

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)が発症することが知られている。SBMA は男性特異的に下位運動ニューロンの退縮により最終的に致死となる神経変性疾患であり、中年以降に発症し高齢に伴い重篤化する。しかしながら、男性特異的な発症機構や加齢に伴う病態悪化の分子機構は不明であった。これまでに我々は SBMA のアンドロゲン依存的な AR の構造変換が神経変性誘導を生じることを世界に先駆け報告してきた。さらに最近ではポリグルタミン伸長異常による神経変性誘導は転写機構の破綻が深く関わっていると示唆され、加齢に伴う神経変性機構解明には転写制御レベルの分子機構解析のアプローチは非常に重要であると考えられる。

そこで本研究は ER α 、AR の転写活性能を指標とした既知および新規転写共役因子の同定・機能解析ならびにポリグルタミン伸長異常による神経変性誘導の分子作用機構解明を目的とした。これまでの生化学的なアプローチでは同定困難である複合体群の構成因子および神経変性制御因子を標的として、分子遺伝学の発達したショウジョウバエを用いた分子遺伝学的アプローチにより、様々な遺伝子変異個体から新規標的分子を試みた。既にヒト ER α 、AR 遺伝子およびこれらのレポーター遺伝子を発現導入したショウジョウバエ個体を構築し、様々な組織で転写活性を発揮することを確認済みである。これらモデル個体による分子遺伝学的に得られた知見を礎に生化学的解析によりステロイド作用機構を把握すると共に、神経変性亢進と老化の因果関係を明確にしたいと考える。

B. 研究方法

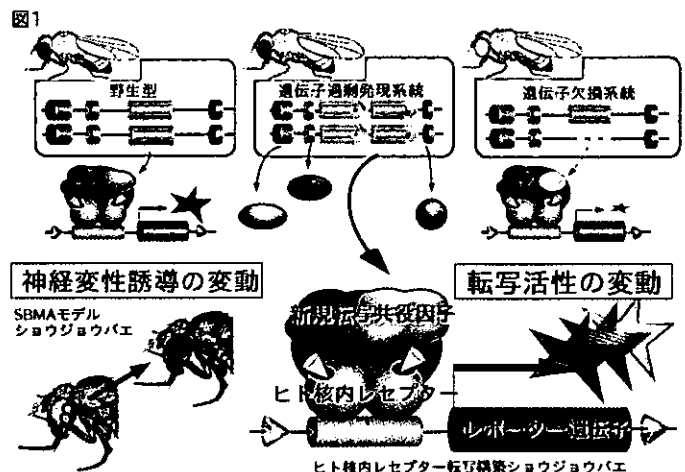
本研究はショウジョウバエ分子遺伝学を用いた以下 4 つの独立した機能解析系を構築し遂行した。

(1) ER α および AR 既知転写共役因子の分子遺伝学的相互作用解析

ER α 、AR ならびにこれらの変異体遺伝子をそれぞれ GAL4 応答遺伝子配列下流に構築したショウジョウバエを作出後、組織・時期特異的に発現する GAL4 系統と掛け合わせ特異的に発現させた。さらにこれらレセプターの認識応答配列 ARE と ERE の下流に構築した GFP を転写活性評価のレポーターとなるトランスジェニックバエを作出した。最終的にこれら遺伝子を同一個体に導入し、全長ならびに AF-2 のリガンド依存的な転写活性を、AF-1 のリガンド非依存的な転写活性を検出した。これら転写活性は三齢幼虫種々器官や卵母細胞においてレセプター発現特異的に認められた。これらの結果はショウジョウバエ内在性転写共役因子がこれらレセプター転写活性を惹起すると予測された。そこで、既知ヒト転写共役因子のハエホモログ遺伝子欠損変異体(CBP, p160, TRAP80, TRAP100)を用いて、転写活性能を検討した。これらの解析系はヘテロ接合体であるため dsRNAi 法により同様に転写活性能を確認した。

(2) ER α および AR 新規転写共役因子の分子遺伝学的探索

ER α および AR 発現ショウジョウバエを用いた転写共役因子群の分子遺伝学的な探索は数千種におよぶ各種遺伝子変異型ショウジョウバエとの交配により核内レセプター転写活性能の変動を指標に網羅的な探索を行った(図 1)。転写強弱を示したハエ変異体から変異遺伝子を同定

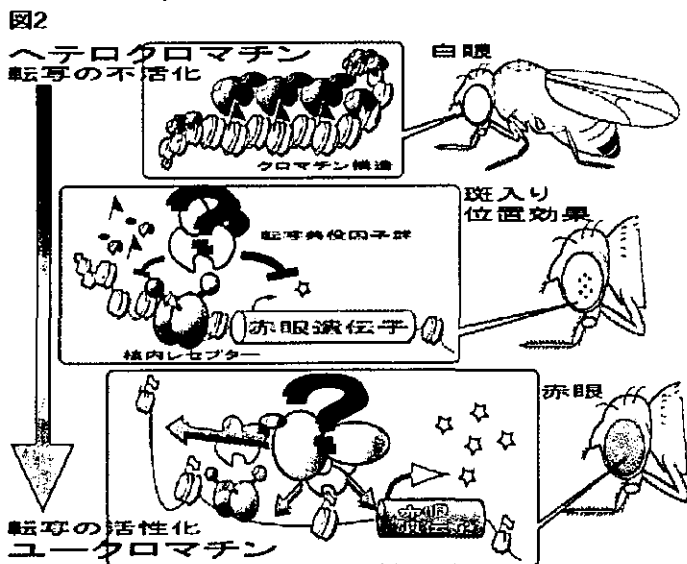


した後、相同性の高いヒトホモログ遺伝子を単離した。単離した遺伝子は HEK293T 細胞において ER α および AR と同時に過剰発現させ、それぞれレセプターの転写活性能をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

(3) 染色体構造変換を介した転写共役因子の機能解析系の構築

転写共役因子の染色体構造調節機能を指標に個体レベルで遺伝子同定する手法には、ショウジョウバエで唯一、ヘテロクロマチンおよびユークロマチン状態と転写頻度との相関関係を示す Position Effect Variegation (PEV) 解析が可能である

(図 2)。取得因子の機能には転写開始や終息因子をはじめ転写伸長、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング等機能を単離できると推測される。ER α および AR 応答配列を含む GFP レポーター遺伝子を様々な染色体領域に導入した。これらレポーター遺伝子がヘテロクロマチンおよびユークロマチンへ挿入したことを確認後、レセプターによる転写活性能の変動を確認した。さらにこの条件下、既知転写共役因子変異体による転写活性能の影響を検討し、転写開始の必要性を検討した。



