

「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

核内ステロイドレセプターによる転写促進制御の分子メカニズム解明を目的とする。種々のレセプターの生体内での生理機能の解析を試みた。同時に、新規核内ステロイドレセプター転写共役因子群の同定・性状解析を、生化学的手法を用いることで行なった。転写共役因子複合体として核内に存在することが、近年明らかになりつつあることから、本年度は複合体の精製を行った。その結果、今まで報告のなかった転写共役因子複合体が、核内レセプターに作用する可能性が明らかになった。一方、核内レセプターの生体内高次機能をノックアウトマウスを作出することで解析した。本年度は、男性ホルモンレセプターのノックアウトマウス(AR KO)の作出に成功し、男性ホルモン不応症を呈したモデル動物を作出できた。現在変異を詳細に解析しているところである。

2. 研究実施内容

【目的】

核内ステロイドレセプターによる転写促進制御の分子メカニズム解明を目的に、新規核内ステロイドレセプター転写共役因子群の同定及び性状解析を行なった。また核内レセプターの生体内高次機能について検討した。

【方法】

1. ER α AF-2領域と相互作用する転写共役因子複合体の構成因子であるAF-2 p160コアクチベーター (SRC-1/TIF2/AIB1)の転写活性化領域 (AD2) に相互作用するコアクチベーターをエストロゲン依存性に増殖するMCF7乳癌組織由来cDNAライブラリーからYeast two-hybrid法にてスクリーニングした。
2. 核内レセプター転写共役因子複合体構成因子群を同定する目的に、週に数リットルHeLaの細胞を浮遊培養し、核抽出液を調整し、ER α 組み換えタンパクをプロープに、コアクチベーター複合体の精製を試みた。
3. 核内レセプターの生体内での生理機能を評価する目的に、上述してきたようにin vitro系のみならずin vivo系遺伝子ノックアウトマウス (KOマウス) を作成し解析してきた。ビタミンDレセプター (VDR) KOマウス (VDR KO) は、重

篤なクル病を離乳期以降のみ発症することを見出し、骨代謝やカルシウム代謝に中心的役割を果たすことを証明した (Yoshizawa et al., Nature Genetics, 16, 391, 1997)。このような戦略を用い、p68/p72、SRC-1のKOマウスの作製及びアンドロゲンレセプター (AR) KOマウスの組織特異的KOを試みているところである。

【結論】

- 1 . p160コアクチベーター AD 2 と相互作用する因子群の候補のうちp72は、上記p68 (Endoh et al., MCB, 19, 5363, 1999) と最も相同性の高いRNAヘリケースであることが判明した。詳細な解析からp72は、p68と同様の性状を有することがわかった。一方、昨年複数のステロイドレセプター AF-1と作用するRNA型コアクチベーターが報告されたので、p68/p72とSRAとの関連を探った。その結果、p68/p72はin vitroでSRAと直接結合するRNA結合因子であることを判明した。またp68/p72は核に局在することから、SRA膜レセプタータンパクとして、AF-2コアクチベーター複合体の構成因子であり、かつまたER α AF-1の直接的な相互因子であることを見出した (Watanabe et al., EMBO J, 20, 1341, 2001)。
 - 2 . 柳澤らが同定したp68/p72 Smadを含む核内レセプター転写共役因子複合体の同定を試みたが、同定に到らなかった。しかし、精製複合体の中に、未知の第3の核内レセプターコアクチベーター複合体の存在を見出し、現在、その構成成分の同定を試みているところである。
 - 3 . Cre-lox Pシステムを応用することで、AR遺伝子を潜在的に破壊した。本法を使うことにより、女性化しないflox AR KOマウスが作出できた。本マウスとCre発現トランスジェニックノックアウトマウスとを交配することで、雌雄でAR遺伝子破壊に成功した。現在その表現型を詳細に解析しているところである。
- 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

加藤グループ

Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arai, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S. : A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 1341-1352, 2001.

Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K. : Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.

Sasagawa, S., Kato, S. : A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.

Kato, S. : Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.

Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P. : Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR α mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, 407, 633-636, 2000.

Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H. : Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N. Engl. J. Med.*, 343, 856-862, 2000.

Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S. : Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, 275, 33201-33204, 2000.

Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G. : Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, 481, 53-56, 2000.

