

図7

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8)。

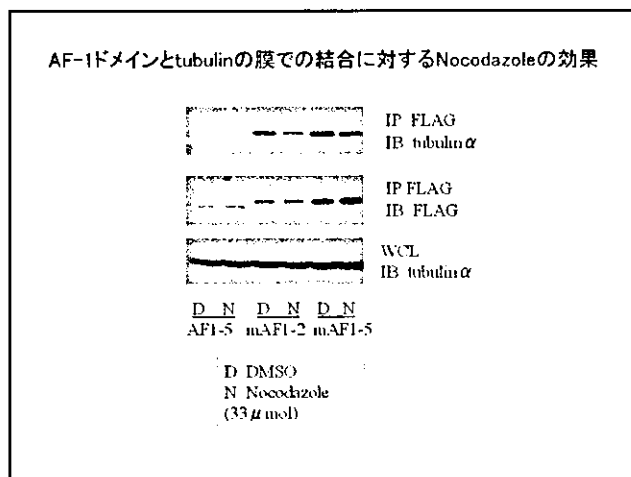


図8

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存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9)

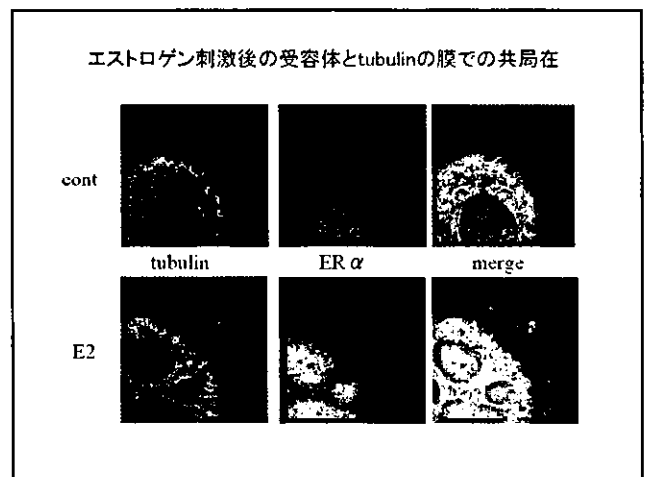


図9

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 nongenomic 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。

D. 考察

本研究は、2000 年以降、相次いで発表されたエストロゲン受容体と細胞内シグナル伝達系との直接のクロストークのモデルに基づき、その種々の臓器における生理作用を明らかにする目的で推進してきているが、現時点での一番大きな問題点は、発表されている nongenomic な反応と全く同じ細胞や培養条件、刺激方法を用いても、例えばエストロゲン刺激による MAP キナーゼの活性化などはごくごく僅かしか観察されず、論文のような顕著な変化が起きないということである。今に至るまでこの問題は解決せず、

このことがこの研究が初年度から手間取る大きな要因となった。同時に内在性のエストロゲン受容体をきれいに描出できる抗体がなく、ほとんどの実験が外からタグを付加して発現させた受容体の挙動を観察するものとなってしまったのも残念である。チロシン 537 のリン酸化に関してもリガンド刺激の有無によるリン酸化の程度の差が認められれば、まさにリガンドの下流の直接のシグナル伝達経路として興味深いのが、現在のところ恒常的チロシンリン酸化のようなので nongenomic なシグナルの調節部位としての役割は少ない可能性がある。

それでもこの方法によって同定されたチューブリンは、膜局在タイプの AF-1 にのみ結合するという特異性から、その機能に興味を持たれる。通常の微小管の機能におけるエストロゲン受容体の役割という面だけでなく、免疫細胞染色の結果から、細胞辺縁で細胞運動や細胞間接着などに関わるシグナル・分子輸送などに関与していることも考えられ、生理的意義を更に探っていく必要がある。またこれから AF-2 のチロシンリン酸化部位に結合する蛋白質など膜内複合体構成成分が微量なものに至るまで明らかになれば、自ずと受容体の膜における役割についても浮き彫りになるものと期待される。膜特異的な結合ではなかったものの、もう一つ同定された Hsp70 は通常、細胞内で分子シャペロンとして機能し、ATP を利用してタンパク質のフォールディング、輸送、集合や分解などに関与することからチューブリンとの結合に強調して働く可能性なども考えられこちらも更なる機能解析の必要性が残った。

一方、今回のアプローチの反省点として、ここ数年の質量分析技術の進歩によって、蛋白質複合体解析が今までより遙かに微量の蛋白質で行えるようになったが、それでもまだ細胞内シグナル伝達分子のように絶対量が少ない蛋白質群にと

っては、非常に多くの材料からスタートする必要があったということである。一般にシグナル伝達分子は往々にして蛋白質としての絶対量が少なく、プロテオミクスなどの網羅的解析に引っかかってこない分子も多い。ステロイドホルモンの複合体解析においても、核内作用に関わる複合体に比べて、核外作用に関与する複合体成分は極めて微量で、今回も精製源として数々の細胞群を試みたが、nongenomic作用が多くのグループにより示されている MCF-7 細胞の大量培養から相互作用する分子のうち発現の絶対量が多いものを 2 種類同定することができただけで、神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞などからこのような複合体成分の分析に進もうとすると、蛋白質精製のスケールアップが必要となり、多大な時間と労力を要することが明らかになった。今回我々が発見し発表した知見も併せて、これまでにエストロゲン受容体が核外でシグナル伝達分子の一つとして働く事を支持する情報を図 10 にまとめた。

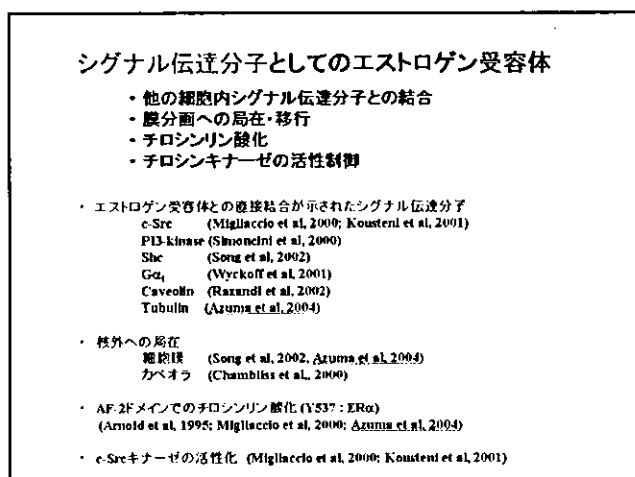


図 10

より包括的にエストロゲン受容体が伝える生理的なシグナルを理解する為には、さらに特異性及び感度の高い抗体を開発することに加えて、環流法を用いた初代培養細胞の立体培養などにより蛋白質サンプルを大量に調整する条件を検討することや、正常細胞に近い不死化細胞株を