(4) アンドロゲン依存的神経変性発症の分子機構解明

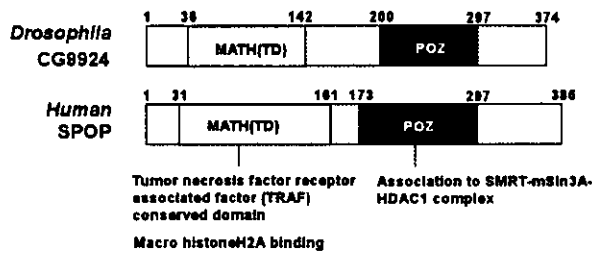
アンドロゲン依存的に神経変性を誘導する SBMA モデルショウジョウバエ複眼での神経変性を指標に神経変性制御因子の探索、性状解析が可能となる(図 1)。また加齢に伴い変性状態が亢進する表現系は、老化による神経衰退機構を解明する手掛かりになると期待される。そこで約 1000 系統の遺伝子変異体と SBMA モデルショウジョウバエとを交配し、個眼細胞における神経変性を指標に遺伝子を検討した。単離した遺伝子は AR への特異性を検討するためポリグルタミン伸長異常した AR との直接的相互作用を確認した。

C. 研究結果

1. 発生時期や組織特異的に発現させた ER α 、AR はリガンド依存的に転写を亢進させた。次にリガンド非依存的な転写活性化領域(AF-1)およびリガンド依存的転写活性化領域(AF-2)の転写活性も哺乳動物細胞様の活性を持つことを確認した。そこでこれらレセプター転写活性を司るショウジョウバエ既知転写共役因子を検索した。既知転写共役因子のショウジョウバエホモログ CBP、p160 および TRAP80、100 の機能欠失変異体では著しく転写活性が抑制され、一方過剰発現変異体は転写を亢進させた。さらに卵母細胞において dsRNAi により転写活性能が抑制されることを確認した。

2. ER α および AR 発現ショウジョウバエによる新規転写共役因子群の探索により、転写制御共役因子と示唆される遺伝子を複数同定した。中でも RNA binding protein は数多く同定された。一方、転写変動が顕著に認められた l(3)s84507(CG9924) および l(3)s23617(CG7008) に着目した。CG9924 は MATH(TD) および BTB/POZ domain が保存された核内タンパクでヒト SPOP と高い相同性を示す(図 3)。SPOP の MATH domain は TRAF-1,6 や TNFR と直接相互作用し、その下流のシグナル

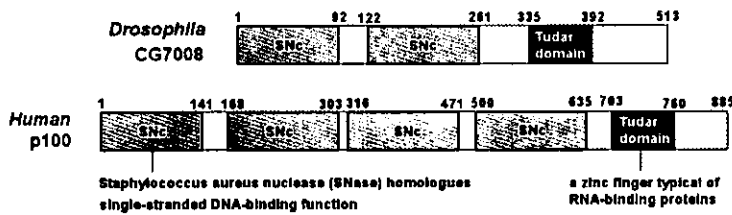
図3 CG9924 とヒト SPOP 遺伝子との比較



を制御している。一方、BTB/POZ domain は SMRT-mSin3A-HDAC1 の複合体と相互作用し、X 染色体不活性化領域の標的となるヒストンの macroH2A1.2 とも結合し、転写抑制化制御に関与すると示唆されている。

CG7008 は SNeC および Tudar domain が保存され、そのヒトホモログは p100 に相当する (図 4)。p100 は Tudar domain

図4 CG7008 とヒト p100 遺伝子との比較



を介して RNA 結合タンパクへ相互作用し、RNA の transport や metabolism を制御する。また STAT6 の転写活性化共役因子として機能することが知られている。そこでこれら p100 および SPOP における転写活性能を 293T 細胞でルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、ER α AR の転写活性能において p100 は転写抑制を示し、SPOP は転写増強が認められた。この結果からこれら分子が核内レセプター転写を制御する可能性が強く示唆された。

3. ER α および AR 応答配列を含む GFP レポーター遺伝子をヘテロクロマチンおよびユークロマチンへ挿入したショウジョウバエを作出した。その結果、それぞれレセプターによる転写活性能はクロマチン状態により変動し、ヘテロクロマチン状況下では転写抑制され、ユークロマチン状況下では転写促進した。そこでこ

れら状況下における既知転写共役因子の機能解析を行った。その結果、CBP 変異体におけるヘテロクロマチン条件下での転写活性能は増強した。すなわち CBP は標的遺伝子のクロマチン状態において異なる転写制御能を発揮することが示唆された。

4. アンドロゲン依存的神経変性制御因子を探索した結果、約 1200 line 中 73 lines が神経変性を促進あるいは抑制することを見出した。中でもユビキチン化およびヒストン修飾に関与する遺伝子欠失変異体が大半を占めていることを見出した。またヒストンメチル化修飾因子 Ash1 機能欠失変異体では神経変性が顕著に改善した。Ash1 は PHD finger、Bromo domain、SET domain をもつヒストンメチル化修飾酵素でヒストン H3 の K4 と K9 およびヒ

ストン H4 の 20 をメチル化し転写を活性化することが知られている。そこで Ash1 と AR の直接的相互作用を確認するため、GST pull-down アッセイを行った。その結果、Ash1

がリガンド依存的にポリグルタミン伸長異常型 AR と結合することを見出した。

D. 考察

本研究はショウジョウバエの分子遺伝学を駆使した解析系を構築し、機能遺伝子を同定・性状解析した。現在ヒトとショウジョウバエの機能遺伝子は解読済みであり、その構造・機能ともに高く保存されていることが判明している。従ってショウジョウバエ中で機能するヒト ER α および AR は性ステロイドホルモン作用機構を分子遺伝学的に解析できるツールとなり、標的遺伝子のクロマチン構造を考慮した解析系には格好のモデル個体と言える。既知転写共役因子でありヒストンアセチル化修飾し転写を活性化すると考えられてきた CBP がヘテロクロマチン上で抑制的に働く知見は初めての報

告であり、今後どの様な転写抑制機構で機能するか、ヒストン修飾を介した詳細な転写制御解析を進展させる予定である。

また今回新たに取得した転写共役因子と示唆された SPOP および p100 は核内レセプターを通じて制御機構の報告はなく、ヒストン修飾や RNA 結合機能性や、他のシグナル(TRAFF, STAT6)へのクロストークにも関与する可能性が示唆された。

