

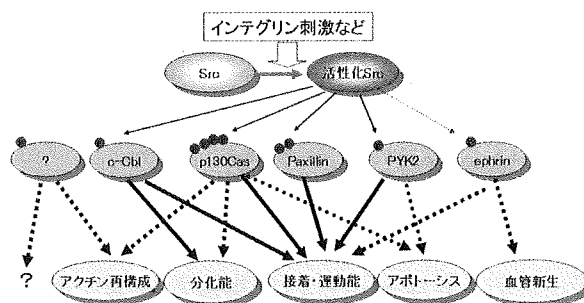
ル伝達を解析するにあたって特に焦点を絞って解析したいのは、非受容体型チロシンキナーゼに分類される Src ファミリーのチロシンキナーゼとそれによってチロシンリン酸化を受ける基質蛋白質群を介したシグナル伝達系である。Src ファミリーキナーゼはいくつもの生理機能を持つが、その中で重要なのは細胞と細胞外基質と間での接着刺激の情報を受け取るインテグリンシグナルの媒介分子としての役割である。骨粗鬆症の病態に関与する破骨細胞はその骨吸収作用を発揮するために骨基質と接着したり移動したりする事が必要で、そのため細胞表面のインテグリン  $\alpha V \beta 3$  を中心とするインテグリンが接着刺激を受け取る。このような接着能・運動能を維持し、機能を発揮するにはインテグリンシグナルを細胞内に伝える Src キナーゼが必要である。また変形性関節症で病的減少が見られる軟骨細胞の増殖には回りのコラーゲンによるインテグリン  $\alpha 1 / \alpha 2 \beta 1$  複合体刺激が必要で、細胞内シグナル伝達はやはり Src キナーゼ経路を用いると考えられる。

一方、これらの新患の発症や治療にも関わるステロイドホルモンであるエストロゲンは、骨芽細胞、乳癌細胞、血管細胞などで新しい作用、すなわち核外のシグナル伝達分子に働きかけ RNA や蛋白質の合成を伴わずに短時間で起こる作用 (nongenomic 作用) がみついている。この作用にも Src キナーゼがステロイドホルモン受容体 ( $ER \alpha / ER \beta$ ) と直接作用することによるメカニズムも発表されており、またエストロゲンとの結合が、通常は分子内結合により不活性化している Src を活性化することも考えられるので、骨粗鬆症の成因にもつながる可能性が示唆されている。

このように多彩な機能が骨・軟骨系の維持にも重要であると考えられる Src ファミリーキナーゼであるが、ノックアウトマウスの解析から破骨細胞では Src フ

ファミリーのうち c-Src が機能維持に中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。ただ Src ファミリーに属する Fyn や Yes なども広範な組織において発現を認めるため、骨芽細胞・軟骨細胞など他の細胞系において役割を果たしている可能性があるが、現時点では Src ファミリーの使い分けについては明らかになっていない部分が多い。Src ファミリーキナーゼはチロシンキナーゼの酵素としてその生理機能を発揮すると考えられるが、数多くの分子が潜在的に Src ファミリーの基質となりうる。骨・軟骨系において発現する Src ファミリーキナーゼが、臓器特異的に、そして機能特異的に多くの基質のチロシンリン酸化に関わっていると考えられるが、その機能に対応した基質はまだ同定されていない場合が多い。Src ファミリーの各組織における機能を正確に理解するには、その場でリン酸化を受ける基質の同定と、基質が下流に伝えるシグナルを明らかにすることが極めて重要である (図 1)。

図1 Srcファミリーキナーゼと基質群による生理作用の制御



その方向からのアプローチが遅れている背景には、このような基質蛋白質の機能解析に現在主流となった DNA チップのような発現量解析では情報を得るのが難しい幾つかの情報、すなわち 1) 蛋白質のチロシンリン酸化の状態、2) 蛋白質の複合体形成とその結合相手、3) 蛋白質の細胞内局在、などの情報が必要不可欠である事がある。我々はこの目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持

ち込むため新しい技術の開発を行ってきた。この手法と、プロテオーム解析や古典的な細胞生物学的解析をうまく組み合わせることで研究を押し進めることにより、各種刺激により骨・軟骨細胞に起こる細胞内変化に蛋白質発現-蛋白質修飾-複合体形成-細胞内局在の4つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。これまでも骨代謝シグナル制御分子を含めた分子群のプロテオームの手法による網羅的解析や、既知のシグナル伝達分子の解析など幾つかの異なるアプローチを用いて Src ファミリーキナーゼとその基質の機能解析を行ってきた。これまでの知見と併せて Src キナーゼの活性または下流シグナルの制御が骨細胞系の機能調節や軟骨細胞の増殖能調節にどれだけ有効であるかを解析する。

蛋白質の解析にはサンプル量が増やせることが必要になってくる場合が多いので、当面の実験は骨肉腫細胞株などの腫瘍細胞を用いて行い最終的な *in vivo* の標的臓器（骨・軟骨）に対する作用を解析するための基礎データを蓄積する。Src ファミリーの活性化のメカニズムに基づいて、破骨細胞の細胞内 Src キナーゼ活性あるいはシグナルの制御により、その機能を調節する系をデザインする。

以上のような解析により病態と Src ファミリーのシグナルの関わりをできる限り正確に把握し、骨粗鬆症・変形性関節症の診断や、分子レベルでの治療法の開発に結びつけることをめざすものである。

## B. 研究方法

これまでのチロシンリン酸化蛋白質群の網羅的解析等のアプローチは、蛋白質試料の量的制限から推進するのに多くの困難を伴った。そのため新規のシグナル伝達分子の同定で成功したのは、サンプルの大量調整が可能な系に限られた。具体的には骨肉腫細胞を初めとする固形腫

瘍の細胞株から、その増殖や運動性に関わるチロシンリン酸化分子群を解析するというのが初めのステップとなる。

(1) 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨吸収の過程で破骨細胞が骨に接着し *sealing zone* を形成することにより隔離された間隙が骨吸収のための“場”となる。この最初のステップは骨吸収のために極めて重要であり、この形成に関わる破骨細胞の接着能と運動能がその機能のために必須なものであると考えられている。我々は蛋白質試料採取のための量的制限の少ない骨肉腫細胞株をモデルに使用して、この接着能や運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の単離を進めてきた。

