

- molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density. *J Bone Miner Res* 18, 1642-1649 (2003)
6. Omasu F, Emi M, Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H: Association of genetic variation of gene encoding LIM domain protein (RIL) with low bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Hum Genet* 48, 342-345 (2003)
  7. Ishida R, Ezura Y, Emi M, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H: Association of a promoter haplotype (-1542G/-525C) in the tumor necrosis factor receptor associated factor-interacting protein gene with low bone mineral density in Japanese women. *Bone* 33, 237-241 (2003)
  8. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1333-1340 (2003)
  9. 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. *Int J Cancer* 106, 310-315 (2003)
  10. 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. *Eur J Cancer* 39, 1552-1561 (2003)
  11. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S: Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 101-4 (2003)
  12. 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).
  13. 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* 101, 1673-1678, 2004
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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* 144, 5138-5144, 2003

18. Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R: Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma *J Biol Chem* 278, 48367-48376, 2003
19. 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

### 【国際学会】

1. Inoue S: [Invited Seminar] The role of 14-3-3sigma proteolysis in breast cancer growth. Biology of 14-3-3 Proteins. Gordon Research Conferences, Ventura, CA, USA (2004.2.22-27)
2. Inoue S: [Workshop] Estrogen responsive genes and breast tumors. The US-Japan Workshop on "The Role of Nuclear Receptors in Carcinogenesis", Maui, HA, USA (2004.3.21-23)
3. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D. International Bone and Mineral Society 2003, Osaka (2003.6.3-7)
4. Ishida R, Sudo Y, Ezura Y, Yoshida H, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: Association of Molecular Variants, Haplotypes, and Linkage Disequilibrium within the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor-

Interacting Protein (I-TRAF) Gene with Adult Bone Mineral Density. American Society of Bone and Mineral Research 25<sup>th</sup> Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA (2003.9.19-23)

5. Urano T, Fujita M, Shiraki M, Hoshino S, Ouchi Y, Inoue S: Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. 7<sup>th</sup> Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
6. Hoshino S, Inoue S, Ouchi Y: Monitoring bone resorption by serum type I collagen N-telopeptides (NTX) predicts change of bone mineral density in postmenopausal Japanese women. 7<sup>th</sup> Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
7. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie K, Usui T, Muramatsu M, Inoue S: Negative regulation of transcription activity of estrogen receptor by protein phosphatase 5. Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
8. Kato S: SERMs: Molecule Level Action Mechanism Update, First Joint Meeting for International Bone and Mineral Society-Japanese Society for Bone and Mineral Research. Osaka (2003.6.3-7)
9. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: Activation of the anaplastic lymphoma kinase in Neuroblastoma cells. German-Japanese Cancer Workshop on modification of signaling cascades in cancer. Tokyo (2003.1.8-11)
10. Sakai R: Roles of Src-binding molecules in the control of cancer progression. The eighteenth workshop on France-Japan cooperative cancer research program, Osaka (2003.10.28-11.1)
11. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: "Involvement of Eph receptor tyrosine

kinase and ephrin ligand in the regulation of cell-to-cell adhesion by interaction with claudins” 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Waikoloa, Hawaii, USA (2004.1.25-29)

【国内学会】

1. 井上聡：[シンポジウム]エストロゲンの作用の分子機序と骨代謝、脳機能における役割 (2003.4.1) 第 100 回日本内科学会 (福岡)
2. 井上聡：[シンポジウム]標的遺伝子から見たエストロゲン作用メカニズム (2003.4.4-6) 第 26 回日本医学会総会 (福岡)
3. 井上聡[サテライトシンポジウム]女性ホルモンとその応答遺伝子の作用メカニズム (2003.5.9-11)第 76 回日本内分泌学会 (横浜)
4. 井上聡[パネルディスカッション]ゲノムと骨：エストロゲンシグナル (2003.7.3-5) 第 23 回日本骨形態計測学会 (東京)
5. 井上聡：[シンポジウム]男性ホルモンと骨—女性ホルモン受容体遺伝子改変動物の骨における雌雄差— (2003.10.10) 第 5 回日本骨粗鬆症学会 (福岡)
6. 井上聡：[シンポジウム]エストロゲン受容体標的因子の同定とその機能 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
7. 井上聡：[シンポジウム] 核内情報受容から遺伝子発現への機構-病態とその治療の分子レベルでのアプローチ：エストロゲン—受容体応答遺伝子の病態と治療標的における役割 (2004.3.29-31) 日本薬学会第 124 年会 (大阪)
8. 浦野友彦、星野真二郎、白木正孝、江面陽一、江見充、細井孝之、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症における LRP5 遺伝子多型の関与 (2003.6.18-20) 第 45 回日本老年医学会学術集会 (名古屋)
9. 星野真二郎、井上聡、大内尉義：血中ならびに尿中 I 型コラーゲン N-telopeptide (NTx)の骨代謝マーカーとしての有用性に関する検討 (2003.6.18-20) 第 45 回日本老年医学会学術集会 (名古屋)
10. 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
11. 保母るつ子、池田和博、竹田省、井上聡：エストロゲンによって誘導される Cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide (COX7RP) の発現機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
12. 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の分子標的の探索と機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
13. 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)
14. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由起子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡：ER $\alpha$ および ER $\beta$ 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 (神戸)
15. 松本高広、佐藤隆史、河野博隆、渡辺資之、植松良勝、福田享、山田高嗣、山本陽子、中村貴、吉村公宏、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、加藤茂明：脳の性差とその性分化を誘導するアンドロゲン受容体の機能 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)

16. 大竹史明、馬場敦史、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明：ダイオキシン受容体を介したエストロゲン受容体制御機構の解析と相互作用複合体精製の試み (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
17. 大石元、北川浩史、高田伊知郎、和田修、柳沢純、加藤茂明：癌抑制遺伝子 BRCA1 は GCN5 複合体と結合し、転写活性能と DNA 損傷修復の両機能を促進する (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
18. 田中佐依子、松本高広、山田高嗣、盛真友、佐藤隆史、Pierre Chambon、加藤茂明：骨格パターンニングにおける性差形成因子の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
19. 中村貴、渡辺資之、福田亨、山本陽子、松本高広、吉村公宏、宮本純子、椎名博子、田中佐依子、盛真友、中道裕子、佐藤隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤茂明：破骨細胞特異的性ステロイドホルモンレセプター遺伝子欠損マウス作出の試み (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
20. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexander Kouzmenko、加藤茂明：シヨウジョウバエを用いたヒトエストロゲンレセプター転写制御機構の解明 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
21. 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
22. 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)
23. 黄錦鴻、浅輪珠恵、高戸毅、堺隆一：マウス高転移性メラノーマ細胞の細胞運動における Fyn と cortactin の協調的役割 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
24. 東浩太郎、堀江公仁子、井上聡、大内尉義、堺隆一：細胞膜近傍におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  の機能解析 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
25. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一：Eph 受容体/Ephrin による細胞接着制御の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