Tajima, T., Kitagawa, H., Yokoya, S., Tachibana, K., Adachi, M., Nakae, J., Suwa, S., Kato, S., Fujieda, K. : A novel missense mutation of mineralocorticoid receptor gene in one Japanese family with a renal form of pseudohypoaldosteronism type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 4690-4694, 2000.

Kato, S. : Molecular mechanism of transcriptional control by nuclear vitamin receptors. *British J. Nutrition*, 84(suppl.2) 229-233, 2000.

Kato, S., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K. : Missense mutations in 25 (OH) vitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D dependent type I rickets. *Clin. Pediatr. Endocrinol.*, 9(suppl.14) 1-5, 2000.

Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N. : FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277, 643-649, 2000.

Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M. : Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, 150, 873-879, 2000.

Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S. : A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 380, 228-236, 2000.

Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J. : Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, 5, 593-601, 2000.

Kato, S. : The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, 127, 717-722, 2000.

Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G. : Molecular analysis of external genitalia formation : the role of *fibroblast growth factor*(*Fgf*)genes during genital tubercle formation. *Development*, 127, 2471-2479, 2000.

Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S. : p300 Mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 275, 15645-15651, 2000.

Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S. : Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 14, 889-899, 2000.

Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y. : Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 141, 1317-1324, 2000.

Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F. : Metabolism of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, 39, 2123-2129, 2000.

Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S. : p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 410-414, 2000.

Tai, H., Kubota, N., Kato, S. : Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 311-316, 2000.

Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T. : Identification of novel human *GH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1290-1295, 2000.

垣塚グループ

Kakizuka, A. : Molecular mechanisms underlying neuronal cell death in polyglutamine diseases. *Neurochemical Res.*, 25, 990-991, 2000.

Maeda, H., Segawa, T., Kamoto, T., Yoshida, H., Kakizuka, A., Ogawa, O., Kakehi,

Y. : Rapid detection of candidate metastatic foci in the orthotopic inoculation model of androgen-sensitive prostate cancer cells introduced with green fluorescent protein. *Prostate*, 45, 335-340, 2000.

井上グループ

Ogawa, S., Fujita, M., Ishii, Y., Tsurukami, H., Hirabayashi, M., Ikeda, K., Orimo, A., Hosoi, T., Ueda, S., Nakamura, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M., Inoue, S. : Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J. Biol. Chem.*, 275, 21372-21379, 2000.

Ikeda, K., Sato, M., Tsutsumi, O., Tsuchiya, F., Tsuneizumi, M., Emi, M., Imoto, I., Inazawa, J., Muramatsu, M., Inoue, S. : Promoter analysis and chromosome mapping of human EBAG9 gene. *Biochem Biophys Res Commun.*, 273, 654-660, 2000.

Orimo, A., Yamagishi, T., Tominaga, N., Yamauchi, Y., Hishinuma, T., Okada, K., Suzuki, M., Sato, M., Nogi, Y., Suzuki, H., Inoue, S., Yoshimura, K., Shimizu, Y., Muramatsu, M. : Molecular cloning of testis-abundant finger Protein/Ring finger protein 23 (RNF23) a novel RING-B box-coiled coil -B30.2 protein on the class I region of the human MHC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 45-51, 2000.

Orimo, A., Tominaga, N., Yoshimura, K., Yamauchi, Y., Nomura, M., Sato, M., Nogi, Y., Suzuki, M., Suzuki, H., Ikeda, K., Inoue, S., Muramatsu, M. : Molecular cloning of ring finger protein 21 (RNF21)/interferon-responsive finger protein (ifp1), *Genomics* 69, which possesses two ring-B box-coiled coil domains in tandem. *Genomics*, 69, 143-149, 2000.

Inoue, S., Ogawa, S., Horie, K., Hoshino, S., Goto, W., Hosoi, T., Tsutsumi, O., Muramatsu, M., Ouchi, Y. : An estrogen receptor beta (ER beta) isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ER alpha and ER beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 45-51, 2000.

※本プロジェクトの研究代表者であった加藤茂明氏については、同氏が主宰する研究室において論文の不正行為があったことが東京大学において認定されています。認定された不正行為には、本プロジェクトの研究成果とされた論文の一部が含まれています。詳細は、下記をご参照下さい。

http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_261226_j.html.

<http://www.u-tokyo.ac.jp/content/400007786.pdf>.

http://www.jst.go.jp/osirase/20160325_oshirase-2.html