

筑波大学先端学際領域研究センター
客員教授

藤井 義明

「 内分泌かく乱物質の生体毒性発現の
メカニズムとモニター系の開発 」

研究期間：平成11年1月1日～平成15年12月31日

1. 研究実施の概要

生体にダイオキシン(TCDD)やベンツピレンなどのような化合物が取り込まれると様々な生体応答反応が引き起こされる。すなわち、薬物代謝酵素の誘導、発癌、内分泌攪乱、奇型の誘導、免疫不全、体重消耗などの生体反応である。我々は、TCDDや3メチルコラントレンによる薬物代謝酵素の誘導メカニズム解明の研究から、誘導現象を司る細胞内因子、アリルハイドロカーボン受容体(AhR)を同定し、そのcDNAクローニングからAhRの構造を決定した。このような研究を基盤にして、これまでマウスを用いた遺伝学的な研究から予想されていた、上述のTCDDなどの化合物の示す多岐にわたる生体反応にAhRがどのように、またどの程度関与しているかを、主として分子生物学的方法と発生工学的手法を用いて解明すること、及び内分泌攪乱物質に対し感受性の高いモニターマウスを作製することを目的に研究を計画した。研究体制は、構想の項に述べたように若干の変動はあったが6班の編成で行った。成果の概要は次の通りである。

AhRは正常な状態では細胞質にHSP90, XAP2, P23の複合体として存在しているがTCDDなどの誘導剤が細胞中に取り込まれると、複合体にあるAhRはこれと結合し、核に移行する。核内でArntが存在するとAhRはHSP90複合体から解離してArntとヘテロ2量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター領域にあるXRE配列に結合して標的遺伝子の遺伝子発現を活性化する。

(図 1.)

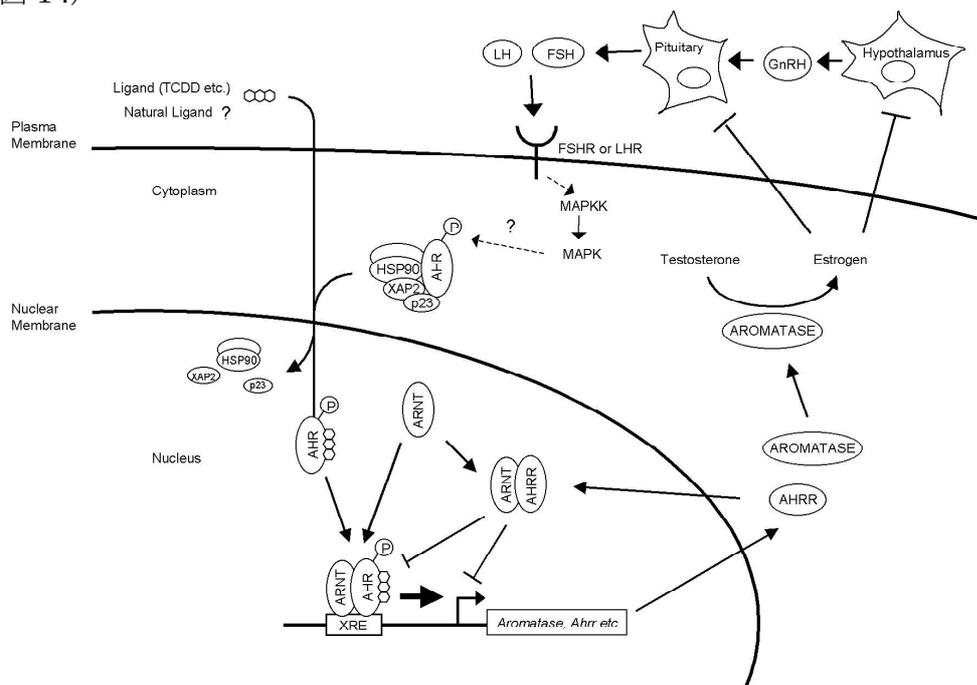


図1. AhRの作用と問題点

しかし、CYP1A2やエストロゲンの標的遺伝子のcfosやVEGFもTCDDや3MCによってその発現が活性化されるが、これら遺伝子のプロモーター領域にはXRE配列がない。DNAトランスフェクション法によってその転写活性化メカニズムを検討した結果、CYP1A2遺伝子のプロモーター領域には新しい誘導的エンハンサー配列CATGN₆CTTGが存在し、この配列にLBP-1転写因子が結合し、TCDDなどの結合したAhR/Arntヘテロ2量体はこのLBP-1に結合してCYP1A2遺伝子の発現を活性化することが分かった。また、ERE (Estrogen Response Element) によって駆動されるレポーター遺伝子は、ER (エストロゲン受容体) の存在下に3MCの結合したAhR/Arntヘテロ2量体が、エストロジェンの結合していないERに結合して標的遺伝子を活性化することが示された。2つの例はいずれもAhR/Arntは直接にDNAに結合するのではなく、DNA結合性の転写因子に結合してコアクチベーター的に働いて、遺伝子発現を活性化するAhRの新しい転写活性化メカニズムである。マウス個体を用いた実験でも3MCはAhRを介して子宮の増量に関してエストロゲン様の作用を示すことが明らかになった。これは、子宮内膜症のメカニズムを示すものとして注目される。一方では、エストロゲンと結合したERによる遺伝子発現には、3MCによって活性化されたAhRは、拮抗的に働くことが分かった。最近ではAhRの拮抗作用はERの分解によることが示されている。AhRの働きをさらに個体レベルで検討するために、相同組み換え法によってAhR欠失マウスを作製した。AhR欠失マウスはAhR(+/-)♀×AhR(+/-)♂マウスのかけ合わせで、メンデルの法則に基づいて正常に生まれてきて、見かけ上、生育も正常である。肝臓の発達は生後一週間では、やや遅滞が見られるが、それ以後は、野性型に追いつく。また、肝臓の血管系の発達に異常が報告されている。AhRは、マウスを用いた遺伝学的解析からTCDDによる奇型(口蓋裂と水腎症)の誘発と化学発癌物質による癌の発症に関与していることが示唆されていた。我々は、AhR(+/-)マウス同志のかけ合わせで得られた妊娠マウス12.5日目に40μg/kgのTCDDを経口的に投与し、18.5日に帝王切開により胎児を取り出し、水腎症を調べた結果、AhR(+/-)及びAhR(+/-)マウスはすべてに水腎症の発症が認められるのに対して、AhR(+/-)マウスでは水腎症の発症は、全く観察されないことが分かった。一方口蓋裂はAhR(+/-)マウスでは100%に口蓋裂が認められ、AhR(+/-)マウスでは口蓋裂の発症は部分的で、その程度も個体差が認められhaploinsufficiencyがあることが分かったが、AhR(+/-)マウスでは口蓋裂は全く認められなかった。また、ベンツピレンによるヒフ癌の形成でもAhR(+/-)またはAhR(+/-)

マウスでは、ヒフへの塗布あるいは、皮下注射によって17〜27週目にすべてのマウスに癌の発症が観察されたが、AhR(-/-)マウスでは、癌の発症は全く見られないことが示された。この他に、TCDD投与による胸腺の縮退は、AhR依存的に起こることを明らかにすることができたし、他の研究グループによってTCDDによる肝毒性の発現も、AhR依存的に起こることが証明された。また、これらの外来異物の毒性発現に対する感受性の動物種差と系統差の一つの重要な要因がTCDDなどの化合物のAhRに対する親和性の違いであることが、DNAトランスフェクション法によるレポーター遺伝子の発現量の測定実験と、ヒトのAhR遺伝子をマウスのAhR遺伝子座に入れ換えたAhRヒト化マウスを作製した研究によって明らかになった。TCDDに対して感受性の高いC57BL/6マウスと不感受性のDBA/2マウスでは、C57BL/6のAhRの375番目のAlaが、DBA/2ではValに変わっており、終止コドンの変異のためにDBA/2のAhRではC末端に43アミノ酸の延長がみられる。このためにDBA/2のAhRは、TCDDに対する親和性が低下し、解離定数で6倍大きくなっている。ヒトのAhRもDBA/2タイプのアミノ酸変異があつて、TCDDに対する解離定数は、やはり6倍位大きくなっている。このヒトのAhRのcDNAをC57BL/6のAhRの遺伝子座に置換してヒト化AhRのマウスを作り、TCDDや3MCに対して薬物代謝酵素の誘導、口蓋裂や水腎症の誘発がどの様になるかを調べた。その結果、薬物代謝酵素に対するヒト化AhRマウスの感受性はDBA/2マウス、あるいはそれ以下になっていることが明らかになった。また、TCDDに対する奇型の誘発に対する感受性もDBA/2マウスと同程度か、それ以下に低下していることが分った。このAhRのヒト化マウスは今後、外来異物に対するヒトの感受性を検討するモニターマウスとして使用できる可能性を示している。

AhR遺伝子は哺乳類のみでなく鳥類、魚類から線虫、ハエまで保存されている。この生物種間における高い保存性は、AhRが外来異物のセンサーとして働くのみでなく、生物本来の重要な生理的機能を果たしているように思われる。AhR(-/-)マウスをよく観察すると、AhR(-/-)雌マウスは初回の妊娠は成立するが、二回目以降の妊娠が起こり難く、また、AhR(-/-)雌マウスをC57BL/6に戻し交配を8回以上繰り返すことによって遺伝的背景をC57BL/6に純化すると不妊に近くなる。その原因を追求した結果、AhR(-/-)の不妊の原因は、生殖サイクルの不順、PMSGとhCG投与による強制排卵による排卵数の低下、黄体形成不全であることが明らかになった。この表現型は、アロマターゼ遺伝子の欠失マウスとよく似ているので、卵巣におけるE₂の

濃度を測定した結果、その濃度が顕著に減少していることが分かり、AhRがアロマターゼ遺伝子の発現制御に働いている可能性が示された。実際にマウスとヒトのアロマターゼ遺伝子を単離してその構造を調べると、プロモーター領域にXRE配列が存在し、AhRが転写因子としてこのXREに結合して働くことがChIP法及びDNAトランスフェクション法によって確かめられた。この結果は、TCDDや3MCがAhRを介してER α 及びER β との相互作用を通してエストロゲン作用を示すのみでなく、アロマターゼ遺伝子の直接的な活性化によるエストロジェンの生産を通して、エストロゲン作用を示す経路があることが証明された。従って、これまでにDESなどの化合物のようにERに直接結合してエストロゲン作用を示すメカニズムが知られていたが、外来異物によるエストロゲン作用を示すメカニズムは、本研究によって見出されたメカニズムと合わせて3つのメカニズムがあることが明らかになった。

最近では、AhRが免疫T細胞分化にも関係していることが我々も含めていくつかの研究室によって明らかにされて来ている。AhRの本来的機能の解明が進展すれば、この機能をモジュレートするものとしての内分泌かく乱物質の作用が明確に理解され、科学的根拠に基づいた的確な対策が講じられるようになるであろう。

2. 研究構想

マウスを用いた遺伝学的研究によってTCDDや3MCなどの示す生体毒の多くはAhRが関与していることが示唆されていたことや、我々のこれまでの研究の進展上からも研究の焦点を、AhRにシフトすることが最もこの分野に貢献できると考えられたので、内分泌攪乱物質の作用メカニズムの研究を、AhRに焦点をあてて行うことにした。シトクロムP450の3MCによる誘導メカニズムの研究から遺伝子上の誘導的エンハンサー配列、XRE配列を決定し、さらにそのXRE配列に誘導時に結合する因子に、誘導剤であるTCDDが結合していることを見出し、XRE結合因子がAhR (arylhydrocarbon受容体)であることを証明した。その研究の発展として、XRE配列に結合する因子のクローニングを行い、そのcDNAの単離、遺伝子の構造解析までは、順調に世界に先駆けて研究を進めることができた。しかし、遺伝子欠失マウスの作製は残念ながら世界的に2つの研究室の後塵を拝する結果になった。AhR欠失マウスの作製は研究を進めて行く上でどうしても必要であったので、その作製を行い、それを用いて、AhRがTCDDによる奇型の誘発に関与して

いることを証明した。本研究が構想されたのはこの時であった。研究は、1) AhR欠失マウスと分子生物学的研究を用いたAhRの機能の研究(藤井グループ)、2) AhRの機能について発生工学的手法を用いた研究、内分泌攪乱物質のモニターマウスの作製(山本、本橋グループ)、3) AhRによって誘導されるP450の代謝活性と標的遺伝子の研究(鎌滝グループ)、4) TCDDによる胸腺縮退及び免疫不全におけるAhRの役割(菅野グループ)、5) TCDDによる奇型誘導におけるAhRの役割(山下グループ)、6) 核内受容体とAhRの相互作用による内分泌攪乱作用(梅園グループ、平成11年4月逝去により、東大分生研武山グループに変更して藤井グループに編入)の6研究グループで研究はスタートした。しかし、梅園グループがなくなり、5グループになったが、2002年に藤井が筑波大学に移転したのに伴い、研究の一部を東北大学で続けるために、東北大学に十川グループを作り、最終的に再び6グループの編成になった。研究班は、年一回内分泌攪乱物質事務所にて、各々の研究グループの年間研究目標と成果の報告を行い、討論して相互の研究の連携を密にした。研究は、鎌滝グループがTCDDによって誘導されるP450によってステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、プロスタグランジンなどの代謝が、どのような影響をうけるかを検討する事及び、TCDD投与によってどのような遺伝子の発現が変化をうけるかを明らかにすること。藤井、十川グループは、AhRの転写因子としての作用メカニズムを明らかにすること及び、AhR欠失マウスを用いてAhRの機能解析をすること、そして、山下グループと共同してTCDDによる奇型の誘発におけるAhRの機能を明らかにすること。菅野グループは、TCDDによる胸腺の縮退と免疫系に対する作用にAhRがどのように関与しているかを明らかにすること。山本、本橋グループは、AhR欠失マウス、彼等の研究して来た薬物代謝第2相酵素の発現をコントロールするNrf2の欠失マウス及び、AhRR欠失マウスを用いて発生工学的に内分泌攪乱物質の検出に有利なモニターマウスを作製すること、等を目的に進められた。各々のグループの具体的成果は、研究成果に譲るが、研究構想を立てた時に予想していなかった新しい研究の展開は次の通りである。1) AhRの活性を抑える因子AhRR (AhR repressor)が発見され、TCDDなどの誘導剤によってAhR/Arntヘテロ2量体を介して誘導されることが見出されたこと、2) AhRがコアクチベータ的に働いて、E₂の結合していないER α あるいはER β を介してエストロジェンの標的遺伝子の発現を活性化させること、3) 生殖サイクルにAhRがアロマターゼ遺伝子の制御を介して関与しているメカニズムが明らかにされたこと。これらの研究の発

展によって新たにAhRの作用をコントロールするAhRRの役割とTCDDなどのAhRのリガンドによる内分泌攪乱作用，特に，エストロゲン作用を説明する分子基盤を研究する展望が開かれた。

3. 研究成果

3. 1 “AhRとAhRRの機能調節（藤井グループ）”

(1) 研究内容及び成果（藤井）

【AhRの外来異物による化学発癌における役割】

ベンツピレンや3MCなどの多環性発癌物質は、それ自身は癌原性を示さず、細胞内に取り込まれてチトクロムP4501A1, 1B1 (CYP1A1, 1B1)などの酵素によって酸化代謝をうけて癌原性を示すようになる。CYP1A1や1B1はAhRによってその遺伝子発現がコントロールされているので、AhR欠失マウスと野性型マウスを用いてベンツピレンの投与によってヒフ癌の発生がどのように変化するのかを検討した。生後12週目の雌マウスの皮下にベンツピレンを2mg, 一週間の間隔を置いて2回投与するとAhR(+/-)あるいは、AhR(+/-)のマウスのヒフに5週目から癌が発症し、18週目にはすべてのマウスに癌が発生する。しかし、AhR(-/-)マウスは、すべてに癌の発症は認められないことが明らかになった。これはヒフに塗布する場合も同様の結果であった。ベンツピレンを与えることでヒフ組織にAhR(+/-)やAhR(+/-)マウスでは、ベンツピレンを代謝的に活性化するCYP1A1, CYP1B1の発現が誘導されるが、AhR(-/-)マウスでは、誘導されないことが分った。さらにDNA複製時に、誤った塩基を取り込み易い複数のfidelityの低いDNA polymeraseがあるが、この遺伝子発現もベンツピレンの結合によって活性化したAhR/Arntヘテロ2量体によって誘導されることが明らかになった。これによって修飾をうけた塩基が校正されることなく変異としてDNAに取り込まれる可能性が増すことになる。AhRは発癌物質ベンツピレンの代謝活性化に働くCYP1A1とCYP1B1の発現を誘導すると同時に、その活性化された発癌物質によって修飾された塩基をDNAの変異として定着させるpolkを誘導することによって発癌の可能性を高めていると考えられる。

【AhRの雌マウスの生殖に対する働き】

AhR(-/-)雌マウスは、生殖能力が弱く、初産はやや生まれて来る子の数が少なく、2産あるいは3産目は、妊娠しにくくなることが分った。また、AhR(-/-)雌マウスの遺伝的背景をC57BL/6に純化すると不妊に近くなる。その原因は、マウスでは4～5日周期でおこる生殖周期が著しく不順になり、PM SGとhCGを与えておこす強制排卵の排卵数の減少と黄体形成が不順であることが分った。この症状はアロマターゼ欠失マウスによく似ていたため、PMSGとhCGを与えて4時間後に卵巣で起こるコレステロールからプロゲス

テロンやエストロジェンの合成に関与している酵素系の発現を調べてみるとテストステロンからエストロジェンを合成するアロマターゼの発現がAhR(-/-)マウスでは、顕著に減少していることが分った。さらに生殖周期でエストロジェンの卵巣に置ける濃度を測定すると、正常マウスに比較してAhR(-/-)マウスでは1/3以下に低下していることが認められた。さらにアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域には、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子によく見られるAd4配列のあることが分った。ヒトアロマターゼ遺伝子の上流配列をルシフェラーゼ遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製し、293T細胞に導入して、その発現を見るとAhRとArntの発現ベクター存在下に3MCを添加すると、レポーター遺伝子の発現は活性化され、さらに、Ad4BPの発現ベクターを与えると、その発現は相乗的に増強することが認められた。卵巣ではアロマターゼはGranulosa細胞に発現しているが、AhRも同様にGranulosaに発現していることが免疫組織化学的方法によって確認された。Granulosaにおいてアロマターゼ遺伝子の発現がAhRとAd4BPによってコントロールされているかについてChromatin immunoprecipitation法によって検討すると、AhRはアロマターゼ遺伝子のXRE配列に、Ad4BPはAd4配列に結合していることが確認された。興味あることにAd4とXRE配列は遺伝子上で離れて存在しているが、Ad4BP抗体で分離したクロマチン沈降物には、XRE配列が含まれており、逆にAhR抗体で分離したクロマチン沈降物にはAd4配列が含まれていることが分った。このことは、Ad4配列に結合しているAd4BPとXRE配列に結合しているAhR/Arntヘテロ2量体が相互作用していることを示している。実際にGST-pulldown法でその相互作用を検討すると、Ad4BPとAhRは結合することが示された。生殖サイクルに伴ってAhRがどのように活性化されて核に移行しアロマターゼ遺伝子の活性化に働くのは、今のところ分らない。生殖サイクルに伴ってAhRのリガンドが合成されてAhRを活性化するのか、FSHなどのホルモンによるリン酸化カスケードによってAhRが活性化するのか今後に残された重要な問題である。マウスにDMBAなどのAhRのリガンドを投与するとアロマターゼ遺伝子の発現が活性化されることは確認された。このことは、アロマターゼ遺伝子の発現がAhRを介して外来異物によって活性化されることを示している。もう一つの外来異物による内分泌攪乱作用メカニズムである。また、AhR(-/-)雌マウスにエストロジェンを与えると雌マウスの排卵数は、部分的に回復することが分った。このことは、AhR(-/-)マウスの不妊の原因の一つはアロマターゼ遺伝子の発現低下であることを示している。

【AhRシグナル伝達系におけるAhRRの役割】

AhRに類似の因子があるかどうかAhRのcDNAをプローブにしてマウスのゲノムライブラリーをスクリーニングする過程で、この遺伝子クローンが得られた。この遺伝子クローンをプローブにしてマウスの小腸cDNAライブラリーよりcDNAを単離して、塩基配列を決定した結果、このcDNAは701アミノ酸をコードしており、N末端からPASをコードする部分までは、AhRとアミノ酸配列がよく似ているが、それよりC末端側のアミノ酸配列は、類似性が殆どないことが分った。(図2.)