一方、これら個体における評価系と同時に *in vitro* 系での評価も必須と考える。現在ショウジョウバエ卵母細胞より核抽出画分を調整し、裸の DNA に対しヒストンを巻いたクロマチン再構築系での *in vitro* 転写系の確立を試みている。ショウジョウバエ卵母細胞の核抽出画分はクロマチンを再構築する活性が高く、ヒストン修飾の位置特異性を決定づける最適なツールとなっている。ショウジョウバエ卵母細胞抽出画分によるクロマチン再構築系は確立済みであり、クロマチン再構築したレポーター遺伝子からの *in vitro* 転写系を検討している。ヒストン修飾の特異性を示す因子は単一分子ではなく複合体形成で機能すると推測され、取得因子を Bait とした相互作用分子のタンパク複合体精製は必須と考える。当該研究室ではタンパク複合体精製法は確立済みであり、複合体構成因子個々の染色体構造調節機能への相互作用の検討も重要な課題と考える。

神経変性制御遺伝子の同定により、神経変性機構の一端がクロマチン構造変換を伴う転写制御機能の破綻、染色体 DNA 構造変換維持機能の衰退が考えられた。これまでヒストン脱アセチル化活性やアセチル化活性は神経変性制御に拘わることは報告されていたが、本研究結果から、ヒストン修飾のみならずクロマチン構造変換も非常に重要であることが判明した。現在この神経変性疾患は治療法がないばかりか加齢に伴い亢進し最終的に致死となる難病であることから、これら破綻機

構の解析は神経変性発症抑制や治療に大きく貢献できると期待する。

E. 結論

性ステロイドホルモン作用をショウジョウバエ個体レベルで評価できる転写制御系を構築した。この系を用いて性ステロイドホルモン作用を制御すると予想される新規転写共役因子を同定した。これら因子にはヒストン修飾や RNA 結合を制御すると示唆される因子が含まれた。一方、ポリグルタミン伸長異常による神経変性制御はヒストン修飾を伴うクロマチン構造変換が関与していることが推測された。従って加齢に伴う神経変性の亢進は全体的な転写制御の破綻ならびに染色体 DNA 構造維持の衰退の可能性が考えられた。

F. 健康危険状態

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J*, 2004 in press
2. Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Yamamoto A, Suzuki E, Maki A, Yamagata K, Zhao Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci Biotech and Biochem*, 2004 in press
3. Kato S, Suzawa M, Takada I, Takeyama K, Yanagisawa J, Fujiki R, Kitagawa H: The function of nuclear reception in bone tissue. *J Bone Miner Metab* 21, 323-336, 2003
4. Kato S, Takeyama K: Expression cloning

- of ligand biosynthetic enzymes. *Methods Enzymol* 364, 361-375, 2003
5. Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S: Androgen receptor functions from reverse genetics models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 95-99, 2003
6. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Yanagisawa J, Chambon P, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Activation of estrogen signaling by dioxin-induced association AhR with ER. *Nature* 423, 545-550, 2003
7. 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
2. 学会発表
- I. 武山健一、大竹史明、加藤茂明：[シンポジウム] (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

脳の老化におけるステロイド受容体作用機構の解明とその応用

分担研究者 柳澤 純
筑波大学応用生物化学系教授

【研究要旨】

主要女性ホルモンであるエストロゲンは、女性生殖器の維持・発達、骨量の維持などに重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。エストロゲンは核内レセプタースーパーファミリーに属するエストロゲンレセプター α と β (ER α 、 β)に結合し、その生理作用をあらわす。エストロゲンレセプター α と β (ER α 、 β)は、その発現が脳においても顕著にみとめられることから、何らかの機能を持っているものと考えられているが詳細は不明である。ER 遺伝子欠損マウスでは、脳損傷からの回復が起こらない、また、海馬ではエストロゲン依存的なシナプス突起の伸長が認められる、などの研究結果からエストロゲンが脳において記憶や損傷した神経細胞の修復に関与することが次第に明らかになりつつある。本研究者は、ER が神経細胞の成長とアポトーシスに関与する IGF-1 受容体とエストロゲン依存的に複合体を形成することを見出した。ER はエストロゲン依存的に細胞膜に分布し、IGF-1 受容体と複合体を形成し、受容体のリン酸化およびそれに引き続く下流シグナル、MAP キナーゼ、Akt などの活性化を引き起こすことを明らかにした。IGF-1 受容体の遺伝子欠損細胞を用いたところ、MAP キナーゼ、Akt の活性化がエストロゲンによって誘導されたことから、ER は IGF-1 受容体だけでなく、他の受容体や膜の分子にも結合する可能性が示された。

A. 研究目的

エストロゲンレセプター α と β (ER α 、 β)は、その発現が脳においても顕著にみとめられることから、何らかの機能を持っているものと考えられているが詳細は不明である。ER 遺伝子欠損マウスでは、脳損傷からの回復が起こらない、また、海馬ではエストロゲン依存的なシナプス突起の伸長が認められる、などの研究結果からエストロゲンが脳において記憶や損傷した神経細胞の修復に関与することが次第に明らかになりつつある。このようなエストロゲンの作用には細胞質に存

在する ER が関与していることが示唆されている。

そこで、本研究者は、脳の老化とエストロゲンの関係を解明するため、細胞質における ER の機能を解析することを目的とし以下の研究を行った。

B. 研究方法

(1) エストロゲンによる IGF-1 受容体の活性化

脳においてエストロゲンと増殖因子である IGF-1 の間に機能的相互作用が存在することが知られている。IGF-1 は細胞

表面上の IGF-1 受容体に結合し、IGF-1 受容体のリン酸化を促す。そこで、エストロゲン依存的に IGF-1 受容体がリン酸化を受けるか否かを検討した。IGF-1 受容体と ER α をともに発現している MCF-7 細胞をエストロゲン(10⁻⁸M)存在下と非存在下において培養し、回収した後ホモジナイザーで破碎することによって抽出液を作製した。この抽出液から抗 IGF-1 受容体抗体を用いて IGF-1 受容体を免疫沈降し、抗リン酸化抗体を用いてイムノブロットを行った。

(2) エストロゲンによる MAP キナーゼと Akt の活性化

IGF1 受容体の下流には MAP キナーゼおよび Akt が存在し、IGF-1 受容体の活性化によって MAP キナーゼと Akt もリン酸化され活性化される。そこで、エストロゲンによる IGF-1 受容体のリン酸化にともない MAP キナーゼと Akt がリン酸化を受けるか否かを検討した。MCF-7 細胞をエストロゲン存在下、非存在下でそれぞれ培養し、細胞を回収後ホモジナイザーにより破碎し、細胞抽出液を調整した。この細胞抽出液から MAP キナーゼ、Akt をそれぞれ特異的な抗体を用いて免疫沈降し、リン酸化抗体を用いてイムノブロットを行った。

