

「生命活動のプログラム」

平成9年度採択研究代表者

加藤 茂明

(東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

## 「遺伝情報制御分子としてのステロイドレセプター」

### 1. 研究実施の概要

核内ステロイドレセプターによる転写促進制御の分子メカニズム解明を目的とする。種々のレセプターの生体内での生理機能の解析を試みた。同時に、新規核内ステロイドレセプター転写共役因子群の同定・性状解析を、生化学的手法を用いることで行なった。転写共役因子複合体として核内に存在することが、近年明らかになりつつあることから、本年度は複合体の精製を行った。その結果、今まで報告のなかった GCN5/TRRAP 転写共役因子複合体が、核内レセプターに作用することを明らかにした。またこの複合体はエストロゲン依存的細胞増殖に深く関与することを明らかにした。一方、本年度は、男性ホルモンレセプターのノックアウトマウス (AR KO) の変異を詳細に解析し、男性ホルモン不応症を呈することに加え、骨代謝異常更に性行動欠失を見出し、AR の生理学的重要性を証明することができた。

### 2. 研究実施の内容

#### 【目的】

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

#### 【方法】

- (1) 核内レセプター転写共役因子複合体構成因子群を同定する目的に、週に数リットル HeLa の細胞を浮遊培養し、核抽出液を調整し、ER $\alpha$ , AR, MR, VDR 組み換えタンパクをプローブに、コアクチベーター複合体の精製を試みた。同時に精製した複合体の機能としてクロマチン修飾活性やヒストンアセチル化活性を測定した。
- (2) 核内レセプターの生体内での生理機能を評価する目的に、上述してきたように in vitro 系のみならず in vivo 系遺伝子ノックアウトマウス (KO マウス) を作成し解析してきた。このような戦略を用い、p68/p72、SRC-1 の KO マウスの作製を試みている。一方アンドロゲンレセプター (AR) KO マウスの flox 化に成功しており、現在脳や骨組織特異的 KO を試みているところである。

#### 【結論】

- (1) 核内レセプター転写共役因子複合体の同定を HeLa 細胞核抽出液より生化学的手法により

試みた。各種核内レセプターを用い複合体の検索を試みた結果 ER にエストロゲン依存的に結合する GCN5/TRRAP 複合体を同定することができた (Yanagisawa et al., *Molecular Cell* 9, 533-62, 2002)。更にこの複合体は、乳癌細胞のエストロゲン依存性細胞増殖において極めて重要な役割を果たすことを証明できた。このことは、この複合体が転写反応のみならず細胞増殖にも関与する多機能複合体であることが分かった。このことは核内での生物反応が同一の複合体により調節される可能性を示すものであり、創薬研究においても重要な手がかりになると期待される。

- (2) 一方 VDR に相互作用する精製複合体の中に、未知のクロマチン修飾複合体の存在を認めた。そこでこの複合体を一構成因子を大量に発現した stable transformant を用いることで大量に調整した。その結果、この複合体はクロマチン修飾活性に加え、DNA 複製機能に関与する可能性が明らかになった。このことは核内レセプターのシステムが、遺伝子の発現調節のみならず、その場を作るクロマチン構造をも積極的に修飾する可能性を示唆するものであった。
- (3) Cre-lox P システムを応用することで、AR 遺伝子を潜在的に破壊した。本法を使うことにより、女性化しない flox AR KO マウスが作出できた。本マウスと Cre 発現トランスジェニックノックアウトマウスとを交配することで、雌雄で AR 遺伝子破壊に成功した。雄 AR KO マウスは典型的なアンドロゲン不応症を示し、外性生殖器は完全女性型であり、ヒト疾患モデルとなることを確認することができた。更に詳細な解析によりこのマウスでは骨代謝異常亢進による骨量の減少に加え、成長期終了後異常な脂肪蓄積を認めた。更に最も驚くべき変異として雌雄性行動欠落を見出した。定説では脳の性分化プログラムは女性型と考えられてきたが、本研究から性ステロイドホルモンの作用が脳の性分化に必須であることを証明した (Sato et al., 投稿準備中)。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 核内レセプター及び共役因子の性状の解析グループ

