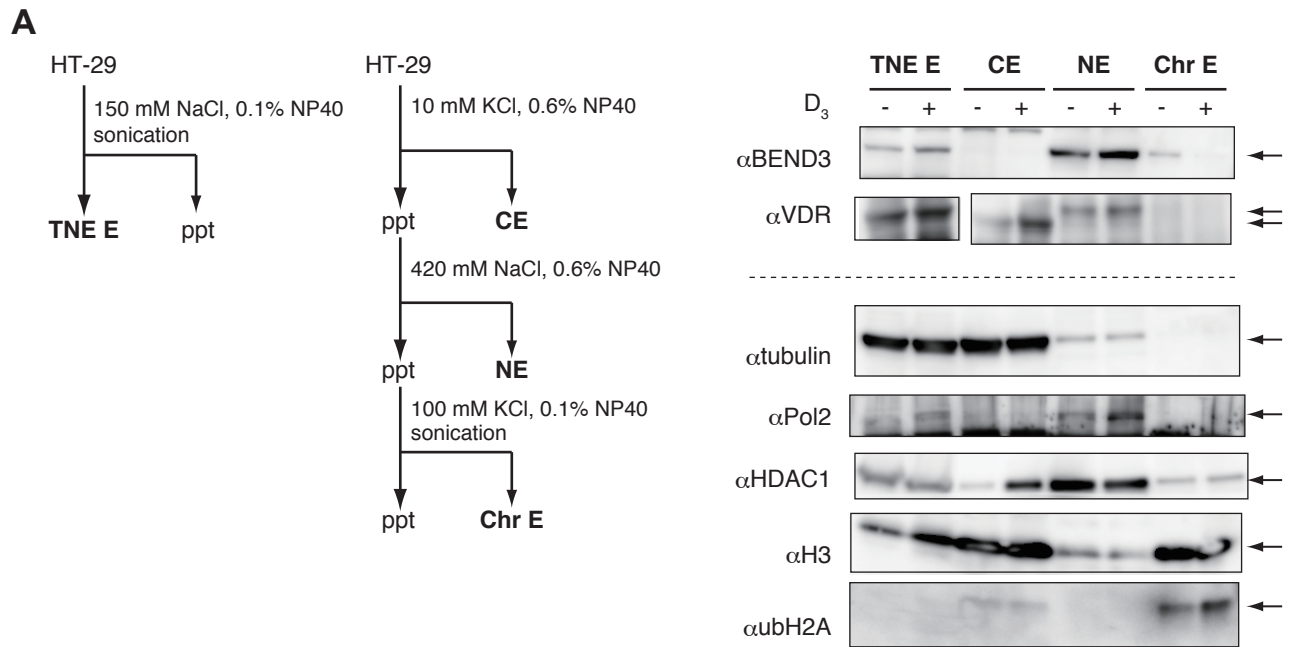


Figure 2-2 BEND3 は VDR とリガンド非依存的に相互作用する

(A) BEND3 の細胞内局在: リガンド非処理 / 処理した HT-29 細胞を細胞質画分 (CE)、核画分 (NE)、クロマチン画分 (ChrE) に分画した。(左): 分画スキーム。(右): ウェスタンブロッティングの結果。tubulin、Pol2 と HDAC1、ヒストン H3 とユビキチン化 H2A 後はそれぞれ CE、NE、ChrE の各マーカーとして使用した。(B) HEK293 細胞に FLAG-HA-BEND3 と VDR を過剰発現し、相互作用を確認した。(C) HT-29 細胞を用いて内在性 BEND3 と VDR の相互作用を検討した。免疫沈降は抗 VDR 抗体で行った。

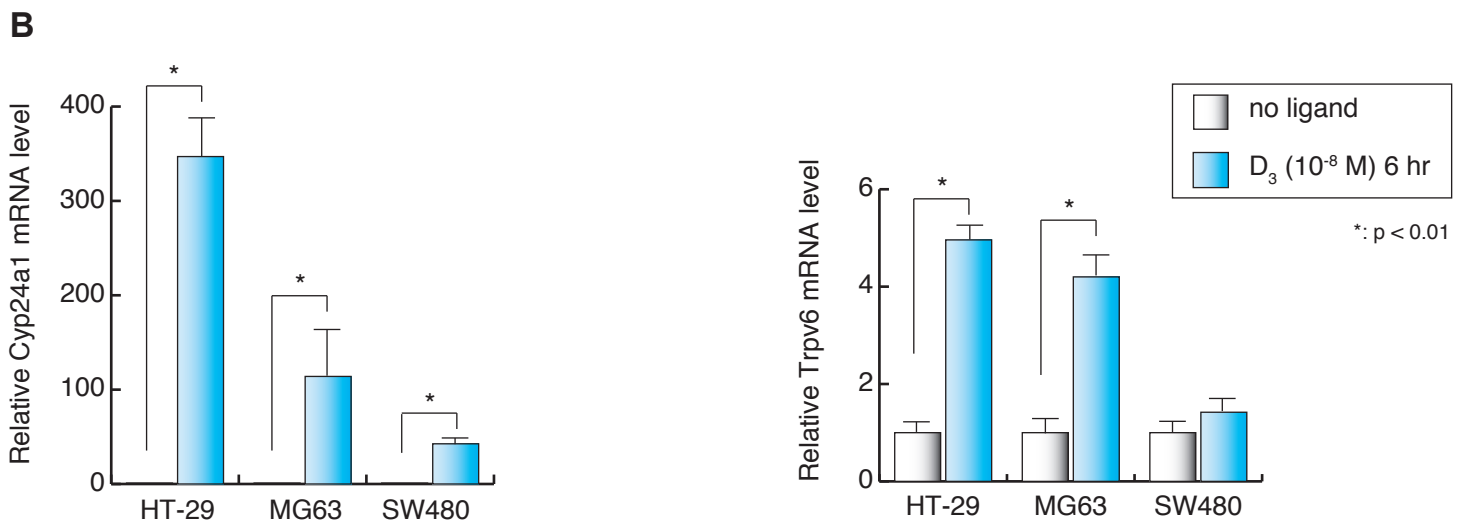
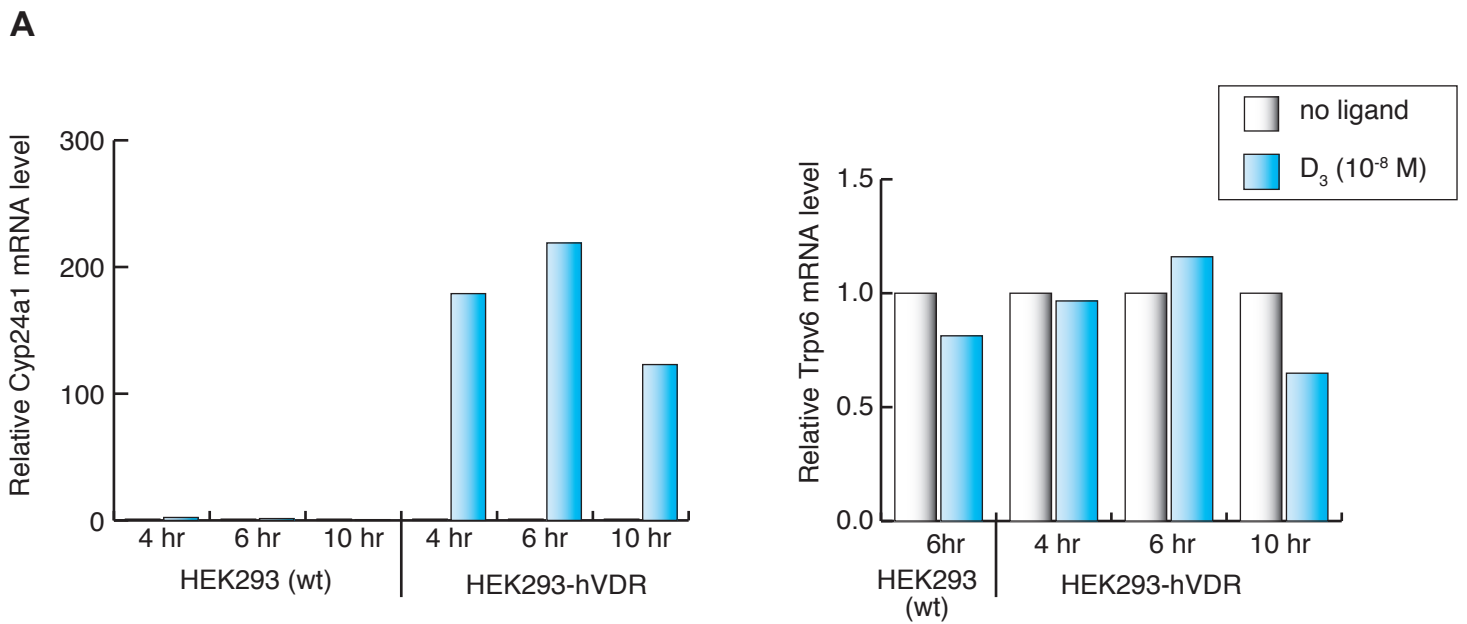


Figure 2-3 ヒト培養細胞のビタミン D 依存的な転写活性化の検討

(A) HEK293 細胞 (HEK293 (wt)) あるいは FLAG-hVDR を恒常的に発現する HEK293 cells 細胞 (HEK293-hVDR) を用いて、代表的なビタミン D 標的遺伝子である Cyp24a1 (左) 及び Trpv6 (右) の mRNA 量を検討した。リガンド添加時間は 4、6、10 時間とした。グラフはリガンド未添加時の mRNA 量を 1 とし、リガンド添加に伴う mRNA 量の変化を倍率で示した。