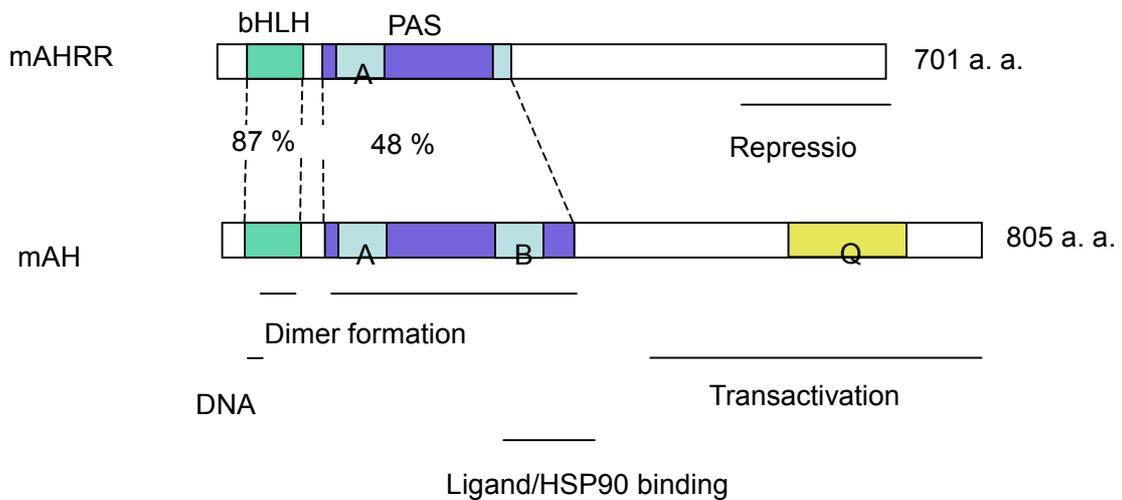


図2. AhRRとAhRの構造の比較

このcDNAのコードするタンパク質はAhRのパートナー分子であるArntとヘテロ2量体を形成し、XRE配列に結合することが示された。しかし、XRE配列によって駆動されるレポーター遺伝子の発現は、活性化しなかったが、このcDNAを発現ベクターに組み込んでコードするタンパク質を発現させるとAhR/Arntヘテロ2量体による遺伝子発現を強く抑制することが分った。この性質によって新しいcDNAによってコードされるタンパク質は、AhRR (AhR repressor)と命名された。この阻害のメカニズムは、AhRとArntの取り合いとAhR/Arntヘテロ2量体とAhRR/Arntヘテロ2量体のXREへの結合の拮抗によることが明らかになった。また、XRE配列に結合したAhR/ArntはHDAC活性によって転写を抑制することがHDACの阻害剤を用いた実験によって示された。また、AhRRの遺伝子をクローニングしてその構造を決めたところ、遺伝子プロモーター領域にGC-box配列とXRE配列が存在すること

が分った。さらにAhRR遺伝子の上流配列をルシフェラーゼ遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製し、293T細胞にトランスフェクトすると3MCによってレポーター遺伝子は活性化されることが分った。さらに生体の組織でもAhRRは3MCの投与によって、発現が誘導される。その誘導的発現は肺、心臓など比較的限られた組織に限られることが分って来た。またこの他にAhRの活性化によって卵巣とマクロファージにAhRRが誘導されることが見出された。これらの組織においてAhRRがどのような機能を担っているかは、現在のところ不明である。

AhRRの機能を検討する目的で相同組み換え法を用いてAhRR欠失マウスを作製した。AhRR(+/-)♀×AhRR(+/-)♂のかけ合わせからAhRR(-/-)マウスはメンデルの法則に従って生まれて来ることが分った。見たところ正常で、生育も野性型と変わらず、生殖能力も殆ど変わらないことが観察されている。

今後このAhRR欠失マウスを用いて、AhRRの機能解析等を行う予定である。

(2)研究成果の今後期待される効果（藤井）

AhRはTCDDなどの多環性芳香族化合物による異物代謝酵素シトクロムP450の誘導機構の研究からそのcDNAが単離され、転写因子としての機能が明らかにされて来た。さらに分子生物学的研究や発生工学的研究によって、外来異物の示す催奇型性、発癌プロモーション作用、胸腺縮退による免疫不全、内分泌攪乱作用などの多岐に渡る生物毒性の発現にもAhRが関与していることも明らかにされた。従って化学物質のAhRの結合性によって、その物質の生体作用がある程度予測することが可能である。AhRはこのように生体異物の生体毒発現の仲介因子として、生体にとって不都合な反応に働くにもかかわらず、広く魚類、鳥類、哺乳類や線虫、ハエに至るまで保存されていることから高い保存性を保証する生物にとって重要な役割を担っていることが考えられた、AhRの本来的な生理機能を追求した結果、生殖と免疫のT細胞の分化にかかわっていることが分って来たので、今後AhRの機能について、生殖とT細胞の分化に関連した研究の進展が期待される。AhRはTCDDなどのリガンドによって活性化されることが知られているが、このような生理的機能の発揮に天然のリガンドが必要なのか、あるいはFSHなどのシグナル伝達のリン酸化カスケードによるリン酸化のみによっても活性化されるのか、AhRの生理機能の研究からこの重要な問題は解決さ

れる可能性がある。AhRはTCDD, 3MC, ベンツピレンなどのアゴニストやラスベラトロール, α -ナフトフラボンなどのアンタゴニストなどが知られているので, AhRの活性を化合物によってコントロールすることが可能である。またヒフにおけるAhRの生理機能についても活性型AhRのトランスジェニックマウスが研究に使用できるようになっているので, 研究が進展するであろう。AhRのヒト化マウスは, ヒトの化合物に対する応答性を予測するのに使える。例えば, 薬の開発でCYP1A1の誘導性が一つの重要な岐路になっているが, 生物種の感受性は, AhRによって変化するので, 今後この問題はヒト化AhRマウスを用いて試されるべきである。ヒトのAhRはマウスのAhRに比較して化合物に対する感受性が低いので薬になる化合物の間口が広がる可能性がある。ヒト化AhRマウスの研究はこの点を考えてもう少し詳細に検討が加えられるべきである。

(1) 研究内容及び成果 (武山)

ダイオキシン類をはじめとした人工加工物群が内分泌攪乱作用を発揮することは環境汚染による野生動物の雌化等で顕在化した事実である。このような性転換を伴うダイオキシン類の内分泌攪乱作用については, 数多くの作用機構について検討がなされ, いくつかの仮説が立てられている。すなわち, 女性ホルモンや男性ホルモン等の性ホルモン生合成攪乱や, これら性ホルモン受容体タンパクあるいはその遺伝子群の発現量そのものを攪乱する作用などが指摘されてきた。しかしながら, これらの機構のみではダイオキシン類の攪乱作用を明確に説明できるものではなかった。なぜならば, これら攪乱作用は性ホルモンの作用を一方向的に亢進若しくは抑制するものではなく, 臓器によってはその作用が正若しくは負に作用することが示されているからである。従って, 今まで示されてきたような機構ではなく, 性ホルモン作用を担う受容体自身の機能調節の可能性が考えられた。本研究では, 従って従来のアプローチとは異なり, 受容体の転写制御機能調節という観点から研究を展開したものである。以下, 具体的な方法及び実施の内容について述べる。

エストロゲン作用を担うエストロゲン受容体(ER)とダイオキシン類の作用を担うAhR受容体との機能的相互作用について検討した。特に, 両者の受容体は極めて類似した作用機序により, それぞれの転写機能を発揮するため, これら受容体の共通の転写共役因子についても検討した(図1)。培養細胞においてERの転写制御能に対するAhRの作用の有無を検討したと

ころ、驚いたことに、E2未結合で不活性化状態のERをリガンド結合AhRが活性化し、ERを介した転写を活性化することが明らかになった。ERと転写共役因子との相互作用は本来E2結合に伴うAF-2の構造変化に依存しており、MAP kinaseによるリン酸化等これまでに知られていたクロストークにおいてもE2未結合ERが活性化する例は知られていなかった。この結果は遺伝子欠損マウスを用いた検討において再確認された。マウス子宮において、AhRリガンド3-methylcholanthrene (3MC)投与はE2投与と同様にエストロゲン標的遺伝子c-fos, VEGFの発現を誘導し、この誘導はAhR欠損マウス、ER α 欠損マウスのいずれにおいても検出されなかったのである。すなわちAhRリガンドはAhRに結合し、さらにER α を介するクロストーク経路でエストロゲン様作用を発揮すると考えられた。

また、Wormkeらの報告と一致して、E2結合により活性化状態のER機能はAhRにより抑制された。すなわちAhRはERシグナルの正常なON/OFFを攪乱するという、新規のクロストーク経路が見い出されたのである。

さらに我々はこのクロストークの分子機構を検討した。ERとAhRが直接又は間接に会合する可能性を検討したところ、AhRはリガンド依存的にERと直接結合し、さらに転写共役因子p300をリクルートすることが明らかとなった。クロマチン免疫沈降(ChIP assay)によっても、エストロゲン標的遺伝子プロモーター上でER, AhR, p300がAhRリガンド依存的に会合することがわかった。また、HeLa細胞からの精製によっても、AhR, ER, p300は分子量670kDa以上の複合体を形成していた。すなわち、E2未結合ER自身は転写共役因子複合体をリクルートできないコンフォメーションをとっているが、ERに直接結合した活性型AhRが転写共役因子をリクルートし転写制御複合体を形成、ERが標的配列の認識を担うことで、結果的にエストロゲン標的遺伝子の転写が誘導されるのである。AhRがERを乗り物のように利用するこの機構は「hijack仮説」として紹介された(図2)。

今回の研究で、ダイオキシン類と女性ホルモンシグナルとの間に、受容体同士の相互作用を介した転写制御機構の攪乱というクロストーク経路が存在することが新たに明らかとなった。これまで両者のクロストークに関して動物、細胞レベルでの知見が報告されていたものの、内分泌攪乱化学物質の分子レベルでの作用点には不明な点が多かった。今回の研究はその一つの作用点が転写制御複合体を介した転写制御機構にあることを示している。内分泌攪乱化学物質の物質種は多様であるが標的となる生体機構は有限であるため、今回のような分子生物学的アプローチによって毒性機構

の全貌が解明されていくと期待される。

一方、ダイオキシン類の抗エストロゲン作用の分子機構として、WormkeらはERの分解が亢進することを報告した。そこで、AhRリガンドのER転写制御機能抑制の分子機構について、AhR及びERのタンパク分解制御について検討した。その結果、AhRはリガンド結合後直ちに核内に移行するが、この際AhRタンパクは不安定となり、分解することを確認することができた。更にERとの関連を詳細に検討したところ、AhRは直接相互作用するERタンパクをも不安定化することが明らかになった。このことは、ユビキチン化されたAhRは同時にERのユビキチン化を促進する効果が考えられ、活性化されたAhRは一種のタンパク分解促進因子のように思えた。このように、AhRリガンドの負の内分泌攪乱作用は受容体タンパクの分解制御を介する可能性が指摘された。

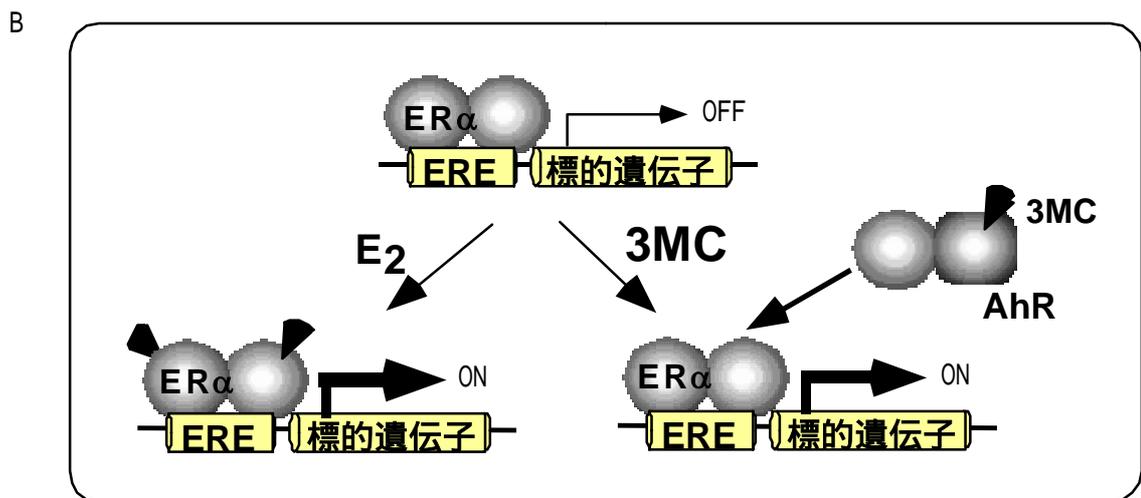
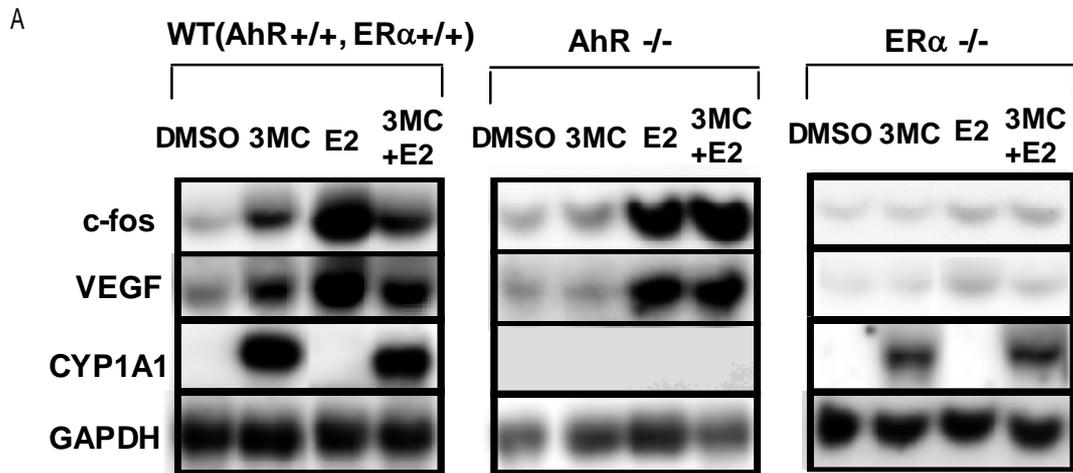


図1 AhR はリガンド未結合ERの転写促進能を誘導する

図1, AhRはリガンド未結合ERの転写促進能を促進する。

マウス子宮において, エストロゲン標的遺伝子c-fos, VEGFの発現がリガンド活性化AhR及びERαを介して誘導される。

リガンド結合AhRによる正常なERシグナルの攪乱作用

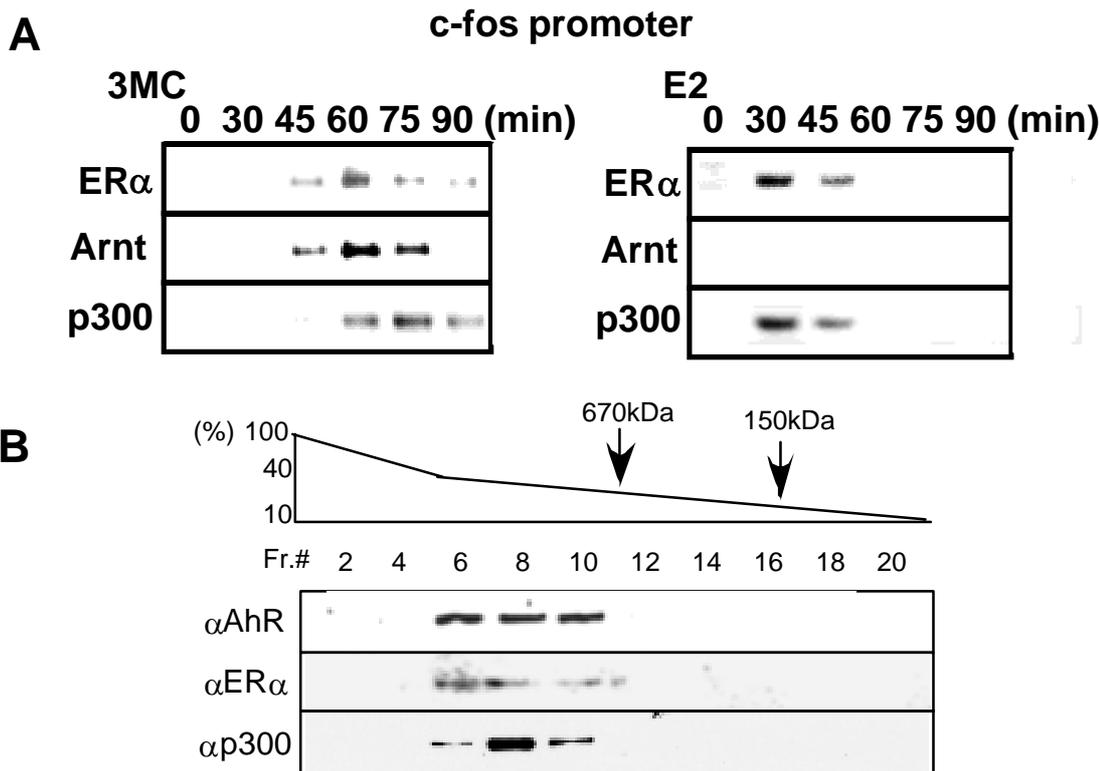


図2 AhR, ERは転写制御複合体を形成する

図2, AhR, ERは転写制御複合体を形成する。

ChIP法により, エストロゲン標的遺伝子(c-fos)プロモーター上でAhR, ER, 転写共役因子p300が複合体を形成する。

子宮癌由来HeLa細胞からの精製により, AhR, ER, p300が巨大複合体を形成する。

(2)研究成果の今後期待される効果 (武山)

今回の研究結果から, ダイオキシン類の内分泌攪乱作用, 特にエストロゲンの攪乱作用の分子機構の一端を明確にできた。その分子機構は従来から考えられてきた攪乱作用とは異なった様式であり, 受容体間での相互作用であった。また, この受容体間の相互作用に伴い, 核内の未知共役因子との会合が予想された。ERの転写機能促進の場合には, 従来のERコアクチベーターとの会合は必ずしも確認できず, AhRのコアクチベーターでもあるp300/CBPのみ確認することができた。近年の転写促進機構を鑑みると, 転写共役因子群は複合体としてこれら受容体転写制御因子群と相互作用することから, 未知あるいは既知転写共役因子群との相互作用が考えられる。

実際、生化学的なアプローチにより、ER/AhR会合体を含む、核内巨大複合体の単離を試みたところ、その存在が確認され、現在複合体構成因子群の同定を急いでいるところである。

ER/AhRともにリガンドが結合した状態では、ERの機能は抑制され、両受容体タンパクは不安定化することを今回の結果から明らかにした(Ohtake et al., submitted)。現在までにユビキチン化を行うこれら受容体特異的E3リガーゼの存在は報告が無いが、これらの結果から特異的因子の存在が予想される。現在、上述と同様のアプローチにより、このタンパク分解に導く共役因子群の同定も進めているところである。

このような受容体群に結合する核内共役因子群を検索、同定することでダイオキシン類のエストロゲン作用攪乱の分子機構の本態に迫れるものと考えている。

今回はこのようにERの機能制御について詳細に解析したが、ERと同様に内分泌系で極めて重要な役割を果たしている他のステロイドホルモン受容体群についても同様な機構が考えられる。ダイオキシン類の内分泌攪乱作用として、雌化が野生動物の間で広く知られてきているが、その機構の一つとして男性ホルモン受容体(AR)のAhRによる機能抑制が考えられる。実際、AhRとARとの機能的関連について検討したところ、転写制御能に関し、相互に干渉作用がある可能性が考えられた。現在、この点についても詳細な解析を行っており、ERを介さないダイオキシン類の内分泌攪乱作用の一端が明らかになるかもしれない。また、AR、ERを含めた核内受容体群の中には、内因性リガンドが同定されていないオーファン受容体が存在するが、ダイオキシン類がそれら受容体のリガンドとして作用する可能性も考えられ、検討を必要とする。

3. 2 “内分泌攪乱物質の代謝に関わるP450の検討（鎌滝グループ）”

(1) 研究内容及び成果

【研究目的】

ダイオキシン類や多環芳香族炭化水素 (PAH) などの内分泌攪乱物質に対する生体応答は多岐に渡るが、その中でも顕著に見られる現象は芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介した薬物代謝酵素 (チトクロームP450, 以下CYP) の誘導である。ダイオキシン類に代表されるハロゲン化芳香族炭化水素 (HAH) は一般にCYPによる代謝を受けづらいのに対し、ベンゾ[a]ピレンや3-メチルコランスレン (3MC) に代表されるPAHはCYPにより遺伝子損傷性の代謝物へと変換される。

CYPによるPAHの代謝的活性化がPAHによる発がんのイニシエーションに重要な役割を果たすことはよく知られているが、この機構がPAHによる様々な内分泌攪乱作用にも関与するか否かは不明である。そこで本研究では、ダイオキシン類やPAHによる毒性発現、特にPAHによる内分泌攪乱作用、におけるCYP誘導の意義を解明することを目的とした。

【研究方法】

9週齢の雌性野生型およびAHR欠損マウスに3MCを投与した。投与量は80 mg/kg body weightとし、2日間腹腔内投与した。最終投与より24時間後に肝臓を摘出し、mRNAを調製し、DNAマイクロアレイ（インサイト社、Mouse GEM1）にて3MCによりAHR依存的に発現が変化する遺伝子を探索した（図 1）。DNAマイクロアレイにより発現が2倍以上変化した遺伝子を抽出した。また、DNAマイクロアレイの結果はノーザンブロット分析により再現性を確認した。レポーターアッセイは、ヒト肝がん由来HepG2細胞にperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α に応答するレポータープラスミドおよびPPAR α 発現プラスミドを共導入し、3MCで処置することにより行った。なお、マウスを用いた実験は北海道大学薬学部動物実験委員会の規定に従って行った。

