

平成22年 5月 24日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390014

研究課題名（和文） 核内レセプターによる蛋白質分解機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the proteolysis mechanism by nuclear receptors

研究代表者

柳澤 純 (YANAGISAWA JUNN)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50301114

研究成果の概要：

核内レセプターは、ビタミンA、Dなどの脂溶性ビタミン、性ホルモン、脂質などを結合物質とする細胞内受容体であり、多様な生理機能を制御する。

本研究者は、核内レセプターの1つである、エストロゲンレセプター（ER）を分解誘導するE3ライゲースCHIPを見出し、CHIPの発現と乳癌の増悪に負の相関があることを明らかにした。さらに、ERがエストロゲン依存的に標的蛋白質の分解を促すことにより、乳癌の転移を抑制する機能を有することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ユビキチン・核内レセプター・蛋白質分解・転写制御・クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

核内レセプターはビタミンA、Dなどの脂溶性ビタミン、性ホルモン、脂質、コレステロール代謝物などをリガンドとする細胞内受容体であり、発生・分化や生体の恒常性維持などの生物学的局面において重要な役割を担っていることが知られている。ヒトでは48種類の核内レセプターが存在し、それぞれが特異的なリガンドと結合することによって生理機

能を発揮する。リガンドを受容した核内レセプターはDNA上の特異的配列に結合し、下流の遺伝子群の転写を調節する。

核内レセプターによる転写調節には、核内レセプターとリガンド依存的に結合または解離する「転写共役因子」と呼ばれる蛋白質群が必要である。「転写共役因子」は転写を抑制する「転写抑制因子」と転写を活性化する「転写活性化因子」に大別される。転写抑制

因子はリガンドの結合していないレセプターまたはアンタゴニストの結合したレセプターと相互作用してヒストンを脱アセチル化することにより転写を抑制する。一方、転写活性化因子は、リガンドが結合したレセプターと相互作用し、クロマチン構造変換や基本転写因子群との仲介をすることによって転写を促進する。これらのレセプターは生体内の脂溶性低分子と転写を結びつけるという重要な役割を果たしており、その機能破綻は様々な疾患の原因となる。さらに、低分子と結合する性質を持つ核内レセプターは、創薬の格好の標的分子であり、その制御機構や生理機能を明らかにすることは各種疾患の原因解明と新規治療戦略、さらには医薬品開発へと繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

本申請者らは、核内受容体の分解について研究を進め、その過程で、ER を分解ユビキチン化させるユビキチンリガーゼCHIPを見出した。ER と乳癌との相関は知られているが、CHIP と乳癌の関係は全く調べられていない。そこで、CHIP と乳癌の増悪との関係を全く新しい、癌マーカーになりうる可能性を検討する。

さらに、本研究者は、核内受容体はその特異的リガンドの受容体への結合によって自分自身の分解が誘導されることを見出した。また、リガンドの細胞への添加が、核内受容体だけでなく、受容体以外の蛋白質の分解を引き起こすことも発見した。解析を進めた結果、リガンド添加によって分解される蛋白質は、核内受容体と複合体を形成し、リガンド添加によって核内受容体と同時に分解されていることが明らかとなってきた。具体的には、核内レセプターはSmadと結合し、分解を誘導することによってTGF β シグナル系を制御することを発見した。これらの結果は、核内レセプターが転写因子として機能するだけでなく、ユビキチン化制御因子としても機能し得ることを示唆しており、本研究を進めることで核内レセプター研究の予想もしなかった新局面が開けることが予測される。よって、プロジェクトをさらに推進して、最終的には核内レセプターによる標的蛋白質の分解制御メカニズムを解明するとともに、転写・細胞内情報伝達系との関係を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

1) CHIPによる乳癌増悪抑制機構の解析

A) NRDFによるNuRDの転写抑制解除機構の解析

A) - 1 CHIPmRNA量と乳癌のステージとの関係の検討

乳癌の増悪とCHIPの関係を検討するため、RT-PCRを行い、乳癌組織中におけるCHIPのmRNA量の検討を行った。

A) - 2 CHIPの発現量と乳癌腫瘍形成又は転移との関係の検討

乳癌の腫瘍形成とCHIPの関係を検討するため、CHIPの発現量を低下(MCF-7)又は、増加させた(MDA-MB-231)を作成し、マウスの皮下へ移植を行った。また、乳癌の転移とCHIPの関係を検討するため、CHIPの発現量を低下又は、増加させた細胞をマウスの静脈に注射し、肺への転移の違いを観察した。

B) CHIPの下流因子の検討

CHIPの発現量を低下させた乳癌細胞株を用いて、タンパク質量が増加する腫瘍形成又は転移に関与する因子をWestern blottingにより検討を行う。さらに、CHIPのノックダウンにより増加した因子に関して、mRNA量の変化もRT-PCR法により検討を行った。

