

## Ubiquitin/Proteasome 経路を介した核内受容体 turnover における Suppressor for Gal-1 の役割

増山 寿

岡山大学医学部 産科婦人科学

キーワード: suppressor for gal-1, turnover, proteasome, nuclear receptor, endocrine disrupting chemicals

### はじめに

Proteasome は ubiquitin にて標識された蛋白質を選択的に分解する真核生物の ATP 依存性プロテアーゼ複合体であり、多様な生体反応を迅速に順序良く一過的にかつ一方的に決定する合理的手段として生命科学の様々な領域(細胞周期, アポトーシス, 代謝調節, シグナル伝達, 転写制御, ストレス・免疫応答, 蛋白質の品質管理機構など)で幅広く活躍していると考えられています<sup>1)</sup>. このシステムの多様性を考えるとシステム破綻は様々な疾病に関係することが予想されますが、特に p27などの細胞周期制御因子や p53などの転写因子, Smad などのシグナル伝達因子の分解に必須であるため、その破綻は細胞周期の無秩序な進行を引き起こし癌化につながります<sup>2)</sup>. また異常蛋白質の蓄積をもたらすことにより Parkinson 病や Alzheimer 病などの神経変性疾患を引き起こすことが明らかとなっています<sup>3)</sup>. 以前我々は核内受容体の一つである Vitamin D receptor (VDR) が生体内の重要な蛋白分解を

司っている proteasome の subunit である suppressor for gal-1 (SUG1)<sup>3)</sup>と結合することから、VDR turnover に proteasome と SUG1 が深く関わっていることを報告してきました<sup>4)</sup>.

一方、我々は、いくつかの内分泌攪乱物質 (Endocrine Disrupting Chemical; EDC) が新しい核内受容体である Pregnane X Receptor (PXR) を介した転写活性を誘導すること、Coactivator がこれら EDC の存在下で PXR と結合すること<sup>5)</sup>, ホルモン依存性腫瘍である endometrial cancer でも発現しており CYP3A と正の, Estrogen Receptor (ER) と負の相関関係にあること<sup>6)</sup>やいくつかの抗癌剤が PXR を介して薬剤耐性因子のひとつである MDR1 の発現を誘導すること<sup>7)</sup>を示してきました. このことは EDC の作用機序として従来知られている ER などの核内受容体に結合する直接的作用<sup>8,9)</sup>の他に、特に endometrial cancer などで PXR を介してステロイド代謝に影響する間接的作用の可能性が考えられます. 更に PXR のリガンドである progesterone は PXR と SUG1 の結合を誘導するが、同じリガンドである EDC はこの PXR-SUG1 結合に影響を及ぼさず、また EDC が proteasome を介した PXR degradation を progesterone と比較して抑制することも報告してきました<sup>10)</sup>. このことは PXR の

平成17年11月受理

〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7320 FAX: 086-225-9570

E-mail: masuyama@cc.okayama-u.ac.jp

### ◆ プロフィール ◆



昨年の林原賞に引き続き、思いもかけず今年は結城賞を受賞させて頂くことが出来ました。これもひとえに研究を続けさせて頂く中でお会いしたたくさんの方のお陰と感謝するのみです。私は平松祐司先生(現教授)のもとで大学院の学位研究として胎児肺発育、分化に影響する因子を検討する中で出会ったのがレチノイド(ビタミンA)でした。そのレチノイドが作用を発現するためには受容体が必要であり、レチノイド受容体が核内受容体スーパーファミリーに属することを知りました。この核内受容体による標的遺伝子の発現制御は如何に行われているかを知りたくて大学院卒業後、Paul N MacDonald 教授(米国 Case Western Reserve 大学)のもとで Molecular Endocrinology の領域に足を踏み入れました。帰国後は、工藤尚文教授(現名誉教授)、平松教授のご配慮で引き続き教室で研究を続けさせて頂き、その後再び文部科学省の在外研究員として渡米し新しい知識、技術などを取り入れながら、環境ホルモンや生殖生理における核内受容体を介した遺伝子制御について研究を続けています。また最近では、アディポサイトカインと妊娠高血圧症候群の関連性について研究を始めています。

turnover 即ち受容体蛋白の安定性にある種の EDC が影響を及ぼすことにより攪乱作用を起こす可能性が示唆されました。

これらの研究結果を踏まえて、今回我々は ER の ubiquitin/proteasome 経路を介した turnover への SUG1 の関与について検討しました。更に EDC の作用機序に深く関わっている ER の turnover への EDC の影響についても調べました<sup>11)</sup>。