核内受容体とその共役因子の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

分担研究者 加藤 茂明  
東京大学分子細胞生物学研究所教授

【研究要旨】

骨粗鬆症の予防・治療薬として用いられる選択的エストロゲン受容体調節因子は骨に対してエストロゲン作用を示しつつ、乳腺や子宮などに対しては抗エストロゲン作用を示すことが知られている。骨における SERM のエストロゲン作用はエストロゲン受容体の N 末側転写活性化能と C 末側転写活性化能の協調作用により発揮される。そのため従来用いられてきた N 末側転写活性化能単独あるいは C 末側転写活性化能単独を用いた転写共役因子複合体の精製手法の適用が困難である。そこで大量培養が容易な浮遊 HeLa 細胞を用い、タグを融合した full length のエストロゲン受容体恒常発現株を樹立した。これにより生化学的手法を用いた SERM 特異的転写共役因子複合体の精製が可能になった。

A. 研究目的

骨粗鬆症の予防・治療のためのホルモン補充療法においては、骨に対してエストロゲン作用を示しつつ、乳腺や子宮などに対しては抗エストロゲン作用を示す選択的エストロゲン受容体調節因子 (SERM) を用いることによって、乳癌や子宮内膜癌の発症リスクを低減させる工夫がなされている。

エストロゲン受容体は N 末側と C 末側に 2 つの転写活性化領域を有し、それぞれ activation function-1 (AF-1)、AF-2 と呼ばれている。AF-2 はリガンド結合ドメイン内に存在し、主として細胞内に普遍的に存在する転写共役因子群により制御されている。タモキシフェンをはじめとする SERM が組織特異性を発揮するためには、組織特異的な転写共役因子を結合することのできる AF-1 が必要である。すなわち、SERM は AF-2 の本体であるリガンド結合ドメインに結合しつつ、

AF-1 機能を通じてその作用を発揮する。

我々は既に、エストロゲン受容体 AF-2 転写共役因子として GCN5 を含む複合体を同定し、p300/p160 複合体、DRIP/TRAP 複合体に引き続く、第 3 のクラスの新たな転写共役因子複合体であることを示した (Yanagisawa et al., 2002)。またエストロゲン受容体 AF-1 転写共役活性化因子として RNA ヘリケース p68/p72、エストロゲン受容体 AF-1 転写共役抑制因子として RNA 認識モチーフを持つ p54 を同定してきた。これらの因子は AF-1 領域単独あるいは AF-2 領域単独の bait を用いて精製したものであり、これらの系を用いて、AF-1 と AF-2 の相互作用により機能を発揮する SERM 結合時のエストロゲン受容体転写共役因子を精製することは困難である。そこで大量培養が容易な HeLa 細胞から、full length のエストロゲン受容体を恒常的に発現する細胞株の樹立を行い、SERM 結合時の

エストロゲン受容体転写共役因子複合体の解析を試みた。

## B. 研究方法

FLAG タグを付けた full length エストロゲン受容体発現ベクターを浮遊 HeLa 細胞にトランスフェクションし、ネオマイシン耐性を利用して恒常発現株を樹立した。エストロゲンあるいはタモキシフェン存在下でエストロゲン受容体恒常発現株を大量培養し核抽出液を調製した。抗 FLAG ペプチド抗体カラムを用いてエストロゲン受容体転写共役因子を精製し、グリセロールグラジエント法を用いて複合体の大きさを推定した。

## C. 研究結果

FLAG タグを付けた full length エストロゲン受容体恒常発現株を 8 クローン樹立した。これらの細胞株のエストロゲン受容体の発現量は、核抽出液 1ml 当たり 0.1~1ug 程度であり、これは、エストロゲン受容体陽性乳癌細胞株 MCF-7 と比較しておよそ 10 分の 1 の発現量であった。

次に、エストロゲン受容体恒常発現株の発現するエストロゲン受容体が機能的であるかどうかを調べるため、レポーターアッセイを行った。エストロゲン応答配列の下流に TATA box とルシフェラーゼ遺伝子を組み込みエストロゲン受容体恒常発現株にトランスフェクションした。その結果 8 クローンすべてでエストロゲン応答性を示し、おおよそ 10 倍の転写活性化が見られた。これにより、エストロゲン受容体恒常発現株が機能的なエストロゲン受容体を発現していることが確かめられた。

さらに、得られたエストロゲン受容体恒常発現株をエストロゲンもしくはタモキシフェン存在下で大量培養し、核抽出液を調製して転写共役因子複合体の精製を行った。現在複合体構成因子をウエスタ

ンブロットティングと MALDI-TOF MASS を用いて解析中である。

## D. 考察

今回我々は、浮遊 HeLa 細胞より、エストロゲン受容体恒常発現株を樹立した。この細胞株はエストロゲン添加時に比べタモキシフェン添加時にやや増殖抑制傾向を示したこと、およびレポーターアッセイの結果から、HeLa 細胞においてはタモキシフェンはアンタゴニストとして作用していると考えられる。SERM 結合時のエストロゲン受容体転写共役因子複合体の構成因子を同定し、それらの因子の骨組織での発現量を検討することにより、SERM の骨組織におけるアゴニスト作用を解明する糸口が得られると思われる。

今後はこれら核内受容体および転写共役因子複合体の生体内高次機能を明らかにするため、ノックアウトマウスを作製して解析を行う。我々は既に Cre-loxP システムを用いることによりアンドロゲン受容体ノックアウトマウスの作製に成功しており、骨形成作用に対するアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体の関与について解析中である。また、ビタミン D 受容体転写共役因子複合体の構成因子として当研究室で同定されたクロマチン修飾関連因子のノックアウトマウスの作製が進行中である。

また、ノックアウトマウスによる *in vivo* の解析と平行して、転写共役因子複合体の機能を *in vitro* で詳細に解析するために、クロマチン再構成系、リコンビナントヒストン作製系、*in vitro* 転写系などが当研究室において精力的に進められており、核内受容体とその転写共役因子の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割を解明するための強力なツールになると思われる。

## E. 結論

浮遊 HeLa 細胞を用いて full length の

エストロゲン受容体恒常発現株を樹立した。この細胞株を用いて SERM 結合時のエストロゲン受容体転写共役因子複合体を同定することにより、骨粗鬆症治療薬としての SERM の組織特異的な転写活性化メカニズムの解明が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 【英文原著】