(3) 細胞質における ER α の局在

IGF-1 受容体がエストロゲン刺激によってリン酸化を受けること、エストロゲン依存的 IGF-1 受容体の活性化がエストロゲン添加後 15 分程度の短時間で起こることから、この過程には細胞質に存在する ER α が関与しているものと考えられる。そこで、エストロゲン添加時における ER α の細胞質での局在を検討した。

MCF-7 または HeLa 細胞に GFP と融合した ER α を発現させ、エストロゲン未添加の状態と添加後 15 分で細胞内の GFP- ER α の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) IGF-1 受容体と ER α との相互作用の

解析

ER α はエストロゲン添加後 15 分以内に細胞膜上に移動する。エストロゲン刺激後 15 分で IGF-1 受容体がリン酸化されることを考えあわせると、ER α はエストロゲン依存的に IGF-1 受容体と相互作用する可能性が考えられた。そこで、MCF-7 細胞にエストロゲンを添加し、細胞を回収後破碎して調整した細胞抽出液から抗 IGF-1 受容体抗体を用いて IGF-1 受容体を免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE にて分離し膜にブロットした後、抗 ER α 抗体で ER α を検出した。

(5) IGF-1 受容体遺伝子欠損細胞に対するエストロゲンの作用

エストロゲンによる MAP キナーゼ、Akt の活性化は IGF-1 受容体を介しているものと考えられた。そこで、IGF-1 受容体遺伝子欠損マウスの繊維芽細胞を株化した R-細胞を用い、エストロゲンへの応答性を検討した。IGF-1 受容体を発現している R+細胞と発現していない R-細胞をそれぞれ培養し、エストロゲンを添加後、細胞を回収・破碎し、抗 MAP キナーゼ抗体、抗 Akt 抗体を用いて MAP キナーゼ、Akt を免疫沈降した。沈降した MAP キナーゼ、Akt を抗リン酸化抗体を用いてブロッティングし、リン酸化状態を検討した。

(6) エストロゲン依存的に ER α と相互作用する細胞質蛋白質因子の単離と同定

IGF-1 受容体の発現していない R-細胞においてもエストロゲン依存的な MAP キナーゼと Akt の活性化が認められたことから、IGF-1 受容体以外にも ER α と結合する膜局在蛋白質が存在する可能性が示唆された。そこで、大腸菌を用いて GST 融合 ER α 蛋白質を大量に調整し、GST-ER α カラムを作製した。このカラムにエストロゲン存在下または非存在下でマウス脳の細胞質および膜抽出画分をアプライし、エストロゲン依存的に結合した各分を SDS-PAGE にて分離した後、TOF-MS

を用いた Mass fingerprinting によって同定した。

C. 研究結果

エストロゲン依存的に IGF-1 受容体がリン酸化を受けるか否かを抗リン酸化抗体を用いて検討した結果、IGF-1 受容体はエストロゲン添加後 15 分程でリン酸化されることが明らかとなった。このリン酸化反応は IGF-1 添加時に比較すると 5 分の 1 程度であった。リン酸化反応が時間スケールでなく、分のオーダーで起こることから ER α の転写による 2 次的機能ではなく、ER α の細胞質での 1 次機能であることが予想された。

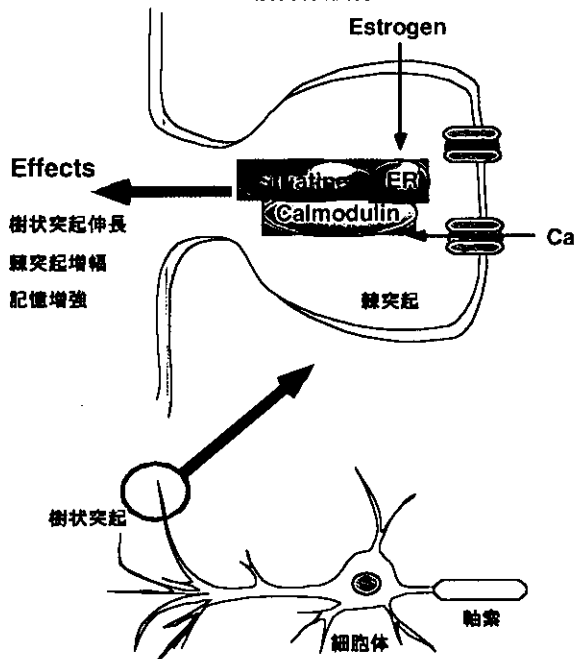
IGF1 受容体の下流には MAP キナーゼおよび Akt が存在し、IGF-1 受容体の活性化によって MAP キナーゼと Akt もリン酸化され活性化される。そこで、エストロゲンによる IGF-1 受容体のリン酸化にともない MAP キナーゼと Akt がリン酸化を受けるか否かを検討した。その結果、MAP キナーゼ、Akt ともにエストロゲン添加後 15~30 分程度でリン酸化され活性化されることが明らかとなった。両者のリン酸化の割合は、IGF-1 で刺激したときと比較して低いことが示された。

IGF-1 受容体がエストロゲン刺激によってリン酸化を受けること、エストロゲン依存的 IGF-1 受容体の活性化がエストロゲン添加後 15 分程度の短時間で起こることから、この過程には細胞質に存在する ER α が関与しているものと考えられる。そこで、エストロゲン添加時における ER α の細胞質での局在を検討した。エストロゲン未添加の状態と添加後 15 分で細胞内の GFP-ER α の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、エストロゲン刺激前はほとんどすべての ER α が核内に存在し、刺激によって数%が膜へと移行することが明らかとなった。この結果とエストロゲン刺激後 15 分で IGF-1

受容体がリン酸化されることを考えあわせると、ER α はエストロゲン依存的に IGF-1 受容体と相互作用する可能性が考えられた。そこで、MCF-7 細胞を用いて、IGF-1 受容体と ER α がエストロゲン依存的に結合するか否かを免疫共沈降法により検討した。その結果、やはりエストロゲン刺激 15 分後ほどで ER α と IGF-1 受容体が相互作用を示すことが明らかとなった。この相互作用は、一時的なものであり、30 分後には両者の結合は認められなくなった。

