

progenitors. **BONE** 37(6): 842-849, 2005.

2. Hironobu Shibata, Masahiro Abe, Kenji Hiura, Javier Wilde, Keiji Moriyama, Toshiaki Sano, Ken-ichi Kitazoe, Toshihiro Hashimoto, Shuji Ozaki, Shingo Wakatsuki, Shinsuke Kido, Daisuke Inoue and Toshio Matsumoto. Malignant B-lymphoid cells with bone lesions express RANK ligand and VEGF to enhance osteoclastogenesis.

**Clin Cancer Res** 11(17): 6109-6115, 2005.

3. Takashi Oshima, Masahiro Abe, Jin Asano, Tomoko Hara, Kenichi Kitazoe, Etsuko Sekimoto, Yoichi Tanaka, Hironobu Shibata, Toshihiro Hashimoto, Shuji Ozaki, Shinsuke Kido, Daisuke Inoue, Toshio Matsumoto. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. **Blood** 106(9): 3160-3165, 2005.

4. 井上大輔、松本俊夫：副甲状腺および骨・カルシウム代謝。Annual review 2005 内分泌、代謝（中外医学社）。：211-214, 2005.

## 2. 学会発表

1. 第78回日本内分泌学会学術総会  
(7/1-3/2005、東京)

グルココルチコイド過剰における骨形成低下の機序：AP-1 転写因子とその標的遺伝子の役割。シンポジウム12 グルココルチコイドと骨粗鬆症

伊藤祐司、木戸慎介、井上大輔、松本俊夫

2. 第78回日本内分泌学会学術総会

(7/1-3/2005、東京)

ラロキシフェンの骨髄間質細胞の分化におよぼす影響

林勉、木戸慎介、井上大輔、石川敏夫、岡崎亮

3. 第23回日本骨代謝学会学術集会  
(7/21-23/2005、大阪)

骨髄腫細胞、破骨細胞と血管内皮細胞の細胞間相互作用：腫瘍進展、骨破壊と血管新生の促進。

田中洋一、安倍正裕、日浅雅博、橋本年弘、木戸慎介、井上大輔、尾崎修治、森山啓司、松本俊夫

4. 第23回日本骨代謝学会学術集会  
(7/21-23/2005、大阪)

$\gamma$   $\delta$  T細胞の骨髄腫骨髄微少環境に及ぼす影響：骨吸収抑制および抗腫瘍活性の誘導

柴田泰伸、安倍正博、原朋子、橋本年弘、大島隆志、田中洋一、木戸慎介、井上大輔、尾崎修治、松本俊夫

5. 第23回日本骨代謝学会学術集会  
(7/21-23/2005、大阪)

骨髄腫由来 MIP-1 による単球からの破骨細胞分化の誘導と樹状細胞分化の抑制

橋本年弘、安倍正博、田中洋一、尾崎修治、木戸慎介、井上大輔、松本俊夫

6. 第23回日本骨代謝学会学術集会  
(7/21-23/2005、大阪)

破骨細胞と血管内皮細胞の細胞間相互作用：腫瘍進展、骨破壊と血管新生の促進

田中洋一、安倍正博、日浅雅博、橋本年弘、木戸慎介、井上大輔、尾崎修治、森

山啓司、松本俊夫

H. 知的所有権の出願・取得状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

血清カルシウム維持機構-  
ビタミンD受容体およびカルシウム感知受容体に関する研究

分担研究者 大菌 恵一 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学小児科学講座 教授

研究要旨：

血清カルシウム維持機構の解明の一端として、ビタミンD受容体(VDR)の核移行メカニズムの検討を行なった。VDRのリガンド非依存性核移行は importin 4 によることを見出し、原著論文として採択された。VDRは、核孔の構成分子である NUP214 と相互作用をすることを見出したが、この蛋白質を強制発現すると、VDR依存性のみならず、非依存性の転写活性も減少した。また、カルシウム感知受容体(CaSR)は、副甲状腺の過形成にも関わる可能性が報告されている。CaSRシグナルの標的遺伝子を探索するために、変異型CaSR(C129S)を恒常的に発現するHEK293細胞を樹立した。野生型CaSRを発現させた細胞との遺伝子発現の違いをDNAチップにより検討し、有意に発現が亢進している遺伝子群を同定した。

1. ビタミンD受容体(VDR)の核移行を担う分子の探索

A. 研究目的

我々は、VDRの一次構造中に核移行シグナル(NLS)様の配列が存在することを見出し、これが実際にNLSとして機能し得ることを明らかにしてきた(J Biol Chem 274: 33531, 1999)。VDRはリガンド依存性転写因子であり、その機能は核内において発揮されることから、VDRの核移行はビタミンDの作用発現において極めて重要なステップであると位置付けられる。ビタミンD依存症II型(VDDR II)は、VDRの機能異常によってもたらされる疾患であり、従来、患者の線維芽細胞を用いた検討などからDNA結合、ホルモン結