利用することなど超大量培養のための技術・設備の開発と、更なる質量分析の高感度化が必須であろうと考える。

E. 結論

ステロイドホルモンの nongenomic な作用についての情報はここ数年の間で驚くほど蓄積されてきているが、それでも分子メカニズムの詳細については他のシグナル伝達分子に比べ、極めて遅れを取っている状態である。また情報のみが先行して、個々の報告の一貫性や再現性に問題が残るケースも残念ながら多い。その大きな要因の一つが、受容体などの分子がほとんど核に移行するため、極めて鋭敏かつ信頼性の高い検出法を用いないと、ノイズのように僅かな細胞質・細胞膜に移行した分子の働きを検出して、解析することが出来ない点にあることを今回の研究で実感した。ステロイドの多彩な生理機能について深く理解するためには、立ち遅れてきたこの分野の研究が今すぐに求められているといえるが、むしろ立ち遅れているからこそ、しっかりしたデータと分子機構に基づいた情報を発信していく必要がある。エストロゲン受容体とチューブリンなどの細胞骨格や膜蛋白質との結合は、細胞の接着、運動性など今までスポットを浴びてこなかった分野におけるエストロゲンの役割を照らし出す可能性もあり、老化という生命現象とエストロゲンとのつながりを考える上で新しい切り口を与える可能性がある。またエストロゲンの多種の臓器におけるそれぞれの作用の調節機構をシグナル伝達の立場から正確に理解することにより、エストロゲン補充療法における造腫瘍効果などの副作用を切り離れた、有効な治療法の開発などにもつながるものと考えられる。具体的には特定のシグナル伝達分子間の結合を阻害する分子の設計により、単一のシグナル経路のみのブロックする可能性も生まれ、エストロゲンのアンタ

ゴニストや受容体の機能阻害などよりも細かい調節薬を設計できる可能性もある。特に痴呆、動脈硬化、骨粗鬆症などの症状に対してどのような機序でエストロゲンが予防的に働き得るかを新しい方向から解明を目指すことにより、これらの老化に伴う病態を完全に理解し、新しい治療法の開発の可能性を生むものと考える。

F. 発表

論文発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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* 25, 1826-1835, 2005
5. 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
6. 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

【国際学会】

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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. 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)
2. 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 α の機能解析

(2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会
(名古屋)

3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)

厚生労働科学研究費（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書（総合）

脳、血管、骨の老化における
ステロイド作用調節薬の作用機構の解明と臨床応用

分担研究者 池田 和博
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門助手

【研究要旨】

ステロイドホルモンであるエストロゲンは骨粗鬆症、動脈硬化、心疾患、痴呆などの老化に伴う疾患に密接に関与している。エストロゲンの作用はリガンド依存性の転写因子であるエストロゲン受容体（ER）を介して標的遺伝子の発現量が制御されることによりその作用を発揮する。従って、エストロゲンシグナルの作用機構の解明は老年病の治療や予防などに重要な知見をもたらすと考えられる。本研究において、ER α の118番目のセリン残基（S118）の脱リン酸化に関与するPP5（protein phosphatase 5）を同定した。PP5によるER α の脱リン酸化によって転写活性は抑制され、エストロゲン標的遺伝子の発現も抑制されることが明らかになった。一方、エストロゲン応答遺伝子COX7RPはミトコンドリアに局在した。さらに、COX7RPはエストロゲン依存性の細胞増殖を媒介し、腫瘍細胞の造腫瘍性を亢進することが明らかとなった。本研究で明らかにされたERの脱リン酸化による活性制御機構、ならびにエストロゲンシグナルとミトコンドリア機能におけるCOX7RPの役割は、老化に深く関与しているエストロゲンシグナルを解明する上で有用であり、老年病における新たな分子標的としての可能性を示唆することができたと考えられた。

A. 研究目的

ステロイドホルモンであるエストロゲンは、女性のライフサイクルにおいて重要な役割を担っているが、老化に伴う卵巣機能の低下（閉経）によりその産生量は低下する。このエストロゲンの減少は、更年期障害、骨粗鬆症、動脈硬化、心疾患、痴呆などの老化に伴う疾患の発症と相関することが知られている。骨粗鬆症や更年期障害の治療薬としてエストロゲン剤を用いたホルモン補充療法が行われているが、子宮内膜癌の危険率を上昇させるなどの重篤な副作用が問題となっている。従って、エストロゲンの生理学的

および病態生理学的作用機能の解明とそれに基づく作動薬の開発が望まれている。エストロゲンは核に存在するリガンド依存性の転写因子であるエストロゲン受容体（ER α 、ER β ）に結合して活性化し、その標的遺伝子の発現量を直接制御することによりその機能を発揮する。ERの転写活性化にはリン酸化制御が重要な働きを担っており、ER α の118番目のセリン残基はその主要なリン酸化部位である。このリン酸化は細胞増殖因子とリガンドによるER転写制御のクロストークの場としても重要な機能を担っている。この

ような ER の転写調節機構を明らかにし、さらにエストロゲンの作用を直接媒介する標的遺伝子の発現制御と機能を明らかにすることで、エストロゲンシグナルの包括的な理解が可能になると考えられる。本研究では、エストロゲンの老化に伴う疾患における作用メカニズムを明らかにし、エストロゲンの分子標的を用いた老年病の新たな治療や予防の可能性について検討することを目的とする。

B. 研究方法

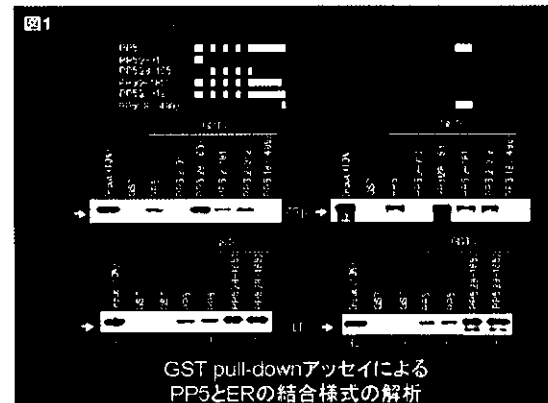
ER と相互作用し転写活性を調節する新たな因子を同定するため、C 末端を欠く ER β を用いて、酵母 two-hybrid スクリーニング法を行った。得られたクローンは PP5 (protein phosphatase 5)であったが、PP5 と ER α および ER β との結合様式を解析するため GST pull-down アッセイと哺乳類 two-hybrid アッセイ、培養細胞を用いた免疫沈降法によって解析した。PP5 の基質としての ER α の検討は ER α の 118 番目のセリン残基 (S118) のリン酸化に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。また、PP5 の ER の転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。さらに、エストロゲン応答遺伝子のエストロゲン誘導性の発現における PP5 の影響を MCF-7 細胞にアデノウイルスベクターによって PP5 を過剰発現し、エストロゲンを添加後、ノーザンブロットにて pS2、c-Myc、CycD1 遺伝子の発現量を定量した。

エストロゲン応答遺伝子 COX7RP のエストロゲンならびにタモキシフェンによる発現制御をヒト子宮内膜癌 Ishikawa 細胞ならびにヒト乳癌 MCF7 細胞を用いて解析した。COX7RP 遺伝子の第一イントロンに存在する ERE を含むプロモーター領域およびこの ERE に変異を導入したコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、ER α と ER β による