これらの結果は、エストロゲンによる MAP キナーゼ、Akt の活性化は IGF-1 受容体を介していることを示している。そこで、IGF-1 受容体遺伝子欠損マウスの繊維芽細胞を株化した R-細胞を用い、エストロゲンへの応答性を検討した。IGF-1 受容体を発現している R+細胞と発現していない R-細胞をそれぞれ培養し、エストロゲンを添加による MAP キナーゼ、Akt のリン酸化状態を検討した。驚いたことに R+、R-どちらの細胞株においても MAP キナーゼ、Akt の活性化が認められた。この結果は、IGF-1 受容体以外にも ER α と結合する膜局在蛋白質が存在する可能性を示唆している。そこで、大腸菌を用いて GST 融合 ER α 蛋白質を大量に調整し、GST-ER α カラムを作製した。このカラムにエストロゲン存在下または非存在下でマウス脳の細胞質および膜抽出画分をアプライし、エストロゲン依存的に結合した各分を SDS-PAGE にて分離した後、TOF-MS を用いた Mass fingerprinting によって同定した。この方法を用い、ER α の結合蛋白質を検索したところ、カルモジュリンとストリアチンがエストロゲン依存的に ER α に結合することが明らかとなった (図 1)。カルモジュリンはカルシウムと結合し、CaMKII などの活性化を引き起こすことが知られているが、その機能の詳細は長年の研究にも関わらず未だ不明である。一方、ストリアチン

図1 ER α とカルモジュリン、ストリアチンとの複合体形成



は脳に高発現しておりカルモジュリンを制御することによって樹状突起の伸長に関与することが報告されている。今後これらの因子と ER α との相関を解析する予定である。

D. 考察

エストロゲンが細胞質に存在する ER α と IGF-1 受容体との相互作用を誘導し、IGF-1 受容体のリン酸化、引いては MAP キナーゼ、Akt の活性化を引き起こすことを示した。エストロゲン依存的な MAP キナーゼおよび Akt の活性化には、必ずしも IGF-1 受容体は必要ないことから、そのほかの因子が ER α と細胞質で相互作用し、MAP キナーゼと Akt pathway の活性化を行っているものと考えられた。

GST- ER α カラムを作製して ER α にエストロゲン依存的に結合する細胞質蛋白質を精製・同定したところ、カルモジュリンとストリアチンが得られた。カルモジュリンは細胞内のカルシウム・モジュレーターであり、カルシウムと結合して CaMKIIなどを活性化し細胞増殖、樹状突起伸長など様々な過程に関与することが報告されている。しかしながら、その

分子機構の詳細は明らかになっていない。ストリアチンは脳において豊富に存在し、神経突起終末にカルモジュリンと結合して存在することが報告されている。ER α も樹状突起の棘突起部位に局在すること、エストロゲンが樹状突起の伸長に関与することから、ER α 、カルモジュリン、ストリアチンは複合体を形成してエストロゲン依存的な樹状突起伸長に関与しているものと考えられる。今後、エストロゲン依存的に3者の複合体が形成されるか、ER α の結合によってカルシウム非存在下でもカルモジュリンの活性化が起こるのか、ストリアチンの役割は何かなどの疑問を解明し、樹状突起伸長での ER α の機能と機構および老化にともなう変化について解析を進めたい。

D. 結論

ER α が神経細胞の成長とアポトーシスに関与する IGF-1 受容体とエストロゲン依存的に複合体を形成することを見出した。ERはエストロゲン依存的に細胞膜に分布し、IGF-1 受容体と複合体を形成し、受容体のリン酸化およびそれに引き続く下流シグナル、MAP キナーゼ、Aktなどの活性化を引き起こすことを明らかにした。IGF-1 受容体の遺伝子欠損細胞を用いたところ、MAP キナーゼ、Aktの活性化がエストロゲンによって誘導されたことから、ERは IGF-1 受容体だけでなく、他の受容体や膜の分子にも結合する可能性が示された。GST- ER α カラムを用いて脳における ER α の相互作用因子を探索した結果、カルモジュリン、ストリアチンという樹状突起伸長を制御する因子群が得られた。脳ではエストロゲン依存的な樹状突起伸長が観察されていることから、カルモジュリン、ストリアチンと ER α との相互作用はエストロゲン依存的な樹状突起伸長に関与しているものと考えられる。今後、この機構の詳細な解析を行い、記憶とホルモンとの関係、

そして老化に伴うこれらの変化を明らかにしていきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S: Ligand-induced transrepression by a nuclear receptor mediated by a bHLH-type activator through co-regulator switching. *EMBO J*, 2004, in press
2. Fan W, Yanase T, Wu Y, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol* 18, 127-141, 2004
3. Yamamoto Y, Wada O, Takada I, Yogiashi Y, Shibata J, Yanagisawa J, Kitazato K, Kato S: Both N- and C-terminal transactivation functions of DNA-bound ERalpha are blocked by a novel synthetic estrogen ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 656-662, 2003
4. 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: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917, 2003
5. Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J: Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 26704-26714, 2003
6. 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 oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550, 2003
7. Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S: Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nature Cell Biol* 5, 224-230, 2003

2. 学会発表

【国内学会】

1. 柳澤純 : [シンポジウム] ユビキチン・ネットワークによる核内レセプターの制御(2003.12.12) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
2. 川辺洋一、柳澤純 : [シンポジウム] エストロゲンレセプター (ER α) の制御機構(2003.12.11) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用

分担研究者 津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター実験動物施設講師

【研究要旨】

エストロゲンシグナルをリガンド非依存的に活性化できるリガンド非依存型エストロゲンレセプター（caER α および caER β ）を代表研究者が既に見いだしており、これらを使用して組換えアデノウイルスおよび遺伝子改変マウスを作製し、生きた試薬を準備することができた。コンディショナルトランスジェニック（cTg）マウスについては、それぞれ caER α および caER β について 10 ライン以上のトランスジェニックマウスが得られた。また、これらの cTg マウスは普段レポーター遺伝子である GFP または DsRed を発現しており、予め個体において外来遺伝子の発現部位を予測できることが示された。また、これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに目的遺伝子を過剰発現させる系を確立した。本研究では、Cre を組換えアデノウイルスを利用することにより caER α の cTg マウスの卵巣において、ER α を過剰発現させることより、ER α シグナルの卵巣機能について示唆し、他のステロイドシグナルと知られるプロゲステロンレセプターとの相互作用についても考察した。さらに今後の研究の方向性として、これらの遺伝子改変モデルマウスを利用して老年病の病態メカニズム、治療法への応用性、治療効果およびそのリスクについて検討し、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発を目指す。

A. 研究目的

急速な高齢化社会が進む現在の重要な社会問題として、老人人口と平行に老年病の増加・多様化があげられる。実際に老化にともなうステロイドシグナルの減衰・破綻は、骨粗鬆症、アルツハイマー、ホルモン依存性ガン等の多くの老年病を引き起こすと考えられ、これらの老年病の予防・診断・治療法の開発は、国民福祉に極めて意義が大きく急務な問題と考えられる。

本研究課題の目的は、ステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の予防・治療法の開発という観点から、

