

欠失変異体を用いた Rat Estrogen Receptor  
の機能解析

今門 純久

①

The N-terminal Transactivation Domain of Rat Estrogen Receptor is Localized in a Hydrophobic Domain of Eighty Amino Acids

欠変異体を用いた Rat Estrogen Receptor の機能解析

今門純久

## 要約

ラット・エストロゲンレセプター (rat ER) の機能を解析するために、一連の rat ER の欠失変異体を作成し、この欠失変異体の発現ベクターをエストロゲン反応性のレポーター・プラスミドである ERE-tk(197)-CATとともに COS7細胞にトランスフェクトした。CAT活性を測定することで、作成した変異体によるレポーター・プラスミドの転写の活性化を調べた。Rat ER のアミノ末端から 59 番目の alanine から 140 番目の glutamate の間の疎水性の領域が、転写の活性化に重要であると判明した。また、異なるレポーター・プラスミドを用いた実験により rat ER による転写の活性化に重要な別のファクターの存在の可能性が示唆された。

## 緒論

ホルモンは、各種内分泌器官において合成・分泌され、体液とともに体内を循環して、特定の組織（標的器官）の活動に一定の変化を与える。ホルモンは、標的器官に存在するレセプターを介して（すなわち、それぞれのホルモンに特異的なレセプターに結合して）、ホルモン作用を発揮する。ホルモンは、ペプチドホルモン、ステロイドホルモン、アミノ酸誘導体ホルモンなどに大別されるが、最近、ホルモンの作用機序の分子生物学的詳細が、明らかになってきた。

ステロイドホルモンレセプターは、チロシンキナーゼ型レセプターなど細胞膜に存在する膜レセプターと異なり、少なくともホルモンが結合して活性化した状態では核内に存在し、クロマチン内の標的遺伝子近傍のレセプター結合部位に結合して、標的遺伝子の転写をホルモン依存性に制御する<sup>1)</sup>。グルココルチコイド、エストロゲン、アンドロゲンなどステロイドホルモンのレセプターのcDNAは既に多種属においてクローン化され、得られたcDNAのホモロジー解析や、培養細胞においてホルモンレセプターを発現させCAT遺伝子の転写制御を調べる、今回我々が用いた実験系等の普及により、ステロイドホルモンレセプターの構造や機能、特に、転写制御機構について新しい知見が次々と得られた。

エストロゲンレセプター(ER)は、リガンド依存性にestrogen response element (ERE) と呼ばれる特徴的塩基配列を認識して遺伝子の転写を制御する<sup>2,3)</sup>。現在までに、ER cDNA は、ヒト<sup>4,5)</sup>、ラッ

ト<sup>19</sup>、マウス<sup>20</sup>、ニワトリ<sup>21</sup>、ツメガエル<sup>22</sup>などの種においてクローン化されている。さらに、得られた各種ERにおいてアミノ酸配列を比較して、ERの各部分部分におけるアミノ酸保存の割合により、ERは領域AからFまでの6つの領域に分けられている<sup>23</sup>。アミノ酸の保存度の高い3つの領域が知られており、中央に存在する領域CはDNAに結合し、カルボキシル末端側の領域Eはエストロゲンに結合することが判明しているが<sup>24,25</sup>、アミノ末端側の領域Aの機能は、はっきりとは知られていない。この研究の最初の目的の1つは、この領域Aの働きを調べることであった。そのため、一連のrat ERの欠失変異体を作成し、この変異体プラスミドをツメガエルのピテロゲニンA2遺伝子のERE<sup>26</sup>を持ったエストロゲン反応性のレポーター・プラスミドERE-tk(197)-CATとともにCOS7細胞にトランスフェクトした。それぞれの変異体ごとにCAT活性を測定し、変異体ERによるレポーター・プラスミドの転写の活性化を定量化した。

## 材料および方法

### <プラスミドの構築>

レポーター・プラスミド tk(197)-CAT は、pSV2CAT<sup>17)</sup> の SV40 の初期プロモーター領域の AccI-HindIII 断片を Herpes simplex virus のサイミジン・カイネース(tk) プロモーター (-197 から +51 まで)<sup>18)</sup> で置き換えたものである。ERE-tk(197)-CAT は、tk(197)-CAT の tk断片の前に、ツメガエルのピテロゲニン A 2 の塩基配列 (-334 から -289 まで)<sup>20)</sup> を含む合成オリゴヌクレオチドを持っている。rat ER 野生株の発現ベクターである pSV2RcER は、既に、詳述されている<sup>6)</sup>。プラスミド rERORF は、pSV2RcER の 5 プライム非翻訳領域の大部分を欠く代わりに、その領域に 21 塩基の長さの open reading frame を有している。プラスミド rERN $\Delta$ 0 では、rERORF の 5 プライム非翻訳領域の小さな open reading frame が、除いてある。残りのアミノ末端側欠失変異体は以下のように構築された。すなわち、5 プライム側と 3 プライム側に HindIII サイトと BamHI サイトをそれぞれ持ち Kozak の開始コードンに関するコンセンサス配列 (5'-ACCATGG-3')<sup>19)</sup> を in-frame になるように有したイニシエーション・アダプターを、BAL31 ヌクレアーゼにより種々の欠失を加えた ERcDNA の BamHI-XbaI 断片と、pSV2RcER の HindIII-XbaI のベクター側断片にライゲーションした。カルボキシル末端側欠失変異体のうち、rERC $\Delta$ 235、rERC $\Delta$ 281 と rERC $\Delta$ 430 の 3 つは、pSV2RcER を ClaI か XbaI か BglII で切

