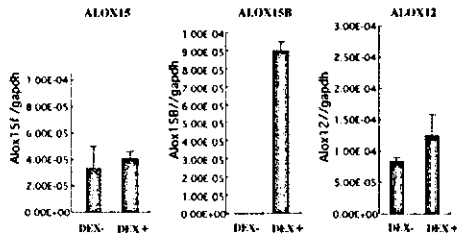
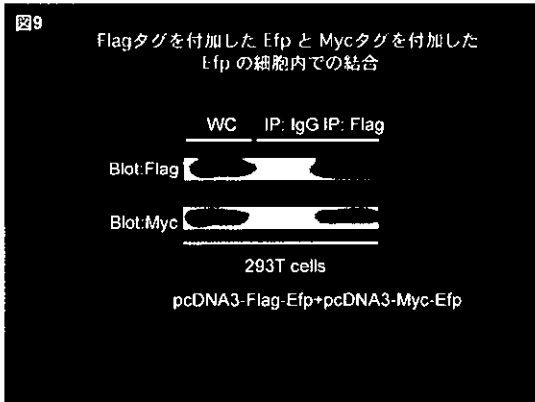


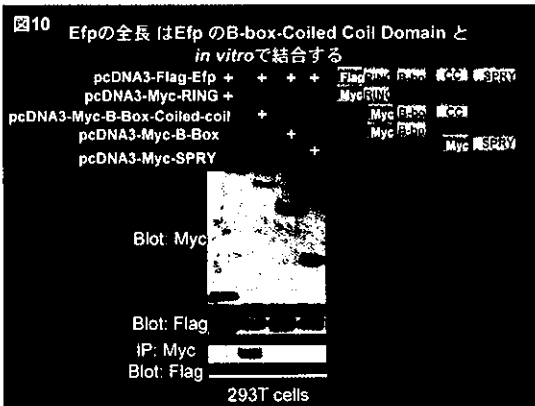
図8 ヒト初代培養骨芽細胞における
デキサメタゾンによるAlox15B遺伝子の発現誘導



法を用いて検討を行った結果多数のエピキチンと乳癌細胞株である MCF7 由来の cDNA ライブラリーから Efp そのものがクローニングされた。この結果を確認するため細胞内に異なる Tag を付加させた Efp を過剰発現させることにより Efp が 2 量体以上の複合体形成を行うことを証明した(図 9)。さらに Efp の各ドメイン



のみを発現させ Efp 全長との結合を検討したところ B-Box-Coiled-coil ドメインと結合することが明らかとなった(図 10)。

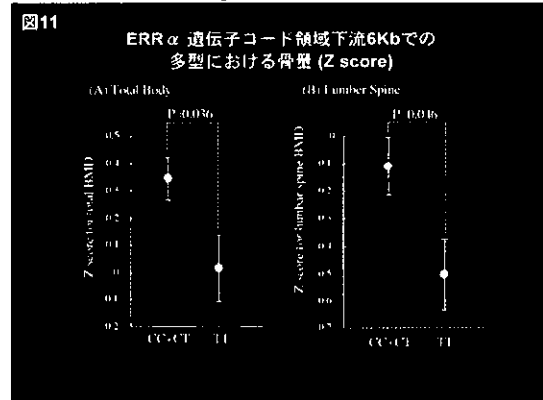


Efp はN末端に位置する RING finger ドメインを欠落させると蛋白分解酵素活性が

消失することをすでに主任研究者らは明らかにしている(Urano et al., Nature 2002)。この RING フィンガーを欠落させた Efp を過剰発現させると全長の Efp と複合体形成を行い、さらに Efp が行う 14-3-3 σ の蛋白分解を抑制し、ドミナントネガティブ効果により、MCF7 や MDA-MB-231 といった乳癌細胞の増殖抑制を誘導することを示した。

(6) エストロゲン応答遺伝子 $ERR\alpha$ の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響ならびに骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

Estrogen Receptor Related Receptor α ($ERR\alpha$) の遺伝子コード領域の下流約 6 kb に存在する SNP に関して、C アレルを持つ群(CC+CT; n=240)では持たない群(TT; n=75)に比べ有意に骨密度が高いことを見出した(Total BMD Z score; 0.344 vs 0.014; p=0.036, Lumbar Spine BMD Z score; -0.108 vs -0.503; p=0.046) (図 11)。



また初代培養骨芽細胞を用いて $ERR\alpha$ の mRNA での発現の変化を RT-PCR で検討したところ $ER\alpha$ ならびに $ER\beta$ の発現のピークと一致する培養開始後 15-20 日において発現のピークとなることが明らかとなった(図 12)。

(7) ビタミン D3 応答遺伝子 $p57^{Kip2}$ による骨形成制御機構に関する検討：
 $p57^{Kip2}$ 過剰発現安定性形質発現骨芽細胞株を用いた $p57^{Kip2}$ シグナル下流遺伝子の探索

骨芽細胞様細胞株である UMR106 に

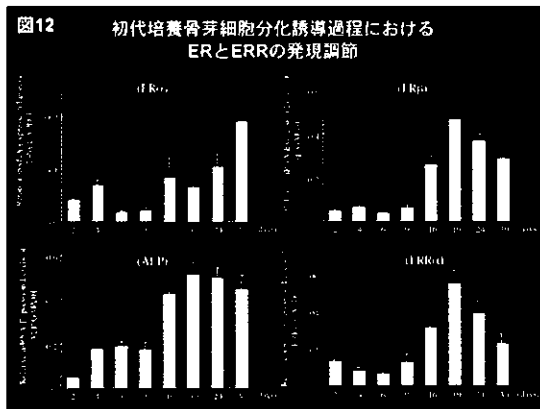


図12 初代培養骨芽細胞分化誘導過程におけるERとERRの発現調節

p57^{Kip2} を過剰発現させた安定性過剰発現株を作製した。RNA を採取し p57^{Kip2} を過剰発現させたことにより発現増加(表3)ならびに減少が誘導される遺伝子(表4)をマイクロアレイ法を用いてリストアップした。

(8) 低用量エストロゲンの内膜肥厚抑制作用

表5に各群の血圧、血清脂質、ホルモン、体重および子宮重量を示す。卵巢摘

表5 各群の血圧、血清脂質、ホルモン濃度、体重および子宮重量

	Sham		OVX + E2 (μg/kg/d)					OVX + candesartan (μg/kg/d)		
	0	0.2	0	1	2	10	20	0	2	20
No. of rats	7	10	8	4	8	8	5	4	4	4
SBP (mmHg)	121±4	113±7	123±2	120±5	127±2	121±4	121±4	121±7	122±2	118±8
TC (mg/dl)	78±9	75±5	86±4	78±10	84±8	95±5*	113±3**	79±2	89±4	81±5
HDL-C (mg/dl)	20±2	21±3	20±2	16±3	23±2	27±1	30±1*	17±2	21±2	22±2
Triglyceride (mg/dl)	41±6	53±8	45±9	64±16	81±17	87±10*	153±31**	64±11	25±5	35±10
E2 (pg/ml)	19±4**	8±1	9±1	12±2	20±2**	54±5**	95±3**	11±3	11±1	14±2
Pro (ng/ml)	20±5	13±2	6±3	21±5	8±2	11±3	6±2	18±4	21±6	15±6
Body weight (g)	269±6	282±8	281±8	290±6	294±5	257±5*	263±7	285±10	290±5	290±3
Uterus (mg)	651.102**	114.29	321.23	377.48*	511.70**			148.22	149.5	156.7

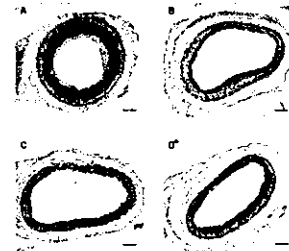
Values are expressed as mean±SEM. *, P<0.05, ** P<0.01 vs OVX+0 (μg/kg/d) of E2. E2, 17β-estradiol; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; E1, estrone; Pro, progesterone

出後の E2 補充により用量依存的に血清 E2 濃度は増加し、2 μg/kg/day の E2 補充で sham 手術群と同等の血清 E2 濃度に達した。すべての群で血清 estrone 濃度は測定感度以下で、progesterone 濃度は変化しなかった。血清総コレステロール、トリグリセリド、HDL コレステロールはすでに報告されているように高容量補充群で増加したが、2 μg/kg/day もしくはそれ以下の用量の E2 では変化しなかった。体重は高容量群で低下したのに対し、子宮重量は用量依存的に E2 補充で増加し、低用量でも補充なしに比べて有意な

増加を示した。

ラット頸動脈の新生内膜肥厚は E2 補充により濃度依存的に減少し、0.2 μg/kg/day の E2 補充でも有意な効果がみられた(図12、図13)。

図12



頸動脈バルーン傷害2週間後の代表的横断面標本 (Elastica van Gieson染色)。A. 対照群投与; B. 0.2 μg/kg/day 17β-estradiol投与; C. 20 μg/kg/day 17β-estradiol投与; D. 20 μg/kg/day candesartan投与

図13

ラット頸動脈バルーン傷害2週間後の組織計測による中膜面積(A)、内膜面積(B)、内膜/中膜面積比(C)の評価。データはmean±SEMで示す。*P<0.05, **P<0.01 vs. 卵巢摘出+17β-estradiol (-)。*P<0.01 vs. 卵巢摘出+candesartan (-)

