

ンの細胞外表出の誘導は、U0126の同時添加にて増強され、SB203580の同時添加にて抑制された。U0126およびSB203580の単独投与では影響がなかった(図2)。このことよりグルココルチコイドによるT細胞アポトーシスに対してERKは抑制的に、P38は促進的に働くことが示唆された。

ERKおよびP38の標的として、アポトーシスを調節するbcl-2ファミリーおよびIAPファミリーに属する分子が考えられたため、bcl-2、bcl-xL、Bax、Bad、Bak、c-IAP-1、XIAPのタンパク量におよぼすU0126単独、U0126およびデキサメサゾンの同時投与の影響を検討したが、影響は認められなかった(図3)。

また、グルココルチコイド抵抗性株CC3においてもU0126存在下にてデキサメサゾン投与にてアポトーシスが誘導された(図1)。

#### D. 考案

グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスはグルココルチコイド受容体を介すること、新たな遺伝子発現が必要であることが知られている。グルココルチコイドによるアポトーシス促進性遺伝子の発現増強、またはアポトーシス抑制性遺伝子の発現低下がなんらかの影響を及ぼしてT細胞アポトーシスが誘導されると考えられている。

また、グルココルチコイドによるアポトーシス誘導はミトコンドリアを介すると考えられている。ミトコンドリアを介するアポトーシスはbcl-2ファミリーに属する因子にて正または負に調節されている。なんらかのアポトーシス刺激がミトコンドリアに到達すると、ミトコンドリアの外膜と内膜の間の膜間スペースからチトクロームCなどの物質が細胞質に放出され、カパーゼの活性化、DNAの分解、クロマチン

凝縮、ホスファチジルセリンの細胞外表出、と言った一連のアポトーシスカスケードが誘導される。

MAPキナーゼにはおもなものにERK、JNK、P38の3つがあり、一般にERKが細胞の増殖、生に、JNKおよびP38がストレス応答、アポトーシスなどに関与している。MAPキナーゼは一連のリン酸化カスケードにより活性化され、U0126はERKを活性化するMEK1/MEK2のインヒビター、SB203580はP38そのもののインヒビターである(図4)。

今回の検討によりグルココルチコイドによるT細胞アポトーシスに対して、ERKは抑制的に、P38は促進的に作用することが示唆された。ミトコンドリアの膜電位減少に始まる一連のアポトーシスカスケードのすべての段階においてその作用が認められたため、ERKおよびP38の標的はミトコンドリアまたはミトコンドリア以前にあると思われる。ミトコンドリアを介したアポトーシスを調節するbcl-2ファミリーのbcl-2、bcl-xL、Bax、Bad、Bakの発現自体は変化がなかったが、リン酸化状態の変化、および細胞内局在の変化におよぼす影響については今後の検討が必要である。

ERKはRas-Rafを介して活性化されるが、T細胞においてはT細胞受容体および種々の増殖因子によりRas-Raf-ERKが活性化される。

以前よりT細胞受容体を介したT細胞アポトーシスとグルココルチコイドを介したT細胞アポトーシスは拮抗することが知られていたが、ERKがグルココルチコイドによるT細胞アポトーシスを抑制することはこのことをよく説明する(図5)。

また、ERKを抑制するとグルココルチコイド抵抗性株でもアポトーシスが誘導されることより、グルココルチコイド抵抗性の機序のひとつとして、ERKの過剰な活性化

が考えられる。また、治療への応用として、ERKを抑制するとグルココルチコイド抵抗性を解除する可能性があり、大変興味深い。

## E. 結論

グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスにおけるMAPキナーゼとのクロストークについて検討し、ERKは抑制的に、P38は促進的に作用することが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Saitoh, M., Takayanagi, R., Goto, K., Fukamizu, A., Tomura, A., Yanase, T., Nawata, H.: The presence of both the amino- and carboxy- terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: A three dimensional imaging study. *MolEndocrinol* 16: 694-706, 2002.
- 2) Nawata, H., Yanase, T., Goto, K., Okabe, T., Ashida, K.: Mechanism of action of anti- aging DHEA- S and the replacement of DHEA- S. *Mech AgeingDev* 123: 1101-1106, 2002.
- 3) Nawata, H., Goto, K., Norinaga, H., Yanase, T., Yanagisawa, J., Kato, S., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R.: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences* 9: 57-70, 2002.
- 4) Zhao, Y., Goto, K., Saitoh, M., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R., Nawata, H.: Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment. *J Biol Chem* 277: 30031-

30039, 2002.

5) Fujii, A., Harada, T., Yamauchi, N., Iwabe, T., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Terakawa, N.: Interleukin-8 gene and protein expression are up-regulated by interleukin-1beta in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line. *Fertil Steril.* 79: 151-157, 2003.

6) Mukasa, C., Nomura, M., Tanaka, T., Tanaka, K., Nishi, Y., Okabe, T., Goto, K., Yanase, T., Nawata, H.: Activin signaling through type IB activin receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell- like KGN cells. *Endocrinology*, in press.

7) 足立雅広、高柳涼一、後藤公宣、柳瀬敏彦、名和田新コアクチベーター病Annual Review 2002: 66-74, 2002.

8) 柳瀬敏彦、足立雅広、高柳涼一、名和田新: 医学と医療の最前線Cofactor病日本内科学会雑誌、印刷中2003。

### 2. 学会発表

1) Okabe, T., Tanaka, T., Yanase, T., Nawata, H.: Crosstalk of intracellular signaling pathways in glucocorticoid-induced T-cell apoptosis. (symposium) The 12<sup>th</sup> Asia- Oceania Congress of Endocrinology. September 20, 2002, Taipei, Taiwan.

2) Tanaka, T., Okabe, T., Gondo, S., Nomura, M., Goto, K., Yanase, T., Nawata, H.: Crosstalk between glucocorticoid and MAPK signaling pathway in glucocorticoid- induced T-cell apoptosis. The 11<sup>th</sup> international congress of hormonal steroid. October 21-25, 2002, Fukuoka, Japan.