2) ユビキチン化・分解を介した細胞内情報伝達経路間クロストークの解析

A) ERによるSmad分解機構の解析

ERはSmadに結合し、分解を促進することによりTGF β シグナルを抑制することを我々は見出した。ERは核内レセプター・スーパーファミリーに属し、女性ホルモンであるエストロゲンを受容して標的遺伝子群の転写を制御する「リガンド誘導性転写因子」である。興味深いことに、ERによるSmadの分解にはERのDNA結合領域は必要ない。この結果はSmadの分解が転写を介さないで起こることを示しており、ERのまったく新しい機能が明らかになる可能性を秘めている。そこで、本研究ではERによるSmadの分解機構を分子レベルで解明することを目指す。ERとSmadを共発現させるとエストロゲン異存的にSmadのユビキチン化が促進することから、ERによるSmadの分解は、ユビキチン付加のステップで制御されている可能性が高い。ところが、ERはユビキチン・リガーゼ活性を持たないことから、Smadと結合したERが未知のユビキチン・リガーゼを呼び込むことによってSmadのユビキチン化を促進するものと考えられる。そこで、プロテオミクス技術を用いてSmadとともにERに結合するユビキチン・リガーゼの探索を行う。

B) ERのTGF β パスウェイに対する影響の検討

TGF β の刺激が入力すると細胞内の2ndメッセンジャーであるSmadがリン酸化され、核内に移行し転写因子として働く。本研究ではER

によるSmadの分解がTGF β 依存的転写制御に与える影響を検討する。具体的にはSmadの標的遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子と連結し、ルシフェラーゼ活性を指標としてERを共発現させた場合の転写の変化を検出する。

女性ホルモンであるエストロゲンは、女性生殖器の維持・発達などにおいて重要な役割を果たす一方で、乳癌の増悪因子としても機能するなど、負の側面も併せ持つことが知られている。初期の乳癌患者においてはERの発現上昇が認められており、エストロゲンは乳癌細胞の増殖を促進することが報告されている。一方、癌が悪性化するに伴いERの発現抑制が観察されるため、後期乳癌ではERは乳癌の悪化を抑制するものと一般に考えられている。このような乳癌に対するエストロゲン作用の2相性は、臨床的には長い間知られていたものの、その分子機構については明らかにされていない。大変興味深いことに、TGF β は癌に対してエストロゲンと逆の作用を持つことが知られている。すなわち、初期癌においてはTGF β は増殖抑制を示し、癌の後期においては転移を促進する。我々の見出した結果は、エストロゲンがERを介してSmadを分解し、TGF β シグナルを抑制することを示しており、これらの臨床的観察を極めて明快に矛盾なく説明することが出来る。そこで、ERが実際にSmadの分解を促進することによって癌の転移を抑制することが出来るか否かについて検討を加える。具体的には、ERを発現させた乳癌細胞と発現していない乳癌細胞を用いてマトリゲル・アッセイにてinvasion能を比較する。また、両細胞株をヌードマウスに移植し、転移の有無について検討する。本研究から予想通りの結果が得られれば、癌の転移を抑制する新たな医薬品開発に繋がるものと期待できる。

2) 核内レセプターの蛋白質ユビキチン化制御機構の解析と標的蛋白質の探索

ERも含め、核内レセプターは遺伝子スーパーファミリーを構成しており構造的な相応性が高い。したがって、ER以外の核内レセプターもSmadの分解を促進することによってTGF β シグナルを抑制する可能性が考えられる。そこで、様々な核内レセプターのTGF β シグナルに対する影響を検討する。また、核内レセプターによるユビキチン化の標的蛋白質はSmadのみとは限らない。本研究者はすでにSmad以外の転写因子のユビキチン化が、核内レセプターによって制御されていることを見出している。そこで、本研究では核内レセプターの標的蛋白質をプロテオミクス技術を用いて網羅的に探索する。

4. 研究成果

核内レセプターの1つである、エストロゲ

ンレセプター (ER) をユビキチン化するユビキチンリガーゼCHIPを見出し、CHIPの発現と乳癌の増悪に負の相関があることを明らかにした。さらに、乳癌細胞中のCHIPの発現量を増加もしくはRNAiによって減少させ、乳癌の腫瘍形成と肺転移に対する影響を検討した。その結果、CHIPの発現量増加は、乳癌の腫瘍形成と肺転移を強力に抑制し、逆に、発現量低下は腫瘍形成と転移を促進することが明らかになった。さらに、CHIPの乳癌増悪抑制メカニズムを探るため、CHIPの標的となる蛋白質を探索し、Amplified In Breastcancer1 (AIB1)を同定した。CHIPはAIB1をユビキチン化し、分解を誘導することで乳癌の転移を抑制することが明らかとなった。AIB1は転写因子であり、Smad, Twistといった転写因子の上流に位置してこれらの因子の転写を促進し、乳癌の転移を促進していることも併せて明らかにした。