合、核局在に異常のある型に分類されていた。VDRのcDNAがクローニングされ、DNA結合及びホルモン結合の異常は実際にVDR遺伝子の変異として同定されたが、核局在異常をきたす遺伝子変異については依然不明である。従って、VDRの核局在を担う蛋白質を同定することは、VDDR IIの病態解析を行う上で必要である。そこで、VDRの核移行を担う分子の同定および核移行の分子機構の解析を試みた。

B. 研究方法（および前年度までの結果）

Yeast two-hybrid systemによりVDRと相互作用する分子のスクリーニング

を行った。同定された分子が、実際に VDR を核移行させる活性があるか否かについては、*in vitro* nuclear transport assay (ジギトニン処理により調製した透過性形質膜と正常な核を有するセミインタクト細胞に組換え蛋白質や細胞抽出液を添加することにより *in vitro* で核移行を再構成する実験系) を用いて検討した。全長あるいは欠失変異型 VDR リコンビナント精製標品と別途 HeLa 細胞より調製した細胞質画分、および ATP を本 assay 系に加え、VDR の核移行の有無を解析した。また、リガンド添加の影響についても検討した。さらに、同定された分子が VDR の転写活性化能に及ぼす影響について、VDR 応答配列を有する reporter assay により検討した。

### C. 研究結果

Yeast two-hybrid 法により同定された分子の一つである importin 4 の VDR との相互作用を、GST-pull down 法により確認した。また、*in vitro* nuclear transport assay により importin 4 が VDR のリガンド非依存性核移行を担う事が明らかとなった。また、DNA 結合領域を欠く変異型 VDR は、リガンド非存在下では核に移行しなかったが、リガンド依存性の核移行を示した。

また、核孔の構成分子である NUP214 が VDR と相互作用をすることを見出したが、この蛋白質を強制発現すると、VDR 依存性のみならず、非依存性の転写活性化を抑制した。

### D. 考察

VDR 内に核移行を担う領域が複数あること、ひとつは DNA 結合領域にありリガンド非依存性に核移行を担い、他方は DNA 結合領域よりも C 端側にありリガンド依存性の核移行を担うことを明らかにした。Importin 4 は VDR のリガンド非依存性核移行を担う分子であり、多くの核局在分子の核移行に関わる importin b は VDR を核に移行させる能力がないことが示された。

NUP214 の VDR 機能阻害効果についてはさらに検討する必要があるが、ビタミン D が関わる白血病細胞の分化などにも関与する可能性がある。

### E. 結論

VDR の核移行を担うタンパク質を同定・解析することにより、ビタミン D 作用受容機構異常症の病態への関与を検討できると考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. Miyauchi Y, Michigami T, Sakaguchi N, Sekimoto T, Yoneda Y, Pike JW, Yamagata M, Ozono K. *J Biol Chem.* 280(49):40901-40908, 2005

#### 2. 学会発表

今年度はなし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

### 2. 常染色体優性低カルシウム血症におけるカルシウム感知受容体の異常に関する研究

#### A. 研究目的

常染色体優性低カルシウム血症 (ADH) は、カルシウム感知受容体 (CaSR) の機能亢進によって起こる遺伝性疾患である。責任遺伝子の同定により、特発性副甲状腺機能低下症と鑑別可能となり、早期より確定診断されるようになったが、報告された症例数はまだ少ない。また、一般的に特発性副甲状腺機能低下症に対しては活性型ビタミン D の投与が行われるが、本症では高 Ca 尿症、尿路結石をきたしやすく、ビタミン D の投与は避けるべきであると考えられている。しかし、実際、テタニーをきたすほどの低 Ca 血症の時もあり、治療法については確立していない。引き続き、本症の遺伝子解析、臨床的特徴、治療法の検討を行う。また、CaSR 以後のシグナルが副甲状腺細胞の増殖分化に関わるとの報告もあり、その機序を解明する必要がある。

また、近年、CaSR に対する自己抗体により、CaSR の機能異常が引き起こされることが、副甲状腺機能異常症の原因として注目されている。分担者らは、選択的 IgA 欠損症にバセドウ病、副甲状腺機能低下症を合併した症例について、副甲状腺機能低下症の原因として CaSR に対する抗体産生が原因かどうかを検討することとした。

