

- K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18, 1131-1143, 2004.
5. Ezura Y, Kajita M, Ishida Y, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M: Association of Multiple Nucleotide Variations in the Pituitary Glutaminyl Cyclase Gene (QPCT) With Low Radial BMD in Adult Women. *J Bone Miner Res* 19, 1296-1301, 2004.
 6. Sudo Y, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: Association of a single-nucleotide polymorphism in the promoter region of leukemia inhibitory factor receptor gene with low bone mineral density in adult women. *Geriatr Gerontol Int* 4, 245-249, 2004.
 7. Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H: Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 218, 147-153, 2004.
 8. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N: Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clin Cancer Res* 10, 2687-93, 2004.
 9. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S: Identification and functional analysis of consensus adnrgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1312-1317, 2004.
 10. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Mario M: Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* 203, 193-201, 2005.
 11. Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res*, in press.
 12. Ikeda K, Inoue S: Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol*, in press.
 13. Kato S, Fujiki R, Kitagawa H: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 173-178, 2004.
 14. Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S, Matsumoto T: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem* 279, 35798-35802, 2004.
 15. Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene* 23, 6000-6005, 2004.
 16. Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: *In vivo* potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes Cells* 9, 983-992, 2004.
 17. Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J: Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome

- pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23, 4813-4823, 2004.
18. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S: Wnt/beta -catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279, 40255-40258, 2004.
 19. Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19, 1452-1461, 2004.
 20. Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K: Function of androgen receptor in gene regulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 627-633, 2004.
 21. Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K: Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol Cell Biol* 24, 6525-35, 2004.
 22. Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H: Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J* 23, 1075-1088, 2004.
 23. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Tubulin association and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor at the plasma membrane. *FEBS Let* 577, 339-344, 2004.
 24. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori M: Hippocampal Synaptic Modulation by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor. *J Neuroscience*, in press.
 25. Miyake I, Hakomori Y, Musu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R: Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene*, in press.
 26. Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, in press.
2. 学会発表
【国際学会】
1. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive gene in the growth control of breast tumors. 3rd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka (2004.4.15-18)
 2. Urano T, Fujita M, Hoshino S, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: [New Investigator Award] SNP detection implicated in Wnt-beta-catenin signaling molecules as a genetic marker for involutional osteoporosis. The American Geriatrics Society, 2004 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, NV, USA (2004.5.17-21)
 3. Inoue S: [Symposium] "Molecular and cellular analysis of steroid hormone receptor: Expression and its role in reproductive organs" Estrogen receptors and their downstream targets in breast tumors. 16th International Congress of the IFAA (International Federation of Associations of Anatomists), Kyoto (2004.8.22-27)
 4. Ikeda K, Inoue S: The estrogen-responsive gene COX7RP is a direct target of Estrogen-related receptor alpha and exhibits tumor-promoting activity in endometrial cancer. The Japanese Biochemical Society International Symposium in 2005, New Frontier of Transcription Research, Kusatsu (2005.1.11-12)
 5. Nakamura T, Watanabe T, Nakamichi Y,

- Fukuda T, Matsumoto T, Yoshimura K, Miyamoto J, Yamamoto Y, Shiina H, Tanaka S, Sakari M, Sato T, Metzger D, Chambon P, Kato S: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts: Generation and characterization of osteoclast-specific androgen Receptor knockout mice. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA (2004.10.1-5)
6. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Kawano H, Nakamura T, Yamada T, Karsenty G, Kato S: A genetic evidence of direct VDR function in osteoblasts: generation and analysis of osteoblast-specific VDRKO mice. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA (2004.10.1-5)
7. Shirode Y, Takeyama K, Kato S: Modulation of VDR function by a novel vitamin D analogue, ED-71, is mediated through a novel serum protein. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA (2004.10.1-5)
8. Kato S: Classes of nuclear receptor coregulatory complexes. ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, Louisiana, USA (2004.6.16-19)
9. Kato S: Transcriptional controls by nuclear receptors. University of Tokyo Forum 2004 in Sweden. Stockholm, Sweden (2004.8.24-25)
10. Kato S: The Williams Syndrome and the Vitamin D Receptor. Vitamin D Workshop Working Group. Seattle, Washington, USA (2004.10.4)
11. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Analysis of estrogen receptor signaling complex at the plasma membrane. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal (2004.8.31-9.4)
12. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: "Biological roles of hyperphosphorylated ShcC docking protein in neuroblastoma cells." 11th conference of Advances in Neuroblastoma Research, Genova, Italy, (2004.6.16-19)
- 【国内学会】
1. 星野眞二郎、井上聡、大内尉義：男性における骨粗鬆症の検討 (2004.4.8-10) 第 101 回日本内科学会 (東京)
 2. 保母るつ子、池田和博、武田省、井上聡：エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の子宮内膜癌における発現とその機能 (2004.4.12) 第 56 回日本産婦人科学会総会・学術講演会 (東京)
 3. 浦野友彦、藤田雅代、白木正孝、星野眞二郎、大内尉義、井上聡：Wnt-beta-catenin シグナル伝達因子における遺伝子多型が骨量に与える影響 (2004.6.16-18) 第 46 回日本老年医学会学術集会 (千葉)
 4. 木下博之、成沢研一郎、中村利孝、吉田英世、鈴木隆雄、大内尉義、井上聡、細井孝之：高齢女性の退行性脊椎病変における遺伝的素因の解析(2004.6.16-18) 第 46 回日本老年医学会学術集会 (千葉)
 5. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：エストロゲン応答遺伝子 Efp 結合蛋白の探索とその機能解析 (2004.6.24-26) 第 77 回日本内分泌学会学術総会 (京都)
 6. 井上聡；[ランチョンセミナー] 骨代謝におけるビタミン K の作用メカニズムとその役割 (2004.8.4-7) 第 22 回日本骨代謝学会 (大阪)
 7. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞におけるステロイド X 受容体 (SXR)ならびにビタミン K の新しい標的分子とその作用 (2004.8.4-7) 第 22 回日本骨代謝学会学術集会

