

「生命活動のプログラム」

平成9年度採択研究代表者

加藤 茂明

(東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

## 「遺伝情報制御分子としてのステロイドレセプター」

### 1. 研究実施の概要

ステロイド・甲状腺ホルモン、ビタミンA、Dや一群のエイコサノイドは、それぞれ固有の核内ステロイドレセプターを介し遺伝子発現を制御する。脂溶性ホルモンの作用発現経路において、核内ステロイドレセプターは中枢であるが、その機能を規定する共役因子群の重要性が最近認識され始めた。本研究の狙いは、核内レセプターの機能及び関連相互作用共役因子や、レセプターの下流に存在する標的遺伝子群の性状を分子レベルで解明し、遺伝情報制御分子としての核内レセプターの機能を明らかにすることにある。

### 2. 研究実施内容

以下のアプローチI、IIに沿って研究を進める。

#### (1) ホルモン活性を規定する核内レセプター機能の解明 (アプローチI)

核内レセプターを有する脂溶性ホルモンは、各組織において特徴ある生理活性を示す。このような組織特異的な生理作用はレセプターの生体内局在のみでは説明できず、むしろレセプターの細胞種特異的な機能によると考えられるようになっている。このような組織特異性は、最近核内レセプターと相互作用する核内共役因子群が担うものと考えられている。共役因子は、核内レセプターと基本転写因子群とを仲介し、転写制御に必須な構成因子と考えられているため、組織特異的なホルモン作用の理解にはこの共役因子の同定と性状解析は必須と考えられる。そこで本アプローチでは、特に組織特異的な作用が知られる性ステロイドホルモン(エストロゲン:女性ホルモン、アンドロゲン:男性ホルモン)共役因子を中心に据える。組織特異的なホルモン作用及び性差を担うと考えられる性ステロイドホルモンの新規標的遺伝子群の同定も試みる。

#### (1)-1 核内レセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これ

に関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれらの転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ) をモデルとして、ER分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子と女性ホルモンの相互作用を中心に調べ、また一般的な共役因子として考えられているCBP/P300との関係を、特に脳において明らかにした。更にこれらの相互作用におけるリン酸化の効果を調べることで、当該キナーゼを活性化する成長因子と女性ホルモンの核内レセプター群及びそれらのクロストークの作用点を特にTGF $\beta$ とビタミンD、アンドロゲンとFGF10について検討した。

#### (1) - 2 ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進する co-activator と転写を抑制する co-repressor の存在が知られている。しかしながらこれら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミンDレセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNAスクリーニング、及び生化学的手法を用いて行う。この時第一には転写を促進する因子群の同定を目指す。同時にクロマチン構造を制御する因子や、細胞周期を制御する因子などの同定も試みる。特に後者の因子の同定は、各種ホルモンの細胞複製・細胞増殖への作用を分子レベルで初めて明らかにできる足掛かりと期待される。既に同定された共役因子 (P68) はERのN末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合するものであった。P68はcDNAクローニングの結果、RNAヘリケースの1種であることが判明し、AR、MR、VDRへの効果についても調べたところ全く効果がなく、ER $\alpha$ 特異的であることが判明した。また同様の手法によりP72RNAヘリケースを同定しており、それらの性状解析を急いでいる。以上のアプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。

#### (1) - 3 新規標的遺伝子の同定

核内レセプターを有するホルモン類はいずれも幅広い生理作用を示す。しかしながら実際にこれら生理作用を担うホルモン標的遺伝子群の性状については不明な点が多く、標的遺伝子として同定されている総数は特に1つの性ステロイドホルモン当たり数例に過ぎない。このことは、ホルモン標的遺伝子の発現量は極めて低く、従来法では単離同定が困難である。一方折茂らが開発した genomic binding-site cloning 法は染色体DNA上のレセプター結合部位近傍の遺伝子を単離する手法で

あり、発現量の有無にかかわらず標的遺伝子を単離できる点で他方を凌いでいる。実際このような手法を用いエストロゲン標的遺伝子 (e f p) の単離に成功している。今年度はこの e f p の高次機能を解析した。

## (2) 核内レセプターの生体内高次機能の解明 (アプローチ I I)

胚発生や器官形成など個体におけるホルモンの効果を従来法でただしく評価することは容易ではない。一方培養細胞などを用いた *in vitro* 系では正確に生体内での作用を反映しない例が多い。一方、近年開発された遺伝子導入又は遺伝子破壊マウスを用いて当該ホルモンのレセプターに変異あるいは破壊を加えるとシグナル伝達が分断できるため、当該ホルモンの効果を生体内で観察することができる。そこで本研究では、胚発生や器官形成に重要な役割を果たすいくつかの核内レセプターの変異あるいは欠失動物を作出し、当該ホルモンの生理作用を探る。更に共役因子や標的遺伝子も同様に解析し、ホルモン発現系における役割を明確にすることを目的とする。