図 1

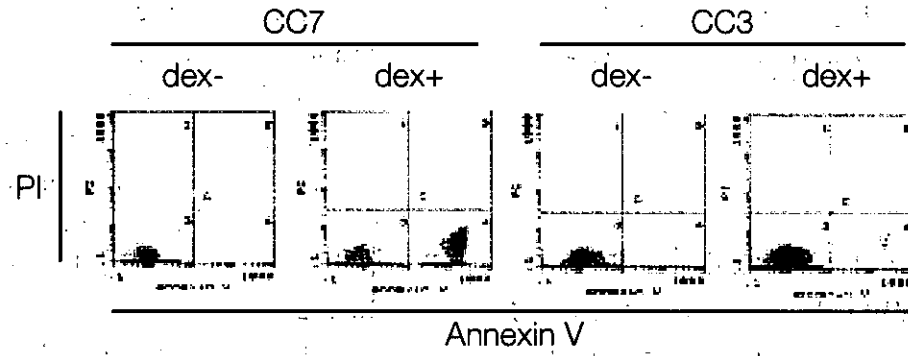
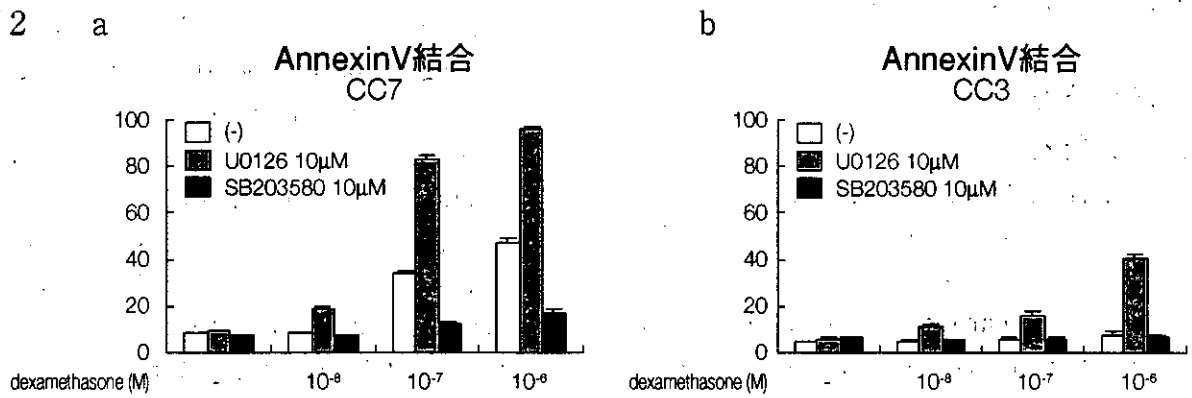
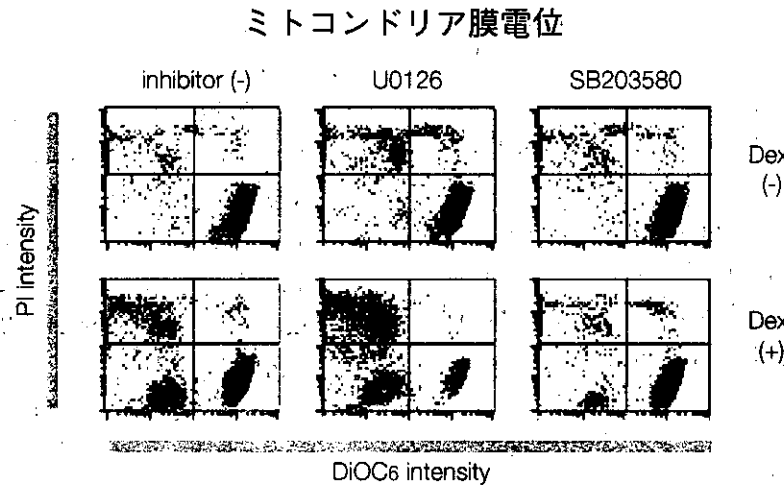