断し、3プライム側に BglII サイトを持ち塩基配列 (5'-TGAGTGA-3') を含むターミネーション・アダプターをライゲーションした後 HindIII と BglII で切断、この断片を pSV2  $\beta$ -globin<sup>11</sup> の HindIII-BglII のベクター側断片にライゲーションした。他のカルボキシル末端側欠変異体や内部欠変異体も類似の方法で作成した。

#### <トランスフェクションとCATアッセイ>

COS7 細胞は、10%の胎児牛血清 (FCS) を含んだ Eagle's minimum essential medium (MEM) 中で維持継代された。

#### プロトコール1

トランスフェクションの前日、 $1 \times 10^5$  個の COS7 細胞を 10 cm シャーレにまく。培地は、10%の新生児牛血清 (NBCS) を含んだ MEM とする。トランスフェクションの1時間前に、培地を10%のチャコール処理NBCSに代え、タモキシフェンを  $5 \times 10^{-5}$  M に加える。トランスフェクションは、リン酸カルシウム法<sup>14)</sup>による。すなわち、1シャーレあたり  $8 \mu\text{g}$  のレセプターの発現ベクターと  $2 \mu\text{g}$  の ERE-tk(197)-CAT または tk(197)-CAT を加えた。4時間後、グリセロール・ショック<sup>15)</sup>を行った。その後、10%のチャコール処理NBCSと  $5 \times 10^{-5}$  M のタモキシフェンを含む培地で細胞を培養した。2シャーレ1組で、実験を行い、一方には、 $17\beta$ -estradiol を  $5 \times 10^{-7}$  M に加え、他方には、加えなかった。細胞は、トランスフェクシ

ンの48時間後に集められ、細胞抽出物のタンパク質濃度を Bradford<sup>16)</sup> の方法で測定した。Gormanら<sup>13)</sup>の方法でCAT活性を測定した。このプロトコールでは、トランスフェクションの効率は、 $\beta$ -galactosidase法ではなくタンパク質濃度で補正した。何故なら、効率補正用のプラスミドである pCH110 に由来する  $\beta$ -galactosidase 活性は、このプロトコールの条件ではエストロゲンの存在下で明らかに抑制を受けたからである。この抑制の機序や生物学的重要性は不明であるが、同様の現象が Meyerら<sup>17)</sup>によって報告されている事は注目に値する。

#### プロトコール 2

トランスフェクションの前日、 $1 \times 10^6$  個の COS7 細胞を 10 cm シャーレにまく。培地は、10%のチャコール処理NBCSを含んだMEMとする。トランスフェクションの1時間前に、培地を交換する。トランスフェクションは、リン酸カルシウム法<sup>14)</sup>による。すなわち、1シャーレあたり0.05  $\mu$ gのレセプターの発現ベクターと2  $\mu$ gの ERE-tk(197)-CAT または tk(197)-CAT に、 $\beta$ -galactosidase の発現ベクターである pCH110 (Pharmacia) を 2.5  $\mu$ g、pGEM3Zf(-) (Promega) 5.45  $\mu$ gを加えた。4時間後、グリセロール・ショック<sup>15)</sup>を行った。その後、10%のチャコール処理NBCSを含む培地で細胞を培養した。2シャーレ1組で、実験を行い、一方には、17 $\beta$ -estradiol を  $1 \times 10^{-8}$  Mに加え、他方には、加えなかった。細胞は、トランスフェクションの4

8 時間後に集められ、細胞抽出物の  $\beta$ -galactosidase 活性を Herbomel ら<sup>120)</sup>の方法で測定した。Gorman ら<sup>111)</sup>の方法で CAT 活性を測定した。このプロトコールでは、タモキシフェンは培地から除いた。何故なら、タモキシフェンは、ある条件下ではエストロゲンのアゴニストとしての活性を持つ事<sup>17)</sup>が判明したからである。一方、プロトコール 1 を用いると高い background の活性が得られた。この結果は、リガンド非依存性の転写活性化が起こっていることを意味するのかもしれない。mouse ER は、ある程度のリガンド非依存性の転写活性化を示すとされている<sup>120)</sup>。おそらく rat ER もエストロゲンなしでも ERE にある程度くっつき、ある程度の転写活性化をおこすのかもしれない。プロトコール 1 でタモキシフェンを除いてもこれらの background の活性は明かには変化しない(図 1) ことより、この活性が、単に、タモキシフェンの持つエストロゲンのアゴニストとしての活性<sup>17)</sup>によるものだとは言えない。