8. 佐久間道子、赤平純平、鈴木貴、井上聡、伊藤潔、森谷卓也、笹野公伸、八重樫伸生：上皮性卵巣癌における Estrogen responsive RING finger protein (efp)の発現とその臨床病理学的意義 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
9. 江見充、須藤悦弘、梶田満子、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一：プロオピオメラノコルチン遺伝子 (POMC)の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
10. 須藤悦弘、梶田満子、中島敏晶、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一、江見充：IkB キナーゼ α および β 遺伝子 (IKKA, IKKB)の遺伝子多型と成人女性補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
11. 梶田満子、須藤悦弘、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一、江見充：破骨細胞随伴受容体遺伝子 (OSCAR) の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
12. 江面陽一、梶田満子、須藤悦弘、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充： α -アデューシン遺伝子 (ADD1)の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
13. 菱沼俊樹、池田和博、井上聡：Gene structure and interferon inducible expression of human ifp1 (2004.10.13-16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
14. 藤田雅代、浦野友彦、大内尉義、井上聡：骨芽細胞の増殖ならびに分化過程におけるステロイド応答遺伝子群の探索 (2004.11.17-20) 第 6 回日本骨粗鬆症学会 (大宮)
15. 井上聡：[ワークショップ]性ホルモン標的因子の同定とその機能 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
16. 今澤由紀子、津久井通、大羽沙弥佳、栗原真紀、堀江公仁子、村松正實、井上聡：Cre/lox P システムを用いた骨代謝におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
17. 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、禾泰寿、村松正實、井上聡：トランスジェニックマウスを用いた卵巣におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
18. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、藤田雅代、浦野友彦、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 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
19. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞におけるステロイド X 受容体 (SXR)を介したビタミン K の標的分子とその作用 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
20. 堀江公仁子、坊農秀雄、岡崎康司、井上聡：ゲノム情報に基づく新規アンドロゲン応答配列群の同定 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
21. 池田和博、保母るつ子、武田省、井上聡：細胞増殖におけるエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の役割 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
22. 山本陽子、吉澤達也、福田亨、加藤茂明：ビタミン D の骨芽細胞への直接作用の分子機構 (2004.12.8-11) 第 27 回

- 日本分子生物学会年会 (神戸)
23. 真木彰郎、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、城出裕子、趙越、山形薫、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明：ショウジョウバエエクダイソンレセプター転写制御を介したエクダイソン/幼若ホルモン拮抗的作用メカニズムの解明 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 24. 鈴木絵里子、武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、城出裕子、真木彰郎、山形薫、趙越、Alexander Kouzmenko、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明：アンドロゲンレセプターを介した E2F-1/Rb 転写制御機構の解析 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 25. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、城出裕子、鈴木絵里子、真木彰郎、Yue Zhao、山形薫、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明：分子遺伝学的アプローチによるヒト性ステロイドホルモンレセプター新規転写制御因子の網羅的 Screening 系の構築 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 26. 大竹史明、馬場敦史、三木ひろみ、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明：ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体のクロストークを制御するユビキチンリガーゼ複合体の精製 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 27. 松本高広、佐藤隆史、渡辺資之、中村貴、椎名博子、宮本純子、武山健一、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 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 28. 椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、菅野純、吉川裕之、加藤茂明：アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 29. 高田伊知郎、須沢美幸、松本邦弘、加藤茂明：non-canonical Wnt pathway による核内レセプターPPAR γ 転写抑制機構の解析 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 30. Yue Zhao, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Sawatubashi S, Shirode Y, Maki A, Yamagata K, Kouzmenko AP, Ishii S, Tabata T, Kato S: *Drosophila* CBP Involves in Transcriptional Repression in Pericentric Heterochromatin. (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 31. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S: Cross-talk *in vivo* between Wnt/b-catenin and estrogen signaling pathways. (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 32. 津久井通、大羽沙弥佳、今澤由紀子、井上聡：Analysis of ovarian function in conditional transgenic mice by overexpressed ER α and ER β . (2005.1.22-23) 平成 16 年度 内分泌攪乱物質の環境リスク国際シンポジウム (京都)
 33. 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 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
 34. 東浩太郎、田中正光、井上聡、横田淳、大内尉義、堺隆一：骨肉腫細胞の転移性に関わる paxillin のチロシンリン酸化亢進 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
 35. 堺隆一、三宅泉、箆島裕子、浅輪珠恵：神経芽腫におけるドッキング分子 ShcC のリン酸化の意味 (2004.11.21-22) 第 20 回日本小児がん学会 (京都)