図 2



c



d

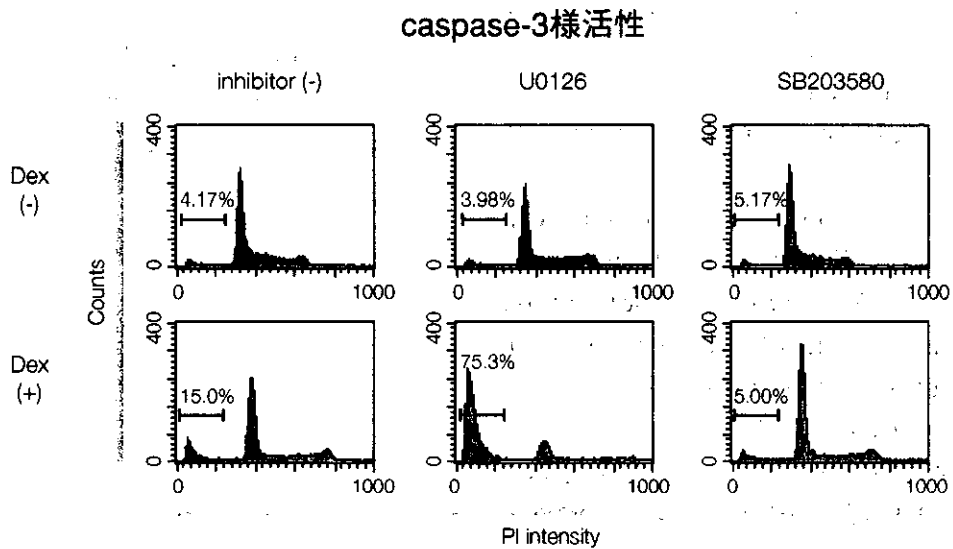


図 3

ウェスタンブロット

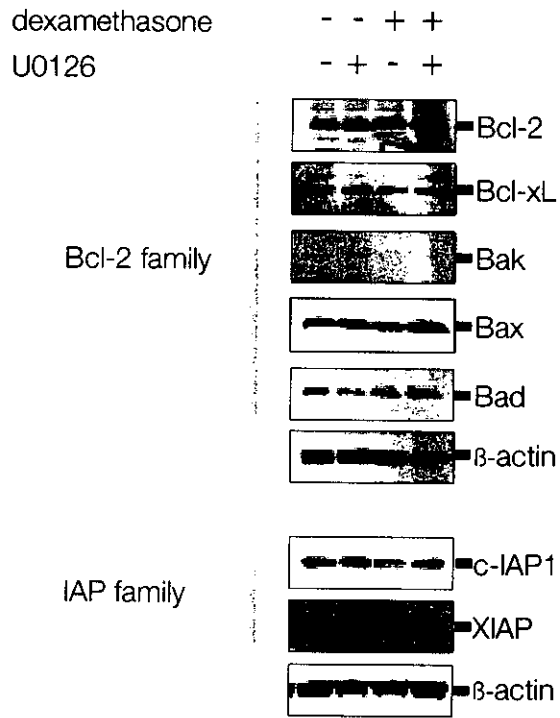


図 4

MAPKカスケード

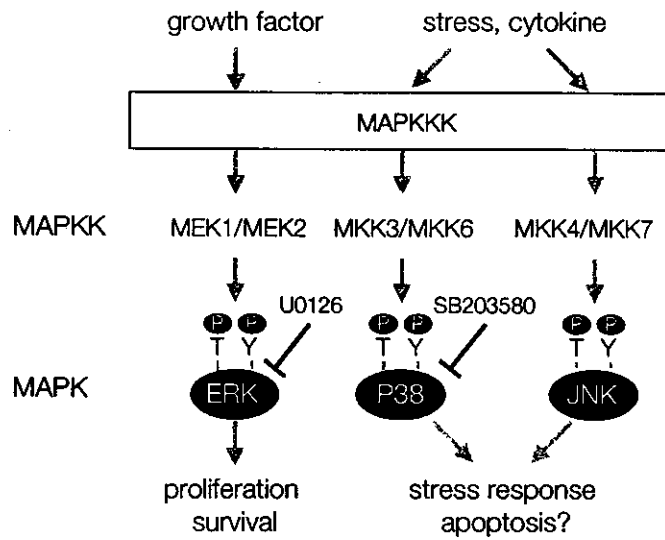
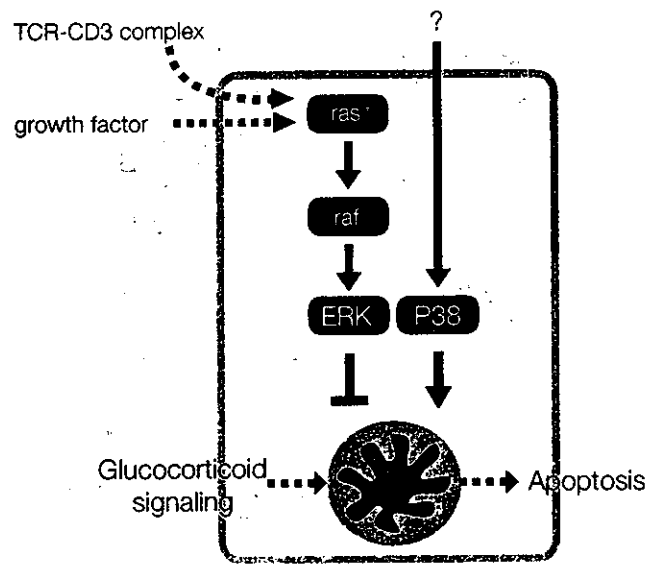


图 5



## **(2)ステロイドホルモン受容体**

# ステロイドホルモンレセプターの転写制御メカニズムの解明

加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所

## 研究要旨

以前より我々はミネラルコルチコイドレセプター(MR)の転写制御メカニズムの解明を目指してきたが、近年我々が確立した生化学的手法による核内受容体転写共役因子複合体同定法により、RHA/CBP複合体がリガンド選択的にMRのN端側AB領域に結合し転写を制御することが明らかにされた(H.Kitagawa et. al. MCB, 2002)。次に同様の方法で我々はエストロゲン受容体(ER)に結合する乳ガン増殖に関わ複合体TRRAP/GCN5複合体を同定し(J. Yanagisawa et. al. Mol. Cell 2002)、さらにビタミンD受容体(VDR)に結合する新規転写修飾因子複合体WINACを同定した(H.Kitagawa et. al. submitted)。この複合体はATP dependent chromatin remodeling complexというこれまで知られていた転写共役因子群とは異なるクラスの転写修飾因子であり、他の転写共役因子群のプロモーターへの結合を制御している。今後は様々なクロマチン構造を制御する因子群の転写における相互作用をさらに明らかにすると共にさらなる未知の転写制御因子複合体の同定を目指す。

## A. 研究目的

核内受容体の転写制御には様々な転写制御因子複合体が関与している。従ってこれまで知られていない複合体を同定し、その機能を明らかにすることが必要と考えられる。また核内受容体はリガンドが結合すると転写が活性化される上に恒常的な転写活性を有する領域AF1を持つという特徴がある。このような核内受容体の特徴を考え、核内受容体の独特の転写制御機構に迫りたいと考えている。

## B. 研究方法

### 1. タンパク質複合体精製系の確立

大量の培養細胞より核抽出液を取得し、核内受容体に結合する因子群を取得した。さらに巨大な複合体を形成している部分のみを取ってその複合体の機能を明らかにするとともに構成因子を同定した。

### 2. タンパク質同定系の発展

MALDI-TOF MSを用いたタンパク質同定法を駆使し、取得した複合体の同定を行った。同定した結果はWestern blottingにて確認した。

### 3. AF1転写共役因子複合体の同定

Baculovirusにて作成したGST融合したMRAF1タンパクをbaitとして結合する因子群を以上の方法を用いて同定し、機能解析を行った。

### 4. クロマチン制御因子の機能解析in vitro

クロマチン再構成系を立ち上げ、取得した複合体がクロマチン再構築能があるか、また構造変換機能があるかを明らかにした。

(倫理面への配慮)

使用している生物材料は培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

## C. 研究結果

### 1. MR AF1転写活性化複合体の同定

MR AF1のN末端領域に結合するこの複合体はヒストンアセチル化活性(HAT)を持つRHA/CBP複合体を同定した。

### 2. AF1を介したリガンド選択的な転写制御機構

この複合体はMRの2つの生体内リガンドの一つであるaldosterone選択的にMR AF1に結合し、転写活性を上昇させることが明らかになった(H. Kitagawa et. al. MCB 2002) (図1)。

### 3. ERに結合する乳癌増殖に関与する転写共役因子複合体TRRAP/GCN5複合体の同定

ERをbaitとしてHAT複合体であるTRRAP/GCN5複合体を同定した。この複合体はホルモン依存性癌である乳癌増殖に関与する複合体であった(J. Yanagisawa et. al. Mol. Cell 2002)

### 4. 新規転写修飾因子複合体WINACの同定

VDRに結合する新規クロマチン修飾因子複合体WINACを同定した。この複合体はウィリアムス症候群という遺伝病に関係した複合体であり、様々な解析によりこの複合体の生体内機能という面を明らかにすることができた(H. Kitagawa et. al. submitted 2002)。