研究グループ長:加藤茂明(東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

研究項目:研究総括、核内レセプターの機能、共役転写因子、遺伝子欠損動物、核内レセプターの高次機能の解析

#### (2) エストロゲンレセプターとその応答遺伝子の機能解析グループ

研究グループ長:井上 聡(東京大学医学部附属病院老年病科 講師)

研究項目:エストロゲンレセプター遺伝子導入動物を用いた機能解析

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

##### 加藤グループ

- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S. : Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complexes. *Mol. Cell*, 9, 553-562, 2002.

- Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 $\alpha$ -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1387–1393, 2002.
- Nawata, H., Goto, K., Morinaga, H., Yanase, T., Yanagisawa, J., Kato, S., Nomura, M., Okabe Taijiro, Takayanagi, R.: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences*, **9**, 057–070, 2002.
- Shimosawa, T., Shibagaki, Y., Ishibashi, K., Kitamura, K., Kangawa, K., Kato, S., Ando, K., Fujita, T.: Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation*, **105**, 106–111, 2002.
- Maillieux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillion, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dichson, C., Thiery, J. P., Bellusci, S.: Role of FGF 10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, **129**, 53–60, 2002.
- Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K., Ohuchi, H.: FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, **129**, 1533–1541, 2002.
- Suzawa, M., Tamura, Y., Fukumoto, S., Miyazono, K., Fujita, T., Kato, S., Takeuchi, Y.: Stimulation of smad1 transcriptional activity by ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: A possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, **17**, 240–248, 2002.
- Lee, H.-S., Miyauchi, K., Nagata, Y., Fukuda, R., Sasagawa, S., Endoh, H., Kato, S., Horiuchi, H., Takagi, M., Ohta, A.: Employment of the human estrogen receptor  $\beta$  ligand-binding domain and co-activator SRC1 nuclear receptor-binding domain for the construction of a yeast two-hybrid detection system for endocrine disrupters. *J. Biochem.*, **131**, 399–405, 2002.
- Kato, S.: Editorial: Vitamin D 1 $\alpha$ -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  $\alpha$  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 $\gamma$  double-null mutant mice. *Endocrinology*, **142**, 5332–5341, 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  $\alpha$  coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, **20**,

1341–1352, 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.
- 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 $\alpha$ -hydroxylase gene expression in alveolar macrophages and the activity of sarcoidosis. *Am. J. Med.*, **110**, 687–693, 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.
- 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  $\gamma$  ameliorates diet-induced obesity and type2 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.

#### 井上グループ

- Tsuchiya, F., Ikeda, K., Tsutsumi, O., Hiroi, H., Momoeda, M., Taketani, Y., Muramatsu, M., Inoue, S.: Molecular cloning and characterization of mouse EBAG9, homolog of a human cancer associated surface antigen: expression and regulation by estrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 2–10, 2001.
- Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Ogawa, S., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Inoue, S.: Differential expression of estrogen receptor beta (ER beta) and its C-terminal truncated splice variant of ER beta cx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 692–699, 2001.
- Orimo, A., Tomioka, Y., Shimizu, Y., Sato, M., Oigawa, S., Kamata, K., Nogi, Y., Inoue, S., Takahashi, M., Hata, T., Muramatsu, M.: Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 3097–3105, 2001.

#### (2) 特許出願

なし

※本プロジェクトの研究代表者であった加藤茂明氏については、同氏が主宰する研究室において論文の不正行為があったことが東京大学において認定されています。認定された不正行為には、本プロジェクトの研究結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/public/public01_261226_j.html).

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

[http://www.jst.go.jp/osirase/20160325\\_oshirase-2.html](http://www.jst.go.jp/osirase/20160325_oshirase-2.html)