国立がんセンター研究所で樹立された骨肉腫細胞株 Hu-O9 は、高転移群、低転移群の亜株がそれぞれ複数樹立されており、二群の間には細胞運動能や接着能に大きな違いがある。この骨肉腫細胞の運動能や接着能を制御している鍵となる分子を、それぞれの細胞群の蛋白質、特にチロシンリン酸化蛋白質の解析により明らかにすることを目的に研究を進めてきた。この過程で Src ファミリーキナーゼと幾つかの基質の蛋白質群が重要であることが明らかになってきた。ウエスタンブロット、キナーゼアッセイ、細胞免疫染色などの手法を用いてこれらの分子や Src ファミリーの接着・運動能への関わりを明らかにする。

(2) Src ファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

Src 機能の調節系を樹立するにあたって最も一般的なキナーゼの阻害はその ATP 結合部位のブロックであり、実験、臨床を含め使われているほとんどのキナーゼ阻害剤がこの作用機序によるものである。入手可能な Src キナーゼの阻害剤もほとんど ATP 結合部位を阻害すると考えられる。問題点はその部位の構造的類

似性から他のキナーゼに非特異的効果があることが多いことである。

Src キナーゼによってチロシンリン酸化を受ける基質のレベルでリン酸化をブロックする方法、リン酸化により生ずるシグナルを阻害することが考えられる。これまでの研究で Src と基質との結合様式が徐々に明らかになってきたので、Src キナーゼの基質の一つを標的としてブロックする系が確立できれば Src キナーゼの持つ多くの生物学的機能の中で特定の機能のみの阻害出来る可能性がある。近年開発された RNAi の手法を用い、骨代謝細胞内での基質分子の発現を抑えることで、骨芽細胞においてはその増殖能や遊走能に、破骨細胞においてはその細胞の生存能や破骨活性にどのような影響が出るかを解析する。さらに選択的な効果が期待できる。

我々は以前、癌化した細胞の中で Src チロシンキナーゼの主要な基質となる蛋白質 Cas をクローニングしたが、Cas は 1) インテグリンシグナルにおける Src の主要な基質として破骨細胞の分化・機能維持に重要である。2) エストロゲン受容体と直接結合してその nongenomic 作用に関わる分子である可能性がある。3) 乳癌における BCAR1/p130Cas の過剰発現が、タモキシフェン耐性獲得につながる、などのこれまでの研究から、基質特異的な阻害のモデルとして最適である。単純に RNAi を用いた発現抑制を用いて Cas のシグナルが腫瘍の特性にどのような影響を与えているか解析するとともに、Src との結合部位のみを発現するアデノウイルスベクターを用いて、Src から Cas に来るシグナルだけを選択的にブロックする系の樹立を試みる。このようなことを既知の基質やこの研究中获得された新規の基質について行い、Src の基質特異的シグナル阻害のシステムを拡げていく。

(3) ephrin-B1 のインテグリンシグナル

における役割

ephrin-B ファミリーはもともと受容体型チロシンキナーゼである Eph のリガンドとして取られたものであるが、それ自体が膜貫通領域を持ち、Src によってチロシンリン酸化を受けることから、Src の基質としての機能に興味を持たれてきた。

ephrin-B ファミリーの分子の中でも ephrin-B1 は骨肉腫細胞の転移性とその発現量に相関を認め、またヒトにおける遺伝子変異は頭蓋骨形成異常などの異常が見られ、発生過程で神経堤由来の細胞の運動能や運動方向を制御していると考えられる。今までの研究は Eph-ephrin の受容体-リガンド相互作用によって細胞間接着で接触した細胞同志に双方向性のシグナルを送り repulsion や adhesion の指令を出すことがこの系の主要な役割として解析が進められてきたが、インテグリン刺激により局所的に活性化した Src キナーゼが、基質として ephrin-B1 をリン酸化することによって、どのように細胞の接着能・運動能に影響を与えるのかについてはまだわかっていないことが多い。特に骨・軟骨系におけるこの分子の Src 基質としての働きを推し量るために、細胞モデルを用いて解析を進める。

### C. 研究結果

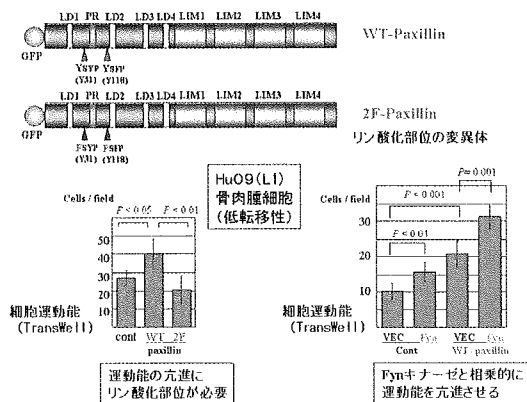
(1) 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨肉腫細胞株 Hu-O9 の転移能の異なる亜株群を用いてチロシンリン酸化の相違の検索を進めてきた。転移性の高い群では、どれも低い群よりも Src ファミリーのキナーゼ活性が亢進していたが、それに対応して強くリン酸化している分子として同定された最初の分子は Paxillin であった。Paxillin の細胞内局在は高転移群でも低転移群でも接着斑にみられ、発現量、リン酸化量は高転移群で顕著に増

加しているもののどちらの群でもインテグリンを介した細胞-基質間の接着に関わっていることが確認された。高転移群の骨肉腫細胞で Src ファミリーのキナーゼ活性を特異的阻害剤 PP2 を用いて阻害すると Paxillin のリン酸化が著明に低下したことから、Src ファミリーの活性上昇が Paxillin のリン酸化をもたらしていることが示唆された。PP2 は同時に高転移群の細胞で亢進していた運動能が低転移群の細胞群と同程度以下に低下した。