### 5. クロマチンを介した転写メカニズムの解明

in vitroのクロマチン再構築系を作成することにより、WINACがクロマチンを再構築し、さらにVDR依存的にクロマチン構造を変換する機能を有することが明らかになった(図2)。

## D. 考察

転写共役因子群は近年complexを形成しており、それらをcomplexごととってることが重要と考えられている。今回我々が確

立した生化学手法を用いることにより、まだまだ未知の機能を持った転写修飾因子複合体が取得できると考えられる。また今後は様々な複合体同士の相互作用の解明が必要となり、目下我々が取り組んでいるin vitroのクロマチン再構築系などが必要になってくると考えられる。

## E. 結論

MRのAF1に結合するRHA/CBP複合体を同定した。この複合体はMR全長においてはリガンド選択的に(aldosterone selective)にMRの結合することから、生理作用との関連が注目される。一方ERに結合するTRRAP/GCN5複合体、VDRに結合する新規クロマチン構造修飾因子複合体WINACを同定し、核内受容体を介する新しい転写制御機構を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Furutani, T., Watanabe, T., Tanimoto, K., Hashimoto, T., Koutoku, H., Kudoh, M., Shimizu, Y., Kato, S., Shikama, H.: Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 779-784, 2002.
- 3) 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 TFIIA-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 9, 553-562, 2002.
- 4) Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., Kato, S.: Andro-



gen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron*, 35, 855-864, 2002.

5) 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 $\gamma$  function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 2003 (in press).

6) 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.

7) Kato, S.: Androgen receptor structure and function from Knock-out Mouse. *Clin Pediatr Endocrinol*, 11, 1-7, 2002.

8) Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K.: Molecular Genetics of Vitamin D-Dependent Hereditary Rickets. *Hormone Research*, 57, 73-78, 2002.

9) Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato, S.: Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3698-3706, 2002.

10) 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.

11) Sakaue, H., Konishi, M., Ogawa, W., Asaki, T., Mori, T., Yamasaki, M., Takata, M., Ueno, H., Kato, S., Kasuga, M., Itho, N.: Requirement of fibroblast

growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes & Development*, 16, 908-912, 2002.

12) 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.

13) 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.

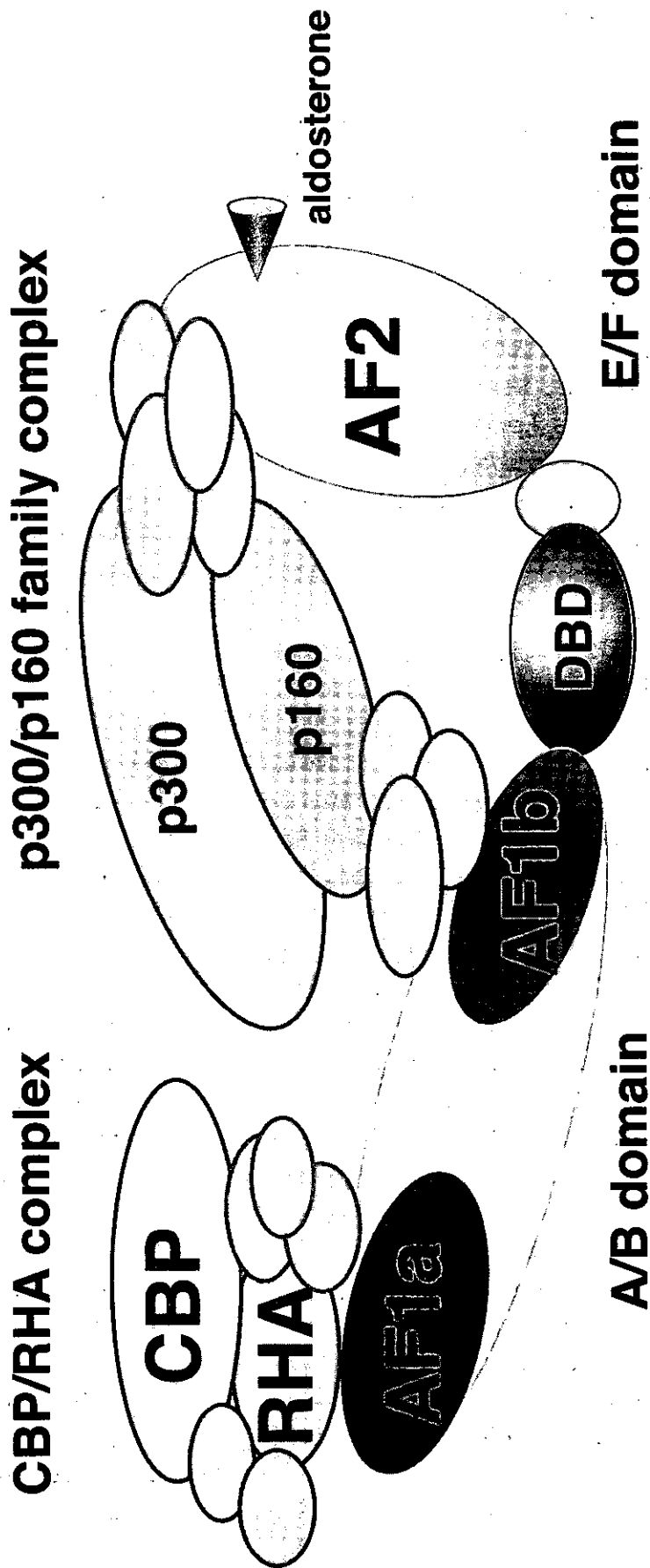
14) Mailleux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillion, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dichson, C., Thiery, J. P., Bellusci, S.: Role of FGF 10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, 129, 53-60, 2002.

15) 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.

16) 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.

17) 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 b 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.

