

【背景・目的】

女性ホルモンであるエストロゲンは、女性特有の生理現象のみならず、男性生殖器では精子形成、骨では骨密度の調節といった幅広い臓器での多様な生理現象に関与している。さらに乳癌や子宮内膜癌の増殖、脳血管疾患などの病態生理現象にも関与しており、現在ではエストロゲンは性ホルモンとしてだけではなく、様々な機能を示す多機能ホルモンとしても認識されている。

エストロゲンは核内受容体であるエストロゲン受容体 (ER) を介して標的遺伝子の遺伝子発現を調節することで作用を発揮する。哺乳動物の ER では異なる遺伝子上にコードされた2種類のサブタイプ (ER α 、ER β) が存在することが知られている。いずれも核内ステロイド受容体スーパーファミリーに属しており、転写調節因子として作用する。それらはリガンド依存的に活性化され、標的遺伝子の遺伝子調節領域に結合し、転写活性調節を介して作用を発現する。そのため、ER の転写発現調節機構の解明は、標的部位のエストロゲン感受性や生理作用を検討するうえでも非常に重要である。

ER α 遺伝子は8つのコーディングエクソンから構成されており、それらエクソンの選択的スプライシングにより、多数のスプライス変異体が生じている。我々の近年の研究からマウス ER α 遺伝子において従来はイントロン領域と考えられていた部位に新規エクソンが存在し、それらが選択的に使用されることでC末端欠損型の受容体をコードする mRNA 変異体が生じることも明らかとなった。そこで本研究では、ヒト ER α 遺伝子でそのような変異体が存在するかを検討し、さらに、それら変異体の機能解析を行った。

【方法】

ヒト ER α 遺伝子の構造の再解析を行うべく、複数の臓器由来の total RNA を用いて、RACE 用 cDNA を作成し、nested PCR を行った。得られた DNA 断片をクローニングベクターに組み込み、DNA シーケンシング法により配列を決定した。決定された配列を用いてゲノム上にマッピングすることで ER α 遺伝子の新規エクソンを同定した。その後、ヒト ER α 変異体をコードする発現ベクターを作成し、培養細胞に導入することで変異体の細胞内局在と機能を免疫細胞化学染色法およびレポーターアッセイ法を用いて解析を行った。また、ER α タンパク質内のどの構造が転写活性化に寄与するかを調べるべく、cDNA のリガンド結合領域にストップコドンを導入することで複数の C 末端欠損型変異体を人為的に作成し、同時に作成した転写活性化補因子 p300 の発現ベクターも用いて ER α 変異体の転写活性化機構の同定を行った。

【結果】

新規配列を含む複数の mRNA 変異体を同定し、これらの新規配列がヒト ER α 遺伝子のイントロン領域 (エクソン4と5、5と6、6と7の間) に新規エクソンとして存在することを発見した。新規 mRNA 変異体は C 末端欠損型受容体をコードしており、既報告分を含め、新規エクソンの存在場所から、それぞれ CTERP-1、ER α i45a、ER α i45b_L、ER α i45b_S、ER α i45c、

ER α Δ 5、ER α i56、ER α Dup5、ER α i67 と命名・整理した。また、RT-PCR を行い、これら変異体 mRNA が正常の組織・器官において幅広く存在していることを見出した。さらに新規の変異体はいずれも核内に局在し、C 末端欠損型 ER α の中にはエストロゲン応答配列を保持するプロモーターの恒常的活性化に関与するものが存在した。

一方、人工的に作成した C 末端欠損型変異体の解析から、C 末端側のリガンド結合領域に存在するヘリックス 3 までを欠損すると著明な恒常的活性化を示し、ヘリックス 5 までを欠損すると恒常的活性化を示すと共に、転写活性化補因子 p300 の存在下で著明な転写活性化の促進を示すことが判明した。核内受容体のリガンド結合領域には 12 個のヘリックスが存在しているが、ヘリックス 3, 5, 12 がリガンド依存的活性化機構に関与することが知られている。これより、C 末端欠損型 ER α 変異体はヘリックス 5 欠損に伴うリガンド依存性の消失と転写活性化能の抑制を解除することにより、恒常的活性化を示すことが示された。

【考察】

ヒト ER α 遺伝子構造は従来考えられていたよりもはるかに複雑であり、多様な機能の mRNA・タンパク質変異体が生じることが明らかとなった。さらに、変異体の解析により、ER α タンパク質のリガンド結合領域に存在するヘリックス 5 領域以降の欠損が ER α の恒常的転写活性化に深く関与することが示唆され、ER α の機能を考える上で重要な所見を得た。これまでに、ヒト ER β の C 末端欠損型変異体においては、各種の腫瘍で高発現しているという報告はあるが、ヒト ER α 変異体と病態との関連に関する報告は殆どなく、今後の ER 研究の基盤となることが見込まれる。