#### B. 研究方法

常染色体優性低 Ca 血症 (ADH) が疑われる患者の CaSR 遺伝子変異検索を行なうとともに臨床的特徴、治療法について検討を行なう。遺伝子診断にあたっては施設の承認を得た上で informed consent を得て行う。我々がこれまでに解析した 4 家系において同定された 4 つの変異を有する変異型 CaSR (C129S, S122P, E228K, E799K) を恒常的に発現する HEK293 細胞を樹立し、その機能異常について解析する。このうち C129S 変異 CaSR を恒常的に発現する細胞株をすでに樹立し (Hirai, H. et al. J Hum Genet 46: 41-44, 2001)、この細胞株を用いた CaSR の機能解析により、C129S 変異が恒常的に機能亢進していることを確認している。野生型あるいは C129S 変異 CaSR を恒常的に発現している HEK293 細胞より mRNA を抽出し、DNA チップ法 (IntelliGene Human 3K chip、タカラバイオ) により両者の遺伝子発現を比較した。

#### C. 研究結果

DNA チップを用いた遺伝子発現解析から、C129S 発現細胞に強く発現している遺伝子が複数同定されたが、そのうちの一つはグルタミン酸受容体の一種である N-Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA) receptor であった。この受容体は細胞内カルシウム濃度の調節に関与している可能性が強いため、現在さらに確認を行っている。

また、自己抗体の関与について検討するため、野生型 CaSR を強発現させた HEK293 細胞

と正常対照および患者血清を用いて、細胞組織化学的に結合を検出する条件設定を行っている。

#### D. 考察

CaSR は、PTH の分泌に関与するのみならず副甲状腺の過形成に関与する可能性が指摘されている。その機序を検討する手始めとして、機能獲得型変異 CaSR の下流の遺伝子をスクリーニングし、複数の遺伝子の発現上昇を認めた。今後は、その機能を検討する予定である。

#### E. 結論

CaSR が関与する副甲状腺の機能異常症の発症機序は多様性に富み、その機序をさらに検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

本プロジェクトに関する論文はなし。他の Ca 骨代謝関連の論文は別紙記載。

##### 2. 学会発表

#### H. 知的所有権の取得状況

特になし。

## ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明

分担研究者 加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所・教授

### 研究要旨

ビタミン D 受容体 (VDR) を介したリガンド依存的な転写抑制機構に関しては、リガンド依存的な転写活性化機構と比較して依然として不明な点が多い。特に転写抑制に係する因子群の実態は未知である。そこで本研究では、ビタミン D31 $\alpha$  水酸化酵素遺伝子のリガンド依存的な転写抑制機構を題材として、我々が同定した新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC による転写抑制機構の解明をクロマチン構造調節の観点から試みた。その結果、WINAC 複合体はアセチル化修飾されたクロマチン構造を特異的に認識し、リガンド未結合状態の VDR をプロモーター領域に呼び込む働きがあることを見出した。生体内ではこの機構を介することによって、本遺伝子のネガティブフィードバック機構を円滑に進めていると考えられた。

### A. 研究目的

ビタミン D はカルシウム代謝の主要制御ホルモンであり、その生理的重要性については広く認められており、更にビタミン D 剤は臨床的にも汎用されている。ビタミン D の作用機構はその核内レセプター (VDR) を介して発揮されることが知られているものの、VDR による転写制御の分子機構や VDR 発現組織での特異的高次機能について不明な点が多い。特に標的遺伝子の発現を負に制御する機構は未知である。

そこで本研究では、VDR による転写制御を担う共役因子或いは共役因子複合体群を同定、機能解析を行った。特に当研究室で単離したビタミン D 生合成の鍵酵素であるビタミン D<sub>3</sub>1 $\alpha$  水酸化酵素 (1 $\alpha$

(OH)ase) 遺伝子のプロモーター上に負の応答領域(1 $\alpha$ -nVDRE)に着目し、解析を行った。

### B. 研究方法

VDR による転写抑制の分子機構を明らかにする目的で、以下の実験を行った。

WINAC 複合体と VDIR の複合体の 1 $\alpha$ , 25(OH)2D<sub>3</sub> 依存的な転写抑制における機能解析のため、以下の検討を行った。全ての解析は 1 $\alpha$ , 25(OH)2D<sub>3</sub> による抑制が見られるマウス腎臓近位尿細管細胞である MCT 細胞を用いる。

1) ルシフェラーゼ(LUC)法で、VDIR や WINAC 複合体の主要因子である WSTF がそれぞれ存在する時、両方存在する時に 1 $\alpha$ , 25(OH)2D<sub>3</sub> による転写抑制に及ぼす影

響を検討する。

2) 免疫沈降法により、WINAC 複合体の主要構成因子 WSTF タンパクと VDIR のリガンド依存的な複合体形成能について検討する。

3) GST pull-down 法から、WSTF タンパクと VDIR と直接結合能について検討する。

4) ABCD assay より、in vitro において、 $1\alpha$  (OH)ase 遺伝子プロモーター領域における WINAC 複合体が E-box 上でリクルートされるか否かを検討する。