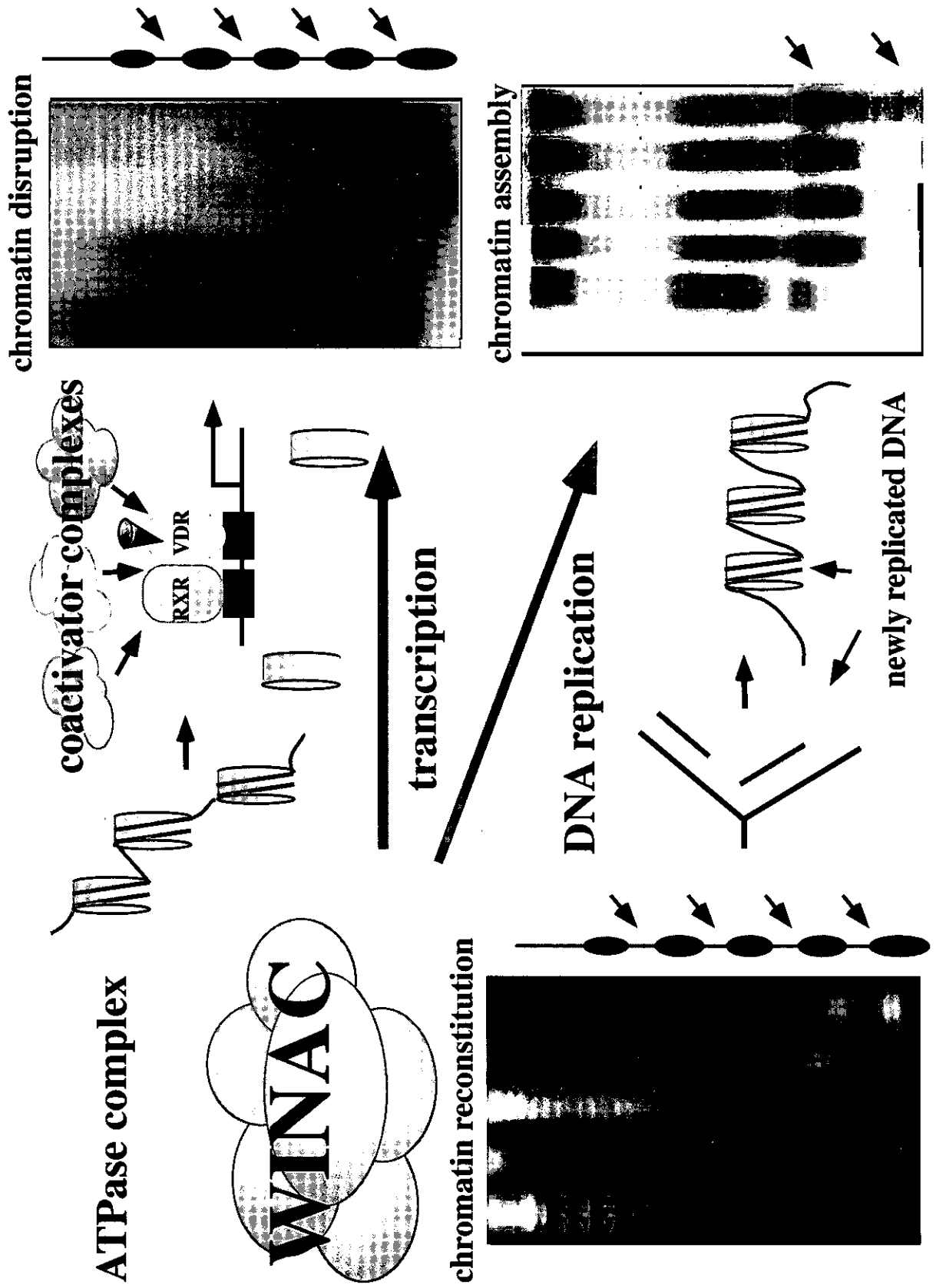
図1 RHA/CBP複合体を介したMRの転写制御メカニズム



**Mineralocorticoid Receptor**

*H.Kitagawa et.al. Mol.Cell Biol. vol. 22 (11), 2002*

図2 新規クロマチン構造変換複合体WINACの機能



# グルココルチコイド受容体 (GR) による 転写活性化に対する Tob タンパク質の作用の解析

高柳 涼一

九州大学大学院医学研究院老年医学

## 研究要旨

Tobタンパク質は細胞増殖抑制活性があり、核内受容体のコアクチベータに共通のLXXLLモチーフを有している。このTobタンパク質のグルココルチコイド受容体(GR)の転写活性化に対する影響を、骨芽細胞においてルシフェラーゼ活性を指標に調べたところ、量依存的にリガンド依存性のGRの転写活性化を抑制した。しかしながら、LXXLLにアミノ酸置換を導入した変異Tobタンパク質も野生型と同様の転写活性化抑制作用を認めた。Tobタンパク質は骨芽細胞や免疫系細胞においてステロイドホルモンの作用を制御している可能性がある。

## A. 研究目的

最近我々は骨形成に深く関与しているTobタンパク質が性ステロイド受容体を介する転写活性化を抑制することを見出した。今回の研究では、Tobタンパク質のGRによる転写活性化機構に対する効果について、主に骨芽細胞株で検討する。骨芽細胞におけるグルココルチコイドの作用を制御するタンパク質の解析は、ステロイド骨粗鬆症の発症機序の解明にも繋がること期待される。

## B. 研究方法

1. GR応答配列を有するMMTVプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドDNAをレポーター遺伝子として、骨芽細胞株MC3T3-E1細胞でGR $\alpha$ とTobを共発現させて、デキサメサゾン処理を行い、TobのGRを介する転写活性化に対する効果を調べる。
2. グルココルチコイド受容体(GR $\alpha$ )と、蛍光タンパク質であるGFPとの融合蛋白質(GR $\alpha$ -GFP)、並びに別の蛍光タン

パク質であるYFPとTobの融合タンパク質(Tob-YFP)を、骨芽細胞に導入して、リガンド添加後の融合タンパク質の細胞内動態を経時的に観察する。

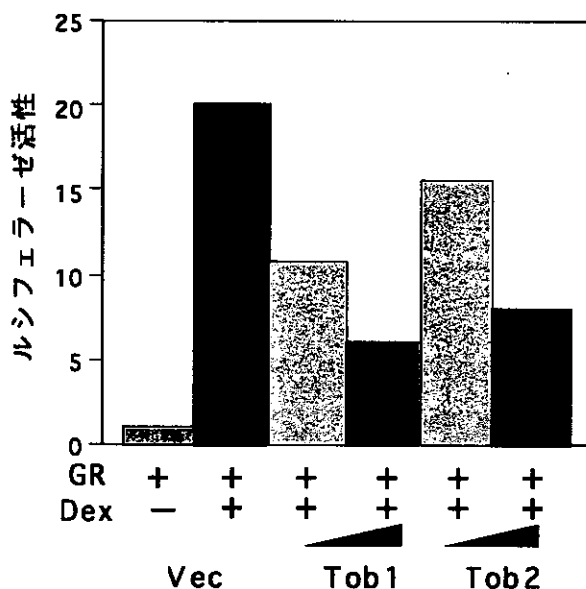
## (倫理面への配慮)