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 核内情報研究分野教授

【研究要旨】

組織特異的にアゴニスト/アンタゴニスト活性を示す SERM の作用メカニズムについてはいまだに不明な点が多い。そこで full length のエストロゲン受容体を恒常的に発現する HeLa 細胞株を用いて SERM 結合時のエストロゲン受容体相互作用因子を精製したところ、BRD4 と呼ばれるプロモドメイン蛋白質を同定した。BRD4 は N 末側転写活性化能 AF-1 を促進し、ヒストン H4 の K5 および K12 のアセチル化を特異的に認識することが判明した。エストロゲン受容体ターゲット遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化状態を ChIP アッセイにより調べたところ、エストロゲン添加時にはヒストン H4 のすべてのリジン残基のアセチル化が亢進するのに対し、SERM 添加時にはヒストン H4 の K12 のみアセチル化が亢進することが判明した。以上の結果より、SERM の作用メカニズムには BRD4 を介するヒストンアセチル化状態の変化が関与することが示された。

A. 研究目的

乳癌の治療薬として用いられるタモキシフェンや骨粗鬆症の予防薬として用いられるラロキシフェンは選択的エストロゲン受容体調節因子 (SERM) と呼ばれる。SERM を用いることにより、乳癌や子宮内膜癌の発症リスクを増加させずに骨粗鬆症の予防・治療を行ったり、乳癌の治療に際して血中コレステロール値の低下などの望ましい副作用を期待することができる。しかしながらこのような SERM の組織特異的な作用メカニズムの詳細についてはいまだに不明な点が多い。

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 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、p300/p160 複合体、DRIP/TRAP 複合体、TFTC タイプの複合体など、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。一方、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 機能を通じてその組織特異的作用を発揮すると考えられている。

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を精製したところ、BRD4 と呼ばれるプロモドメイン蛋白質を同定し、解析を行った。

B. 研究方法

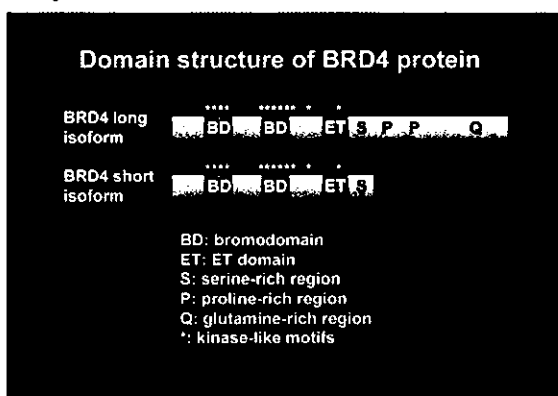
エストロゲンあるいは SERM 存在下で

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あるいはゲル濾過法を用いて複合体の大きさを推定した。単離した複合体の構成因子の同定はペプチドマスフィンガープリンティング法により行った。

単離された複合体とエストロゲン受容体との相互作用の解析は免疫沈降法と GST プルダウン法により行った。また、複合体の構成因子の細胞内での機能解析は、RNAi 法、レポーターアッセイ法、クロマチン免疫沈降法等により行った。

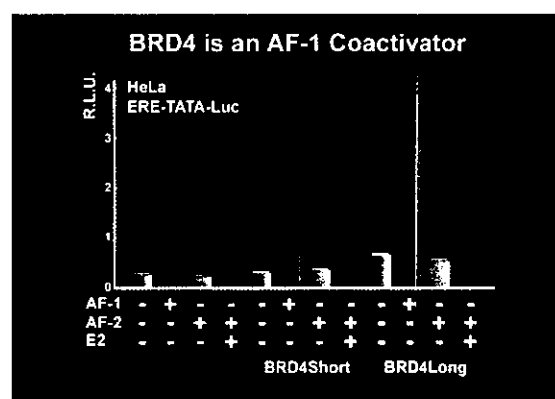
C. 研究結果

FLAG アフィニティーとゲル濾過の2段階精製で、リガンドの種類によりサイズの異なるコンプレックスが形成されることが判明した。また、1-2MDa の分画に各リガンド特有のバンドが存在することを明らかにした。この分画の TOF-MS を行ったところ、RAL 添加時のバンドからプロモドメイン蛋白質 BRD4 を同定した。



エストロゲン受容体のコファクターとしての機能を検討したところ、BRD4 は AF-1 コアクチベータであることが判明した。従来 AF-1 活性がほとんどないことが知られている HeLa 細胞の AF-1 活性をも強く促進することが判明した。

BRD4 のエストロゲン受容体に対する



作用の細胞種特異性を検討するため、子宮内膜腫 Ishikawa、骨芽細胞種 HOS、腎臓 293T を用いて同様のレポーターアッセイを行った。その結果、元々の AF-1 活性の強さに関わりなくその作用を促進することが判明した。また、HOS においてはタモキシフェンの partial agonist 活性をも促進することが判明した。過剰発現系で観察された現象を確認するため、RNAi で発現を減少したときの BRD4 作用を 293T 細胞を用いて調べた。その結果、BRD4 発現の減少により、AF-1 コアクチベータ活性が減弱し、SERM の partial agonist 活性も減弱する傾向が見られた。これは BRD4 が AF-1 コアクチベータであり、SERM の partial agonist コアクチベータであるという過剰発現系の結果と一致した。

次に 293 過剰発現の系でエストロゲン受容体と BRD4 の相互作用を IP-Western 法により検討した。その結果、リガンドの種類によらず両者は結合するが、タモキシフェン添加時には結合が強まることが判明した。さらに BRD4 とエストロゲン受容体の直接相互作用を検討するため GST pull down アッセイを行った。その結果、BRD4 はエストロゲン受容体の AB 領域と直接結合することが判明した。

さらに BRD4 のヒト各組織における発現量をノザンブロットングで調べたところ、各臓器でユビキタスに発現していた。

BRD4 は2つのプロモドメインと ET

ドメインを持つことが知られている。BRD4 の AF-1 コアクチベーター活性に関与するドメインを調べるため、各ドメインを削った deletion construct を作成した。BRD4S とその deletion construct を用いたレポーターアッセイより、BD1 を削ったとき AF-1 コアクチベーター活性が消失することが判明した。