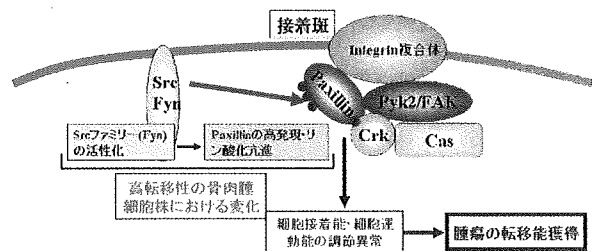
Paxillin のリン酸化量の変化がこの細胞の接着能・運動能に影響を与えていることを確認するために、まず低転移群の細胞に Paxillin を過剰発現すると、細胞の運動能が亢進した。このような運動能の亢進は paxillin の主要なチロシンリン酸化部位 Y31 と Y118 のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体では見られなかった。また paxillin の発現だけでなく Fyn と共発現させることにより相乗的に細胞運動能を亢進させることが示された (図2)。

図2 Paxillinの構造と細胞運動能に対する役割



以上のことをこれまででわかっている paxillin の機能と合わせて考えると、骨肉腫細胞を用いたモデルにおいて、何らかの要因で活性化した Fyn キナーゼが、同時に過剰発現した paxillin のチロシンリン酸化に働き、結果として細胞の運動能・転移能に関わることが明らかになった (図3)。

図3 PaxillinとSrcファミリーによる運動能制御モデル



Hu-O9 も含め幾つかの腫瘍細胞株の系でその接着能や運動能とリンクして Src や Fyn と結合するチロシンリン酸化蛋白質を次々に同定している。その中には Cas やコルタクチンなど既知のもの、それ以外に基質として知られていないもの、機能不明の蛋白質などが含まれている。それらの分子の機能解析を行い発現組織を確認すると同時に、骨芽細胞のモデルとなる Raw 細胞の分化誘導系や軟骨細胞株 ATDC5 を用いて、同様の手法により基質蛋白質の精製・同定を進行中である。

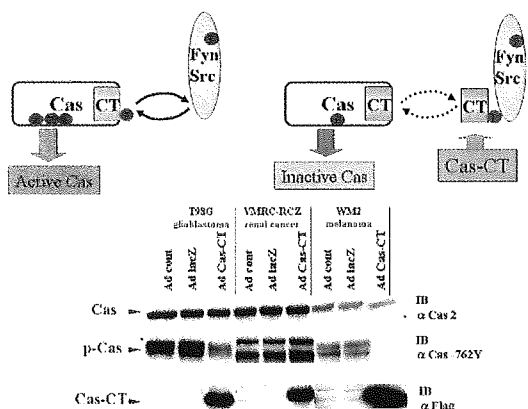
(2) Src ファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

Src ファミリーのうち広範な組織に発現している Src、Fyn、Yes の発現を抑える siRNA を設計し、それぞれの発現を RNAi により抑える系を樹立した。実際ウエスタンブロットで各チロシンキナーゼの量が 80%以上抑制されているのが確認できた。それらを各種の培養細胞に導入することにより、その細胞の接着能・運動能などの特性に Src ファミリーのどのキナーゼが一番関わっているのか調べる事が可能になった。既に固形腫瘍細胞株を用いて、どの Src ファミリーキナーゼがその転移能・運動能に関わるかを解析・検討中である。

また基質レベルでの阻害のモデルとして、Cas については、そのリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析している。Cas は C 末領域に Src キナーゼの SH2 及び SH3 ドメインと結合する領域を持つ。これまでの解析でこ

この領域 (Cas-CT) を欠損した変異体は Src との結合能を失うばかりでなく、チロシンリン酸化のレベルも顕著に低下することがわかっている。今回 Cas-CT をアデノウイルスを用いて大量に発現する系を樹立した。この領域のペプチドは Src と Cas の結合を阻害することにより Cas から伝わるシグナルを選択的にブロックすると考えられる。実際 Cas の恒常的なチロシンリン酸化亢進が見られるグリオーマ細胞 T98G、メラノーマ細胞 WM2 などにこのアデノウイルスを感染させるとコントロールに比べ著明に Cas のチロシンリン酸化が低下した (図4)。

図4 CasのC末ペプチドによるSrc-Casシグナルブロック



ただし、腎癌細胞株 VMRC-R2Z のように Cas のリン酸化レベルの変わらない細胞もあり、細胞により違った機序で Cas のチロシンリン酸化が維持されていることが明らかになった。

T98G や WM2 では同時に細胞運動能も顕著に低下し、Cas を介したシグナルの阻害がうまく効果を現していることが確認された。

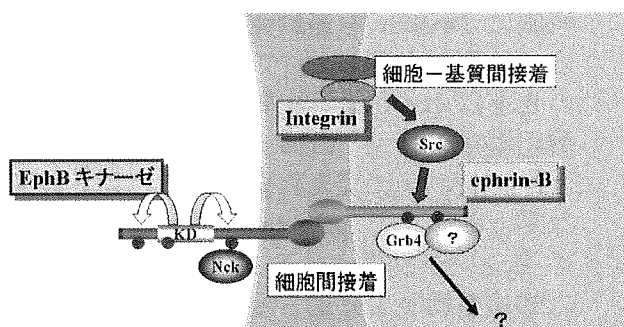
前述の高転移性の骨肉腫細胞株 Hu-O9 ではやはり Cas の強いリン酸化が認められるので Cas-CT のこの系に対する作用を解析中である。

### (3) ephrin-B1 の基質接着シグナルにおける役割

これまでに ephrin-B1 のリン酸化メカニズムや、新規の結合分子の同定などから、Src の基質としての ephrin-B1 の機能

に迫ろうとしてきた。最近タイトジャンクションの構成成分である claudin が ephrin-B1 と結合能を持ち、細胞間接着に伴い claudin が膜表面に集積することで ephrin-B1 がリン酸化するという新しいメカニズムを見いだした。このような受容体を介さない ephrin-B1 の活性化は、他の機序によっても起こると考えられ、その 1 つとして細胞-基質間接着でインテグリンが活性化することにより、Src ファミリーを介して ephrin-B1 がリン酸化するメカニズムがあると考えられ検証を進めている (図5)。