転写調節を解析した。Ishikawa 細胞のエストロゲン依存性の増殖における COX7RP の機能を解析するため、COX7RP の発現量を減少させる系を構築し、MTT アッセイにより細胞増殖を解析した。また、COX7RP タンパクの細胞内局在を免疫染色法を用いて検討した。さらに、COX7RP の機能を解析するため Ishikawa 細胞を用いて COX7RP の安定発現株を取得した。これらの安定発現細胞株を用いて、COX 活性、細胞増殖速度、軟寒天培地中における足場非依存性の増殖について解析した。

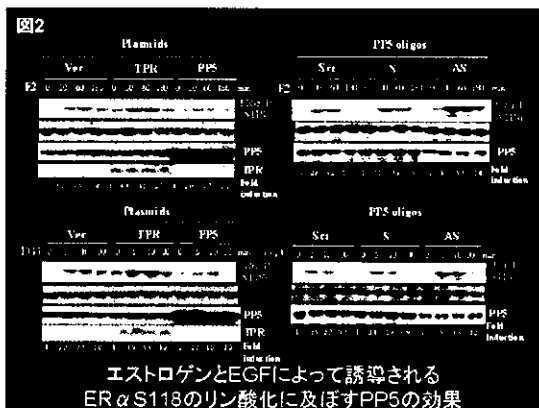
C. 研究結果

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 ER β 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 1)。

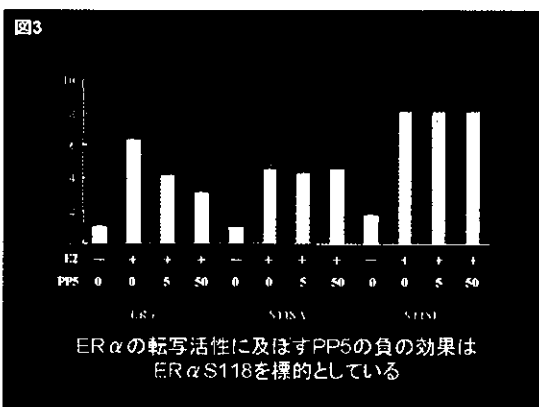


また、免疫沈降法を用いて内在性の PP5 と ER が MCF-7 細胞内で結合することを証明した。MCF-7 細胞においては、エストロゲン処理後 30-60 分をピークとして、また EGF 処理によっては 5-10 分後をピークとして ER α S118 のリン酸化が観察されたが、PP5 を過剰発現するとエストロゲンならびに EGF 刺激による ER α

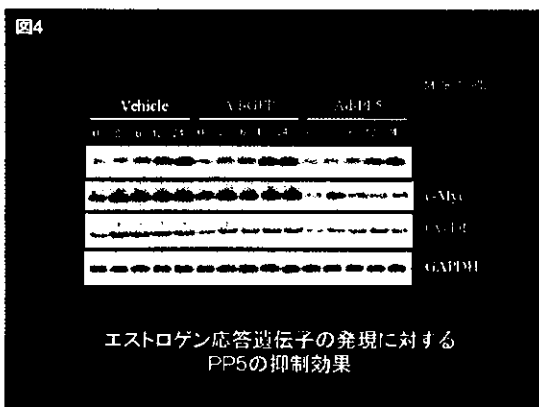
S118 のリン酸化が抑制され、PP5 のアンチセンス DNA を用いて発現量を低下させると逆に ER α S118 のリン酸化は亢進することが確認された(図 2)。



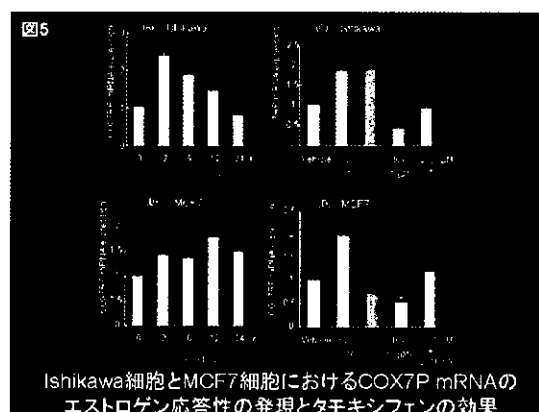
また、PP5 による脱リン酸化は ER の転写活性を抑制することが明らかとなり、この時、PP5 は ER α S118 を標的としていることが示された(図 3)。さらに、PP5



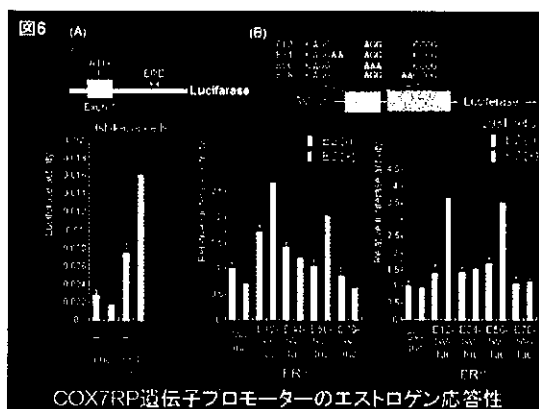
はエストロゲン応答遺伝子である pS2、c-Myc、CycD1 のエストロゲン応答性の発現を減少させることが明らかになった(図 4)。



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 5)。



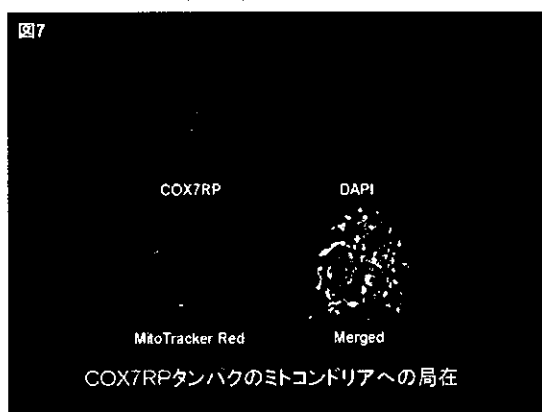
次に、転写レベルでの COX7RP 遺伝子の発現調節を解析するため、COX7RP 遺伝子の ERE を含むプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。COX7RP 遺伝子プロモーターは ER α および ER β によって制御されることが明らかとなった(図 6)。



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 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 7)。



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 は細胞増殖測道を亢進させ、また、足場非依存性の増殖を亢進することが示された。