(B) 同様の検討を HT-29、MG63、SW480 細胞で行った。リガンド添加後 6 時間で細胞を回収し、mRNA 量を定量した。同実験を 3 度行い、t 検定を行った。標準偏差をエラーバーで示した。

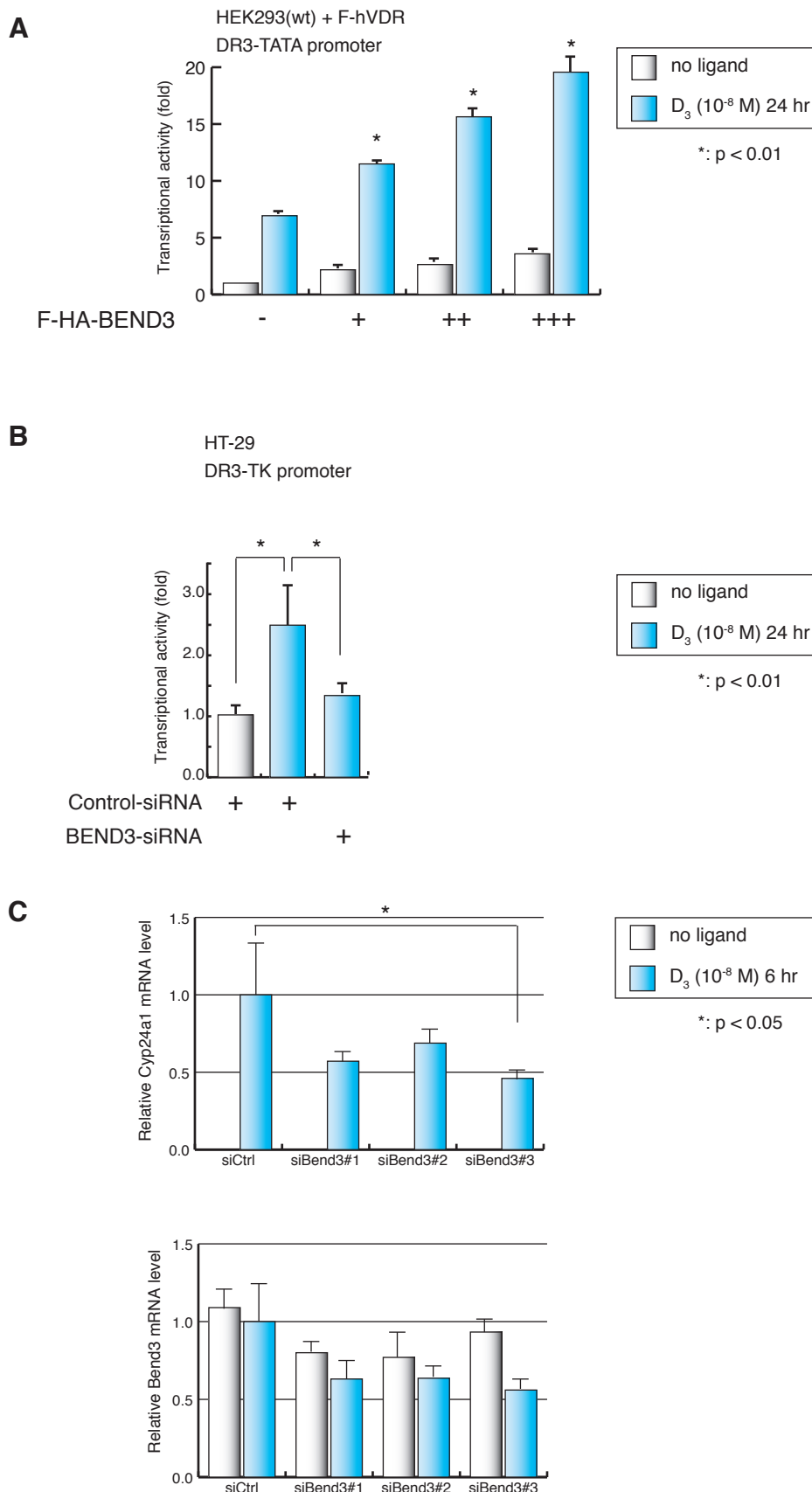


Figure 2-4 BEND3 は VDR のリガンド依存的なコアクチベーターである

(A) BEND3 量依存的な VDR の転写活性化能の検出 : HEK293 細胞に VDR、F-HA-BEND3 及び各種レポータープラスミドを過剰発現し、ルシフェラーゼアッセイを行った。リガンド添加後 24 時間後に細胞を回収した。グラフでは BEND3 プラスミドをトランスフェクションしないリガンド未添加時の活性を 1 とした。(B) HT-29 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、(A) 同様にルシフェラーゼアッセイを行った。(C) 内在性標的遺伝子の転写量における BEND3 の影響 : HT-29 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクション後 72 時間後、ビタミン刺激後 6 時間で細胞を回収し、mRNA を抽出した。これを逆転写した物をテンプレートに標的遺伝子 Cyp24a1 及び Bend3 の転写量を検討した。すべて同実験を 3 度行い、標準偏差をエラーバーで示した。

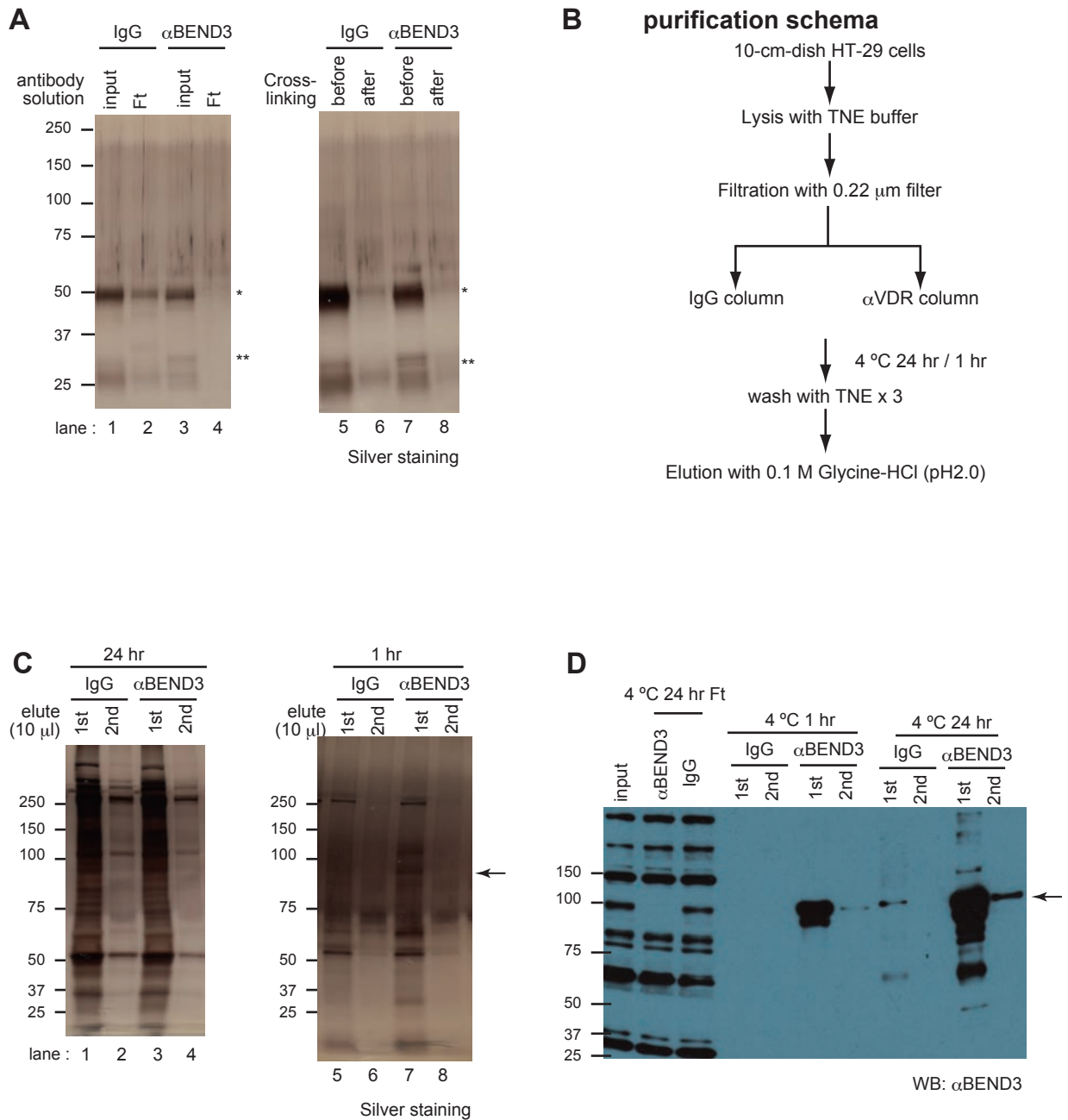
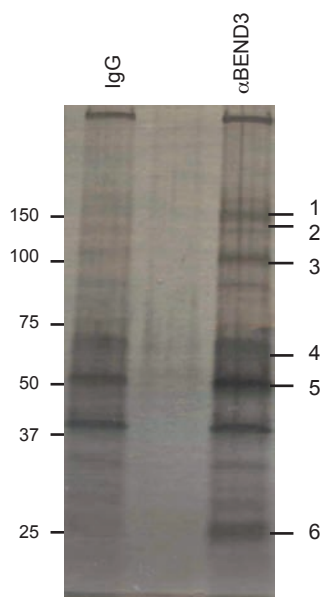
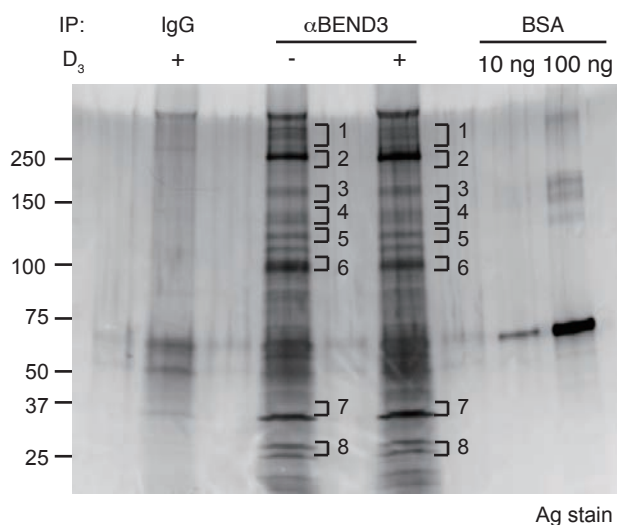