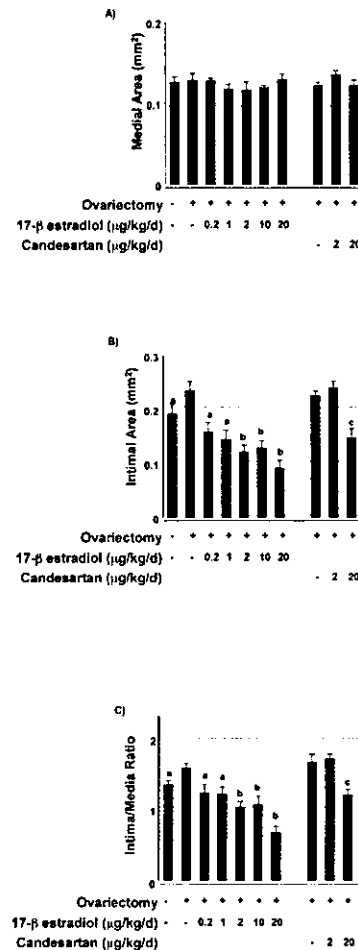


表3 マイクロアレイ法により明らかになった

p57^{kip2} 過剰発現 UMR106 細胞で発現が増加する遺伝子

1041	86	12.088	CORS26	similar to Mouse collagenous repeat-containing sequence of 26kDa protein (CORS26) mRNA, complete cds.
1359	168	8.057	Mgst1	Rattus norvegicus microsomal glutathione S-transferase 1 (Mgst1), mRNA.
3602	484	7.437	Osteopontin	Rattus norvegicus secreted phosphoprotein 1 (Spp1), mRNA.
273	36	7.407	SOX2	similar to Protein:NP_035573 SRY-box containing gene 2
1325	238	5.55	CTGF	Rattus norvegicus connective tissue growth factor (Ctgf), mRNA
722	136	5.307	Serpinb7	Rattus norvegicus serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7 (Serpinb7), mRNA.
519	99	5.236	GB BE105480	Rat H4 gene for somatic histone H4.
2429	478	5.077	GB NM_012940	Rattus norvegicus Cytochrome P450 1b1 (Cyp1b1), mRNA.
411	86	4.738	GB NM_031689	Rattus norvegicus crystallin, beta A4 (Cryba4), mRNA.
602	129	4.647	GB NM_153737	Rattus norvegicus uterine sensitization-associated gene 1 protein (Usag1), mRNA.
1040	226	4.59	GB BQ190716	similar to Protein:NP_032176 glypican 4 [Mus musculus]. score=1.089e-14
251	55	4.509	GB BQ202074	SPT2_MOUSE Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor (Hepatocyte growth factor activator inhibitor), mRNA
1179	264	4.464	GB NM_144755	Rattus norvegicus kinase (LOC246273), mRNA.
8131	1841	4.415	GAS5	Rattus norvegicus gas-5 growth arrest homolog non-translated mRNA sequence.
3528	802	4.395	Cryab	Rattus norvegicus Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab), mRNA.
1922	443	4.339	GB Y10056	Calgizzarin (Endothelial monocyte-activating polypeptide) (EMAP)
389	91	4.27	GB NM_053606	Rattus norvegicus Matrix metalloproteinase 23 (Mmp23), mRNA.
6872	1698	4.046	GB NM_017139	Rattus norvegicus preproenkephalin, related sequence (Penk-rs), mRNA.
508	131	3.879	GB NM_019153	Rattus norvegicus fibulin 5 (Fbln5), mRNA.
4799	1267	3.786	GB BM392037	similar to Mouse mRNA for ATFx, partial cds.
8093	2145	3.773	Fibronectin1	Rattus norvegicus Fibronectin 1 (Fn1), mRNA.
2457	653	3.758	GB BI287856	similar to Mouse SNAG1 (Snag1) mRNA, complete cds.
9346	2512	3.72	GB NM_012904	Rattus norvegicus Annexin I (p35) (Lipocortin 1) (Anx1), mRNA.
872	239	3.643	GB BF284799	similar to Mouse epsilon-sarcoglycan mRNA, complete cds.
352	97	3.63	Cktsf1b1	Rattus norvegicus cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1 (Cktsf1b1), mRNA.
476	132	3.597	GB AA892348	Rat cytochrome P-450 isozyme 5 (P450 IVB2) mRNA, complete cds.
1802	508	3.546	GB BQ208680	similar to mouse LIM and cysteine-rich domains 1, clone MGC:29184 IMAGE:5007525, mRNA, complete cds.
1102	313	3.516	Osteoactivin	Rattus norvegicus glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb), mRNA.
4388	1256	3.491	GB NM_031549	Rattus norvegicus Transgelin (Smooth muscle 22 protein) (Tagln), mRNA.
2216	644	3.44	GB NM_030847	Rattus norvegicus epithelial membrane protein 3 (Emp3), mRNA.
2217	882	3.368	GB BI285124	similar to C.longicaudatus genes for histones H2a.2 and H3.2.
698	210	3.317	Elfin	Rattus norvegicus PDZ and LIM domain 1 (elfin) (Pdlim1), mRNA.
353	107	3.3	GB NM_012598	Rattus norvegicus Lipoprotein lipase (Lpl), mRNA.
145	44	3.231	Murf	similar to Mouse RING-finger protein MURF mRNA, complete cds.
2838	897	3.162	GB BI303648	similar to Mouse lymphotoxin-beta receptor gene, putative promoter and exons 1,2,3,4,5 and 6, partial cds.
468	149	3.124	GB NM_019189	Rattus norvegicus cartilage link protein 1 (Crtl1), mRNA.
3904	1253	3.114	GB NM_024403	Rattus norvegicus activating transcription factor ATF-4 (Atf4), mRNA.
954	307	3.102	GB NM_017073	Rattus norvegicus Glutamine synthetase (glutamate-ammonia ligase) (Glu1), mRNA.
555	181	3.068	GB BE104224	Rattus norvegicus alpha-mannosidase II mRNA, partial cds.
1743	574	3.036	GB NM_013413	Rattus norvegicus Relaxin 1 (H1) (Rln1), mRNA.
1885	622	3.028	GB NM_030873	Rattus norvegicus profilin II (Pfn2), mRNA.
877	290	3.021	GB NM_012679	Rattus norvegicus Clusterin (Clu), mRNA.
2135	707	3.019	GB NM_024134	Rattus norvegicus DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3), mRNA.
274	91	2.989	PP2C-beta	Rattus norvegicus similar to Protein phosphatase 2C beta isoform (PP2C-beta) (LOC292690), mRNA
2252	754	2.986	GB BM392398	similar to Mouse lysosomal thiol reductase IP30 precursor, mRNA, partial cds.
388	130	2.978	MSX1	Rattus norvegicus homeo box, msh-like 1 (Msx1), mRNA.
6440	2165	2.974	GB BG665153	similar to Mouse, calyculin binding protein, clone MGC:38013 IMAGE:5150537, mRNA,
2461	831	2.959	CD48	Rattus norvegicus CD48 antigen (Cd48), mRNA.
2625	890	2.948	GB BQ191871	similar to Mouse mRNA for p50b (identical to LSP1 and pp52), complete cds.
2088	710	2.94	GB AW251358	R.norvegicus mRNA for laminin gamma 1.
1247	427	2.915	GB BI303389	similar to Mouse acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACACT) mRNA, complete cds.
8720	2999	2.907	GB NM_053576	Rattus norvegicus hyaluronidase 2 (Hyal2), mRNA.
2803	968	2.894	GB AW251358	R.norvegicus mRNA for laminin gamma 1.
411	143	2.871	GB BU759691	Transmembrane 4 superfamily, member 1 (Tumor-associated antigen L6)
39682	13836	2.868	RAN	Rattus norvegicus RAN, member RAS oncogene family (Ran), mRNA.
1959	695	2.82	GB BG378761	similar to Mouse arsenite inducible RNA associated protein (Airap) mRNA, complete cds.
1570	558	2.81	GB AI385133	similar to Mouse h2-calponin cDNA.
9714	3462	2.806	GB NM_012857	Rattus norvegicus Lysosomal associated membrane protein 1 (120 kDa) (Lamp1), mRNA.
18756	6774	2.769	GB NM_145878	Rattus norvegicus fatty acid binding protein 5, epidermal (Fabp5), mRNA.
13620	5074	2.684	GB NM_031136	Rattus norvegicus thymosin beta-4 (Tmsb4x), mRNA.
27669	10315	2.682	GB NM_013067	Rattus norvegicus Ribophorin I (Rpn1), mRNA.
44447	16877	2.633	GB BQ207888	similar to Translation of nuc
53023	21663	2.448	GB NM_053867	Rattus norvegicus tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1), mRNA.
39242	16142	2.431	GB BQ207888	similar to Translation of nuc
14798	6214	2.381	GB AI412405	similar to Translation of nuc
16870	7095	2.377	GB NM_053290	Rattus norvegicus Phosphoglycerate mutase 1 (Pgam1), mRNA.
60037	25388	2.365	GB NM_022402	Rattus norvegicus acidic ribosomal protein P0 (Arbp), mRNA.
14843	6340	2.341	GB NM_012992	Rattus norvegicus Nucleoplasmin-related protein (Nuclear protein B23 (Npm1), mRNA.
11961	5142	2.326	GB NM_031114	Rattus norvegicus S-100 related protein, clone 42C (S100A10), mRNA.
10850	4781	2.269	GB NM_031629	Rattus norvegicus proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4 (Psbm4), mRNA.
16552	7384	2.242	GB NM_130401	Rattus norvegicus membrane-associated protein 17 (Map17), mRNA.
34991	15629	2.239	GB NM_031687	Rattus norvegicus ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (Uba52), mRNA.
14200	6353	2.235	GB NM_022592	Rattus norvegicus transketolase (Tkt), mRNA.
31665	14359	2.205	GB NM_031151	Rattus norvegicus malate dehydrogenase mitochondrial (Mor1), mRNA.
17347	7946	2.183	GB NM_033235	Rattus norvegicus Malate dehydrogenase-like enzyme (Mdh1), mRNA.
32890	15074	2.182	GB NM_012848	Rattus norvegicus Ferritin subunit H (Fth1), mRNA.
16211	7753	2.091	GB NM_053800	Rattus norvegicus thioredoxin (Txn), mRNA.
12350	6033	2.047	GB NM_019360	Rattus norvegicus cytochrome oxidase subunit VIc (Cox6c), mRNA.
25524	12680	2.013	GB NM_022179	Rattus norvegicus Hexokinase 3 (Hk3), mRNA.