1) ステロイド様物質（エストロゲン）⇒

2) 核内レセプター（ERs）⇒ 3) 下流応答遺伝子群⇒ 4) 劇的な生体生理作用の発揮に見られる一連のシグナルカスケードを体系的に捉え、劇的な生体生理作用を引き起こすステロイドの最終的な作用点である下流応答遺伝子群に焦点を絞り、老化・老年病の疾患モデル動物を作製・応用し、その新規創薬・治療法の開発を目的とする。

具体的には、女性の加齢にともなう閉経前後において、ホルモン補充療法により更年期障害、骨密度の改善することが報告されている。一方、米国での大規模な疫学調査の結果、他の乳腺、血管障害、血栓症のリスクをあげてしまう等の副作

用が報告され、ホルモン補充療法が 2002 年に米国で見直しが行われ、日本でもその報告を受けて制限される方向にある。これらの副作用は、性ステロイドホルモンであるエストロゲンのリガンドとしての多様な生体生理作用に起因すると考えられる。

これらの問題を改善するため、現在使用されているステロイド性製剤とは別の作用点を持つ因子を同定・解析し、より副作用の少ない老年病への創薬・治療の開発を目的とした研究を行う。これらステロイド性製剤の特徴として、転写因子である核内レセプターを介して、リガンド特異的な下流応答遺伝子群の転写を活性化し、この発現したタンパク質が生体において多様な生理作用を引き起こす。つまり、リガンド特異的な下流応答遺伝子群のシグナルに着目し、マウスモデルを利用することにより生体における下流応答遺伝子群の生体作用、および他の生理作用について併せて検討・評価し、より副作用の少ない創薬・治療法の盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

(1) エストロゲンシグナルにおける生体作用機構

エストロゲンレセプターは 2 種類 (ER α および ER β) 存在し、その生理作用について類似・相違性について未だ明確な報告がなく、ER α と ER β がお互いにオートクライン的に発現量、またはダイマー形成により転写因子としての作用を制御する可能性も考えられる。エストロゲン特異的シグナルを検討するには、KO マウスを検討することが重要と思われるが、より顕著に特異的なエストロゲンの生体作用を見るためにリガンド非依存型エストロゲンレセプター (caER α および caER β) のコンディショナルトランスジェニック (cTg) マウスおよび組織特異的プロモーター/Cre 作製・交配させるこ

とにより、標的臓器のみでリガンド非依存的に ER β シグナルのみを活性化することが可能である。さらに、ER α KO (ER β シグナルのみ存在) マウスを利用することにより、ER のシグナル特異性とその生体作用の特異性についても検討することが可能と考える。つまり、今まで不明瞭であった標的臓器での 1) エストロゲン (ステロイド) \Rightarrow 2) ER α /ER β の特異性およびその作用メカニズムについて詳細に検討し、エストロゲンシグナル経路の特異性について、生体内で生理作用および作用メカニズムについて検討をおこなう。

(2) エストロゲン下流応答遺伝子の検索および発現プロファイリング

ER の下流応答遺伝子群について DNA マイクロアレイにおいて候補遺伝子群を既に得ており、これらの遺伝子群に関して再現性・エストロゲン応答性を検討するために、エストロゲン付加後に発現量の変化についてリアルタイム PCR 法により検討をおこなう。さらに、特にエストロゲン標的臓器を中心にマウス個体における組織切片で 3 次元的位置情報を検討するため、*in situ* hybridization (ISH) 法により発現プロファイルの検討を行う。これらの下流遺伝子群を吟味・検討しエストロゲン下流応答遺伝子群の遺伝子改変マウスの作製を行う。

(3) 下流応答遺伝子群の生体作用、予防・診断・治療法への応用

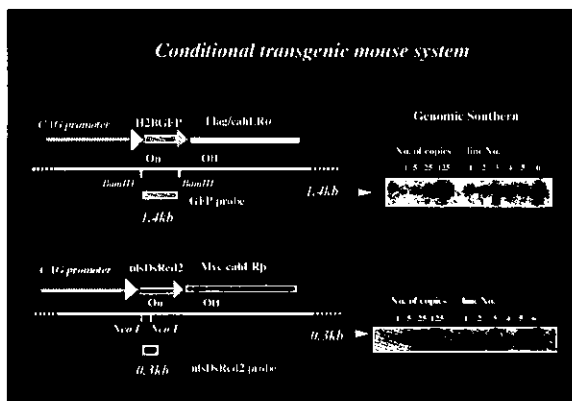
(1) で作製したエストロゲン下流応答遺伝子の遺伝子改変マウスに組織特異的/Cre マウスを交配し、卵巣または精巣摘出を施し、性ステロイドホルモンの作用を排除して、これらの摘出処理にともなう生理作用および作用メカニズムについて検討をおこなう。また、下流応答遺伝子の生体生理作用およびリスクについて検討するために、受精卵 2 細胞後期から発現が知られている CAG (β -actin/CMV-IE) プロモーター/Cre マウス

を交配して下流応答遺伝子が過剰発現される条件を実験系により作製し、下流応答遺伝子の生体での生理作用の解析、および副作用について評価する。また、これらのエストロゲン下流応答遺伝子が発現することにより引き起こされる生体作用について検討するとともに、他のステロイドホルモンシグナルとのクロストークについても併せて検討する。

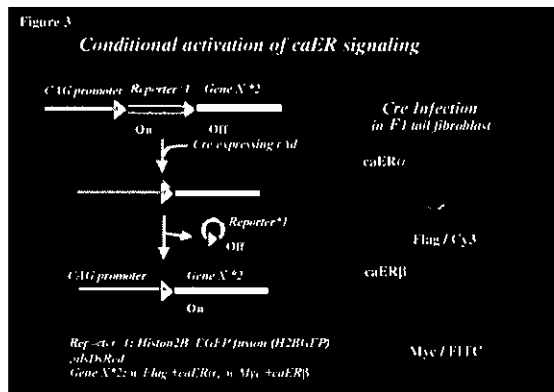
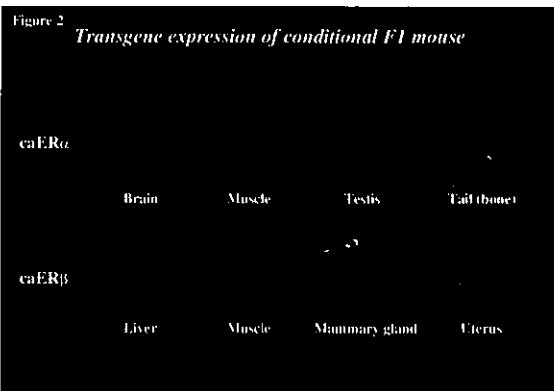
以上、(1)~(3)へと段階的に研究計画を遂行し、本研究課題である老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用について検討することにより、作用メカニズムが明確で非リガンド性物質であり、かつ副作用の少ないステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の予防・治療法への応用できる因子の同定を目指し、研究を推進していく。