さらに、CHIPの乳癌増悪抑制メカニズムを探るため、CHIPの標的となる蛋白質を探索し、Amplified In Breastcancer1 (AIB1)を同定した。CHIPはAIB1をユビキチン化し、分解を誘導することで乳癌の転移を抑制することが明らかとなった。

核内レセプターの1つである、エストロゲンレセプター (ER) がTGF β 経路の細胞内メッセンジャーであるSmadと結合し、ユビキチン化と分解を誘導することを見出した。TGF β は癌の転移を促進するが、ERはTGF β シグナルを抑制することによって癌の転移を強く抑制することが明らかになった。

また、エストロゲンレセプター (ER) のリガンドがER β を介して転写因子KLF5の転写を制御することを見出した。ERリガンドのうちの1つである、ICI 182,780 (ICI)によりKLF5による転写は活性化され、エストロゲン (E2)により抑制された。次に、KLF5の標的遺伝子の探索をおこなった結果、アポトーシス誘導転写因子であるFOXO1を同定した。ICIによりFOXO1のmRNA量は増加し、E2により減少することが明らかとなった。このFOXO1のmRNA量の増加は、ER β を介したCBPのリクルートによるものであり、減少は、ER β を介した分解によるものであることを明らかにした。この分解にはWWP1が関与することを明らかにした。ER β 、KLF5とWWP1は3者複合体を形成し、この複合体の割合がE2依存的に増加することで、KLF5のユビキチン化量が増加し、E2依存的に分解が誘導されることを明らかにした。次に、担癌マウスモデルを用いた実験により、KLF5は前立腺癌の腫瘍形成に対して抑制的に働くことを明らかにした。さらに、E2は前立腺癌の腫瘍形成を促進し、ICIは抑制することが明らかになった。このERリガンドによる制御は、ER β とKLF5を介していることをRNAiの実験により明らかにした。

また、E2 添加時の腫瘍において KLF5 のタンパク質量が減少していたことから、この E2 による前立腺癌の腫瘍形成亢進は ERβ を介した、KLF5 の分解によるものであることが明らかになった。

さらに、他の核内レセプターである、ビタミン D レセプター (VDR) が TGF-β 経路の細胞内メッセンジャーである Smad と結合し、TGF-β シグナルを 1α, 25 依存的に抑制させた。その結果、Smad の標的遺伝子である PAI-1 の mRNA 量を減少させることを明らかにした。さらに、1α, 25 は VDR 依存的に、大腸癌細胞の転移・浸潤能を抑制することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Ito I, Hanyu A, Wayama M, Goto N, Katsuno Y, Kawasaki S, Nakajima Y, Kajiro M, Komatsu Y, Fujimura A, Hirota R, Murayama A, Kimura K, Imamura T, Yanagisawa J. Estrogen inhibits TGF-β signaling by promoting Smad2/3 degradation. *The Journal of biological chemistry*, 査読有 2010, In press
- ② Takemoto A, Maeshima K, Ikehara T, Yamaguchi K, Murayama A, Imamura S, Imamoto N, Yokoyama S, Hirano T, Watanabe Y, Hanaoka F, Yanagisawa J, Kimura K. The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A. *Nature Structural & Molecular Biology*, 査読有 Vol.16, No.12, 2009, pp.1302-1308
- ③ Mikogai A, Yanagisawa J, Yasuzawa-Tanaka K, Murayama A. The nucleolar protein NML regulates hepatic ATP levels during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有 Vol.390, No3, 2009, pp.591-596
- ④ Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, Kawasaki S, Oie S, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J. KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ERα. *Oncogene*, 査読有 Vol.28, No32, 2009, pp.2894-2902
- ⑤ Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y, Kawanowa K, So-ma K, Ito I, Yamaguchi Y, Ohie S, Kobayashi Y, Seino Y, Kawano M, Kawabe YI, Takei H, Hayashi S, Kurosumi M, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J.