今回の実験では、広く用いられている培養細胞株を使った実験であり、倫理上特に問題はないものと考えられる。

## C. 研究結果

1. 骨芽細胞株MC3T3-E1細胞において、GR応答配列を有するプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたプラスミドDNAをレポーター遺伝子としてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、デキサメサゾン処理で約20倍の転写活性化を認めた。この系にTobタンパク質(Tob1およびTob2)を発現させると、量依存的にGRを介する転写活性化を抑制することが明らかになった。(図1)

図1 Tobタンパク質によるグルココルチコイド受容体を介する転写活性化の制御



Tobタンパク質は核内受容体の転写共役因子に共通のLXXLLを有しているが、このモチーフに変異を持つTobタンパク質を作成してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、野生型と同程度の転写抑制効果を認めた。

2. Tobと蛍光タンパク質YFPとの融合タンパク質(Tob-YFP)を発現させるためのcDNAコンストラクトを作製した。

#### D. 考察

同じステロイドホルモン受容体であるアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体を介する転写活性化に関しても、Tobタンパク質はGRの場合と同様に抑制的に働く。最近の報告では、Tobが静止期のT細胞で強く発現しており、Tobを強制発現させると、T細胞の増殖抑制、およびサイトカインやサイクリンの転写の抑制を認めた。以上の結果から、Tobタンパク質は、骨芽細胞や免疫系細胞においてステロイドホルモンの作用を制御している可能性がある。

#### E. 結論

骨芽細胞においてTobタンパク質はステ

ロイドホルモン受容体を介する転写活性化を抑制した。この転写活性化の抑制にはTobタンパク質の持つLXXLLモチーフは関与しないことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nawata, H., Goto, K., Morinaga, H., Yanase, T., Yanagisawa, J., Kato, S., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R.: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Sciences* 9: 57-70, 2002.

2) Takayanagi, R., Goto, K., Suzuki, S., Tanaka, S., Shimoda, S., Nawata, H.: Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a possible source for estrogen formation in bone cells: correlation between bone mineral density and serum DHEA-sulfate concentration in postmenopausal women, and the presence of aromatase to be enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblasts. *Mech Ageing Dev* 123: 1107-1114, 2002.

3) Saito, M., Takayanagi, R., Goto, K., Fukamizu, A., Tomura, A., Yanase, T., Nawata, H.: The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: A three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16: 694-706, 2002.

4) Zhao, Y., Goto, K., Saitoh, M., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R., and Nawata, H.: Activation Function-1 Domain of Androgen Receptor Contributes to the Interaction

between Subnuclear Splicing Factor Compartment and Nuclear Receptor Compartment. *J. Biol. Chem.*, 277: 30031-30039, 2002.

## 2. 学会発表

1) 河手久弥、呉茵、大中佳三、高柳涼一、名和田 新：アンドロゲン受容体による転写活性化に影響を及ぼすTobファミリータンパク質、西日本骨・関節関連疾患懇話会、福岡、平成14年7月20日。

2) Takayanagi, R.: Three-dimensional imaging study of androgen receptor and co-regulators, First Asia-Pacific Forum on Andrology. Shanghai, China, Oct. 20, 2002.

3) Kawate H., Wu Y., Ohnaka K., Nawata H., Takayanagi R, Tob family proteins modulating androgen receptor-dependent transcriptional activation. International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer, Fukuoka, Oct. 21-25, 2002.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# SWI/SNF クロマチン構造変換因子の視点に立った、 ステロイドホルモンの生理作用と副腎皮質上皮癌の解析

伊庭 英夫

東京大学 医科学研究所 感染免疫大部門

## 研究要旨

本研究では、エストロゲンの生理作用の多様性の多くが、クロマチン構造変換因子であるSWI/SNF複合体を巡って転写制御因子AP-1と複雑に相互作用しあう結果生ずる事が示唆された。さらに本研究ではBRG1、Brm両触媒サブユニットを欠くためにこの複合体が機能を失っていると考えられてきたSW13細胞は、実際には正常なBRG1、Brm遺伝子を保持し、しかもこの両遺伝子を恒常的に転写していることが示された。さらに通常のSW13細胞株は、これらの機能的mRNAを合成するSW13(vim+)と一切合成しないSW13(vim-)というepigeneticalに異なる2つのサブタイプから構成され、各サブタイプはクローニング後も安定してその形質を保持した。さらにその制御はpost-transcriptionのレベルで切り換えられることが示された。

## A. 研究目的

副腎で分泌される多種のステロイドホルモンの生理作用は主としてその受容体タンパク質を介しているものと考えられるが、これらの転写制御因子とは別のグループに属する転写制御因子AP-1 (Fosファミリータンパク質とJunファミリータンパク質から形成される)との間に見られる相互排他的な抑制作用や相互の協同作用等細胞型に依存した多様な生理作用の発現に大きく関与するものと考えられる。本研究は転写制御因子AP-1とエストロゲンレセプター(ER)を例に取り、両者の転写活性化に共通して関与するクロマチン構造変換因子、SWI/SNF複合体に注目して生理作用の多様性解明をめざす。またある種の副腎皮質上皮癌細胞株において、機能的なSWI/SNF複合体を欠失する場合が知られていたが、この細胞株がもつ特異な性質の分子基盤の解明をめざす。

## B. 研究方法

### 1. AP-1とERの転写活性化とクロマチン構造変換因子、SWI/SNF複合体

我々はすでに酵母twoハイブリッド法を用いてc-Junの転写活性化ドメインと結合する遺伝子を検索し、クロマチン構造変換因子SWI/SNF複合体の1つのサブユニットであるBAF60aを検出した。これはc-Junと強く結合するものの、その他のJunファミリータンパク質であるJunBやJunDとの結合性は弱い。また驚いたことにFosファミリータンパク質の中ではc-Fosタンパク質とのみ結合活性を有し、c-Fos/c-Junダイマーを同時に結合できることがわかった。これまでの成果からこの複合体がBAF60aと特定のFos/Junダイマーの相互作用により不活性なクロマチン上にあるAP-1結合配列に動員され、これがAP-1の転写制御活性の決定因子として機能することを実証した。GRやERもSWI/SNF複合体がその転写活性化に

関わっている事が知られることから、これらの核内レセプターがAP-1(この場合はc-Fos/c-Jun)とこのクロマチン構造変換因子を競合しあっているか否かを検討し、相互抑制機構に関わる可能性を追求した。