図5 Ephrinの細胞間・細胞-基質間接着における機能



実際、胃癌の細胞株を使って ephrin-B1 を RNAi で抑制すると細胞運動能は顕著に低下し、逆に過剰発現により細胞運動能が増加する事が確認された。リン酸化特異的抗体では ephrin-B1 は接着斑に一致してそのリン酸化を認める。現在リン酸化部位の変異体を使ったシグナルの解析や新たな結合分子の探索を行うことによりインテグリンシグナルの担い手としての新しい ephrin-B1 の役割を明らかにしようとしている。

### D. 考察

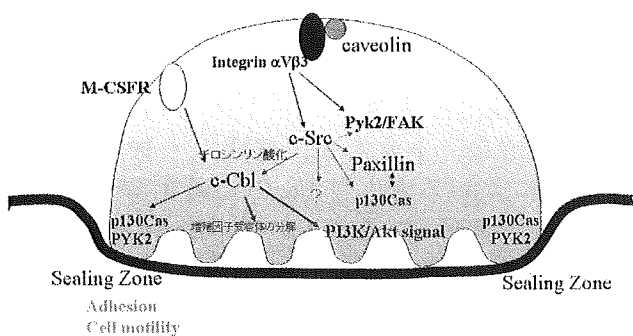
元来、Src キナーゼはレトロウイルスの中で恒常的に活性化した形になることで腫瘍性異常増殖の原因分子として同定されたもので、正常の Src 蛋白質は細胞の秩序の取れた増殖や運動を維持する働きがあると考えている。正常細胞では、細胞内の限られた場所で、限られた時間の間活性化する事で細胞を正しくコント

ロールするので、必要がない状態では非活性型として存在している。活性が強く遷延する場合には腫瘍のような異常増殖につながるし、一方活性或いは蛋白質それ自体が無くなった場合にも、その臓器に他の Src ファミリーの相補的作用がなければ各種の病態を引き起こしうる。

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

Src キナーゼの基質 c-Cbl や Cas もう一つのチロシンキナーゼ Pyk2 が c-Src の下流分子として機能すること、主として Sealing Zone で  $\alpha V \beta 3$  インテグリンを介した細胞接着シグナルが Src/Pyk2/p130Cas/c-Cbl/Paxillin などからなるシグナル複合体によって伝えられることなどが破骨細胞が機能を発揮するために重要であると考えられている。図6にこれまでにわかっている Src を介した破骨細胞のシグナル伝達をまとめる。

図6 破骨細胞におけるSrcを介したシグナル伝達



本研究で骨肉腫細胞の解析をきっかけに焦点を当てることとなった接着斑に関連する分子 Paxillin は破骨細胞においてもその機能に関連することが示唆されており、われわれの開発してきた Src-Paxillin のシグナルのブロックが破骨細

胞にどのような特異的作用を呈するか今後きちんと詰めていく必要があるが、骨粗鬆症治療の有望なターゲットになっていくことは間違いないと考えている。最近になって Paxillin ときわめて類似した構造を持つ Leupaxin という分子がクローニングされ破骨細胞の接着に関与することも示唆されており、Paxillin と Leupaxin がどのような機能分担や協調的作用を持っているのかも解析していく必要がある。一方 Cas は Src チロシンキナーゼの主要な基質として破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシン酸化をしていることが報告されており、シグナルの調節機構などは細胞がん化などとの関わりで研究が進んでいるので、破骨細胞におけるコンディショナルノックアウトの解析が待たれる。ここまでのところ試料の大量調整の技術的問題もあり、実際の破骨細胞や軟骨細胞株でなく骨肉腫細胞などのモデル系を使った技術開発と特定のコントロール分子の検出による実験手法の確認が中心でしかできなかった事が残念な点であり、早急に破骨細胞・軟骨細胞の機能における役割の確認を行う必要がある。

## E. 結論

骨粗鬆症や変形性関節症などのような老化などの過程で起こる代謝性変化は、特定の遺伝子の変異や発現の ON/OFF のようなはっきりとしたスイッチがあると考えるよりも、いくつかの蛋白質の量的な変化により、バランスが取りきれなくなった状態と考えられる。その意味で「疾患遺伝子」を研究する際に、疾患の引き金となる遺伝子変化を追い求めるだけでなく、疾患の状態を生み出しているエフェクターとしての遺伝子群が重要になると考える。その中で特に細胞機能を制御するリン酸化蛋白質群の解析は、通常のマイクロアレイ法や 2 次元スポット解析だけでは手の届かない分野である。治療

薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化などの修飾とそれによる複合体形成の変化などの解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考え。Src キナーゼに関わる細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることが可能になると考える。今後最も重要な点は、骨・軟骨代謝・機能を特異的かつ適切な程度に阻害する分子の設計と、長期間それを全身にデリバリーするための方法論の確立であろう。

現在、癌などの分野で進められている Src のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた研究と比較しても、細胞内のシグナル媒介・調節分子によるチロシンキナーゼシグナルの制御が実現すればその特異性においてはるかに優れているため、副作用の少ない薬剤の開発につながる可能性が高いと期待している。

## F. 発表

### 1. 論文発表

1. Miyake I, Hakomori Y, Misu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R: Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 3206-3215, 2005.
2. 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* 24, 4754-4764, 2005.
3. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori N: Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J Neurosci* 25, 1826-1835, 2005.

4. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R: Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol* 167, 213-222, 2005.
5. Seo S, Asai T, Saito T, Suzuki T, Morishita Y, Nakamoto T, Ichikawa M, Yamamoto G, Kawazu M, Yamagata T, Sakai R, Mitani K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H: Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol* 175, 3492-3501, 2005.
6. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *EMBO J* 24, 3700-3711, 2005.
7. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of clauden-4 and mediates paracellular permeability. *J Biol Chem* 280, 42375-42382, 2005.