BRD4 の AF-1 コアクチベーター活性にプロモドメインが関与することが示唆されたが、プロモドメインはアセチル化ヒストンに結合するドメインであることが知られている。そこで BRD4 プロモドメインがヒストンのどの位置のアセチル化を認識するのかをペプチド pull down アッセイにより検討した。その結果 BRD4 はヒストン H3 のアセチル化は認識せず、ヒストン H4 の K5 および K12 のアセチル化を特異的に認識して結合することが判明した。またヒストン H4 の K8、K16 のアセチル化は BRD4 の結合に関与しないが、K5/K8 がアセチル化しているときにはその結合を強める効果のあることが判明した。

BRD4 がヒストン H4 の K5/12 のアセチル化を認識することが判明したので、エストロゲン受容体のターゲット遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化状態を ChIP アッセイにより調べた。その結果、腫瘍マーカー pS2 のプロモーター領域において、エストロゲン添加時にはヒストン H4 のすべてのリジン残基のアセチル化が亢進するのに対し、SERM 添加時にはヒストン H4 の K12 のみアセチル化が亢進することが判明した。

全長の BRD4L および BRD4S 蛋白をバキュロウイルス発現系で取得し、これを bait として HeLa 細胞核抽出液より BRD4 相互作用因子を精製したところ、hSWI/SNF 複合体および WINAC 複合体の構成因子として知られている BAF250 が同定された。さらに、HeLa 細胞核抽

出液中に endogenous に存在する BRD4 蛋白が精製されてきたことから、BRD4 は核内で multimer を形成することが示唆された。

D. 考察

full length のエストロゲン受容体を恒常的に発現する HeLa 細胞株から、SERM 結合時のエストロゲン受容体転写共役因子複合体を精製したところ、BRD4 と呼ばれるプロモドメイン蛋白質を同定した。

BRD4 蛋白質は他のプロモドメイン蛋白質と異なり、細胞分裂時においても染色体に結合し続けることが知られている。そのため、BRD4 は、転写が活発に行われている遺伝子プロモーター上の分子タグとして機能し、細胞分裂後の転写因子や polII の速やかな再集合を保証する因子ではないかと考えられている。本研究において BRD4 が SERM 結合時のエストロゲン受容体に強く結合する AF-1 コアクチベーターであることが明らかになり、エストロゲン受容体ターゲット遺伝子において BRD4 が実際に分子タグとして機能している可能性が示された。

さらに、本研究により、BRD4 はヒストン H4 の K5 および K12 のアセチル化を特異的に認識して結合することが判明した。一方染色体複製時に新たに合成されて deposit されるヒストンは、H4 の K5 および K12 が特異的にアセチル化されていることが知られている。また、BRD4 は複製開始複合体 RFC と結合することが知られており、BRD4 と epigenetic なクロマチンメモリーとの関連が強く示唆された。

E. 結論

full length のエストロゲン受容体を恒常的に発現する HeLa 細胞株から、SERM 結合時のエストロゲン受容体転写共役因子 BRD4 を同定した。BRD4 はエストロゲン受容体 AF-1 コアクチベーターであ

り、M期とS期のクロマチン構造調節を介して、SERMの生理作用を調節している可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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* 23, 1598-1608, 2004.
2. 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.
3. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S: Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge *in vivo*. *J Biol Chem* 279, 40255-40258, 2004.
4. Maki A, Sawatsubashi S, Ito S, Shirode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 262-267, 2004.
5. Sawatsubashi S, Maki A, Ito S, Shirode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosylation). *Biochem Biophys Res Commun* 320, 268-272, 2004.
6. 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 Biotechnol Biochem* 68, 1209-1215, 2004.
7. Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene* 23, 6000-6005, 2004.
8. Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: *In vivo* potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes Cells* 9, 983-992, 2004.
9. Kato S, Fujiki R, Kitagawa H: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 173-178, 2004.
10. Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K: Function of androgen receptor in gene regulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 627-633, 2004.
11. Unno A, Takada I, Takezawa S, Oishi H, Baba A, Shimizu T, Tokita A, Yanagisawa J, Kato S: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 933-938, 2005.
12. Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J: Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23, 4813-4823, 2004.
13. Meindl S, Rot A, Hoetzenecker W, Kato S, Cross S, Elbe-Burger A: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Bri J Dermatol*, in press
14. 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* 18, 1131-1143, 2004.
15. Kahata K, Hayashi M, Asaka M, Hellman W, Kitagawa H, Yanagisawa J, Kato S, Imamura T, Miyazono K: Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes Cells* 9, 143-151, 2004.
16. Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S, Matsumoto T: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem* 279, 35798-35802, 2004.
17. Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19, 1452-1461, 2004.
18. Kawasumi M, Okada T, Yamada M, Miyamae-Kaneko M, Matsuoka M, Nakahara J, Tomita T, Iwatsubo T, Kato S, Aiso S, Nishimoto I, Kouyama K: Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. *Eur J Neurosci* 19, 2826-2838, 2004.
19. Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, Kato S, Miyamoto K: Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F39-F47, 2004.
20. Capuano P, Wagner CA, Radanovic T, Bacic D, Kato S, St-Arnaud R, Murer H, Biber J: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1alpha-OHase deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C429-434, 2005.
21. Peters JM, Kato S, Gonzalez F: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol Carcinogenesis* 41, 77-84, 2004.
22. Uchida E, Kagawa N, Sasaki T, Urushino N, Sawada N, Kamakura M, Ohta M, Kato S, Inouye K: Purification and characterization of mouse CYP27B1 overproduced by an Escherichia coli system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 505-511, 2004.
23. 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 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, 2004.
2. 学会発表
【国際学会】
1. Nakamura T, Watanabe T, Nakamichi Y, Fukuda T, Matsumoto T, Yoshimura K, Miyamoto J, Yamamoto Y, Shiina H, Tanaka S, Sakari M, Sato T, Metzger D, Chambon P, Kato S: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts: Generation and characterization of osteoclast-specific androgen Receptor knockout mice. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA (2004.10.1-5)

2. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Kawano H, Nakamura T, Yamada T, Karsenty G, Kato S: A genetic evidence of direct VDR function in osteoblasts: generation and analysis of osteoblast-specific VDRKO mice. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA (2004.10.1-5)
3. Shirode Y, Takeyama K, Kato S: Modulation of VDR function by a novel vitamin D analogue, ED-71, is mediated through a novel serum protein. American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Seattle, Washington, USA (2004.10.1-5)
4. Kato S: Co-regulator complexes for nuclear receptors and genetic analyses of AR function. Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
5. Takeyama K, Ito S, Sawatsubash S, Shirode Y, Suzuki E, Maki A, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: TRAP240, as a component of the mediator complex, represses transactivation function of androgen receptor. Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
6. Kato S: Classes of nuclear receptor coregulatory complexes. ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, Louisiana, USA (2004.6.16-19)
7. Kato S: Transcriptional controls by nuclear receptors. University of Tokyo Forum 2004 in Sweden. Stockholm, Sweden (2004.8.24-25)
8. Sakari M, Kato S: Azoospermic factor RBMY functions as a cofactor of ERalpha. University of Tokyo Forum 2004 in Sweden. Stockholm, Sweden (2004.8.24-25)
9. Kato S: The Williams Syndrome and the

Vitamin D Receptor. Vitamin D Workshop Working Group. Seattle, Washington, USA (2004.10.4)

【国内学会】

1. 福田亨、渡辺資之、関根圭輔、松本高広、中村貴、田中佐依子、山本陽子、吉村公宏、椎名博子、宮本純子、加藤茂明：エストゲンレセプター特異的転写共役因子ノックアウトマウスの解析 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
2. 高田伊知郎、須沢美幸、武山健一、松本邦弘、加藤茂明：MAPkinaseNLK による新たな核内レセプターPPAR γ 転写抑制機構の解析 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
3. 佐々木康匡、藤木亮次、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明：組み換えヒストンタンパクを用いたクロマチンアッセイ系の構築 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
4. 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 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
5. 真木彰郎、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、城出裕子、趙越、山形薫、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明：ショウジョウバエにおけるエクダイソン/幼若ホルモンによるエクダイソンレセプター転写制御メカニズムの解明 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
6. 馬場敦史、大竹史明、高田伊知郎、加藤茂明：アフィニティーカラムを用いた FXR 新規転写共役因子複合体の精製の試み (2004.3.28-31) 日本農芸化学

- 会 2004 年度大会 (広島)
7. 秋本千央、池郁生、盛真友、松本高広、加藤茂明：マウス Y 染色体ライブラリー作製および機能遺伝子群同定の試み (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
 8. 藤木亮次、金美善、佐々木康匡、北川浩史、加藤茂明： α -水酸化酵素遺伝子発現調節機構の研究 (2004.3.28-31) 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)
 9. 山本陽子、吉澤達也、福田亨、加藤茂明：ビタミン D の骨芽細胞への直接作用の分子機構 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 10. 真木彰郎、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、城出裕子、趙越、山形薫、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明：ショウジョウバエエクダインレセプター転写制御を介したエクダイン/幼若ホルモン拮抗的作用メカニズムの解明 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 11. 鈴木絵里子、武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、城出裕子、真木彰郎、山形薫、趙越、Alexander Kouzmenko、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明：アンドロゲンレセプターを介した E2F-1/Rb 転写制御機構の解析 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 12. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、城出裕子、鈴木絵里子、真木彰郎、Yue Zhao、山形薫、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明：分子遺伝学的アプローチによるヒト性ステロイドホルモンレセプター新規転写制御因子の網羅的 Screening 系の構築 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 13. 大竹史明、馬場敦史、三木ひろみ、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明：ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体のクロストークを制御するユビキチンリガーゼ複合体の精製 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 14. 松本高広、佐藤隆史、渡辺資之、中村貴、椎名博子、宮本純子、武山健一、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 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 15. 椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、菅野純、吉川裕之、加藤茂明：アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 16. 高田伊知郎、須沢美幸、松本邦弘、加藤茂明：non-canonical Wnt pathway による核内レセプター PPAR γ 転写抑制機構の解析 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 17. Yue Zhao, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Sawatubashi S, Shirode Y, Maki A, Yamagata K, Kouzmenko AP, Ishii S, Tabata T, Kato S: *Drosophila* CBP Involves in Transcriptional Repression in Pericentric Heterochromatin. (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 18. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S: Cross-talk *in vivo* between Wnt/b-catenin and estrogen signaling pathways. (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)