## 2. 副腎皮質上皮癌細胞、SW13が示す形質転換

クロマチン構造変換因子SWI/SNF複合体はその触媒サブユニットとしてBRG1とBrmのいずれか一方を含むが、ヒトadrenal adenocarcinoma由来のSW13細胞株では両タンパク質の発現が検出されないと報告されている。このtrithorax-Gから構成される「細胞の記憶」を担う重要な複合体が機能しないことから、SW13細胞では遺伝子発現がエピジェネティカルに不安定になっている可能性がある。事実この細胞株には、vimentinを発現している細胞(SW13(vim+))と発現していない細胞(SW13(vim-))が混在していること、それらは限界希釈法によるクローニングによって分けることが可能であった。本研究ではこの2つのサブグループに注目し、BRG1、Brmの発現制御と細胞の形質との関連を追及した。

## C. 研究結果

### 1. AP-1とERの転写活性化とクロマチン構造変換因子、SWI/SNF複合体

ER $\alpha$ は*in vitro*においてBAF60aとエストロゲン(E2)依存的に結合しER $\beta$ は非依存的に結合した。ステロイドホルモン受容体のリガンド結合領域と結合する多くのタンパク質が共通して持つモチーフであるLXXLL配列がこのBAF60a中に2ヶ所見いだされることから、ERに対する結合領域の候補として解析する事にした。これらを単独およ

び共々欠失した変異体は、ERに対する結合性とそのリガンド依存性をそれぞれ複雑に変えたばかりか、いずれもc-Fos/c-Junに対する結合活性を完全に失っていた。

### 2. 副腎皮質上皮癌細胞、SW13が示す形質転換

SW13をクローニングによりSW13(vim+)とSW13(vim-)に分離したところ、その表現型は継代を繰り返しても長期に安定で、SW13(vim-)クローンはいずれもBRG1とBrmの発現が検出されなかった。しかしSW13(vim+)ではいずれのクローンでもこれらの発現が認められた。このSW13(vim-)にBRG1またはBrmを強制発現させると、どちらの遺伝子を導入してもvimentinのmRNAの発現が誘導された。これらの観察と、vimentinがAP-1の制御を受ける代表的な遺伝子であることを考慮すると、SW13細胞はBRG1とBrmタンパク質の発現の有無によって、下流の様々な遺伝子群の発現を転写レベルで総括的に制御していると考えられる。そこでSW13(vim-)における、BRG1、Brmの発現抑制の機構を追求した。SW13(vim-)にDNAメチル化阻害剤、HDAC阻害剤等を添加するとBRG1、Brmの発現が回復し、これらの発現は薬剤を除いた後も維持されることから、SW13(vim-)ではこれらの遺伝子には変異があるわけではないと考えられる。さらに、SW13(vim-)もSW13(vim+)と同様にBRG1とBrmの転写開始と伸長が認められ、SW13(vim-)ではBRG1、Brmが転写後に負に制御を受けている可能性が示された。これらの結果からSW13(vim-)とSW13(vim+)は遺伝的に異なるわけではなく、BRG1、Brmの転写後の抑制とその解除によって形質が転換していると



考えられる。

#### D. 考察

*in vitro*で見られたERとAP-1の相互作用の様式はER $\alpha$ とER $\beta$ で異なり、これが両受容体がAP-1に対して示す、作用の違いを示す可能性がある。現在ER $\alpha$ とER $\beta$ のうち一方のみの発現しか見られない培養株を作って、*in vivo*における相互作用の様式とステロイドホルモンの生理作用の相関を今後解析する必要がある。またSW13細胞株が2つのsubtypeの混合物であること、そしてこのsubtype間をまれにtransitionする可能性があることは、発癌におけるエピジェネティクス制御の機構解析の重要性を示している。

#### E. 結論

本研究では、エストロゲンの生理作用の多様性の多くが、クロマチン構造変換因子であるSWI/SNF複合体を巡って転写制御因子AP-1と複雑に相互作用しあう結果生ずる事が示唆された。さらに本研究ではBRG1、Brm両触媒サブユニットを欠くためにこの複合体が機能を失っていると考えられてきたSW13細胞は、実際には正常なBRG1、Brm遺伝子を保持し、しかもこの両遺伝子を恒常的に転写していることが示された。さらに通常のSW13細胞株は、これらの機能的mRNAを合成するSW13(vim+)と一切合成しないSW13(vim-)というepigeneticalに異なる2つのサブタイプから構成され、各サブタイプはクローニング後も安定してその形質を保持した。さらにその制御はpost-transcriptionのレベルで切り換えられることが示された。この成果は癌の発症、進展、多様性におけるepigenetics制御の重要性を示唆する。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ito, T., Yamauchi, M., Nishina, M., Yamamichi, N., Mizutani, T., Ui, M., Murakami, M. and Iba, H.: Identification of SWI/SNF complex subunit BAF60a as a determinant of transactivation potential of Fos/Jun dimers. *J. Biol. Chem.* 276(4): 2852-2857, 2001.
- 2) Fang, S-H., Chiang, B-L., Wu, M-H., Iba, H., Lai, M-Y., Yang, P-M., Chen, D-S. and Hwang, L-H.: Functional measurement of hepatitis C virus core-specific CD8+ T-cell responses in the livers or peripheral blood of patients using autologous peripheral blood mononuclear cells as targets or stimulators. *J. Clin. Microbiol.* 39(11): 3895-3901, 2001.
- 3) Koike, C., Mizutani, T., Ito, T., Shimizu, Y., Yamamichi, N., Kameda, T., Michimukai, E., Kitamura, N., Okamoto, T. and Iba, H.: Introduction of wild-type patched gene suppresses the oncogenic potential of human squamous cell. *Oncogene* 21:2670-2678, 2002.
- 4) Mizutani, T., Ito, T., Nishina, M., Yamamichi, N., Watanabe, A., and Iba, H.: Maintenance of integrated proviral gene expression requires Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* 277:15859-15854, 2002.
- 5) Shimizu, Y., Yamamichi, N., Saitoh, K., Watanabe, A., Ito, T., Nishina, M., Mizutani, M., Yahagi, N., Suzuki, T., Sasakawa, C., Yasugi, S., Ichinose, M. and Iba, H.: Kinetics of v-src-induced epithelial-mesenchymal transition in developing glandular stomach. *Oncogene*. in press.
- 6) Kameda, T., Nakata, A., Mizutani, T., Terada, K., Iba, H. and Sugiyama, T.: Analysis of the cellular heterogeneity in the basal layer of mouse ear epidermis: an approach from partial de-

composition in vitro and retroviral cell marking in vivo. *Exp Cell Res.* in press.