【研究結果】

DNAマイクロアレイ解析の結果、3MCによりAHR依存的に10遺伝子の発現が誘導され、44遺伝子の発現が抑制された。抑制された44遺伝子のうち、13遺伝子は脂質代謝に関与するPPAR α の標的遺伝子群であった（CYP4A10、カルニチンパルミトイル転移酵素およびアシルCoA転移酵素など）。3MCによるPPAR α 標的遺伝子のAHR依存的な抑制はノーザンブロット分析で確認した（図 2）。以上の結果から、脂質代謝に関与するPPAR α 標的遺伝子の発現が3MCによりAHR依存的に抑制されることが明らかとなった。上記の抑制が3MCによるPPAR α シグナル伝達の抑制の結果であるか否かを調べるために、PPAR α に応答するレポータープラスミドをHepG2細胞に導入し3MCで処置した。その結果、PPAR α による転写活性は3MCにより濃度依存的に抑制された。また、この抑制はAHRのアンタゴニストである α -ナフトフラボンにより解除された。この結果から、3MCはAHR依存的にPPAR α シグナル伝達系を抑制することが明らかとなった。PPAR α シグナル伝達系は、PPAR α がそのパートナーであるレチノイドX受容体 (RXR) α とヘテロダイマーを形成し、このヘテロダイマーがPPAR応答配列に結合することにより起こる。そこで次に、3MCがPPAR α およびRXR α の発現に及ぼす影響

をノーザンブロット分析およびウェスタンブロット分析により調べた。PPAR α の発現は3MCによりほとんど変化しなかったが、RXR α の発現は3MCによりAHR依存的にmRNAとタンパク質レベルの両方で抑制された。また、この抑制の経時変化を調べたところ、mRNAの抑制は3MC投与後約24時間で認められたのに対し、タンパク質の抑制は3MC投与後約4時間とはやい段階で認められた。以上の結果から、3MCによるPPAR α 標的遺伝子の抑制はRXR α の発現抑制、特にタンパク質レベルでの抑制、が原因であることが示唆された。上記の仮説をさらに検討するために、RXR α が関与する他の核内受容体のシグナル伝達系も3MCにより抑制されるか否かをレポーターアッセイにより調べた。その結果、3MCはPPAR α シグナル伝達系以外にもレチノイン酸代謝に関与するレチノイン酸受容体 (RAR) , オキシステロール代謝に関与するliver X receptor (LXR) および脂肪細胞分化に関与するPPAR γ のシグナル伝達系も抑制することが明らかとなった。最後に、3MCによるPPAR α シグナル伝達系の抑制が脂質代謝に与える影響を調べるために、3MC投与した野生型およびAHR欠損型マウスの肝臓切片をオイルレッドで染色し、脂肪滴の蓄積を検討した (図 3)。その結果、野生型マウスに3MCを投与したときのみ、中心静脈付近に脂肪滴の蓄積が認められた。以上の結果より、3MCなどのPAHはAHRを介してPPAR α シグナル伝達系を抑制することにより、脂質代謝異常ひいては脂肪肝などを誘発することが示唆された (図 4)。

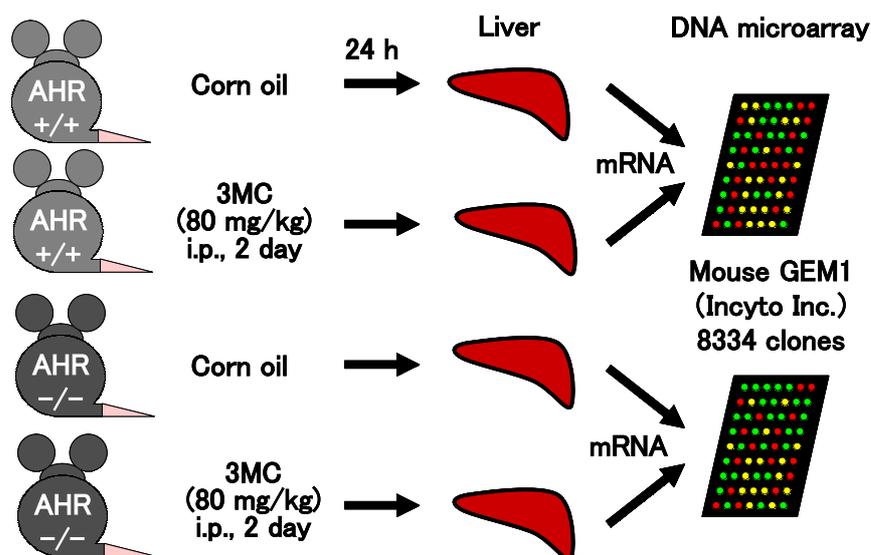


図 1. DNAマイクロアレイによる3MCによりAHR依存的に発現が変化する遺伝子の同定

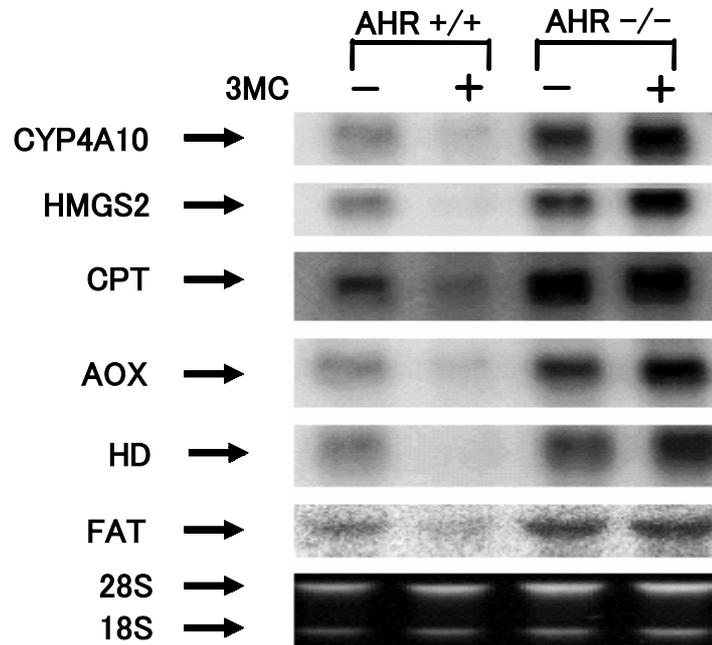


図 2. 3MCによるAHR依存性的なPPARα標的遺伝子の発現抑制

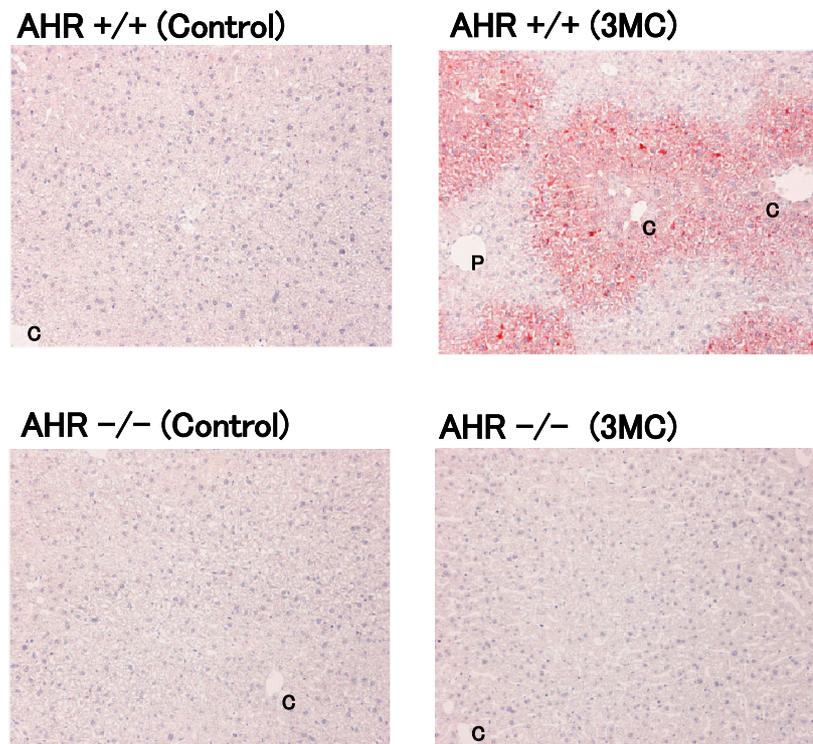


図 3. 肝臓における3MCによるAHR依存性的な脂肪滴の蓄積。 C, central vein; P, portal vein.

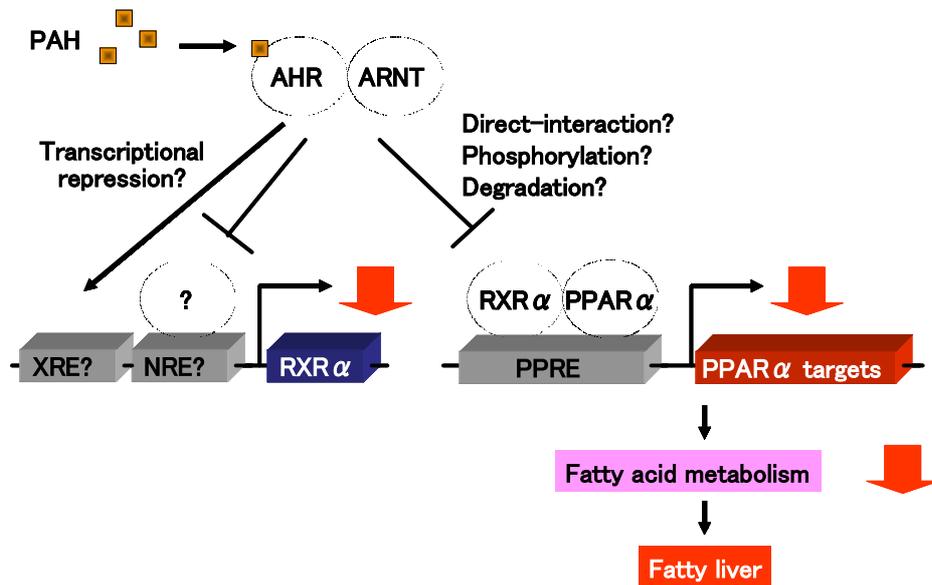


図 4. 3MCによるAHR依存的なPPAR α シグナル伝達系の抑制モデル

(2) 研究成果の今後期待される効果

ダイオキシン類やPAHによるAHRを介した毒性発現は多岐に渡るが、その分子機構に関してはほとんどわかっていない。本研究では、野生型およびAHR欠損マウスを用いたDNAマイクロアレイ解析により、代表的なPAHである3MCがAHR依存的に脂質代謝に関与するPPAR α シグナル伝達系を抑制することを明らかにした。また、本研究は、3MCによるPPAR α シグナル伝達の抑制が肝臓における脂質代謝異常ひいては脂肪肝にも関与することを明らかにした。本研究では、3MC以外にもベンゾ[a]ピレンやDMBAなど、他のAHRのリガンドとなりうるPAHについても検討したが、これらPAHもまたPPAR α シグナル伝達系を抑制した。PAHはタバコ煙中やディーゼル排気中などに多く含まれるため、これらに高曝露されるヒトにおける脂質代謝異常などについて今後検討していく必要があると思われる。また、本研究では3MCによるPPAR α シグナル伝達抑制の分子機構を検討した結果、この抑制はPPAR α のヘテロダイマーのパートナーであるRXR α の抑制によることを明らかにした。RXR α はPPAR α 以外にも多くの核内受容体のヘテロダイマーのパートナーとして働き、ホルモンバランスのマスターレギュレーターであることが知られている。このため、本研究で見出した機構は、PPAR α シグナル伝達系にとどまらず、他の多くの核内受容体シグナル伝達系にも当てはまる可能性がある。この可能性は、PAHによる多岐に渡

る毒性発現を説明しうる機構であり、今後さらなる検討が必要であると思われる。

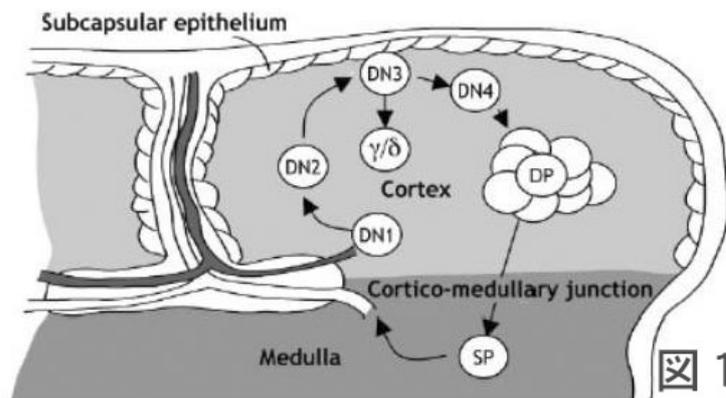
3. 3 “ダイオキシンによる胸腺縮退のメカニズム（菅野グループ）”

菅野グループ（広島大）は当初、ダイオキシンの胸腺に及ぼす影響解析を目指して研究チームを構成したがその後、派生的な研究として、造血幹細胞に対する影響解析の研究も行ったので、以下に別個に（胸腺）（造血幹細胞）と2つに分けて記載する。

(1) 研究内容及び成果

【胸腺】

胸腺という器官はTリンパ球の発生・分化に重要な器官で有るだけでなく、免疫系全体にとっても、「自己・非自己の識別」をリンパ球が学習する教育機関として非常に重要である。ここで正しく「自己同一性」を教育されなければ、外部からの感染症に対応出来なくなり、さらに間違った教育から自己を攻撃してしまう、などのために「感染症」「自己免疫疾患」「免疫不全」「アレルギー・アトピー」との関係を考えるうえで、中心的な器官である。その胸腺の中で、リンパ球は、図1の様に胸腺の中を移動しながら分化・成熟し、末梢・全身へと運ばれてゆく。さらに詳しくその分化段階を見ると図3の様な段階が判明しており、ほぼ各段階ごとに細胞死のルートが設定されていると考えられている。



研究の経過：

ヒトの体内に普通にダイオキシンが入ってくるのと同じ経路（経口投与）でマウスに投与したときに、「マウス個体（特に免疫系）に何が起きているのか？」という事を正確に記述・解析することにフォーカスを絞った。免疫学的には、最近リンパ球の発生・分化に核内受容体ファミリーが重要な役割を果たしていることが少しずつ明らかになってきているが、AhRが胸腺内T細胞分化にどのような役割を果たしているのか、という点に研究の的を絞っ

た（生体内のリガンドは不明？）。とにかく、ダイオキシンによる免疫不全（胸腺萎縮を含む）に関して、あまりにも間違っただ情報が報告されている。実際、ダイオキシンによる胸腺萎縮、免疫不全の作用点は、「アポトーシス・細胞周期停止だ」として *in vitro* の実験をしている論文・報告があるが、それは間違いである事がはっきり分かった。

1) TCDDをただ1回、経口投与するだけで、3日後から胸腺の萎縮が始まり、回復するのに1ヶ月以上かかることがわかった（図2）。最も症状が顕著である3日—2週間の時期について、注目すると、この時期の胸腺は正常の1/10の大きさになり、遺伝子再構成を起こす分化段階（図3のpro-T3とpro-T4の間；）が最も影響が強い事などがわかった。DN3(ProT-3)の細胞をさらに *resting* (beta-selection前) なサイズの小さい細胞と、増殖している (beta-selection後) サイズの大きい細胞の比率を観察すると、明らかにTCDD投与群のbeta-selection後のサイズの大きな細胞数が減少しているのがわかる。このことから、DN3(ProT-3)細胞で、pre-TCR シグナルが入り細胞増殖が起きるステージから後のT細胞分化段階においてTCDD投与による異常（細胞数の減少）が起こることが判明した。その分子機構としては、DN3細胞の増殖（またはサバイバル障害）と細胞死のバランスの破綻が起きていることが考えられた。

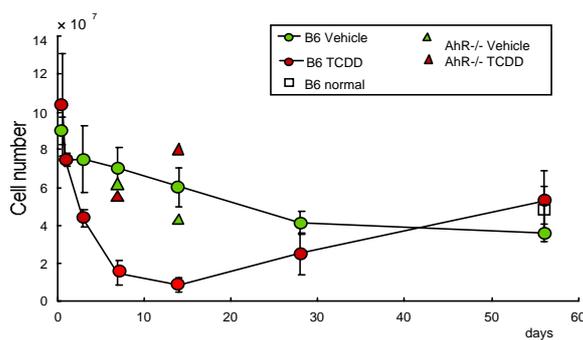


図2 胸腺細胞数の推移

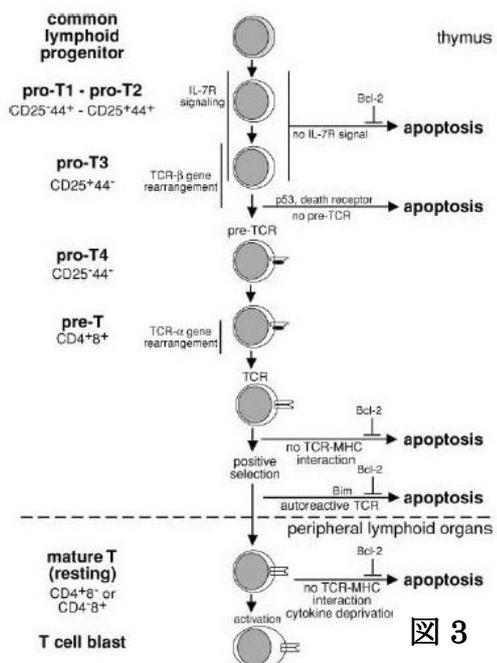


図3

2) この時期のダイオキシンの作用点は細胞周期ではなく、細胞死調節機構であることが判明した。ダイオキシンの作用による胸腺細胞死は、DNA分断非依存性、Bcl-2非依存性 (Bcl-2 Tgマウスでレスキュー出来ない)、Caspase非依存性、であるが、ミトコンドリア膜電位依存性、の細胞死であることが分かり、「アポトーシス」とは異なるタイプの細胞死である事が分かった (データは示しません)。形態学的にも、電子顕微鏡観察を行ったところ、ミトコンドリアの膨化や、小胞体(ER) が空胞化している像が多く見られ、死細胞の割合も多かった (図4)。特にこのステップの細胞死はp53依存性の細胞死であることが判明してきており、AhR依存性の細胞死の経路とp53依存性細胞死が交差している可能性が考えられた。

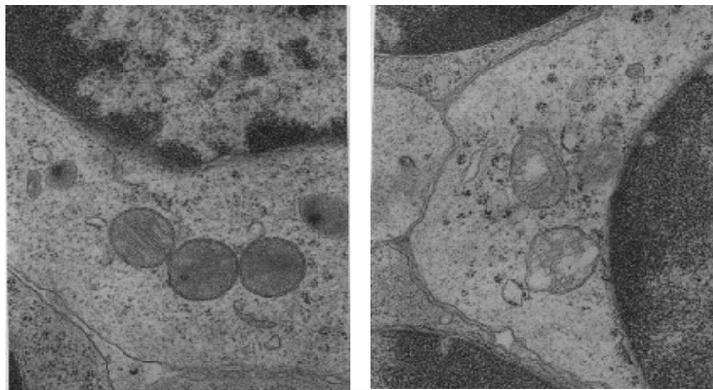
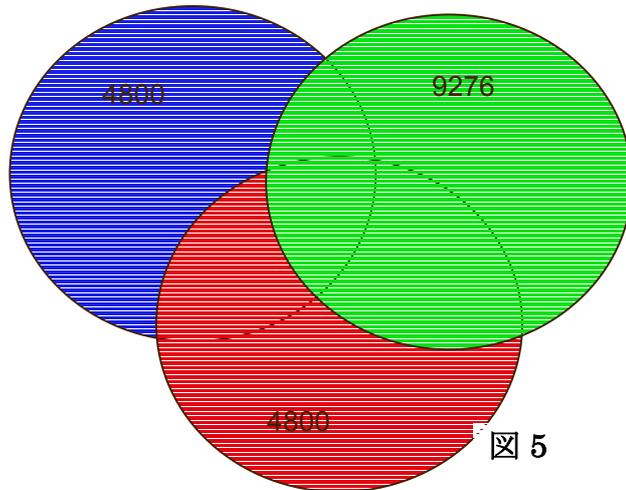


図4 TCDD投与による胸腺T細胞ミトコンドリアの膨化 (左; コントロール、右 TCDD投与群)

3) Ahリセプター遺伝子欠損マウスにおいて同様の実験を行うと、胸腺萎縮が90%以上回復することから、ミトコンドリアの膜電位を介したCaspase非依存性の細胞死機構がAhR依存性である事が判明した。この経路・機構にAhR/Arntの標的遺伝子群が関与していると考えられた。この事は逆にいうと、この時期 (図1, 図3のDN3からDN4への移行期) にリンパ球が滞在しているsubcapsular領域にAhRのリガンドが存在している可能性も示唆している。

4) 標的遺伝子の検索に関しては、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。TCDD投与後12時間の時点では胸腺内T細胞のサブセット分布に変化が見られないので、投与後12時間の時点の、未熟なDN細胞群(CD4-CD8-)を回収し、RNAを抽出した後、マイクロアレイ解析を行った。DN細胞集団は胸腺全体の約5%程度であるため、1回の実験にマウスを50-100匹使用した。さらにマイクロアレイ解析のアーティファクトを減らすために3種類のマイ