## 研究結果

### 1. Proteasome を介した ER 蛋白分解

ER 発現細胞である子宮内膜癌由来 Ishikawa cell を用いて cyclohexamide により蛋白合成を抑制し Proteasome 阻害剤 (MG132,  $\beta$ -lactone) を添加し ER 蛋白の変化を調べたところ、Proteasome 阻害剤無添加群では ER 蛋白は急速に分解されたが、Proteasome 阻害剤を加えるとこの分解は阻害されました (Fig. 1 A)。また Estradiol の存在下では受容体蛋白分解が促進されましたが、Proteasome 阻害剤にてこの促進作用は阻害されました。また ER- $\beta$  は、BSA の存在下で

estradiol と比較して受容体蛋白分解が著明に抑制されました (Fig. 1 B)。これらのことより ER $\alpha$  や ER $\beta$  の turnover は ubiquitin/proteasome 経路を介して制御されていると考えられました。また一部の EDC が ER の turnover に影響を及ぼす可能性が示唆されました。

### 2. ER と SUG1 の結合

Yeast two-hybrid 法を用いて ER と SUG1 の結合を検討したところ、endogenous な ligand である estradiol の存在下で ER $\alpha$  および ER $\beta$  と SUG1 は結合しました (Fig. 2 A)。また EDC として知られるフタル酸 (PA) やビスフェノール A (BSA) の存在下で ER $\alpha$  および ER $\beta$  は SUG1 と結合しましたが、その誘導能に著しい差を認めました。BSA は特に ER $\beta$ -SUG1 結合誘導能をほとんど認めませんでした (Fig. 2 B)。

### 3. SUG1 の ER turnover に及ぼす影響

SUG1 の ER turnover に及ぼす影響を検討するため培養細胞を用いて SUG1 発現 vector を transient transfection し受容体蛋白 turnover が変化するか、またこのような変化が endogenous なリガンドや EDC の存在下で違うかを検討しました。SUG1 過剰発現細

