

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成22年度 博士課程進学  
氏名 朝妻 知子  
指導教員名 白髭 克彦

### 論文題目

新たなビタミン D 受容体共役因子群の機能解析

#### 【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

的タンパク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タンパク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リ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考える。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。