Figure 2-5 抗 BEND3 抗体カラムを用いたアフィニティー精製の検討

(A) 抗 BEND3 抗体カラムの架橋効率の確認：抗 BEND3 抗体あるいは rabbit IgG を Dynabeads protein A に吸着させた後、DMP (dimethylpimelimidate) を用いて架橋した。(Lane 1, 3; rabbit IgG/αBEND3 Lane 2,4; Dynabeads 吸着後の flowthrough、Lane 5,7; 架橋前、Lane 6,8; 架橋後の抗体 / ビーズをボイルしたもの、*、IgG heavy chain, **, IgG light chain.) (B) 精製スキーム。(C) インキュベーション時間を考慮したアフィニティー精製産物の検討。抗体カラムと細胞抽出液をそれぞれ (左)：24 時間、(右)：1 時間インキュベーションした。1 時間インキュベーションにおいて抗 BEND3 抗体カラム特異的に矢印の高さに BEND3 のバンドを検出した。(D) ウェスタンブロッティングによるアフィニティー精製産物の確認。矢印の高さに BEND3 が十分溶出できているのを確認した。

A

1. Splicing factor 3B subunit 1
2. Splicing factor 3B subunit 3
3. BEND3 (bait)
4. ?
5. ?
6. RPL13 protein
ribosomal protein L10a
UPF0568 protein C14orf166

B

1. ?
2. Myosin-9
3. kinesin family member 13B / clathrin
4. ATP-dependent RNA helicase A / Splicing factor 3B subunit 1
5. Splicing factor 3B subunit 3
6. BEND3 (bait)
7. d(TTAGGG)-binding protein / RNA binding motif protein
8. Unknown (protein for IMAGE:4538098)
(= rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin)

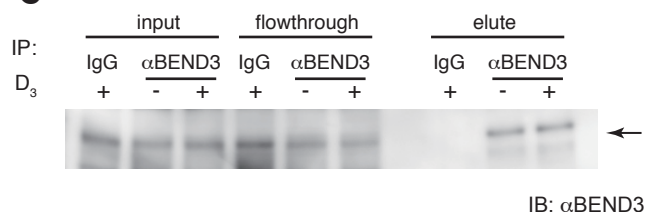
C

Figure 2-6 BEND3 相互作用因子複合体群の同定

(A) Fig. 2-5 の方法で得られた精製産物について、1-6 のバンドを切り出し、LC-MS/MS に供した。同定された主な因子を右側にリスト化した。(B) BEND3 アフィニティー精製 (2 回目)。更なる BEND3 複合体同定のため精製方法を改良し、ビタミン D 添加有無による BEND3 複合体構成因子のバンドパターンに変化が見られるか検討した。1-8 のバンドを切り出し、ビタミン D 添加に拘らず同定された主要な因子を右側にリスト化した。(C) ウェスタンブロッティングによるアフィニティー精製産物の確認。矢印の高さに BEND3 が溶出されているのを確認した。

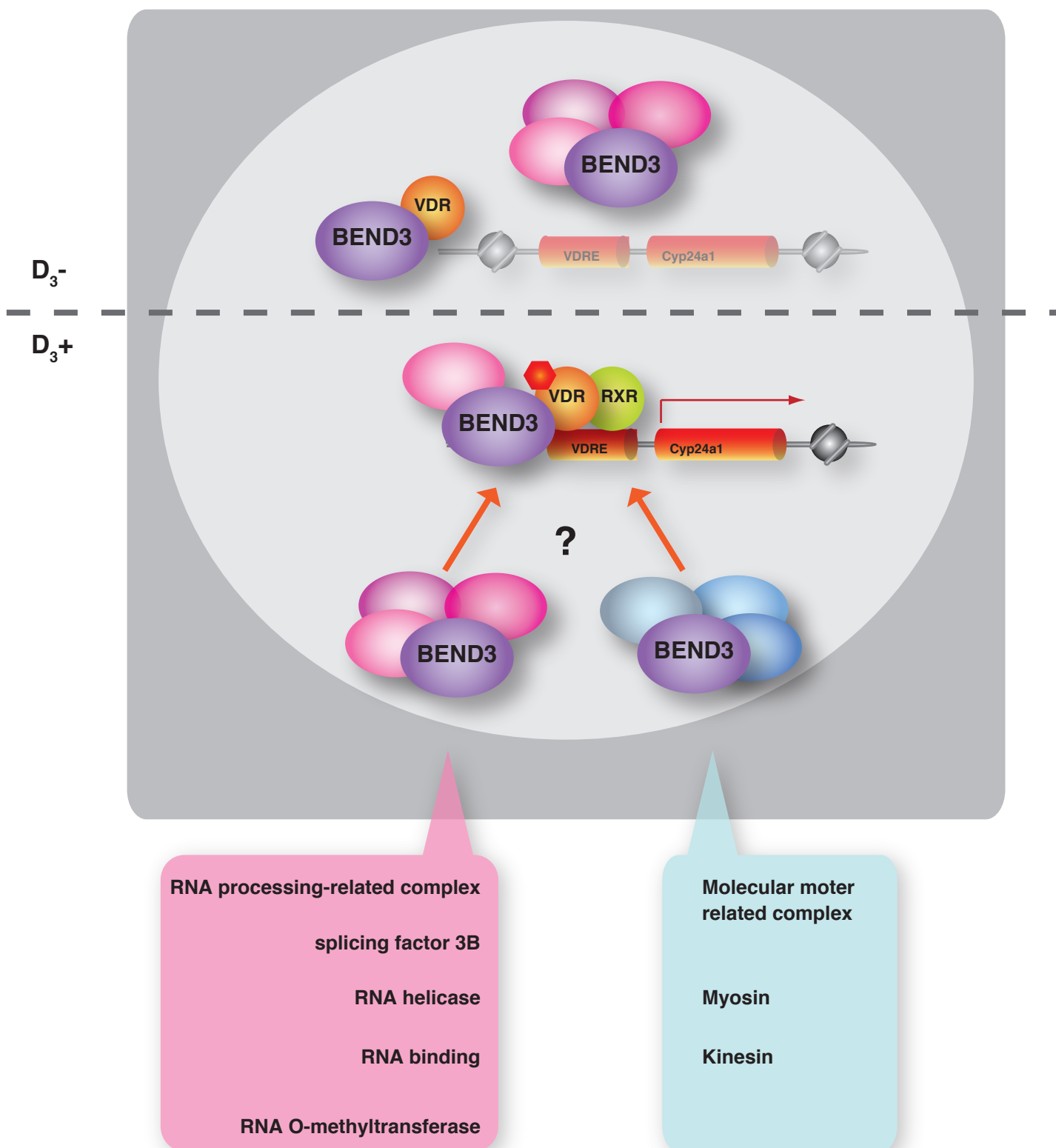


Figure 2-7 本章のまとめ

BEND3 は VDR の転写活性化能を活性化することを見出した。BEND3 は VDR とリガンド非依存的に相互作用した。HT-29 細胞において BEND3 複合体精製を試みた結果、BEND3 は RNA プロセッシング関連因子および、分子モータータンパク質群との相互作用が同定された。

第三章 新たな VDR 共役因子の同定

第一節 緒言

第二章では、VDR の自己ユビキチン化活性を指標に取得した BEND3 について、その機能解析を試みた。VDR には相互作用因子が多いため、BEND3 の取得までには、VDR の複合体を分画するなどして、メディエーター等転写共役因子を含む主要な相互作用因子群を除外する必要があった。

これまでの研究により、VDR の自己ユビキチン化活性には DNA 結合ドメインである C 領域が必要であることが明らかになった(Figure 3-1)。抗 FLAG 抗体免疫沈降産物を用いた検討では、A/B 領域を欠損した物では全長と同程度の自己ユビキチン化活性を有する一方で、A/B/C 領域を欠損させると自己ユビキチン化レベルが減弱した(Figure 3-1 (B))。また、GST 融合 VDR 用いた検討では、GST-VDR (A/B/C)は核抽出液とのインキュベーションに伴い自己ユビキチン化活性を発揮した(Figure 3-1 (C))ことから、VDR の自己ユビキチン化活性は C 領域における複合体形成により発揮されると考えられた。これまで既知となっている VDR 共役因子群の殆どは、VDR の C 末端部分、E/F 領域に結合することが明らかとなっていることから、VDR の N 末端領域を用いた複合体精製を行うことで新規相互作用因子を取得できる可能性が高いと考えた。