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

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】

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、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) を骨芽細胞系譜に過剰発現させた結果、出産後 1-2 日目にほとんどの胎児が致死となり、骨の成長不全および石灰化異常を示すことが、本研究により示された。また、エストロゲンシグナルを非リガンド依存的に活性化できるエストロゲンの変異レセプター (caER α および caER β) の遺伝子改変モデルマウスを利用して、それぞれのレセプターを骨組織で過剰発現することにより、エストロゲンシグナルの骨組織での作用について検討を行った。本研究課題では、骨組織におけるエストロゲンシグナルの作用メカニズムを解明するとともに、その多様な生理作用について報告する。

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、ビスホ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、重力化での骨代謝における生体機能、薬剤の効果・影響について個体丸ごとを活用した系で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、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因子群を同定し、これらの因子群の生体内における骨作用を解明し、これらの因子の相互作用やシグナル伝達に関する研究を通して、違う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遺伝子改変モデル動物を利用して、これらの因子の骨代謝における生体作用、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指した。

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網羅的に遺伝子改変動物の作製を行った。特に分担者は、本年度にビタミンK関連因子としての γ -カルボキシラーゼ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い、骨組織での作用について検討を行う。さらに、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、エストロゲンレセプター(ER α およびER β)を介する生体での骨作用について焦点を絞り解析を行う。なお、ビタミンDに関しては、本研究課題の分担者である加藤

茂明（東大・分生研・教授）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、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。

疾患遺伝子および標的遺伝子群の候補について、生体における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4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い、さらにこれらの生きた試薬を交配により、骨組織特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序に迫る。

1. 活性型caER α 、およびcaER β トランスジェニックマウスの作製およびその解析
2. 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
3. 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
4. 1、2、および3で作製した遺伝子改変マウスを交配させることにより、骨組織特異的にgain of functionする系を確立し、骨組織での生体作用について検討する。

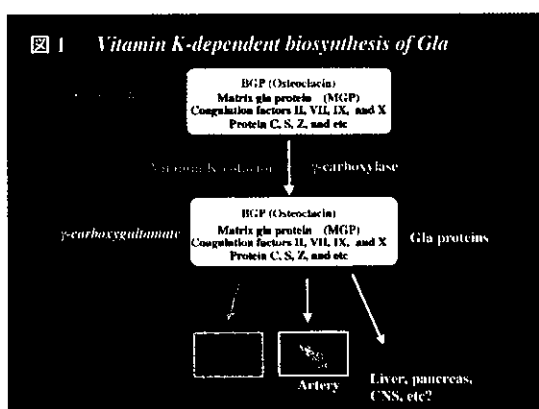
C. 研究結果

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。

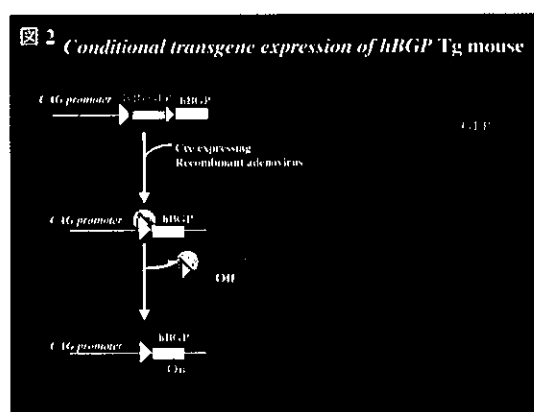
ビタミンKに関連する骨疾患遺伝子の候補として、 γ -カルボキシラーゼのグラ

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、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(図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ている。

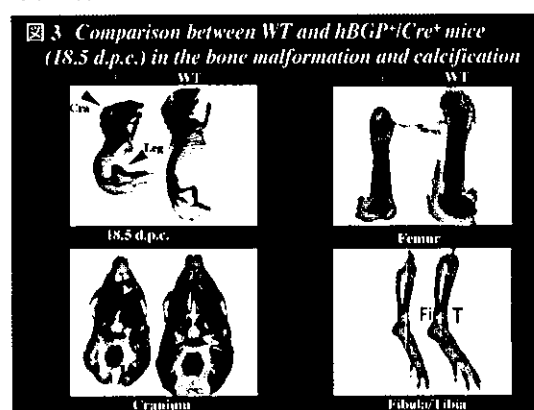
BGPの骨代謝における役割を検討するために、ヒトBGP cDNAを単離し、Cre/loxP系を利用して、コンディショナルにGain of functionできる遺伝子改変マウスを作製した。Cre処理前では、GFPをレポーター遺伝子として発現しており、Cre処理後ではGFPが除去されBGPが強制発現される系である(図2)。



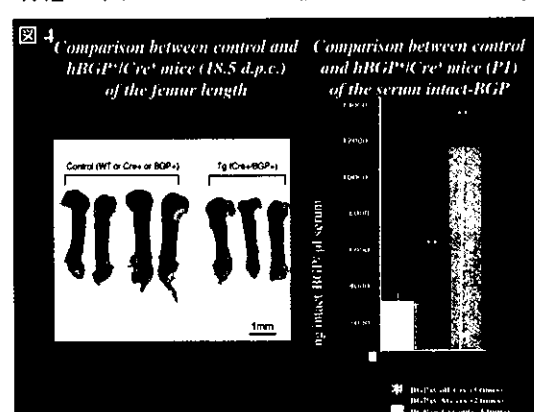
骨芽細胞系譜で発現のあるコラーゲンタイプI プロモーターにCreを発現し、BGPを強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して、生体におけるBGPの骨代謝への作用について解析を行った結果、マウス胎生後期から骨組織において石灰化が低い傾向が観察さ



