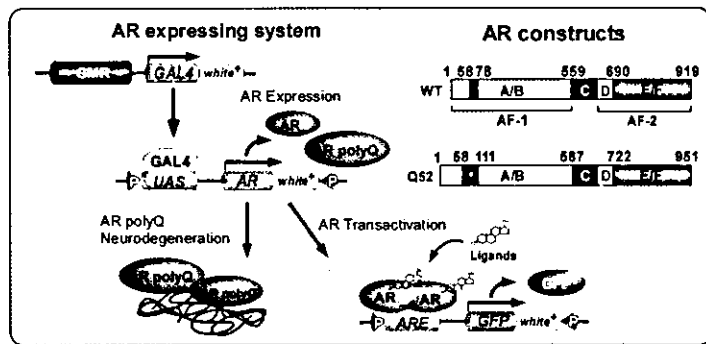


進行を制御する因子の探索にはこの系統を用い分子遺伝学的なアプローチが可能と考えられた。

性ステロイドホルモンであるエストロゲンおよびアンドロゲンは、リガンド依存的に標的遺伝子を発現制御する転写制御因子である核内レセプター[エストロゲンレセプター($ER\alpha, \beta$)およびアンドロゲンレセプター(AR)]を介し時期や組織特異的に生理作用を表している。核内レセプター転写制御メカニズムはリガンド依存的な転写共役因子複合体群との相互作用により染色体構造変換をはじめ様々なヒストンやDNA修飾により厳密に制御されている。すなわちステロイドホルモン作用は核内レセプターを介するこれら転写共役因子複合体群の機能および選択性により特異的標的遺伝子の染色体構造変化を誘導し、厳密に時期や組織特異性を表していると考えられる。従って核内レセプター転写共役因子複合体群の探索はステロイドホルモン生理作用を理解する上で必須と考えられる。そこで時期や組織特異性を理解する上で、核内レセプター転写活性を厳密に制御する転写共役因子群の単離が生化学的アプローチにより成し遂げられてきた。しかし $ER\alpha$ やARの転写活性化機構の实体は培養細胞やin vitro系で確認されているものの、個体レベルに依存した老化を伴う解析系の報告は無い。そこで本研究では $ER\alpha$ およびARを複眼に強制発現させたショウジョウバエを構築後、レポーターにGFPを用いて個体レベルでリガンド依存的な転写活性を把握した。更にショウジョウバエ既知転写共役因子がARの転写活性を制御していることを報告した。しかし老化に伴う生理作用の低下・衰退を理解する因子群は判然としていない。そこで申請者はこれらショウジョウバエに構築したヒト核内レセプタ



一転写制御機構を用いて、核内レセプターの転写共役因子の単離を試みた。その結果、既知転写共役因子のショウジョウバエホモログCBP、p160およびTRAP80、100の機能欠失変異体は著しく転写活性が抑制され、一方過剰発現変異体は転写を亢進させることを報告した(Takeyama et al., Biosci Biotech Biochem, 2004)。

そこで本研究では $ER\alpha$ 、ARの転写活性を指標とした既知および新規転写共役因子の同定・機能解析ならびにAR遺伝子変異による神経変性の分子機構解明を目的とした。特にこれまでの生化学的なアプローチでは同定困難である複合体群の構成因子を標的として、分子遺伝学の発達したショウジョウバエに着目した分子遺伝学的アプローチにより、様々な遺伝子変異個体から分子同定を試みる。既にヒト $ER\alpha$ 、AR遺伝子およびこれらのレポーター遺伝子を発現導入したショウジョウバエ個体を構築し、様々な組織で転写活性を発揮することを確認済みである。またショウジョウバエでは唯一、ヘテロクロマチンおよびユークロマチン状態と転写頻度との相関関係を示すPosition Effect Variegation (PEV)解析が可能である。そこで $ER\alpha$ およびAR応答配列を含むレポーター遺伝子をヘテロクロマチンおよびユークロマチンへ挿入後、ホルモン依存的な転写開始に必須となる転写共役因子を明確にできると考える。さらに個体レベルでの転写活性の把握は老化進行の観察を検討する上で必須である。単離同定した因子はヒトホモログ

を単離し、ヒト培養細胞系および *in vitro* 系においてヒストン修飾やクロマチンリモデリング活性を検討すると共に、これらホルモンの既知標的遺伝子のクロマチン動態を解析し、老化に伴う機能維持を検討できると考える。同時に当該研究室では組織特異的な ER α および AR 遺伝子欠損マウスを構築済みであることから、個体における意義も分子レベルで明確にできると期待する。これらモデル個体による分子遺伝学的ならびに生化学的解析の両側面からのアプローチによりステロイドシグナルを把握し、老化と因果関係を明確にできるものと考えた。

B. 研究方法

本研究は以下 4 つの独立した機能解析系により老化に伴う SBMA の発症・進行の分子機構とステロイドホルモン作用の低下・衰退の因果関係を分子レベルで解明した。第一にショウジョウバエ AR polyQ 依存的な神経変性および ER α ・AR 転写活性を指標に、遺伝子欠損あるいは過剰発現変異体と掛け合わせ、機能遺伝子の分子遺伝学的な探索を行った。次に神経変性誘導に寄与する細胞核内の AR polyQ の蓄積・凝集において、核内の詳細な局在性や凝集体分子を明らかにするため、AR polyQ を bait にした生化学的アプローチにより細胞核内の局在性や相互作用分子の同定を試みた。第三に神経変性において AR の機能低下を導く転写

共役因子の同定・性状解析を行った。最終的に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の系を構築した。