クローレイを用いて実験を行った（図5）。



	Vehicle	TCDD
C57BL/6	A	A, C
AhR+/+	D,	D, E
AhR-/-	B	B, C, E

図5

複数回ずつ異なったDNAマイクロアレイを用いた実験を行い、オーバーラップして検出された標的遺伝子群のみを解析対象とした（図5および表）。

マウス実験より，このTCDD投与による胸腺萎縮はAhR依存性であることがわかっていたので，AhR-/-マウスを用いて同様な実験を行い，AhR-依存性の標的遺伝子群にさらに解析目標を絞った（図6）。その結果cut-off ratio 3.0以上に設定した場合には，AhR依存性的にDN細胞群で動く遺伝子は，上昇するものが8個，減少するものが3個であった。

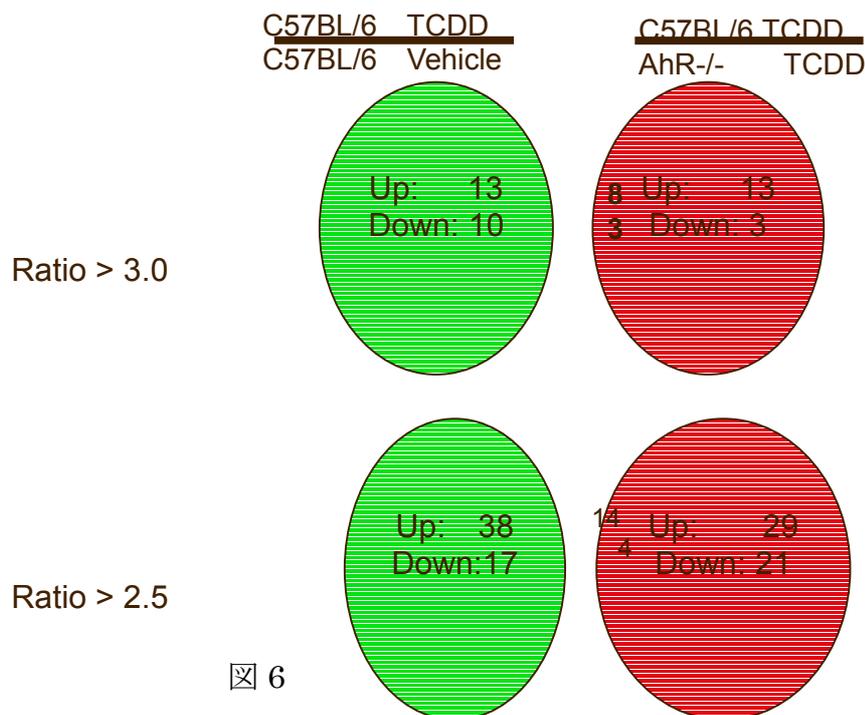
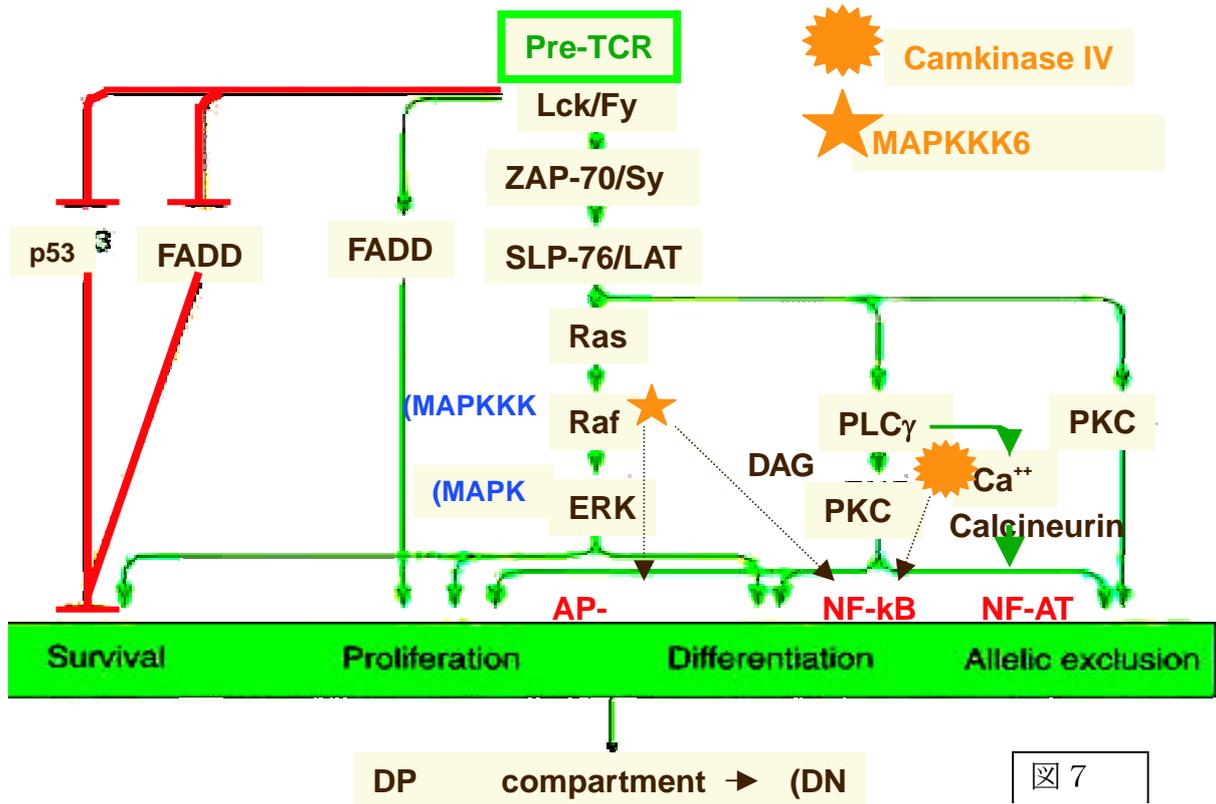


図6

	Gene bank #	Gene	
Up (ratio >3.0)	NM09692	Apolipoprotein A1	
	NM010217	Connective tissue growth factor (Ctgf, Hcs24, Fisp12)	
	NM.008851	Phosphatidylinositol membrane-associated (Pitpnm,RdgB, DRES9, mpt-1)	
	NM.019715	RIKEN cDNA 1700094M07(=potassium channel modulatory factor?)	
	NM.019770	Coated vesicle membrane protein	
	NM010483	Serotonin reseptor 5B (Htr5B, 5-Ht5B)	
	NM.019728	Defensin beta 4 (Dfb4)	
	NM.019540	Pore forming protein-like (Pfp1, Epsc5, Epsc50)	
	Down (ratio <3.0)	X58995	Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV catalytic subunit
NM.016675		Claudin	
NM.016693		MAPKKK6(Map3k6) (apoptosis signal regulating kinase -2, ASK-2)	

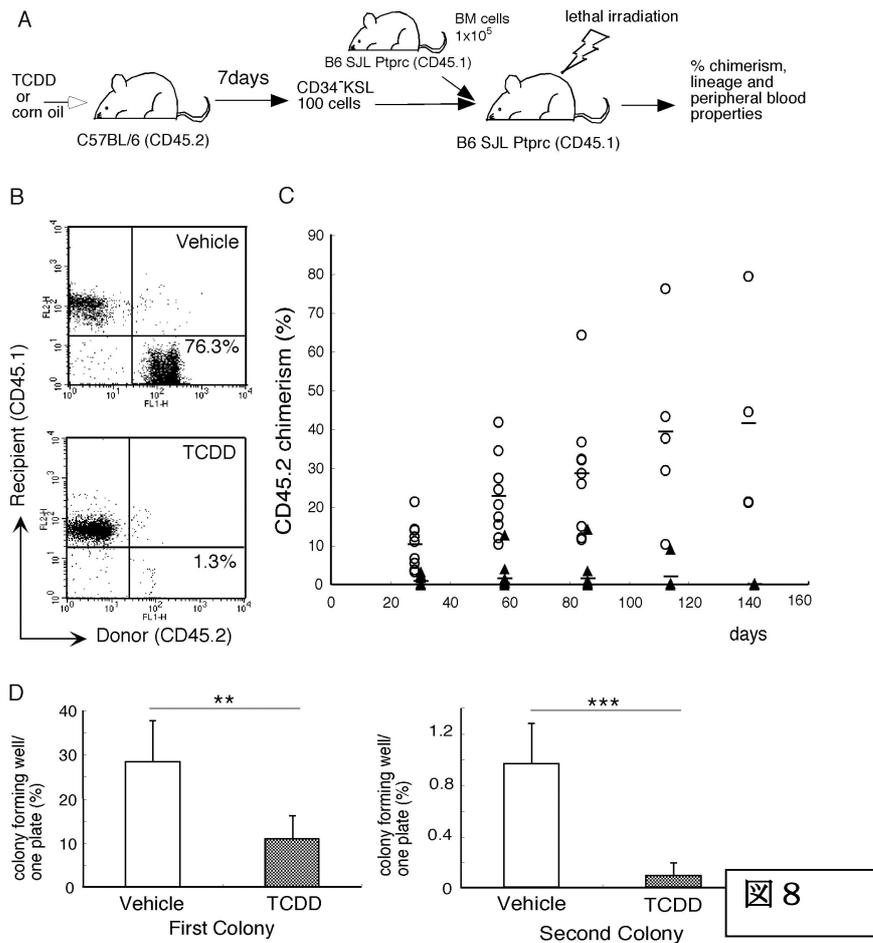
特に、そのリストのなかで、発現が減少する遺伝子としてCaMKinaseIVとASK-2が見つかってきた。これらは共にpre-TCRのシグナル伝達系に参与するKinaseであり、これらの発現調節をAhR/Arntが行っていることが想定され、TCDDの作用点である可能性が高い事がわかった。(図7)



(造血幹細胞)

免疫系・血球系細胞の基になる「造血幹細胞」に対するTCDDの影響は何であろうか？ほとんど報告がなされていないのが現状である。そこで、ダイオキシン投与による造血幹細胞の機能を骨髄移植の実験系を用いて解析を始めた。その結果、表面マーカーは造血幹細胞であるが、まったく再構築能を失っていることが判明した（図8参照）。図8Aの様に、ダイオキシン経口投与1週間後のマウス骨髄より、CD34⁺, c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lineage marker-negativeの造血幹細胞分画をFACS Vantage/ cell sorterで単離し、その細胞100個を、致死量の放射線を照射し、血球系を破壊しておいたレシピエント・マウスに骨髄移植を行った。その後140日まで、観察し長期再構築能を検討した。図9Cのグラフで分かるように、コントロール群（白丸）は正常に血球系が再構築されたが、ダイオキシン投与群（黒三角）の幹細胞分画はその能力をほとんど失っていた。この結果は単にダイオキシン類が幹細胞の自己複製能をも標的にしているという毒性学的な観点だけでなく、AhRとその自然リガンド系が幹細胞の自己複製制御機構に関与していると考えることが出

来る。



(2) 研究成果の今後期待される効果

(胸腺)

今回の研究から、AhR/Arnt系（またはTCDDの作用）は、T細胞のDiversity形成に重要なpreTCRからのシグナルを受け取った後の細胞増殖（beta-selection）を制御していることがわかった。少なくともそのシグナル伝達分子の遺伝子発現がAhR/Arntにより制御されていることがわかった。結果的に免疫系のDiversityが正常よりかなり小さくなることから、自己免疫疾患・アレルギーとの関係について無視できないことがわかった。その人工的制御技術の開発、またはTCDDの作用を阻害する手段の開発につながる分子標的を示すことが出来た。その意味では社会的な波及効果は大きいと思う。

(造血幹細胞)

この研究結果は、AhR/Arntを介して、造血幹細胞の自己複製能を制御できる

可能性が存在する事を意味している。このことは将来的には患者自身の造血幹細胞を用いた再生医療を考える上で、その人工的制御技術の開発という観点からは非常にインパクトが大きいと思われる。さらにTCDDが造血幹細胞の機能にも致命的な障害を与えているという、全く初めての研究結果なので、その意味でも初回の影響は大きいと思われる。

3. 4 “ダイオキシンと発生・生殖（山下グループ）”

(1) 研究内容および成果

【はじめに】

環境汚染物質として悪名高いダイオキシンは、生体に対して種々の毒性を発揮する。その毒性は、肝臓の解毒酵素の誘導、発ガンのプロモータ作用、免疫毒性、生殖毒性、発生毒性（催奇形性）、内分泌攪乱作用と多岐にわたる。本研究は、マウスを用いて、ダイオキシンが胎児に奇形を誘発する機序を明らかにする目的で開始した。

【ダイオキシンがマウス胎児に奇形を起こす機序（口蓋裂と腎盂拡大）】

妊娠マウス（Jcl:ICR系統）の妊娠12.5日（膣栓発見日を妊娠0日とする）にダイオキシンのうち、最も毒性が強いといわれる2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 以下TCDDと略）を体重1kg当り40 μ gの割合で1回強制経口投与する。妊娠18.5日（満期）に母体を屠殺し、胎仔を取り出し、観察すると、ほぼすべての胎仔に口蓋裂と腎盂拡大（水腎症）が観察される。

ダイオキシンによるマウス胎児の口蓋裂誘発機序を検討してみた。

二次口蓋の正常発生過程を見てみると、口蓋は左右の二次口蓋突起が最初は口腔に向かって垂直位をとっている。ついで、妊娠14.0から14.5日にかけて、口蓋突起は90度転位・挙上し、水平位をとる。左右の突起は正中線上で接触し、やがて両者が癒合することによって、口蓋は閉鎖し、口腔と鼻腔が隔てられることになる。

ダイオキシンによって、左右の口蓋突起は癒合が行われなくなり、左右の口蓋突起が離れたままの状態まで出生に至ることになる。この状態を口蓋裂という。口蓋裂が生じると、新生児は口腔内を陰圧に保つことができず、哺乳が不可能となる。ダイオキシンによる口蓋裂誘発機構については、アメリカEPAのAbbott博士らのグループは、口蓋突起の上皮細胞が異常に増殖するために、左右の突起が癒合できず、そのために口蓋裂にいたるとの説を主張してきた。

私たちは、上記実験系において、妊娠13.5日の口蓋突起の粘膜上皮細胞、間葉細胞のBrdU取り込み率を見ることにより、突起の増殖能を調べた。すると、TCDD投与群で有意にBrdUの取り込みが低下していることが判明した。また、左右の突起が接触・癒合する、妊娠14.5日の口蓋粘膜上皮の上皮細胞の細胞死をTUNEL法で調べたところ、TCDD群と対照群との間には差は見られなかった。以上のことから、TCDDによる口蓋裂誘発機序は、TCDDが垂直位にある口蓋突起の粘膜上皮と間葉細胞に働き、両者の細胞増殖をおさえることによって、口蓋突起の伸長を抑制する。このため、口蓋突起が水平位に転位しても、左右の突起の接触はおこらない。これによって、口蓋裂が誘発されることになる (Takagi et al., 2000)。

さらに、TCDD投与の口蓋突起には、癒合能力がもはや失われているのかわりかを見た。妊娠7.5日に6 mg/kg体重の割合で塩化カドミウムを母体腹腔に投与すると、外脳症 exencephalyが生じる。これにより、左右の頭蓋が狭小化し、左右の口蓋突起を強制的に接触させる条件が作製される。この状態で、TCDD投与群で、左右の口蓋突起の癒合能力を見たところ、すべての胎児で口蓋は閉じていた。この結果は、TCDD投与群においても、口蓋突起の癒合能力は保たれていることを意味する (Takagi et al., 2000)。

TCDDによるマウス胎児の腎盂拡大の原因 (病因) として、尿管上皮が過剰増殖し、それが尿管腔をふさぎ、上流から流れ落ちてくる尿が貯留し、その結果、腎盂拡大に至ると説明されている。

尿管上皮は移行上皮であると組織学的に説明されているが、その細胞動態については、本当のところは、解明されていないのが実情である。そこで、今回は、正常尿管上皮細胞の細胞動態を微細形態学的・組織細胞化学的に検討し、発表した。

成獣マウス (Jcl:ICR) の尿管の透過電子顕微鏡標本を作製し、観察した。組織細胞化学的手法としては、細胞をBrdUでラベルし、DNA増殖能を持つ細胞の同定を行った。

観察の結果、成熟マウスの尿管上皮が、一般に言われている移行上皮ではなく、重層扁平上皮であることを明らかにできた。その根拠は2つ。1つには、マウス尿管上皮細胞は4層の細胞から成り立つ。基底膜側から、基底細胞、2つの中間細胞、表層細胞である。細胞内にある紡錘型小胞の成熟を超微形態学的に追及したところ、基底細胞、中間細胞、表層細胞へと内腔側に向かうほど、紡錘型小胞は成熟してゆくことが明らかになった。2つ目には、BrdU取り込み細胞は、最初、基底細胞の位置にあるが、時間経過をおって、

ラベルされた細胞の動きを見ると、ついで中間細胞がラベルされ、最後に表層細胞がラベルされることが明らかとなった。

以上の証拠から、尿管上皮は重層扁平上皮であるの結論を得た。

【ダイオキシンとアリール炭化水素受容体】

ダイオキシンをはじめとするアリール炭化水素は細胞内に入ると、細胞質に存在するAhRと結合する。AhRは、もともと細胞質に存在し、HSP90(heat shock protein 90)をはじめとする、タンパクと結合することによって、安定化されている。ダイオキシンがAhRと結合すると、HSP90等の安定化タンパクが解離し、核移行シグナル(Nuclear localization signal, NLS)がオンになって、核に移行する。核内で、AhR核移行分子(AhR nuclear translocator, Arntと略)と結合し、AhR-Arntヘテロ二重体を形成する。AhR-Arntは、DNAのダイオキシン反応配列(Xenobiotic responsive element, XREと略)に結合する。結合に伴い、転写共役因子群にシグナルが伝わり、種々の遺伝子発現を調節する。チトクロームP450酵素のうち、1A1(CYP 1A1)はその代表的なものであり、肝臓で多量に発現し、解毒の第I相の反応を活発に進める。

ダイオキシンは、その化学構造が非常に安定で、分解を受けにくい。CYP 1A1酵素を誘導しても、この酵素はダイオキシンを代謝することはできない。

AhRはダイオキシンと挙動を共にするタンパクがあることが知られるようになり、受容体としての作用があるのではないかと推測された後、1992年にクローニングされた。

【アリール炭化水素受容体遺伝子欠損マウスにおけるダイオキシンの奇形誘発に及ぼす影響】

ダイオキシンは生体内でアリール炭化水素受容体(別名ダイオキシン受容体, Aryl hydrocarbon receptor, 以下AhRと略)を介して、毒性を発揮されると言われる。AhRの作用を調べる目的で、遺伝子欠損マウスが作製された(Mimura et al., 1997)。

TCDDを妊娠12.5日(臍栓発見日を妊娠0日とする)のマウスに40 μ g/kg体重の割合で1回強制経口投与すると、マウスの系統がC57BL/6Jの場合、すべての胎児に口蓋裂と腎盂拡大が誘発された。一方、マウスがAhR^{-/-}(AhR遺伝子欠損ホモ)の場合、胎児には口蓋裂も腎盂拡大も見られなかった(Mimura et al., 1997)。AhRの遺伝子型がヘテロの場合は、中間的な値をとるこ

とが判明し、AhR^{+/-}遺伝子型を持つ胎児の奇形誘発は、AhR^{+/+}野生型胎児のそれに比べると頻度が低かった。このことは、奇形誘発には、AhR遺伝子産物の用量依存効果 Gene dosage effectが観察されたことを意味する(Yama shita et al., 2000)。

さらに、どういう遺伝子メッセージのカスケードが、口蓋突起の増殖を抑制し、口蓋裂を誘発するにいたるのかを明らかにするための実験を行った。方法は、上記、実験系を用いて、TCDDを同じ用量で、妊娠12.5日のC57BL/6Jマウスに投与し、投与6, 12, 24時間後の胎児の口蓋部分の遺伝子メッセージの発現を、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・スクリーニング法、cDNAマイクロアレイ法で見た。メッセージの検討には、投与12時間後が適当であることが判明したが、結局、うまくカスケードを描くには至らなかった。

【アリール炭化水素受容体（ダイオキシン受容体）抑制因子欠損が、ダイオキシンの奇形誘発に及ぼす影響】

AhRと類似した構造をもつタンパク (bHLHドメインとPASドメインをもつ)をスクリーニングしている最中に、培養細胞系で、AhRの作用を抑制する働きをもつ、AhR抑制因子 (AhR repressor, AhRR) がクローニングされた(Mimura et al., 1999; Baba et al., 2001; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2002)。今回、このAhRR遺伝子の欠損マウスが作製された (論文未発表)。

AhR-Arnt複合体がDNAのXRE (Xenobiotic responsive element)を認識し、種々の遺伝子の転写を調節するが、AhRRは発現が上昇する遺伝子産物のひとつである。AhRRは、さらにArntとヘテロ二重体を形成する。AhR-Arnt, AhRR-Arntの両者がXREを取り合うことによって、AhRの作用を拮抗的に阻害する。こうして、AhRの作用がAhRRによって抑制される結果、負のフィードバック・ループが形成される。