D. 考察

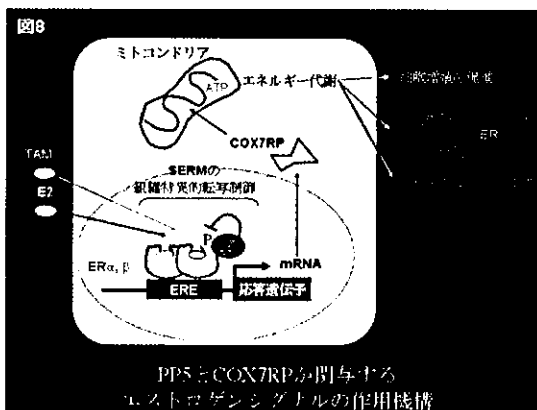
ER の転写活性の制御にリン酸化が重要な働きを担っており、中でも ER α S118 のリン酸化は細胞増殖因子によって活性化される MAPK を介して誘導されることが知られており、特にホルモン非依存性の ER の活性化 (ER の AF-1 の活性化) に重要な機能を有していると考えられている。また、ER α S118 のリン酸化はエストロゲン刺激によって CDK7 を介しても起こり、細胞増殖因子とエストロゲンシグナルのクロストークの場としても重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら ER α S118 の脱リン酸化の機構についてはほとんど知られていなかった。本研究により、ER α S118 の脱リン酸化酵素として PP5 を同定し、PP5 は

ER の転写活性を負に制御していることが示された。抗エストロゲン剤として開発されたタモキシフェンは、乳腺に対してはアンタゴニストとして働き、乳癌の治療に使用されているが、一方でタモキシフェンは子宮内膜に対してはアゴニスト作用を有し、子宮内膜癌の危険率を上昇させることが知られている。タモキシフェンのこのような組織特異的な作用は ER の AF-2 の活性を阻害するが、AF-1 の活性は阻害しないことに依ることが示唆されている。タモキシフェンによって ER α S118 のリン酸化が誘導されることが観察されており、抗エストロゲン剤の組織特異的な作用を PP5 が制御している可能性が考えられた。

エストロゲン応答遺伝子である COX7RP の発現は Ishikawa 細胞においてはタモキシフェンによって誘導されたが、MCF7 細胞においては誘導されなかった。COX7RP の細胞特異的なタモキシフェン応答性は、このようなタモキシフェンの組織特異的な作用を説明する機序の一つと考えられた。また、COX7RP タンパクはミトコンドリアに局在し、細胞増殖や造腫瘍能の亢進に寄与することが示唆された。このようなエストロゲンシグナルならびにミトコンドリア機能は老化と密接に関与していると考えられており、これら 2 つの経路に関わる COX7RP の機能解明は、老年病における新たな予防、治療法に繋がると考えられた。エストロゲンは痴呆、動脈硬化、骨粗鬆症などの老化に伴う病態と深く関わっていることが知られており、その作用を媒介する ER の PP5 による脱リン酸化制御機構ならびにエストロゲン応答遺伝子である COX7RP の機能の解明は老年病における新たな予防、治療法に繋がる可能性が示唆された(図 8)。

E. 結論

ER に相互作用する因子として脱リン



酸化酵素である PP5 を同定した。PP5 は細胞増殖因子とエストロゲンによって誘導されるリン酸化 ER α S118 の脱リン酸化に関与し、転写活性を負に制御することを示すことができたことから、これまで明らかではなかった ER の脱リン酸化制御の一端を解明することができた。

エストロゲン応答遺伝子である COX7RP の発現調節には ER ならびに ER α が関与しており、SERM の組織特異的作用の発現機構に関与していることが示唆された。また、COX7RP はミトコンドリアに局在し、細胞増殖と造腫瘍能の亢進に関与することが示唆された。このように、新たな負の ER 転写活性制御を解明し、またエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の制御ならびに機能を明らかにできたことは、老化に伴う病態におけるエストロゲンの作用機構を明らかにする上で有用であり、臨床応用を目指した新たな分子標的としての可能性を示唆すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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)
- Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Kikuchi A, Kayama F: Estrogen and phytoestrogen

regulate the mRNA expression of adrenomedullin and adrenomedullin receptor components in the rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 223, 27-34 (2004)

- Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation. *Zinc Finger Proteins: from Atomic Contact to Cellular Function* (Edited by Iuchi S, Kuldell N), Landes Bioscience, Georgetown, TX, 2004.
- Arao Y, Kikuchi A, Kishida M, Yonekura M, Inoue A, Yasuda S, Wada S, Ikeda K, Kayama F: Stability of A+U-rich element binding factor 1 (AUF1)-binding messenger ribonucleic acid correlates with the subcellular re-localization of AUF1 in the rat uterus upon estrogen treatment. *Mol Endocrinol* 18, 2255-2267 (2004)
- Horiguchi H, Oguma E, Nomoto S, Arao Y, Ikeda K, Kayama F: Acute exposure to cobalt induces transient methemoglobinuria in rats. *Toxicol Lett* 151, 459-466 (2004)
- Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S: Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 101-104 (2003)
- Kayama F, Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H: Mechanisms of action and physiological functions of naturally occurring and man-made xenoestrogens. *J UOEH* 25, 161-167 (2003)

2. 学会発表

【国際学会】

- 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

(2002.2.28-3.4)

【国内学会】

1. 池田和博, 井上聡: エストロゲンシグナルの負の調節因子. (2003.3.14-15) 第2回 ステロイドホルモンを考える会.(東京)
2. 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 α および ER β の生体内 Gain of functionによる生殖機能の解析. (2003.12.10-13) 第26会日本分子生物学会 (神戸)
3. 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会日本分子生物学会 (神戸)
4. 池田和博, 菱沼俊樹, 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の網羅的探索. (2003.12.10-13) 第26会日本分子生物学会 (神戸)
5. 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会日本分子生物学会 (神戸)
6. 野本聡, 池田和博, 趙建宏, 香山不二雄: ラットの子宮において DRE1 という仮想的なアクチン結合タンパク質の mRNA のエストロゲンを介した不安定性. (2003.12.10-13) 第26会日本分子生物学会 (神戸)
7. 池田和博: 脱リン酸化によるエストロゲン受容体転写活性の負の制御. (2004.1.15-17) 第3回転写研究会 (つくば)
8. 池田和博, 井上聡: ER 結合部位により同定されたエストロゲン応答遺伝子の機能解析 (2004.2.20-21) 「ステロイドホルモンを考える会」第3回研究発表会 (東京)
9. 池田和博, 津久井通, 井上聡: 脱リン酸化酵素 Protein phosphatase 5によるエストロゲン応答シグナルの負の制御機構 (2004.3.17-19) 研究会 環境と遺伝子 (岡崎)
10. 保母るつ子, 池田和博, 竹田省, 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 (2004.4.10-13) 第56回日本産科婦人科学会 (東京)
11. Hishinuma T, Ikeda K, Inoue S: Gene structure and interferon inducible expression of human ifp1. (2004.10.13-16) 第77回日本生化学会 (横浜)
12. 池田和博, 保母るつ子, 竹田省, 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 (神戸)
13. 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 (神戸)
14. Ikeda K, Inoue S: The Estrogen-Responsive Gene COX7RP Is a Direct Target of Estrogen-Related Receptor α and Exhibits Tumor-Promoting Activity in Endometrial Cancer. (2005.1.11-13) 第4回転写研究会 (草津)