1. 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
2. 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
3. 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* 5, 224-230, 2003
4. 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
5. Ishitani K, Yoshida T, Kitagawa H, Ohta H, Nozawa S, Kato S: p54<sup>nrb</sup> acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 660-665, 2003
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-1 (ChM-1) is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 23, 636-644, 2003
7. 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
8. Taketani Y, Nomoto M, Yamamoto H, Isshiki M, Morita K, Arai H, Miyamoto K, Kato S, Takeda E: Increase in IP3 and intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 287-291, 2003
9. 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
10. 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
11. Kato S, Takeyama K: Expression cloning of ligand biosynthetic enzymes. In



Methods in enzymology, Vol. 364, Nuclear Receptors, ed. by D.W. Russel and D.J. Mangelsdorf, Elsevier, Inc., San Diego, CA, pp. 361-375, 2003

12. 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* 144, 5138-5144, 2003
13. 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* 18, 127-141, 2003
14. 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* 101, 1673-1678, 2004
15. 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. 学会発表

### 【国際学会】

1. Kato S: SERMs: Molecule Level Action Mechanism Update, (2003.6.3-7) First Joint Meeting for International Bone and

Mineral Society-Japanese Society for Bone and Mineral Research, Osaka (2003.6.3-7)

### 【国内学会】

1. 松本高広、佐藤隆史、河野博隆、渡辺資之、植松良勝、福田亨、山田高嗣、山本陽子、中村貴、吉村公宏、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、加藤茂明: 脳の性差とその性分化を誘導するアンドロゲン受容体の機能 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
2. 大竹史明、馬場敦史、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明: ダイオキシン受容体を介したエストロゲン受容体制御機構の解析と相互作用複合体精製の試み (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
3. 大石元、北川浩史、高田伊知郎、和田修、柳沢純、加藤茂明: 癌抑制遺伝子 BRCA1 は GCN5 複合体と結合し、転写活性と DNA 損傷修復の両機能を促進する (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
4. 田中佐依子、松本高広、山田高嗣、盛真友、佐藤隆史、Pierre Chambon、加藤茂明: 骨格パターンニングにおける性差形成因子の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
5. 中村貴、渡辺資之、福田亨、山本陽子、松本高広、吉村公宏、宮本純子、椎名博子、田中佐依子、盛真友、中道裕子、佐藤隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤茂明: 破骨細胞特異的性ステロイドホルモンレセプター遺伝子欠損マウス作出の試み (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
6. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexander Kouzmenko、加藤茂明: ショウジョウバエを用いたヒトエストロゲンレセプター転写制御機構の解明 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症における疾患モデルマウスの作製  
ならびにその生体作用機構の解析

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講師

【研究要旨】

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症における疾患モデルマウスの作製ならびにその生体作用機構の解析を目的とする。多因子性疾患である骨粗鬆症について、その疾患因子候補としてのエストロゲン、ビタミンK関連遺伝子について、集中的かつ網羅的に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。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骨組織で過剰発現をさせる系を確立した。特に、臨床では骨形成マーカーとして使用されているビタミンKの関連因子として知られるBGP (Bone gla protein ; オステオカルシン) を骨芽細胞特異的に過剰発現させた結果、胎生の18.5日の胎児において既に骨に石灰化異常を示すことが、本研究により示された。この遺伝子改変モデルマウスを利用して、それぞれの因子の生体内での骨機能に関してカスケードおよびシグナル伝達を中心とした解析をすることにより、分子レベルで骨粗鬆症を網羅的に解明する。さらに今後の研究の方向性として、病態のメカニズム、治療法への応用性、骨粗鬆症の治療効果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貢献することを目指す。

A. 研究目的

骨粗鬆症の治療薬としてその有効性または可能性が高いことが報告されている物質について、カルシトニン、ビタミンD、ビタミンK、PTH、エストロゲン、ビスフォスフォネートが治療薬として考えられており、また実際に臨床におけるデータよりその有効性が示されているが、その作用機序・骨代謝以外のリスク等については、未だ不明な点が多く生体内での機能解析が必須と考えられる。これらの生体内での作用メカニズムを分子レベルで解明し、骨粗鬆症疾患遺伝子の検索、シグナル伝達、および相互作用に関する

研究を行うことで、新規の治療法および創薬の可能性を示すことが、今後の重要な研究課題と考えられる。とりわけ将来的な治療法として極めて重要なコンセプトとして、生体内で副作用が少なく骨形成作用を持つ新規因子の同定が急務と考えられる。

本研究課題における、分担項目としてエストロゲン、ビタミンK関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを作製することにより、動物個体を利用することでしか得られない、生体機能、薬剤の効果・影響を検討できる点が遺伝子改変マウスを使用する利点と考えられる。その際、

実際に骨代謝で重要と考えられる候補因子群について、マウスで遺伝子改変を行った場合、これらの個体においては、種々の理由（例えば、軟骨の石灰化異常により、肺呼吸不全、授乳不可能等）から胎生期で致死となる可能性が高く、遺伝子改変マウスをライン化して、再現性および信頼できるデータとして吟味することが困難であった。それら問題点を改善するため、本研究課題では、コンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスシステムを開発し、個体での網羅的な解析を行う。

最終目的は、本研究課題により明らかにされると期待できる候補標的因子群を同定し、これらの標的因子群の生体内における骨作用を解明し、それら標的因子の相互作用やシグナル伝達に関する研究を通して、異なる作用点を持つと考えられる因子について分子レベルで骨粗鬆症を体系的に解明することである。さらに、本研究課題で作製される骨粗鬆症疾患モデル動物を利用して、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、実際にこれらの疾患モデル動物を利用して、骨粗鬆症の治療効果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貢献することを目指す。

## B. 研究方法

分担者の研究分担項目のうち、受容体・酵素系等を介して作用する骨粗鬆症疾患の治療薬であるビタミンK、エストロゲン等のシグナル経路について集中的かつ網羅的に遺伝子改変動物の作製を行う。特に分担者は、本年度にビタミンK関連因子としての $\gamma$ -カルボキシラーゼおよびそのグラ化標的タンパクであるBGP (bone gla protein)について、遺伝子改変マウスの作製を行う。エストロゲンのシグナル経路を集中的かつ網羅的に解析するために、エストロゲン受容体 (ER  $\alpha$

および ER  $\beta$ )、その下流応答遺伝子群に焦点を絞り解析を行っていく。なお、ビタミンDとアンドロゲンの受容体に関しては、本研究課題の分担者である加藤茂明教授（東大・分生研）が既にその受容体の遺伝子改変マウスを作製しており、分担項目として分かれている。それ故、当分担研究者は治療薬・新規標的候補としてエストロゲンおよびビタミンKについてのシグナルを網羅的に解明するために、本研究課題での分担項目として以下の研究を行う。

*in vitro*の実験系においては、DNAマイクロレイ技術を利用することにより、エストロゲン受容体の下流応答遺伝子群の発現プロファイル化を検討することにより、エストロゲンの受容体であるER  $\alpha$  および ER  $\beta$  について、それぞれの受容体特異的な下流応答遺伝子群の同定および *in situ* hybridization (ISH)法により確認・検討し、診断・治療を目的とした下流応答遺伝子群のリスト化を試みる。さらに骨粗鬆症疾患との関連および標的遺伝子とのシグナル伝達の関連性について検討および吟味する。