## 結果

<アミノおよびカルボキシル末端欠失変異体による rat ER の解析>

rat ER のどの領域が転写活性化能を持つかを決定するために、一連のアミノおよびカルボキシル末端欠失変異体を作成した(詳細は、材料および方法を参照)。図2に示すこれらの欠失変異体の相対的な転写活性化能をCATアッセイを用いて比較した。図3に、CATアッセイの結果を示す。図3に示した実験(トランスフェクションおよびCATアッセイ)を5回繰り返し、図4にまとめた。値は、tk(197)-CAT と pSV2RcER を co-transfect して得られた CAT 活性を基準として相対活性で表してある。Rat ER 野生株の発現ベクターである pSV2RcER を ERE-tk(197)-CAT と co-transfect するとエストロゲン依存性に転写活性化能を発揮する(図3の3および4、ならびに図4)。一連のアミノ末端欠失変異体を作成して転写活性化能を調べた。アミノ末端から81番目の serine まで欠失させても転写活性化能は、ほとんど失われない(図3の5から18、ならびに図4)。しかし、110番目の proline や140番目の glutamate まで欠失させると野生株のそれぞれ60ないしは10%まで活性が落ちる(図3の19から22、ならびに図4)。DNA結合ドメインの中央に存在するアミノ末端から246番目の arginine まで欠失させるとエストロゲン依存性の CAT 活性の上昇は認められない(図3の25および26、ならびに図4)。次に、カルボ

キシル末端からの欠失の転写活性化能に対する影響を調べた。エストロゲン結合ドメインのおおよそ半分を欠失する変異体は、CAT活性を上昇させない(図3の35および36、ならびに図4)。これは、human ERについてのKumarらの報告<sup>23)</sup>によく一致する。しかし、カルボキシル末端のisoleucine からアミノ末端から341番目のproline までを欠失した変異体である rERC $\Delta$ 341 では、CAT 活性をエストロゲン非依存的に上昇させる。この結果も human ER においてエストロゲン結合ドメインの大部分を欠失させると変異レセプターは弱いながら恒常的な転写活性化能を持つという結果<sup>23)</sup>に一致する。この CAT 活性の上昇は、さらに24アミノ酸を欠失させた rERC $\Delta$ 317 では、消失する(図3の31から34、ならびに図4)。これらの結果は、rat ER が2つの転写活性化ドメインを持つこと(すなわち、1つをカルボキシル末端側、316番目の threonine と341番目の proline との間に、もう1つをアミノ末端側、おそらく140番目の glutamate の直前あたりに)を示唆する。

<アミノ末端側の転写活性化ドメインについての、さらなる検討>

アミノ末端側の転写活性化ドメインの正確な位置を決めるために、いくつかの内部欠失変異体を作成した。それらの変異体は、図5にCATアッセイの結果とともに示してある。ここでは、実験にプロトコール2を用いた。トランスフェクトす

るレセプターの発現ベクターの量を大幅に減らすことで、プロトコール1よりもC A Tアッセイにおいてbackgroundが、低くなったからである。変異レセプターの転写活性化能は、図5の右サイドに、野生株レセプター pSV2RcER を100%として表してある。DNA結合ドメインのアミノ末端側に近接して比較的狭い範囲に転写活性化ドメインが存在する可能性を検討するために、rER $\Delta$ (168/176)とrER $\Delta$ (168/183)の2つの変異体を作成した。2つの変異体共に、野生株と同等の転写活性化能を保っていた(図5の7から10)。この結果とrERN $\Delta$ 110とrERN $\Delta$ 140の間で転写活性化能が劇的に低下することを考えあわせて、我々は、アミノ末端側の転写活性化ドメインは110番目のprolineと140番目のprolineの間の比較的小さい領域に存在するものと予想し、内部欠失変異体rER $\Delta$ (111/140)を作成した。転写活性化ドメインが、110番目のprolineよりアミノ末端側に広がっている可能性も考えてrER $\Delta$ (104/110)を、また、図3ならびに図4の結果より転写に影響がないと思われる領域を欠いたrER $\Delta$ (59/81)も作成した。結果は、3つの変異体共に、充分の転写活性化能を有することがわかった(図5の11から16)。そこで、アミノ末端側の転写活性化ドメインは比較的広い領域より構成されるものと考えてrER $\Delta$ (104/166)とrER $\Delta$ (59/140)を作成した。転写活性化能を計算するとそれぞれ19%と10%となった(図5の17から20)。rERN $\Delta$ 140が5%の活性を持つことを考慮すると(図5の5および6)、rER $\Delta$ (59/140)の1

0%の活性は充分減弱したものと考えて、アミノ末端側の転写活性化ドメインは、59番目のalanineと140番目のglutamateの間の領域に存在するものと結論した。この領域は、図6に示すように高い疎水性を特徴とする。この領域は、44個(54%)の疎水性のアミノ酸を有し、また、prolineを13%と比較的多く含んでいた。estrogen-binding assay<sup>20)</sup>の結果よりrERN $\Delta$ 140もrER $\Delta$ (59/140)も細胞中で野生株のERと同等に合成されていることが判明した。すなわち、これら2つの変異体がほとんど転写活性化能を有さないのは、変異体タンパク質の発現レベルが低いためではないことがわかった。

<変異体レセプターによる転写活性化に及ぼすレポーター・プラスミドの相違の影響>

レポーター・プラスミドとしてERE-tk(197)-CATの代わりにpBLCAT<sup>21)</sup>のSphI-PstIサイトにピテロゲニンA2のERE<sup>21)</sup>を持ったERE-tk(105)-CATを使用すると転写活性化の程度が変化する。ERE-tk(105)-CATをレポーターにするとrERN $\Delta$ 140やrER $\Delta$ (59/140)は、充分な転写活性化能を有する(図7)。