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書（総合）

エストロゲン受容体を介した細胞保護作用に対するレドックス制御分子の意義

分担研究者 近藤 宇史

長崎大学医歯薬総合大学院医学研究科附属原爆後障害医療研究施設
放射線障害研究部門分子情報制御研究分野教授

【研究要旨】

酸化ストレスに対して細胞は活性酸素種消去系の活性化を示すのみならず、レドックスを介して細胞の生死を制御する。レドックスは情報伝達キナーゼや転写因子の SH 基修飾を介して活性を制御するもので、ステロイドホルモン作用の分子標的を検討する上で重要である。本研究は、エストロゲン受容体シグナルの細胞保護作用におけるレドックスの意義を明らかにすることを目的とした。ラット心筋細胞株 (H9c2) に 100nM エストラジオール(E2)を 16 時間投与した後、0.1mM 過酸化水素で 4 時間処理をして生存細胞を測定すると、コントロールに比べて E2 投与で細胞死が著明に減少した。過酸化水素で処理すると、抗アポトーシス因子の Akt のリン酸化が E2 非投与細胞で 1.8 倍であったのに、E2 投与細胞では約 4 倍と増加していた。E2 はグルタチオン合成の g-glutamylcysteine synthetase とレドックス因子 glutaredoxin の遺伝子の発現増加作用が認められた。これらが共同して Akt を還元型に保つことで、抗アポトーシス作用が増加したと考えられた。

A. 研究目的

心疾患の頻度が女性で低く、閉経後に高くなることはよく知られている。これは、ステロイドホルモンの中で特にエストロゲンが心筋細胞の活性酸素による障害を防御することが一因であると考えられてきた。最近エストロゲンが抗酸化酵素 (Persky et al.) やカリウムチャンネル (Ranki et al.) の遺伝子発現を上昇させることが報告されているが、その詳細な機構はまだ明らかではない点が多い。生体内でグルタチオン(GSH)などの抗酸化分子とその関連酵素は活性酸素を消去することによって細胞保護作用を示すのみならず、レドックス（酸化・還元）の調節を介して細胞内シグナルや転写因子の活性を調節することによって細胞機能を

制御する。そこで、本研究は、エストロゲン受容体シグナルの制御におけるレドックスの意義を明らかにすることを目的とした。具体的には、レドックスは酵素タンパクの活性中心に存在する Cys 残基が酸化修飾されるのを還元するもので、この機構を明らかにすることは、ステロイドホルモン作用の分子標的を検討する上で極めて重要な課題である。具体的には、E2 によって活性化される抗アポトーシスシグナルの機序を詳細に検討することを目的とした。

B. 研究方法

培養細胞

ラット心筋芽細胞、H9c2,を Dulbecco s modified Eagle s medium に 10% fetal calf

serum を加え 95% air と 5% CO₂ 下 37°C で培養した。H9c2 細胞に glutaredoxin(GRX) 遺伝子を発現ベクターに結合させて導入した GRX 高発現株 (H9c2-GRX) も確立した。

E2 の細胞保護作用

細胞機能に及ぼす影響を、過酸化水素による細胞障害を MTT アッセイ、DNA 障害を Tunnel 法で測定した。

Akt 活性の測定

Akt 活性は、Akt assay kit(Cell Signaling Technology)を用いて G S K 3a/b を基質として測定した。

タンパク質のレドックス状態の測定

タンパク質の Cys 残基の修飾によるレドックス状態の変化を、遊離 SH 基を AMS で修飾する Kobayashi らの方法に準拠して測定した。細胞を H₂O₂ などの酸化ストレス下で処理後、7.5% TCA でタンパクを変性させ、12,000 x g、10 分遠沈後、アセトンで 2 度洗浄、1 % SDS と 15 mM AMS を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 に溶解後、10% SDS-PAGE で泳動し、特異抗体を用いた immunoblot で解析を行い、移動度の相違を検討した。

protein phosphatase 活性の測定

PP2A 酵素活性は、Ser/Thr protein phosphatase assay kit 1(Upstate Biotechnology)を用いて測定した。基質として phosphopeptide RKpTIRR と p-nitrophenylphosphate を用いた。

Thiol transferase 活性の測定

Thiol transferase 活性は Gan and Wells の手法に準拠して測定した。反応液 (137 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM GSH, 1.2 units GSSG 還元酵素、2.5 mM Cys-SO₃, 0.35 mM NADPH, 1.5 mM EDTA) と試料とを 30°C で反応させ 340 nm の吸光度の変化を分光光度法で測定した。

Immunoblot 解析

Immunoblot 解析は、試料中のタンパク濃度を BCA assay kit (Pierce) で測定後、10%-15% SDS-PAGE で泳動し、

nitrocellulose 膜に転写後 Tween20 を含んだ液で反応を停止、一次抗体で 4 °C overnight 反応させた後、horseradish peroxidase-conjugated 抗 IgG 抗体を 2 次抗体として反応させた。膜上のタンパクは enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Bioscience) で発色させた。

Akt のタンパク量は抗 Akt 抗体、Akt のリン酸化はリン酸化 Ser473 とリン酸化 Thr309 に対するそれぞれの抗体(Cell Signaling Technology)を用いて測定した。

Northern blot 解析

764bp の human g-glutamylcysteine synthetase heavy subunit (g-GCS-HS) プローブは既報に基づいて作製した (Int. J Cancer, 1999)。GRX の発現は RT-PCR 法で測定した。プローブを Random Primer DNA labeling kit (Takara) を用いて ³²P で放射標識し、total RNA の分離精製と Northern blot は Sambrook の方法に準拠して行なった。即ち、分離した total RNA (10 μg) を 0.6 M formaldehyde を含む 1 % agarose gel にて泳動し、nylon membrane に移した後に ³²P-標識プローブで hybridize し、放射活性を BAS5000 で測定した。

GSH 濃度の測定

細胞内 GSH 濃度の測定は、Beutler による recycling 法に準拠した Total Glutathione Quantification kit (DOJINDO Molecular Technology) で測定した。

γ-GCS の発現

γ-GCS のタンパク量は、ヒト γ-GCS-HS に対する家兎特異抗体を用いて Immunoblot 法で測定した。遺伝子発現は Northern blot 法で測定した。γ-GCS 遺伝子プロモーターの導入と解析は、γ-GCS-HS 遺伝子の 3.1 kbp の E2 が結合する配列領域を持つプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに組み込んだ。

site-directed mutagenesis の作製

Akt cDNA の Cys-297 と Cys-311 の Ser

残基への変換は、QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて行なった。

C. 研究結果

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 1)、Hoechst 染色法(図 2)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 1