*in vivo*での実験系では、疾患遺伝子および標的遺伝子群の候補について、生体内におけるgain of functionを行う実験系の確立、および遺伝子改変モデル動物の作製を行うことにより、骨代謝におけるエストロゲン・ビタミンKシグナルの解明、および治療法の確立を目指す。以上の研究課題を遂行するために、先ず具体的に大きく分けると5つ研究材料が必要となり、これらの材料および疾患モデル動物の作製を行う。

1. エストロゲンについては、エストロゲン受容体 (ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$ ) から転写される下流応答遺伝子群について検討するために、活性型 (constitutive active form) caER  $\alpha$ 、caER  $\beta$  の組換えアデノウイルスの作製
2. 活性型caER  $\alpha$ 、およびcaER  $\beta$  トランス

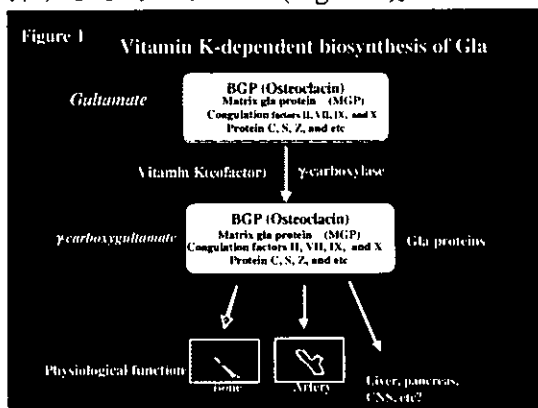
ジェニックマウスの作製およびその解析

1. ビタミンK関連遺伝子群としてビタミンK依存性γ-カルボキシラーゼの組換えアデノウイルスの作製
1. ビタミンK依存性γ-カルボキシラーゼおよびそのグラ化標的タンパクとしてのBone Gra Protein) BGP、等のビタミンK 関連遺伝子のトランスジェニックマウスの作製およびその解析
1. 骨組織特異的に遺伝子改変するための組換え酵素Creを発現するマウスの準備および実験系の確立

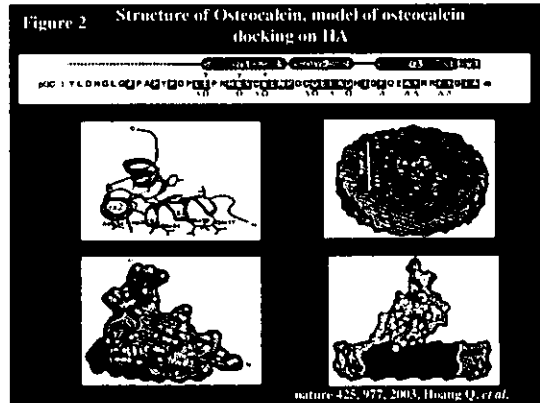
### C. 研究結果

#### 1. 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

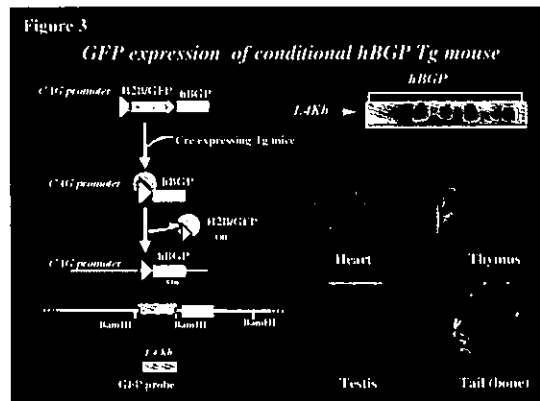
ビタミンKに関連する骨疾患遺伝子の候補として、γ-カルボキシラーゼおよびそのグラ化の標的タンパクであるBGPに関して、cTgマウスの作製を行った結果、両遺伝子において数ラインのcTgマウスが得られた。BGP (Bone Gla protein: Osteocalcin) は、血中における代表的な骨代謝マーカーとして知られており、実際に骨形成の指標とされている。BGP遺伝子のKOマウスの表現型では、石灰化異常を伴う顕著な骨量増加が報告されている。また、BGPは名前の通りビタミンK依存性γ-カルボキシラーゼのグラ化標的タンパクであり、プロセッシングおよびグラ化修飾を受けて本来の機能を発揮すると考えられる (Figure 1)。



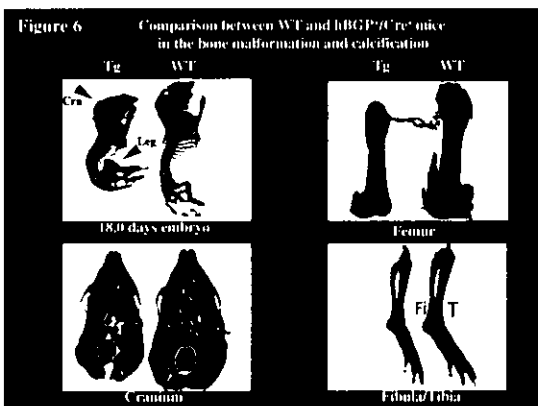
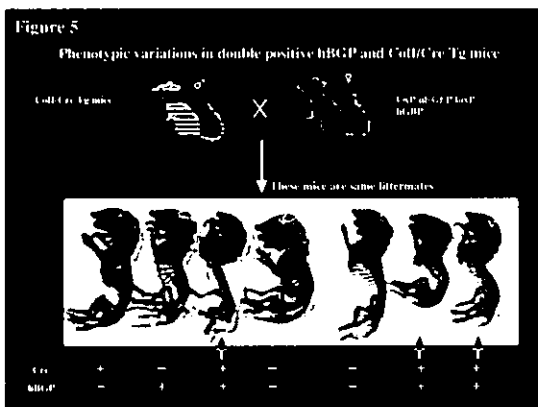
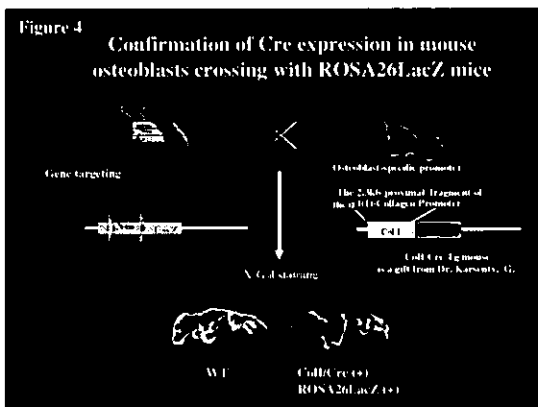
最近の3次元の立体構造解析の結果から骨においてBGPは、ビタミンK依存性γ-カルボキシラーゼのグラ化修飾を受けて、ハイドロキシアパタイトとカルシウムと強固に結合するモデルが報告された (Figure 2)。