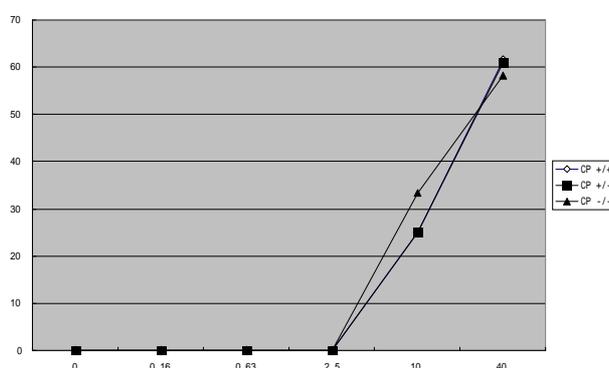
さて、AhRR遺伝子を欠損したホモマウスにおいては、この負のフィードバック・ループの一翼が欠損することになり、リガンドを結合したAhR-Arnt系の転写が促進され続けることが、予想された。ダイオキシンの口蓋裂誘発の実験系において、AhRR欠損マウスでは、ダイオキシンの影響は強くなるのだろうか。結果は、「増強しない」であった。

マウスは細谷らが作製したAhRR遺伝子欠損マウスを用いた。メスAhRR^{-/-}マウスをオスC57BL/6Jにバッククロスし、AhRR^{+/-}ヘテロマウスを得た。このAhRR^{+/-}ヘテロマウスの雌雄を交配し、妊娠マウスを得た。胎児の遺伝子

型はメンデルの法則に従って、AhRR^{-/-}, ^{+/-}, ^{+/+} (野生型) が得られた。

妊娠12.5日のAhRR^{+/-}マウスに、TCDDを公比4で、0 (溶媒), 0.156, 0.625, 2.5, 10, 40 μ g/kg体重の割合で1回投与した。各用量群に供した妊娠マウスは7母体とした。妊娠18.5日に母体を屠殺し、胎児の口蓋裂の有無、腎盂拡大の有無を観察した。胎児の尾からDNAを抽出して、AhRRの遺伝子型を判定した。各用量での胎児の遺伝子型別の口蓋裂、腎盂拡大の頻度を計算した。

TCDD 10, 40 μ g/kg投与群の野生型胎児 (AhRR^{+/+}) において、口蓋裂が観察された。AhRR^{+/-}, ^{-/-}の胎児においては、口蓋裂の誘発率がAhRR^{+/+}の



それと殆ど同じであった。AhRR遺伝子型の違いと口蓋裂誘発との関係を示す結果を図に示す。横軸はTCDDの用量 (μ g/kg) を、縦軸は口蓋裂の誘発率(% per fetus)を表す。腎盂拡大については、予想とは逆にAhRR^{-/-}群が野生型群よりも誘発率が若干低いという結果が得られた。

胎児の口蓋裂、腎盂拡大をエンドポイントにした場合、AhRR遺伝子欠損マウスのダイオキシンへの感受性上昇は見られなかった。野生型マウスにおいて、リガンド存在下でAhRRの発現は臓器によって異なる。さらに詳細にAhRRの発現を調べて、実験にのぞむ必要がある。

3. 研究成果

3. 5 “AhRR, AhR/Nrf2欠失動物の作製と機能解析 (山本・本橋グループ)”

(1) 研究内容および成果

我々は最近、異物代謝系第2相の酵素群の発現が転写因子Nrf2により統一的に調節されることを発見した。このことは、同第1相の反応を触媒する酵素群がPAS群転写因子により統一的に調節されていることと呼応して、異物代謝系の発現調節機構の包括的な理解を可能とするものと思われる。第1相の酵素群の誘導の際には、AhR (ダイオキシン受容体) が細胞質から核に移

行するが、その転写促進活性はAhRRによって抑制される。一方、第2相の酵素群の場合には、Keap1がNrf2の安定性と核への移行を調節している。本研究では、異物に対する応答系の分子メカニズムと、生体における異物代謝系第1相、あるいは、第2相の応答系の意義を明らかにし、他の薬剤応答系とのクロストークも明らかにすることを目指している。また、このような転写因子の核移行、シス配列への結合、さらにそこから基本転写装置へ向かっての制御情報の流れを明らかにし、異物に対する応答反応の分子機構を理解する。そして、その知見をもとに、環境中の異物の生物モニター系を確立する。

AhR制御系遺伝子やNrf2制御系遺伝子の遺伝子改変マウスを用いて、薬剤投与実験により毒性の発現や、発癌を検討した。AhR/Nrf2 2重欠損マウスの薬剤投与実験、AhRR欠損マウスやAhRR/Nrf2 2重欠損マウスの化学発癌実験を行った。また、とりわけ、AhRの機能は種により大きく異なることが知られているので、ヒトでの反応性をモニターするためのモデル動物作製のために、ヒトAhR (hAHR) cDNAノックインマウスを作製し、その薬剤に対する応答性を検討した。

AhR/Nrf2 2重欠損マウスの薬剤に対する反応性を調べたところ、AhRリガンドである3-MCや、Nrf2の活性化剤であるBHAに対する反応は著しく低下していたが、フェノバルビタールに対する反応は保たれており、むしろ、増強しているという結果であった。AhR制御系・Nrf2制御系のいずれにも依存しない薬物代謝系のみを有するマウスを得ることができたといえる。AhRR欠損マウスやAhRR/Nrf2 2重欠損マウスの化学発癌実験では、野生型に比べて、AhRR欠損マウスにおける発癌が亢進していることを示唆する結果が得られつつある。つまり、AhRの抑制性因子AhRRの欠損によりAhRの機能が亢進した状態が維持され、その結果、生体高分子に障害をもたらす活性化型代謝中間体が増加し、発癌の増加につながったものと考えられる。hAHRノックインマウスの反応性を検討したところ、3-メチルコラントレンに対する反応は、hAHRノックインマウスもコントロールマウスも同程度であったが、TCDDに対する反応は前者の方が弱いという結果であった。この結果は、ダイオキシン受容体のリガンドに対する反応特異性が、種により異なること、そして、hAHRノックインマウスがヒトの反応の特異性を再現できるモニター動物として利用可能であることを示唆している。

【Nrf2欠損マウスの薬剤応答性の検討】

Nrf2欠損マウスを、ディーゼルエンジン排気ガスに曝露したところ、同マウスでは、野生型マウスに比べて、DNA アダクト (DNA adduct=外来異物がDNAに共有結合した複合体で、遺伝子の損傷を誘導する状態) が過剰に産生されることが明らかになった。この結果から、Nrf2によって誘導される生体防衛系がディーゼルエンジン排気ガスに対する防衛系において重要であることが示唆された。また、Nrf2欠損マウスにアセトアミノフェンを投与し、その後の肝障害の出現について、検討したところ、同マウスにおいては、高頻度に急性肝障害がおこることが明らかになった。Nrf2欠損マウスでは、アセトアミノフェンに対する感受性が顕著に上昇していることが明らかとなった。さらに、化学発がん防御機構におけるNrf2の役割を明らかにするために、ベンツピレンの胃内投与実験を行ったところ、同マウスでは、高頻度に胃ガンが発症することが明らかになった。さらに、以前よりベンツピレンと同時にとうよすることで、その発がん作用を抑制することが知られていたオルティプラッツの効果を検討したところ、Nrf2欠損マウスにおいて、オルティプラッツの発癌抑制効果が認められなかった。この結果から、Nrf2による異物代謝系第2相の活性化が、発癌抑制に重要であることが明らかになった。

【keap1欠損マウスの解析】

Nrf2の抑制性制御因子であるkeap1遺伝子破壊マウスを作製したところ、同マウスは、食道と前胃の異常角化による摂食障害で、生後2—3週で、致死であった。出生直後の肝臓における遺伝子発現を調べたところ、keap1遺伝子破壊マウスにおいては、異物代謝系第2相の酵素群の非誘導時における発現量が上昇していることと、薬剤による誘導が消失していることが明らかになった。マウス個体レベルにおいて、Keap1がNrf2の活性を負に制御していることが証明された。さらに、keap1欠損マウスにおける第2相酵素群の発現量の上昇は、keap1/Nrf2 2重欠損マウスでは、完全に解除された。これは、Keap1がNrf2の活性を負に制御していることが、個体において証明する結果である。また、Nrf2-Keap1の相互作用が、薬剤に対するセンサー機能を果たしている可能性が強く示唆された。

【AhR::Nrf2 2重欠損マウスの作製の薬剤に対する応答性の検討】

AhRとNrf2により制御される第1相、第2相酵素群が、薬剤の毒性発現にどのように貢献するのかを明らかにするために、また、これらの酵素群の機能に依存しない薬物代謝系の実体を明らかにするために、AhR欠損マウスと

Nrf2欠損マウスを交配することにより、これらが制御する酵素群の誘導的発現が全ておこらないマウスAhR::Nrf2 2重欠失マウスを作製し、同マウスの薬剤に対する反応性を調べた。その結果、AhRリガンドである3-MCや、Nrf2の活性化剤であるBHAに対する反応は著しく低下していたが、フェノバルビタールに対する反応は保たれており、むしろ、増強しているという結果であった。AhR::Nrf2 2重欠失マウスに対して様々な薬剤を投与し、さらに、その薬剤の代謝経路、代謝産物を調べることにより、AhRとNrf2に制御される酵素群の、薬物代謝と毒性の発現における重要性が明らかになると考えられる。

【AhRR::Nrf2 2重欠損マウスの易発癌性の検討】

AhRの抑制性因子AhRRの欠損によりAhRの機能が亢進した状態が維持されるかどうか、そして、AhR機能亢進状態は、易発癌性の素地となりえるかどうかを検討するために、AhRR欠損マウスとAhRR::Nrf2 2重欠損マウスに対して皮下にベンツピレンを投与して、AhRの標的遺伝子であるCYP1A1の発現と、腫瘍が生じるまでの時間とその個数を調べた。AhRR欠損マウスでは、CYP1A1の発現誘導が、遷延する傾向が認められ、さらに、第2相酵素群の誘導もおこっていることが明らかになった。また、皮膚における発がん実験では、野生型マウスに比べて、腫瘍が明らかになるまでの時間が延長しており、化学発がんに対して、むしろ抵抗性になっていることが示唆された。これは、第2相酵素群がより高レベルに誘導される傾向が有るためと考えられる。

【ヒトAhRノックインマウスの作製と薬剤反応性の検討】

薬剤の毒性発現に対する第1相酵素群の役割を明らかにするため、第1相酵素群の誘導に関わる制御因子のうちAhRに注目し、同因子の機能を個体において検討することを試みた。AhR分子の性質には種差が大きく、そのために、ダイオキシンなど芳香族炭化水素に対する反応は、種により質的・量的に異なっていることがこれまでの報告から推測されている。in vitroで計測されたTCDDとの親和性は、C57BL6のAhR (AhR^{b1}) で高く、DBA/2のAhR (AhR^d) で低く、後者の親和性はhAHRのそれと同程度である。しかし、AhR分子のC末端側は、hAhRとAhR^dとは、大きく異なっており、それぞれの分子に特有の性質を担っている可能性が示唆される。そこで、ヒトのhAHRを有するhAhRノックインマウスを作製し、その薬剤に対する反応性を調べ

た。このマウスに対して、hAhRの組織における発現の確認を行った後、3-メチルコラントレン (3-MC) と2,3,7,8-TCDDの投与実験をおこない、肝臓におけるCYP1A遺伝子群の誘導的発現の検討と、催奇形性の検討を行った。

3-MC投与による肝臓でのCYP1A1あるいはCYP1A2の誘導の強度は、AhR^{b-1}マウス>>AhR^dマウス=hAhRマウスという順番であり、hAhRマウスとAhR^dマウスの反応性はほぼ等しかった。一方、TCDD投与による誘導の強度は、AhR^{b-1}マウス>AhR^dマウス>hAhRマウスであり、hAhRマウスは3-MCに比べてTCDDに反応しにくいということが明らかになった。TCDDに対する催奇形性も、この結果と一致する傾向が得られた。口蓋裂は、AhR^{b-1}マウスで100%、AhR^dマウスで30%、hAhRマウスで0%という発生率であった。水腎症の発生率は、いずれの系統においても8割前後であったが、重症度はAhR^{b-1}マウス>AhR^dマウス>hAhRマウスという傾向が認められた。

hAhRマウスが3-MCに対しては、AhR^dマウスとほぼ同程度の反応を示したのにも関わらず、TCDDに対しては、それよりも弱い反応しか示さなかったということである。AhRが介在する反応のリガンド特異性が、マウスとヒトとは、異なっている可能性が示唆された。

3. 研究成果

3. 6 “AhRの作用メカニズム (十川グループ)”

(1) 研究内容及び成果

【Ahリセプターリプレッサー遺伝子のクローニングと構造解析】

メチルコランスレン(MC)などの外来異物は、Ahリセプター(AhR)と名づけられた、受容体型転写因子にリガンドとして結合し、P4501A1やP4501B1などの遺伝子上流に存在するXRE配列に結合し、転写を活性化することが知られている。このためには、核内でAhRはArntとヘテロダイマーを形成することが必要である。この転写活性化を抑制する因子として、AhRリプレッサー(AhRR)が見出された。AhRRはAhRとN末端からDNA結合活性やArntとのヘテロダイマー形成に必要な構造である、HLHモチーフとPAS Aドメインまでアミノ酸配列の類似性があり、Arntとヘテロダイマーを形成し、XREに結合する。また、分子のC末端側に転写活性化抑制領域が存在した。細胞内で強制発現したところ、AhRの転写活性化を選択的に阻害した。これらの性質により、AhRRはAhRの転写活性化に対する特異的抑制因子と考えられている。

マウスAhRR遺伝子を単離し、構造解析ならびにプロモーター解析を行った。マウスAhRR遺伝子は約60 kbの長さで、11のエキソンからなっていた。

FISH解析によって、マウス染色体13C2, ラット染色体1p11.2, ヒト染色体5p15.3にAhRR遺伝子は存在することが判明した。AhRR遺伝子上流にはTATAボックスはなく、複数の転写開始点が存在した。非常に興味深いことに、構造解析によって転写開始点から、-45, -388, -1296の位置に3つのXREが存在することが判明した。これらのXREの機能を調べるために、ゲルシフトアッセイを行ったところ、AhR-Arntヘテロダイマーが結合した。また、DNAトランスフェクションによって、MCによる誘導を調べたところ、レポーター遺伝子として使ったルシフェラーゼ活性が12倍に上昇した。さらに遺伝子上流には、GCボックスが存在した。XREとGCボックスのプロモーター上の共在は、MCで誘導される遺伝子に特徴的な組み合わせであり、AhRR遺伝子もその範疇に入ると考えられた。GCボックス結合因子を解析したところ、Sp1とSp3が結合することが分かった。さらに、転写開始点の上流にNF-κB結合サイトが存在した。このDNAエレメントにはp65/p50が結合した。AhRR遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につないだレポーター活性は、フォルボールエステルであるTPA処理によって2倍に増加した。また、MCとTPAによってトランスフェクションした細胞を処理したところ、相乗的にレポーター活性が増加した。以上の結果から、AhRR遺伝子はAhRの下流に位置し、フィードバック的に転写を阻害することが強く示唆された。また、NF-κB結合配列がプロモーター領域に見出され、p65/p50が結合しTPAによって活性化されたことは、AhR活性がAhRRの抑制活性の増加をとおして、サイトカインなどで抑制されることを示唆し、免疫系と薬物代謝系との相互作用を示唆し、非常に興味もたれる。

【Ahリセプターの転写のコアクティベーターとしての機能】

メチルコランズレンで転写が活性化されるCYP1A2遺伝子は、CYP1A1遺伝子と異なり、内在性のCYP1A2を誘導的に発現する培養細胞が長い間見出されず、転写調節のメカニズムの解明は大きく遅れていた。HepG2細胞で内在性CYP1A2の発現が報告され、我々は、HepG2細胞をトランスフェクションの受容細胞として、ラット遺伝子上流を使って誘導的発現に必要なエンハンサーを同定した。転写開始点から-5.6kb上流をもったDNAフラグメントをCAT遺伝子につないだ発現プラスミドを、HepG2細胞にトランスフェクションしたところ、CAT活性がMC処理によって増大した。多くの欠失を遺伝子上流にいれ、この誘導に必要な領域を調べたところ、転写開始点から約-2 kb上流に2つの領域（A領域とB領域）を見出した。この2つの領域のうちB領

域が誘導的エンハンサーであることが分かり、A領域はB領域の活性を強める働きがあることが判明した。B領域は最終的に24 bpまで狭められた。このエンハンサーに突然変異を導入して、詳細にその活性に必要な配列を調べたところ、6塩基対離れた4塩基対からなる繰り返し構造が重要であることが判明した。このCYP1A2エンハンサー配列の特徴はXREとまったく異なっており、ゲルシフトアッセイなどで詳細に調べたところ、細胞由来のAhリセプターとArntのヘテロダイマーも、大腸菌で発現した組換えAhR-Arntも直接結合しなかった。そこで、AhR-Arntはエンハンサーに直接結合せず、エンハンサー結合因子に相互作用し、エンハンサーには間接的に結合すると考え、エンハンサーに直接する因子を探索した。HepG2細胞でゲルシフトアッセイを行ったところ、特異的結合タンパク質が1つ見出され、調べた限りの培養細胞ですべて、結合因子は存在した。この結合因子は、細胞核に局在しており、MC処理によって結合活性は、変化しなかった。この結合因子を精製するために、マウスの種々の組織から核抽出液を調製し、CYP1A2エンハンサー結合活性をゲルシフト法で調べたところ、腎臓が最も比含量が高いことがわかった。また、肝臓その他、調べた組織すべてで、結合活性は見出された。そこで、マウス500匹の腎臓から核を単離し抽出液を調製し、精製の出発材料とした。まず、硫酸沈殿を行い、つぎにDEAEセルロースを用いた、イオン交換クロマトグラフィー、続いて、ヘパリン-セファロースクロマトグラフィーで部分精製後、エンハンサー配列を持つオリゴヌクレオチドによるDNAアフィニティークロマトグラフィーによって最終的に精製した。SDS-PAGEによって解析したところ、約60kDaのところに4本のバンドが認められた。これらのバンドのうち主要な2本のバンドはゲルから抽出後、SDSを除く再生処理によりエンハンサー結合活性を示し、そのゲルシフトのバンドの位置は、目的タンパク質と同じ移動度であり、精製タンパク質は目的とするエンハンサー結合因子であることが確認された。得られた4つのタンパク質のリジルエンドペプチダーゼによる消化物のペプチドマップは非常に類似しており、類縁のたんぱく質である可能性が高いと考えられた。ゲル内でリジルエンドペプチダーゼ消化を行い、HPLCで精製したペプチドを分離し、アミノ酸配列決定を行ったところ、3つのタンパク質は、転写因子LBP-1a, LBP-1b, LBP-1cであることがわかった。4番目のバンドは同定できなかったが、LBP-1cのプロテアーゼ分解産物か、LBP-9であると予想された。つぎに、in vitroでこれらLBP-1ファミリータンパク質を合成し、ゲルシフトアッセイを行ったところ、LBP-1タンパク質はCYP1A2エンハンサーに結合した。さらに、LB

P-1タンパク質に対する抗体を使い、ゲルシフトアッセイを行ったところ、CYP1A2エンハンサーに特異的に結合するタンパク由来のバンドはスーパーシフトした。これらの結果から、腎臓や培養細胞のCYP1A2エンハンサー結合タンパク質は、LBP-1ファミリータンパク質であることが証明された。LBP-1ファミリーは2つの遺伝子座から構成され、それぞれオルタナティブスプライシングによって2つずつの遺伝子産物(LBP-1aとLBP-1b, LBP-1cとLBP-1d)が生成することが報告されている。これら4つの産物のうち、LBP-1dはDNA結合活性に必要な領域を欠き、転写の阻害因子として機能すると考えられている。また、ファミリー内で自由にLBP-1タンパク質はホモダイマー、ヘテロダイマーをつくり、DNAに結合し転写を活性化すると考えられている。今までに知られているLBP-1によって、転写が調節される遺伝子は、HIV-1、 β -グロビン、CYP2d9などの遺伝子が知られており、かなり多くの遺伝子の転写に関係していると考えられている。しかしながら、特定の生理機能に対応した転写因子ではなく、種々の雑多な遺伝子の発現に関係しており、そういった意味であまり注目されていない転写因子である。また、DNA結合のコンセンサスは報告があり、我々のエンハンサーから導いた重要な塩基配列を満足していた。

我々はエンハンサー結合因子としてLBP-1を同定した後、AhR-Arntとの相互作用を調べた。まず、培養細胞でGST-AhR, GST-ArntとFLAGタグをもつLBP-1タンパク質を共発現し、GSTプルダウンアッセイを行った。すべてのLBP-1ファミリーメンバーとAhリセプターが直接結合し、ArntとはLBP-1aとLBP-1cが結合することが、FLAGタグに対する抗体を用いたウエスタンブロットの結果明らかとなった。また、Ahリセプター/ArntとLBP-1タンパク質を培養細胞で共発現し、ルシフェラーゼレポーター活性を測定したところ、AhR-ArntとLBP-1タンパク質は、相乗的にCYP1A2エンハンサーからの転写を活性化することを示すことができた。これらの実験事実から、CYP1A2エンハンサーにLBP-1ファミリーメンバーが直接、ダイマーとして結合し、さらにAhリセプター/ArntヘテロダイマーがコアクティベーターとしてLBP-1に結合し、CYP1A2遺伝子の転写を、外来異物依存的に活性化していることが判明した。我々の実験結果ではLBP-1cがやや強くCYP1A2エンハンサーに結合することが分かったが、その他のLBP-1タンパク質もCYP1A2エンハンサーに結合し、LBP-1タンパク質のエンハンサーに対する特異性は、あまりないと考えてよさそうである。