7) Iba, H., Mizutani, T. and Ito, T.: SWI/SNF chromatin remodeling complex and retroviral gene silencing. *Reviews in Medical Virology.* in press.

8) Yamamichi-Nishina, M., Ito, T., Mizutani, T., Yamamichi, N., Watanabe, H. and Iba, H.: SW13 cells can transition between two distinct subtypes by switching expression of BRG1 and Brm genes at the post-transcriptional level. *J. Biol. Chem.* in press.

# グルココルチコイドレセプターのリガンド結合領域の 多様な調節機構に関する研究

田中 廣壽<sup>1, 2</sup>、吉川 賢忠<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野

<sup>2</sup> 東京大学医科学研究所附属病院 内科

## 研究要旨

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドは各々のレセプターであるグルココルチコイドレセプター (GR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) に結合しその作用を発現させるが両ホルモンの作用には redundancy が存在する。合成グルココルチコイドであるコルチバゾール (CVZ) は、MR とは結合せず、GR にきわめて特異的リガンドである。GR のリガンド結合領域の構造と機能に与えるリガンドの影響を検討した結果、CVZ は他のアゴニストとは異なった様式でかかる領域に結合することが推定された。以上の成果は GR 特異的リガンド開発の分子基盤を構築する上で重要と考えられる。

## A. 研究目的

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドは各々のレセプターであるグルココルチコイドレセプター (GR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) に結合しその作用を発現させる。しかし、前者は MR に、後者は GR にも結合可能であり、GR、MR ともに同じ DNA 配列 GRE/MRE に結合することから両ホルモンの作用には redundancy が存在する。生体においては、ミネラルコルチコイドであるアルドステロンの血中濃度は低く、MR 発現組織には多くの場合、グルココルチコイドであるコルチゾールを不活化する酵素  $11\beta$ -HSD2 が発現しているため、ミネラルコルチコイドは MR を介して作用を発現する。しかし、脳、心などの  $11\beta$ -HSD2 の発現の少ない組織では必ずしもこの機構が働かないと考えられており、グルココルチコイドとミネラルコルチコイドの作用がいかに制御されているかは不明である。かかる問題の解決はこれらのホルモンが過剰な病態の理解

や、薬理量投与時における副作用の発生機構の解明にきわめて重要であるが、各々のレセプター特異的リガンドは知られておらず、きわめて立ち後れている。合成グルココルチコイドであるコルチバゾール (CVZ) は、ステロイド D 環 C21 位にアセチロキシメチル基を、A 環にピラゾール基を配したアゴニストであり、GR に対して 2 つの解離定数を有する。ヒツジにおいて、CVZ 投与後、血清あるいは尿中電解質は影響を受けないが、血圧は他のアゴニストの場合と同様に上昇することが知られている。したがって、CVZ は、MR とは結合せず、GR 特異的リガンドである可能性がある。そこで、GR、MR の機能に与える CVZ の作用を他のリガンドと対比して検討し、CVZ の GR 特異性とその機構を明確にし、レセプター特異的リガンドの分子基盤を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

リガンド結合実験は、放射性標識した合成グルココルチコイド、デキサメタゾン DEX ならびにアルドステロン ALD を用いて行った。GR をはじめとした核内レセプターの細胞内局在は、免疫蛍光抗体法、green fluorescent protein (GFP) 融合タンパク発現系を用いて検討した。GR の転写活性化作用は GRE/MRE 配列の下流にルシフェラーゼの cDNA を有するレポータープラスミドを用いたトランジェントトランスフェクションによって測定した。GR のタンパク分解酵素による限定分解は、試験管内で 35S 標識した GR をトリプシンによって消化後、SDS-PAGE によって解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究は試験管内実験および培養動物細胞を用いたものであり、その意味において倫理面への配慮は特に必要無いものと考えられる。なお、遺伝子組み換え実験に関して機関承認を得ていることを付記する。

## C. 研究結果

1. COS7 細胞に GR あるいは MR を発現させ、GR と DEX、MR と ALD の結合に対する CVZ を含む各種リガンドの影響を検討した結果、CVZ は MR と ALD の結合には影響を与えず、GR と DEX の結合を DEX と同程度に阻害した。すなわち、CVZ は GR に特異的に結合する可能性がある (図 1)。
2. GR と MR を、各々、GFP 融合タンパクとして COS7 細胞に発現させ、その細胞内局在に与える各種リガンドの影響を検討した結果、やはり、CVZ は GR のみを核に移行させた (図 2)。
3. COS7 細胞におけるレポーター遺伝子を用いた転写活性の解析においても、CVZ は GR 存在下でのみ GRE/MRE 応答性遺伝子の発現を誘導した (図 3)。以上から、CVZ はきわめて GR に特異的なリガ

ンドであるといえる。

4. CVZ の GR 特異性の分子基盤を明確にするため、各種 GR 変異体を用いて実験を行った。C 末端のアミノ酸を欠失した GR 変異体を用いた場合、古典的アゴニストであるコルチゾールは 775 番目以降、DEX は 766 番目以降のアミノ酸を欠失させた場合、かかる GR 変異体の核移行を誘導し得なかった。一方、CVZ は、1-765 変異体をも核移行させ、転写活性をも誘導し得た (表)。ここで、helix12 にアミノ酸変異を導入した GR (L753F) において、DEX と CVZ はいずれも核移行を誘導したが、転写活性は CVZ によってのみ誘導された (図 4)。転写共役因子 TIF2 との colocalization assay の結果、これらのリガンドの働きの違いは、TIF2 との相互作用を前者は誘導せず、後者は野生型と同様に誘導するためと考えられた (図 5)。

5. 野生型あるいは変異 GR の立体構造に与えるリガンドの影響をトリプシンを用いた限定分解実験により解析した。野生型に関して、DEX と CVZ 存在下ではいずれも類似の分解パターンを呈じた。一方、1-765 変異体、あるいは GAL4-LBD499-765 を用いた場合、DEX では低濃度のトリプシン存在下で消化された。ここで、CVZ 存在下ではこれらの変異体を用いた場合も LBD に相当する領域が保護された (図 6)。

## D. 考察

GR の LBD は各種リガンドと結合した後コンフォメーション変化を起こすと考えられている。その結果、TIF2 などの転写共役因子との相互作用が可能となり、標的遺伝子の転写を活性化する。今回、CVZ はきわめて GR 特異性の高いリガンドであることが確