れた、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(図3)。

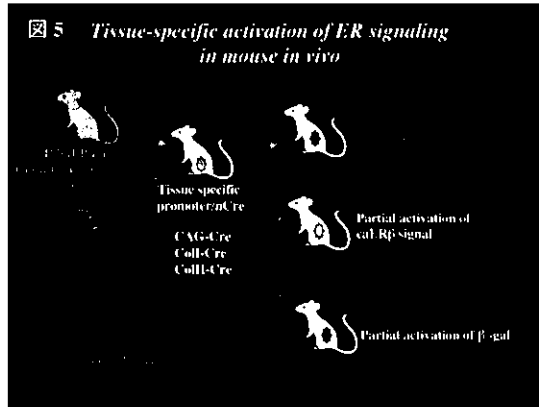


上記交配により得られたBGPを過剰発現するマウスは、ほとんどが出生後1日目—2日目で致死となることを明らかにした。これら出生後1日目—2日目のマウス胎児から血清を集め、血清中のヒトBGP量を測定するとこれらのマウスで有意に高いintract-BGP値を示した(図4)。



2. ER α およびER β の生体内 Gain of function による骨機能の解析。

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作用については、選択的に ER α または ER β 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の作製を行い、骨組織で ER α または ER β を過剰発現可能な系を確立した (図5)。



まず、骨形成能をもつ骨芽細胞とエストロゲンシグナルの作用について検討を行った。コラーゲンタイプI (Coll) -Cre マウスとcTg マウスを交配することにより、骨芽細胞系譜に ER α および ER β シグナルを活性化させた場合は、コントロールマウス群と比較して外見上顕著な表現型は観察されず、加えてこれらの遺伝子改変マウスで体重差には、有意な変化は観察されなかった。また詳細な解析を行うために骨形態計測を検討した結果、少なくとも ER α シグナルを活性化したマウスラインの骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) および骨塩量 (BMC: Bone Mineral Content) に変化は観察されなかった。ER β シグナルを活性化させたラインについても検討を行っているが、同様な傾向が観察された。さらに、メスの Tg マウスに卵巣摘出 (OVX) を施し、エストロゲンを枯渇させる環境を雌個体で人工的に付加をかけることにより、骨形成能に保護作用があるか検討を行った結果、少なくとも骨芽細胞で ER α シグナルを活性化させた場合においても骨量を保護する結果が得られなかった。また、ER β シグナルに関しても同様な手法により、現

在検討中である。以上の結果より、今回の実験系において ER α シグナルが骨芽細胞に直接作用することは少ないと示唆され、ER α シグナルを介する骨形成作用は、他の細胞系譜に作用することが推測される。

D. 考察

ビタミンKおよびエストロゲン受容体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がでることが想定され、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・組織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、骨組織特異的にビタミンK・エストロゲン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。さらにこれらの研究を進展させるためには、マウス個体において、より厳密に組換え酵素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も将来的な研究課題として重要と考えられる。

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ることにより、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考えられる。

エストロゲンシグナルに関しては、骨代謝における作用機序の解明、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うことが重要と考えられる。

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、コラーゲンタイプIプロモーター(Coll)-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 γ -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。実際、BGPを過剰発現したマウスの胎児血清中のintact-BGP量が有意に増加しており、血中BGPの増加が骨代謝以外の作用をもつことが示唆された。

エストロゲンシグナルと骨代謝の作用に関しては、さらに詳細な解析が必要だがエストロゲンが直接骨芽細胞系譜に作用するよりはむしろ、ER α シグナルに関して間接的に骨芽細胞の増殖や分化過程でエストロゲンシグナルが関与する可能性があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K: Transcriptional coactivator

PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol Cell Biol* 24, 6525-35, 2004.

2. 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* 18, 1131-1143, 2004.

2. 学会発表

【国内学会】

1. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、藤田雅代、浦野友彦、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 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
2. 今澤由紀子、津久井通、大羽沙弥佳、栗原真紀、堀江公仁子、村松正實、井上聡：Cre/LoxP システムを用いた骨代謝におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
3. 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：トランスジェニックマウスを用いた卵巣におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
4. 津久井通、大羽沙弥佳、今澤由紀子、井上聡：Analysis of ovarian function in conditional transgenic mice by overexpressed ER α and ER β . (2005.1.22-23) 平成16年度 内分泌攪乱物質の環境リスク国際シンポジウム (京都)

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

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 細胞増殖因子研究部部长

【研究要旨】

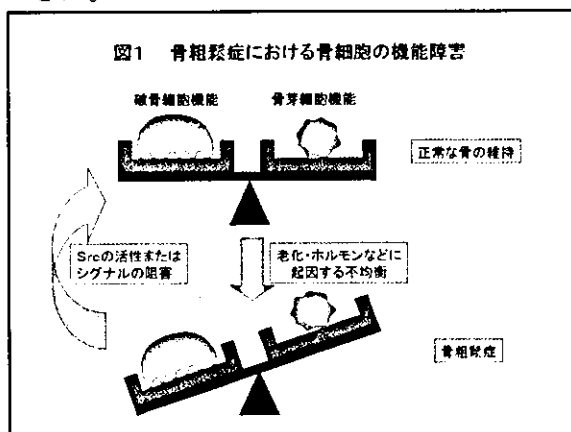
骨粗鬆症を骨形成や骨破壊を制御する細胞内シグナル伝達分子の異常という観念で捉え、骨代謝の細胞内シグナルを司る各蛋白質の変化の検索から疾患遺伝子を推定するアプローチは、現在精力的に行われている発現量変化や遺伝子変異の網羅的探索と対極には位置する戦略として、新たな突破口を切り開く可能性を持っている。特にチロシンキナーゼである Src ファミリーの分子とその基質群は、これまでの破骨細胞の機能の重要な制御に関わると考えられ、その発現量、活性の変化が骨粗鬆症の病因を理解する上で重要であるだけでなく、これを標的とした治療への発展につながると考えられる。我々は Src の活性やその基質 Paxillin や Cas が細胞の運動能や接着能の制御により破骨細胞が機能を発揮する上で重要であると考え、欠損変異体、阻害剤や RNAi の手法によりそれらの特異的シグナルをブロックする手法を確立した。この手法を更に押し進めることにより Src のシグナルの中で特に破骨細胞の骨破壊作用のみを減弱するような、骨粗鬆症の治療薬開発につながると考える。