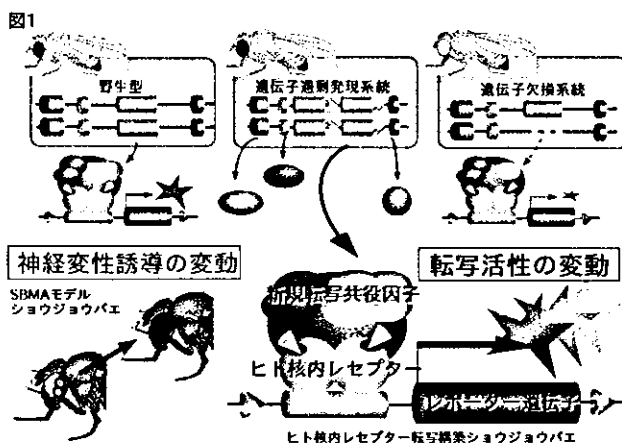
1. AR polyQ 依存的な神経変性誘導因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

神経変性を制御する遺伝子を探索するため、SBMA モデルショウジョウバエ(AR polyQ 系統)の神経変性を指標として遺伝子変異体と掛け合わせた分子遺伝学的スクリーニングを行なった。当該遺伝子が欠損または過剰発現しているショウジョウバエ変異体と AR polyQ 系統を交配させ、次世代の複眼を観察した。約 1500 遺伝子のうち 25 遺伝子で神経変性の変化が観察された。中でも神経変性の著しい回復が、細胞周期制御因子であるヒト Retinoblastoma protein(hRb)のショウジョウバエホモログ Retinoblastoma family protein(dRbf)の過剰発現で認められ、AR polyQ 特異的な dRbf の遺伝的相互作用が示唆された。そこで AR polyQ 依存的な神経変性抑制における hRb および dRbf の作用機構の解明を試みた。

一方、AR polyQあるいはpolyQ単独に発現させ誘導した神経変性に対し、遺伝子欠損変異体で顕著に悪化する遺伝子群にはヒストン修飾やクロマチンリモデリング等のクロマチン構造変換・維持関連因子が多く存在することが判明した。そこでこれら因子と polyQ 構造の相互作用に共通した領域を生化学的に解析すると共に、これら因子の機能解析を行った。

1. AR polyQ 細胞内局在性および相互作用因子凝集体の生化学的探索

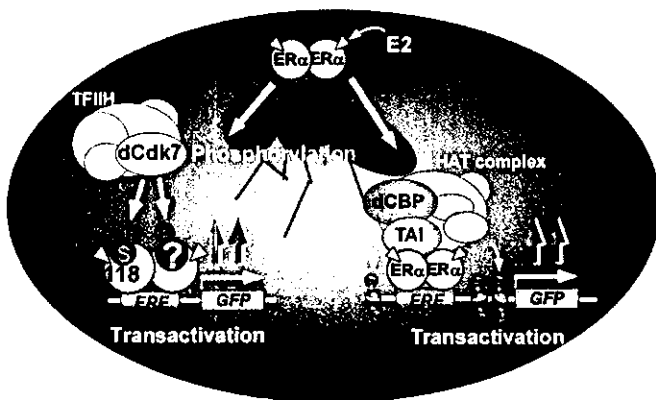
AR polyQ が誘導する神経変性は細胞核内凝集体から引き起こされることは明確にしてきたが、詳細な細胞核内の局在性並びに凝集体形成時の相互作用因子は不明である。そこでショウジョウバエ embryo および複眼



に強制発現させた AR polyQ を bait として細胞内画分後、AR polyQ の局在性および凝集体構成画分における相互作用因子のタンパク精製を試みた。はじめに、ショウジョウバエ embryo および複眼でリガンド非依存的に転写活性を示す AR 過剰発現ショウジョウバエ変異体 [AR(AF-1)系統]の作出を行なった。次に、AR(AF-1)系統のこれら組織の核抽出液、クロマチンを含む沈殿の取得のため、スクロースグラジエントで細胞質画分と核画分に分離後、核抽出液ならびにクロマチンを含む沈殿を画分した。これら画分を用い AR(AF-1)および相互作用因子の同定を行った。

1. ER α および AR 転写共役因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

ショウジョウバエに構築した ER α および AR 転写系において、既知転写共役因子が機能することを報告した。一方でリン酸化に代表される細胞内情報伝達系が核内レセプター転写制御に対し、その情報伝達系のクロストークが保持されているかの検討は、一連の核内レセプター機能解析に必須である。ER α は細胞内情報伝達因子によりリン酸化修飾され転写活性化能が増強することが知られている。



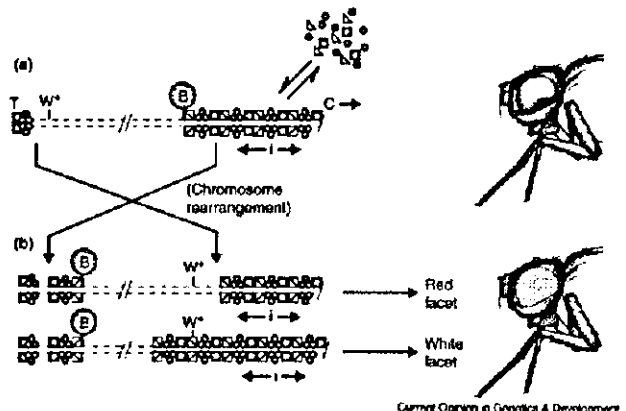
細胞増殖因子により活性化される MAP kinase (MAPK) や細胞周期調節因子により活性化される Cyclin dependent kinase 7 (Cdk7) は細胞種特異的に ER α の Ser¹¹⁸ 残基をリン酸化し、転写活性化能を増強することが報告されている。これら ER

α のリン酸化に関する培養細胞レベルでの知見を生体内で証明するため、ER α 転写活性化能を指標とし、MAPK 及び Cdk7 並びにこれらシグナル伝達因子の機能欠損変異ショウジョウバエを用いて、Ser¹¹⁸ を標的とするリン酸化シグナルを検討した。

これら細胞内情報伝達系との核内レセプターの情報伝達クロストークと、既知転写共役因子の機能の確認により、更なる転写共役因子の分子遺伝学的探索を遂行した。ER α および AR 発現ショウジョウバエを用いた転写共役因子群の分子遺伝学的な探索は数千種におよぶ各種遺伝子変異型ショウジョウバエとの交配により核内レセプター転写活性能の変動を指標に網羅的な探索を行った。転写強弱を示したハエ変異体から変異遺伝子を同定した後、相同性の高いヒトホモログ遺伝子を単離した。単離した遺伝子は HEK293T 細胞において ER α および AR と同時に過剰発現させ、それぞれレセプターの転写活性能をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