### 2. 学会発表

#### 【国内学会】

1. 堺隆一、上北尚正、田中正光、浅輪珠恵：Cas ドッキング蛋白質の C 末端領域による腫瘍特性の制御 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
2. 三宅泉、上北尚正、堺隆一：神経芽腫における野生型 ShcC の腫瘍抑制効果の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
3. 上北尚正、堺隆一：がん細胞の足場非依存性増殖における Src 型キナーゼ及び、その基質群を介した新規シグナル伝達機構の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
4. 田中正光、鎌田礼子、佐々木一樹、

堺隆一 : ephrin-B1 の shedding による  
細胞外ドメインの分泌機序の解析  
(2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会  
学術総会 (札幌)

5. 二見仁康、梶村直子、堺隆一 : RNA  
干渉による活性化 Ret 蛋白の機能解  
析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学  
会学術総会 (札幌)



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

骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子、  
標的因子の検索と機能解析

分担研究者 津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 実験動物施設講師

【研究要旨】

多因子性疾患である骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子について、その疾患因子候補としてのエストロゲン、ビタミン K 関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを作製した。さらに、これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに骨組織で過剰発現させる系を確立し、以下の遺伝子情報制御因子の生体での機能解析を行った。臨床では血中の骨形成マーカーとして、またビタミン K の関連因子として知られる ヒト BGP (Bone gla protein ; オステオカルシン) を骨芽細胞系譜に過剰発現させた結果、出産後 1-2 日目にほとんどの胎児が致死となり、骨の成長不全および石灰化異常を示した。また、エストロゲンシグナルを非リガンド依存的に活性化できるエストロゲンの変異レセプター (caER  $\alpha$  および caER  $\beta$ ) の遺伝子改変モデルマウスを利用して、それぞれのレセプターを軟骨組織で過剰発現することにより、エストロゲンシグナルの軟骨組織における作用を示唆した。本研究課題では、エストロゲンシグナル・ビタミン K による遺伝子情報制御因子群について、骨組織における作用メカニズムを解明するとともに、骨粗鬆症・変形性関節症の病態メカニズムの解明を目指す。

A. 研究目的

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

可能性を示すことが、今後の重要な研究課題と考えられる。とりわけ将来的な治療法として極めて重要なコンセプトとして、生体内で副作用が少なく骨形成作用を持つ新規因子の同定が急務と考えられる。加えて、骨粗鬆症疾患とならんで変形性関節症は、“痛み”を伴う骨疾患で、健康長寿を脅かす大きなリスクファクターと考えられる。

本研究課題における分担項目として、エストロゲン、ビタミン K 関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを解析することにより、動物個体を利用することでしか得られない、重力下での骨代謝における生体機能、薬剤の効果・影響について

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

最終目的は、本研究課題により明らかにされると期待できる候補因子群を同定し、これらの因子群の生体内における骨作用を解明し、これらの因子の相互作用やシグナル伝達に関する研究を通して、違う作用点を持つと考えられる新規因子について分子レベルで骨粗鬆症を体系的に解明することである。さらに、本研究課題で作製される遺伝子改変モデル動物を利用して、これらの因子の骨代謝における生体作用、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指した。

## B. 研究方法

分担者の研究分担項目のうち、骨粗鬆症疾患の治療薬であるビタミンK、エストロゲン等の遺伝子情報制御因子について網羅的に遺伝子改変動物を作製し、その動物個体における骨作用について解析を行い始めた。特に分担者は、本年度にビタミンK関連因子としての $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化標的タンパクであるBGP (Bone Gla Protein) について、骨組織での作用について検討を行う。さらに、エストロゲンのシグナル経路を集中的かつ網羅的に解析するために、エストロゲ

ンレセプター (ER $\alpha$  および ER $\beta$ ) を介する生体での骨作用について焦点を絞り解析を行う。分担研究者は新規遺伝子情報制御因子・標的因子候補としてエストロゲンおよびビタミンKのシグナル因子を網羅的に解明するために、本研究課題での分担項目として以下の研究を行う。

疾患遺伝子および標的遺伝子群の候補について、生体における gain of function を行う実験系の確立、および遺伝子改変モデル動物の作製を行うことにより、エストロゲン・ビタミンKシグナルの骨組織における作用メカニズムおよび病態メカニズム解明、最終的に治療法の確立を目指す。以上の研究課題を遂行するために、先ず具体的に大きく分けると4つ研究材料が必要となり、これらの材料および疾患モデル動物の作製を行い、さらにこれらの生きた試薬を交配により、骨組織特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序に迫る。

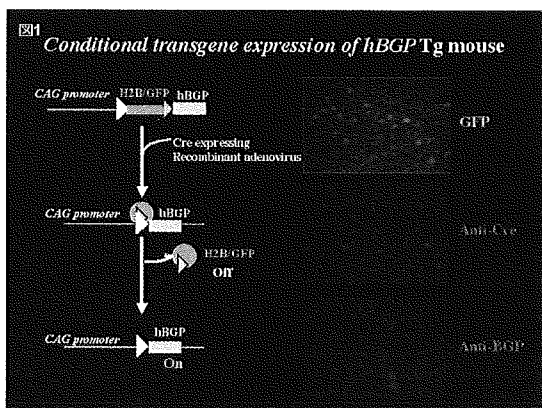
1. 活性型caER $\alpha$ 、およびcaER $\beta$  Tgマウスの作製およびその解析
2. ビタミンK依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼおよびそのグラ化標的タンパクとしてのBone Gra Protein) BGP、のビタミンK 関連遺伝子のTgマウスの作製およびその解析
3. 骨組織特異的に遺伝子改変するための組換え酵素Creを発現するマウスの準備および実験系の確立
4. 1、2、および3で作製した遺伝子改変マウスを交配させることにより、骨組織特異的にGain of functionする系を確立し、骨組織での生体作用について検討する。

## C. 研究結果

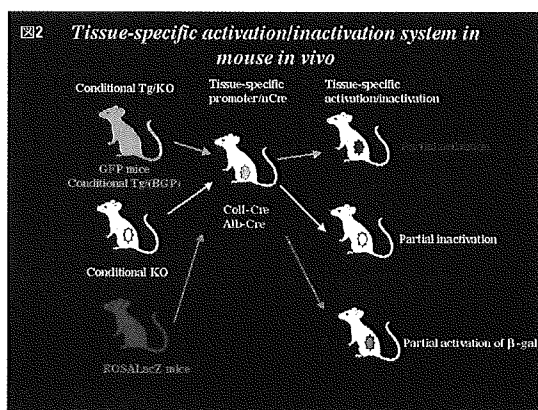
1. BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析  
ビタミンKに関連する骨疾患遺伝子の候補として、 $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化の標的タンパクである BGP に関して、cTg マウスの作製を行った結果、数ライ