### 考察

ステロイドホルモンレセプターの中央に存在するDNA結合領域は各ステロイドホルモンレセプター間で特に高いホモロジーを示し、ツメガエルの5S rRNAの転写制御因子であるTF III Aのメタル結合フィンガーに類似の構造を2カ所持っているが、この領域にhormone response element (HRE)の識別能力のあることが以下のように証明された。すなわち、グルココルチコイドホルモンレセプター (GR) は、glucocorticoid response element (GRE)に結合して転写を活性化し、ERはEREに結合して転写を活性化するが、human GRとhuman ERのDNA結合領域のみを交換したhuman GRとhuman ERのキメラ・レセプターを作ると、human ERのDNA結合領域を持ったキメラ・レセプターは、他の部分がhuman GRにより構成されていてもEREに結合して転写を活性化し、逆に、human GRのDNA結合領域を持ったキメラ・レセプターは、他の部分がhuman ERにより構成されていてもGREに結合して転写を活性化する<sup>22)</sup>。このようにしてDNA結合領域の中に、EREとGREを識別する能力の局在することが示された。さらに、human ERの2つのメタル結合フィンガーのうち前のひとつ、あるいは、後ろのひとつをそれぞれhuman GRの相当するフィンガーと交換したキメラ・レセプターを使用して、human ERとhuman GRの間では、DNA結合領域の2つのメタル結合フィンガーのうち前のひとつが、HREの識別に働くことを証明した<sup>23)</sup>。

その後、梅園らは、DNA結合領域の前のメタ

ル結合フィンガーから後ろのメタル結合フィンガーにかけての領域に、P-ボックスおよびD-ボックスの名称を与え、この2つの領域がHREの識別に直接的に関与していることを証明した<sup>24)</sup>。

ところで、human ERはEREに結合するだけでは転写を活性化できない<sup>25)</sup>。転写の活性化のためには転写活性化ドメインの働きを必要とするが、本来のリガンドであるエストロゲンのみがその働きを引き出すことができる。抗エストロゲン剤であるタモキシフェンが結合したhuman ERは、EREには結合するが転写を活性化できない<sup>25)</sup>。このように、一般的に、ステロイドホルモンレセプターによる転写の活性化には、転写活性化ドメインの働きが必須である。

転写活性化ドメインの解析は、最初に、human GRにおいて進んだ。Human GRのアミノ末端側の転写活性化ドメインは、酵母のGAL4の転写活性化ドメインと同様に、酸性アミノ酸に富んでおり、欠失させると転写の活性化は本来の5%にまで低下するが、重複させると300%に増加する<sup>1)</sup>。また、human GRにおいては、ホルモン結合領域内にも、やはり酸性アミノ酸に富んだ転写活性化ドメインが存在する。

最近の研究により human ER<sup>26)</sup> も mouse ER<sup>19)</sup> も共に2つの転写活性化ドメインを有することが知られている。2つの転写活性化ドメインは、レセプター・タンパク質のアミノ末端側とカルボキシル末端側にそれぞれ位置している。特に、アミノ末端側の転写活性化ドメインは、ERの領域AおよびBにわたって存在する<sup>26)</sup>とされている。

が、それ以上の詳細な解析は知られていない。

我々の結果から、rat ER のアミノ末端側の転写活性化ドメインは、アミノ末端から 59 番目から 140 番目のアミノ酸により構成される疎水性の領域に局在することが判明した。この領域を完全に欠くと転写活性化能は著明に減弱し、部分的に欠くと欠失の割合に比例して転写活性化能が減弱する（図 5 の 11 から 16）。これらの結果より、この領域の働きとして 2 つの可能性が示された。この領域は、疎水性のあるいは proline に富む転写活性化ドメインとしてプロモーターの“転写装置”と直接接触しているのかもしれない。しかし、この疎水性の領域が、転写活性化ドメインの 3 次元的なコンフォメーションを保つ為に重要な役割を果しているから欠失により活性が低下するにすぎないのかもしれない。rat ER のアミノ末端側（領域 A および B）は、GAL4 の転写活性化ドメイン<sup>27)</sup> のように酸性ではないし、Sp1 の転写活性化ドメイン<sup>28)</sup> のように glutamine にも富んでいない。しかし、CTF<sup>29)</sup> や OCT-2<sup>30)</sup> や OCT-3<sup>31)</sup> の転写活性化ドメインのように、やや proline に富んでいる。human ER と mouse ER と rat ER においてこの領域 A および B の酸性および塩基性アミノ酸の分布はよく保存されており、また、hydropathic profile や proline の分布はよく似ているので、human ER や mouse ER のアミノ末端側の転写活性化ドメインは rat ER のそれと同様の性格を有するかもしれない。

317 番目の alanine から 340 番目の arginine までの 24 アミノ酸の領域にもう 1 つの

転写活性化能が局在されうるかもしれない。この領域は酸性アミノ酸に富んでおり、human ERにおいても認められる<sup>32)</sup>。しかし、Websterら<sup>32)</sup>は、この領域では、TAF-2<sup>26)</sup>の強い転写活性化能を説明できないとしている。彼らは、TAF-2を担うタンパク質の表面は、エストロゲン結合ドメインの3次元的な折れ曲がり依存しており、いくつかの離れた部分により構成されていると考えている。また、rERC $\Delta$ 341のリガンドに依存しない転写活性化能は、プロトコール2を用いると認められない。この24アミノ酸によりなる領域は、プロトコール1に示されたような条件においてのみ、弱い転写活性化能を発揮できるのかもしれない。