そこで第三章では、VDR の A/B/C 領域を用いた複合体精製を行い、VDR の新規相互作用因子取得を試みた。

第二節 材料と方法

第一項 材料

1. プラスミド

GST-VDR(A/B/C): pGEX 4T1 ベクターに mouse VDR の N 末部分(96-422 アミノ酸を欠失)を挿入したもの。

他は第二章第二節を参照。

2. 抗体

ウェスタンブロットティング一次抗体・免疫沈降

MYSM1: Rabbit polyclonal antibody, 以下の合成ペプチドを抗原として Operon biotechnology 社に発注して新規に作製し、アフィニティー精製したものを使用。

(31-44 a.a.)NH₂-C+VLQKDHYLDSSWRT-COOH

(808-822 a.a.)NH₂-NYKSNQENGVTEENC-COOH

クロマチン免疫沈降法

ubH2A: Rabbit monoclonal antibody, Cell Signaling (D27C4)を 1 サンプル当たり 3 μl 使用。

H2A: Rabbit polyclonal antibody, Abcam (ab18255)を 1 サンプル当たり 2 μg 使用。

他は第二章第二節を参照。

4. siRNA

以下は invitrogen 社のデザイン済み Stealth RNAi™より選択した。

siMysm1#1: 5'-UAACCGUGGAAACUGCAGUGCUCUCCU-3'

5'-AGGAGCACUGCAGUUUCCACGGUUA -3'

siMysm1#2: 5'-AUCAACUGCUGUCUGCUGACUUGCG-3'

5'-CGCAAGUCAGCAGACAGCAGUUGAU-3'

siMysm1#3: 5'-GCAGUGAUCUCUUGUUAGA-3'

5'-UCUAACAAGAGAUCACUGC-3'

第二項 方法

1. GST 融合タンパク質の調製

pGEX にクローン化した融合タンパク質発現 vector を大腸菌(BI21)に遺伝子導入し、LBamp で一晩培養した。この培養液 1 ml を LBamp 250 ml に植え、37°C で 2 時間程度

震盪培養した。OD₆₀₀=0.5 程度になったら、25 ml 1M IPTG (final 1%)を加え、30°C で 90 分間培養した。

以下の試薬にはDTT及びP.I.Cocktailを加えて行った。250 ml分の菌を集菌し、PBS-G (PBS(-)に10% glycerolを加えたもの) 40 mlに懸濁し、2 ml 20% Triton-X100 (final 1%)を加え、4°C 30分間攪拌させた。この後、10秒間のsonicationを5回行い、遠心し、上清を取得した。この上清に、glutathione sepharose 4B beadsを200 ml加え、30分程度4°Cで緩やかに回転させた。その後PBS-Gで5回洗浄し、4°Cで保存した。調製したタンパク質は、全て一週間以内に用いた。

2. ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞核抽出液の調製

ここでは、大量培養スケールでの細胞分画方法を述べる。全ての試薬に DTT、P.I.Cocktail、MG-132 を加えて行った。-80°C でセルバンカーに保存した細胞を 37°C で素早く溶かし、2,000 rpm、5 分間遠心し、PBS で洗浄した。まず、低張液で細胞を膨潤させた。細胞ペレットの約 2 倍量の Buffer A (10 mM HEPES pH=7.5、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl)に懸濁し、氷上に 5 分間静置し、Trypan blue(SIGMA)により一部を染色して細胞膜の破砕による核の染色を確認した後、2,000 rpm で 5 分遠心した。この上清は細胞質画分として用いることができる。遠心された細胞核を Buffer A で 2 回洗浄した。次に、高張液で核内タンパク質を抽出する。ペレットの 1.5 倍量の Buffer C (20 mM HEPES pH=7.5、0.2 mM EDTA、1.5 mM MgCl₂、25% glycerol)で細胞核を懸濁した。低温室でマグネチックスターラーを用いて穏やかに攪拌しながら、5 M NaCl を全液量の 1/16-1/15 量(終濃度 300 mM 程度になる様)をゆっくり滴下した。ダウンス型ホモジナイザー (Loose)で 10 回ホモジェナイズした。NaCl を急いで滴下すると DNA が析出して固形化してくるので注意する。

この後、SW28 rotor を用いて 25,000 rpm、4°C で 1 時間超遠心を行い、上清を取得した。これを核抽出液とした。核抽出液は Buffer D (20 mM HEPES pH=7.5、150 mM KCl、0.2 mM EDTA、10% glycerol)で 2 時間以上 3 回透析し、5,000 rpm で 30 分遠心して沈殿物を除き、OD 測定、-80°C 凍結保存、または精製のステップへ進む。

3. GST-VDR 複合体の取得

核抽出液を調製し、Buffer D で透析した後、調製した GST 融合タンパクを加え、ファルコンチューブで 6 時間 4°C にてインキュベートした。インキュベートの後、Buffer D で 10 回洗った後、elution buffer (30 mM reduced glutathione、pH=8.3 in Buffer D)で GST タンパクを競合的に溶出した。ビーズと等量の elution buffer で 30 分・3 回溶出した。

glutathione は溶かすと酸性に傾くので、NaOH 溶液で調製した。

4. MALDI-TOF/MS

ゲル内トリプシン消化は、第二章第二節 9. に参照した方法で行った。但し、最後の過程で蒸発後のペプチドについては、3 μ l の Re-suspension buffer (10 mM ammonium phosphate、0.1% TFA、1mM n-octylglycoside) を加え、震盪させながら溶解させた。

ペプチド断片の質量分布(peptide mass fingerprinting, PMF)測定には、Ultraflex TOF/TOF (Bruker) を用いた。試料の調製には、市販のPrespotted Anchor Chip (Bruker) を用いた。これ以降全ての操作において、あらかじめスポットされているマトリックスをチップの先で触れないように細心の注意を払った。Matrix spot 上に、3 μ l のペプチド断片溶液を滴下し、3 分間静置した。液を除いた後、5 μ l の Wash buffer (10 mM ammonium phosphate、0.1% TFA)にて、スポット全体を覆うように滴下した。脱塩のための洗浄操作なので、滴下後はすぐに液滴を除いた。試料を風乾させた後、すぐにTOF-MS による測定を行った。保存する場合は、窒素ガスを封入し、CHCA マトリックスやペプチド断片が劣化しないように注意する。

PMF 用の測定メソッドには、“Proteomics-HP. Par”を選択した。測定条件はレーザー強度以外変更しなかった。測定誤差を50-100 ppmで抑えるため、試料に最も近い標準スポットを用いて、キャリブレーションを行った。計500-1000 回の積算値を元にしたスペクトルを以下の解析に用いた。

MPF 法による同定

MALDI-TOF MS によって測定したスペクトルは、個々のタンパク特有のトリプシン消化ペプチドパターン (peptide mass fingerprinting; PMF) となる。PMF の照会には、UCSF のProtein Prospector (MS-Fit) 利用した(URL:<http://prospector.ucsf.edu/>)。

ピークリストの作成

まず、Flex Analysis (Bruker) による検索により、モノアイソトープピークを自動リスト化した。ピークが十分に検出されない場合は、取得スペクトルを適宜拡大し、視認操作でモノアイソトープピークを検索した。

Ms-Fit によるデータ検索

今回PMFの参照にはNCBI の最新のデータベース を用いた。“Digest” に“Trypsin”を、“Max. # of missed cleavages” には「1」を、“Cys modified by” には“carbamidomethylation”を選択した(iodoacetamide アルキル化反応を行っているため)。“Species” には“HOMO SAPIENS”を、“MW of Protein” には切り出したバンドサイズの ± 50 kDa 程度を入力し、“Data Paste Area”には作製したピークリストを入力した。また、ネガティブ

コントロール (タンパクを含まないサンプルBuffer のみ) のピークリストを”C-ontaminant Masses”に入力した。この入力により、操作手順による不可避なコンタミピーク (トリプシンの自己消化ピーク、ゲルやサンプルBuffer 由来のコンタミピークなど) を排除した。

5. ルシフェラーゼアッセイ

第二章 7.参照、但し F-HA-MYSM1 の量を 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ とした。

6. Real-Time PCR 法

第二章 6.参照、但し以下のプライマーを用いた。

Mysm1 : 5'-TGGGAGATATGCAAACCAAA-3'

5'-ACAGCCTGTTCCACATCCAAA-3'

7. クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

前日に抗体ビーズを作製した。1 サンプルにつき抗体を 2 μg 、Dynabeads® protein A を 50 μl 使用した。予め 5 mg/ml BSA /PBS でビーズを洗浄し、同 BSA /PBS 溶液に抗体を加え、3 時間以上 4°C でビーズと混和した。これを BSA /PBS 溶液で 2 回、Lysis buffer (LB) 3 (20 mM Tris-HCl (pH=8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、1% TritonX-100、0.1% Na-Deoxycholate、0.1% SDS)で洗浄し、抗体ビーズとした。

細胞については、1 サンプルにつき HT-29 細胞を 10 cm dish 1 枚分用いた。必要に応じて siRNA 処理を行った細胞に適当なビタミン D 刺激を加えた。この細胞に 1%となるように formaldehyde を加え、37°C で 15 分間固定した。固定した細胞を氷冷した PBS にて洗浄・回収した後、まず LB1 (20 mM Tris-HCl (pH=7.5)、10 mM NaCl、1 mM EDTA、0.2% NP-40)に細胞を懸濁して 10 分間氷上に静置し、遠心することで細胞質画分を除去した。続いて LB2 (20 mM Tris-HCl (pH=8.0)、200 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA) に懸濁、氷上静置後遠心することで可溶性核画分を除去した。更に LB3 に懸濁後、ソニケーターを用いて超音波処理を行い、ゲノム DNA を 500 – 1000 bp.程度の断片にした。遠心により夾雑物を除いた上清をクロマチン抽出液として、10%を input として回収した。