ンの cTg マウスが得られた。BGP (Bone Gla protein: Osteocalcin) は、血中における代表的な骨代謝マーカーとして知られており、実際に血中の骨形成の指標とされている。BGP 遺伝子の KO マウスの表現型では、石灰化異常を伴う顕著な骨量増加が報告されている。また、BGP は名前の通りビタミンK依存性  $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化標的タンパクであり、プロセッシングおよびグラ化修飾を受けて本来の機能を発揮すると考えられる。最近の3次元の立体構造解析の結果から、骨において BGP は、ビタミンK依存性  $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化修飾を受けて、ハイドロキシアパタイトとカルシウムと強固に結合するモデルが報告されている。

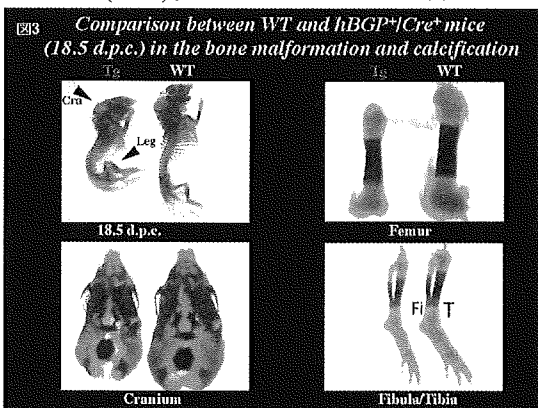
BGP の骨代謝における役割を検討するために、ヒト BGP cDNA を単離し、Cre/loxP系を利用して、コンディショナルに Gain of function できる遺伝子改変マウスを作製した。Cre 処理前では、GFP をレポーター遺伝子として発現しており、Cre 処理後では GFP が除去され BGP が強制発現される系である(図1)。骨芽細



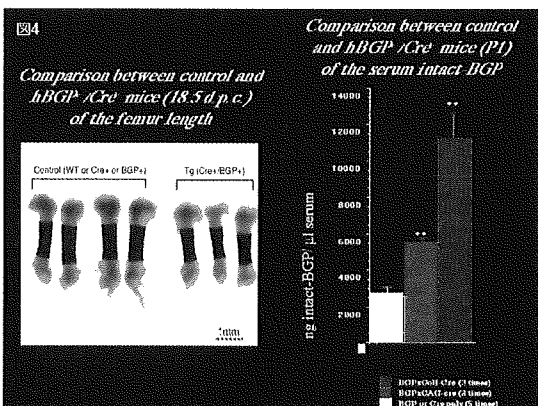
胞系譜で発現のあるコラーゲンタイプIプロモーター支配下に Cre を発現し、BGP を強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して、生体における BGPの骨代謝への作用について解析を行った(図2)。BGPを過剰発現した結果、マウス胎生後期から骨組織において石灰化異常が観察された、特に大腿骨、



頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形成が見られた(図3)。上記交配により得られた

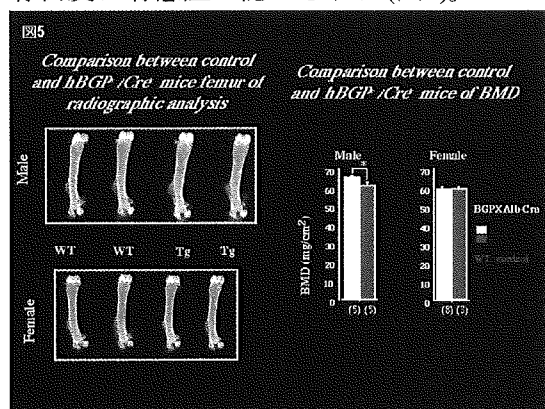


BGP を過剰発現するマウスは、ほとんどが出産後1日目—2日目で致死となることを明らかにした。これら出産後1日目—2日目のマウス胎児から血清を集め、血清中のヒト BGP 量を測定した結果、これらのマウスで有意に高い intrac-BGP 値を示した(図4)。しかし、生後直後に致



死となるため、骨代謝における作用を検討することは、問題点として考えられた。

それ故、これらの問題点を改善するために、BGPが血中分泌型タンパクであることに着目し、肝臓特異的に遺伝子を発現可能なアルブミンプロモーター支配下にCreを発現するTgマウスと交配することにより、成熟マウス個体を得ることが可能であった。現在、これらのマウスを利用して、血中ヒトBGP量と骨代謝作用の解析に着手し始めた。個体数と再現性の観点からさらに検討する必要があるが、骨密度に有意差が認められた(図5)。

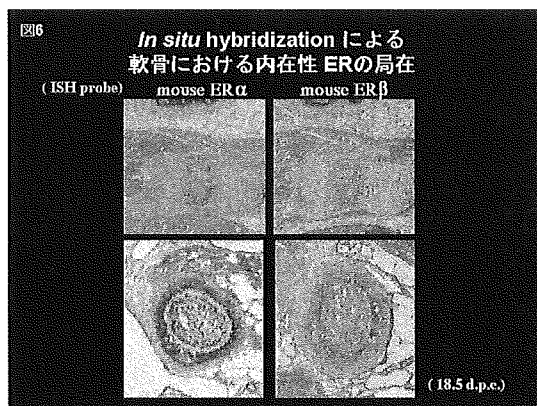


## 2. ER $\alpha$ および ER $\beta$ のシグナルと変形性関節症

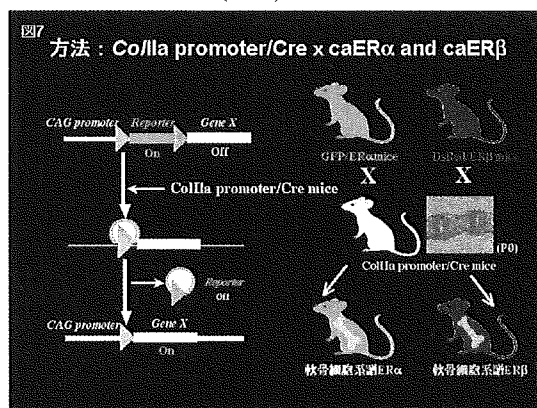
エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨代謝における作用については、選択的に ER  $\alpha$  または ER  $\beta$  シグナルを Gain of function することが可能な、cTg マウスの作製を行い、骨組織で ER  $\alpha$  または ER  $\beta$  を過剰発現可能な系を確立した。変形性関節症は、閉経後女性において多く発症しエストロゲン欠乏との関与が推測されているが、その病態メカニズムは未だ明確ではない。それ故、本年度は特に、エストロゲンシグナルと軟骨作用および変形性関節症との関係について、その病態メカニズムの解明を目指すテーマに焦点を絞って研究を遂行した。多くの変形性関節症を呈するマウスモデルは、II型コラーゲンの変異が原因で起こることが知られている。