1. 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

1.2.3 のスクリーニングにより同定した因子の多くは染色体構造調節機能を有していると推測され、本研究では生化学的な機能解析と同様に個体レベルで明確にすることが老化の評価系に必須であると考へた。現在、ヘテロクロマチンおよびユークロマチン状態と転写頻度との相関



を示す Position Effect Variegation (PEV)解析は、ショウジョウバエ複眼の表現系解析が最も有用とされている。本研究では PEV 解析を応用化し AR 転写系を構築した。すなわち白眼の遺伝的条件下において、AR 応答配列下流に構築した赤色素を有する遺伝子をゲノム上ランダムに導入させた。この遺伝子導入位置がユークロマチン領域であればアンドロゲン依存的に複眼は赤色を呈すが、ヘテロクロマチン領域であれば転写は抑制化状態にあり、赤目遺伝子の発現は抑制され、白眼を示す。従ってアンドロゲン依存的にレポーター遺伝子位置の染色体構造状態を個体レベルで視覚的に把握し、取得した転写共役因子のクロマチン構造変換機能の評価を行った。

C. 研究結果

1. AR polyQ 依存的神経変性誘導因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

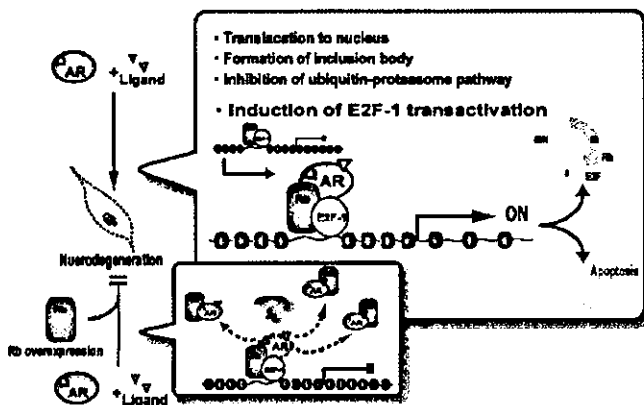
SBMA モデルショウジョウバエ(AR polyQ 系統)を用いた分子遺伝学的探索から、神経変性の抑制遺伝子として dRbf を同定し、AR polyQ 特異的に dRbf との遺伝的相互作用を示唆した。hRb および dRbf は G1→S 移行因子 E2F-1 の転写抑制因子である。そこで、ショウジョウバエ個体にて AR polyQ が dRbf/dE2F-1 複合体の転写調節機構への影響を検討した。その結果、dE2F-1 標的遺伝子の発現量が顕著に亢進していた。更に、dE2F-1 標的

遺伝子のプロモーター上に AR polyQ がリクルートされ、ヒストン H3 のアセチル化も亢進することを確認した。次に AR polyQ と hRb との相互作用をヒト培養細胞 293T 細胞を用いて検討したところ、AR polyQ はリガンド依存的に hRb との相互作用が増強することを見出した。以上より、AR polyQ は Rb との相互作用を通して E2F-1 の転写活性化を促進し、神経変性を誘導していることを強く示唆した。

一方、polyQ 依存的神経変性抑制因子としてヒストンアセチル化(HAT)、ヒストンメチル化(HMTase)、クロマチン再構築機能を有する CBP, Ash1, Acl1 等、クロマチン構造変換・維持関連因子を同定した。これら因子の結合特異性は共通構造からなる可能性を考え、結合領域を同定するため、GST-pull down assay により AR の結合を検討した。その結果、2 個の Zn を取り込んで形成する機能不明瞭な PHD finger が polyQ 領域と強固に結合することを見出した。実際、PHD finger をもつ CBP, Ash1, Acl1 の機能が AR polyQ により制御され、ヒストン修飾やクロマチン構造変換能が破綻するかを検討するため、HAT, HMTase, クロマチンリモデリング解析を行った。その結果、AR polyQ はこれら機能を抑制することが判明し、クロマチン構造変換・維持機構を破綻させることが示唆された。

2. AR polyQ 細胞内局在性および相互作用因子凝集体の生化学的探索

AR polyQ 細胞内局在性および相互作用因子凝集体の探索のため、ショウジョウバエ embryo および複眼を用い、AR に相互作用する因子の精製を試みた。各画分を Western blotting で確認したところ、AR(Af-1)はクロマチンを含む沈殿に含まれていた。そこで、クロマチンを含む沈殿を SDS 化し、SDS-PAGE でタンパク質を展開後、MALDI-TOF-MS で質量分析を行った。その結果、未



| | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|------------|------------|-----------|------------|-----------|-------|-------|-------|-------|----|
| ASH1-1 | 1 | C-CGLYNDDE | GLMIQ | ----- | 30 | ----- | 40 | ----- | 50 | ----- | 50 |
| CBP | 1 | CEKCFTEIQG | ENATLQDDPS | QPQTTSKDD | FEKQKNOTLD | PEPFVDCKE | ----- | ----- | ----- | ----- | 50 |
| INK2 | 1 | CLCHGVSYD | EMIQ | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 50 |
| WSTF | 1 | CVKCVKQGD | DKLA | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 50 |
| MIZ-1p10 | 1 | CEVCOOQEI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 50 |
| Consensus | 1 | C-C | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 50 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|-----------|--------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| ASH1-1 | 51 | CMVWQ-MED | CMGVNDSVEHVL | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |
| CBP | 51 | CDRQW-MDI | CVLHFRWV | SGFVCDMC | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |
| INK2 | 51 | DCPIEWFH | CVSLTYPKK | KWY-CPIYG | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |
| WSTF | 51 | CHKAF-ALF | CLRPALVEP | DEEWQCPAC | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |
| MIZ-1p10 | 51 | CPRAV-HLV | CLDPELDRA | EQKWSQPHC | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |
| Consensus | 51 | C-C | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |

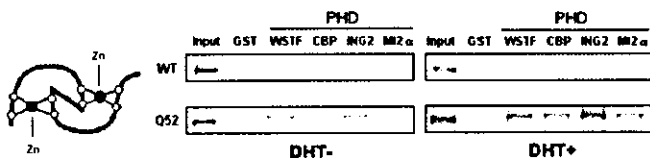


図4 ポリグルタミン配列はPHD fingerと結合する

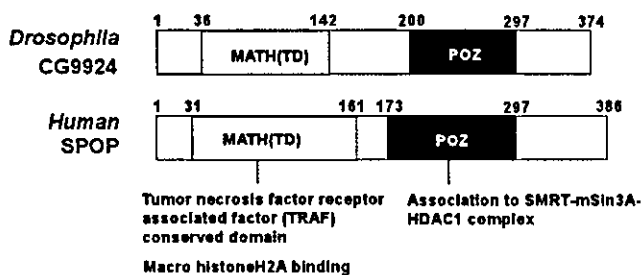
知因子の他、クロマチン構造変換や維持に重要と考えられるヒストンシャペロンや TOPO II を同定することに成功した。研究結果 1 の結果を考慮すると、AR polyQ は核内クロマチン画分で凝集すると強く示唆され、クロマチン構造変換や維持機能を破綻させ、神経変性誘導および促進すると考えられた。

3. ER α および AR 転写共役因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

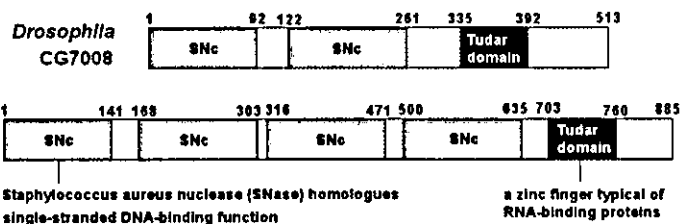
ショウジョウバエにおける細胞内情報伝達系と核内レセプターの転写制御のクロストークが種を越え保存されているか確認するため、リン酸化修飾を介した ER α の転写活性制御機構の意義をショウジョウバエ遺伝子変異体により検討した。その結果、dCdk7 遺伝子欠損変異系統において ER α の顕著な転写抑制が観察され、Ser¹¹⁸ 残基非リン酸化型 ER α の転写活性には変化が無いことを確認した(図 5)。同時に *in vitro* 系にお

いて dCdk7 が 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

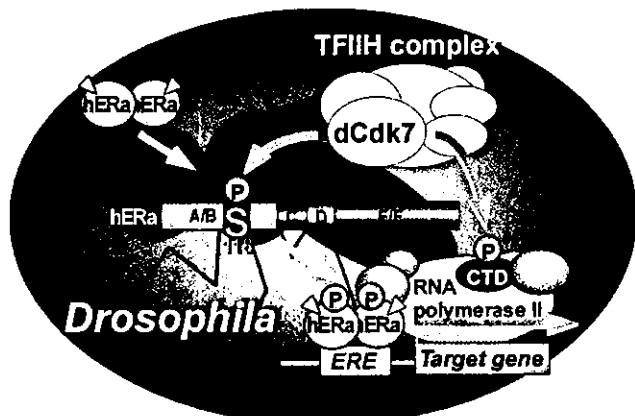


に認められた I(3)s84507(CG9924)および I(3)s23617(CG7008)に着目した。CG9924 は MATH(TD)および BTB/POZ domain が保存された核内タンパクでヒト SPOP と高い相同性を示す。SPOPの MATH domain は TRAF-1,6 や TNFR と直接相互作用し、その下流のシグナルを制御している。一方、BTB/POZ domain は SMRT-mSin3A-



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 macroH2A.1.2 とも結合し、転写抑制化制御に関与すると示唆されている。

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。p100 は Tudar domain を介して RNA 結合タンパクへ相互作用し、RNA の transport や metabolism を制御する。また STAT6 の転写活性化共役因子として機能



dCdk7によるSer118のリン酸化はER α 転写活性を促進させる

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。従来 PIAS 機能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。

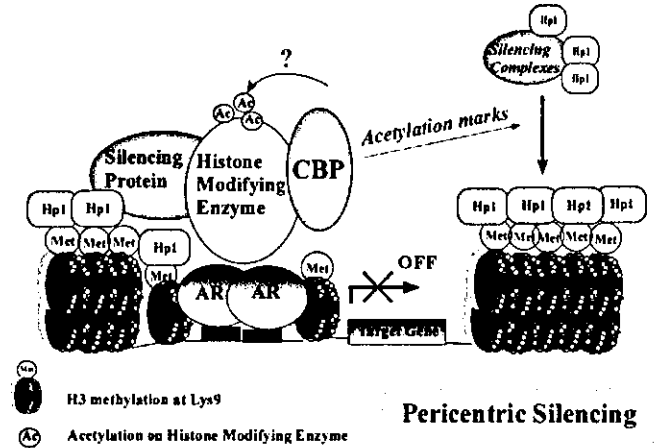
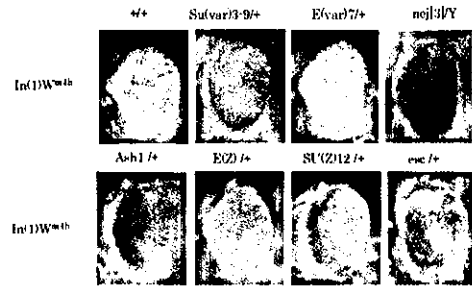
最終的にこれら p100 および SPOP における転写活性能を 293T 細胞でルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、ER α AR の転写活性能において p100 は転写抑制を示し、SPOP は転写増強が認められた。この結果からこれら分子が核内レセプター転写をヒト生体内で制御する可能性が強く示唆された。