クロマチン抽出液に作製した抗体ビーズを加え、4°C にてオーバーナイトで混和した後、RIPA buffer (50 mM HEPES-KOH (pH=7.4)、250 mM LiCl、1 mM EDTA、0.5% Na-Deoxycholate、1% NP-40)でビーズを 5 回洗浄した。上清を完全に除去した後、elution buffer (1 回目: 1% SDS、2 回目: 0.1% SDS、100 mM NaCl /50 mM Tris- HCl (pH=8.0)、10 mM

EDTA)を加え、時々攪拌しながら 65°C にてビーズから DNA-タンパク質複合体を溶出した。先に取得した input にも等量の elution buffer を加え、これら溶出液を 65°C にて 6 時間以上反応させ、DNA-タンパク質複合体の脱クロスリンク反応を行った。更に RNase を加え 50°C で 1 時間、ProteinaseK を加え 50°C で 2 時間以上反応させ、RNA、タンパク質を分解した。PCR purification kit (QIAGEN)により、得られた DNA を精製した。

2 µl の DNA サンプルをテンプレートとし、第二章 6.に示した Real-Time PCR 法に従って定量的 PCR を行った。用いた primer の配列は以下の通りである。

hCYP24-qChIP : 5'-AGCACACCCGGTGAAGTC-3'

5'-TGGAAGGAGGATGGAGTCAG-3'

第三節 GST 融合 VDR アフィニティー精製による VDR 新規相互作用因子取得の試み

本節では、GST 融合 N 末端 VDR (GST-VDR(A/B/C))をベイトに用い、複合体の再構成を行うことで相互作用因子の取得を試みた。

大腸菌より GST および GST-VDR(A/B/C)を調製し、HEK293 細胞由来核抽出液とインキュベーションして複合体の再構築を行った(Figure 3-2 A)。グルタチオンにより競合溶出し、得られた複合体を銀染色により可視化した(Figure 3-2 B)。この結果、特に 1 回目の溶出において GST-VDR (A/B/C)依存的なバンドを数多く取得したが、GST に吸着される非特異的なバンドも多く見られた。2 回目、3 回目の溶出に伴い、得られる相互作用因子のバンドが薄くなったが、その分 GST のレーンには見られず、強固に相互作用している因子が検出できた。そこで、GST より 1 回目の溶出で得られたバンドと、GST-VDR(A/B/C)より 1 回目および 3 回目の溶出で得られたバンドを比較し、特異的に見られたものを切り出し、MALDI-TOF/MS に供した(Figure 3-2 C)。この結果、ヒストン H2A 脱ユビキチン化酵素である MYSM1 (myb-like, SWIRM and MPN domains 1)を同定した。

MYSM1 は JAMM/MPN ドメインを有し、このドメインによりユビキチン付加におけるイソペプチド結合を切断する事で脱ユビキチン化活性を発揮する。また、MYSM1 はヒストンや DNA 結合能を有する SANT ドメイン及び、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 や、クロマチン関連因子に含まれる SWIRM ドメインを有する。更に、核内受容体のコアアクチベーターに多く存在する LXXLL モチーフを C 末端に有している(Figure 3-3 A)。

第四節 VDR の転写制御における MYSM1 の機能解析

第一項 MYSM1 は VDR とリガンド非依存的に相互作用する

まず、第二章第三節第一項と同様の方法で HT-29 細胞の分画を行い、MYSM1 の細胞内の局在をウェスタンブロッティングにより検討した。この結果、BEND3 と同様に MYSM1 も核内に多く存在することが明らかとなった。

続いて、HEK293 における過剰発現系にて、VDR と MYSM1 の相互作用を確認した (Figure 3-3 C)。抗 VDR 抗体で免疫沈降を行った結果、ビタミン D 刺激非依存的に FLAG-MYSM1 のバンドが検出された。更に、HT-29 細胞を用いて内在性 VDR および MYSM1 の相互作用を検討した (Figure 3-3 D)。この結果、IgG のレーンにはない、抗 VDR 抗体特異的なバンドが微弱ながら検出された。このバンドについても、ビタミン D 依存性は見られなかった。このバンドが真に MYSM1 由来のバンドであるか確認するため、MYSM1 のノックダウンを行った HT-29 細胞で同様の検討を行った (Figure 3-3 E)。ノックダウン効率が低く、インプットである細胞抽出液の検出では 2 割程度の減少が見られず、これは抗 MYSM1 抗体で免疫沈降したレーンで検出された MYSM1 の量ともほぼ一致している。抗 VDR 抗体で免疫沈降を行い、MYSM1 を検出したところ、MYSM1 ノックダウンのレーンで MYSM1 のシグナルが減弱していた。また、抗 MYSM1 抗体で免疫沈降を行い VDR の検出を行ったところ、ノックダウンを行っていないレーンでは微弱ながら VDR のサイズの所にバンドが検出できたが、MYSM1 ノックダウンのレーンではバンドが消失した。以上より、MYSM1 はリガンド非依存的に VDR と相互作用することが確認できた。

第二項 MYSM1 は VDR の転写共役因子である

続いて、MYSM1 についても、VDR の転写制御における機能を検討した。MYSM1 については核内受容体の 1 つ、アンドロゲン受容体の共役因子であることが報告されている。この報告では、MYSM1 は H2A の脱ユビキチン化活性を有することおよび、MYSM1 複合体にヒストンアセチル化酵素 p/CAF が含まれることが見出されており、アンドロゲン受容体の転写共役因子であると結論されていた。この報告より、MYSM1 は VDR に対しても転写共役因子として働くのではないかと予想した。まず、HEK293 における過剰発現系を用いてレポーターアッセイを行った (Figure 3-4A)。この結果、MYSM1 量依存的にレポーターの活性が上昇した。また、HT-29 細胞に MYSM1 ノックダウン処理を行い、これにレポーター発現プラスミドを過剰発現することでレポーターアッセイにおける内在性 MYSM1 の影響を検討した (Figure 3-4 B)。この結果、リガンド添加に伴い

2.5 倍程度活性化していた転写が MYSM1 のノックダウンにより 1.5 倍程度にまで減弱した。更に、HT-29 細胞を用いて VDR の標的遺伝子に対する MYSM1 の影響を検討した。三種類の MYSM1 に対する siRNA を用いて MYSM1 をノックダウンし、それぞれの細胞における VDR 標的遺伝子 Cyp24a1 の転写量をリアルタイム PCR で検討した (Figure 3-4 C)。HT-29 細胞のトランスフェクション効率は低く、Mysm1 の転写量を検出した結果、ビタミン D 添加された状態では MYSM1 の転写量は 30%程度しか低下していなかった。この状態で Cyp24a1 の転写量を検討した結果、MYSM1 ノックダウンした細胞において 30%程度の転写量の減少が見られた。これらの結果より、MYSM1 は VDR についても転写共役因子であると結論した。

第三項 MYSM1 は Cyp24a1 遺伝子上流の VDR 結合領域におけるヒストン H2A を脱ユビキチン化する。

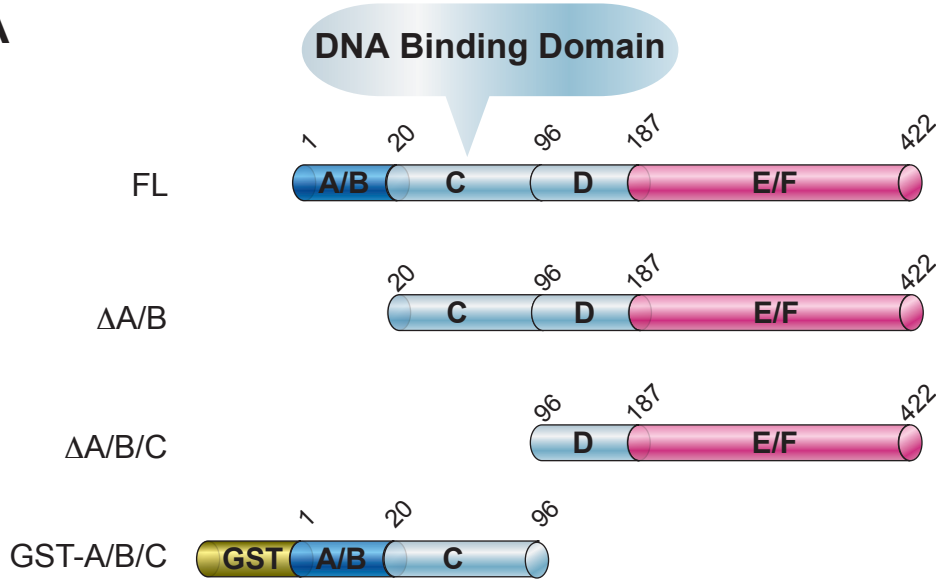
そこで、MYSM1 が VDR の転写共役因子として機能する分子機構を明らかにしようと試みた。MYSM1 がヒストン H2A の脱ユビキチン化酵素として知られていることから、まず VDR 標的遺伝子 Cyp24a1 の既知 VDR 結合領域 (Figure 3-5 A) における H2A のユビキチン化状態を ChIP 法により検討した (Figure 3-5 B)。この結果、ビタミン D 添加による転写活性化に伴い、ユビキチン化 H2A が減少した。そこで、HT-29 細胞において MYSM1 をノックダウンし、同領域で ChIP を行ってユビキチン化された H2A の割合の変化を追った (Figure 3-5 C)。この結果、ノックダウンのコントロール群においては、ビタミン D 添加後 60 分で、ユビキチン化 H2A がリガンド添加時の 6 割程度に減少する一方で、MYSM1 ノックダウン下では、およそ 8 割がユビキチン化されたままであった。以上より、Cyp24a1 遺伝子プロモーターにおいて、MYSM1 は転写の抑制化マークである H2A のユビキチン化を外す役割を有することが明らかとなった。