表 4 マイクロアレイ法により明らかになった
p57^{kip2} 過剰発現 UMR106 細胞で発現が減少する遺伝子

34	267	0.129	GB AA901064	similar to Protein:NP_083234 TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II,
27	157	0.175	GB NM_031705	Rattus norvegicus dihydropyrimidinase (Dpys), mRNA.
342	1851	0.185	GB CB548005	similar to Translation of nuc
35	173	0.207	GB NM_130403	Rattus norvegicus protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14a (Ppp1r14a), mRNA
20	82	0.251	GB CB544605	Rattus norvegicus similar to mannosidase, beta A, lysosomal (LOC310864), mRNA
182	679	0.268	MTIE	Rat metallothionein-2 and metallothionein-1 genes, complete cds.
121	448	0.271	GB NM_017200	Rattus norvegicus tissue factor pathway inhibitor (Tfpi), mRNA.
33	112	0.293	GB BM385982	similar to Mouse, clone IMAGE:3498302, mRNA, partial cds.
48	165	0.293	GB NM_139326	Rattus norvegicus Proopiomelanocortin, beta (endorphin, beta) (Pomc2), mRNA.
168	574	0.293	GB NM_172333	Rattus norvegicus collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1), mRNA.
23	71	0.328	GB NM_022209	Rattus norvegicus BRbeta B-regulatory subunit of protein phosphatase 2A (LOC60660), mRNA.
19	58	0.33	GB NM_133562	Rattus norvegicus phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A (Pib5pa), mRNA.
1052	3139	0.335	GB NM_053605	Rattus norvegicus sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral (Smpd3), mRNA.
320	941	0.34	GB NM_030834	Rattus norvegicus monocarboxylate transporter (Mct3), mRNA.
60	177	0.343	GB NM_053704	Rattus norvegicus Bcl2-interacting killer-like (Biklk), mRNA.
23	65	0.356	GB BG665929	similar to small GTPase RAB6B
27	76	0.363	GB NM_032616	Rattus norvegicus liver-specific bHLH-Zip transcription factor 7 (Lisch7), mRNA.
124	338	0.367	GB BU758443	similar to Mouse, a disintegrin and metalloprotease domain 8, clone MGC:36123 IMAGE:5324943, mRNA, complete cds.
33	89	0.369	GB BF564580	unknown function
34	91	0.376	GB BI275705	Rat mRNA for glycerol 3-phosphate dehydrogenase, complete cds.
158	414	0.383	Trbm	Rattus norvegicus thrombomodulin
1285	3279	0.392	GB NM_053573	Rattus norvegicus olfactomedin related ER localized protein (Olfm1), mRNA.
26	66	0.394	Axl (receptor of GAS6)	A41527 protein-tyrosine kinase (EC 2.7.1.112) axl precursor
24	62	0.395	GB NM_017159	Rattus norvegicus histidine ammonia lyase (Hal), mRNA.
230	578	0.399	CD2	Rattus norvegicus OX-45 surface antigen, homolog to human T lymphocyte CD2 antigen (Cd2), mRNA.
96	238	0.405	GB AA893984	similar to Mouse CYFIP2 mRNA, complete cds.
214	524	0.408	GB AA964489	Rattus norvegicus C-CAM4 mRNA, complete cds.
34	83	0.415	GB BG376982	similar to Mouse Dp111 mRNA for polyposis locus protein 1-like 1 (TB2 protein-like 1), complete cds.
27	65	0.424	OPHN1	similar to Protein:NP_443208 oligophrenin 1, Rho-GTPase activating protein
95	219	0.434	GB NM_020074	Rattus norvegicus proteoglycan peptide core protein (Pgs), mRNA. AMGNNUC:ARGI1-073480-CYA
26	60	0.437	GB CB544526	unknown function
453	1028	0.44	GB NM_053714	Rattus norvegicus progressive ankylosis (Ank), mRNA.
52	118	0.442	GB BF556399	similar to Unknown (protein for MGC:23936)
92	209	0.442	GB BF291027	similar to Mouse complement component C5D (pro-C5D) mRNA, complete cds.
27	62	0.444	GB CB548290	similar to Protein:NP_598895 RIKEN cDNA 2510002C16 [Mus musculus].
64	144	0.448	Neurturin	Neurturin precursor
34	76	0.45	GB NM_023969	Rattus norvegicus putative G protein-coupled receptor snGPCR32 (Edg7), mRNA.
172	382	0.451	GB AI575272	similar to Mouse chromosome 11a2 clone rp21-493n6 strain I29S6/SvEvTac, complete sequence.
26	57	0.453	GB CB545555	similar to Protein:NP_003655 adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit; beta3A-adaptin;
226	495	0.457	GB NM_053539	Rattus norvegicus isopentenyl-diphosphate delta isomerase (Idi1), mRNA.
182	393	0.464	GB AI172217	similar to evidence:NAS-hypothetical protein~putative
26	56	0.465	GB NM_053904	Rattus norvegicus 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) (Oplah), mRNA. AMGNNUC:ARGI1-069169-CYA AMGNNUC:NM_053904 1 Rattus norvegicus 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) (Oplah), mRNA.
27	59	0.465	GB CB548459	similar to Protein:NP_613069 expressed sequence AI481216 [Mus musculus]. score=1.012e-35
27	59	0.465	GB NM_053912	Rattus norvegicus pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 3 (Pscd3), mRNA.
27	58	0.471	GB CB545510	similar to Protein:NP_033556 X-linked nuclear protein; alpha thalassemia/mental retardation syndrome (X-linked) [Mus musculus]. score=1.28e-29
26	55	0.477	Notch1	R.rattus mRNA homologue of Drosophila notch protein.
27	57	0.477	GB NM_053811	Rattus norvegicus solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 2 (Slc9a3r2), mRNA.
67	141	0.477	GB CB545511	similar to Protein:NP_083001 RIKEN cDNA 4632417N05 [Mus musculus]. score=2.949e-49
41	86	0.481	GB NM_031027	Rattus norvegicus dihydropyrimidine dehydrogenase (Dpyd), mRNA.
26	54	0.483	GB NM_012844	Rattus norvegicus Epoxide hydrolase 1 (microsomal xenobiotic hydrolase) (Ephx1), mRNA.
38	79	0.486	GB NM_031648	Rattus norvegicus FXVD domain-containing ion transport regulator 1 (Fxyd1), mRNA.
53	110	0.486	GB AI171466	unknown function
26	53	0.49	GB BF524977	unknown function
33	67	0.492	GB NM_053949	Rattus norvegicus potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 (Kcnh2), mRNA.
31	64	0.493	GB NM_031686	Rattus norvegicus sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide (Scn6a), mRNA.
106	215	0.493	GB AI227731	unknown function
30	60	0.5	GB BI275669	similar to Mouse, clone MGC:35667 IMAGE:5323841, mRNA, complete cds.
30	60	0.5	GB CB544983	similar to Translation of nuc:BC030850_1 Mus musculus, Similar to unc-51-like kinase 1 (C. elegans), clone IMAGE:4165582, mRNA, partial cds. score=9.784e-45
30	60	0.5	Robo1	Rattus norvegicus roundabout homolog 1 (Drosophila) (Robo1), mRNA.
59	118	0.5	GB AI228076	similar to Mouse DNA sequence from clone RP23-22K4 on chromosome 2, complete sequence.

2 $\mu\text{g/kg/day}$ もしくはそれ以下の用量の E2 による効果が 20 $\mu\text{g/kg/day}$ のカンデサルタン投与と同等の効果であった点は特記すべき点である。

(9) ラット血管平滑筋におけるエストロゲン応答遺伝子の検索と同定

検索した約 7,000 遺伝子のうち、約 2,000 の遺伝子が大動脈組織に存在すると考えられた。表 6 にマーカー遺伝子の発現を示すが、G3PDH が各群で同等に

表6 マーカー遺伝子と従来報告のあるエストロゲン応答遺伝子の発現

Accession No.	Definition	Sham (intensity)	OVX+V (intensity)	OVX+E (intensity)
M17701	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	1278.5	1232.6	1246.0
M83107	SM22	4350.8	4487.8	4631.9
U50044	von Willebrand	8.7	-54.5	-19.8
AF110508	内皮素-1酸化酵素合成酵素	48.4	48.1	46.3
M90065	アンジオテンシンII 受容体	-7.5	5.1	4.2
U03734	アンジオテンシン変換酵素	216.6	239.9	148.3
X06769	c-fos	1800.1	307.7	231.5
S64044	プロゲステロン受容体	61.3	31.7	39.8
X07457	glucose-6-phosphate dehydrogenase	474.0	332.1	454.2
Y00396	c-myc	44.4	36.3	33.3

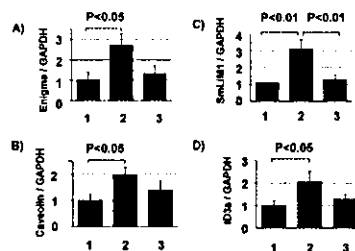
発現している点はマイクロアレイの系が適切に行われたことを、平滑筋マーカーの SM22 が高発現し内皮マーカーの von Willebrand factor と endothelial nitric oxide synthase の発現が極めて低かった点を用いた大動脈組織が平滑筋組織に由来することを意味する。アンジオテンシン変換酵素が OVX+E で低発現であった点は報告通りだが、その他のマーカー遺伝子については必ずしも過去の報告のような変動を示さなかった。結局、20 遺伝子を候補遺伝子として選び出し、real-time PCR とあわせて発現レベルを評価した。最終的に 4 つの遺伝子、caveolin-1, enigma, SmLIM, Id3a がエストロゲン応答遺伝子として同定された。表 7 にこれら 4 遺伝子のマイクロアレイ結果を、図 14 に real-time PCR の結果を示すが、いずれの遺伝子もエストロゲン補充により 2~3 倍に発現が増加している。逆にエストロゲン補充で発現が低下する遺伝子は同定されなかった。最後に、培養血管平滑筋細胞を用いた検討では、やはり 4 遺伝子

表7

DNAマイクロアレイにより同定された4遺伝子の発現レベル

Accession No.	Definition	Sham (intensity)	OVX+V (intensity)	OVX+E (intensity)	OVX+E / OVX+V (intensity)
U48247	Enigma	288.3	126.6	455.5	3.5
Z46614	Caveolin1	674.3	329.1	694.4	2.1
U44948	SmLIM1	1286.9	1260.7	2054.9	1.6
AF000942	Id3a	201.7	224.6	318.3	1.4

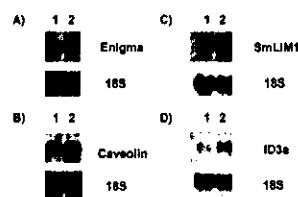
図14



4つのエストロゲン応答遺伝子、enigma (A), caveolin-1 (B), SmLIM1 (C), Id3a (D)のreal-time PCRによる発現解析。OVX+V (lane 1, n=5), OVX+E (lane 2, n=5), Sham (lane 3, n=4)からえた大動脈組織を解析した。

ともに E2 添加で発現が 1.5~2 倍に増加し、エストロゲンに応答することを確認した (図 15)。

図15



ラット培養血管平滑筋細胞における4遺伝子の発現とエストロゲンの効果。大動脈由来平滑筋細胞を対照溶媒 (lane 1) もしくは100 nmol/L 17β-estradiol (lane 2) にて24時間刺激後回収し、遺伝子発現をノーザンブロットにて解析した。

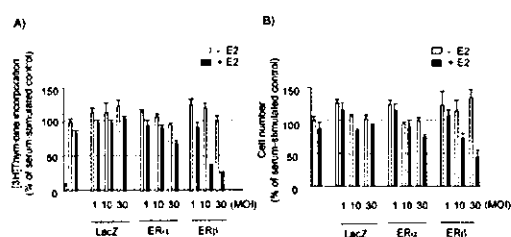
(10) 血管平滑筋細胞(VSMC)および心筋線維芽細胞(CF)増殖における ER サブタイプの役割