BGPの骨代謝における役割を検討するために、ヒトBGP cDNAを単離し、Cre/loxP系を利用して、コンディショナルにgain of functionできる遺伝子改変マウスを作製した。Cre処理前では、GFPをマーカー遺伝子として発現しており (Figure 3)、Cre処



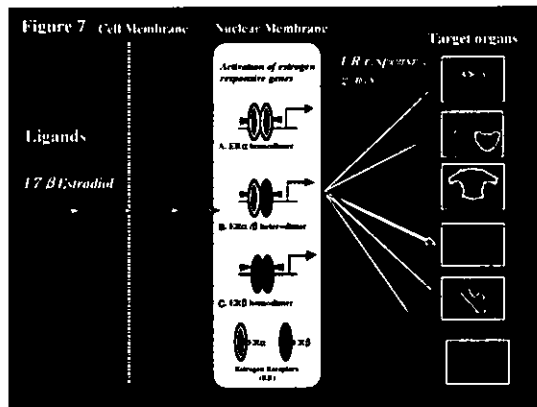
理後ではGFPが除去されBGPが強制発現される系である。骨組織特異的にCreを発現しBGPを強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して (Figure 4)、生体におけるBGPの骨代謝への作用について解析を行った結果、マウス胎生後期から軟骨組織において石灰化の遅延する傾向が観察され (Figure 5)、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形



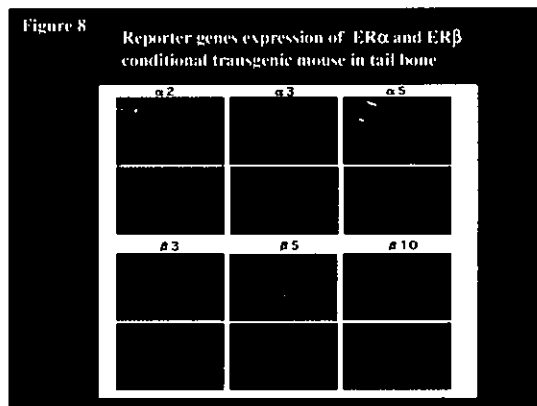
成が見られた(Figure 6)。

2. ER $\alpha$ および ER $\beta$ の生体内 Gain of function による骨機能の解析

エストロゲンは、女性ホルモンとして重要な生殖機能、生理機能を発揮する核内受容体 (ER $\alpha$ および ER $\beta$ ) を介するリガンドとして知られている(Figure 7)。特に骨代謝においては、退行期骨粗鬆症疾患の重要な因子として知られており、エストロゲンに関しては、リガンド非依存性活性型エストロゲン受容体 (caER $\alpha$ 、



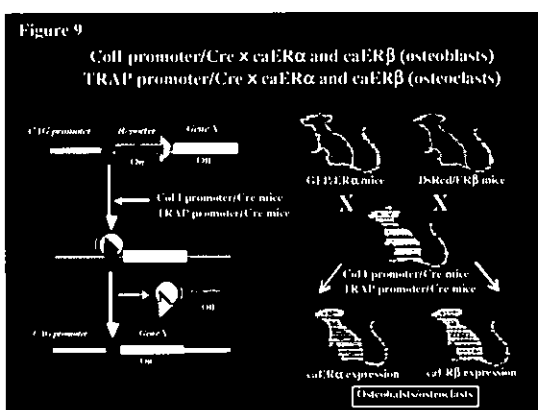
およびcaER $\beta$ ) について、コンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスをそれぞれについて作製を行い、それぞれcaER $\alpha$ およびcaER $\beta$ について10ライン以上のトランスジェニックマウスが得られた。また、これらのcTgマウスは普段GFPまたはDsRedを発現しており、予め個体において外来遺伝子の発現部位を予測できることが示された (Figure 8)。さらに、



これらのマウスを交配させることにより、caER $\alpha$ ・ER $\beta$ のシグナルを同時に活性化させるcTgマウスの作製、および KOマウスを利用して骨特異的かつ特異的シグナルを付加・欠損したマウスを交配により得て、生体内でのエストロゲンシグナルを体系的にとらえ骨代謝の作用について検討する。さらにエストロゲン下流応答遺伝子として骨代謝に関連すると想定される遺伝子としてカルシトニン関連遺伝子の同定に成功した。さらに、現在これらの遺伝子について遺伝子改変動物の作製および解析を行っている。

#### D. 考察

エストロゲン受容体およびビタミンKに関連した遺伝子に関して、それぞれの遺伝子をマウス個体で過剰発現した場合、胎生期において骨代謝に影響を及ぼすことが想定され、骨代謝研究に制限があり、マウスをライン化することすら困難と考えられたが、コンディショナルトランスジェニックマウスにすることにより、胎生期以降の骨代謝研究にも応用できることが示唆された。つまり、閉経後ならびに老人性骨粗鬆症の疾患モデルマウスの開発を目指す本研究課題の目的に合致しており、今後、如何に生体内の骨組織において時期・分化特異的な関連遺伝子群のgain of functionを行うかが、今後の研究課題の鍵となると考えられる。つまり、それぞれのシグナルが本来持つ生理機能を解明するために、骨組織特異的にエストロゲン・ビタミンKシグナルを過剰発現、または異所性発現させることが必要である。さらに研究を進展させるためには、マウス個体において、より厳密に組織交換酵素Creを発現させる研究資材が必要であり、骨芽細胞系または破骨細胞系のみで発現できる遺伝子改変マウスの作製を来年度の重要項目として研究を継続することが適切と考えられる(Figure 9)。



エストロゲンシグナルに関しては、骨代謝におけるシグナル特異性の検討、下流応答遺伝子群の遺伝子改変マウスの骨代謝における作用の解析を中心に行い、ビタミンKに関しては、疾患モデルマウ

スの作製、その受容体の同定やグラ化標的タンパクの同定・解析を中心に研究を進め、骨代謝におけるビタミンKの必要性やその作用機序を明確にすることにより、老人性骨粗鬆症の新しい創薬および治療法の開発の鍵となると考えられる。