第1に、軟骨とエストロゲンシグナルの作用について検討した。マウスの内在性の ER  $\alpha$  および ER  $\beta$  は、発生初期の肥

大軟骨で発現していることを見いだした(図6)。エストロゲンの作用としては、性



成熟期や二次性徴段階の骨の成長や骨端線閉鎖に生理的な作用があると想定される。本研究では、軟骨、特にタイプIIコラーゲンとエストロゲンシグナルの作用について検討するために、コラーゲンタイプII (ColII) -Cre マウスとcTg マウスの交配を行った(図7)。現在まだ統計的処



理が可能な数ではないが、独立したTgマウスラインから、同じ成長不全を伴う表現型が得られていることより、骨長の制御や骨の成長に作用していることは明らかと考えられる。また、骨組織での表現型の解析を行った結果、3週齢幼若マウスの軟骨成長盤での短縮が観察され、骨端線閉鎖(軟骨成長盤の消失)と骨長への作用の可能性が示唆された。さらに、大腿骨と頸骨の関節腔の滑膜領域において解析を進めている。

## D. 考察

ビタミンKおよびエストロゲン受容体

に関連した遺伝子に関して、それぞれの遺伝子をマウス個体で過剰発現した場合、胎生期において骨代謝に影響がでることが想定され、骨代謝研究に制限があり、マウスをライン化することすら困難と考えられたが、cTgマウスにすることにより、胎生期以降の骨代謝研究にも応用できることが示唆された。したがって、閉経後ならびに老人性骨粗鬆症・変形性関節症疾患の疾患モデルマウスの開発を目指す本研究課題の目的に合致しており、今後如何に生体内の骨組織において時期・組織特異的な関連遺伝子群のGain/Loss of functionを行うかが、今後の研究課題の鍵となると考えられる。すなわち、それぞれのシグナルが本来持つ生理機能を解明するために、骨組織特異的にビタミンK・エストロゲンシグナルを過剰発現、または異所性発現させることが必要である。さらにこれらの研究を進展させるためには、マウス個体において、より厳密に組換え酵素 Cre を発現させる研究資材が必要であり、骨芽細胞系または破骨細胞系のみで発現できる遺伝子改変マウスの作製も将来的な研究課題として重要と考えられる。ビタミンKに関しては、疾患モデルマウスの作製、その受容体の同定やグラ化標的タンパクの同定・解析を中心に研究を進めることにより、骨代謝におけるビタミンKの必要性やその作用機序を明確にすることにより、老人性骨粗鬆症の新しい作用メカニズムや創薬および治療法の開発の鍵と考えられる。

エストロゲンシグナルに関しては、閉経後女性において変形性関節症が多く発症することから、エストロゲン欠乏との関与が推測されているが、その病態メカニズムは未だ明確ではない。多くの変形性関節症のモデルマウスでは、コラーゲンII型の変異、細胞外マトリックスの変異、およびコラーゲン分子の分解に関与する因子により引き起こされることが報

告されている。つまり、変形性関節症の1つの原因として膝関節等においてコラーゲン分子および細胞外マトリックスの枯渇や異常により引き起こされると考えられる。それ故、軟骨におけるエストロゲンシグナルの作用機序の解明、シグナル特異性の検討、下流応答遺伝子群の遺伝子改変マウスの骨代謝における作用の解析を中心に行うことが重要と考えられる。また、ヒトと違い齧歯類では骨端線閉鎖はほとんど起こらないが、未成熟個体においてエストロゲンを付加すると、未成熟の骨において骨端線閉鎖が亢進することが報告されている。リガンド非依存的に活性型エストロゲンレセプターを過剰発現するトランスジェニックマウスを使用して、分子レベルで直接エストロゲンシグナルが軟骨に直接作用することが考えられた。本研究により、エストロゲンシグナルの軟骨作用に関して、二次性徴にともなう骨長の制御、骨端線閉鎖、および変形性関節症に関与する可能性が示唆された。

## E. 結論

BGP cTgマウスにおける骨代謝の解析を行った結果、コラーゲンタイプIプロモーター(Coll)-Creにより骨芽細胞特異的に、コラーゲンタイプIIプロモーター(Coll)-Creにより骨芽細胞特異的にBGPを過剰に発現させた場合、マウス胎生後期から軟骨組織において石灰化の遅延する傾向が見られ、これらのマウスから得られた仔マウスでは出産後に生存することが困難と示唆された。成熟マウス個体においてBGPを過剰に発現した場合、骨代謝および石灰化に影響を与えることが示唆された。

エストロゲンシグナルと軟骨作用に関しては、さらに詳細な解析が必要だが、エストロゲンシグナルにより、大腿骨と頸骨間の滑膜領域に変化を観察している。エストロゲンシグナルの異所的な過剰発

現により、軟骨細胞・細胞外マトリックスへの影響少が考えられる。また、対照区と比較し骨長の短縮および軟骨成長盤領域の減少が見られることから、エストロゲンシグナルが軟骨成長盤に作用して、骨長制御および軟骨分化・増殖に関与することが示唆された。

## F. 発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S: Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 11: 6148-6154, 2005.
2. Imazawa Y, Hisatake K, Mitsuzawa H, Matsumoto M, Tsukui T, Nakagawa K, Nakadai T, Shimada M, Ishihama A, Nogi Y. The fission yeast protein Ker1p is an ortholog of RNA polymerase I subunit A14 in *Saccharomyces cerevisiae* and is required for stable association of Rrn3p and RPA21 in RNA polymerase I. *J Biol Chem* 280: 11467-11474, 2005.