アミノ末端欠変異体の多く(例えば、rERN $\Delta$ 140やrERN $\Delta$ 166やrERN $\Delta$ 246)は、エストロゲンなしの時、野生株のレセプターとtk(197)-CATをco-transfectした時より低いCAT活性を示している(図3および図4)。これは、これらの変異体が、repressorとして働いていることを示唆するのかもしれない。

レポーター・プラスミドによって転写活性化の程度が変化するという現象(図7)と同様の現象は、他の研究者<sup>3,19,26)</sup>によっても報告されている。この変化はおそらく、2つのレポーター・プラスミドにおけるEREとtkプロモーターの構成要素の間の距離や立体的関係の相違によるものであろう。

ステロイドホルモンレセプターによる転写の活性化に、未同定のファクターが必要であるらしい

ことが明らかになってきた。間接的ではあるが未同定のファクターの存在を示唆する根拠としては、(1) スクウェルチングという現象<sup>17)</sup>、(2) 転写活性化ドメインの活性が宿主の細胞の種類に大きく左右されること<sup>20)</sup>、などが挙げられる。仮に、ER と basic transcription machinery の間を仲介する“アダプター”が存在し、アミノ末端側の転写活性化ドメインが、この“アダプター”との相互作用に重要であるとすれば、レポーター・プラスミドによって転写活性化の程度が変化するという現象も説明出来そうである。

GAL4 や LexA の DNA 結合ドメインを含んだキメラ・レセプターを用いた実験が、アミノ末端側の転写活性化ドメインの機能をさらに調べるためには必要であろう。

## 謝辞

実験に関して多くの助言をくださった半田宏教授（東工大）、梅園和彦博士（米国ソーク研）に深謝致します。オリゴヌクレオチドを合成してくださった東大医第1生化、石川さん、前田さん、野田さんに感謝します。

文献

1. 梅園和彦、(1990年)、先端の医生物学と  
バイオサイエンス、代謝、第27巻、175-  
180
2. Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., &  
Ryffel, G. U. (1986) *Cell* 46, 1053-1061
3. Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin,  
J-R., & Chambon, P. (1987) *Cell* 51, 941-951
4. Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker,  
A., Hort, Y., & Shine, J. (1986) *Science* 231,  
1150-1154
5. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A.,  
Bornert, J-M., Argos, P., & Chambon, P. (1986)  
*Nature* 320, 134-139
6. Koike, S., Sakai, M., & Muramatsu, M. (1987)  
*Nucleic Acids Res.* 15, 2499-2513
7. White, R., Lee, J. A., Needham, M., Ham, J., &  
Parker, M. (1987) *Mol. Endocrinol.* 1, 735-744
8. Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V.,  
Walter, P., Bornert, J-M., & Chambon, P.  
(1986) *EMBO J.* 5, 891-897
9. Weiler, I. J., Lew, D., & Shapiro, D. J. (1987)  
*Mol. Endocrinol.* 1, 355-362
10. Kumar, V., Green, S., Staub, S., & Chambon, P.  
(1986) *EMBO J.* 5, 2231-2236  
371-378
11. Gorman, C. M., Moffat, L. F., & Howard, B. H.  
(1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051
12. McKnight, S. L., Gavis, E. R., & Kingsbury, R.  
(1981) *Cell* 25, 385-398

13. Kozak, M. (1986) *Cell* 44, 283-292
14. Chen, C., & Okayama, H. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745-2752
15. Parker, B.A., & Stark, G. R. (1979) *J. Virology* 31, 360-369
16. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
17. Meyer, M-E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M-T., Tasset, D., & Chambon, P. (1989) *Cell* 57, 433-442
18. Herbomel, P., Bourachot, B., & Yaniv, M. (1984) *Cell* 39, 653-662
19. Lees, J. A., Fawell, S. E., & Parker, M. G. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 5477-5488
20. 加藤順三、(1982年)、ホルモン生物学、実験生物学講座、第12巻、266-269、丸善、東京
21. Luckow, B., & Schutz, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5490
22. Green, S., & Chambon, P. (1987) *Nature* 325, 75-78
23. Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., & Chambon, P. (1988) *EMBO J* 7, 3037-3044
24. Umesonu, K., & Evans, R. M. (1989) *Cell* 57, 1139-1146
25. Webster, N.J.G., Green, S., Rul Jin, J., & Chambon, P. (1988) *Cell* 54, 199-207
26. Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., & Chambon, P. (1989) *Cell* 59, 477-487

27. Ma, J., & Ptashne, M. (1987) *Cell* 48, 847-853
28. Courey, A. J., & Tjian, R. (1988) *Cell* 55, 887-898
29. Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J., & Tjian, R. (1989) *Cell* 58, 741-753
30. Ko, H-S., Fast, P., McBride, W., & Staudt, L. M. (1988) *Cell* 55, 741-753
31. Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., & Hamada, H. (1990) *Cell* 60, 461-472
32. Webster, N. J. G., Green, S., Tasset, D., Ponglikitmongkol, M., & Chambon, P. (1989) *EMBO J.* 8, 1441-1446
33. Imakado, S., Koike, S., Kondo, S., Sakai, M., & Muramatsu, M. (1991) *J. Biochem.* 109, 684-689