第五節 小括

本章では、VDR の新規相互作用因子取得のため、今までに行われていない方法を検討した。VDR は他の核内受容体と比較して A/B 領域が極めて短く、20 アミノ酸分しかない。このため、VDR の N 末端領域を用いた複合体精製は今まで行われてこなかったと考える。今回、GST-VDR(A/B/C)を用いて複合体の再構成を行い、新たに MYSM1 を同定した。MYSM1 は LXXLL モチーフを有することから、核内受容体のリガンド存在下において、リガンド結合ドメインと相互作用すると予想されるため、この結果は意外な物であった。免疫沈降法を用いて VDR と MYSM1 の相互作用を確認したところ、リガンド非存在下でも相互作用することが示唆された。

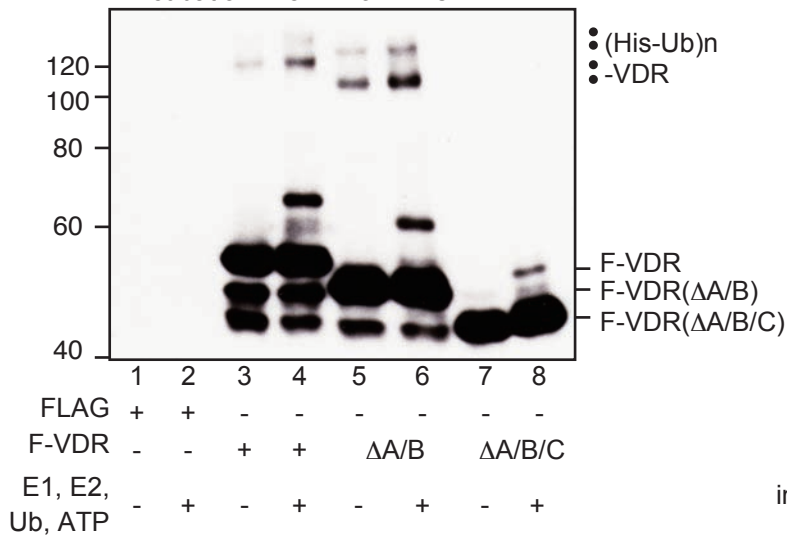
一方で、VDR の転写における機能を検討したところ、MYSM1 の影響はリガンド存在下において顕著であり、VDR の転写活性化能を促進した。そこで Cyp24a1 プロモーター領域について検討した結果、MYSM1 がビタミン D 刺激に伴い H2A を脱ユビキチン化する可能性が示唆された。

A



B *in vitro* ubiquitination assay

IP : αFLAG IB : αVDR
incubation in 37°C for 2 hrs



C *in vitro* ubiquitination assay

GST-VDR (A/B/C) IB : αVDR
incubation in 37°C for 2 hrs

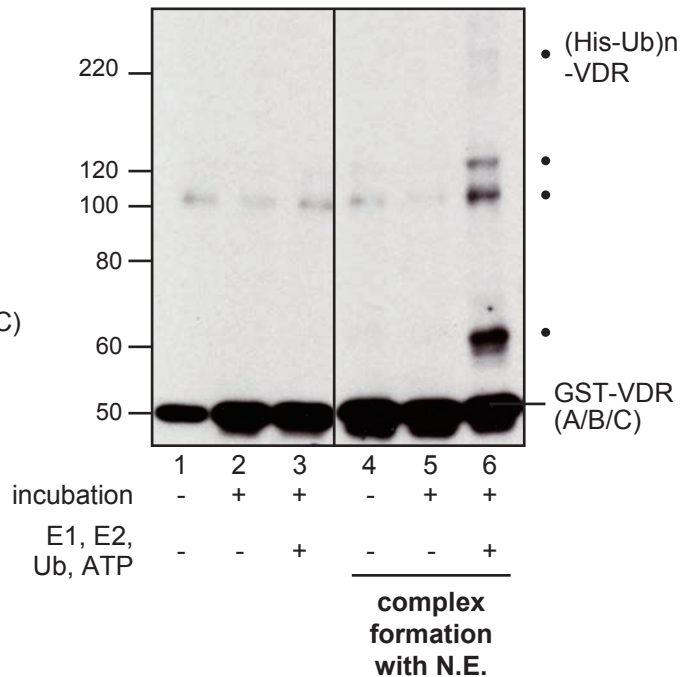


Figure 3-1 修士論文までの研究結果 (VDR の N 末領域は複合体を構成して自己ユビキチン化活性を発揮する)

修士論文では、VDR の C 領域が自己ユビキチン化活性に必要であることを見出した。(A) 用いた VDR のドメイン構造。(B) FLAG-hVDR 及びその変異体の免疫沈降産物を用いた *in vitro* ubiquitination assay の結果、C 領域を用いた場合に自己ユビキチン化のバンドが減弱した。(C) 銀染色による分画した各複合体を可視化 : 0.3 M KCl 溶出画分において相互作用因子が少なく、活性が濃縮されたと予想した。(D) GST-VDR (A/B/C) を用いた *in vitro* ubiquitination assay の結果、この領域は核抽出液とのインキュベーションによる複合体構成の結果、自己ユビキチン化活性を発揮することが明らかとなった。

A HEK293F cell nuclear extract
 ↓ pre-clearing with Glutathione Sepharose 4B beads (1 hr at 4°C)
 ↓ incubation with GST or GST-VDR(A/B/C) (5 hr rotation at 4°C)
 ↓ competitive elution with 30 mM glutathione in Ub assay buffer
 ↓ elute condition check (**B**)
 MALDI TOF-MS (**C**)

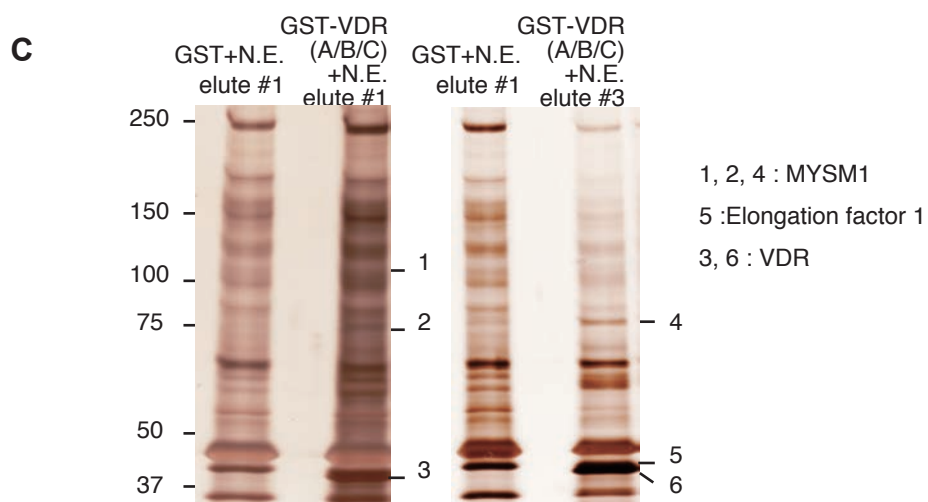
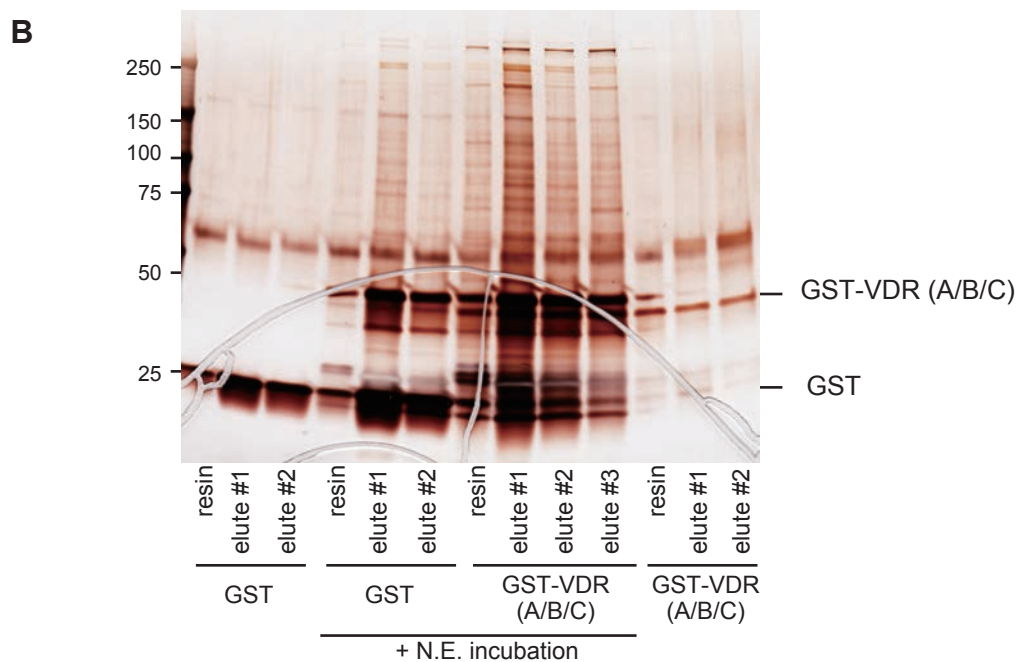