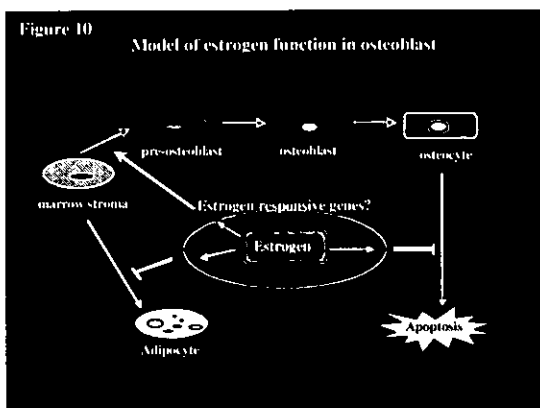
#### E. 結論

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を行った結果、Col1プロモーター/Creにより骨芽細胞特異的に BGPを過剰に発現させた場合、マウス胎生後期から軟骨組織において石灰化の遅延する傾向が見られ、これらのマウスから得られた仔マウスでは出産後に生存することが困難と示唆された。胎生期において母方由来の補酵素であるビタミンKの胎盤通過性がほとんどないことが報告されており、それ故、BGPが $\gamma$ -カルボキシラーゼの修飾がなく非グラ化タンパクとして存在する可能性があると考えられる。今後、骨芽細胞で過剰発現したBGPについて、グラ化の有無について検討する必要があると考えられる。さらに、ビタミンK、 $\gamma$ -カルボキシラーゼ付加および欠乏状態を実験系で確立することにより、個体での骨組織における影響・効果について検討する。

エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨代謝における機能については、選択的にER $\alpha$ またはER $\beta$ シグナルをGain of functionすることが可能な、コンディショナルトランスジェニックマウスを全てそろえることができた。さらに、下流応答遺伝子群の遺伝子改変マウスの作製についても、順次おこなっており、エストロゲン⇒エストロゲンレセプター⇒下流応答遺伝子群⇒生理作用(骨代謝)に見られる一連のエストロゲンシグナルを網羅的に解析して行く予定である。

平成16年度迄に、特にエストロゲンシグナルにおける下流応答遺伝子群の骨芽

細胞での骨形成機能に注目し、ER KOマウスとコンディショナルトランスジェニックマウスを交配することにより、より明確なシグナルカスケードを構築し、新規診断マーカーの検討や、シグナルカスケードを明らかにすることにより、新規の治療標的の検討を目指す(Figure 10)。



加えて、ER KOマウスと下流応答遺伝子の遺伝子改変マウスを交配し、特異的なエストロゲンシグナルが欠如した状態で、直接的に骨形成能がある下流応答遺伝子の同定を目指し、別の作用点を持つ因子について個体のみでしか得られない総合的な影響や網羅的な解析を展開することにより、疾患モデル動物の作製およびこれらの動物を利用した治療効果の検討を行う。

## F. 発表

### 1. 論文発表

【英文原著】

- 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* (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

【国内学会】

- 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
- 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
- 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
- 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 $\alpha$ およびER $\beta$ 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
- 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
- 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)

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担報告書

細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の  
骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

分担研究者 堺 隆一  
国立がんセンター研究所部長

【研究要旨】

骨粗鬆症の疾患遺伝子の解析において、DNA チップ、マイクロアレイにより得られた情報を正確に理解するためには、同時にそれらの遺伝子産物の蛋白質としての機能を解析することが必須である。本研究は、ゲノム・遺伝子の構造解析では解決できない蛋白質の修飾や複合体形成などが、骨粗鬆症発症においてどのように変化するかを知る目的で、プロテオーム分析による網羅的アプローチと生化学的手法による個別のアプローチとの併用により解析を進めている。さらに細胞への遺伝子導入や遺伝子改変動物の作成などの手法と組み合わせることにより病態の理解を深めることを目標とする。これまでにチロシンリン酸化蛋白質や蛋白質複合体の変化を網羅的に解析する手法を確立して、骨代謝系の細胞の解析に用いようとしている。またステロイドホルモンが細胞内シグナル伝達に関わる分子群に直接働きかけ、短時間でその効果を表す non-genomic な細胞内シグナルと Src ファミリー等による蛋白質のチロシンリン酸化を介したシグナルの 2 つの経路に注目して、骨代謝制御機構を明らかにすることを試みており、これにより、カルシトニン、PTH、ビスフォスフォネート、ビタミン K やその他の既存の骨粗鬆症治療薬の薬理作用について理解を深めると共に、骨粗鬆症の診断・治療に役立てることを目指している。

A. 研究目的

骨粗鬆症とは、主として加齢や生活習慣の変化などにより骨吸収と骨形成からなる骨代謝のバランスが崩れることで、骨量の病的減少が引き起こされた状態と考えられる。その発生に関わるファクターとしては、エストロゲン、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモンなどのホルモンバランスやカルシウム代謝などが知られており、加齢などによってこれらの正常な調節が崩れると破骨細胞の機能亢進や

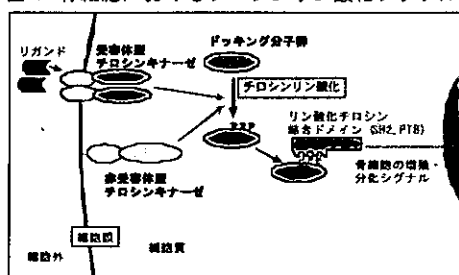
骨芽細胞の機能低下が引き起こされるものと推定されている。本研究の目的は、このような破骨細胞や骨芽細胞の機能がどのような機構により制御されているかを、細胞内シグナル伝達の解析により明らかにすることである。近年では、骨芽細胞の BMP 蛋白質群による分化制御に関する詳細な知見に加えて、破骨細胞においては RANKL 蛋白質が膜上の受容体 RANK を介してその分化や活性化を制御していることが分かってきた。このような骨代謝細胞に細胞外から働きかける分



子による刺激が、実際にどのような細胞内のシグナル伝達分子を介して、どのように細胞の機能・増殖・生存を制御するのかを明らかにしたいと考えている。そのために、分化刺激などによっておこる蛋白質の変化を網羅的に解析する。これらの解析には、最近広く行われている DNA チップ・マイクロアレーなどを用いた網羅的な発現解析に加えて、二次元電気泳動による蛋白質発現解析、Flag タグによる複合体解析や二次元電気泳動解析などプロテオミクスの諸手法を用いていくつもりである。エストロゲン、副甲状腺ホルモン、ビタミン D 等の刺激により骨芽細胞、破骨細胞系の培養細胞での発現量に顕著な変化のみられた蛋白質について質量分析により同定し、抗体を用いた生化学的解析や、ノックアウトマウスを用いた発生工学的解析により、実際の生体での骨の形成や吸収における役割を明らかにする。

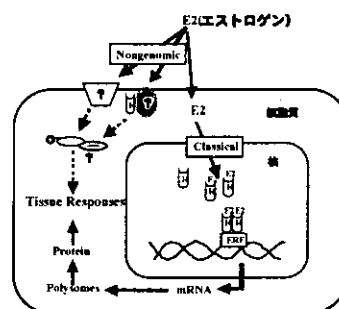
更に蛋白質の修飾については特にチロシンリン酸化を含む蛋白質群について集中的・網羅的に解析を進める。図 1 に示すようにこれらの蛋白質は受容体型チロシンキナーゼや Src ファミリーなどの非受容体型チロシンキナーゼの基質として、細胞の増殖や生存に関わるシグナルを伝える分子が多く含まれることが骨を含め多くの細胞系において知られている。この目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持ち込むため新しい技術の開発を