## 図および表

### 図1 : 培地中のタモキシフェンのCATアッセイへ及ぼす影響

tam(+) は、培地中に  $5 \times 10^{-6}$  M のタモキシフェンを含む (レーン 1 ~ 8)。tam(-) は、タモキシフェンを含まない (レーン 9 ~ 16)。他の実験条件は、プロトコール 1 による。例えば、レーン 1、2 および 9、10 は、それぞれ同じ組合せのベクターをトランスフェクトしている。co-transfect したベクターの組合せを図中に示す。

### 図2 : ラット・エストロゲン受容体のアミノ末端およびカルボキシル末端欠失変異体

Rat ER のアミノ末端およびカルボキシル末端欠失変異体が模式的に示してある。変異体で保たれている部分を黒線で、欠失する部分を空白で示してある。下端部に、rat ER の DNA およびエストロゲン結合ドメインを、境界部のアミノ酸番号と共に示してある。各変異体についての詳細は、文献 33 を参照。

### 図3 : ラット・エストロゲン受容体のアミノ末端およびカルボキシル末端欠失変異体によるCATアッセイ

トランスフェクションおよびCATアッセイは、プロトコール 1 による。 $5 \times 10^{-6}$  M のタモキシフェンのみ (E<sub>0</sub>-)、または、 $5 \times 10^{-6}$  M のタモキシフェンと  $5 \times 10^{-7}$  M の  $17\beta$ -estradiol (E<sub>1</sub>)

+ ) を培地に加えた。3AC; 3'-acetyl chloramphenicol, 1AC; 1'-acetyl chloramphenicol, C; chloramphenicol.

図4: CATアッセイの結果をまとめた棒グラフ

プロトコール1に従って、5回の実験を行った。値は、液体シンチレーション・カウンターにより測定し、tk(197)-CAT と pSV2RcER を co-transfect して得られた  $E_{\alpha}(-)$  と  $E_{\alpha}(+)$  の平均値に対する相対活性で表してある。値は、5回の実験の平均値である。ERE-tk(197)-CAT と co-transfect したレセプターの発現ベクターは、グラフの下に、省略形で示してある。

図5: 内部欠失変異体によるCATアッセイ

変異体は、模式的に示してある。最上部に rat ER のアミノ末端側半分を、境界部のアミノ酸番号とともに示す。太線部は、変異体で保たれている部分を示し、欠失している部分は、空白あるいは細線で表してある。内部欠失変異体は、欠失している部分の最初と最後のアミノ酸の番号で表してある。例えば、rER  $\Delta$  (168/176) では、168番目の glutamate から176番目の lysine までが、欠失している。実験は、プロトコール2にしたがって行った。左側にCATアッセイの結果を示す。 $E_{\alpha}(-)$  や  $E_{\alpha}(+)$  は、培地中への  $10^{-8}$  M の  $17\beta$ -estradiol の有無を表す。右側に、pSV2RcER を100とした時の変異体の転写活性化能を相対値で示す。また、数回の実験におけるエストロゲンによる誘導の最大と最小を示す。

図6 : Rat ER のアミノ末端側の転写活性化ドメイン

Rat ER の hydrophobic profile<sup>67</sup> の一部を、アミノ酸番号と共に示す。アミノ末端側の転写活性化ドメインが、点線で示してある。

図7 : 変異体レセプターによる転写活性化に及ぼすレポーター・プラスミドの相違の影響

上段 (レーン 1 ~ 10) は、tk のプロモーターを -197 から +51 まで持つレポーター・プラスミド (tk(197)-CAT および ERE-tk(197)-CAT) を用いている。下段 (レーン 11 ~ 20) は、tk のプロモーターを -105 から +51 まで持つレポーター・プラスミド (tk(105)-CAT および ERE-tk(105)-CAT) を用いている。レポーター・プラスミドとともに co-transfect した発現ベクターを図中央に示す。例えば、レーン 5、6 および 15、16 は、同じ発現ベクター rERN $\Delta$ 140 をトランスフェクトした。実験は、プロトコール 2 によった。