Figure 3-2 GST-VDR(A/B/C) アフィニティー精製による MYSM1 領の同定

(A) GST-VDR (A/B/C) アフィニティー精製スキーム。HEK293 細胞より抽出した核抽出液を用いた。(B) 銀染色による GST タンパク質溶出効率の確認。(C) (B) にて泳動に用いた 3 倍量を 4-20% SDS-PAGE ゲルにより展開し、銀染色により可視化した。GST-VDR (A/B/C) のレーンに特異的なバンドである 1-6 のバンドを切り出して MALDI-TOF/MS に供した。同定された因子を右側に示した。

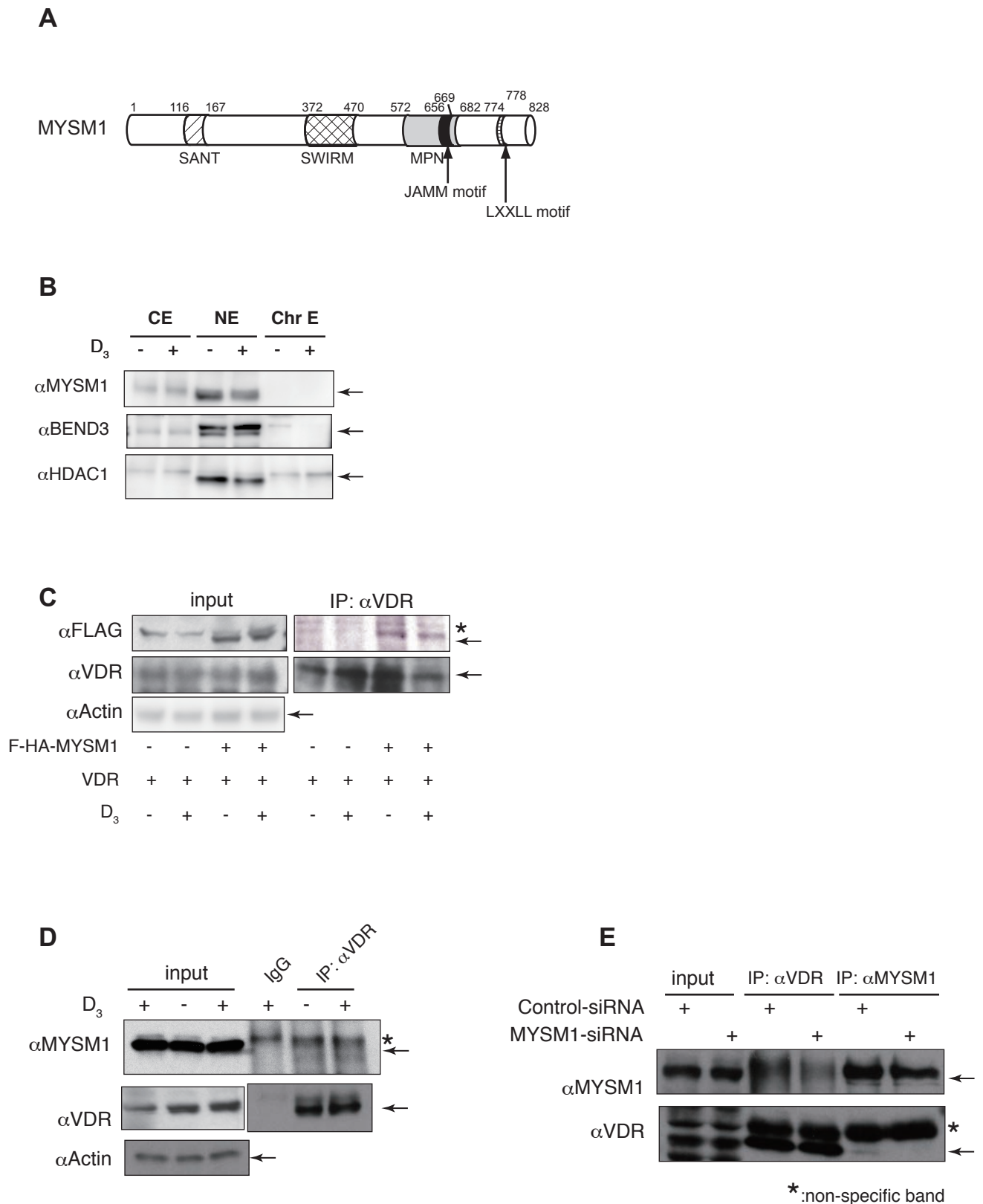


Figure 3-3 MYSM1 は VDR とリガンド非依存的に相互作用する

(A) MYSM1 のドメイン構造。(B) MYSM1 の細胞内局在: リガンド非処理 / 処理した HT-29 細胞を細胞質画分 (CE)、核画分 (NE)、クロマチン画分 (ChrE) に分画したウェスタンブロッティングの結果。HDAC1 は NE のマーカーとして使用した。(C) HEK293 細胞に FLAG-HA-MYSM1 と VDR を過剰発現し、相互作用を確認した。(D) HT-29 細胞を用いて内在性 MYSM1 と VDR の相互作用を検討した。免疫沈降は抗 VDR 抗体で行った。(E) HT-29 細胞にて MYSM1 のノックダウンで抗 VDR 抗体により免疫沈降を行った。MYSM1 ノックダウン下で VDR の相互作用の減弱を確認した。

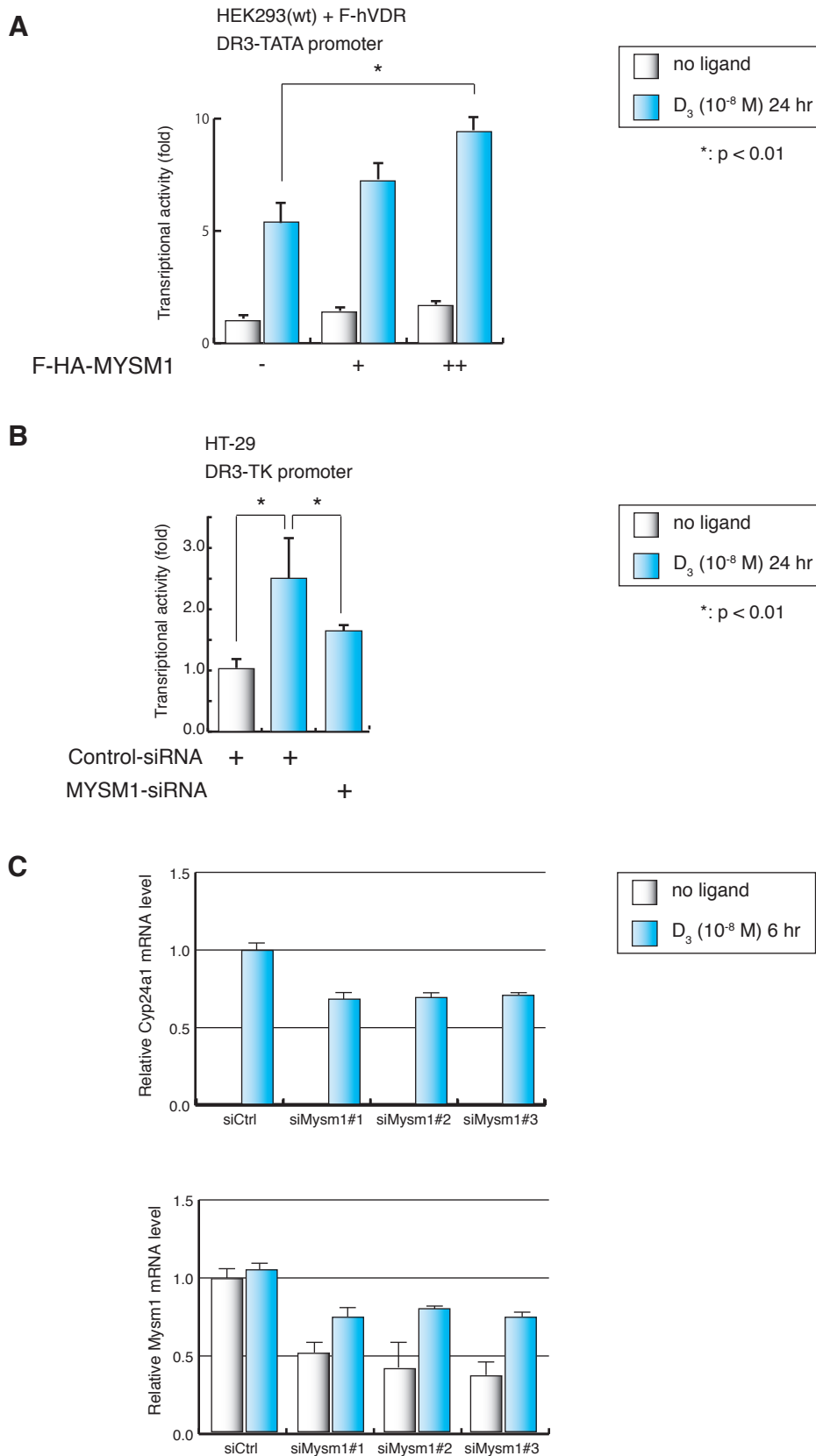


Figure 3-4 MYSM1 は VDR のリガンド依存的なコアクチベーターである

(A) MYSM1 量依存的な VDR の転写活性化能の検出 : HEK293 細胞に VDR、F-HA-MYSM1 及び各種レポータープラスミドを過剰発現し、ルシフェラーゼアッセイを行った。リガンド添加後 24 時間後に細胞を回収した。グラフでは MYSM1 プラスミドをトランスフェクションしないリガンド未添加時の活性を 1 とした。(B) HT-29 細胞に各種 siRNA をトランスフェクションし、(A) 同様にルシフェラーゼアッセイを行った。(C) 内在性標的遺伝子の転写量における MYSM1 の影響 : HT-29 細胞に各種 siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクション後 72 時間後、ビタミン刺激後 6 時間で細胞を回収し、mRNA を抽出した。これを逆転写した物をテンプレートに標的遺伝子 Cyp24a1 及び Mysm1 の転写量を検討した。