1) VSMC における ER サブタイプの増殖制御作用

ERE レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性の内因性 ER による転写活性を、E2 の VSMC 増殖抑制作用については DNA 合成能をそれぞれ検討した。E2 は vehicle に比べ ERE レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性を約3倍高め、

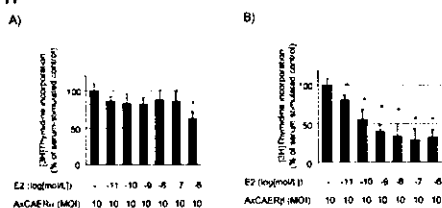
そして VSMC の増殖を用量依存的に 10% 程度まで抑制した。次に、アデノウイルスを用いて ER サブタイプを過剰発現して同様の実験を行った。ノーザンおよびウェスタンブロットでは、内因性の ER サブタイプ発現は検出できなかったのに対し、感染させた VSMC では MOI に依存して遺伝子およびタンパクの発現レベルが著明に増加した。AxCALacZ を VSMC に感染させると、DNA 合成は 30 MOI 以上では用量依存性に減少した。そこで、アデノウイルスが DNA 合成に影響しない 30 MOI 以下で検討を行った。図 16 および図 17 に示したように、AxCAER α を

図 16



VSMC増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果
3種類のアデノウイルスベクター (AxCALacZ, AxCAER α , AxCAER β) を感染させたラットVSMCを、E2 100 nmol/L 存在下もしくは非存在下で、5% DCC-FBSにより増殖させ、[3H]thymidineの取り込み (A) および細胞数 (B) を測定した。

図 17



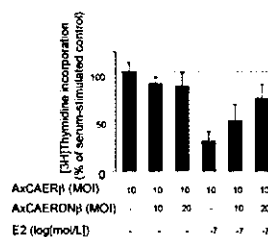
VSMC増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果 ; E2の濃度依存性

AxCAER α (A) もしくはAxCAER β (B) を感染させたラットVSMCを、表示した E2存在下で 5% DCC-FBS により増殖させ[3H]thymidineの取り込みを測定した。*p<0.05 vs. E2 (-)

感染させた VSMC では DNA 合成の抑制作用は E2 の存在にかかわらず増強効果は 30 MOI でわずかに認める程度であった。対照的に、AxCAER β を感染させた VSMC では、5 MOI 以上では E2 の存在下で DNA 合成の抑制作用は増強し、10 MOI では約 50 %減少させた(図 16、図 17)。これに並行して、48 時間 5% DCC-FBS で刺激した VSMC 細胞数の増加は、

AxCAER β で感染させた VSMC では E2 の存在下で 10 および 30 MOI にて減少を認めたが、AxCALacZ または AxCAER α で感染させた VSMC においては減少を認めなかった(図 16)。また、10 MOI の AxCAER β を感染させた VSMC では 0.01 nmol/L という低濃度の E2 においても、DNA 合成は有意に抑制された(図 17)。一方、この作用は AxCAER α で感染させた VSMC ではほとんど認められなかった(図 17)。さらに、AxCAER β を感染させた VSMC での抑制作用は AxCAERDN β の共感染で用量依存的に減弱した(図 18)。

図 18



ER β に対するドミナントネガティブERの拮抗作用

ラットVSMCにAxCAER β 単独感染もしくはAxCAERDN β の共感染によりドミナントネガティブERを発現させ、E2 100 nmol/L存在下もしくは非存在下で[3H]thymidineの取り込みを測定した。

VSMC 増殖抑制作用における ER α と ER β のヘテロ二量体化の効果を検討するために、AxCAER α 及び AxCAER β で感染した VSMC において thymidine の取り込みを測定したが、拮抗作用は認められなかった。同様にヒト VSMC を用いて行った増殖実験では、やはり AxCAER β を感染させた場合のみ増殖抑制の増強効果を認めた。

COS-7 細胞に非感染あるいは AxCALacZ を感染させた場合、ER の転写活性は E2 の添加によって変化しなかった。しかし、AxCAER α および AxCAER β を感染させると、E2 存在下で ER の転写活性は以前示した研究と同様に増加した。以上のことからアデノウイルスベクターにより過剰発現させた ER α または ER β は転写因子として機能することを確認した。そこで、同様に VSMC へ ER を過剰発現させたときに、転写活性を加算

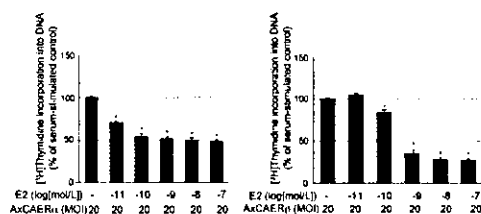
的に増加させるかどうかを検討した。その結果、10 MOI にて AxCAER α または AxCAER β を感染させた VSMC における転写活性は若干増加し、AxCADNER β の共感染にて活性はほぼ完全に消失した。

2) CFにおけるERサブタイプの増殖抑制作用

ラット CF における内因性の ER の発現を検討するために RT-PCR 法にて検討し、ER α および ER β ともに発現を認めた。次に、CF の細胞増殖に対する E2 の作用を検討するために DNA 合成を検討したところ、生理的濃度(～100 nmol/L)の E2 は CF の増殖を最大で約 10%抑制した。

AxCALacZ を 60 MOI 以上で感染させると MOI 依存性に DNA 合成を抑制させた(図略)。したがって、アデノウイルス自身による DNA 合成に対する影響を受けない 60 MOI 以下で DNA 合成を検討した。AxCALacZ を感染させた CF では E2 による DNA 合成の抑制作用に影響を与えなかった。一方、AxCAER α あるいは AxCAER β を 10 MOI 以上で感染させた CF において DNA 合成は有意に抑制され、その作用は MOI 依存的であり、効果は両サブタイプでほぼ同等であった(図 19)。また、この増殖抑制作用は低

図19



CF増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果
AxCAER α (A) もしくはAxCAER β (B) を感染させたラットCFを、表示したE2存在下で5% DCC-FBSにより増殖させ、[3H]thymidineの取り込みを測定した。*p<0.05 vs. E2 (-)

濃度の E2 においても十分にみられた。ER サブタイプを過剰発現させた CF における抑制作用が実際に ER を介しているかを検討するために、AxCAER α あるいは AxCAER β と AxCADNER β を共感染させ

て検討を行った。20 MOI の AxCAER α あるいは AxCAER β を単独で感染させた CF では約 50-70%の DNA 合成の抑制が認められたが、AxCADNER β の共感染によりその抑制作用は AxCADNER β の MOI 依存性に減少した。次に、CF → ER を過剰発現させたときに、転写活性が増加するかどうかを検討した。20 MOI の AxCAER α または AxCAER β を感染させた CF における転写活性は 3 倍以上に増加し、AxCADNER β の共感染にて活性はほぼ完全に消失した。

(11)高年齢患者における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標との関連

男性では、free-T は PWV および DWMH と有意な負の相関を示したが、PVH や高感度 CRP、炎症性サイトカインとは相関しなかった(表 8)。DHEAS は DWMH と

表8 高齢患者におけるアンドロゲン濃度と動脈硬化指標の相関

	男性 (n=46)		女性 (n=88)
	free-T	DHFAS	DHEAS
年齢	-.435*	-.596*	-.196*
PWV	-.330*	-.172	-.035
PVH	-.108	-.148	-.168
DWMH	-.300*	-.271*	-.092
logCRP	-.151	-.172	-.035
logMCP-1	.164	.053	-.078
logIL-6	-.205	-.047	-.073
logTNF α	-.010	.173	.017

相関係数を示す。*P<0.05, †P<0.1

の間に負相関する傾向を示したものの、そのほかの指標とは相関しなかった。一方、女性では、DHEAS が PVH と負相関する傾向を示したが、高感度 CRP、炎症性サイトカインとは相関しなかった。逆に、DHEAS と PWV との間には有意な正の相関がみられた。年齢を変数に入れた重回帰分析では、PWV や PVH、DWMH は年齢との関連が強く、女性の DHEAS と PWV との関連($\beta=0.341$, $p<0.001$)以外はホルモンが動脈硬化マーカーの有意な決定因子ではなかった。

(12)虚弱高齢男性における血中テストステロン濃度と日常生活機能

総テストステロンおよび遊離テストス

テロン濃度は、GDS 以外の機能評価項目と有意な正相関を示した(表 9)。年齢、

表9

日常生活機能指標の分布および血中テストステロン濃度と各指標との単相関係数

	Barthel Index	IADL	HDS-R	GDS	Vitality Index
Mean±SD	73±27	21±2.0	18±7	6.3±3.1	8.8±1.8
(Range)	(5-100)	(0-5)	(2-29)	(1-13)	(3-10)
総テストステロン	.422**	.279*	.344*	.077	.370**
遊離テストステロン	.369**	.390**	.512**	.164	.464**

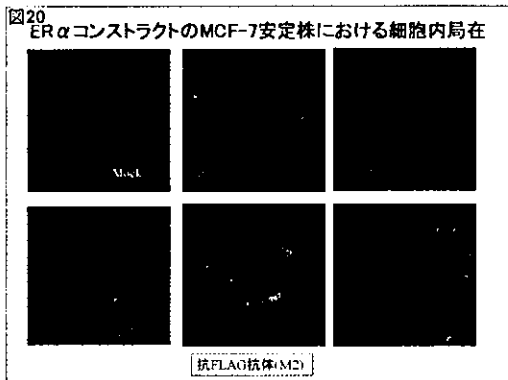
基本的 ADL は Barthel Index により、手段的 ADL は Lawton and Brody's IADL により、認知機能は改訂長谷川式知能評価スケール (HDS-R) により、気分は Geriatric Depression Scale (GDS: 15 項目) により、意欲は Vitality Index により評価した。
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

血清アルブミン、血清総コレステロールを独立変数に加えた重回帰分析でも、遊離テストステロン濃度は HDSR ($\beta=0.403$, $p=0.03$) および Vitality Index ($\beta=0.407$, $p=0.02$) の有意な決定変数であった。なおこの集団では、総テストステロン、遊離テストステロンいずれも、年齢、Body Mass Index、ヘモグロビン、リンパ球数、血清アルブミン、総コレステロールとは関連しなかった。