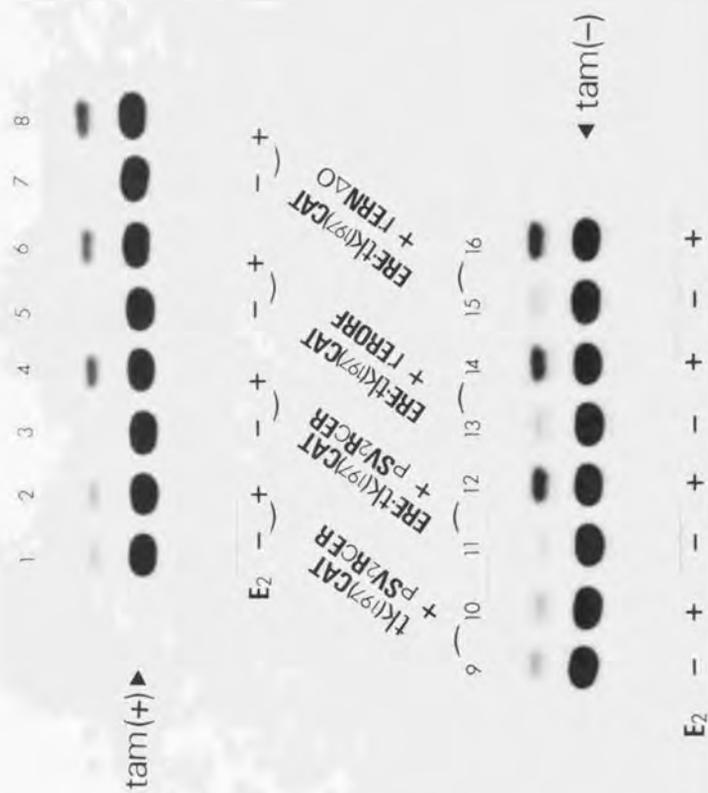


図1 : 培地中のタモキシフェンのCATアッセイ  
 へ及ぼす影響



図 2 : ラット・エストロゲン受容体のアミノ末端  
 およびカルボキシル末端欠失変異体

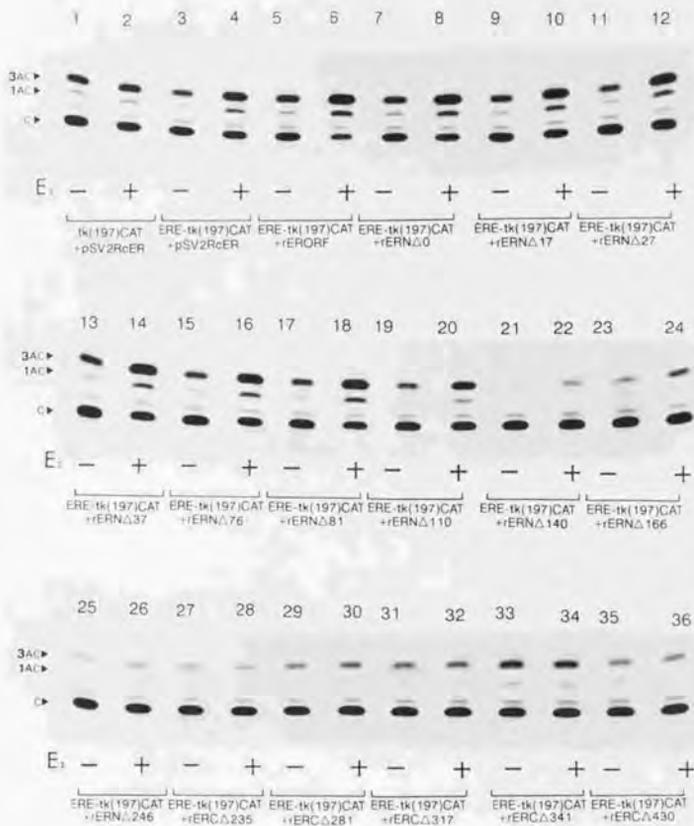


図 3 : ラット・エストロゲン受容体のアミノ末端  
およびカルボキシル末端欠変異体による CAT  
アッセイ

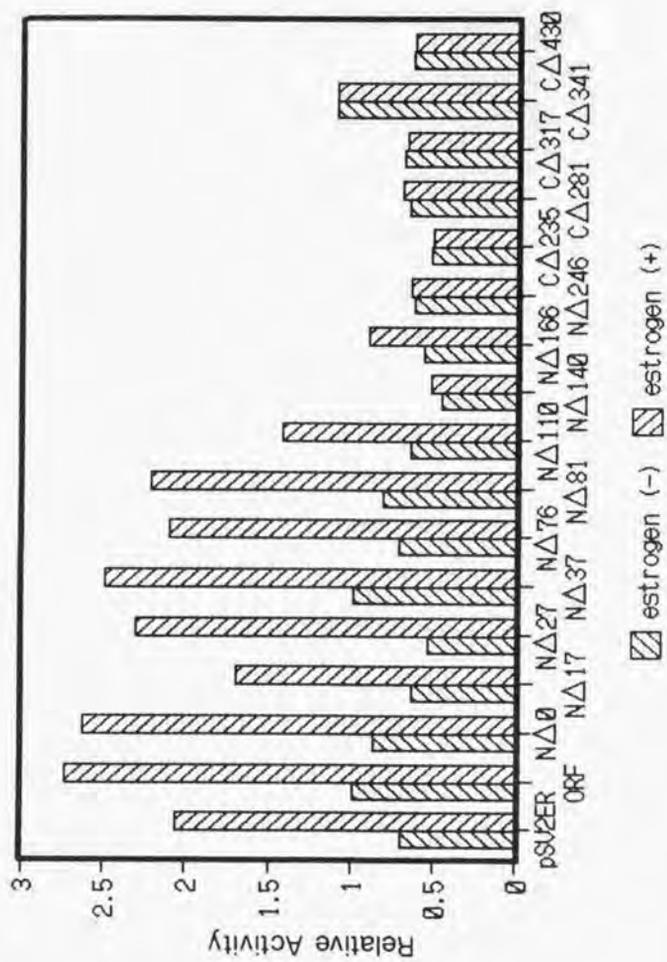


図4 : C A T アッセイの結果をまとめた棒グラフ

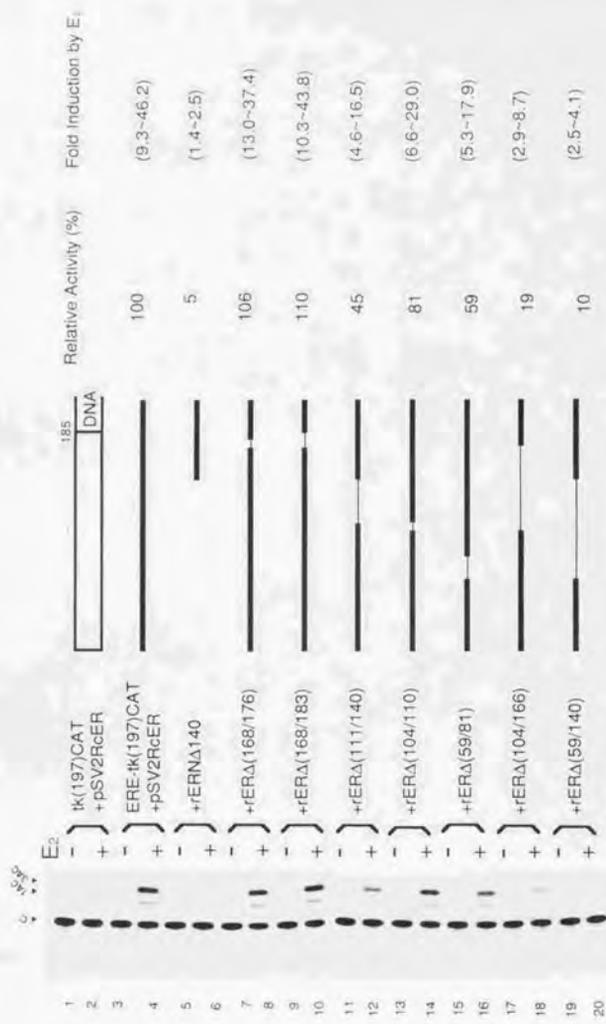


図5：内部欠失変異体によるCATアッセイ