| Gene | AR転写活性 | Human homolog | Domain |
|-------------|-----------|---|--|
| CG9924 | activator | SPOP | POZ/BTB domain |
| CG13625 | activator | SRm160 | Ser/Arg-related nuclear matrix domain, splicing |
| CG7006 | repressor | p100 | RNA binding (tudor domain) |
| CG9935 | repressor | TRAP240 | mediator |
| cpo | repressor | hnRNP-1 | RNA binding |
| Dak1 | repressor | Dak1 cydylyate kinase | RNA binding |
| bonus | repressor | TIF1alpha | corepressor |
| Ash1 | repressor | Ash1 | histone methylase |
| CG1815 | repressor | protein kinase C-binding protein RACK7 | PHD-finger, Bromodomain |
| wdb | activator | epsilon isoform of 61kDa regulatory subunit of PP2A | Protein phosphatase 2A regulatory B subunit (856 family) |
| CG9613 | activator | unknown | UbiA prenyltransferase |
| cenE1A | activator | centaurin B 2 | Zinc-finger GCS-type, Ankyrin repeat |
| Su(var)2-10 | activator | PIAS1 | SAP domain |
| smvCG32529 | activator | unknown/KIAA0925 | BAH(bromo-adjacent homology) domain |
| ago1 | activator | ago1 | RNA-induced silencing complex |
| slx | activator | RRM, RNP | RNA recognition motif, RBD |
| stat92E | repressor | STAT | SH2 domain |
| Tm2 | repressor | Tropomyosin | actin binding coiled coil |

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

Mutations of dCBP and Histone Lysine Methyltransferases for H3K9 Suppress PEV of *ln(1)W^{enh}*



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。

D. 考察

本研究はショウジョウバエの分子遺伝学を駆使した解析系を構築し、機能遺伝子を同定・性状解析した。現在ヒトとショウジョウバエの機能遺伝子は解読済みであり、その構造・機能ともに高く保存

されていることが判明している。従ってショウジョウバエ中で機能するヒト ER α および AR は性ステロイドホルモン作用機構を分子遺伝学的に解析できるツールとなり、標的遺伝子のクロマチン構造を考慮した解析系には格好のモデル個体と言える。

神経変性制御遺伝子の同定により、転写開始や終息因子、転写伸長、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング等機能が推測される因子を複数同定することに成功した。すなわち神経変性機構の一端がクロマチン構造変換を伴う転写制御機能の破綻、染色体 DNA 構造変換維持機能の衰退が考えられた。これまでヒストン脱アセチル化活性やアセチル化活性は神経変性制御に拘わることは報告されていたが、本研究結果から、ヒストン修飾のみならずクロマチン構造変換も非常に重要であることが判明した。AR polyQ と Rb の相互作用は E2F-1/Rb 複合体の転写調節機構の破綻を生じることが示唆し、polyQ 依存的な PHD finger との相互作用は、クロマチン構造維持に破綻をきたす可能性を示唆した。また、生化学的アプローチにより AR polyQ がクロマチン画分に局在することを見出した。以上の成果を踏まえると、神経変性機構と転写制御は共通したクロマチン上のイベントであり、神経変性が遺伝情報伝達のあるクロマチン構造状態の異常により転写制御や細胞周期の破綻を生じると推測された。現在この神経変性疾患は治療がないばかりか加齢に伴い亢進し最終的に致死となる難病であることから、これら破綻機構の解析は神経変性発症抑制や治療に大きく貢献できると期待する。最終的に神経変性の促進とステロイドホルモン作用の低下・衰退はクロマチン上で協調的作用に発揮されることから、老化に伴うヒストン修飾およびクロマチン再構築機構のより詳細な把握はこれらクロストークの分子機構を明確にできると考え

られた。

一方、個体レベルでクロマチン構造を考慮したAR転写系を構築し既知転写共役因子のクロマチン構造変換機能を評価することに成功した。既知転写共役因子でありヒストンアセチル化修飾し転写活性化すると考えられるCBPがヘテロクロマチン上で抑制的に働く知見は初めての報告であり、ヒストンH3 Lys9がメチル化を亢進することを見出した。今後CBP機能はどのような転写抑制機構を介するか、ヒストン修飾を介した詳細な転写制御解析を進展させる予定である。

最終的にpolyQ依存性神経変性においてAR転写の足場となるクロマチン構造の障害により、AR転写活性の低下を導くことが示唆された。すなわち神経変性の促進とステロイドホルモン作用の低下・衰退はクロマチン上で協調的に発揮されることから、老化に伴うヒストン修飾およびクロマチン再構築機構のより詳細な把握はこれらクロストークの分子機構を明確にできると考えられた。

E. 結論

神経変性機構とステロイド生理作用機構の作用点の分子メカニズムを明確にするため、AR polyQ 依存性神経変性および ER α ・AR 転写共役因子の同定・機能解析を行った。性ステロイドホルモン作用をショウジョウバエ個体レベルで評価できる神経変性誘導系および転写制御系を構築した。ポリグルタミン伸長異常による神経変性制御はヒストン結合やクロマチン再構築因子等が関与しクロマチン動態を制御破綻することが推測された。従って老化に伴う神経変性の亢進は全体的な転写制御の破綻ならびに染色体DNA構造維持の衰退を招くことが考えられた。さらに ER α ・AR 転写活性もまたこれら因子により仲介されていることが判明した。すなわち、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。今後、老化に伴う神経変性促進と転写・複製・修復・細胞周期時におけるクロマチン動態を個体レベルで把握することにより、更なる詳細な分子機構を明確にできると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato S, Suzawa M, Takada I, Takeyama K, Yanagisawa J, Fujiki R, Kitagawa H: The function of nuclear reception in bone tissue. *J Bone Miner Metab* 21, 323-336, 2003
2. Kato S, Takeyama K: Expression cloning of ligand biosynthetic enzymes. *Methods Enzymol* 364, 361-375, 2003
3. Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S: Androgen receptor functions from reverse genetics models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 95-99, 2003
4. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Yanagisawa J, Chambon P, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Activation of estrogen signaling by dioxin-induced association AhR with ER. *Nature* 423, 545-550, 2003
5. Fujishima T, Kittaka A, Yamaoka K, Takeyama K, Kato S, Takayama H: Synthesis of 2,2-Dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org Biomol Chem* 1, 1863-1869, 2003
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: In vivo potentiation of human oestrogen receptor _by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells* 9, 983-992, 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. 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.
12. 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.