C. 研究結果

本研究では、caER α および caER β の cTg マウスの作製にそれぞれ成功し (Figure 1)、少なくともこれらの cTg マ

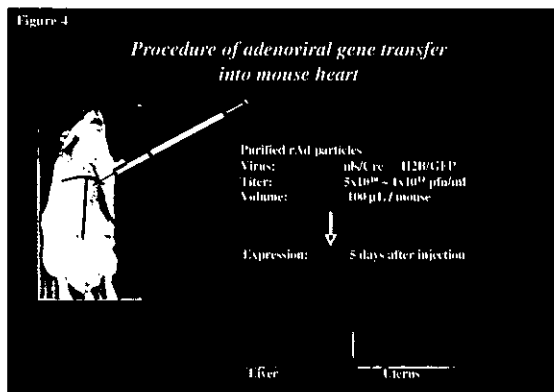


ウスの数ラインの種々の臓器でレポーター遺伝子を発現していることが確かめられ (Figure 2)、これらのレポーター遺伝子の発現は個体でリガンド非依存型エストロゲンレセプターを過剰発現させることが可能なことを示唆した。また、Cre を発現可能な組換えアデノウイルスを cTg 由来の F1 マウス尾部の初代繊維芽細胞に感染させ、*in vitro* において外来性 caER α および caER β 遺伝子が発現して



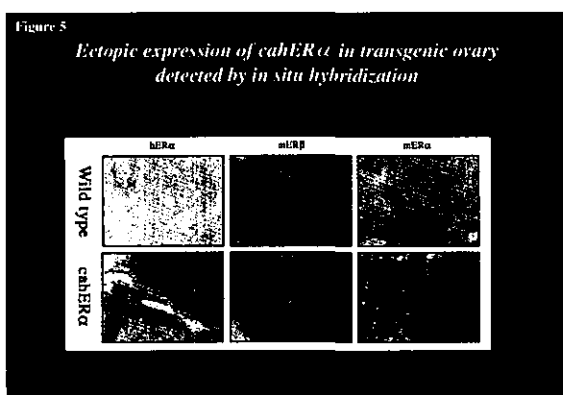
いることを確認した (Figure 3)。

さらに *in vivo* においては、先ずコントロールウイルスとしてレポーター遺伝子 (Histon 2B に GFP を融合させた遺伝子) を持つ組換えアデノウイルスを個体に直接心臓から接種することにより、*in vivo* で Cre を発現させることが可能かどうか検討した結果、高濃度に精製したウイルスを接種することによりレポーター遺伝子の発現を蛍光実体顕微鏡で確認できた (Figure 4)。つまり、高濃度に精製した



Cre を発現する組換えアデノウイルスを心臓より直接接種することにより、部分

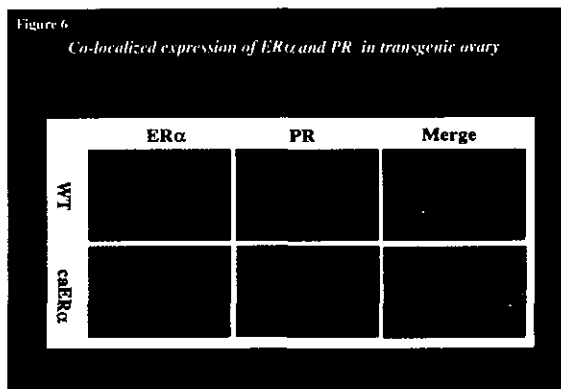
的ではあるがコンディショナルに個体において目的遺伝子を過剰発現させる系が可能と示唆された。実際に、成熟雌の cTg (caER α) の心臓から高濃度の Cre 発現ウイルスを接種し、2 週間後にエストロゲンシグナルの標的臓器である卵巣において異所性の外来性 caER α のシグナルを ISH 法により RNA レベルで確認すると共に、異所的な内在性の ER α および ER β シグナルの発現を確認した (Figure 5)。Cre を処理した卵巣において、部分



的に外来性の caER α の発現が確認でき、これらの卵巣では黄体様の組織構造および発達した卵胞の減少が観察され、外来性の caER α の発現する部分において ER の下流応答遺伝子と知られている EBAG9、および Efp の異所的な発現を確認した。これらの Cre 処理後の cTg マウスの卵巣を詳細に解析した結果、内在性 ER α 、ER β 、EBAG9、および Efp が本来発現する部位で発現するのみでなく、外来性の caER α の発現が強い黄体様組織で異所的な発現が見られた。

さらに、この外来性の caER α の発現が強い黄体様の組織で、黄体機能の作用が存在するか検討するために、エストロゲンの下流応答遺伝子として知られるプロゲステロンレセプター (PR) が発現しているか検討した結果、外来性の caER α の発現により下流応答遺伝子として知られる PR の発現を同じ黄体様組織において観察した (Figure 6)。

一方、前述で挙げた *in vivo* においてコ



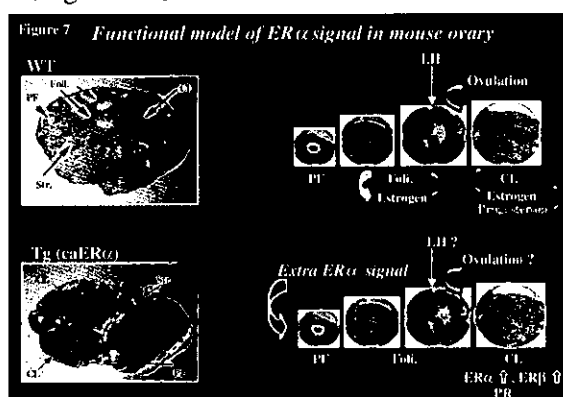
ンディショナルに目的の遺伝子を発現させるために Cre を発現できる組換えアデノウイルスを利用した方法について検討した結果、肝臓、肺等には導入効率が良いが特異性がなく、他の標的臓器に特異性を持って効率的に発現させるためには、組換えアデノウイルスを利用する系には短所があることが示唆された。それ故、より特異性が高く効率の良い方法を検討するために、組織特異的なプロモーターに Cre を発現できる遺伝子改変マウスについても作製中である。

エストロゲンの下流応答遺伝子群に関しても、既に 2 つの遺伝子を同定し遺伝子改変マウスの作製を行っており、それらの老年病の疾患モデル動物として吟味・検討している。