5) クロマチン免疫沈降法 (CHIP) を用いて、WSTF、VDIR、VDR、HDAC、NCoR が  $1\alpha$ , 25(OH)2D<sub>3</sub> 存在下において  $1\alpha$  (OH)ase 遺伝子プロモーター上への複合体形成能を調べる。

一方、VDR の骨組織での機能を明らかにする目的で、骨細胞種特異的な VDR 欠損マウスの作出を行い、その骨変異を解析する。具体的には、破骨細胞特異的に Cre を発現するノックインマウスを、カテプシン K 遺伝子を利用することで、作出に成功した。現在、そのマウスと Floxed VDR マウスを掛け合わせている。同様のアプローチにより、骨芽細胞特異的に VDR を欠損したマウスでは、予想に反し骨量増加を認めた。そこで、その骨量増加が何に起因するかを明確にする目的で、骨代謝及び内分泌系について詳細に検討する。

### C. 研究結果および考察

$1\alpha$ -nVDRE を用いたレポーターアッセイの結果、WINAC 複合体主要構成因子である WSTF は、ビタミン D による転写抑制に対して VDIR と協調的に働くことが明らかとなった。これは免疫沈降法、および

GST pull-down 法を用いて VDIR と WSTF が、VDR を介することによって、リガンド依存的に結合することからも支持された。しかしながら、ChIP 法による解析の結果では、HDAC コリプレッサー複合体の  $1\alpha$  (OH)ase 遺伝子プロモーター上への結合はビタミン D 依存的であるにもかかわらず、VDR、WSTF はプロモーター上にリガンド非依存的に結合することが明らかとなった。この矛盾を解明するため、DNA 結合アッセイによって、リガンド非存在下における VDR/WSTF のプロモーター上への結合を検討した。その結果、この複合体の結合は DNA 配列を認識したものでなく、WSTF を介したクロマチン結合能によるものであることが判明した。さらに、WSTF がクロマチンと相互作用する領域 (PHD-Bromo 領域) に関し、結合するヒストンを検討した結果、特異的なアセチル化アミノ酸残基を WSTF が認識する事でビタミン D 依存的な転写活性抑制が生じる事を見出した (Fujiki et al., EMBO J. 2006)。また破骨細胞特異的 VDR KO マウスに関しては、現在掛け合わせ中である。

### D. 結論

以上の結果から、VDR を介したリガンド依存的転写抑制機構は、周辺の染色体構造調節を介して行われており、WINAC 複合体は、その機構に中心的な役割を果たすことが今回明らかとなった。更に WSTF のアセチル化ヒストンへの選択的な結合能が、ビタミン D 依存的な転写活性抑制に必要である事を見出した。



E. 研究発表

1. 論文発表

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., Kato, S.: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 224-229, 2006.

Oishi, H., Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J. Biol. Chem.*, **281**, 20-26, 2006.

Masuhira, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley, B. W., Kato, S.: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8126-8131, 2005.

Fujiki, R., Kim, M., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J.*, **24**, 3881-3894, 2005.

Ogawa, S., Oishi, H., Mezaki, Y., Kouzu-Fujita, M., Matsuyama, R., Nakagomi, M., Mori, E., Murayama, E., Nagasawa, H., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: Repressive domain of unliganded human estrogen receptor associates with Hsc70. *Genes to Cells*, **10**, 1095-1102, 2005.

Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito S., Taniguchi N., Suzuki E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J. Pharm. Experim. Therapeutics*, **315**, 545-552, 2005.

Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2236-2239, 2005.

Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 933-938, 2005.

Takada, I., Suzawa M., Kato, S.: Nuclear receptors as targets for drug

- development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 184-189, 2005.
- Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., Kato, S.: Study of androgen receptor functions by genetic models. *J. Biochem.*, **138**, 105-110, 2005.
- Kato, S., Sato, T., Watanabe, T., Takemasa, S., Masuhiro, Y., Ohtake, F., Matsumoto, T.: Function of nuclear sex hormone receptors in gene regulation. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **56** (Supple. 7), 4-9, 2005.
- Kambayashi H., Odake Y., Takada K., Funasaka Y., Ichihashi M., Kato S.: N-retinoyl-D-glucosamine, a new retinoic acid agonist, mediates topical retinoid efficacy with no irritation on photoaged skin. *Br. J. Dermatol.*, **153**, 30-36, 2005.
- Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., Okano, T.:  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 429-440, 2005.
- Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C. A., Bacic, D., Kato, S., Uchiyama, Y., St-Arnaud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and  $1\alpha$ -OHase deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **288**, C429-C434, 2005.
- Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br. J. Dermatol.*, **152**, 231-241, 2005.
- Wada-Hiraike, O., Yano, T., Nei, T., Matsumoto, Y., Nagasaka, K., Takizawa, S., Oishi, H., Arimoto, T., Nakagawa, S., Yasugi, T., Kato, S., Taketani, Y.: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor  $\alpha$ . *Br. J. Cancer*, **92**, 2286-2291, 2005.
- Fan, W., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Sato, T., Kawano, H., Kato, S., Nawata, H.: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*, **54**, 1000-1008, 2005.
- Saito, H., Maeda, A., Ohtomo, S., Hirata, M., Kusano, K., Kato, S., Ogata,