2. 学会発表

【国際学会】

1. Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi 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 (2004.2.28-3.4) Keystone

Symposia, Keystone, CO, USA.

2. Shirode Y, Takeyama K, Kato S: A serum protein regulates VDR transactivation by a novel vitamin D analogue, ED-71. (2004.10.1-5) American Society of Bone and Mineral Research 26th Annual Meeting, Washington DC, USA.

【国内学会】

1. 武山健一、大竹史明、加藤茂明：[シン

ポジウム] Transcriptional regulation of steroid hormone receptor with co-regulators. (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (横浜)

2. 武山健一、松本高広、加藤茂明：アンドロゲンレセプター転写制御機構における転写共役因子群の分子遺伝学的解析 (2004.6.24-26) 第 77 回日本内分泌学会学術総会 (京都)

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）

脳の老化におけるステロイド受容体作用機構の解明とその応用

分担研究者 柳澤 純

筑波大学大学院生命環境科学研究科教授

【研究要旨】

エストロゲンレセプター α と β (ER α 、 β)は、その発現が脳においても顕著にみとめられることから、脳で重要な機能を持っているものと考えられているが詳細は未だ不明である。本研究者は、ER α が神経細胞の成長とアポトーシスに関与する IGF-1 受容体とエストロゲン依存的に複合体を形成し、MAP キナーゼ、Akt などの下流のシグナルの活性化を引き起こすことを見出した。この結果は、ER α が神経の成長などに重要な役割を担っていることを示すものである。脳の老化は、さまざまな蛋白質の品質低下を招くことが知られている。ER α の加齢に伴う機能低下は、シナプス突起伸長の低下、神経細胞の修復異常などを引き起こし、記憶低下などに繋がる可能性がある。そこで、次に ER α の品質管理機構について解析を試みた。その結果、ユビキチン・リガーゼである CHIP が機能の低下した ER α を速やかにユビキチン化し、分解へと導くことを明らかにした(Tateishi Y. *et al.*, *EMBO J.* 2004 in press)。CHIP による品質管理は、ER α と IGF-1 を含む細胞内シグナル伝達系に対しても大変重要な働きを担っている可能性が考えられる。今後、老化に伴う CHIP 依存的品質管理機構の機能低下について検討を加えるとともに、品質管理機構の老化に伴う機能低下を抑制する方法について研究を進めたい。

A. 研究目的

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

での ER α の機能を分子レベルで探ることを目標とし、神経細胞の成長とアポトーシスに関与する IGF-1 受容体とのクロストークについて解析を行った。

ER α が記憶や神経細胞の保護に関与していることから、脳の老化に伴った ER α の機能低下は、シナプス突起伸長の低下、神経細胞の修復異常などに伴う記憶低下などに繋がる可能性がある。本研究では、さらに ER α の機能維持に関わる品質管理機構を分子レベルで明らかにすることも合わせて目的とし、研究を進めた。

B. 研究方法

(1) エストロゲンによる IGF-1 受容体の活性化

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

(2) エストロゲンによる MAP キナーゼと Akt の活性化

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

(3) 細胞質における ER α の局在

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

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

(4) IGF-1 受容体と ER α との相互作用の解析

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

(5) IGF-1 受容体遺伝子欠損細胞に対するエストロゲンの作用

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

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

IGF-1 受容体の発現していない R-細胞においてもエストロゲン依存的な MAP キナーゼと Akt の活性化が認められたことから、IGF-1 受容体以外にも ER α と結合する膜局在蛋白質が存在する可能性が示唆された。そこで、大腸菌を用いて GST

融合 ER α 蛋白質を大量に調整し、GST-ER α カラムを作製した。このカラムにエストロゲン存在下または非存在下でマウス脳の細胞質および膜抽出画分をアプライし、エストロゲン依存的に結合した各分を SDS-PAGE にて分離した後、TOF-MS を用いた Mass fingerprinting によって同定した。

(7) エストロゲン非存在下における ER α の分解誘導

ER α の蛋白質量を定量するため、MCF-7 細胞をエストロゲン(10^{-8} M)存在下と非存在下において培養し、回収した後ホモジナイザーで破碎することによって抽出液を作製し、抗 ER α 抗体を用いてイムノブロットを行った。ER α の分解がユビキチン・プロテアソーム系に依存しているか否かを確かめるため、プロテアソーム阻害剤である MG132 およびラクタシスチン存在下での ER α 蛋白質量についても上記と同様の方法を用いて定量した。さらに、MCF-7 細胞の破碎液から抗 ER α 抗体を用いて ER α を免疫沈降し、SDS-PAGE にて展開したのち、抗ユビキチン抗体を用いてイムノブロットを行い、ER α のユビキチン化の度合いを検討した。

(8) エストロゲン非存在下における ER α の分解誘導に必要な領域の決定

ER α の各種領域欠損変異体を作製し、293 細胞にトランスフェクションした。293 細胞をエストロゲン、MG132 存在下または非存在下で培養し、破碎したのち、ER α の領域欠損変異体量を、抗 ER α を用いたイムノブロットによって定量した。

(9) ER α の分解に関与する E3 型ユビキチン・リガーゼ、CHIP の同定

GST と融合させた ER α のエストロゲン結合領域を大腸菌に発現させ、超音波による破碎ののち、グルタチオンビーズを用いて精製した。精製した GST-ER α をカラムに詰め、HeLa 細胞の抽出液をエストロゲン存在下または非存在下においてロードした。カラムを 150mM KCl

を含む緩衝液で 3 回洗浄したのち、結合蛋白質をザルコシンもしくはグルタチオンを用いて溶出した。溶出蛋白質を SDS-PAGE にて展開し、銀染色を行ったのち、各蛋白質のバンドを切り出し、ゲルのままトリプシン処理を行った。トリプシン処理を行ったゲルからペプチドを回収し、飛行時間型質量分析器を用いて各ペプチドの質量を測定し、MS-fit によって蛋白質の同定を行った。質量分析による蛋白質の同定結果を確認するため、特異的抗体を用いてイムノブロットを行った。