### 2. 学会発表

#### 【国内学会】

1. 今澤由紀子、津久井通、井上聡：選択的エストロゲンシグナルの骨代謝における作用：II型コラーゲンプロモーターを利用したER $\alpha$ およびER $\beta$ コンディショナルトランスジェニックマウスの解析 (2005.7.21-23) 第23回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
2. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、栗原真紀、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ER $\alpha$ ・ER $\beta$ の解析 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
3. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、井上聡：オステオカルシンを異所性に発現させたコンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝および石灰化作用の解析 (2006.2.18) 第9回Vitamin K & Aging研究会 (東京)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

IV-	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1	Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxigenase ALOX15 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density.	<i>J Bone Miner Metab</i>	23	226-230	2005
6	Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, <u>Inoue S</u>	Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma.	<i>Cancer Res</i>	65	3700-3706	2005
13	Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, <u>Inoue S</u>	Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer.	<i>Clin Cancer Res</i>	11	6148-6154	2005
20	Sudo Y, Ezura Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, <u>Inoue S</u> , Shiraki M, Ito H, Emi M	Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the pro-opiomelanocortin gene (POMC) with low bone mineral density in adult women.	<i>J Hum Genet</i>	50	235-240	2005
26	Sakuma M, Akahira JI, Suzuki T, <u>Inoue S</u> , Ito K, Moriya T, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N	Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer.	<i>Gynecol Oncol</i>	99	664-670	2005
33	Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, <u>Inoue S</u> , Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Mario M	Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling.	<i>J Cell Physiol</i>	203	193-201	2005
42	Asaoka K, Ikeda K, Hishinuma T, Horie-Inoue K, Takeda S, <u>Inoue S</u>	A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	338	1950-1956	2005
49	Ito K, Suzuki T, Akahira J, Sakuma M, Saitou S, Okamoto S, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H, <u>Inoue S</u>	14-3-3 sigma in endometrial cancer - A possible prognostic marker in early stage cancer -.	<i>Clin Cancer Res</i>	11	7384-7391	2005
57	Ikeda K, <u>Inoue S</u> , Muramatsu M	RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation.	<i>Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function.</i>		106-113	2005



65	Azuma K, Tanaka M, Uekita T, <u>Inoue S</u> , Yokota J, Ouchi Y, <u>Sakai R</u>	Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma.	<i>Oncogene</i>	24	4754-4764	2005
76	Aoki T, Imamura H, Makuuchi M, <u>Inoue S</u>	Immunohistochemical detection of EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma.	<b>Handbook of Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas Vol. 3. Molecular genetics, liver carcinoma, and pancreatic carcinoma</b>	3	261-268	2005
84	Horie-Inoue K, Takayama K, Bono H, Ouchi Y, Okazaki Y, <u>Inoue S</u>	Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	339	99-106	2006
92	Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	in press		
103	Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, <u>Inoue S</u> , Shiraki M, Emi M	Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women.	<i>Bone</i>	in press		
120	Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women.	<i>Spine</i>	in press		
132	Masuihiro Y, Mezaki Y, Sakari M, Takeyama K, Yoshida T, Inoue K, Yanagisawa J, Hanazawa S, O'Malley BW, <u>Kato S</u>	Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	102	8126-8131	2005
138	Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, <u>Kato S</u> , Isshiki M, Fujita T, Masuda H, Kobayashi M, Kawamura K, Kamiya A, Ando J	Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice.	<i>Nature Medicine</i>	12	133-137	2006

143	Fujiki R, Kim M, Sasaki Y, Yoshimura K, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones.	<i>EMBO J</i>	24	3881-3894	2005
157	Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, <u>Kato S</u> , Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N	Circulating FGF-23 is regulated by 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 and phosphorus <i>in vivo</i> .	<i>J Biol Chem</i>	280	2543-2549	2005
164	Yamamoto K, Uchida E, Urushino N, Sakaki T, Kagawa N, Sawada N, Kamakura M, <u>Kato S</u> , Inouye K, Yamada S	Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D3 whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I.	<i>J Biol Chem</i>	280	30511-30516	2005
170	Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Kuwahata M, Saito H, Fukushima N, <u>Kato S</u> , Kanayama H, Miyamoto K	Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism.	<i>Biochem J</i>	390	325-331	2005
177	Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, <u>Kato S</u>	Study of androgen receptor functions by genetic models.	<i>J Biochem</i>	138	105-110	2005
183	Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, <u>Kato S</u>	Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	103	224-229	2005
189	Miyake I, Hakomori Y, Misu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, <u>Sakai R</u>	Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells.	<i>Oncogene</i>	24	3206-3215	2005
199	Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, <u>Sakai R</u>	Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma.	<i>Am J Pathol</i>	167	213-222	2005
209	Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, <u>Sakai R</u> , Mori N	Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor.	<i>J Neurosci</i>	25	1826-2835	2005
219	Seo S, Asai T, Saito T, Suzuki T, Morishita Y, Nakamoto T, Ichikawa M, Yamamoto G, Kawazu M, Yamagata T, <u>Sakai R</u> , Mitani K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H	Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance.	<i>J Immunol</i>	175	3492-3501	2005
229	Tanaka M, Kamata R, <u>Sakai R</u>	Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contract formation.	<i>EMBO J</i>	24	3700-3711	2005

241	Tanaka M, Kamata R, <u>Sakai R</u>	EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of clauden-4 and mediates paracellular permeability.	<i>J Biol Chem</i>	280	42375-42382	2005
249	Imazawa Y, Hisatake K, Mitsuzawa H, Matsumoto M, <u>Tsukui T</u> , Nakagawa K, Nakadai T, Shimada M, Ishihama A, Nogi Y.	The fission yeast protein Ker1p is an ortholog of RNA polymerase I subunit A14 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and is required for stable association of Rrn3p and RPA21 in RNA polymerase I.	<i>J Biol Chem</i>	280	11467-11474	2005

刊行物の別刷