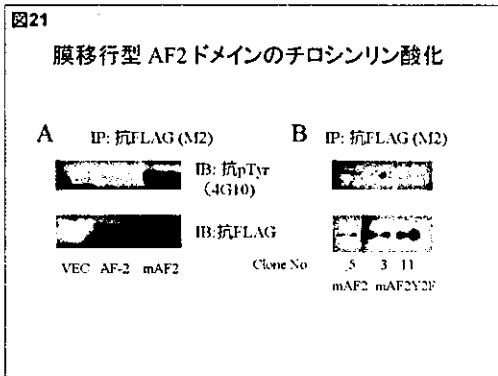
(13) エストロゲンの non-genomic 作用の解析

MCF-7 細胞の系で樹立した安定発現細胞株の免疫細胞染色の結果から、エストロゲンの AF-1 ドメインや AF-2 ドメインをそのまま発現させた MCF-7 細胞では、蛋白質発現は細胞質に見られるのに対し、膜局在シグナルを付加した蛋白質は予想通り、膜に局在が移行していることが観察された(図 20)。

また抗リン酸化チロシン抗体を用いた



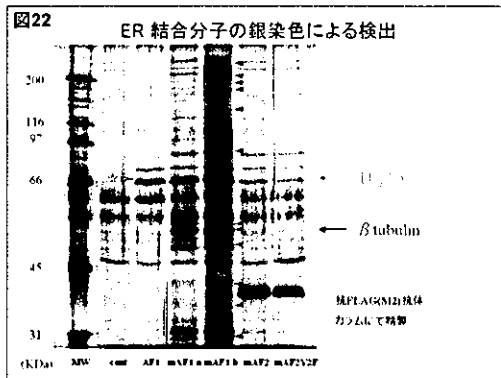
ウエスタンブロッティングにより AF-2 ドメインが膜移行させたときのみチロシンリン酸化を受けることが観察された(図 21)。このリン酸化は 537 番のチロシンを



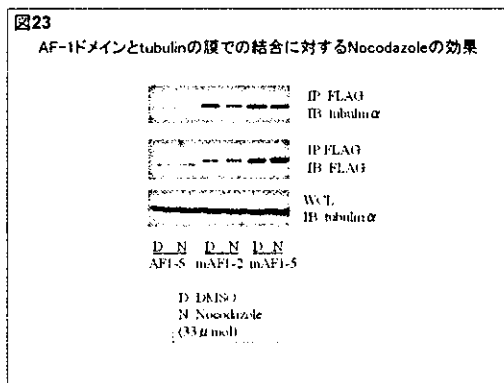
フェニルアラニンに変えた変異体 537F ではほぼ消失したことから、この部位が膜におけるチロシンリン酸化部位の候補と考えられた(図 21)。

我々は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 19 に示す通り AF-1 ドメインに特異的に結合する多くの蛋白質群が銀染色により観察されたのに対し、AF-2 ドメインと特異的に結合する蛋白質はこのスケールの精製では明確に検出はできなかった。

AF-1 ドメインに特異的に結合する蛋白質群を質量分析により解析した結果、Hsp-70 と β チューブリンの同定に成功した(図 22)。図 23 に示すように特異的抗



体を用いたウエスタンブロッティングで AF-1 ドメインは膜に局在したときに限り β チューブリンと結合することが確認された。 α チューブリンも同様に膜に局

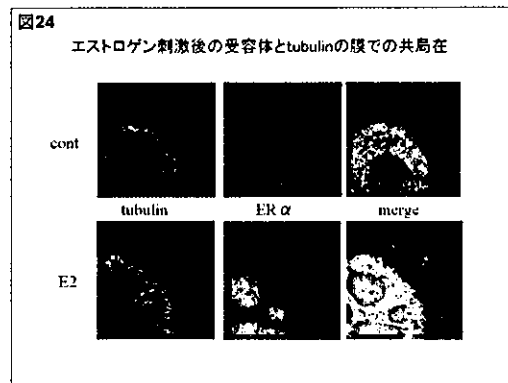


在した AF-1 に特異的な結合が認められたが、そのようなチューブリンとの結合は、チューブリンの重合阻害剤であるノコダゾールによる処理で AF-1 ドメインとの結合が減弱することから、微小管のようなチューブリンの重合体が少なくとも部分的にはエストロゲン受容体の AF-1 ドメインとの結合に関わることが示唆された(図 23)。

エストロゲン受容体と HSP70 との結合は AF-1 ドメイン特異的であったが膜局在との関連は認められず、恒常的結合ではないかと考えられた。ただしこれらの分子と AF-1 ドメインの結合の生理学的意味について現在解析中である。これまで精力的に AF-2 に結合する蛋白質の大量精製による同定を試みてきたが、幾つかの蛋白質の候補を銀染色レベルでは見いだすことが出来たが、蛋白質の絶対量の問題で、質量分析による蛋白質の同定は成功しなかった。

MCF-7 細胞をエストロゲンで刺激したときの細胞蛍光染色では、細胞質の微小管領域にはエストロゲン受容体の発現は検出されないが、細胞辺縁に沿ってエストロゲン受容体とチューブリンが共局在しているエリアが認められた。すなわちエストロゲン受容体のごく一部の局在が核から細胞膜に移行すると同時に、エストロゲン受容体の存在する膜周辺部に移行していることから、チューブリンが微小管から離れてこの周辺領域で通常の微小管の機能とは異なる未知の機能を持

っていることが示唆された (図 24)



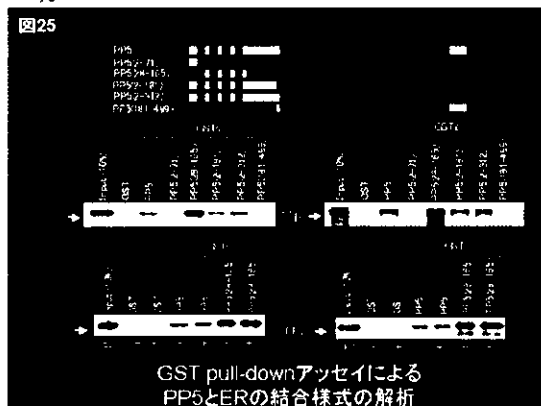
一方で、既に報告されているエストロゲン刺激による内在性レセプターのリン酸化や、レセプターの膜局在、下流シグナルの活性化などは、いろいろ条件を変えて検討を繰り返しているものの、再現性良く検出することが現在までできていない。一つの工夫としてシグナル解析に最もよく用いられる乳癌細胞株 MCF7 をモデル系として、エストロゲンを長期にわたって枯渇させることにより内在性受容体の発現が数十倍にまで高くなった LTED (long term estrogen depletion)細胞を樹立することに成功した。この細胞やエストロゲン受容体全体を過剰発現させた細胞を用いても、既に報告されているエストロゲン刺激による MAPK のリン酸化やエストロゲン受容体の細胞膜への移行は予想よりも弱いながらも確認することができた。ただしそのような non-genomic な反応は必ずしも毎回再現性良く見られるわけではなく、いくつかの論文で見られる顕著な反応を得られるような条件は最後まで見つからなかった。また Src ファミリーキナーゼの活性もエストロゲン刺激による短時間での変化は見られず、Cas、パキシリンなど Src の基質蛋白質群のリン酸化状態もリガンドの有無で変化が認められなかった。同じリガンド刺激で ER α の Ser118 のリン酸化は著明に起こっていることから、リガンドによる genomic な反応に関しては十分に起こっており、刺激自体の問題はない

ものと考えられた。

また MCF-7 の他に T47D, ZR75-1 などの乳癌細胞も試したが、これまでの所、再現性の高いリガンド依存性の即時性変化は認められていない。

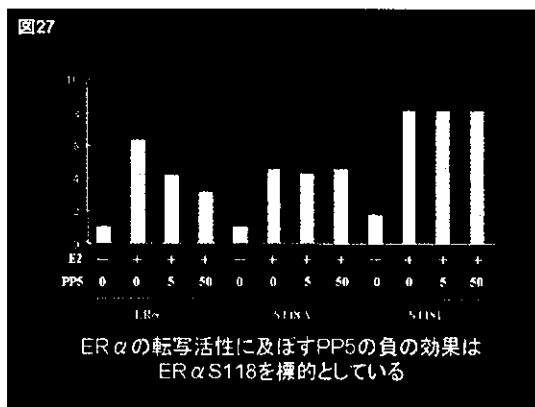
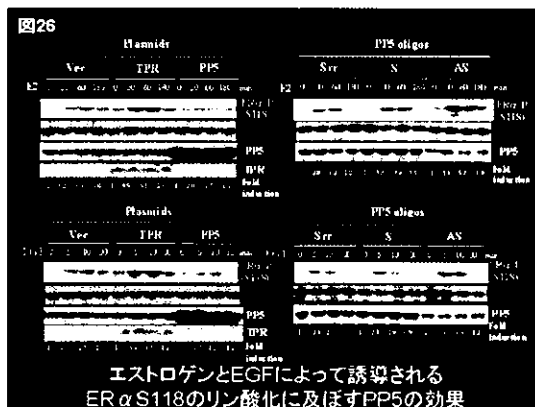
(14) エストロゲン受容体修飾因子 PP5 とエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の同定とその機能解析

酵母 two-hybrid スクリーニング法を用いて C 末端を欠きドミナントネガティブに転写を抑制する ERβ に結合する因子をスクリーニングしたところ、Protein phosphatase 5 (PP5) を同定した。GST pull-down アッセイにより PP5 の N 末端に存在する TPR ドメインが ER と結合し、その際の結合はエストロゲンの存在によって影響されないことが明らかとなった(図 25)。



また、免疫沈降法を用いて内在性の PP5 と ER が MCF-7 細胞内で結合することを証明した。MCF-7 細胞においては、エストロゲン処理後 30-60 分をピークとして、また EGF 処理によっては 5-10 分後をピークとして ERα S118 のリン酸化が観察されたが、PP5 を過剰発現するとエストロゲンならびに EGF 刺激による ERα S118 のリン酸化が抑制され、PP5 のアンチセンス DNA を用いて発現量を低下させると逆に ERα S118 のリン酸化は亢進することが確認された(図 26)。

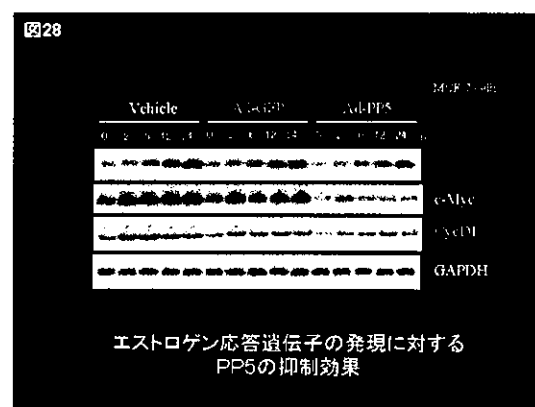
また、PP5 による脱リン酸化は ER の転写活性を抑制することが明らかとなり、この時、PP5 は ERα S118 を標的として