(10) CHIP 複合体構成因子の精製と同定

CHIP を含む蛋白質複合体を精製するため、FLAG と HA ダブルタグ CHIP を HeLa 細胞に発現させ、G418 でセレクションをかけることによって、stable transformant を得た。この stable transformant を大量に培養し、破碎したのち、CHIP を含む蛋白質複合体を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を FLAG ペプチドを用いて遊離させたのち、バックグラウンドを除くため、さらに抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE にて展開した。各蛋白質のバンドを切り出し、ゲルのままトリプシン処理を行った。トリプシン処理を行ったゲルからペプチドを回収し、飛行時間型質量分析器を用いて各ペプチドの質量を測定し、MS-fit によって蛋白質の同定を行った。質量分析による蛋白質の同定結果を確認するため、特異的抗体を用いてイムノブロットを行った。

(11) CHIP による ER α の品質管理

CHIP を 293 または MCF-7 細胞に発現させ、ER α の転写活性に与える影響を、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。さらに、ER α にアミノ酸変異を導入することにより、温度感受性変異体を作製し、CHIP とともに 293 細胞にトランスフェクションした。293 細胞を破碎し、抗 ER α 抗体によってイムノブロットし、

温度感受性変異体の蛋白質量に対する CHIP の効果を検討した。CHIP と ER α をトランスフェクションした 293 細胞を 42 度で 30 分間培養し、細胞を破碎後、抗 ER α 抗体によってイムノプロットし、ミスフォールディングした野生型 ER α に対する CHIP の影響を検討した。

(12) CHIP 遺伝子欠損マウス由来細胞株を用いた ER α 品質管理機構の解析

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 遺伝子欠損マウス (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 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによって ER α の蛋白質量を検討した。さらに、MEF 細胞を熱ストレス条件下 (42 度、30 分) で培養し、ER α 蛋白質にミスフォールド誘導したのち、ER α モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングすることによって ER α の蛋白質量を検討した。

C. 研究結果

(1) ER α の細胞質での機能の解析

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 1)。カルモジュリンはカルシウムと結合し、CaMKII などの活性化を引き起こすことが知られているが、その機能の詳細は長年の研究にも関わらず未だ不明である。一方、ストリアチン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ェスタンブロットティ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

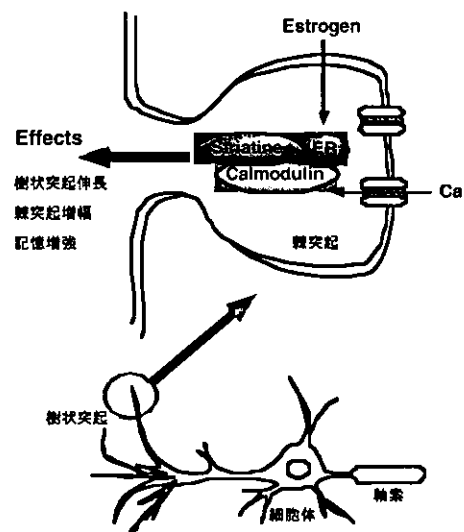


図1 ER α とカルモジュリン、ストリアチンとの複合体

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 あるいはラクタシスチンの添加が 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 によるスミ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

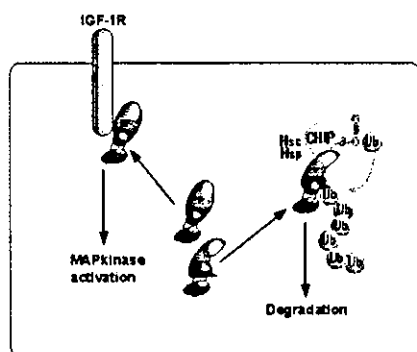
ると、CHIP の発現によって ER α のタンパク質量は減少していた。一方で、ER α による転写活性は CHIP の発現によってわずかながら促進していた。そのため、単位 ER α タンパク質量あたりで考慮した場合には、CHIP を発現させることによって、ER α の転写活性はほぼ二倍上昇していた。これらの結果およびこれまでに報告されている論文(Hohfeld et al., 2001; Meacham et al., 2001; Murata et al., 2001; Goldberg, 2003)から、CHIP はミスフォールドした ER α タンパク質を細胞内から除去するために、優先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。

D. 考察

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

活性化を行っているものと考えられた。GST-ER α カラムを作製してER α にエストロゲン依存的に結合する細胞質蛋白質を精製・同定したところ、カルモジュリンとストリアチンが得られた。カルモジュリンは細胞内のカルシウム・モジュレーターであり、カルシウムと結合して



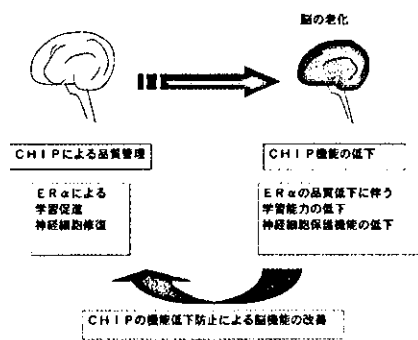
CaMKIIなどを活性化し細胞増殖、樹状突起伸長など様々な過程に関与することが報告されている。しかしながら、その分子機構の詳細は明らかになっていない。ストリアチンは脳において豊富に存在し、神経突起終末にカルモジュリンと結合して存在することが報告されている。ER α も樹状突起の棘突起部位に局在すること、エストロゲンが樹状突起の伸長に関与することから、ER α 、カルモジュリン、ストリアチンは複合体を形成してエストロゲン依存的な樹状突起伸長に関与しているものと考えられる。そこで、樹状突起伸長でのER α 機能の老化にともなう変化について解析を進めるためにER α の品質管理機構について解析を行った。その結果、ユビキチン・リガーゼであるCHIPが機能低下を起こしたER α に選択的に結合し、ユビキチン化することによって分解を促進していることを見出した。CHIPによるER α の分解は細胞質で起こっていることから、ER α の品質管理はエストロゲン依存的なIGF-1シグナル伝達制御においても極めて重要な役割を担っているものと考えられる。ER α 品質管理機構の破綻は、エストロゲン依