- E., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima N.: Circulating FGF-23 is regulated by 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phosphorus *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2543-2549, 2005.
- Bando, T., Sekine, K., Kobayashi, S., M. Watabe, A., Rump, A., Tanaka, M., Suda, Y., Kato, S., Morikawa, Y., Manabe, T., Miyajima, A.: Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 4166-4175, 2005.
- Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N., Okano, T.: 22-Oxa-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 1044-1054, 2005.
- Kallay, E., Bises, G., Bajna, E., Bieglmayer, C., Gerdenitsch, W., Steffan, I., Kato, S., Armbrrecht, H. J., Cross, H. S.: Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases—a possible approach for tumor prevention. *Carcinogenesis*, **26**, 1581-1589, 2005.
- Yamamoto, K., Uchida, E., Urushino, N., Sakaki, T., Kagawa, N., Sawada, N., Kamakura, M., Kato, S., Inouye, K., Yamada, S.: Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I. *J. Biol. Chem.*, **280**, 30511-30516, 2005.
- Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Masuda, H., Kobayashi, M., Kawamura, K., Kamiya, A., Ando, J.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X<sub>4</sub>-deficient mice. *Nature Medicine*, **12**, 133-137, 2005.
- Inoue, Y., Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Kusano, K., Kawakami, E., Furutani, J., Ito, M., Kuwahata, M., Saito, H., Fukushima, N., Kato, S., Kanayama, H., Miyamoto, K.: Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem. J.*, **390**, 325-331, 2005.
- Ikeda, Y., Aihara, K., Sato, T., Akaike, M., Yoshizumi, M., Suzaki, Y., Izawa, Y., Fujimura, M., Hashizume, S., Kato, M., Yagi, S., Tamaki, T., Kawano, H., Matsumoto, T., Azuma, H., Kato, S., Matsumoto, T.: Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **280**, 29661-29666, 2005.

## 2. 学会発表

### 第28回日本分子生物学会

クロマチン構造を介したエクダイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究

沢津橋 俊、武山 健一、伊藤 紗弥、鈴木 絵里子、田辺 真彦、趙 越、山形 薫、城出 裕子、多羽田 哲也、加藤 茂明

選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 結合エストロゲン受容体転写制御機構の解析

目崎 喜弘、神津 円、高田 伊知郎、北川 浩史、加藤 茂明

クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析

大矢 博之、藤木 亮次、吉村 公宏、目崎 喜弘、北川 浩史、高田 伊知郎、加藤 茂明

ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する

五十嵐 庸、過足 芳子、三原 正朋、高田 伊知郎、北川 浩史、加藤 茂明

ユビキチン化を介したダイオキシン受容体のエストロゲン・シグナル制御

大竹 史明、馬場 敦史、藤井 義明、加藤 茂明

新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC を介した、リガンド依存性ビタミンDレセプター転写抑制機構の解明

藤木 亮次、金 美善、佐々木 康匡、吉村 公宏、北川 浩史、加藤 茂明

ERαの細胞周期依存的なERαの機能解析

岡田 麻衣子、竹沢 慎一郎、目崎 喜弘、高田 伊知郎、北川 浩史、加藤 茂明

ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析

盛 真友、松本 高広、秋本 千央、加藤 茂明

WSTF(Williams syndrome transcription factor)は移動後の神経堤細胞と心臓の発生に必須である

吉村 公宏、北川 浩史、竹沢 慎一郎、高田 伊知郎、古谷 善幸、八木 寿人、福田 亨、山本 陽子、渡辺 智之、中村 貴、椎名 博子、宮本 純子、田中 佐依子、松本 高広、松岡 瑠美子、加藤 茂明

### 日本農芸化学会 2005 年度大会

ERαの細胞周期依存的機能の解析

岡田 麻衣子、竹沢 慎一郎、目崎 喜弘、高田 伊知郎、加藤 茂明

ポリグルタミン鎖伸長異常アンドロゲンレセプターによって引き起こされる神経変性はRb/E2F-1 転写調節機能の抑制化により回復する

鈴木 絵里子、武山 健一、伊藤 紗弥、沢津橋 俊、城出 裕子、真木 彰郎、山形 薫、趙 越、Alexandr Kouzmenko、相垣 敏郎、多羽田 哲也、加藤 茂明

ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析

盛 真友、松本 高広、秋本 千央、加藤 茂

明

3. その他

なし

分子遺伝学的アプローチによるヒト核内  
レセプター転写共役因子の探索と機能解  
析

武山 健一、伊藤 紗弥、沢津橋 俊、城出  
裕子、鈴木 絵里子、真木 彰郎、趙 越、  
山形 薫、Alexander Kouzmenko、田辺 真  
彦、多羽田 哲也、加藤 茂明

non-canonical Wnt pathway による核内レ  
セプターPPAR $\gamma$  転写抑制機構の解析

高田 伊知郎、須沢 美幸、松本 邦弘、加  
藤 茂明

クロマチンリモデリング複合体 WINAC に  
おけるシグナル依存的調節機構の解析

大矢 博之、藤木 亮次、目崎 喜弘、北川  
浩史、高田 伊知郎、加藤 茂明

*Drosophila* CBP involves in  
transcriptional repression in  
pericentric heterochromatin

Yue Zhao, Ken-ichi Takeyama, Saya Ito,  
Eriko Suzuki, Shun sawatubashi, Yuko  
Shirode, Akio Maki, Kaoru Yamagata,  
Alexander Kouzmenko, Shunsuke Ishii,  
Tetsuya Tabata, Shigeaki Kato

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

リガンド特異的なビタミン D 受容体活性化機構の解析

研究協力者 槇島 誠 日本大学医学部生化学 教授

研究要旨：

ビタミン D 受容機構異常症の分子病態の解明を目的として、活性化ビタミン D<sub>3</sub> の非カルシウム作用の生理的意義および胆汁酸によるビタミン D 受容体 (VDR) 活性化の生理的・病理的意義の解析を行った。VDR のリガンド結合ドメインの変異体に対する活性型ビタミン D<sub>3</sub> とリトコール酸の作用の解析から、リトコール酸の活性には RXR とのヘテロ二量体インターフェースが重要であることを明らかにした。また、膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 阻害活性を有する強心配糖体ブファリンに VDR のリガンド依存性転写誘導活性を増強する作用のあることを見いだした。これらの結果は、新たな VDR の活性化分子機構を示しており、さらに解析することによりビタミン D 受容体機構異常症の病態解明が期待できる。

A. 研究目的

カルシウム代謝の重要な調節因子の一つであるビタミン D 受容体 (VDR) には、活性型ビタミン D<sub>3</sub> と胆汁酸であるリトコール酸の少なくとも 2 種類の生理的リガンドが存在する。活性型ビタミン D<sub>3</sub> の VDR を介するカルシウム代謝調節については多くの研究がなされているが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の非カルシウム調節作用の生理的意義および胆汁酸による VDR 活性化の生理的・病理的意義はほとんど解明されていない。本研究では、活性型ビタミン D<sub>3</sub> と胆汁酸による VDR の活性化機構

の相違点を明らかにして、リガンド特異的な生理機能及び疾病の病態との関連性を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. 活性型ビタミン D<sub>3</sub> と胆汁酸の VDR に対する作用様式の相違を解明するため、VDR のリガンド結合ポケット、コファクター作用ドメイン、VDR とヘテロ二量体を形成する RXR との作用部位などの変異体を作成し、リガンドの効果を検討した。

2. VDR の非カルシウム調節作用の生理的意義を解明するため、活性型ビタミン D3 による骨髄性白血病細胞の分化誘導作用を修飾することが報告されている薬剤のリガンド依存性 VDR 転写誘導活性に対する影響を検討した。

3. 遺伝子組換え実験に関しては、遺伝子組換え生物等規制法に基づく手続きを行い、機関の承認を得た。

### C. 研究結果

1. VDR リガンド結合ポケットを構成する 36 のアミノ酸のうちアラニンではない 34 のアミノ酸をそれぞれアラニンに変異してリガンドに対する反応性を評価した

(alanine scanning mutational analysis)。その結果、S278 がリトコール酸との結合に重要であること、またリトコール酸は側鎖が H12 の方向で、リトコール酸の代謝産物である 3-ケトコラン酸は側鎖が  $\beta$  ターンの方でそれぞれリガンド結合ポケットへ結合していることが確認された。また、ヘテロ二量体インターフェースを構成する R391 の変異体

(R391A および遺伝性くる病で報告されている R391C) において、活性型ビタミン D3 の活性は変化しないが、リトコール酸の活性は消失した。リトコール酸の活性には VDR と RXR との二量体間相互作用が

重要であることが示された。

2. 活性型ビタミン D3 による骨髄性白血病細胞の分化誘導作用を増強することが報告されている強心配糖体ブファリンは、VDR のリガンド依存性転写誘導活性を増強した。ブファリンは、活性型ビタミン D3 およびリトコール酸両方による VDR 転写誘導活性を増強し、活性型ビタミン D3 による VDR 標的遺伝子 CYP24 の発現誘導も増強した。ブファリンは細胞膜を透過しないと報告されており、膜シグナルと VDR との相互作用の存在を示している。