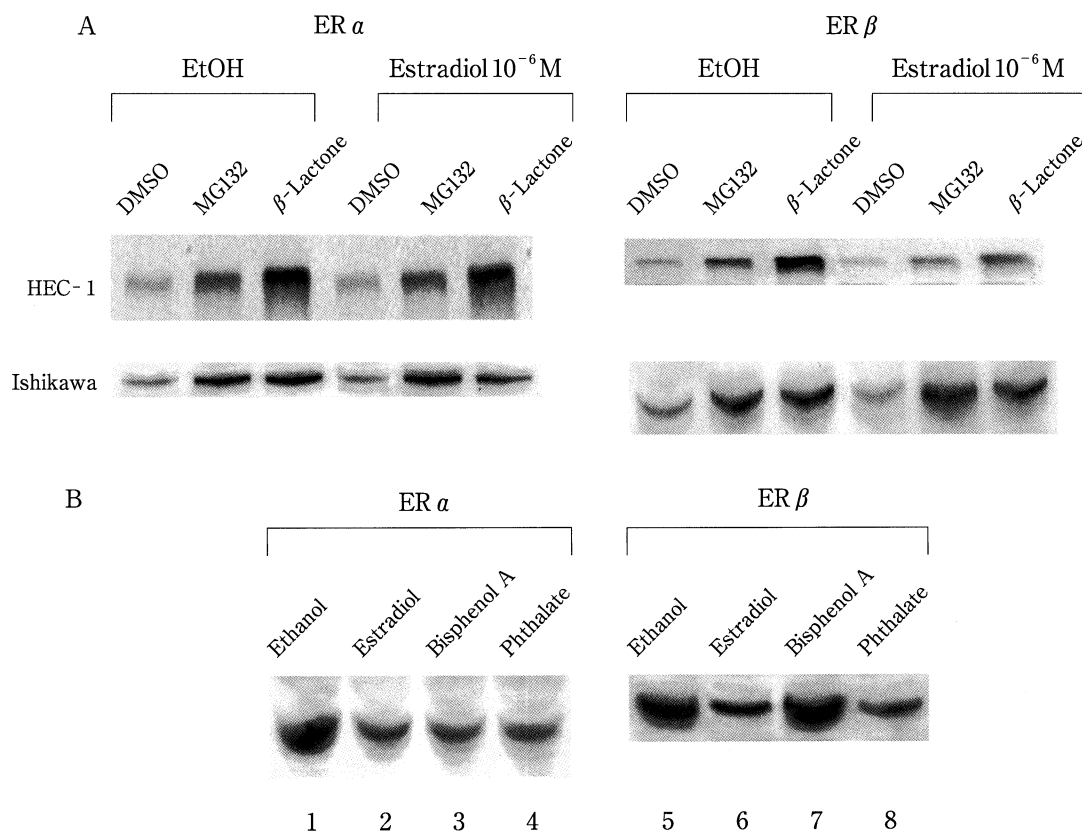


Fig. 1 Proteasome-mediated degradation of estrogen receptors

胞ではリガンドの存在下で ER $\alpha$ と ER $\beta$ 共に proteolytic fragment が発現していましたが, BSA の存在下では ER $\beta$ の proteolytic fragment は認めませんでした. また阻害剤 (MG132) の投与により proteolytic fragment は消失しました (Fig. 3). 以上より, SUG1 はリガンド存在下に ER に結合し proteasome による受容体蛋白分解に関与していると考えられました. EDC 特に BSA は ER $\beta$ -SUG1 結合をほとんど誘導せず, ER $\beta$ 受容体蛋白分解を著明に抑制しました.

#### 4. SUG1 の受容体蛋白 Ubiquitin 化への影響

SUG1 の受容体蛋白 Ubiquitin 化への影響を検討するため, 培養細胞を用いて SUG1 発現 vector を transient transfection し Ubiquitin 鎖を持つ受容体蛋白が出現するか polyubiquitin affinity beads を用いて pull down assay にて検討しました (Fig. 4 A). またこの ubiquitination が endogenous なリガンドや EDC の存在下で異なるか検討しました. SUG1 過剰発現細胞では Estradiol や PA の存在下で polyubiquitin 化した ER $\alpha$ と ER $\beta$ の発現を認めました. BSA の存在下では polyubiquitin 化 ER $\beta$ は認めませんでした

た (Fig. 4 B). 以上のごとく SUG1 は ubiquitin/ proteasome を介して特にリガンドの結合した ER 蛋白の分解に関与していると考えられました.

#### 5. SUG1 の ER を介した転写に及ぼす影響

SUG1 の ER を介した転写に及ぼす影響を検討するため, 培養細胞を用いて SUG1 発現 vector を transient transfection し ER を介した転写への影響や, この影響が endogenous なリガンドや EDC の存在下で違うかを検討しました. SUG1 を過剰発現すると ER による転写活性は抑制されました. BSA の存在下では SUG1 は ER $\beta$  を介した転写に影響を与えませんでした (Fig. 5).

#### 6. SUG1 の発現

新たに作成した SUG1 ポリクローナル抗体を用いて各組織での SUG1 の発現を免疫組織染色法にて検討しました. 肝臓, 小腸などと共に子宮や卵巣などの生殖臓器でも発現を認めました. ヒトにおいて子宮内膜では, 正常例に比しホルモン剤投与症例の子宮内膜で強く発現していました (unpublish data).