### (2) - 1 変異レセプター動物を用いての解析

ビタミンAは個体発生や細胞分化に必須なホルモンであるが、そのレセプターは6種 (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) も存在するため、1つのレセプターの欠損では当該組織でのビタミンAの作用を評価することができない。一方リガンド結合能を保持するものの転写促進能を全く欠いたいわゆる dominant negative 型のレセプターは、そのリガンドをトラップする。よって標的組織 (細胞種) にこの変異レセプターを大量発現させると、局所的なホルモン欠乏を引き起こすことができる。実際このような手法を用いることで、RARが皮膚の重層構造形成に必須であることをこのチームの一人は世界で初めて証明している。昨年度までに同様の手法により従来法では解析不能であったRAR、RXRの発生段階における骨形成への機能を調べた。その結果軟骨形成に変異が見られた。性ステロイドホルモンは情動行動など脳における精神活動に重要であることが近年証明されている。この時共役因子が脳において如何なる作用を示すかは定かではない。そこで核内レセプターの共通の共役転写因子であるCBPの dominant negative タイプの遺伝子を導入したマウスを作出し、情動行動への効果を調べる。

### (2) - 2 レセプター欠損動物を用いての解析

特定遺伝子の生体内高次機能を調べるのには、遺伝子破壊動物 (ノックアウトマウス) は最適である。ビタミンDは生体内に数多くの類縁体が存在するにも関わらずレセプター (VDR) は1種である。そこでVDRノックアウトマウスを作出したところ、重篤なクル病を呈したがこのような異常は離乳後のみ見られ、更に雌性生殖器の形成不全が見られた。VDRはRXRとヘテロ2量体を形成して転写促進能を示すので、VDR-RXR 2重ノックアウトマウスを平成9年度において作出

した。その結果、VDRノックアウトマウスより重度の骨変異が認められ、特に軟骨の詳細な解析をしたところ、肥大軟骨層の増殖・分化に異常をきたすことも見出した。同様の遺伝子破壊動物を用い、転写共役因子やホルモン標的遺伝子の高次機能を解析する。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, **21**, 138-141, 1999.
- Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1049-1055, 1999.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, No. 8, 1999.
- Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, **283**, 1317-1321, 1999.
- Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- $\beta$  signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12971-12974, 1999.
- Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A *trans*-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 248-255, 1999.
- Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Kawacushi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 $\alpha$ ,

- 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in intact animals. *Endocrinology*, **140**, 2224-2231, 1999.
- Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, **140**, 2125-2133, 1999.
- Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, **140**, 1005-1008, 1999.
- Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **259**, 731-738, 1999.
- Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., Kojima, S.: Increased 9,13-di-*cis*-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- $\beta$  mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, **30**, 1073-1080, 1999.
- Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: *In vivo* function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 247-251, 1999.
- Kato, S., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between estrogen and growth-factor signaling pathways. *Oncology*, **55** (suppl 1), 5-10, 1998.
- Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Sato, T., Okumura, K., Nogami, M., Hasegawa, Y., Niimi, H., Yanagisawa, J., Tanaka, T., Kato, S.: Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficient rickets. *N. Engl. J. Med.*, **338**, 653-661, 1998.
- Harada, H., Kuboi, Y., Miki, R., Honda, C., Masushige, S., Nakatsuka, M., Koga, Y., Kato, S.: Cloning of rabbit TR4 and its bone cell-specific activity to suppress estrogen receptor-mediated transactivation. *Endocrinology*, **139**, 204-212, 1998.
- Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Hosoya, T., Kato, S.: The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene

- confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin and  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 11-16, 1998.
- Watanabe, M., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: A putative tumor suppressor, TSG101, acts as a transcriptional suppressor through its coiled-coil domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 900-905, 1998.
- Kato, S., Sekine, K., Matsumoto, T., Yoshizawa, T.: Molecular genetics of vitamin D receptor acting in bone. *J. Bone Miner. Metab.*, **16**, 65-71, 1998.
- Kato, S., Yanagisawa, J., Murayama, A., Kitanaka, S., Takeyama, K.: The importance of 25-hydroxyvitamin  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase gene in vitamin D-dependent rickets. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **7**, 377-383, 1998.
- Kishimoto, H., Hoshino, S., Ohori, M., Kontani, K., Nishina, H., Suzawa, M., Kato, S., Katada, T.: Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15429-15434, 1998.
- Takeshita, A., Imai, K., Kato, S., Kitano, S., Hanazawa, S.:  $1\alpha, 25$ -Dehydroxyvitamin  $\text{D}_3$  synergism toward transforming growth factor- $\beta$ 1-induced AP-1 transcriptional activity in mouse osteoblastic cells via its nuclear receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14738-14744, 1998.
- Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., Kato, S., Kawashima, H.: A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 142-147, 1998.
- Fukumoto, S., Suzawa, M., Kikuchi, T., Matsumoto, T., Kato, S., Fujita, T.: Cloning and characterization of kidney-specific promoter of human PTH/PTHrP receptor gene: Absence of mutation in patients with pseudohypoparathyroidism type Ib. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **141**, 41-47, 1998.
- Nishihara, A., Hanai, J., Okamoto, N., Yanagisawa, J., Kato, S., Miyazono, K., Kawabata, M.: Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF- $\beta$ . *Genes to Cells*, **3**, 613-623, 1998.

他 21 件