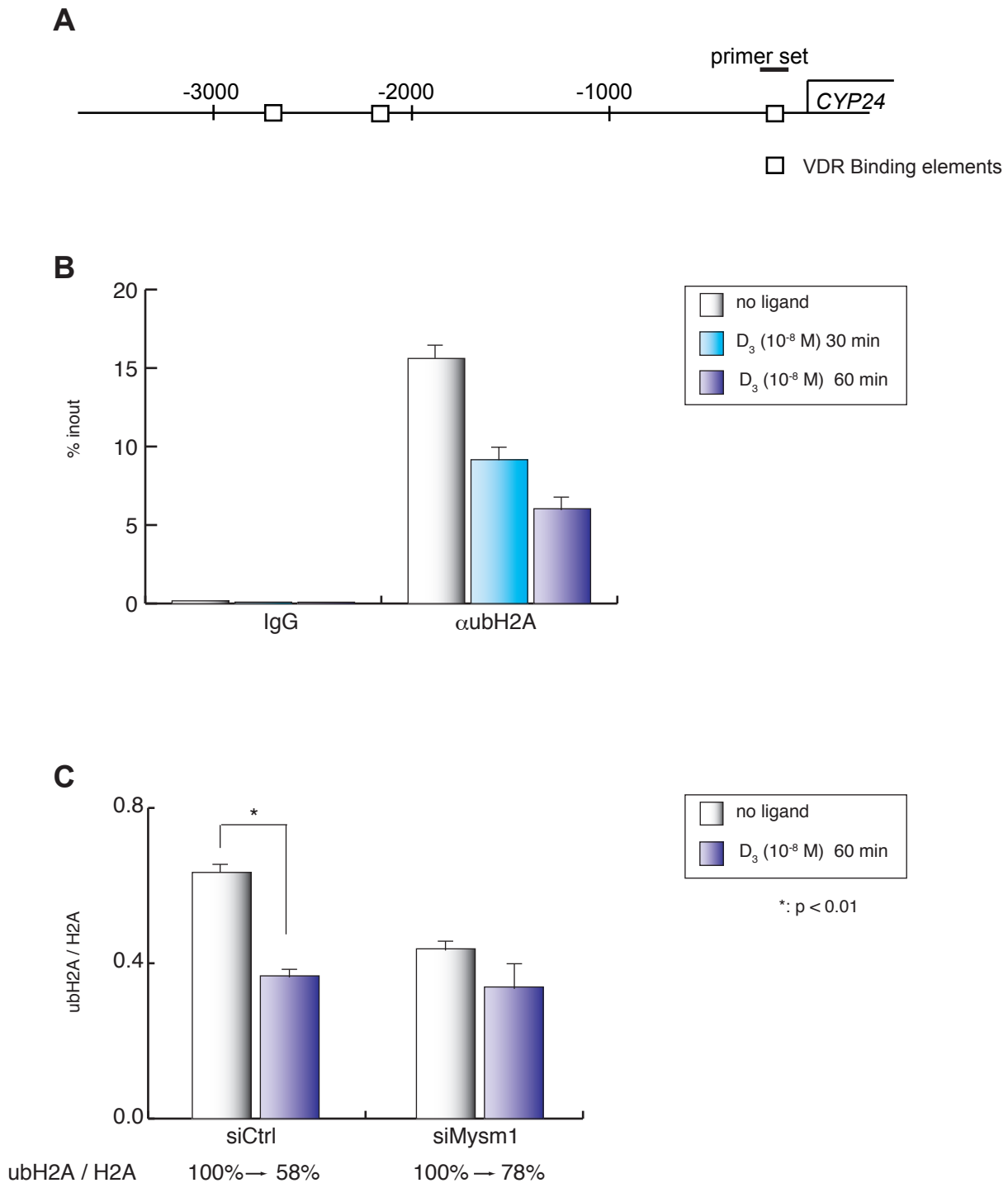


Figure 3-5 MYSM1 は Cyp24a1 プロモーター領域の H2A を脱ユビキチン化する

(A) ビタミン D 標的遺伝子である Cyp24a1 の上流を図示した。VDR 結合領域のうち、転写開始点近傍のプロモーター領域を使用した。(B) 抗ユビキチン化 H2A 抗体を用いて、ビタミン D 添加後 0 分、30 分、60 分における (A) の領域でのユビキチン化 H2A 量を ChIP 法により検討した。(C) H2A のユビキチン化状態において、Mysm1 ノックダウンの影響を検討した。siRNA をトランスフェクションしてから 72 時間後にビタミン D を処理し、60 分後に固定を行った。それぞれの siRNA トランスフェクション下におけるリガンド添加前のユビキチン化 H2A 量を 100% とし、リガンド添加 60 分後のユビキチン化 H2A 量の割合をグラフの下に示した。

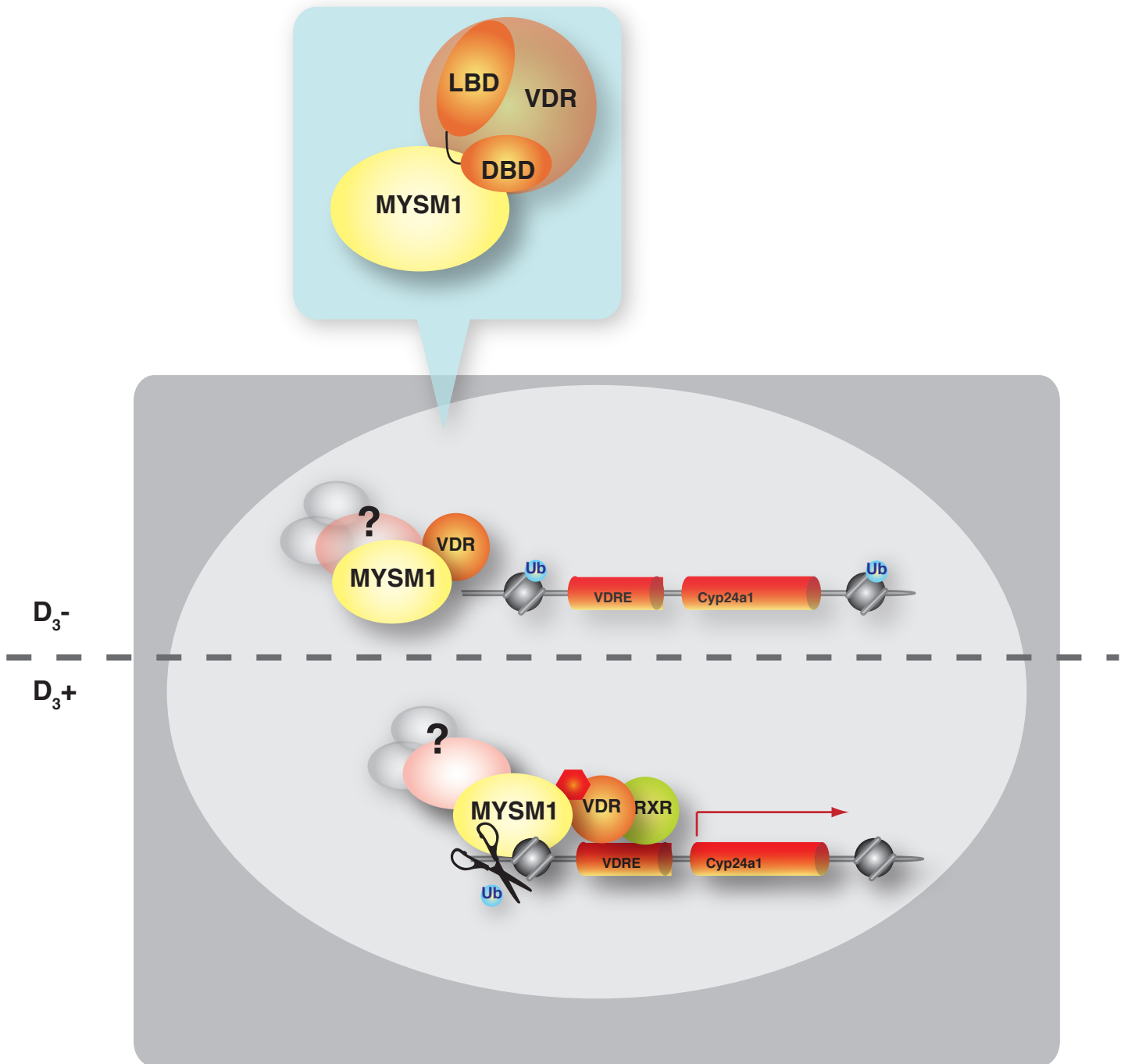


Figure 3-6 本章のまとめ

VDR A/B/C 領域相互作用因子として、MYSM1 を同定した。MYSM1 は VDR とリガンド非依存的に相互作用し、VDR の転写活性化能を促進することを見出した。MYSM1 の分子機能の 1 つとして、VDR 標的遺伝子プロモーター領域のヒストン H2A を脱ユビキチン化することが明らかとなった。