図 1 骨細胞におけるチロシンリン酸化シグナル



行う。以上のような手法を用いて各種刺激により骨細胞に起こる細胞内変化に遺伝子発現-蛋白質発現-蛋白質修飾-複合体形成の 4 つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。現時点で特に重要であると考えているのは、骨粗鬆症の成因の一つであるエストロゲンがどのようなシグナル伝達分子群を介して骨代謝に関わるかを明らかにすることである。エストロゲンに関しては図 2 に示したように受容体を介して核内で転写制御に関わる作用 (classical) の他に、核外のシグナル伝達分子に働きかけ RNA や蛋白質の合成を伴わずに短時間で起こる作用 (non-genomic) が血管細胞、骨芽細胞、乳癌細胞などでここ数年提唱されており、シグナル伝達の側面からは後者

図 2 エストロゲンの古典的作用と核外作用



が特に興味深い。一方で破骨細胞の機能維持や生存に関わると考えられている Src チロシンキナーゼが、破骨細胞でどのような分子群のリン酸化を介してその機能を発揮するのかを解析する。ごく最近、骨以外の系ではあるがステロイドホルモン受容体 (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) が核外で Src キナーゼの相互作用することを示唆するデータが発表されている。前立腺癌細胞 (LNCaP) や乳癌細胞 (MCF-7) などでは、ER $\alpha$  と ER $\beta$  が Src キナーゼの調節領域の Src 相同領域 2 (SH2) に結合し、アンドロゲン受容体 (AR) が同じく SH3 領域に結合することが示された。この結

合が、通常は分子内結合により不活性化している Src を活性化しその結果として Ras や下流の Erk の活性化と細胞の増殖亢進モデルが提示された。このような核外の作用が骨代謝細胞においても機能している可能性がある。それにより骨粗鬆症の病態をできる限り正確に把握し、骨粗鬆症の診断や、分子レベルでの治療法の開発に結びつけることをめざすものである。

## B. 研究方法

### (1) 骨芽細胞・破骨細胞の分子発現制御機構の解析

骨芽細胞や破骨細胞に分化や活性化の刺激を与えることが知られる外的刺激によって、細胞内に起こる遺伝子・蛋白質発現を網羅的に解析する。第一に BMP/TGF- $\beta$  ファミリーにより誘導される骨芽細胞への分化や、RANKL または M-CSF 刺激により誘導される破骨細胞への分化をモデル系にして、骨芽細胞や破骨細胞の成熟に伴い特異的に発現する分子群を、マイクロアレイによる遺伝子発現解析と蛋白質の 2 次元電気泳動により解析し、発現の変化する遺伝子に関してはデータベース検索よりその遺伝子産物の機能を推定し、蛋白質に関してはスポットを切り出し質量分析から発現の変化する蛋白質の同定を試みる。破骨細胞についてはその機能調節に関わると考えられるエストロゲン、副甲状腺ホルモン、ビタミン D 等による刺激やフィブロネクチンへの接着によるインテグリン刺激により誘導される分子群を同様の手法により解析する。さらに骨粗鬆症の治療薬として使われ、その明確な作用機序がわかっていないビスフォスフォネートやビタミン K などの薬剤についても、誘導される遺伝子蛋白質に関する情報を得る。細胞蛋白質の溶出液の調整においては、可溶性分画と不溶性分画に分けてそれぞれを別個に二次元電気泳動で解析すること

により、機能調節に伴って細胞質から膜成分への移行する蛋白質群についても情報を得ることを試みる。遺伝子・蛋白質の発現量に関する情報はデータベース化し、今後の複合体解析などで得られた特定の分子の発現細胞・発現量変化などが参照できるような形にして保存する。

### (2) 2 次元電気泳動・免疫沈降によるチロシンリン酸化の解析

上記のような種々の刺激で細胞内のチロシンリン酸化にどのような変化が起こるのかを解析する。実際には、リン酸化チロシンを含むスポットの変化をただ観察するだけではなく、未知のスポットは切り出して質量分析によって同定を行う必要があり、総タンパク量に対するリン酸化蛋白質の比率がきわめて低いことから、リン酸化チロシンを含む蛋白質を精製してから解析することが望ましい。そのためにまず、抗リン酸化チロシン抗体 4G10 を用いて細胞溶出液を効率よく精製する方法論の確立が重要である。精製した蛋白質を 2 次元電気泳動にかけ、個々のスポットを銀染色で同定するとともに、直接対応する細胞溶出液を抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットで解析し、チロシンリン酸化蛋白質を検出する。このようにして各種基質・ドッキング蛋白質のスポットを可能な限り同定し、刺激による発現量、リン酸化の程度の変化を記録する。また主要ドッキング蛋白質 Shc、IRS-1、FRS2、Cas、Dok、Gab-1 などについては、免疫沈降後、リン酸化チロシン抗体や特異抗体でウエスタンブロット解析し、リン酸化チロシン含量の変化、結合蛋白質の変化などを観察する。

### (3) 刺激で誘導される SH2、PTB 結合リン酸化蛋白質の複合体分析

Src、Fyn、Grb2、Shc、Crk 等、主要なシグナル伝達分子の SH2 領域と PTB 領域を RT-PCR で増幅してクローニングし、哺乳類細胞で Flag タグとの融合蛋白質の形で発現させるベクターを構築する。具

体的には Crk-SH2、Grb2-SH2、Nck-SH2、Shc-SH2、Shc-PTB の各ドメインを既にクローニング済みであるのでこれをさらに広げる。これらのリン酸化チロシン結合ドメインをそれぞれ分化誘導・各種ホルモン刺激・細胞接着などで刺激した骨芽細胞や破骨細胞に一過性に発現させ、抗 Flag 抗体と抗リン酸化チロシン抗体による二段階の特異的精製法により結合するチロシンリン酸化蛋白質群を通常の SDS-PAGE あるいは 2 次元の SDS-PAGE で解析する。特にインテグリンやエストロゲン刺激によってリン酸化チロシン含有量の変化する蛋白質に着目し、分子量や 2 次元での位置から予想がつくものについては既存の抗体などを用い、あるいは質量分析により同定し、(2) の結果と併せて骨細胞内のチロシンリン酸化蛋白質データベースを構築する。結合が予想される分子群については、特異抗体を用いて細胞内での直接の結合を確認する。更にどのようなチロシンキナーゼが活性化しているかをみるために Src ファミリーキナーゼ (Src、Fyn、Lyn、Fgr、Lck、Yes) や Abl、Fak などの非受容体型チロシンキナーゼ、FGF-R、PDGF-R、Ret などの受容体型チロシンキナーゼのキナーゼ活性の刺激による変化を自己リン酸化ないし、enolase などの外部基質を用いたキナーゼアッセイにより測定する。