Fig. 1

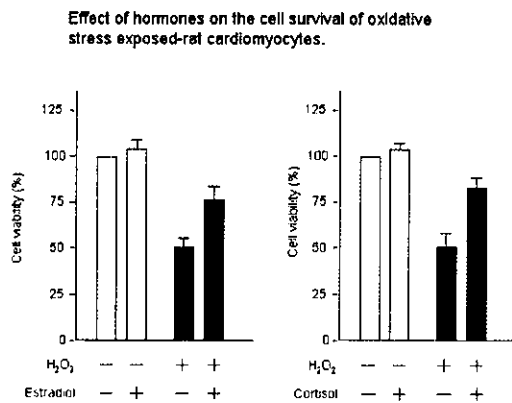
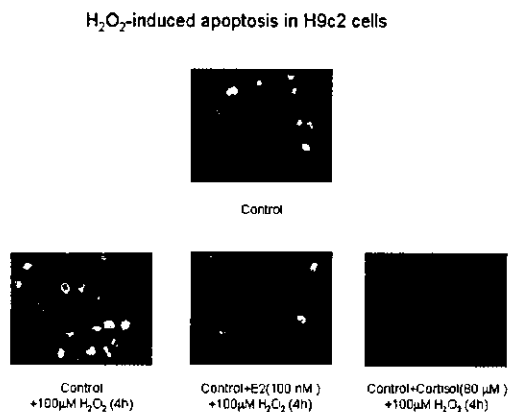


図 2

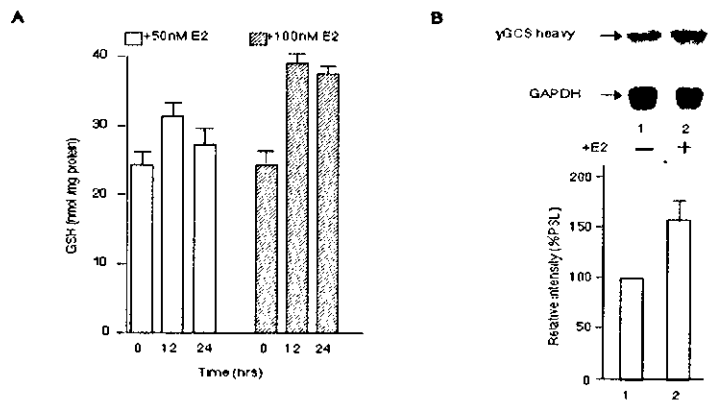
Fig 2



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 3)。

図 3

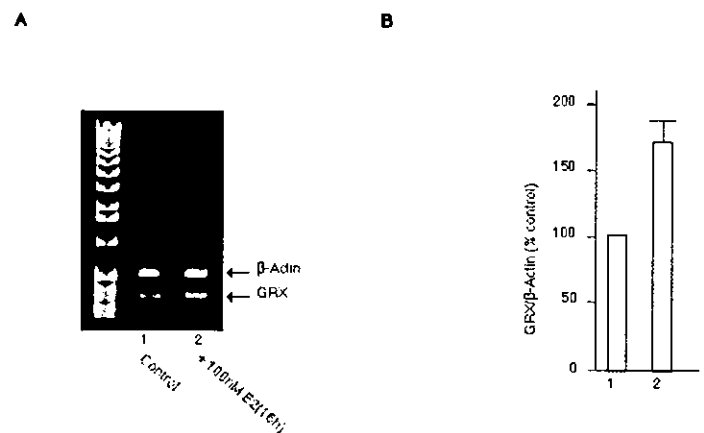
Estradiol stimulated the expression of γ -GCS.



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 4)。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。

図 4

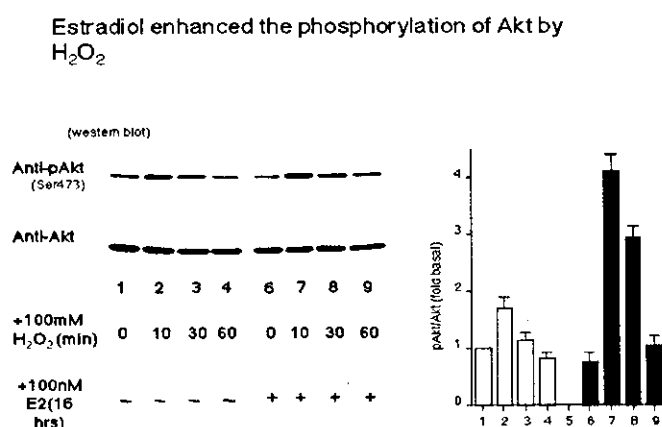
Estradiol induced the expression of GRX.



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(10⁶ cells)に 100 nM E2 を加え

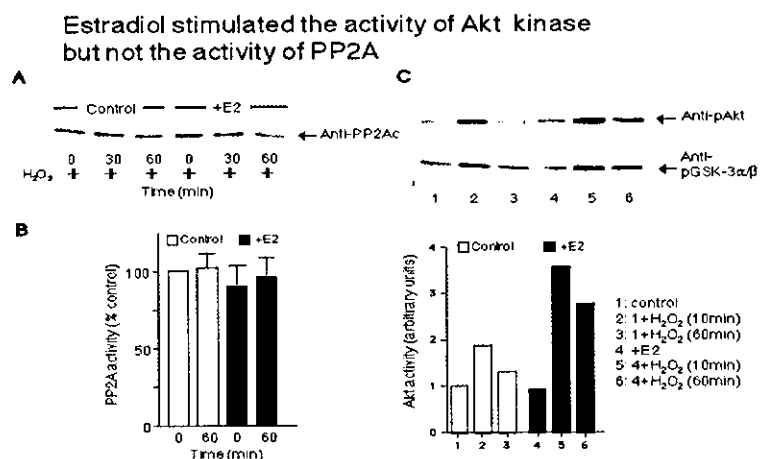
て 16 時間培養し、その後に 0.1mM H₂O₂ を加え、0-1 時間で以下の実験を行なった。Akt リン酸化は、H₂O₂ 処理後 10 分で上昇した。その程度は E2 処理細胞では約 410%であり、E2 未処理細胞での約 180%の上昇に比較して高かった(図 5)。E2 前投与では、酸化ストレスに反応した Akt 活性が上昇していた結果から、E2 の抗アポトーシス作用の機序の重要な一要因であることが推測された。

図 5



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 6)。

図 6



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 H₂O₂ 処理後も還元型が維持されていた(図 7)。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。g-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 7 次頁)。

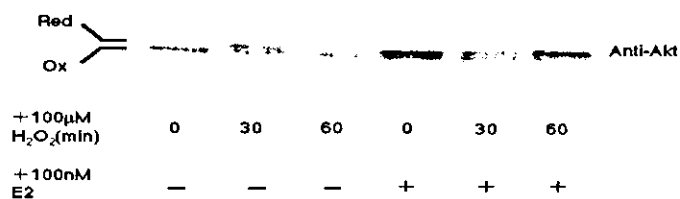
D. 考察

多くの生活習慣病による疾病発症の基盤に心血管の病的老化が存在する。この心血管系組織細胞の機能低下には酸化ストレス障害が関与すると考えられている。すなわち心血管細胞が酸化ストレスを感受して防御する機能の低下が老化を進展させるという考え方である。しかし、その詳細な機序は未解明であった。

E2 が酸化ストレスに対する細胞保護作用を示すことは、既によく知られている。この細胞保護作用に、PI3-Kinase/Akt signal pathway が関与することがわれわれの研究で明らかになった。最近同様の報告がなされている。(Yu X et al. J Biol Chem, 2004, Koga M. et al. Biochem Biophys Res Commun., 2004)。しかしながら、この Akt を介した抗アポトーシスシグナル制御の詳細は未解明であった。今回、E2 前投与によって抗酸化物質の中心をなす g-GCS とともに thioredoxin family の GRX の発現が酸化ストレスに反応して上昇することを始めて明らかにした。

シグナルの強弱はレドックスで調節されている。申請者はこれまでに、酸化ストレスによる細胞障害を防御する上で、GSH が重要であることを検討してきた。GSH は抗酸化物

図7
Redox regulation of Akt by estradiol.