A. 研究目的

骨粗鬆症とは、骨吸収と骨形成のバランスが巧妙に調節されている骨代謝において、加齢などの要因でこれらの正常な調節が崩れた状態である。すなわち破骨細胞の機能亢進や骨芽細胞の機能低下がエストロゲン、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の多くのファクターにより引き起こされるものと考えられている。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、そしてそのメカニズムに基づいて有効な骨粗鬆症の治療モデルを提唱することで

ある。骨代謝細胞に細胞外から働きかける分子による刺激が、実際に細胞膜・細胞質のどのような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て、正常な骨代謝細胞の機能のバランスを取り戻すためには骨代謝細胞にどのようなシグナル分子を標的とした治療を行うと有効であるかを、細胞モデルを用いて解明することを目指している。これまでに骨代謝細胞のシグナルに関しては骨芽細胞の分化制御に関わる BMP 蛋白質群や、破骨細胞の分化や活性化を制御する RANKL 蛋白質とその膜受容体 RANK などについては多くの知見が得られてきた。昨年度まで骨代謝シグナル制御分子のプ

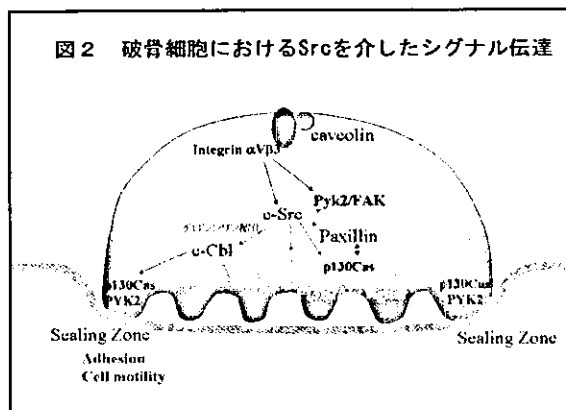
ロテオームの手法による網羅的解析や、既知のシグナル伝達分子の解析など幾つかの異なるアプローチを用いてきたが、最終年度にあたる本年度は、その中で破骨細胞の機能制御に最も深く関わると考えられる Src ファミリーキナーゼとその基質の機能解析を重点的に行った。これまでの知見と併せて Src キナーゼの活性またはシグナルの調節による破骨細胞機能の抑制が骨粗鬆症の標的治療として有効であると予測して (図 1)、そのような Src の特異的ブロックの系を樹立することを本年度の目標の一つとして推進してきた。



そもそも c-Src のノックアウトマウスが破骨細胞機能障害により骨大理石病を呈することが 1991 年の Cell 誌に報告されて以来、Src の活性化と破骨細胞の機能が密接に関係しているものと予測されて重点的に研究が進められてきたが、多くの状況証拠や関連分子の発見にもかかわらずその分子メカニズムについては現在に至るまで完全に解明されてはいない。

Src キナーゼの基質 c-Cbl やもう一つのアミノチロシンキナーゼ Pyk2 が c-Src の下流分子として機能すること、主として Sealing Zone で α V β 3 インテグリンを介した細胞接着シグナルが Src/Pyk2/p130Cas/c-Cbl/Paxillin などからなるシグナル複合体によって伝えられることなどが破骨細胞が機能を発揮するために重要であると考えられている。これまでにわかっている Src を介した破骨細

胞のシグナルを図 2 にまとめる。



c-Src の一次構造は、C 末側のチロシンキナーゼとしての活性を持つキナーゼドメインとその N 末側の機能調節領域に存在する SH2 と SH3 が特徴的である。更に細かい機能解析で N 末端には脂質修飾により膜局在に関わる部位、C 末端側にリン酸化されることに自己のキナーゼ活性を抑えるチロシン (チロシン 527) がある。以上の特徴的な構造、モチーフは種を超えて保存されており、Src ファミリーと呼ばれている蛋白質群に共通して保存されている。Src ファミリーの SH2 はリン酸化チロシンを含むモチーフに、SH3 はプロリンを多く含むモチーフに特異的かつ高親和性な結合をすることが知られている。X 線構造解析によって通常 Src が活性化していない状態では Src の SH2 が C 末のチロシン 527 のリン酸化した形に、SH3 がキナーゼドメインと SH2 の間にある領域と結合することにより 2 重にロックされた形でその活性を封じこめていることが明らかになった。この構造変化による Src 活性化のモデルを図 3 に示す。

チロシン 527 のリン酸化状態により Src ファミリーは活性化と不活性化の平衡状態にあると考えられる。Csk (C-terminal Src kinase) は、チロシン 527 を特異的にリン酸化することで Src の SH2 とチロシン 527 との分子内結合を誘導するため Src の活性を抑制する方向に作用する。一方これと逆にチロシン 527 の脱リン酸