#### (4) 蛋白質発現阻害による骨代謝における役割の細胞生物学的解析

ここまでの解析の結果から、特に骨代謝の調節の鍵を握ると予想される蛋白質群を絞り込み、それらの発現を抑えることにより骨形成にどのような影響を与えるかを解析する。In vitro の系としては、近年開発された RNAi の手法を用い、骨代謝細胞内での発現を抑えることで、骨芽細胞においてはその増殖能や遊走能に、破骨細胞においてはその細胞の生存能や破骨活性にどのような影響が出るかを解析する。一部の分子については、ゲノム

構造を解析して、発生工学的手法を用いてその遺伝子発現を欠損したノックアウトマウスの作成をおこない、骨形成にどのような影響が出るか、加齢やステロイドホルモンの過剰投与による骨粗鬆症の発生の程度が変わるかどうかを解析する。既に Src チロシンキナーゼの主要な基質で破骨細胞に強く発現してリン酸化を受けているドッキング蛋白質 Cas のノックアウトマウスを樹立し、維持しているので、このマウスにおける骨異常の解析も行う予定である。また骨芽細胞、破骨細胞の初代培養を行い詳細にわたる機能解析を行う。

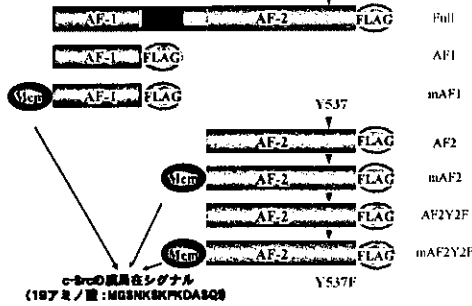
### C. 研究結果

昨年度から今年度にかけては、蛋白質の生化学的解析に用いられるだけの量の、骨細胞系の分化や初代培養による調整法を検討する傍ら、大量の準備が可能な骨肉腫などの腫瘍細胞株を用いた発現、リン酸化レベルでの解析やノックアウトマウスから調整した初代培養細胞や腫瘍細胞などを用いたエストロゲンの核内・核外の作用の解析やインテグリン-Src 経路の解析を通じて、本研究に用いる手法の確立を行った。

#### (1) エストロゲンの骨代謝における作用

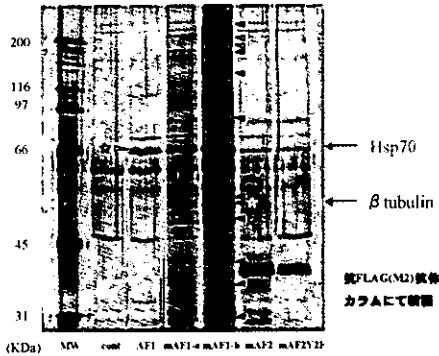
骨細胞においてはエストロゲンの核内における作用については精力的に研究が進められてきており、核外での作用についても即時的反応を示唆するデータは上がってきているものの、具体的なシグナル経路について多くは知られていない。2001 年に Kousteni らは、骨細胞のエトポシドによるアポトーシスが、エストロゲンやアンドロゲンを介して抑制されるという現象に、受容体の膜への局在や即時的な細胞内シグナル伝達が関与していることを明らかにした。我々はこのデータに基づき、膜局在型のエストロゲンが伝えているシグナルを明らかにする目的で図 3 に示すようなエストロゲン機能ドメ

図3 エストロゲンの各ドメインコンストラクトの作成



インを Flag タグを付加した形で膜に発現するコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを用いて結合蛋白を精製する条件がうまく行くか知る目的で、同じように核外の作用が報告されている乳癌細胞 (MCF-7) に導入して安定発現株を樹立した後、大量培養した細胞溶出液から抗 Flag 抗体で結合蛋白質を精製した。図4に示す通り AF1 ドメインに結合する蛋白質として Hsp-70 とβチューブリンの同定に成功した。そのうちβチューブリンは膜局在タイプの AF-2 に選択的に結合することが確かめられた。現在これら蛋白質の機能とエストロゲンの骨作用との関わりについても解析中である。

図4 ER結合分子の銀染色による同定

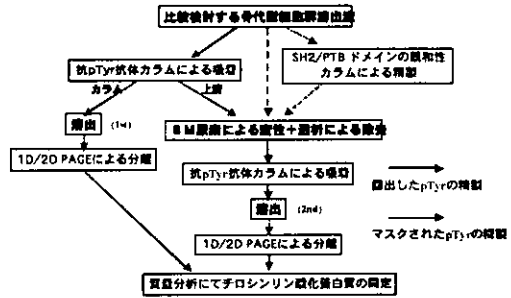


(2) チロシンリン酸化蛋白質の分離法の確立

刺激前後など2つの系でのチロシンリン酸化の差異を検出する目的で、まずチロシンリン酸化蛋白質を精製して1次元あるいは2次元電気泳動で分離したのち質量分析により同定する実験系を確立した。通常は1次元電気泳動では100 μg、

2次元電気泳動では500 μg程度の蛋白質サンプルまでしか、高解像度で分離することができないので、シグナル伝達分子のように発現量があまり多くない蛋白質の場合は、ウェスタンブロットや蛋白質ラベルによりリン酸化蛋白質の位置を確定できても量的に質量分析による同定のために足りない場合が多い。そのため抗リン酸化チロシン抗体カラムによる粗精製を分離前に行うことを考えたが、細胞内でチロシンリン酸化部位で他の蛋白質と複合体を形成しているものが多いため直接カラムにかけても結合しない分子が多いことがわかった。図5に流れ図として示したが、前もって細胞溶出液全体を高濃度の尿素で変性した後、尿素を徐々にのぞいてやると、Casなど既知のリン酸化蛋白質を指標にすると結合の効率が遥かに上昇することが確かめられた。

図5 チロシンリン酸化蛋白質の網羅的解析 (リン酸化チロシン: pTyr)



変性のステップを入れなくても抗リン酸化チロシン抗体カラムに結合するこれとは異なる量の多い一群の蛋白質群があることから、直接抗リン酸化チロシン抗体カラムに通した pass through に尿素による変性の操作を加えた後、再び直接抗リン酸化チロシン抗体カラムにかけ結合分子をとることで、ドッキング分子などのチロシンリン酸化部位で複合体を作る蛋白質群を効率的に濃縮できることを見出した。蛋白質の絶対量が少ないため質量分析で同定できなかったものも多く、質量分析に十分な量を集めるためには、か