The redox states of Akt was assessed by modifying free thiol with 4-2-cetarrido-4'-maleimidothiobene-2,2'-disulfonic acid (AMS) (Kobayashi, 1997PNAS)

質として重要であるばかりでなく、酸化型グルタチオン(GSSG)を低く押さえ、GSH/GSSG を高く維持し、さらに酸化ストレスに応答するシグナル伝達分子のリン酸化活性を直接制御する GRX の基質としても重要である。これらシグナルスイッチの ON/OFF を制御する因子が E2 によって発現上昇することは、E2 の細胞保護作用の中心となると考えられる。今後更に、GSH と GRX の細胞保護における調節機構を明らかにする必要がある。

レドックスは、一般的にタンパク質の合成や成熟、酵素、受容体、転写因子などの構造や機能の制御に重要である。近年、シグナル伝達分子において、個々の因子のリン酸化部位の近傍に存在する特定の Cys 残基が還元型であることが活性の発現に重要であるとの報告が見られるようになってきている。しかしながら、その詳細な調節機構はまだ解明されていない。GRX は GSH を基質とし、NADPH を補酵素とする酵素タンパクである。活性中心は Cys-Pro-Tyr-Cys である。GRX は、酸化ストレスでジスルフィド結合をしたり、GSSG で glutionyl 化されたタンパク質の Cys 残基を還元する。これらを踏まえて、Akt の Cys 残基の酸化還元状態を測定したところ、E2 は Akt の Cys を還元状態に保つことを明らかにした。このことは、E2 によって GRX が活性型に維持されることを示している。最近、

細胞内シグナル分子 Ras やカルシウム輸送の担い手 SERCA が酸化ストレスで glutionyl 化されることが、細胞機能に大きな意味をもつことが報告されてきている。今回の研究成果も、老化とその防御に対する今後の研究発展に寄与することと思われる。

E. 結論

- 1) E2 が示す細胞保護作用に、抗アポトーシス作用を示す Akt 活性の上昇や、抗酸化分子 γ -GCS の発現調節が関与することが始めて明らかにした。
- 2) E2 が細胞の機能を調節する因子であるレドックス関連因子 GRX の発現上昇と活性化に働くことを明らかにした。
- 3) Akt のレドックス制御を解した E2 の細胞防御作用を示す機序を明らかにした。これらの結果はステロイドホルモンシグナルの抗老化作用の機序解明に寄与するものである。ホルモン作用を制御する新しい標的分子の検索に貢献すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ihara Y, Manabe S, Kanda M, Kawano H, Nakayama T, Sekine I, Kondo T, Ito Y: Increased expression of protein C-mannosylation in the aortic vessels of diabetic rats. *Glycobiology*, in press
2. Soh Y, Goto S, Kitajima M, Moriyama S, Kotera K, Nakayama T, Nakajima H, Kondo T, Ishimaru T: Nuclear Localization of Glutathione S-Transferase π is an Evaluation Factor for Drug Resistance in Gynecological Cancers. *Clinical Oncology*, in press
3. Yasuoka C, Ihara Y, Ikeda S, Miyahara Y,

- Kondo T, Kohno S: Antiapoptotic activity of Akt is down-regulated by Ca^{2+} in myocardial H9c2 cell. – Evidence of Ca^{2+} -dependent regulation of protein phosphatase 2Ac. *J Biol Chem* 279, 51182-51192, 2004
4. Kamada K, Goto S, Okunaga T, Ihara Y, Tsuji K, Kawai Y, Uchida K, Osawa T, Matsuo T, Nagata I, Kondo T: Nuclear glutathione prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced pS-transferase formation of exocyclic DNA adducts. *Free Radical Biol Med* 37, 1875-1884, 2004
 5. Tarumoto T, Nagai T, Ohmine K, Miyoshi T, Nakamura M, Kondo T, Mitsugi K, Muroi K, Komatsu N, Ozawa K: Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2- dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Experimental Hematology* 32, 375-381, 2004
 6. Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T: Glutaredoxin exerts anti-apoptotic effect by regulating redox state of Akt. *J Biol Chem* 278, 50226-50233, 2003
 7. Muroya T, Ihara Y, Ikeda S, Yasuoka C, Miyahara Y, Urata Y, Kondo T, Kohno S: Oxidative modulation of NF- κ beta Signaling by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 900-905, 2003
 8. Muta K, Masuzaki H, Urata Y, Goto S, Ishimaru T, Kondo T: Gene expression of nitric oxide synthase and heme oxygenase in placental villi during pregnancy with and without intrauterine growth restriction. *J Clin Biochem Nutr* 32, 11-21, 2004
 9. Mitsuta K, Matsuse H, Fukushima C, Kawano T, Tomari S, Obase Y, Goto S, Urata Y, Shimada T, Kondo T, Kohno S: Production of TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells through activation of nuclear factor κ B by specific allergen stimulation in patients with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc* 24, 19-26, 2003
 10. Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S: Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-like protein/Doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 278, 28944-28949, 2003
 11. Okuno S, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Tamba M, Sohda S, Hamada H, Yoshikawa H, Kondo T, Bannai S: Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *British J Cancer* 88, 951-956, 2003
 12. Shimizu K, Naito S, Urata Y, Takamiyagi A, Bae SJ, Ogawa F, Kondo T, Katayama I: The induction of eNOS by exogenous nitric oxide in ex vivo normal human skin. *J Dermatol* 30, 17-25, 2003
 13. Ohira A, Tanito M, Kaidzu S, Kondo T: Glutathione peroxidase induced in rat retinas to counteract photic injury. *Invest Ophthalm Vis Sci* 44, 1230-1236, 2003
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Kondo T: Protective role of glutaredoxin on oxidative stress-induced cell death in cardiac H9c2 cells. SFRBM's 10th Annual Meeting, Seattle, Canada (2003.9.20-24)
 2. Kondo T: Protective role of glutaredoxin on oxidative stress – induced cell death in cardiac H9c2 cells. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 3. Kondo T: Impairment of the activity of transcription factor by oxidized LDL in macrophages. The 13th International