### D. 考察

1. VDR 変異体の解析により、活性型ビタミン D3 とリトコール酸の作用機構が異なることが明らかになった。特に RXR とのヘテロ二量体インターフェースの関連性に相違が見いだされたことから、リガンド特異的な VDR の生理・病態機構の存在が示唆された。

2.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 阻害活性を有する強心配糖体ブファリンに VDR のリガンド依存性誘導活性増強作用を認めた。VDR 欠損マウスにおいて高血圧や心肥大などの循環器系の異常が報告されているが、本研究によって示唆された膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase と VDR の機能関連の循環器系における役割

について、今後の解析が興味深い。膜シグナルと VDR との相互作用について、genomic action と non-genomic action との両方の観点から解析を進めたい。

## E. 結論

活性型ビタミンD3 とリトコール酸とでは VDR に対する作用メカニズムが異なり、特にリトコール酸の活性において VDR の RXR ヘテロ二量体インターフェースが重要であった。強心配当体ブファリンは、VDR のリガンド依存性転写誘導活性を増強した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Makishima, M., and Yamada, S. Targeting the vitamin D receptor: advances in drug discovery. *Expert Opin. Ther. Pat.* 15: 1133-1145, 2005
2. Nakano, H., Matsunawa, M., Yasui, A., Adachi, R., Kawana, K., Shimomura, I., and Makishima, M. Enhancement of ligand-dependent vitamin D receptor transactivation by the cardiotonic steroid bufalin. *Biochem. Pharmacol.* 70: 1479-1486, 2005

3. Yamamoto, K., Abe, D., Yoshimoto, N., Choi, M., Yamagishi, K., Tokiwa, H., Shimizu, M., Makishima, M., and Yamada, S. Vitamin D receptor: ligand recognition and allosteric network. *J. Med. Chem.* 49: 1313-1324, 2006

### 2. 学会発表

1. 榎島誠. 核内レセプターによるコレステロール胆汁酸代謝調節. 食習慣を監視する分子メカニズム (特別講演). 第 91 回日本消化器病学会総会、東京、2005. 4
2. 榎島誠. 胆汁酸によるビタミン D 受容体活性化機構の解析 (シンポジウム: 核内受容体によるホルモン作用の新展開). 第 78 回日本内分泌学会学術総会、東京、2005. 7
3. 榎島誠、川名克芳. コレステロール胆汁酸代謝センサー LXR 及び VDR を標的とする代謝性疾患および悪性腫瘍の新規治療戦略 (シンポジウム: 代謝性疾患克服を目指した核内受容体リガンドの創製). 日本薬学会生物系薬学部会 生体機能と創薬シンポジウム 2005 「疾病に関わる生体分子と治療薬」、広島、2005. 9
4. 松縄学、中野寛之、川名克芳、榎島誠. 強心配糖体ブファリンによるリガンド依存性ビタミン D 受容体転写誘導活性の増



強作用. 日本レチノイド研究会第 16 回学術集会、東京、2005.11

5. 稲葉有香、吉本暢子、川名克芳、榎島誠、清水正人、山田幸子、山本恵子. 新規ビタミンD受容体アンタゴニストの作用発現機構に関する研究. 日本レチノイド研究会第 16 回学術集会、東京、2005.11

6. Yamada, S., Yamamoto, K., and Makishima, M. Vitamin D receptor, ligand recognition and allosteric network: from total alanine scanning mutational analysis of the residues lining the ligand binding pocket of vitamin D receptor. Keystone Symposia. Nuclear Receptors: Orphan Brothers. Banff, Canada, 2006.3.

7. 稲葉有香、吉本暢子、川名克芳、榎島誠、清水正人、山田幸子、山本恵子. ビタミンD受容体合成リガンドの作用発現機構に関する研究. 日本薬学会第 126 年会、仙台、2006.3

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

受容体依存性エンドサイトーシス異常症における  
カルシウム・リン調節機構の解析

研究協力者 道上 敏美 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 環境影響部長

研究要旨：

近位尿細管上皮細胞刷子縁に局在するエンドサイトーシス受容体メガリンの機能を一時的に攪乱することにより、メガリンが、IIa型ナトリウム／リン酸共輸送担体の細胞内局在の制御を介してリン酸再吸収量の調節に関わることを示した。