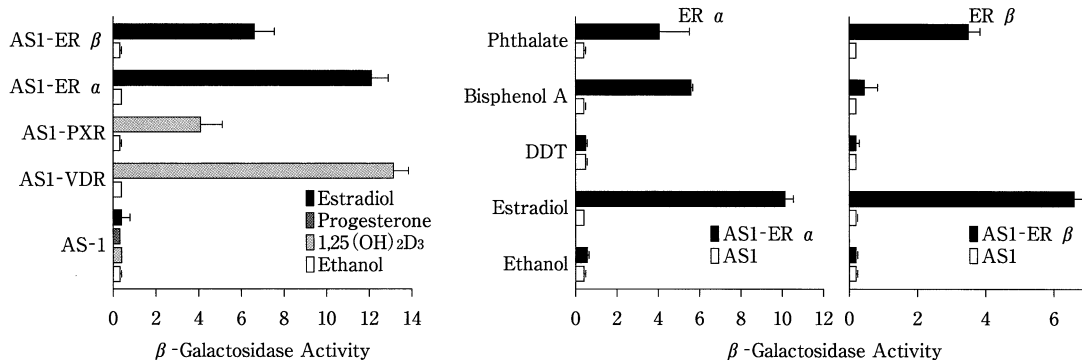


Fig. 2 The Interactions between Estrogen Receptor and SUG1

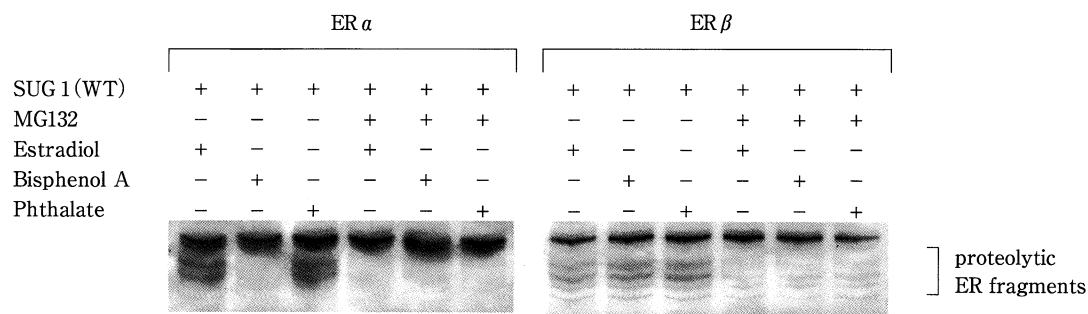


Fig. 3 Enhancement of Wild-type SUG1 on ER Proteolysis

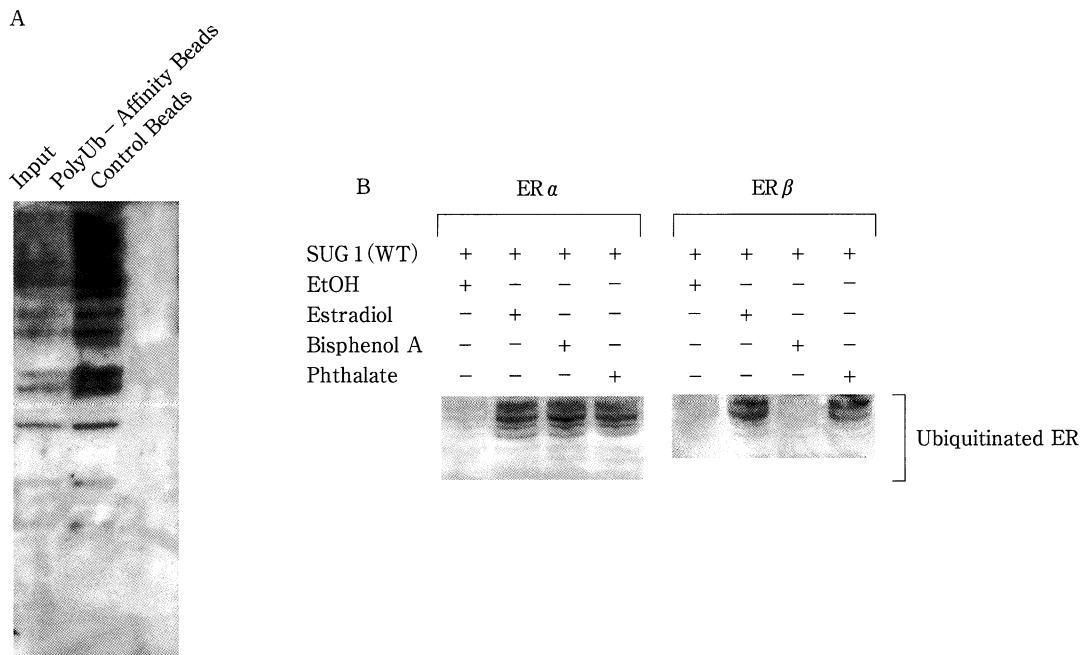


Fig. 4 Enhancement of SUG1 on the Ubiquitination of Estrogen Receptors

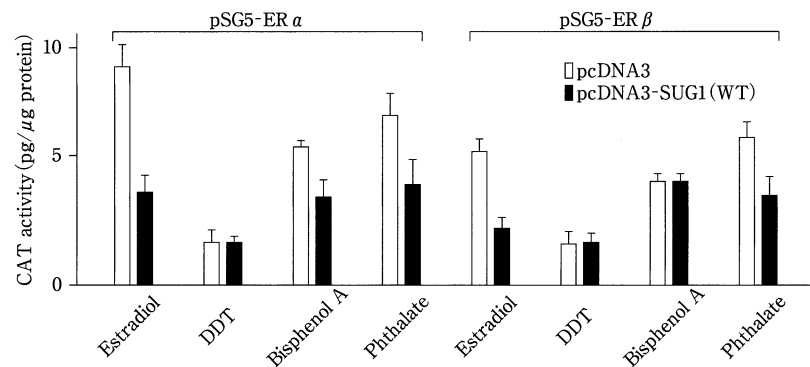


Fig. 5 Suppression of ER-mediated Transcription by Overexpressed SUG1

## 結 論

以上の結果より、ER $\alpha$ や ER $\beta$ の turnover は ubiquitin/proteasome 経路を介して制御されていると考えられました。リガンドの存在下で ER $\alpha$ や ER $\beta$ は SUG1 と結合し、SUG1 を過剰発現させると ER $\alpha$ や ER $\beta$ を介した転写誘導が抑制され、また ER $\alpha$ や ER $\beta$ の proteolytic fragment や Polyubiquitin 化 ER が発現したことから、SUG1 は ubiquitin/proteasome を介した特にリガンドの結合した ER 蛋白の分解に関与していると考えられました (Fig. 6)。これまでの我々の VDR や PXR の turnover での SUG1 の役割の報告<sup>4,10)</sup>とあわせて、SUG1 は ubiquitin/proteasome 経路を介して核内受容体 turnover に深く関わっており、

受容体レベルを調節することによって核内受容体を介した転写制御に関与していると考えられました。一方、この SUG1 と ER $\beta$ の結合を誘導しない BSA の存在下では ER $\beta$ の ubiquitin/proteasome を介した ER $\beta$ 蛋白分解が阻害されており、BSA が受容体蛋白 turnover に影響を及ぼすことにより内分泌攪乱作用を引き起こしている可能性が示唆されました。また SUG1 はヒトにおいても生殖臓器である卵巣や子宮にも発現しており、高ステロイドホルモン暴露下の子宮内膜で発現が増加していたことから、生殖機能においても何らかの役割を果たしていると考えられ、今後更に検討が必要と思われました。