- symposium on atherosclerosis society, Kyoto (2003.9.28-10.2)
4. Kondo T: Clinical evaluation of oxidative stress in cardiovascular disease. The 13th International symposium on atherosclerosis society, Kyoto (2003.9.28-10.2)
- 【国内学会】
1. 近藤宇史: [シンポジウム]核内核酸化機構と癌薬剤耐性 (2003.5.17-18) 第89回財団法人基礎腫瘍学研究会 (札幌)
 2. 近藤宇史: 放射線が誘導する細胞の分化増殖を制御する遺伝子群の検討 (2003.6.1) 第44回原子爆弾後障害研究会 (広島)
 3. 近藤宇史: [シンポジウム]グルタチオン関連酵素の細胞内局在とアポトーシスシグナルに及ぼす影響 (2003.7.22) 第5回21世紀COEプログラム(長崎)
 4. 近藤宇史: [特別講演] グルタチオン関連酵素の細胞内局在とアポトーシスシグナルに及ぼす影響の検討 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
 5. 近藤宇史: [特別講演]慢性酸化ストレスによる血管マクロファージ機能の変化 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
 6. 近藤宇史: [特別講演]ハンマーヘッドリボザイムによるグルタチオン合成遺伝子の制御と多剤耐性がんの克服 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
 7. 近藤宇史: [特別講演]小胞体分子シャペロンによる心筋細胞分化とアポトーシスの制御 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
 8. 近藤宇史: [特別講演] 心血管の老化でのステロイド作用におけるレドックス制御機構の役割の解明とその臨床応用 (2003.8.2) 第3回血管老化研究会 (大分市)
 9. 近藤宇史: [シンポジウム講演]Role of intranuclear translocation of glutathione S-transferase in the acquisition of cancer cells to drug-resistance (2003.8.20-22) 国際レドックスシンポジウム (札幌)
 10. 近藤宇史: 婦人科癌における GST π の核内局在の関連 (2003.9.25) 第62回日本癌学会 (名古屋)
 11. 近藤宇史: 長時間の酸化 LDL の暴露によるマクロファージの機能低下 (2003.9.27-28) 第35回日本動脈硬化学会総会 (京都)
 12. 近藤宇史: ヒト動脈硬化病変における酸化ストレスマーカーの測定と評価 ヒト動脈硬化病変における酸化ストレスマーカーの測定と評価 (2003.9.27-28) 第35回日本動脈硬化学会総会 (京都)
 13. 近藤宇史: Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by doxorubicin in human lung cancer cells (2003.10.15-18) 第76回日本生化学会 (東京)
 14. 近藤宇史: Melatonin inhibits VEGF gene expression by Doxorubicin (2003.10.15-18) 第76回日本生化学会 (東京)
 15. 近藤宇史: [シンポジウム] 老化を制御するシグナル: エネルギー代謝とストレス応答の交差点—酸化ストレス性細胞障害を防御するシグナル伝達と細胞内アンチオキシダントによる制御 (2004.11.6) 第26回日本基礎老化学会シンポジウム (東京)
 16. 近藤宇史: 心筋芽細胞の参加ストレス障害に対するエストロジェンの防御作用の機構 (2004.10.28) 第28回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会 (名古屋大学) (名古屋)
 17. 近藤宇史: 核内グルタチオン S-トランスフェラーゼ π による酸化的 DNA 障害の抑制 (2004.10.28) 第28回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会 (名古屋大学) (名古屋)

18. 近藤宇史 : ER retention of calreticulin and structural implications (2004.10.16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
19. 近藤宇史 : Protective effect of Estradiol on oxidative stress-induced apoptosis-implication of redoxregulation (2004.10.16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
20. 近藤宇史 : Nuclear glutathione S-transferase π prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA adducts. (2004.10.16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
21. 近藤宇史 : [特別講演] 血管の老化と酸化ストレス (2004.8.26) 第 25 回道北心臓勉強会 (旭川)
22. 近藤宇史 : 原発性脳腫瘍の放射線耐性機序における小胞体分子シャペロンの役割 (2004.6.6) 第 45 回原子爆弾後障害研究会 (長崎)
23. 近藤宇史 : 核内グルタチオン S-トランスフェラーゼ π による酸化的 DNA 傷害の抑制 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
24. 近藤宇史 : 原発性脳腫瘍の放射線耐性機序における小胞体分子シャペロンの役割(2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
25. 近藤宇史 : [特別講演] 老化研究の最前線 (2004.11.16) 第 291 回日本皮膚科学会地方会 (長崎)

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書（総合）

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の応用

分担研究者 武山 健一
東京大学分子細胞生物学研究所助手

【研究要旨】

老化に伴い進行する神経変性機構と性ステロイドホルモン作用機構の相互作用機序を明確にするため、代表的な神経変性疾患である球脊髄性筋萎縮症(SBMA)発症・促進ならびに核内レセプター転写制御機構に着目した。本研究課題はこれら分子機構の個体レベルの把握は必須と考え、モデル個体の寿命を指標とした機能因子や分子機構解明を最終的な目標として、まず系の確率および分子探索を試みた。その結果、神経変性制御因子を見出し、その一部はクロマチン動態および細胞周期の破綻が神経変性誘導に寄与することを見出した。また性ステロイドホルモンレセプター(ER α 、 β および AR)の機能特異性を制御する新規転写共役因子の探索からも、同一なヒストン結合やクロマチン構造変換機能が予想される遺伝子を同定した。本研究成果により、神経変性機構と核内レセプター転写制御機構にはヒストン修飾を伴うクロマチン構造変換制御のクロストークが存在し、老化に伴う神経変性機構はクロマチン動態の破綻変動を招き、核内レセプターの機能低下を導くことが強く示唆された。

A. 研究目的

老化の促進や老年性病態惹起の主要因の一つには遺伝子発現機構の衰退や破綻、それに伴う細胞機能の衰退があげられる。中でも高齢化に伴うステロイドホルモンの減少は老年病進行を促すが、これはステロイドホルモンが様々な組織にて遺伝子発現を厳密に制御し、多彩な生理作用を発揮していることに起因すると考えられている。従って、ステロイドホルモン作用機序の分子レベルの解明は老年病の予防・治療法開発に非常に重要であると考えられる。

一方、代表的な神経変性疾患である球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はポリグルタミン伸長異常型アンドロゲンレセプター(AR polyQ)により男性特異的に生じる神

経変性疾患である。ARpolyQ伸長異常に伴う神経変性機構はlate onsetかつ男性特異的に発症する神経変性を誘導することが知られている。しかしながら、男性特異的な発症機構や加齢に伴う病態悪化の分子機構は不明であった。申請者はこれまでSBMAのモデル生物としてAR polyQ発現ショウジョウバエを構築し、その表現系を複眼で観察することでSBMAの発症・進行機構の基礎解析を試みてきた。その結果、アンドロゲンと結合したARの立体構造変化に伴う分子凝集により神経変性が発症するメカニズムを世界に先駆け証明した(Takeyama et al., Neuron 2002)。これらの結果は、ヒト神経変性機構を解析する上でモデルショウジョウバエが非常に有用であり、神経変性誘導や