A. 研究目的

メガリンは、腎近位尿細管上皮細胞に局在する多機能エンドサイトーシス受容体であり、尿細管における25位水酸化ビタミンD(25OHD)の再吸収に関与する。ファンconi症候群やアミノグリコシド系薬物などによる尿細管障害においてはメガリン機能が障害されていると考えられ、25OHDの排泄増加をもたらし、ビタミンD作用不全を引き起こすと考えられる。一方、副甲状腺ホルモン(PTH)もメガリンのリガンドとなることが報告されている。こうした背景から、本研究においては、血清カルシウム・リン調節ホルモンの作用機構におけるメガリン依存性エンドサイトーシスの役割について詳細に解析することを目的とする。今年度はとくに、近位尿細管におけるリン酸再吸収に対するメガリンの関与について検討した。

B. 研究方法

メガリンのリガンドの一つで、他のす

べてのリガンドの結合を阻害するreceptor associated protein (RAP)のリコンビナント蛋白をマウスに投与することにより、メガリン機能を攪乱することを試みた。小胞体保持シグナルを除いて可溶型としたRAPにヒスチジンタグ(His)を付加したリコンビナント蛋白を調製し、マウスの腹腔内に投与後、腎臓の切片を作製し、Hisタグに対する抗体を用いて免疫染色を行い、His-RAPが近位尿細管上皮細胞への取込みを確認した。さらに、His-RAPの投与がメガリンやIIa型ナトリウム／リン酸共輸送担体の細胞内局在やリン酸排泄に及ぼす影響について検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については当該施設（大阪府立母子保健総合医療センター研究所）の動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

可溶型 His-RAP とメガリンとの相互作用

用をリガンドブロットにより確認した後、マウス腹腔内に His-RAP を単回投与(3.5 mg/dose)し、経時的に腎臓の切片を作製して His タグを認識する抗体による免疫染色を行ったところ、投与後 1 時間の時点で His-RAP が近位尿細管上皮細胞の刷子縁下に取り込まれていることが示された。抗メガリン抗体を用いた免疫染色では、His-RAP 投与前には刷子縁にメガリンの強い局在を認めたが、His-RAP 投与 1 時間後の時点では刷子縁下に多数の dot 状の染色を認め、エンドソームに局在していると考えられた。6 時間後の時点ではメガリンはふたたび刷子縁優位の局在を示した。また、IIa 型ナトリウム/リン酸共輸送担体の細胞内局在変化についても検討したところ、His-RAP 投与前には刷子縁に優位に局在していたが、His-RAP 投与 1-2 時間後の時点では、一部細胞内へと内在化していた。この観察結果は、腎皮質の刷子縁画分とそれ以外の画分をサンプルとしたウェスタンブロットにおいても確認された。His-RAP をマウスに連続投与したところ、尿中リン酸排泄の増加を認めた。

#### D. 考察

今回、可溶性 RAP をマウスに投与することにより、メガリン機能の一時的な攪乱を試みた。His-RAP は約 40 kDa の蛋白であり、糸球体でろ過されると予測されたが、実際、His-RAP をマウスの腹腔内に投与したところ近位尿細管での His-RAP の取り込みが確認され、腹腔内に投与された His-RAP が、一旦循環血液中に入り、糸球体でろ過された後に、管腔側からメガリンとの相互作用を介して上皮細胞内に取り込まれたことが示唆された。また、メガリンに対する抗体を用いた免疫染色において、His-RAP 投与 1 時間後の時点で刷子縁下に dot 状の染色

を認めたが、これはエンドソームが染色されているものと考えられ、His-RAP がメガリンに結合してエンドサイトーシスの一時的亢進を来したものと考えられた。また、His-RAP 投与により、IIa 型ナトリウム/リン酸共輸送担体の細胞内内在化及びリン酸排泄増加が認められたことから、メガリン依存性エンドサイトーシスの亢進が IIa 型ナトリウム/リン酸共輸送担体の細胞内内在化を伴うことが推察された。

#### E. 結論

メガリン依存性エンドサイトーシスが IIa 型ナトリウム/リン酸共輸送担体の細胞内局在制御を介してリン酸再吸収量調節に関わる。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamagata M, Ozono K, Hashimoto Y, Miyauchi Y, Kondou H, Michigami T. Intraperitoneal administration of recombinant receptor-associated protein causes phosphaturia via an alteration in subcellular distribution of the renal sodium phosphate co-transporter. *J Am Soc Nephrol*, 16:2338-2345, 2005

Miyauchi Y, Michigami T, Sakaguchi N, Sekimoto T, Yoneda T, Pike JW, Yamagata M, Ozono K. Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. *J Biol Chem*, 280:40901-40908, 2005

##### 2. 学会発表

山形雅代、大藪恵一、道上敏美. II 型 Na<sup>+</sup>/Pi 共輸送担体の細胞内局在制御にお

けるメガリン依存性エンドサイトーシスの関与. 第 23 回日本骨代謝学会. 2005.7. 大阪.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得：該当なし。
  2. 実用新案登録：該当なし。
- その他：該当なし。