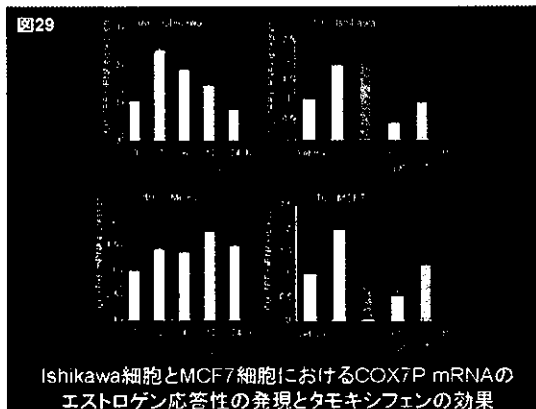
いることが示された(図 27)。

さらに、PP5 はエストロゲン応答遺伝子である pS2、c-Myc、CycD1 のエストロゲン応答性の発現を減少させることが明らかになった(図 28)。

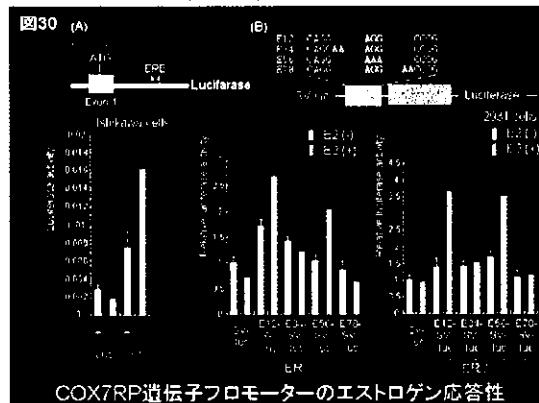
ヒト子宮内膜癌 Ishikawa 細胞およびヒト乳癌 MCF7 細胞において COX7RP mRNA のエストロゲン誘導性の発現が観察された。しかしながら、乳腺に対してアンタゴニストとして作用するが、子宮内膜に対してはアゴニストとして作用することが知られている SERM であるタモ



キシフェン(TAM)を投与したときには、MCF7 においては COX7RP の発現量は変化しなかったが、Ishikawa においては誘導性の発現が観察された(図 29)。



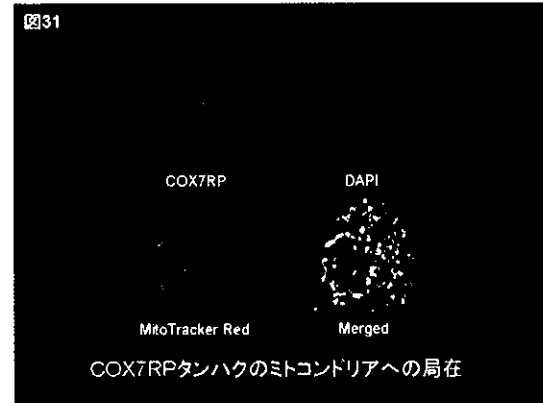
次に、転写レベルでの COX7RP 遺伝子の発現調節を解析するため、COX7RP 遺伝子の ERE を含むプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。COX7RP 遺伝子プロモーターは ER α および ER β によって制御されることが明らかとなった(図 30)。



Ishikawa 細胞はエストロゲン依存性の増殖を示し、この際、タンパクレベルでも COX7RP はエストロゲン誘導性の発現を示すことが確認され、さらに COX7RP に対するその発現量を減少させると、エストロゲン依存性の増殖が見られなくなることが示された。

次に、抗 COX7RP ポリクローナル抗体を作製し、細胞免疫染色法を用いて COX7RP タンパクの細胞内局在を解析したところ、COX7RP のシグナルはミトコンドリアに選択的に集積する MitoTracker

Red と完全に一致したことから COX7RP タンパクはミトコンドリアに局在することが判明した(図 31)。



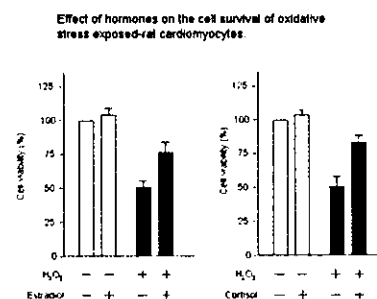
また、COX7RP を安定発現する Ishikawa 細胞を樹立し、COX7RP の機能を解析したところ、COX7RP は細胞増殖速度を亢進させ、また、足場非依存性の増殖を亢進することが示された。

(15)エストロゲン受容体を介した心筋細胞保護作用に対するレドックス制御分子の意義

1) E2 の抗酸化能

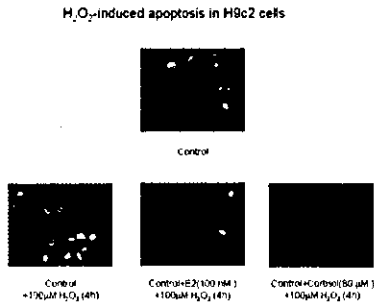
ラット心筋芽細胞に E2 に GRX を強制発現させた H9c2-GRX 細胞を 100nM で 16 時間投与した後に、0.1mM 過酸化水素で 4 時間処理をした。MTT アッセイ法(図 32)、

図32



Hoechst 染色法(図 33)で生存細胞を測定すると、コントロールに比べて H9c2-GRX 細胞で酸化ストレスで死亡する細胞が著明に減少した。このことは、E2 が心筋芽細胞の酸化ストレスによるアポトーシスを保護する作用があることを示すものである。

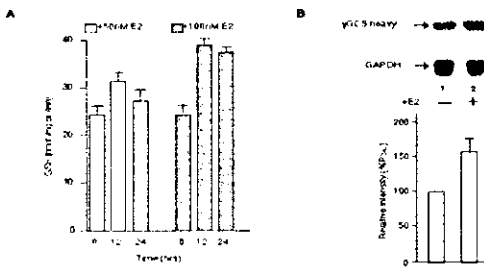
図33



E2 は心筋芽細胞内の GSH 濃度を上昇させた。それは GSH 合成律速酵素 γ -GCS の遺伝子発現が上昇していることが原因であると考えられた(図 34)。

図34

Estradiol stimulated the expression of γ -GCS.

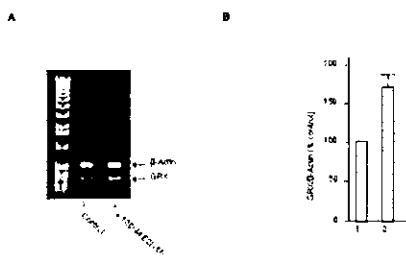


次に、GRX 発現細胞で抗酸化能が高かった他に、E2 が GRX 発現を上昇させた (図 35)。このことは、E2 が GRX を介したレドックス調節による細胞保護作用を持つことを示している。

この GSH と GRX で制御を受ける細胞内抗アポトーシスシグナルの重要な因子である Akt についての検討を行った。H9c2 細胞(10^6 cells)に 100 nM E2 を加えて 16 時間培養し、その後に 0.1mM H_2O_2

図35

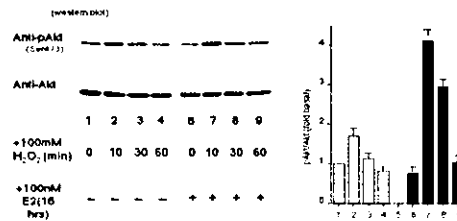
Estradiol induced the expression of GRX.



を加え、0-1 時間で以下の実験を行なった。Akt リン酸化は、 H_2O_2 処理後 10 分で上昇した。その程度は E2 処理細胞では約 410%であり、E2 未処理細胞での約 180%の上昇に比較して高かった(図 36)。

図36

Estradiol enhanced the phosphorylation of Akt by H_2O_2

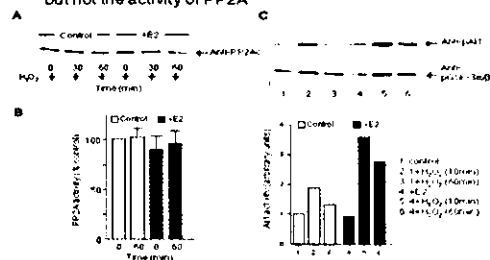


た Akt 活性が上昇していた結果から、E2 の抗アポトーシス作用の機序の重要な一要因であることが推測された。

Akt 活性を測定すると、E2 前処理によってより高い上昇が見られた。しかし、PP2A の活性は E2 前処理によっても変化は認められなかった (図 37)。

図37

Estradiol stimulated the activity of Akt kinase but not the activity of PP2A

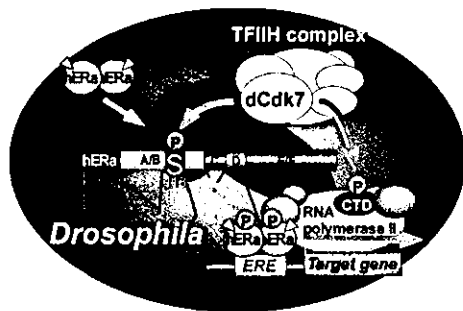


Akt の Cys 残基の状態を AMS 処理によって測定すると、E2 前処理では H_2O_2 処理後も還元型が維持されていた(図 38)。更に、細胞内レドックス状態を測定すると、E2 前処理細胞では thiol reductase 活性が増加していた。 γ -GCS-HS プロモーターの ERE 領域の活性は、E2 依存性に増加した(図 38)。

(16)老化と神経変性疾患におけるステロイド受容体転写調節機構の解明とそ

ショウジョウバエにおける細胞内情報伝達系と核内レセプターの転写制御のクロストークが種を越え保存されているかを確認するため、リン酸化修飾を介した ER α の転写活性制御機構の意義をショウジョウバエ遺伝子変異体により検討した。その結果、dCdk7 遺伝子欠損変異系統において ER α の顕著な転写抑制が観察され、Ser¹¹⁸ 残基非リン酸化型 ER α の転写活性には変化が無いことを確認した(図40)。同時に *in vitro* 系において dCdk7 が

図40

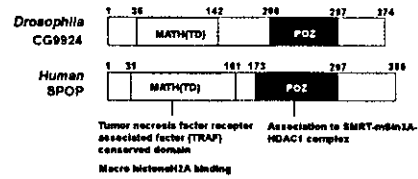


dCdk7によるSer118のリン酸化はER α 転写活性を促進させる

ER α Ser¹¹⁸ 残基を直接的にリン酸化することを確認した。以上の結果、dCdk7 による Ser¹¹⁸ 残基のリン酸化を介した ER α 転写制御機構を個体レベルで初めて証明し、遺伝学的な相互作用を見出した(Ito et al., Gene to Cells 2004)。