D. 考察

エストロゲンと卵巣機能に関しては、女性の二次成長に伴い卵巣が発達し、性周期により他のホルモンと厳密に相互に制御することにより、女性生殖を維持していることが知られている。また、卵巣は生体におけるエストロゲンを分泌する主要な臓器であり、そのステロイドレセプターである ER α および ER β の発現が報告されており、妊娠期に劇的に変化をとまなう子宮および乳腺が近接して存在する代表的な標的臓器として考えられる。とりわけ老年病との関連について考えると、女性の閉経後における生体変化は極めて重要な問題であり、骨粗鬆症、ホルモン依存性ガン等と深く関連するこ

とが示唆されている。本研究により、エストロゲンシグナルが卵巣機能の黄体化作用に関与することが示唆され、下流応答遺伝子の1つであるPRの発現を制御していることが推測される。1つのモデルとして、卵巣においてエストロゲンシグナルがプロゲステロンシグナルを階層的に制御する可能性を示唆している (Figure 7)。また、エストロゲンレセプ



ターの下流応答遺伝子である EBAG9、および Efp についても、生体内で過剰な ER α シグナル付加することにより転写を上昇させることが示唆された。とりわけ、Efp は乳癌の細胞増殖における重要な因子であることを研究代表者および分担者により既に報告しており、ガンとの関連について生体内での作用メカニズムを解明することは重要と考えられる。

これらの研究を進展させるためには、個々の標的臓器・疾患に焦点を絞り、疾患モデルマウスを応用して本来エストロゲンが持つ生体作用を明確にし、ステロイドシグナルの減衰・破綻による病態メカニズムを理解することにより、新しい老年病の予防・治療法の開発を行うのに必須と考えられる。

E. 結論

研究課題である“老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用”に対する観点から、エストロゲンシグナルをリガンド非依存的に活性化できる遺伝子改変マウスを作製し、生きた試薬を準備する

ことができた。コンディショナルトランスジェニック (cTg) マウスについては、それぞれ caER α および caER β について数ラインのトランスジェニックマウスが得られた。また、これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに過剰発現をさせる系を確立したが、*in vivo* でより特異性があり効率的な cTg マウスの過剰発現系の確立が必須と考えられた。

他方で、既に老年病早期発症モデルとして知られている *Klotho* マウスを利用して、エストロゲンおよびそれらに関連するステロイドシグナルに関して併せて検討することにより、Reverse Genetics および Forward Genetics の両面から総合的に老年病を捉え、疾患モデルを利用した応用面についても研究を展開している。

最後に、今後の研究の方向性として、これらの遺伝子改変モデルマウスを利用して病態のメカニズム、治療法への応用性、老年病の治療効果およびそのリスクについて検討することにより、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に迫る。

F. 発表

1. 発表論文

- Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*, 2004, in press
- Kawakami Y, Tsukui T, Ng JK, Izpisua Belmonte JC: Pattern Formation in Vertebrate Development, section in "Insights into the Molecular Basis of Vertebrate Forelimb and Hindlimb identity" Oxford University Press, London, 198-213, 2003
- Fukuda A, Tokonabe S, Hamada, M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K: Alleviation of PC4-mediated

transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 278, 14827-14831, 2003

2. 学会発表

1. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡：ER α およびER β の生体内 Gain of function による生殖機能の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
2. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、浦野友彦、藤田雅代、佐藤美幸、村松正實、井上聡：BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
3. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるエストロゲン分子標的の検索と機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
4. 市川智恵、堀江公仁子、津久井通、堺隆一、井上聡：プロテオーム解析による骨芽細胞様細胞におけるビタミン K 分子標的の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
5. 池田和博、菱沼俊樹、大羽沙弥佳、津久井通、村松正實、井上聡：ラット脳におけるエストロゲン標的遺伝子網羅的検索 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
6. 津久井通、井上聡：BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2004.2.14) 第 7 回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S	Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription.	<i>Mol Endocrinol</i>	<i>in press</i>		2004
Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S	Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	85	101-104	2003
Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S	EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer.	<i>Int J Cancer</i>	106	310-315	2003
Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T	Zone-dependent expression of estrogen receptor alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	88	1333-1340	2003
Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M	EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation.	<i>Eur J Cancer</i>	39	1552-1561	2003
Inoue H, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Cui X, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S	Idoxifene and estradiol enhance antiapoptotic activity through estrogen receptor-beta in cultured rat hepatocytes.	<i>Dig Dis Sci</i>	48	570-580	2003
Horie K, Urano T, Inoue S	Efp as a new molecular target for breast cancer therapy.	<i>Anticancer Drugs</i>	14	1-2	2003
Okada A, Ohta Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Iguchi T	Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats.	<i>J Mol Endocrinol</i>	30	301-315	2003
Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H	Estrogen receptor (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 thyroid disorders.	<i>Modern Pathology</i>	16	437-444	2003
Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B	Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR.	<i>J Biol Chem</i>	278	43919-43927	2003

Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M	Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density.	<i>J Bone Miner Res</i>	18	1642-1649	2003
Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H	Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone (GnRH) signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing.	<i>Bone</i>	32	185-190	2003
Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S	Association of Tumor Necrosis Factor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	3	101-105	2003
Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S	Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density.	<i>J Bone Miner Metab</i>	<i>in press</i>		2004
Kobayashi K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M, Toba K	Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia.	<i>J Am Geriatr Soc</i>	<i>in press</i>		2004
Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K	Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis; flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity.	<i>Atherosclerosis</i>	<i>in press</i>		2004
Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y	17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	311	454-459	2003
Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y	Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular muscle cell proliferation.	<i>Cardiovasc Res</i>	59	734-744	2003
Nakamura T, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Orimo H, Ouchi Y	Influence of sex and estrogen on vitamin D-induced arterial calcification in rats.	<i>Geriatr Gerontol Int</i>	3	145-149	2003
Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K	Testosterone and comprehensive geriatric assessment in frail elderly men.	<i>J Am Geriatr Soc</i>	51	1324-1326	2003
Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R	Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma.	<i>J Biol Chem</i>	278	48367-48376	2003

Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M	RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation.	<i>Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function</i>	<i>in press</i>		2004
Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T	Glutaredoxin exerts anti-apoptotic effect by regulating redox state of Akt.	<i>J Biol Chem</i>	278	50226-50233	2003
Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S	Ligand-induced transrepression by a nuclear receptor mediated by a bHLH-type activator through co-regulator switching.	<i>EMBO J</i>	<i>in press</i>		2004
Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S	Androgen receptor functions from reverse genetic models.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	85	95-99	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 oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.	<i>Nature</i>	423	545-550	2003
Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J	Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells.	<i>J Biol Chem</i>	278	26704-26714	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	The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome.	<i>Cell</i>	113	905-917	2003
Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K	Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIID.	<i>J Biol Chem</i>	278	14827-14831	2003