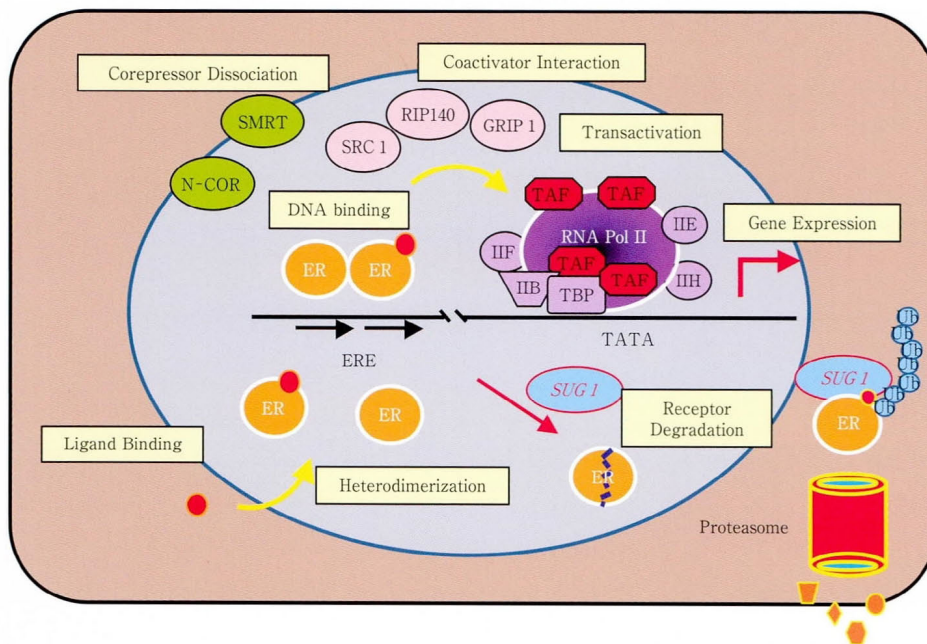


Fig. 6 Potential Roles of SUG1 in Nuclear Receptor-mediated Transcription

## 謝 辞

本稿で述べた研究内容は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科産科・婦人科学教室で行われたものです。教室歴代の関場香教授、工藤尚文教授および平松祐司教授をはじめ産科婦人科学教室の医局員のご指導、ご協力があって初めて研究を進めることが出来ました。感謝致します。また本研究の一部は文部科学省特定領域研究「内分泌攪乱物質の環境リスク」（代表者：松井三郎京都大学教授）の研究費により行われたことを記します。

## 文 献

- 1) 田中啓二：プロテアソーム研究の動向, 実験医学 (2001) **19**, 231-238.
- 2) 佐伯 泰, 横沢英良：ユビキチンシステムのメカニズム, 医学のあゆみ (2004) **211**, 5-11.
- 3) Rubin DM, Coux O, Wefes I, Hengartner C, Young RA, Goldberg AL and Finley D : Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature* (1996) **379**, 655-657.
- 4) Masuyama H and MacDonald PN : Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the Af-2 domain of VDR. *J Cell Biochem* (1998) **71**, 429-440.
- 5) Masuyama H, Hiramatsu Y, Kunitomi M, Kudo T and MacDonald PN : Endocrine Disrupting Chemicals Phthalic Acid and Nonylphenol Activate Pregnane X Receptor-mediated Transcription. *Mol Endocrinol* (2000) **14**, 421-428.
- 6) Masuyama H, Kodama J, Hiramatsu Y and Kudo T : Expression and Potential Roles of pregnane X receptor in Endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab* (2003) **88**, 4446-4454.
- 7) Masuyama H, Suwaki N, Tateishi Y, Nakatsukasa H, Segawa T and Hiramatsu Y : The pregnane X receptor regulates gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *Mol Endocrinol* (2005) **19**, 1170-1180.
- 8) 井口泰泉：外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）とは, 周産期医学 (1999) **29**, 393-397.
- 9) Cooper RL and Kavlock RJ : Endocrine disrupters and reproductive development : a weight-of-evidence overview. *J Endocrinol* (1997) **152**, 159-166.
- 10) Masuyama H, Inoshita H, Hiramatsu Y and Kudo T : Ligands Have Various Potential Effects on the Degradation of Pregnane X Receptor by Proteasome. *Endocrinology* (2002) **143**, 55-61.
- 11) Masuyama H and Hiramatsu Y : Involvement of suppressor for gal-1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors. *J Biol Chem* (2004) **279**, 12020-12026.