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。まず転写変動が顕著に認められた I(3)s84507(CG9924)および I(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41)。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

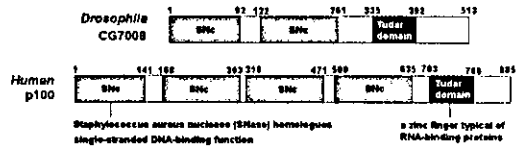
図41



制化制御に関与すると示唆されている。

次に CG7008 は SNc および Tudar domain が保存され、そのヒトホモログは p100 に相当する転写抑制化因子を見出した(図42)。p100 は Tudar domain を介して RNA

図42



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。

また Su(var)2-10 を転写活性化因子として同定した。dSu(var)2-10 ヒトホモログは PIAS であった(図43)。従来 PIAS 機能

図43

Gene	ARK, Y17, H1	Human homology	Domain
CG9924	activator	SPOP	POZ/BTB domain
CG13625	activator	Shn160	Shn/Anp-related nuclear matrix domain, splicing
CG7008	repressor	p100	RNA binding (tudor domain)
CG9630	repressor	TRAF240	mediator
spo	repressor	hnRNP-1	RNA binding
Dan1	repressor	Dan-1 cyclinlike kinase	RNA binding
toron	repressor	Tif-1alpha	corepressor
Ash1	repressor	Ash1	histone methylase
CG1815	repressor	protein kinase C-binding protein RAC17	PHD finger, Bromodomain
mbp	activator	specimen-specific binding protein subunit of POU domain subunit 1 (POU class 1 subunit of POU)	Protein phosphatase 2A regulatory B subunit (B56 family)
CG9813	activator	unknown	RNA primase/transcriptase
canb1A	activator	canonin B 2	Zinc-finger GCS-type, Ankyrin repeat
Su(var)2-10	activator	PIAS1	GAP domain
shncVCG32520	activator	unknown/KIAA0926	BAH(homo-ubiquitin homology) domain
sgo1	activator	sgo1	RNA induced silencing complex
sh	activator	TRIM, RNP	RNA recognition motif, RBD
sta2GE	repressor	STAT	SH2 domain
Tm2	repressor	Tropomyosin	actin binding coiled coil

はユビキチンリガーゼ活性や SUMO-1 との相互作用を伴う SUMO 化活性によるタンパク分解作用が知られているが、ER α および AR タンパク量は変動しないことから、PIAS の新たな転写促進機能が推察された。その他、RNA binding 機能を保持する hnRNP や siRNA の作用構成因子である Ago1 を同定した。

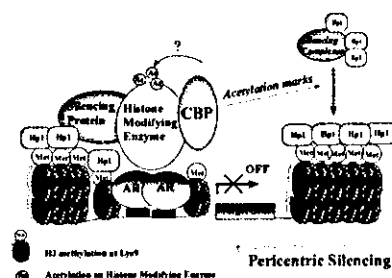
最終的にこれら p100 および SPOP における転写活性能を 293T 細胞でルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、ER α AR の転写活性能において p100 は転写抑制を示し、SPOP は転写増強が認められた。この結果からこれら分子が核内レセプター転写をヒト生体内で制御する可能性が強く示唆された。

4) 染色体構造変換を指標とした転写共役因子の分子遺伝学的探索とその機能解析
 個体レベルでクロマチン構造を考慮した転写活性を把握する PEV 解析系を応用した AR 転写系を構築した。その結果、ヘテロクロマチン下の AR 応答遺伝子はその発現が減弱することが判明した。驚くべきことにこの条件下において既知転写活性化共役因子である CBP mutant は AR 転写活性を顕著に増強させることを見出した。すなわち CBP はヘテロクロマチン上において転写抑制する機能が示唆された。そこでヘテロクロマチン AR 応答遺伝子上での CBP によるヒストン修飾への影響を ChIP assay にて検討したところ、ヒストン H3 Lys9 がメチル化を亢進することが判明した。またこれらの結果と同様に、AR のみならず内因性転写機構においても CBP はヘテロクロマチン領域では転写抑制を促すことを確認した。従って、ヘテロクロマチン領域における CBP 機能は HAT 活性を介した転写活性化作用とは異なり、ヒストンメチル化修飾を誘導しヘテロクロマチン維持に作用すると推測された(図 44)。

(17) 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

1) ER α の細胞質での機能の解析

図 44



ER α の細胞質での機能を探るため、IGF-1 受容体とのクロストークを検討した。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。両者のリン酸化の度合いは、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。興味深いことに 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 45)。カルモ

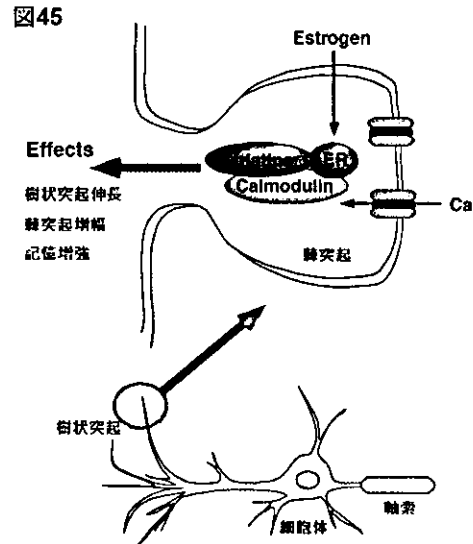


図45 ER α とカルモジュリン、ストリアチンとの複合体

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。現在これらの因子と ER α との関連を解析中である。

2) ER α の品質管理機構の解析

本研究者は、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加することによって、エストロゲン未結合型 ER α が蓄積することを見出した。この結果は、エストロゲンが結合していない ER α がプロテアソームによって分解されていることを示している。そこで、このエストロゲン非依存的な ER α の分解が、ユビキチン-プロテアソーム経路を介しているのかを検討するため、ユビキチン化アッセイを

行った。その結果、ER α はエストロゲン存在下、非存在下いずれの場合においてもユビキチン化されていることが明らかになった。次に ER α においてエストロゲン非依存的な分解に必要とされる領域を同定するため、いくつかの領域欠損変異体を作製し、エストロゲン添加、非添加時における分解の有無をウエスタンブロットングによって検討したところ、リガンド結合領域を含む全ての欠損変異体においてエストロゲン添加時の有意な蛋白質蓄積が認められた。したがって、エストロゲン非依存的な ER α の分解に重要な領域は ER α のリガンド結合ドメイン内に存在するものと考えられた。そこで、エストロゲン非存在下で ER α のリガンド結合領域と結合するユビキチンリガーゼの同定を試みた。HeLa 細胞の核抽出液を用いて、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合 ER α リガンド結合ドメインタンパク質とエストロゲン存在下あるいは非存在下において結合するタンパク質の精製を行った。さらに、エストロゲン非依存的に ER α リガンド結合ドメインに結合するタンパク質を同定するため Peptide Mass Fingerprinting を行ったところ、35 キロダルトンの結合タンパク質が carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein(CHIP)であることが明らかになった。CHIP はユビキチンリガーゼの一種であり、その C 末端側にある U-box ドメインに E3 ユビキチンリガーゼ活性をもち、N 末端側のテトラトリコペプチドリピート(TPR)を介してシャペロンである Hsp70 や Hsc70 と結合することが知られている。質量分析によってシャペロンタンパク質 Hsp/Hsc70 も同定できたことから、CHIP はエストロゲンの結合していない ER α リガンド結合ドメインと、Hsp/Hsc70 を含む複合体として結合していることが示唆された。そこで、ER α と CHIP/Hsp/Hsc70 複合体の相互作用を免疫

共沈降法によって検討した。CHIP は抗 ER α 抗体を用いて免疫沈降した場合においてもエストロゲン非依存的に検出されたことから、*in vivo*において ER α と CHIP は相互作用していることが明らかにされた。

CHIP-Hsc70 複合体におけるその他の構成因子をより詳細に同定するため、FLAG と HA の二種類のタグをつけた CHIP を恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立した。CHIP と複合体を形成しているタンパク質を得るため、この HeLa 細胞抽出液において抗 FLAG モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行い、結合したタンパク質を FLAG ペプチドで溶出した。溶出されたタンパク質は、さらに抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行うことによって非特異的なタンパク質を減らした。質量分析による精製タンパク質の同定の結果から、本複合体中には KIAA0678, Hsp90, Hsc70, Hsp70, Hsp40 などのシャペロン蛋白質群が存在していることが明らかになった。したがって、CHIP はシャペロン蛋白質と複合体を形成し、ER α に結合しているものと考えられた。

次に、CHIP が ER α のユビキチン化や分解に関与しているかどうか調べるために、293 細胞に ER α を単独あるいは CHIP とともに発現させた。回収した細胞抽出液のウエスタンブロット分析により、エストロゲン非存在下において CHIP の発現は ER α の定常状態での蛋白質量を減少させた。細胞への MG132 あるいはラクタシチンの添加が CHIP による ER α の分解を妨げたことから、この分解はプロテアソーム経路を介しているものと考えられる。さらに、CHIP が ER α の分解を促進していることを、パルスチェイス法を用いて確認した。CHIP を発現しない場合、ER α の半減期は 12 時間であったが、CHIP を発現させると ER α のターンオーバーは早まり、半減期は 6 時間に近くなった。この効果の特異性を調べる

ために、CHIP から TPR ドメインもしくは U-box ドメインを欠損させた変異発現ベクターを作製した。CHIP は TPR ドメインを介して Hsp/Hsc70 と結合し、また E3 ユビキチンリガーゼ活性は U-box ドメインによって発揮される。これら欠損タンパク質は野生型 CHIP と同様に発現したが、それぞれのドメインが欠損していることによって ER α に対する分解促進効果を失っていた。最後に、CHIP がユビキチン化を介して ER α のターンオーバーを促進しているのかどうかを検討した。ER α が CHIP と共発現した場合、ユビキチン化された ER α によるスメアなバンドが検出できた。以上の結果は、リガンドと結合していない ER α がユビキチンリガーゼ CHIP を有する複合体によってユビキチン化され分解されていることを裏付けるものである。