59 ..... 140

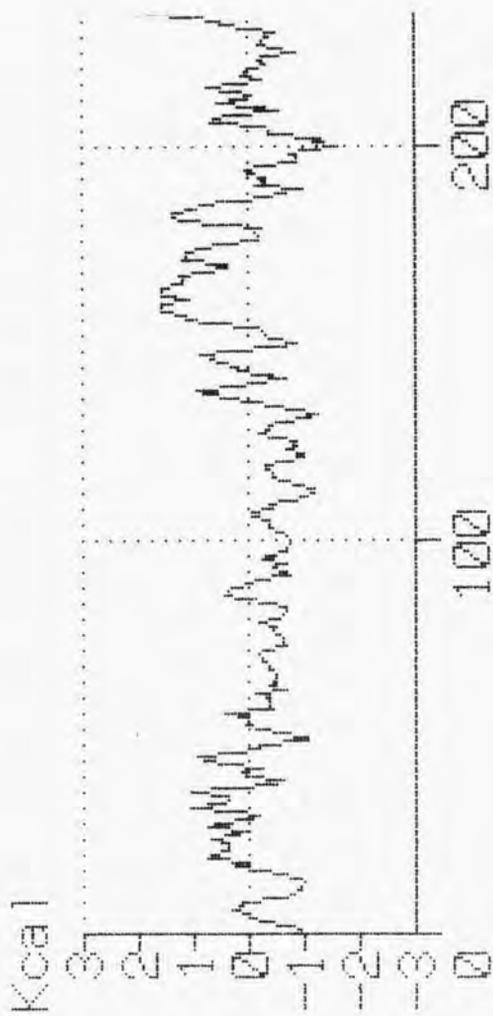


図 6 : Rat ER のアミノ末端側の転写活性化ドメイン

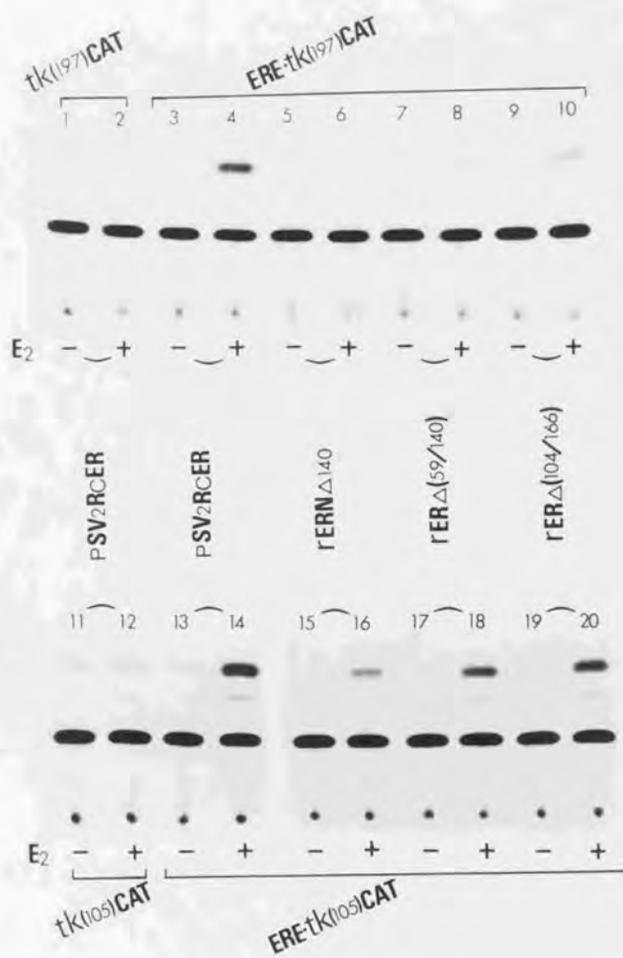


図7: 変異体レセプターによる転写活性化に及ぼすレポーター・プラスミドの相違の影響





## Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TAI Kodak



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TAI Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