The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.* 査読有 Vol.11, No3, 2009, pp.312-319

- ⑥ Ema M, Mori D, Niwa H, Hasegawa Y, Yamanaka Y, Hitoshi S, Mimura J, Kawabe Y, Hosoya T, Morita M, Shimosato D, Uchida K, Suzuki N, Yanagisawa J, Sogawa K, Rossant J, Yamamoto M, Takahashi S, Fujii-Kuriyama Y. Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell*. 査読有 Vol.3, No5, 2008, pp.555-567
- ⑦ Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Simizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*. 査読有 Vol.133, 2008, pp.627-639
- ⑧ Komatsu Y, Ito I, Wayama M, Fujimura A, Akaogi K, Machida H, Nakajima Y, Kuroda T, Ohmori K, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J. PPARγ ligands suppress the feedback loop between E2F2 and cyclin-E1. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 Vol.370, No.1, 2008, pp.145-148
- ⑨ Takemoto A, Murayama A, Katano M, Urano T, Furukawa K, Yokoyama S, Yanagisawa J, Hanaoka F and Kimura K. Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. *Nucleic Acids Res.* 査読有 Vol.35, 2007, pp.2403-2412

[学会発表] (計 20 件)

- ① 核内受容体の新しいネットワークと化学物質による制御. 柳澤 純. 日本薬学会第 130 年会 2010. 3. 28-30. (就実大学 岡山)
- ② 核小体因子 Nucleomethylin によるエネルギー消費調節機構と細胞内エネルギー代謝. 柳澤 純. 生体調節研究所シンポジウム 2010. 3. 17. (群馬大学生体調節研究所 群馬)
- ③ Nucleolus and Cancer. Junn Yanagisawa. International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010 2010. 2. 17-18. (長崎大学 長崎)
- ④ ユビキチンリガーゼ CHIP プロモーターのエピゲノム情報操作による革新的乳癌治療法の開発. 柳澤 純. 彩都産学官連携シンポジウム 2010. 1. 14. (千里ライフサイエンスセンター 大阪)
- ⑤ 核内受容体の新規機能と癌. 柳澤 純.

- 第 12 回 Osaka University Advanced Medical Seminar 2009.12.24-25. (大阪大学 大阪)
- ⑥ Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. 柳澤 純. 第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2009.12.9-12. (パシフィコ横浜 横浜)
- ⑦ 核内受容体によるエピゲノム制御. 柳澤 純. 第 82 回日本生化学会大会 2009.10.21-24. (神戸ポートアイランド 神戸)
- ⑧ エネルギー代謝と肥満症. 柳澤 純. 第 30 回日本肥満学会 2009.10.9-10. (アクトシティ浜松 浜松)
- ⑨ 乳癌・前立腺癌における核内レセプターの新規機能とその制御. 柳澤 純. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009.10.1-3. (パシフィコ横浜 横浜)
- ⑩ がんの進展とタンパク質分解. 柳澤 純. 千里ライフサイエンス振興財団平成 21 年度セミナー 2009.9.7. (千里ライフサイエンスセンター 大阪)
- ⑪ 「がんとユビキチンリガーゼ」について. 柳澤 純. 第 10 回ホルモンと癌研究会 2009.7.31-8.1. (長陵会館 仙台)
- ⑫ 核内レセプターの新規パスウェイとがん. 柳澤 純. 大阪大学蛋白質研究所セミナー 2009.6.28-29. (大阪大学蛋白質研究所 1F 講堂 吹田キャンパス)
- ⑬ 柳澤 純. 第 9 回 TCカンファレンス (興和製薬株式会社) 2009.6.6. (興和製薬株式会社 東京)
- ⑭ 環境因子によるエピジェネティクス制御. 柳澤 純. 第 5 回宮崎サイエンスキャンプ 2009.2.20-22. (ワールドコンベンションセンター サミット宮崎)
- ⑮ Estrogen enhances prostate cancer progression by inducing KLF5 degradation. Junn Yanagisawa. 2008.12.9-12. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) (神戸ポートアイランド)
- ⑯ eNoSC, a novel protein complex, senses intracellular energy status and epigenetically controls the rDNA locus. Junn Yanagisawa. THE 21ST NAITO CONFERENCE ON Nuclear Dynamics and RNA[I] 2008.6.25 (八ヶ岳ロイヤルホテル)
- ⑰ 核内レセプターの新規機能と創薬. 柳澤 純. 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会合同大会 2007.12.13. (パシフィコ横浜)
- ⑱ 核内受容体の新規機能と癌転移抑制. 柳

- 澤 純. 第 10 回癌と骨変病研究会 2007.11.17. (癌研有明病院 吉田講堂)
- ⑲ Nuclear receptor dependent protein degradation and cancer metastasis. Junn Yanagisawa. The 3rd DECODE for Biological Responses International Meeting 2007.8.4. (日本科学未来館)
- ⑳ 癌化のスイッチ～ホルモンと癌の関係～ 柳澤 純. 高校生と市民のための公開講座 知っておこう！環境がゲノムに作用する仕組み～生命のスイッチ～ 2007.7.28. (筑波大学総合研究棟 A 1 階 110 講義室)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 純 (YANAGISAWA JUNN)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50301114