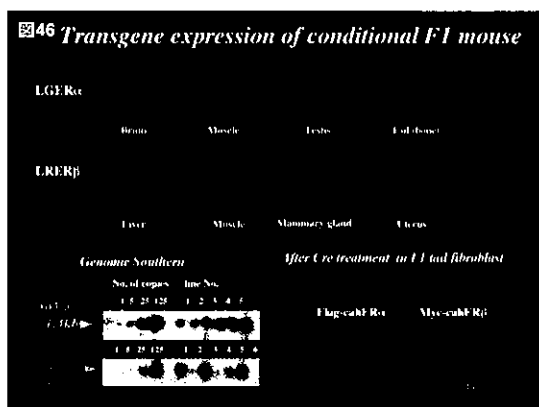
次に、ER α の転写活性化能における CHIP の影響を検討するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。293 細胞に ER α を単独あるいは CHIP と共発現させ、48 時間後に細胞培地にはエストロゲンを添加し、さらに 12 時間培養した後に細胞を回収しルシフェラーゼアッセイおよびウエスタンブロットティングを行った。すると、CHIP の発現によって ER α のタンパク質量は減少していた。一方で、ER α による転写活性は CHIP の発現によってわずかながら促進していた。そのため、単位 ER α タンパク質量あたりで考慮した場合には、CHIP を発現させることによって、ER α の転写活性はほぼ二倍上昇していた。これらの結果およびこれまでに報告されている論文(Hohfeld et al., 2001; Meacham et al., 2001; Murata et al., 2001; Goldberg, 2003)から、CHIP はミスフォールドした ER α タンパク質を細胞内から除去するために、優先的にユビキチン化する可能性が考えられた。CHIP は、転写活性をもたないアンフォールドあるいはミスフォールドした ER α を選択的

に減少させることによって ER α タンパク質あたりの転写活性を上昇させることが推測されこの仮説を検討するため、ER α の 364 番目のバリンをグルタミン酸(V364E)に、447 番目のシステインをアラニン(C447A)にそれぞれアミノ酸置換を行い、ミスフォールディングを誘導した変異型 ER α を発現させた。37°C においては転写活性をもたない温度感受性 ER α (V364E)および ER α (C447A)は、リガンド非存在下において許容範囲外の温度(37°C)条件下で、野生型 ER α に比べてより速やかに分解した。細胞を 42°C 30 分間という熱ストレス条件下で培養した場合、野生型 ER α も温度感受性変異体と同程度の分解を示した。これらの変異タンパク質を用いて転写活性測定を行ったところ、変異型 ER α はいずれも野生型 ER α に比べて転写活性が減少あるいは完全に失われていた。さらに、これらの変異タンパク質は野生型 ER α と共発現させた場合において、野生型の転写活性を阻害した。ER α (V364E)および ER α (C447A)によって阻害された野生型 ER α の転写活性は、CHIP の発現量依存的に上昇することが明らかとなった。これらの結果は、CHIP が ER α (V364E)および ER α (C447A)を野生型より優先的にユビキチン化していることを示唆している。さらに、CHIP 依存的な ER α の分解の生体内における重要性を検討するため、CHIP 欠損マウス(CHIP $^{-/-}$)、CHIP ヘテロマウス(CHIP $^{+/-}$)およびこれらの同腹子である CHIP 野生型マウス(CHIP $^{+/+}$)からマウス胎児繊維芽細胞(MEF)を単離し、ER α を検出した。これらの MEF 細胞において、抗 ER α モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングでは ER α タンパク質量に変化はみられなかった。そこで、MEF 細胞を熱ストレス条件下で培養し、ミスフォールド誘導したのち、ウエスタンブロットティングを行って ER α を検出した。熱ストレス条件下かつエ

ストロゲン非存在下においては、CHIP+/+ および CHIP+/- から得られた MEF 細胞における ER α 量は、CHIP-/- の ER α 量と比較して減少していた。MG132 の添加によって、CHIP+/+ および CHIP+/- における ER α 量は CHIP-/- の ER α 量と同等になった。このことから、熱ストレス条件下において CHIP+/+ および CHIP+/- 細胞内ではプロテアソーム経路を介して ER α が分解されていることが明らかになった。この結果は、CHIP が細胞内における ER α タンパク質の品質を維持するため、ミスフォールドした ER α と優先的に結合し分解に導くというメカニズムをさらに支持するものである。

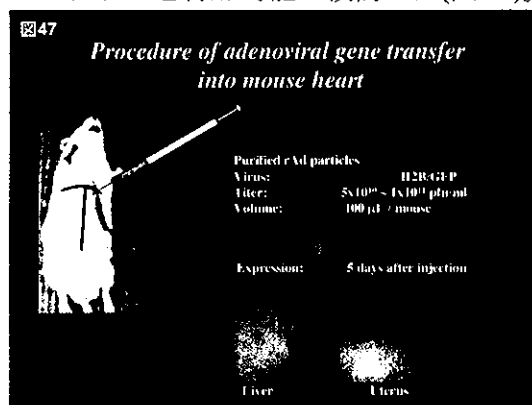
(18) 老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用

第 1 テーマは、caER α および caER β の cTg マウスの作製にそれぞれ成功し、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(GFP または DsRed)を発現していることが確かめられ、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(図 46)。また、Cre

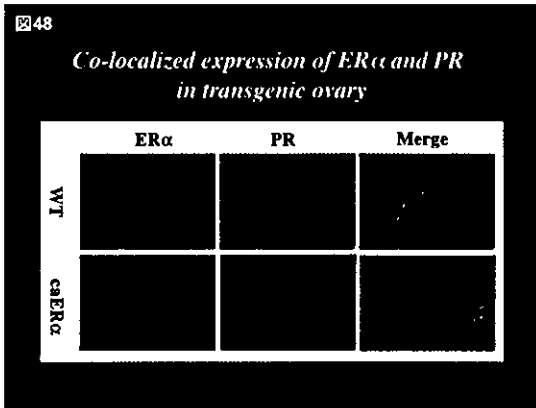


を発現可能な組換えアデノウイルスを cTg 由来の F1 マウス尾部の初代繊維芽細胞に感染させ、*in vitro* において外来性 caER α および caER β 遺伝子が発現していることを確認した。さらに *in vivo* において、高濃度に精製した Cre を発現する組換えアデノウイルスを心臓より直接接

種することにより、外来性のエストロゲンシグナルを付加可能か検討した(図 47)。

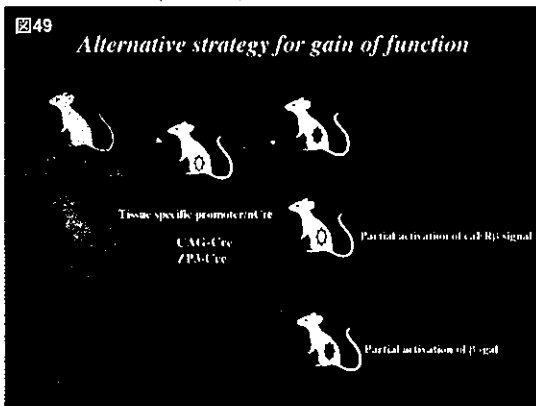


組換えウイルス導入 2 週間後にエストロゲンシグナルの標的臓器である卵巣を摘出し、トランスジェニックマウス由来の卵巣において異所性の外来性 caER α のシグナルを ISH 法により RNA レベルで確認すると共に、異所的な内在性の ER α および ER β シグナルの発現を確認した。Cre 処理卵巣は、部分的に外来性の caER α の発現が確認でき、これらの卵巣では黄体様の組織構造および発達した卵胞の減少が観察され、外来性の caER α の発現する部分において ER の下流応答遺伝子と知られている ER α 、ER β 、EBAG9、および efp が本来発現する部位で発現するのみでなく、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(図 48)。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



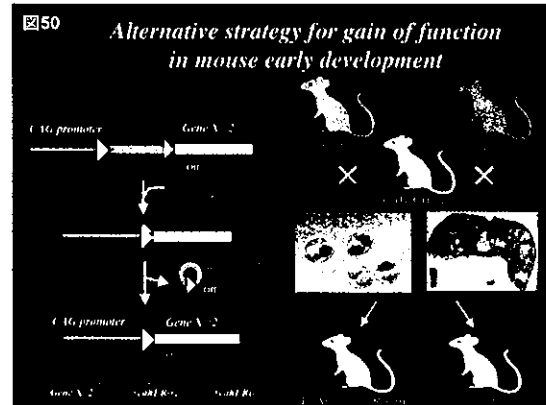
って効率的に発現させるためには、組換えアデノウイルスを利用する系には短所があることが示唆された。それ故、より特異性が高く安定的なデータを得るために、組織特異的なプロモーターに Cre を発現できる遺伝子改変マウスを作製し検討した。

第 2 テーマに関しては、本研究で作製した cTg マウスに Cre を発現するトランスジェニックマウスを交配することにより、組織・時期を任意に変化可能な系を確立した(図 49)。これらをさらに発展



させ発生初期および胎児期での異所性のエストロゲンシグナルの過剰発現における作用について検討するために、CAG-Cre トランスジェニックマウスを 2 ライン作製した。Cre の発現する時期と組織を検討するために、テスターマウスである ROSA26LacZ マウスを交配し、X-Gal 染色をすることにより、Cre の発現時期・分布を検討した結果、発現時期は 2 細胞期(受精後 24 時間)―胚盤胞期(受精後 96 時間)から発現を確認することができ、胎

生 19.5 日の胎児で体全体的にユビキタスに X-gal 染色が確認され、Cre 遺伝子が発生初期からユビキタス発現する Tg マウスを作製できた(図 50)。生体内でエス



トロゲンシグナル付加するために、CAG-Cre マウスを作製して、マウスの初期胚 2 細胞期から発生初期に Cre を発現させることにより、受精後の数日以内にエストロゲンシグナル(caER α および caER β)を初期発生から胎児で過剰に付加した場合、全体的に産仔数の低下、および異常なメンデル法則からかけはなれた率でしか産仔が得られないことが判明した。このエストロゲンシグナルを過剰に付加された産仔が、どの時期から過剰なエストロゲンシグナルの作用を受けるか詳細に検討する必要があるが、生後数日間までにメンデル法則で生まれてくるはずの産仔が減少し、少なくとも生後数日以内にほとんどのマウスが致死となることがわかった。

つづいて、エストロゲン合成の中心的な標的臓器である卵巣作用に焦点を絞り解析を検討した。実際に卵巣での内在性の ER の発現を抗体染色により時系列的に検討すると、出産後 0 日目の卵巣では ER の発現はほとんど確認できず、その後 6 日目の卵巣の卵胞組織周辺で ER β が ER α より強く発現していることがわかる(図 51)。それ故、より特異性が高く安定的なデータがとれる系を検討するために、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よ