多くのMCで誘導される、薬物代謝酵素の遺伝子とその転写調節領域にXR

Eをもち、直接AhR-Arntによって転写が活性化されるメカニズムを採用しているのに比べて、どうしてCYP1A2のみが、AhR-Arntによる転写活性化に、間接的な相互作用メカニズムを採用しているのかは、興味のあるところである。その理由は不明であるが、つぎに報告するようにXREを採用するメカニズムに比べて、CpGメチル化の影響を受けにくいメカニズムであることか確かかのようなものである。老化に伴ったCpGのメチル化に関係なく、薬物代謝を行うのに有用な機構と考えられる。

【AhR-Arnt, AhRR-Arntの大腸菌における共発現とDNA結合活性】

AhRは細胞質でHsp90などと会合しており、リガンド結合後、核移行しArntとヘテロダイマーを形成する。このようにAhRは多くのタンパク質、有機低分子と相互作用し、生化学的にも興味あるタンパク質である。そこで、生化学的な解析に必要な量を取得すべく、種々の発現系でAhRの大量発現を試みてきたが不首尾であった。それらの経験を通じておそらく、AhRの単独での発現は困難であろうと結論した。そこで、安定的に発現することが予想されるAhRとArntのヘテロダイマーの大腸菌での共発現を試みた。

すでに、AhR, Arntとも大腸菌での発現では、分解されFull-lengthのタンパクは得られないことが分かっていたので、bHLH-PASドメインのみを発現させた。発現したタンパク質を解析したところ、ヘテロダイマーを菌体内で形成していると考えられ、単独での発現に比べて水溶性が、格段に向上していた。得られたAhR-Arnt, AhRR-Arntヘテロダイマーを精製し、DNA結合の解離定数をゲルシフト法で求めた。AhR-ArntのXREに対する解離定数は2.0 nMであった。AhRR-ArntのXREに対する解離定数は同じく、2.0 nMであった。細胞由来のAhR-ArntのXREに対する解離定数は、1.2 – 2.5 nMと報告されており、ほぼ同等の値が得られたことになり、我々の行った大腸菌での発現は、天然のタンパク質と同じコンフォメーションを持っていると考えられた。つぎに、XRE配列はメチル化を受けるCpG配列をコア配列内にもっており、メチル化のDNA結合に対する影響を調べた。どちらのストランドもメチル化された場合、解離定数は100 nMとなり、大きく結合親和性は低下することが分かった。片方の鎖がメチル化された場合は、29 nMと8.0 nMという結合定数が得られた。これらの結果から、メチル化によって、XREに対するAhR-Arntの結合は大きく弱まり、転写活性は大きく低下することが予想された。ヒトをふくむ動物の組織では、加齢とともに薬物代謝活性が弱くなることが知られている。我々の得た結果は、この加齢による低下が、DNAのメチル化が

1つの原因であり、それによる、AhR-Arntの結合活性が弱まった結果であることを示唆している。

大腸菌で発現したAhRをMALDI-TOFマスマスペクトロメトリーで解析したところ、予想された分子量をもつ転写産物は発現しておらず、PAS-B領域でプロテアーゼによって分解を受け、分子量の異なったいくつかのタンパク質からできていることが判明した。この結果はAhRとArntとのヘテロダイマー形成において、PAS-B領域が不要であることの直接の証明となった。AhRRはPAS-B領域を欠損していることが知られているが、Arntとのヘテロダイマー形成、XREとの結合に関して、AhRと同等の活性をもつことが報告されている。PASBドメインはヘテロダイマー形成に必要でないことが示唆されてきたが、本研究で得られた結果は、精製されたタンパク質でこれらの報告を最終的に確認したことになる。また、PASタンパク質のDNA結合活性にリン酸化が関与しているとのいくつかの報告があるが、大腸菌でリン酸化は起こりえず、我々の得た組換えAhR-Arntヘテロダイマーが、細胞由来のヘテロダイマーと、ほぼ同等のDNA結合活性を示すという結果は、これを強く否定するものである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

AhRRの転写抑制因子としての性状の解明とAhRR遺伝子の転写調節メカニズムの解明によって、外来異物代謝系において、転写レベルでの負のフィードバックメカニズムが存在することが証明された。ほぼ同様のフィードバックメカニズムが少し遅れて、低酸素ストレス応答に関与するPASドメインをもつ転写因子、HIF-1 α 、HLF、IPASにおいても存在することが報告された。また、少し異なったメカニズムであるが、PASタンパク質であるClock、Per、Arnt3 (BMAL1)が関与するサーカディアンリズムの転写調節において、存在することが報告されている。これらの結果から、PASタンパク質をもつ転写因子による調節には、同様の負のフィードバック機構が存在することが予想され、一般化が行えるのではないかと考えられる。PASタンパク質はバクテリアから哺乳類まで幅広く存在し、センサータンパク質として、転写因子として機能している。おそらく、このフィードバック機構は進化の過程で保存されてきたと考えられる。

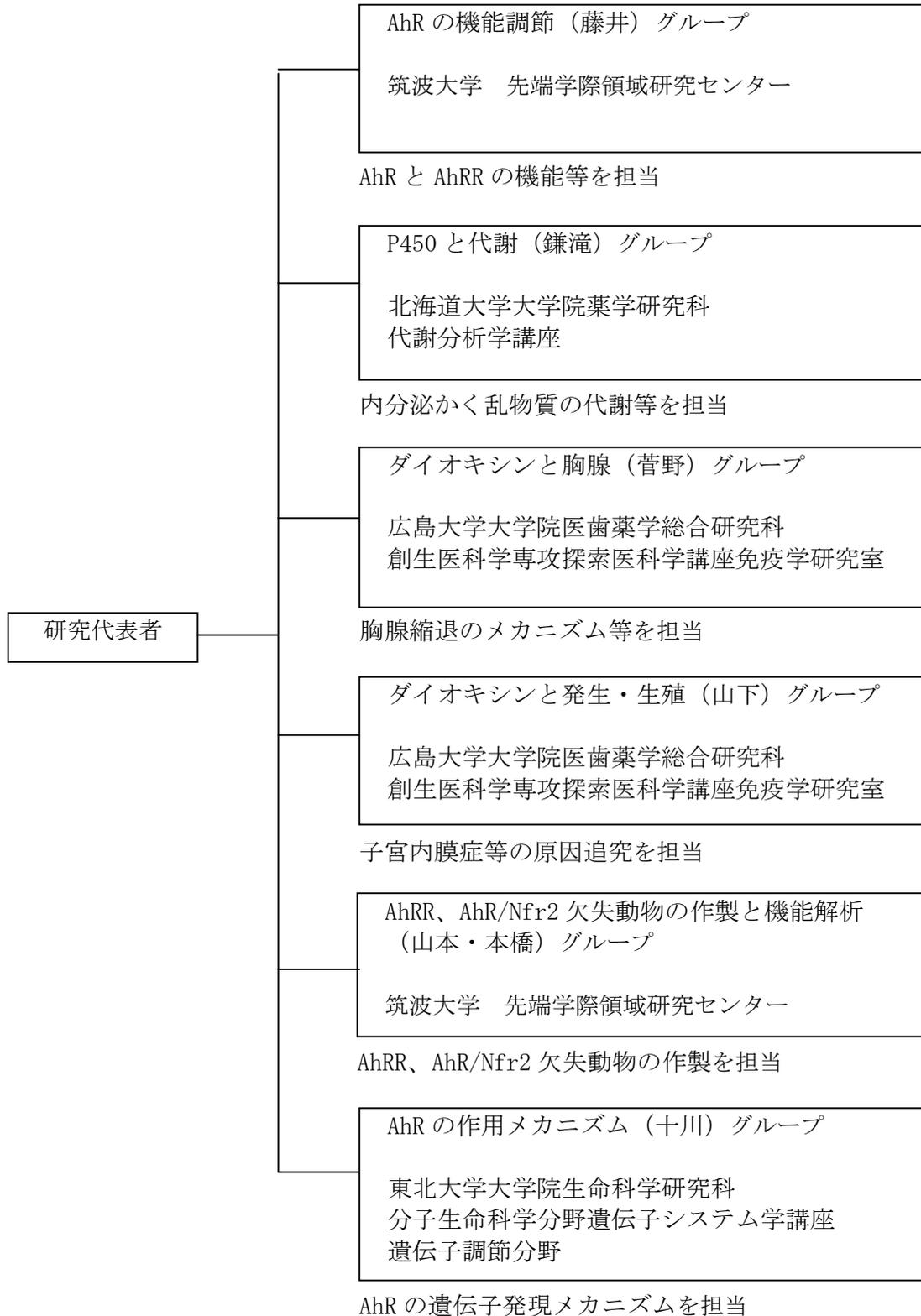
CYP1A2エンハンサーに対するAhR-Arntヘテロダイマーが、コアクティベーターとして機能することは、従来からの直接DNAに結合する転写メカニズ

ムにプラスするAhRの転写活性化機構であり、今後このメカニズムによる遺伝子の例が多数報告されることが予想される。AhRの転写活性化機構の幅を広げたことになり、ダイオキシン類を始めとする環境汚染物質で転写が活性化、抑制される遺伝子を増やす巧妙なメカニズムと考えられる。

AhRは組織から大量に得ることが難しく、また、微生物で合成することも不溶性になることから、三次元構造の解明は困難であった。ここで報告した、Arntと大腸菌で共発現する方法は、飛躍的にAhRの水溶性を増加し、大量に得ることができる。現在の方法ではプロテアーゼによるAhRの分解が起こり、マイクロヘテロジェニティーを持っているが、発現領域を変えることにより、この問題をクリアすれば、Arntとのダイマーの結晶化も夢ではない。AhRの結晶構造解析、特にリガンド結合領域の三次構造の解明は、基礎的な分子生物学的興味があるばかりでなく、環境汚染物質の毒性予想にも大いに役立つと考えられる。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2)メンバー表

① AhR機能調節グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
藤井 義明	筑波大学先端学際領域研究センター	客員教授	研究班の総括 AhRRノックアウトマウス	平成11年1月～平成15年12月
三村 純正	筑波大学先端学際領域研究センター	助手	薬物投与による遺伝子発現の調節機構	平成14年4月～平成15年12月
武山 健一	東京大学分子細胞生物学研究所	助手	AhRと核内ステロイドホルモン受容体の相互作用	平成11年6月～平成15年12月
Katarina Gradin	東北大学大学院生命科学研究科 (兼務 理学研究科)	CREST 研究員	薬物投与による遺伝子発現の調節機構	平成12年1月～平成13年5月
舩廣 善和	東京大学分子細胞生物学研究所	科技団 研究員		平成11年6月～平成13年3月
今高 寛晃	東北大学大学院生命科学研究科	CREST 研究員		平成13年8月～平成14年3月
森 大輔	東北大学大学院理学研究科	CREST 研究員	AhRRノックアウトマウスの機能解析	平成12年4月～平成15年5月
王 鋒	東北大学大学院生命科学研究科	博士 研究員	AhRノックアウトマウスの機能を解析	平成12年4月～平成12年6月
入江 美紀	東北大学大学院生命科学研究科 (兼務 理学研究科)	CREST研究 補助員	研究チーム事務	平成11年1月～平成14年3月
鈴木 晶子	東北大学大学院理学研究科	CREST研究 補助員	研究チーム事務	平成11年4月～平成11年7月
根本 洋子	筑波大学先端学際領域研究センター	CREST研究 補助員	研究チーム事務	平成14年4月～平成15年12月
小川 智子	東京大学大学院農学生命科学研究科	特別研究 学生	核内エストロゲン受容体に対する内分泌攪乱物質の作用	平成12年4月～平成15年12月
朝比奈敬文	東京大学大学院農学生命科学研究科	院生		平成12年4月～平成13年3月

細谷 朋方	東北大学大学院 理学研究科	院生		平成12年4月～ 平成13年3月
山下 年晴	東北大学大学院 理学研究科	院生	Arnt2ノックアウトマウスの機能解析	平成12年4月～ 平成15年3月
馬場 崇	東北大学大学院 理学研究科	院生	AhRR遺伝子発現のメカニズム	平成12年4月～ 平成15年3月
葛西 崇夫	東北大学大学院 生命科学研究所	院生	Arnt2、AhRRのノックアウトマウスの作製と解析	平成13年4月～ 平成14年3月
大島 基彦	筑波大学先端学 際領域研究センター	院生	AhRRのユビキチン化による分解機構の解析	平成13年4月～ 平成15年12月
大竹 史明	東京大学大学院 農学生命科学研究科	院生	核内エストロゲン受容体に対する内分泌攪乱物質の作用	平成13年4月～ 平成15年12月
関根 弘樹	筑波大学先端学 際領域研究センター	院生	①研究データの収集、解析 ②実験器具の洗浄	平成15年4月～ 平成15年12月

② P450と代謝グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
鎌滝 哲也	北海道大学大学院薬学研究科	教授	内分泌かく乱物質応答性の薬物代謝酵素の機能解析	平成11年1月～ 平成15年12月
有吉 範高	北海道大学大学院薬学研究科	助教授		平成11年1月～ 平成13年3月
山崎 浩史	北海道大学大学院薬学研究科	助教授	AhR標的遺伝子の探索	平成14年4月～ 平成15年12月
高橋 芳樹	北海道大学大学院薬学研究科	助手	AhR標的遺伝子の探索	平成11年1月～ 平成14年3月
藤田 健一	北海道大学大学院薬学研究科	助手	ダイオキシン類のCYPへの親和性評価	平成13年4月～ 平成14年3月
藤枝 正輝	北海道大学大学院薬学研究科	助手	ダイオキシン類のCYPへの親和性評価	平成14年4月～ 平成15年12月

③ ダイオキシシンと胸腺グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
菅野 雅元	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	教授	ダイオキシシンによる 胸腺萎縮の分子生物 学的解析および研究 の全体計画策定	平成11年1月～ 平成15年12月
菅野理恵子	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	研究 補助員	マウス遺伝学的解析、 生化学的解析	平成11年1月～ 平成15年12月
神安 雅哉	広島大学医学部 免疫学寄生虫学 講座	助手		平成11年1月～ 平成13年3月
石原 浩人	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	助手	免疫遺伝学的解析	平成11年1月～ 平成15年12月
井上 洋子	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	教職員	胸腺細胞のフローサ イトメトリー解析、分 子生物学的解析、マイ クロアレイ解析	平成11年1月～ 平成15年12月
坂井るり子	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	院生	胸腺細胞のフローサ イトメトリー解析、骨 髄の造血幹細胞解析	平成11年4月～ 平成15年3月
梶梅 輝之	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	院生	骨髄の造血幹細胞解 析、骨髄移植実験系の 確立	平成12年4月～ 平成15年3月
宮崎 正輝	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 創生医科 学専攻 探索医 科学講座 免疫 学研究室	院生	樹状細胞系を用いた 解析	平成13年4月～ 平成15年3月

④ ダイオキシンと発生・生殖グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山下 敬介	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	助教授	精巢毒性発現機構グループ総括	平成11年1月～ 平成15年12月
安田 峯生	広島国際大学保健医療学部 臨床工学科	教授	発生毒性発現機構（実験は広島大学医学部で実施）	平成11年1月～ 平成15年3月
岡村さおり	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	研究員	研究補助	平成11年1月～ 平成15年12月
松井 浩二	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	助手	子宮内膜症発症機構	平成11年1月～ 平成15年12月
長尾 哲二	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所	室長		平成11年1月～ 平成12年3月
澁谷 徹	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所	室長		平成11年1月～ 平成12年3月
大森 啓充	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	博士研究員	研究補助	平成11年4月～ 平成15年3月
高木 敏男	広島大学 医学部 解剖学第一講座	院生		平成11年4月～ 平成12年3月
森 直樹	広島大学 医学部 解剖学第一講座	院生		平成11年4月～ 平成12年3月
加納由香利	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	院生	研究補助	平成11年4月～ 平成15年3月
津間本裕一	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	院生	研究補助	平成11年4月～ 平成15年3月
向山 敦子	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	院生	研究補助	平成11年4月～ 平成15年3月
沖田 進司	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室	院生	研究補助	平成11年4月～ 平成15年3月

谷本 誠治	広島大学大学院 医歯薬学総合研 究科 解剖学・発 生生物学研究室	院生	動物実験全般	平成15年4月～ 平成15年12月
-------	---	----	--------	----------------------

⑤ AhRR,AhR/Nrf2欠失動物の作製と機能解析グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山本 雅之	筑波大学基礎医学系	教授	研究班の総括	平成11年1月～ 平成15年3月
高橋 智	筑波大学基礎医学系	教授	Nrf2とAhRホモノックアウトマウスの解析	平成11年1月～ 平成14年3月
大根田 修	筑波大学基礎医学系	助教授	bHLH-PAS蛋白質の機能解析	平成14年4月～ 平成15年3月
小林麻己人	筑波大学基礎医学系	講師	ゼブラフィッシュのNrf2とAhRの活性化機構の解析	平成11年1月～ 平成15年3月
伊東 健	筑波大学基礎医学系	講師	Nrf2の活性化機構の解析	平成11年1月～ 平成15年3月
本橋ほづみ	筑波大学基礎医学系	講師	研究の総括	平成14年4月～ 平成15年12月
大根田絹子	筑波大学基礎医学系	講師	bHLH-PAS蛋白質の機能解析	平成15年4月～ 平成15年12月
小林 聡	筑波大学基礎医学系	講師	Nrf2とAhRの活性化機構の解析	平成15年4月～ 平成15年12月
若林 伸直	筑波大学基礎医学系	研究員	Keap1ノックアウトマウスの作製	平成11年1月～ 平成14年3月
日田安寿美	筑波大学基礎医学系	研究員	AhRの活性化機構の解析	平成15年4月～ 平成15年12月
金子 直美	筑波大学基礎医学系	CREST技術員	遺伝子改変マウスの組織標本の作製	平成11年4月～ 平成15年12月
古堅 久子	筑波大学基礎医学系	CREST技術員	研究補助	平成13年4月～ 平成15年10月
川合 玲子	筑波大学基礎医学系	CREST技術員	マウス遺伝学実験の補助	平成14年5月～ 平成15年12月

原田 伸彦	筑波大学基礎医学系	院生	AhR及びNrf2ノックアウトマウスの解析	平成15年4月～ 平成15年12月
-------	-----------	----	-----------------------	----------------------

⑥ AhRの作用メカニズムグループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
十川 和博	東北大学大学院生命科学研究科 (兼務 理学研究科)	教授	研究班の総括 AhRRの標的遺伝子の探索	平成11年1月～ 平成15年12月
菊池 康夫	東北大学大学院生命科学研究科 (兼務 理学研究科)	助教授	AhRのE.coliでの発現	平成11年1月～ 平成15年12月
阿部比佐久	東北大学大学院理学研究科	技官	AhRの酵母での発現	平成11年1月～ 平成15年12月
相川 道子	東北大学大学院生命科学研究科 (兼務 理学研究科)	CREST研究補助員	動物飼育と生化学的実験の補助	平成11年1月～ 平成15年12月
沼山 恵子	東北大学大学院理学研究科	学振特別研究員	CYP1A2の外來異物による誘導機構	平成12年4月～ 平成15年3月

⑦ SHR, AhR 及び転写因子間相互作用と内分泌攪乱グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
梅園 和彦	京都大学大学院生命科学研究科	教授		平成11年1月～ 平成11年4月
橋本 主税	京都大学大学院生命科学研究科	助手		平成11年1月～ 平成11年4月
原 健二	京都大学大学院生命科学研究科	助手		平成11年1月～ 平成11年4月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
1999, 8, 16	平成11年度藤井チーム研究打合せ	“内分泌かく乱物質” 渋谷研究事務所	12	
2000, 8, 24	平成12年度藤井チーム研究打合せ	“内分泌かく乱物質” 渋谷研究事務所	12	
2001, 8, 13	平成13年度藤井チーム研究打合せ	“内分泌かく乱物質” 渋谷研究事務所	12	
2002, 8, 29	平成14年度藤井チーム研究打合せ	“内分泌かく乱物質” 渋谷研究事務所	12	
2003, 8, 23	平成15年度藤井チーム研究打合せ	“内分泌かく乱物質” 渋谷研究事務所	12	

(2) 招聘した研究者等

氏名 (所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Katarina Gradin , Ph.D. Laboratory of Molecular Biology Department of Cell and Molecular Biology (CMB) Karolinska Institutet	「内分泌かく乱物質」藤井プロジェクトの研究員として基礎的研究に従事する。	東北大学 大学院生命科学研究科	1999. 9. 1～ 2001. 7. 5

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内 件、海外 172 件)

Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D. and Yamamoto, M. *Keap1*-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature Genetics*, in press

Onodera, K., Shavit, J. A., Motohashi, H., Katsuoka, F., Akasaka, J-e., Engel, J. D. and Yamamoto, M. Characterization of the murine maff gene. *J. Biol. Chem.* in press

Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K. and Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂. *Mol. Cell. Biol.* in press

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003 (in press).

Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*, 2003 (in press).

WuQiang, F., Yanase, T., Yin, W., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol.*, 2003 (in press).

Inoue H, Kanno R, Sakai R, Okamura S, Ninomiya Y, Yamashita KH and Kanno M After Activation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin, AhR Induces Developmental Defect in DN3 Thymocyte and Caspase-independent Cell Death, *J.Immunol.*

Kajiume T, Ninomiya Y, Ishihara H, Kanno R, and Kanno M The *Polycomb* group gene *mel-18* modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells by controlling *Hoxb4* expression, *Exp.Hematol*

Kikuchi Y, Ohsawa S, Mimura J, Ema M, Takasaki C, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Heterodimers of bHLH-PAS Protein Fragments Derived from AhR, AhRR, and Arnt Prepared by Co-Expression in Escherichia coli: Characterization of Their DNA Binding Activity and Preparation of a DNA Complex. *J. Biochem.*, **134**, 83-90 (2003)

Junsei Mimura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD, *Bioch. Biophys. Acta*, **1619**, 263-268 (2003)

Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and Yamamoto, M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, **8**: 379-391 (2003)

Junsei Mimura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD, *Bioch. Biophys. Acta*, **1619**, 263-268 (2003)

Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, **5**: 224-230 (2003)

Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki, Rikako Nagashima, Keisuke Itoh, Shunsuke Iwano, Yoshiki Takahashi, Shaw Watanabe and Tetsuya Kamataki: Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: Trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **12**: 219-222 (2003)

Fujisaki S, Ninomiya Y, Ishihara H, Miyazaki M, Kanno R, Asahara T, and Kanno M. Dimerization of the Polycomb-group protein Mel-18 is regulated by PKC phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**: 135-140 (2003)

Sakai R, Kajiume T, Inoue H, Kanno R, Miyazaki M, Ninomiya Y, and Kanno M. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells. *Toxicol. Sci.*, **72**, 84-91 (2003)

Masanobu Morita, Akira Kobayashi, Toshiharu Yamashita, Tomomasa Shimanuki, Osamu Nakajima, Satoru Takahashi, Shiro Ikegami, Kaoru Inokuchi, Keisuke Yamashita, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. Functional analysis of basic transcription element binding protein (BTEB) by gene targeting technology. *Mol. Cell Biol.*, **23**: 2489-2500 (2003)

Masanobu Morita, Osamu Ohneda, Toshiharu Yamashita, Satoru Takahashi, Norio Suzuki, Osamu Nakajima, Shimako Kawauchi, Masatsugu Ema, Shigeaki Shibahara, Tetsuo Udono, Koji Tomita, sMakoto Tamai, Kazuhiro Sogawa, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. HLF/HIF2 is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J.*, **22**: 1134-1146 (2003)

Daisuke Mori, Naoko Okuro, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Kazuhiro Sogawa, Gene structure and promoter analysis of the rat BTEB2 gene. *Gene*, **304**: 163-170 (2003)

Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome. *Cell*, **113**, 905-917 (2003)

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, 545-550 (2003)

Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Kato, S.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9416-9421 (2003)

Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta H., Nozawa, S., Kato, S.: p54^{nrb} acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 660-665 (2003)

Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S.: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 636-644 (2003)

Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S.: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 167-171 (2003)

Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., Kato, S.: Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **85**, 95-99 (2003)

Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki M., Morita, K., Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E.: Increase in IP3 and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 287-291 (2003)

Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H.: Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1863-1869 (2003)

Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K.: Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 1217-1226 (2003)

Fujisaki S, Ninomiya Y, Ishihara H, Miyazaki M, Kanno R, Asahara T, and Kanno M. Dimerization of the Polycomb-group protein Mel-18 is regulated by PKC phosphorylation. *BBRC* 300:135-140 (2003)

Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H. and Yamamoto, M. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 105-111 (2003)

Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and Yamamoto, M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* **8**, 379-391 (2003; cover)

Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1163-1174 (2003)

- Mimura, J. & Y. Fujii-Kuriyama. Regulatory roles of AhR. *Env. Sci.*, **9**: 71-81 (2002)
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Teshima, S., Rokutan, K., Mukai, K. & Kuroda, M. Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**: 984-987 (2002)
- Gradin K., Takasaki C., Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K. The Transcriptional Activation Function of the HIF-like Factor Requires Phosphorylation at a Conserved Threonine. *J Biol Chem.*, **277**: 23508-23514 (2002)
- F. Wang, H. Sekine, Y. Kikuchi, C. Takasaki, C. Miura, H. Okuda, T. Shuin, Y. Fujii-Kuriyama, and K. Sogawa. HIF-1 α -proryl Hydroxylase: Molecular Target of Nitric Oxide in the Hypoxic Signal Transduction Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**: 657-662 (2002)
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell.*, **9**: 553-562 (2002)
- Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., Kato, S.: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron*, **35**: 55-864 (2002)
- Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K.: Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research*, **57**: 73-78 (2002)
- Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulatin of the mouse steroid 5 α -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Res.*, **30**: 1387-1393 (2002)
- Michihiro Chida, Noritaka Ariyoshi, Tsuyoshi Yokoi, Nobuo Nemoto, Makoto Inaba, Moritoshi Kinoshita and Tetsuya Kamataki: New allelic arrangement *CYP2D6*^{36x2} found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine, *Pharmacogenetics*, **12**: 659-662 (2002)
- Satoshi Daigo, Yoshiki Takahashi, Masaki Fujieda, Noritaka Ariyoshi, Hiroshi Yamazaki, Wasaburo Koizumi, Satoshi Tanabe, Katsunori Saigenji, Seiko Nagayama, Kazumasa Ikeda, Yasuhiko Nishioka and Tetsuya Kamataki: A novel mutant allele of the *CYP2A6* gene (*CYP2A*11*) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype toward tegafur, *Pharmacogenetics*, **12**(4): 299-306 (2002)
- Takeshi Ozeki, Yoshiki Takahashi, Kazuo Nakayama, Masato Funayama, Kazuo Nagashima, Takako Kodama and Tetsuya Kamataki: Hepatocyte nuclear factor(HNF)-4 α and HNF-1 α as casual factors of interindividual difference in the expression of human dihydrodiol dehydrogenase(DD)4mRNA in human livers, *Pharmacogenetics*, **13**: 49-53 (2002)
- Kazuma Kiyotani, Masaki Fujieda, Hiroshi Yamazaki, Tsutomu Shimada, F. Peter Guengerich, Andrew Parkinson, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki and Tetsuya Kamataki: Twenty one novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CYP2A6*

gene in Japanese and Caucasians, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**(5): 482-487 (2002)

Takeshi Ozeki, Yoshiki Takahashi, Kazuo Nakayama, and Tetsuya Kamataki: Hepatocyte nuclear factor(HNF)-4 α , HNF-1 and vHNF-1 regulate the cell-specific expression of the human dihydrodiol dehydrogenase(DD)4/AKR1C4 gene, *Arch. Biochem. Biophys.*, **405**: 185-190 (2002)

Kazuma Kiyotani, Hiroshi Yamazaki, Masaki Fujieda, Satoshi Daigo, Soisungwan Satarug, Pailin Ujjin, and Tetsuya Kamataki: Novel mutations of the *CYP2A6* gene in a Thai population with lowered capacity of coumarin 7-hydroxylation, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**(2):SNP1(161)-SNP3(163) (2002)

Zeki Topcu, Itsuo Chiba, Masaki Fujieda, Toshiyuki Shibata, Noritaka Ariyoshi, Hiroshi Yamazaki, Figen Sevgican, Malsantha Muthumala, Hiroshi Kobayashi, and Tetsuya Kamataki: *CYP2A6* gene deletion reduces oral cancer risk in betel quid chewers in Sri Lanka, *Carcinogenesis*, **23**(4): 595-598 (2002)

Miyazaki, K., Inoue, H., Onai, N., Ishihara, H., and Kanno, M. Chemokine-mediated thymopoiesis is regulated by a mammalian Polycomb group gene, *mel-18*. *Immunol. Lett.*, **80**: 139-43 (2002)

Keisuke Yamashita, Fine structural aspects of the urothelium in the mouse ureter with special reference to cell kinetics. *Hiroshima J. of Med. Sci.*, **51** (2): 41-48 (2002)

Yuichi Tsumamoto, Hidetoshi Yamashita, Masaya Takumida, Koji Okada, Satoshi, Mukai Makoto Shinnya, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Hiromu K. Mishima. In situ localization of nitric oxide synthase and direct evidence of NO production in rat retinal ganglion cells. *Brain Res.*, **933**(2): 118-129 (2002)

Kusunoki, H., Motohashi, H., Katsuoka, F., Morohashi, A., Yamamoto, M. and Tanaka, T. Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. *Nature Str. Biol.*, **9**: 252-256 (2002)

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P Direct evidence that sulfhydryl group of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 11908-11913 (2002)

Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and Yamamoto, M, Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells*, **7**: 807-820 (2002)

Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 1163-1174 (2002)

Muto A, Tashiro S, Tsuchiya H, Kume A, Kanno M, Ito E, Yamamoto M, Igarashi K. Activation of Maf/AP-1 Repressor Bach2 by Oxidative Stress Promotes Apoptosis and Its Interaction with Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies.. *J Biol Chem*. **277**:20724-20733 (2002)

Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T. Regulation of the expression of

Nrf2 transcription factor by cancer chemopreventive agents through antioxidant response element (ARE)-like sequences in its proximal promoter region. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2883-2892 (2002)

Cho, H.Y., Jedlika, A.E., Reddy, S.P.M., Zhang, L.Y., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Kleeberger, S.R. Linkage analysis of susceptibility to hyperoxic lung injury: role of Nrf2 as a candidate gene. *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.* **26**, 175-182 (2002)

Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, H., Fujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M. and Uchida, K. A sulforaphane analogue that potentially activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 3456-3463 (2002)

Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. and Yamamoto, M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP (CREB binding protein) and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6**, 857-868 (2002)

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

Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 33101-33110 (2001)

Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes to Cells* **6**, 361-374 (2001)

Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, Isaka K, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. *J Hum Genet* **46**(6), 342-6 (2001)

Oikawa K, Ohbayashi T, Mimura J, Iwata R, Kameta A, Evine K, Iwaya K, Fujii-Kuriyama Y, Kuroda M, Mukai K. Dioxin suppresses the checkpoint protein, MAD2, by an aryl hydrocarbon receptor-independent pathway. *Cancer Research*, **61**(15), 5707-5709 (2001)

Nukaya, M., Takahashi, Y., Gonzalez, F.J. & Kamataki, T. Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of expression of the low molecular weight prekininogen gene in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 287(1), 301-304 (2001)

Tanaka T, Morita E, Mihara S, Kanno M, Yamamoto S. Identification of leukemia inhibitory factor as a potent mast cell growth-enhancing factor produced by mouse keratinocyte cell line, KCMH-1. *Arch. Dermatol Res* **293**(1-2), 18-25 (2001)

Akasaka T, van Lohuizen M, van der Lugt N, Mizutani-Koseki Y, Kanno M, Taniguchi M, Vidal M, Alkema M, Berns A, Koseki H. Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* **128**(9), 1587-97 (2001)

Yamasaki M, Sasho T, Moriya H, Kanno M, Harada M, Kamada N, Shimizu E, Nakayama T, Taniguchi M. Extrathymic development of V alpha 11 T cells in placenta during pregnancy and their possible physiological role. *J Immunol*, **166**(12), 7244-9 (2001)

Sugihara, K., Kitamura, S., Yamada, T., Ohta, S., Yamashita, K., Masuda, M., Fujii-Kuriyama, Y. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 1093-1099 (2001)

Yamasaki, S., Ohmori, H., Yamashita, K., Yasuda, M. A morphometric study on postnatal development sciences *Hiroshima Journal of Medical Sciences* **50**, 53-60 (2001)

Horie, S., Yasuda, M. Alterations in palatal ruga patterns in Jcl:ICR mouse fetuses from dams treated with all-trans retinoic acid. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* **51**, 17-25 (2001)

Ikemi, N., Otani, Y., Ikegami, T. & Yasuda, M. Palatal ruga anomaly induced by all-trans retinoic acid in the Crj:SD rat: possible warning sign of teratogenicity. *Reproductive Toxicology* **15**, 87-93 (2001)

Ishii, T., Toh, K., Itoh, K., Akasaka, J., Yanagawa, T., Takahashi, S., Yoshida, H., Bannai S. & Yamamoto, M. Induction of murine intestinal and hepatic peroxiredoxin MSP23 by dietary butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis* **21**, 1013-1016 (2001)

Enomoto, A., Itoh, K., Nagaoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T. & Yamamoto, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug-metabolizing enzymes and antioxidant genes *Toxicol. Sci.* **59**, 169-177 (2001)

Ramos-Gomez, M., Kwak, M., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducer is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3410-3415 (2001)

Kobayashi, M., Nishikawa, K. & Yamamoto, M. Hematopoietic regulatory domain of Gata1 gene is positively regulated by GATA1 protein in zebrafish embryos. *Development* **128**(12), 2341-2350 (2001)

Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T.R. & Kensler, T.W. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethylthio-3-thione. *Mol. Med.* **7**(2), 135-45 (2001)

Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. In vivo requirements for functional GATA-1 domains during primitive and definitive erythropoiesis. *EMBO J.* **20**, 5250-5260 (2001)

Ogi, T., Mimura, J., Hikida, M., Fujimoto, H., Fujii-Kuriyama, Y. & Ohmori, H. Expression of human and mouse genes encoding polk: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription *Genes to Cells* **6**, 943-753 (2001)

Ikemi, N., Otani, Y., Ikegami, T. and Yasuda, M. Palatal ruga anomaly induced by all-trans-retinoic acid in the Crj:SD rat: possible warning sign of teratogenicity. *Reproductive Toxicology*, **15** (1), 87-93 (2001)

Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, 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 coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, **20**, 1341-1352 (2001)

Kato, S.: Vitamin D 1 α -hydroxylase knockout mice as a hereditary rickets animal model. *Endocrinology*, **142**, 2734-2735 (2001)

Mezaki, Y., Yoshida, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: N-terminal activation function is dominant in ligand-dependent transactivation of medaka estrogen receptor in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 763-768 (2001)

Yagishita, N., Yoshizawa, T., Yamamoto, Y., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., Kato, S.: Aberrant growth plate development in VDR/RXR double-null mutant mice. *Endocrinology*, **142**, 5332-5341 (2001)

Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Kato, S.: The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocrine J.*, **48**, 427-432 (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)

Bhushan, A., Itoh, N., Kato, S., Theery, J. P., Czernichow, P., Bellusci, S., Scharfmann, R.: Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*. **128**, 5109-5117 (2001)

Yamauchi, T., Waki, H., Kamon, J., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Miki, H., Kubota, N., Terauchi, Y., Tsuchida, A., Tsuboyama-Kasaoka, N., Yamauchi, N., Ide, T., Hori, W., Kato, S., Fukuyama, M., Akanuma, Y., Ezaki, O., Itai, A., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K., Kagechika, H., Shudo, K., Kadowaki, T.: Inhibition of RXR and PRAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.*, **108**, 1001-1013 (2001)

Sawada, N., Sasaki, T., Kitanaka, S., Kato, S., Inouye, K.: Structure-function analysis of CYP27A1. Studies on mutants from patients with vitamin D-dependent rickets type I (VDDR-I) and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6607-6615 (2001)

Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G. J., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J. M., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G.: Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13324-13329 (2001)

Kallay, E., Pietschmann, P., Toyokuni, S., Bajna, E., Hahn, P., Mazzucco, K., Bieglmayer, C., Kato, S., Cross, H. S.: Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*, **22**, 1429-1435 (2001)

Yamamoto, Y., Wada, O., Suzawa, M., Yogiashi, Y., Yano, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: A tamoxifen responsive estrogen receptor alpha mutant D351Y shows reduced tamoxifen-dependent interaction with corepressor complexes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 42684-42691 (2001)

Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K. R., Sun, H., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K. J., Brown, M., Shioda, T.: Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. *Genes Dev.*, **15**, 2598-2612 (2001)

Inui, N., Murayama, A., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., Kato, S., Nakamura, H.: Correlation between 25-hydroxyvitamin D3 1-hydroxylase gene expression in alveolar macrophages and the activity of sarcoidosis. *Am. J. Med.*, **110**, 687-693 (2001)

Um, M., Yamauchi, J., Kato, S., Manley, J. L.: Heterozygous Disruption of the TATA-Binding Protein Gene in DT40 Cells Causes Reduced cdc25B Phosphatase Expression and Delayed Mitosis. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2435-2448 (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)

Tanaka, T., Morita, E., Mihara, S., Kanno, M. and Yamamoto, S. Identification of leukemia inhibitory factor as a potent mast cell growth-enhancing factor produced by mouse keratinocyte cell line ,KCMH-1. *Arch Dermatol. Res.* 293: 18-25 (2001)

Yoh, K., Itoh, K., Enomoto, A., Hirayama, A., Yamaguchi, N., Kobayashi, M., Morito, N., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S. Nrf2 deficient mouse: a novel model for lupus nephritis. *Kidney Int.* **60**, 1343-1353 (2001)

Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K. and Yamamoto, M. Accelerated DNA adducts formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **173**, 154-160 (2001)

Ramos-Gomez, M., Kwak, M-K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. and Kensler, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3410-3415 (2001)

Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T. and Yamamoto, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetoaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzyme and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* **59**, 169-177 (2001)

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Kume, Y.H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Ishikawa, T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice

- lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 779-782 (2000)
- Takahata, S., Ozaki, T., Mimura, J., Kikuchi, Y., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes to Cells*, **5**, 739-747 (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)
- Kato, S., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K. Missense mutations in 25(OH)vitamin D₃ 1-hydroxylase gene causes vitamin D dependent type I rickets. *Clin. Pediatr. Endocrinol.*, **9** (suppl. 14), 1-5 (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 and by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645-15651 (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)
- Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S. and Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 16023-16029 (2000)
- Motohashi, H., Katsuoka, F., Shavit, J., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Positive or negative MARE-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small Maf proteins. *Cell* **103**, 865-875 (2000)
- Kato, S.: Molecular mechanism of transcriptional control by nuclear vitamin receptors. *British J. Nutrition*, **84** (suppl. 2), 229-233 (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)
- 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)
- 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)

Kitanaka, S., Kato, S.: Vitamin D-dependent rickets type I and type II. *In* The Genetics of Osteoporosis and Metabolic Bone Disease, ed. by M. J. Econs, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 95-109 (2000)

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

Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR 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)

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)

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)

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)

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 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, **39**, 2123-2129 (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)

Hiragun, T., Morita, E., Shindo, H., Tanaka, T., Kameyoshi, Y., Okabe, T., Kanno, M. and Yamamoto, S. Altered in vitro apoptosis of cultured mast cells prepared from an inbred strain of mice, NC/Kuj. *Clinical and Experimental Allergy*, **30**: 433-438 (2000)

Takagi TN, Matsui KA, Yamashita K, Ohmori H, and Yasuda M. Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **20**: 73-86 (2000).

Yamashita K, Takagi TN, Yamashita T, Yamasaki S, Okamura S, Fujii-Kuriyama Y, and Yasuda M. Involvement of Ah receptor on developmental toxicity of dioxin in mouse fetuses: sensitivity in Ahr-mutant heterozygotes. *Organohalogen Compounds* **49**: 147-150 (2000).

Hayes, J.D., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G.J., Wolf, C.R., and Yamamoto, M. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 33-41 (2000)

Ishii, T., Itoh, K., Akasaka, J., Yanagawa, T., Takahashi, S., Yoshida, H., Bannai, S. and Yamamoto, M. Induction of murine intestinal and hepatic peroxiredoxin MSP23 by dietary butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis* **21**, 1013-1016 (2000)

Katsuoka, F., Motohashi, H., Onodera, K., Suwabe, N., Engel J.D. and Yamamoto, M. One enhancer mediates *mafK* transcriptional activation in both hematopoietic and cardiac muscle cells. *EMBO J.* **19**, 2980-2991 (2000)

Onodera, K., Shavit, J.A., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Engel, J.D. Perinatal synthetic lethality and hematopoietic defects in compound *mafG::mafK* mutant mice. *EMBO J.* **19**, 1335-1345 (2000)

M. Ema, K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 in response to hypoxia : their stabilization and redox signal induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* **18**: 1905-1914 (1999)

J. Mimura, M. Ema, k. Sogawa & Y. Fujii-Kuriyama. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**: 20-25 (1999)

Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, **283**: 1317-1321 (1999)

Masami Miyamoto, Yuri Umetsu, Hirotoshi Dosaka-Akita, Yuichi Sawamura, Jun Yokota, Hideo Kunitoh, Nobuo Nemoto, Kunio Sato, Noritaka Ariyoshi and Tetsuya Kamataki, CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**: 658-660 (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 α . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5363-5372 (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)

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the N-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76-86 (1999).

Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel, J.D. and Yamamoto, M. The mouse GATA-2 gene is expressed in the aorta-gonads-mesonephros region. *Blood* **93**, 4196-4207 (1999)

Yasumasa Sasaki, Yoshiki Takahashi, Kazuo Nakayama and Tatsuya Kamataki, Cooperative regulation of CYP2C12 gene expression by signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) and liver-specific factor in female rats., *J. Biol. Chem.*, **274**(52): 37117-37124 (1999)

Characterization of the murine *mafF* gene. Onodera, K., Shavit, J. A., Motohashi, H., Katsuoka, F., Akasaka, J-e, Engel, J. D. and Yamamoto, M. *J. Biol. Chem.* **274**, 21162-21169 (1999)

Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K. and Yamamoto, M. Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J. Biol. Chem.* **274**, 19254-19260 (1999)

Kobayashi, A., Itoh, E., Toki, T., Takahashi, S-i, Igarashi, K., Hayashi, N. and Yamamoto, M. Molecular cloning and functional characterization of a new CNC family transcription factor Nrf3. *J. Biol. Chem.* **274**, 6443-6452 (1999)

S. Takahata, K. Sogawa, A. Kobayashi, M. Ema, J. Mimura, N. Ozaki & Y. Fujii-Kuriyama. Transcriptionally Active Heterodimer Formation of an Arnt-like PAS Protein, Arnt3, with HIF-1, HLF, and Clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 789-794(1998)

K.Sogawa, K. Numayama-Tsuruta, M. Ema, M. Abe, H. Abe & Y. Fujii-Kuriyama. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7369-7373(1998)

Y-M. Zheng, M. B. Fisher, N. Yokotani, Y. Fujii-Kuriyama & A. E. Rettie. Identification of a Meander Region Proline Residue Critical for Heme Binding to Cytochrome P450: Implications for the Catalytic Function of Human CYP4B1. *Biochemistry.* **37**:12847-12851 (1998)

F. Wang, J-x. Gao, J. Mimura, A. Kobayashi, K. Sogawa & Y. Fujii-Kuriyama. Structure and Expression of the Mouse AhR Nuclear Translocator (mArnt) Gene. *J. Biol. Chem.* **273**:24867-24873 (1998)

W. Zhang, J. M. Shields, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama & V. W. Yang. The Gut-enriched kr pel-like Factor Suppresses the Activity of the CYP1A1 Promoter in an Sp1-dependent Fashion. *J. Biol. Chem.* **273**:17917-17925(1998)

A. Suzuki, H. Kushida, K. Iwata, M. Watanabe, T. Nohmi, K. Fujita, F. J. Gonzalez, and T. Kamataki: Establishment of a salmonella tester strain highly sensitive to mutagenic heterocyclic amines. *Cancer Res.* **58**: 1833-1838 (1998)

H. Iwata, K. Fujita, H. Kushida, A. Suzuki, Y. Konno, K. Nakamura, A. Fujino, and T. Kamataki: High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in Escherichia coli. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 1315-1325 (1998)

Hasegawa M., Tetsu, O., Kanno, R., Inoue, H., Ishihara, H., Kamiyasu, M., Taniguchi, M. and Kanno, M. Mammalian Polycomb group genes are categorized as new type of early response gene induced by B-cell receptor cross linking. *Molecular Immunology* **35**: 559-563 (1998)

Tetsu, O., Ishihara, H., Kanno, R., Kamiyasu, M., Inoue, H., Tokuhisa, T., Taniguchi, M. and Kanno, M. mel-18, a mammalian Polycomb group gene, negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to c-myc/cdc25. *Immunity.* **9**: 439-448 (1998)

Minegishi, N., Ohta, J., Suwabe, N., Nakauchi, H., Ishihara, H., Hayashi, N. and Yamamoto, M. Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 3625-3634 (1998)

Nagai, T., Igarashi, K., Akasaka, J., Furuyama, K., Fujita, H., Hayashi, N., Yamamoto, M. and Sassa, S. Regulation of NF-E2 activity in erythroleukemia cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **273**, 5358-5365 (1998)

Kuroha, T., Takahashi, S., Komeno, T., Itoh, K., Nagasawa, T. and Yamamoto, M. Ablation of Nrf2 function does not embellish erythroid or megakaryocytic cell lineage dysfunction caused by p45 NF-E2 gene disruption. *J. Biochem.* **123**, 376-379 (1998)

Takahashi, S., Komeno, T., Suwabe, N., Yoh, K., Nakajima, O., Nishimura, S., Kuroha, T., Nagasawa, T. and Yamamoto, M. Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vitro. *Blood* **92**, 434-442 (1998)

Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Y., Tsai, F. Y., Kitamura, Y., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cell* **3**, 39-50 (1998)

Igarashi, K., Hoshino, H., Muto, A., Suwabe, N., Nishikawa, S., Nakauchi, H. and Yamamoto, M. Multivalent DNA binding complex by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for α -globin locus control region holocomplex. *J. Biol. Chem.* **273**, 11783-11790 (1998)

Shavit, J.A., Motohashi, H., Onodera, K., Akasaka, J.-e., Yamamoto, M. and Engel, J.D. Impaired megakaryopoiesis and behavioral defects in mafG-null mutant mice. *Genes Dev.* **12**, 2164-2174 (1998)

Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M. and Igarashi, K. Identification of Bach2 as a B cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulates immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *EMBO J.* **17**, 5734-5743, (1998)

Cohen-Kaminsky, S., Maouche-Chretien, L., Vitelli, L., Vinit, M.A., Blanchard, I., Yamamoto, M., Peschle, C. and Romeo, P.H. Chromatin immunoselection defines a TAL-1 target gene. *EMBO J.* **17**, 5151-5160 (1998)

Iwata, T., Kogame, K., Toki, T., Yokoyama, M., Yamamoto, M. and Ito, E. Structure and chromosome mapping of the human small maf genes MAFG and MAFK. *Cytogenet. Cell Genet.* **82**, 88-90 (1998)

Suwabe, N., Takahashi, S., Nakano, T. and Yamamoto, M. GATA-1 regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation. *Blood* **92**, 4108-4115 (1998)

Motohashi, H., Ohta, J., Engel, J.D. and Yamamoto, M. A core region of the mafK gene IN promoter directs neuron-specific transcription in vivo. *Genes Cell.* **3**, 671-684 (1998)

Zhou, Y., Lim, K-C., Onodera, K., Takahashi, S., Ohta, J., Minegishi, N., Tsai, F-Y., Orkin, S-H., Yamamoto, M. and Engel, J.D. Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development. *EMBO J.* **17**, 6689-6700 (1998)

Furuyama, K., Uno, R., Urabe, A., Hayashi, N., Fujita, H., Kondo, M., Sassa, S. and Yamamoto, M. R411C mutation of the ALAS2 gene encodes a pyridoxine-responsive enzyme with low activity. *British J. Haematol.* **103**, 839-841 (1998)

(2) 口頭発表

①招待、口頭講演 (国内 5 件、海外 5 件)

Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Ema, M. & Sogawa, K. (東北大学), Molecular Mechanisms of Function and Regulation of Ah receptor, 内分泌かく乱物質問題に関する国際シンポジウム, 1999, 12, 11.

Fujii-Kuriyama, Y., Recent findings on structure & function of the Ah receptor 13th International Symposium on Microsomes & Drug Oxidations, Stresa (Italy), 2000, 7, 9.

Fujii-Kuriyama, Y., Transcriptional function of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor, 1st International Symposium on Organ and cell type specificity of tumorigenesis, tumor development and tumor prevention, Mainz (Germany), 2001, 6, 23.

Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Sogawa, K. & Baba, T., Regulatory mechanisms of transcription activity of Ah receptor, 12th International Conference on Cytochrome P450, La Grande Motte (France), 2001, 9.

Fujii-Kuriyama, Y., Numayama-Tsuruta, K., Mimura, J. & Sogawa, K., Ah receptor potential determinant of individual difference in the drug-metabolizing capacity, 8th International Conference on Environmental Mutagens, 静岡市, 2001, 10.

藤井義明, Ah receptor as a potential determinant of individual difference in the drug-metabolizing capacity (生物の環境適応と転写因子), 第30回日本環境変異原学会及び第8回国際環境変異原学会, 静岡市, 2001, 10, 23-25.

藤井義明, Ah receptor and inducible expression of cytochrome, 14th International

Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO2002), Sapporo (Japan), 2002, 7, 22-26.

藤井義明, Role of AhR in expression of biological effects of endocrine disruptors, International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer, Fukuoka (Japan), 2002, 10, 21-25.

藤井義明, Transcriptional roles of AhR in expression of biological effects induced by endocrine disruptors, SCOPE/IUPAC 内分泌活性物質国際シンポジウム, 横浜, 2002, 11, 17-21.

藤井義明, Molecular mechanisms of transactivation of Ah receptor in the target gene expression, 13th International Conference on Cytochromes P450, Pragu (Czech Republic), 2003, 7, 2.

②ポスター発表 (国内 13 件、海外 0 件)

Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawachi, S., Ema, M., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y. (東北大学), Arnt2 regulates the development of secretory neurons in mouse hypothalamus with Sim1 as a dimer, 日本分子生物学会, 2000, 12, 15.

沼山恵子, 十川和博, 高橋智裕, 和田忠士, 半田宏, 藤井義明 (東北大学), AhリセプターとArntのヘテロダイマーをコアアクティベーターとして要求する転写因子の同定, 日本分子生物学会, 2000, 12, 13.

大竹史明, 武山健一, 柳澤純, 佐藤隆史, 藤井義明, 加藤茂明, ダイオキシンによる女性ホルモン攪乱作用の分子メカニズムの解析, 日本分子生物学会, 2000, 12, 13.

藤井義明, 三村純正, 馬場崇, 十川和博, 外来異物に対する生体応答のメカニズム, 日本分子生物学会, 2000, 10, 14.

馬場崇, 三村純正, 十川和博, 藤井義明, AhRR遺伝子の発現制御機構の解析, 日本生化学会, 2000, 10, 13.

藤井義明, Ah受容体の機能とその調節, 第73回日本生化学会, 2000, 10.

藤井義明, アリルヒドロカーボン (ダイオキシン) 受容体の転写活性化機構とその調節, 日本生化学会東北支部シンポジウム, 2000, 6, 3.

沼山恵子 1, 十川和博 1, 菊池康夫 1, 半田宏 2, 藤井義明 1 (1 東北大院・生命科学・分子生命科学, 2 東工大・フロンティア), Ahリセプターがコアアクティベーターとして機能する CYP1A2 遺伝子転写制御機構の解析, 日本癌学会, 横浜市, 2001, 9, 26-27.

木下耕史 1, 笹倉由貴江 1, 十川和博 1, 鈴木理 2, 藤井義明 1, 東北大院・生命科学・分子生命科学, 2 産総研・DNA情報, ハイポキシアで活性化する HLF の DNA 結合様式の解析, 第74回日本生化学会大会, 京都市, 2001, 10, 24-28.

菊池康夫, 大澤志津江, 三村純正, 依馬正次, 十川和博, 藤井義明 (東北大院・生命科学, 分子生命科学, 大腸菌を用いた AhR-Arnt ヘテロ二量体の発現, 第74回日本生化学会大会, 京都市, 2001, 10, 24-28.

山下 年晴 1, 大根田 修 2, 大根田 絹子 2, 守田 匡伸 1, 山本 雅之 2, 藤井 義明 1, 腫瘍血管新生における HLF (HIF-1a like factor) の役割, 第24回日本分子生物学会, 横浜市, 2001, 12, 9.

山下 年晴 1, 2, 大根田 修 1, 守田 匡伸 2, 鈴木教郎 1, 山本 雅之 1, 藤井 義明 1, マウス未熟児網膜症モデルを用いた血管新生における HLF/Hif-2 α 転写因子の機能解析, 第25回日本分子生物学会, 横浜市, 2002, 12, 13-14.

藤井義明, 内分泌攪乱物質の生体作用発現における Ah リセプターの役割, 第26回日本医学会総会, 福岡市, 2003, 4, 6.

①招待、口頭講演 (国内 10 件、海外 1 件)

糠谷学, 高橋芳樹, 斎藤鉄也, Frank J Gonzalez, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝異常の分子レベルにおける発現機構の解明, 日本薬物動態学会, 第18回年会 (札幌), 173, 2003.

柴原憲仁, 都出健治, 山崎浩史, 永島理香子, 伊藤圭輔, 岩野俊介, 高橋芳樹, 斎藤鉄也, 渡辺昌, 鎌滝哲也: CYP1B1 mRNA量を指標としたヒトにおけるダイオキシン類曝露の定量的評価法の確立, 日本薬物動態学会, 第18回年会 (札幌), 174, 2003.

柴原憲仁, 斎藤鉄也, 鎌滝哲也: ヒトCYP1B1の細胞特異的な発現制御機構, 日本トキシコロジー学会, 第30回年会 (相模原), 226, 2003.

糠谷学, 高橋芳樹, 斎藤鉄也, Frank J Gonzalez, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝異常の発現機構の分子レベルでの解明, 日本トキシコロジー学会, 第30回年会 (相模原), 245, 2003.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固カスケードの阻害について, 日本薬物動態学会, 第17回年会 (東京), 223, 2002.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による PPAR α 標的遺伝子の抑制とその分子機構, 日本トキシコロジー学会, 第29回年会 (名古屋), 226, 2002.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝酵素の発現抑制とその分子機構, 日本薬物動態学会, 第16回年会 (神戸), 189, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による JAK-STATシグナル伝達の阻害とその分子機構, 日本癌学会, 第60回年会 (横浜), 163, 2001.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor (AHR) target genes involved in the toxicity caused by polycyclic aromatic hydrocarbons, International Congress of Toxicology, 9th Meeting (Brisbane), 22, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による成長ホルモン応答シグナル伝達の阻害とその分子機構, 日本トキシコロジー学会, 第28回年会 (東京), 81, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: ダイオキシン受容体の新規標的遺伝子の探索, 日本薬物動態学会, 第15回年会 (福岡), 32, 2000.

②ポスター発表 (国内 6 件、海外 2 件)

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素によるPPAR α シグナル伝達の抑制とその分子機構, 日本分子生物学会, 第25回年会 (横浜), 944, 2002.

柴原憲仁, 糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による血液凝固第V因子遺伝子の発現抑制とその影響, 日本分子生物学会, 第25回年会 (横浜), 944, 2002.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of PPAR α signal caused by polycyclic aromatic hydrocarbons, North American International Society for the Study of Xenobiotics, 11th Meeting (Orlando), 35, 2002.

Manabu Nukaya, Yoshiki Takahashi, Frank J. Gonzalez and Tetsuya Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of growth hormone signal caused by polycyclic aromatic hydrocarbons, Microsomes and Drug Oxidation, 14th International Symposium (Sapporo), 169, 2002.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝阻害の分子機構の解明, 日本分子生物学会, 第24回年会 (横浜), 78, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: ディファレンシャルディスプレイ法によるダイオキシン受容体の新規標的遺伝子の探索とその機能解析, 日本薬学会, 第121回年会 (札幌), 89, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: 多環芳香族炭化水素による脂質代謝阻害の分子機構の解明, 日本分子生物学会, 第24回年会 (横浜), 78, 2001.

糠谷学, 高橋芳樹, Gonzalez FJ, 鎌滝哲也: ダイオキシン受容体の新規標的遺伝子の探索と機能解析, 日本分子生物学会, 第23回年会 (神戸), 541, 2000.

②ポスター発表 (国内 6 件、海外 1 件)

Hiroko INOUE, Ruriko SAKAI, Masaki MIYAZAKI, Teruyuki KAJIUME,

Rieko KANNO, Masamoto KANNO. Alterations of thymocyte differentiation in mouse exposed to 2,3,7,8 -tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD); contribution of caspase- and bcl-2 -independent cell death. **11th international Congress of Immunology Stockholm, Sweden, 22-27, July 2001**

井上洋子, 菅野理恵子, 坂井るり子, 神安雅哉, 山下敬介, 菅野雅元, ダイオキシン類による胸腺萎縮作用の解析, 第29回日本免疫学会, 平成11年12月1日〜3日, 国立京都国際会館

井上洋子, 菅野理恵子, 坂井るり子, 岡村さおり, 山下敬介, 菅野雅元, ダイオキシン類による胸腺萎縮作用の解析(III), 第30回日本免疫学会, 平成12年11月14日〜16日, 仙台国際センター

井上洋子, 菅野理恵子, 坂井るり子, 岡村さおり, 山下敬介, 菅野雅元, ダイオキシン類による胸腺への影響—胸腺細胞の細胞死に関連する遺伝子群の挙動と細胞形態変化, 第31回日本免疫学会, 平成13年12月11日〜13日, 大阪国際会議場

坂井るり子, 梶梅輝之, 井上洋子, 菅野理恵子, 岡村さおり, 山下敬介, 菅野雅元, ダイオキシンが及ぼす造血幹細胞への影響について., 第31回日本免疫学会, 平成13年12月11日〜13日, 大阪国際会議場

菅野雅元, 井上洋子, 菅野理恵子, 坂井るり子, 岡村さおり, 山下敬介, 二宮裕一, ダイオキシンによる胸腺萎縮の解析—マイクロアレイ解析及び細胞の形態変化, 第32回日本免疫学会, 京王プラザホテル (東京), 平成14年12月4日—6日

坂井るり子, 梶梅輝之, 井上洋子, 菅野理恵子, 岡村さおり, 山下敬介, 菅野雅元, ダイオキシンが及ぼす造血幹細胞への影響: その2, 第32回日本免疫学会, 京王プラザホテル (東京), 平成14年12月4日—6日

①招待、口頭講演 (国内 2 件、海外 2 件)

山本雅之, Nrf2, an adaptive response gene to oxidative stress and to chemopreventive agents., The 13th International Symposium on Micorsomes and Drug Oxidation, Stresa (Italy), 2000, 7, 10-14.

山本雅之, Nrf2, A transcription factor response to oxidative stress., DMW /International Society for the Study of Xenobiotics, St. Andrews, 2000, 6, 11-16.

山本雅之, Nrf2 and Keap1 regulation of antioxidative stress genes., The 10th Biennial Meeting of International Society for Free Radical Research, Antioxidant: Beyond Scavenger, Kyoto (Japan), 2000, 10, 17-20.

山本雅之, 伊東健, 若林伸直, Nrf2とKeap1による酸化ストレス応答遺伝子制御機構, 第73回日本生化学大会シンポジウム, 2000, 10, 14.

(3)特許出願 (国内 件、海外 件)

なし

(4)新聞報道等

①新聞報道

1999年12月3日読売新聞: ダイオキシンの免疫系へ影響 マウス実験で確認, 広大グループ

<p>ダイオキシンの免疫系へ影響 マウス実験で確認</p> <p>広大グループ</p>	<p>菅野教授らは、マウス約二百匹に、最も毒性の強いダイオキシンのTCDD2・3・7・8を、体重1gあたり0.1〜100ppm(マイクロは百万分の一)から一度だけ投与して、免疫反応を起すリンパ球が正常に働くように教育する器官である胸腺の変化を調べた。</p> <p>その結果、約四十日・倍以上投与したマウスの胸腺は約一週間後までに急激に縮み、中のリンパ球数は正常時の約90%も減少した。さらに未熟な細胞の割合が増え、リンパ球を成熟させる機能にも異常が見られた。人間の耐容摂取量にほぼ相当する0.1ppmを投与した場合でも、数%リンパ球が減少した。</p> <p>ダイオキシンの受容体を持たないマウスでは影響が現れず、受容体に作用して胸腺の細胞を殺していると考えられるが、詳しいメカニズムはわかっていない。</p> <p>胸腺はリンパ球に、自己の細胞を攻撃しないことを教えるため、異常が起るとリンパ球などの自己免疫疾患を起すことが知られている。</p> <p>菅野教授は「アレルギー疾患の一因になっている可能性もあり、詳しいメカニズムを調べたい」と話している。</p>
---	---

2003年5月29日毎日新聞: ダイオキシン 特定たんぱくと結合-東大教授ら解明, 女性ホルモンに異常

2003年5月29日読売新聞: ダイオキシンの環境ホルモン作用 仕組みの詳細解明

(5)その他特記事項

なし

7. 結び

5年間の研究で達成出来なかったものは、内分泌攪乱物質に対する高感受性のモニターマウスを作ることである。これは、AhRRの欠失マウスが高感受性になると予想されたが、あまり予定通りに進めることができなかった。異物代謝第2相酵素の発現を制御するNrf2の欠失マウスは、第1相反応の生成物が蓄積するので、発癌物質などについて高感受性になる可能性がある。この点についての研究は、現在進められている。免疫についてのAhRの機能についても初めは思ったようには進まなかったが、T細胞の分化とマクロファージの発現について糸口がつかめて来たと思うので今後の進展が期待される。

予想以上に研究が進展したものは、AhRがアロマターゼ遺伝子の発現制御を通して生殖サイクルに関与していることを発見したこと、AhRとER α 及びER β が相互作用してTCDDや3MCのエストロジェン作用を発揮するメカニズムが解明されたこと、AhRの作用の抑制因子としてAhRRが発見されたことで、AhRの作用はAhRRによってフィードバック阻害の調節ループが発見されたことである。5年間という長期間に渡って、研究費のみでなく、PDなどの人的援助も受けて非常に有意義な研究期間を送ることができました。また、有効な共同研究ができて、全体的には、予想以上の成果をあげることができたと思っています。科学技術振興機構に対し深甚なる感謝の意を捧げます。



※本プロジェクトのメンバーであった武山 健一氏については、同氏が所属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