存的なIGF-1シグナル伝達の脱制御を引き起こし、シナプス突起伸長の低下、神経細胞の修復異常などに伴う記憶低下などに繋がる可能性がある。

さらに、本研究で、乳がん患者30例の癌部・非癌部でのCHIPの発現量を検討したところ、癌部xでCHIP発現量の有意な低下を認めた。この結果は、蛋白質の品質管理機構の破綻が、癌化に繋がりうることを示唆している。今後、老化に伴うCHIP依存的品質管理機能の低下について検討するとともに、CHIPとシナプス突起伸長、神経細胞修復などの諸過程との関連について研究を進めたい。

E. 結論

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



質のリボソームで合成された後、シャペロン蛋白質と複合体を形成し、正しいフォールディングをとることが示唆された。このような過程で正しく折り畳まれなかった ER α は、ユビキチン・リガーゼである CHIP によってユビキチン化され、分解へと導かれる。CHIP は正しく折り畳まれていない ER α にシャペロン蛋白質中の Hsc70 を介して結合することから、シャペロン蛋白質が ER α のフォールディング状態を認識し、CHIP をリクルートするものと考えられた。ER α の CHIP による品質管理は、IGF-1 を含む細胞内シグナル伝達系に対しても大変重要な働きを担っているものと考えられる。今後、エストロゲン依存的な細胞内シグナル伝達系に対する CHIP の効果を検討する予定である。

脳の老化は、さまざまな蛋白質の品質低下を招くことが知られている。ER α の老化に伴う質の低下は、シナプス突起伸長の低下、神経細胞の修復異常などに伴う記憶低下などに繋がる可能性がある。そこで、今後老化に伴う CHIP 依存的品質管理機構の機能低下について検討するとともに、品質管理機構の老化に伴う機能低下を抑止する方法について研究を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. 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* in press

2. Iwase S, Januma A, Miyamoto K, Shono N, Honda A, Yanagisawa J, Baba T: Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 601-608, 2004.

3. 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.

4. Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama KI, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J* 23, 1598-1608, 2004.

5. Fan W, Yanase T, Wu Y, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol* 18, 127-141, 2004.

6. Yamamoto Y, Wada O, Takada I, Yogiashi Y, Shibata J, Yanagisawa J, Kitazato K, Kato S: Both N- and C-terminal transactivation functions of DNA-bound ER α are blocked by a novel synthetic estrogen ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 656-662, 2003.

7. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S,

- Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917, 2003.
8. Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J: Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 26704-26714, 2003.
9. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550, 2003.
10. Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S: Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nature Cell Biol* 5, 224-230, 2003.
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Junn Yanagisawa :Estrogen receptor are Regulated by Two Independent Ubiquitin-Proteasome Pathways. (2004.4) The 3rd International Nuclear Receptor Meeting in Japan (Osaka)
- 【国内学会】
1. 柳澤 純 :核内レセプターの転写制御機構 (2004.6.24) 第 19 回哺乳動物遺伝学研究会
2. 柳澤 純 :様々な環境応答のメカニズム (2004.1) 生産系特定産業技術研究推進機構 平成 11 年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」若手研究者支援型採択課題「環境化学物質応答の分子機構の解明」研究総括シンポジウム 「環境応答の分子機構の解明」(つくば)
3. 柳澤純 :ユビキチン・ネットワークによる核内レセプターの制御(2003.12.12) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
4. 川辺洋一、柳澤純 :エストロゲンレセプター (ER α) の制御機構(2003.12.11) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
5. 柳澤 純 :核内レセプターの転写制御メカニズム (2003.1) 第 4 回分子血管研究会 (東京)

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）

老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用

分担研究者 津久井 通
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター講師

【研究要旨】

エストロゲンシグナルをリガンド非依存的に活性化できるリガンド非依存型エストロゲンレセプター（caER α およびcaER β ）の組換えアデノウイルスおよび遺伝子改変マウスを作製し、生きた試薬を準備することができた。コンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスについては、それぞれcaER α およびcaER β についてトランスジェニックマウスを得た。また、これらのcTgマウスは普段レポーター遺伝子であるGFPまたはDsRedを発現し、目的遺伝子を過剰発現させる系を確立した。本研究では、Creを組換えアデノウイルスまたはTgマウスにより発現させエストロゲンシグナルを組織特異的に付加できる系の確立を目指した。組換えアデノウイルスによりCreを発現する系では、caER α のcTgマウスの卵巣において、異所的な黄体化が観察され、ER α シグナルの卵巣機能について示唆し、プロゲステロンレセプターとの相互作用についても考察した。

さらに、トランスジェニックマウスでCreを発現する系では、発生初期からエストロゲンシグナルを過剰に付加するとほとんどのマウスでメンデル法則を逸脱し、胎生期で致死となることがわかった。エストロゲン合成の主要組織である卵巣で特異的にエストロゲンシグナルを付加する系を確立し、異所性のエストロゲンシグナルを付加することが可能であった。また、これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに過剰発現をさせる系を確立したが、*in vivo* でより組織特異性・時間軸を制御可能な系を開発し特定疾患に焦点を絞ったcTgマウスの過剰発現系の確立が、老年病の病態メカニズム、治療法への応用性、治療効果およびそのリスクを評価・検討に必須と考えられた。

A. 研究目的

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

国民福祉に極めて意義が大きく急務な問題と考えられる。

本研究課題の目的は、ステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の予防・治療法の開発という観点から、
1) ステロイド様物質（エストロゲン）
⇒ 2) 核内レセプター（ERs）⇒ 3) 下流応答遺伝子群⇒ 4) 劇的な生体生理作用の発揮に見られる一連のシグナルカスケ