

戦略的創造研究推進事業  
発展研究（SORST）

研究課題

「遺伝情報制御分子としての  
ステロイドレセプター」

研究期間：平成14年11月1日～平成17年3月31日

研究代表者

加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所 教授

## 1 . 研究実施の概要

目的：

ステロイドホルモンをはじめとした低分子量脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内ステロイドレセプター群は、転写制御因子として標的遺伝子群の発現を直接転写レベルで制御する。既事業で、転写共役因子の機能的・生理的必須性の部分的解明、及びレセプターKOマウスの解析を通し、未知の生理機能を明確にできた。本研究では、既事業での成果をもとに新展開を目指し、転写共役因子の複合体機能解析を目的に、核内レセプターと共役する新規染色体構造調節因子複合体を生化学的により精製、同定、性状解析した（高田グループ）。一方、レセプターの組織特異性の解明を目的に、核内レセプター及びその共役因子の生体内機能を時期・組織特異的KOマウスを作製することで、レセプター時期・組織特異機能を分子レベルで解明した（武山グループ）。

### 高田グループ

#### 研究題目：核内レセプターと共役する新規核内因子及び複合体精製と同定

研究実施の概要：

##### 1) 核内レセプター転写共役因子複合体の同定と性状解析

最近、核内レセプター転写共役因子は単独で存在することなく、複合体として機能することが証明されており、転写共役因子複合体の同定は必須である。各核内ステロイドレセプターの機能は細胞種によっても大きく異なるため、細胞種特異的な転写共役因子複合体及び相互作用する特異因子の存在が予想されている。研究代表者らは MALDI TOF-MAS を用いたプロテオミクスの手法により、核内レセプターとリガンド依存的に相互作用する核内巨大転写共役因子複合体の精製・同定法を、HeLa 細胞核抽出液を用いて確立した。その結果、VDR に作用する新規染色体構造調節因子複合体（WINAC）の同定・機能解析に成功した（H. Kitagawa et al., Cell, 113, 905-917, 2003）。更に、負の転写調節とクロマチン構造修飾の関連について生化学的アプローチにより解析した（A. Murayama et al., EMBO Journal, 23, 1598-1608, 2004）。

##### 2) 細胞増殖分化を制御する核内レセプターの細胞内シグナルクロストークの解析

核内複合体は、一つの機能単位として、複数の制御因子に対し共通の機能支持母体として機能することが分かりつつある。そのため、複合体群に相互作用する調節因子群を同定することで、上流及び下流に位置する細胞内シグナル伝達因子の同定は可能である。研究代表者らは、ダイオキシン結合ダイオキシンレセプターが、エストロゲン未結合女性ホルモンレセプターと会合し、標的遺伝子発現を起こす新規

クロストークが見出し、環境ホルモンによる癌化の一端を解明した (F. Ohtake et al., Nature, 423, 545-550, 2003) また、骨髄由来間葉系幹細胞において、炎症性転写因子NF- $\kappa$ Bと脂肪細胞分化因子PPAR $\gamma$ が、核内で巨大複合体を形成することでシグナルのクロストークを起こし、細胞の系譜を決定することを見出した (M. Suzawa et al., Nature Cell Biol, 5, 224-230, 2003)。

## 武山グループ

### 研究題目：核内レセプターとその転写共役因子の生体内機能の評価

研究実施の概要：

#### 1) 核内レセプター及びその転写共役因子の組織特異機能の解明

ビタミンDレセプター(VDR)は皮膚と骨組織、ARは脳神経系、性生殖腺分化、骨代謝に、極めて重要な役割を果たすことが判明した。核内複合体群の生理的重要性を検討する目的で、核内レセプター及び複合体主要構成因子遺伝子を破壊したマウスを作成し、その変異を観察する。しかしながら、当グループが既に見出したように、複合体主要構成因子遺伝子破壊マウスでは致死に至る例が多いと予想されるため、Cre-loxP法を用いた組織時期特異的遺伝子欠損マウスの作成を行う。マウスを用いた標的遺伝子破壊法により、複合体群の主要構成因子や複合体と相互作用する転写因子の生理機能を探る。申請者らは骨芽細胞特異的VDR KOマウスにおいて、大腿骨の骨量及び骨密度の増加を示唆した。一方、破骨細胞特異的AR KOマウスにおいて、破骨細胞が多く存在する大腿骨遠位の海綿骨が大幅に減少していた。

#### 2) 核内レセプター転写共役因子の組織特異的機能の解析

核内複合体群の生理的重要性を検討する目的で、複合体主要構成因子遺伝子を破壊したマウスを作成し、その変異を観察する。複合体構成因子の生体内高次機能は、従来手法に従い、遺伝子破壊マウスを作成する。我々は既に同定した新たな染色体構造調節因子複合体WINACの主要構成因子WSTFのノックアウトを行ったが、このマウスは左心室及びそこから派生する動脈の形成不全による胎生致死であった。当グループが既に見出したように、複合体主要構成因子遺伝子破壊マウスでは致死に至る例が多いため、当該遺伝子破壊による胎生致死の回避や特異的組織での特異機能を明確にする目的に、Cre-loxPシステムを用いた誘導性組織特異的遺伝子破壊法により、floxed WSTFマウスを作出したところである (K. Yoshimura et al., unpublished result)。

#### 3) ショウジョウバエを用いた核内レセプター及び転写共役因子の分子遺伝学的検索

生化学的/プロテオミクスアプローチでは、取得困難な複合体構成因子あるいは複合体間

仲介因子の存在が予想される。そこで、ショウジョウバエから未知なる複合体及び仲介因子を分子遺伝学的に同定することを目的に、まず転写制御因子ヒト性ステロイドレセプターを強発現するトランスジェニックラインを確立する。これに、各種染色体欠出ライン(約1500)を掛け合わせることで、候補因子を同定する。同定された因子のヒトホモログを取得後、複合体及びその仲介因子の同定を行う。この分子遺伝学的アプローチにより概念的にも新規な染色体調節因子の同定を期待する。申請者らは、すでに系として動かしており、興味深い因子を取得したところである(K. Takeyama et al., Biosci. Biotechnol. Biochem, 68, 1209-15, 2004; S. Ito et al., Genes Cells, 9, 983-92, 2004)。また、ショウジョウバエ内在性核内レセプターであるエクダイソンレセプターの機能についても解析している(A. Maki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 320, 262-267, 2004; S. Sawatsubashi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 320, 268-272, 2004)。

## 2. 研究構想

### 研究開始時での目的・立案

核内ステロイドレセプター群は、リガンド誘導性転写制御因子として標的遺伝子群の発現を直接転写レベルで制御する。更に、核内レセプター転写共役因子は単独で存在することなく、複合体として機能することが証明されている。そのため、当初の目的は核内レセプター転写共役因子複合体の同定及び機能解析と核内レセプターの組織特異的機能の解析を中心に計画を立てた。具体的には、以下二つの柱に基づき、研究構想を立てた。

#### 1) 核内レセプターと共役する新規核内因子及び複合体精製と同定

核内レセプターに相互作用する核内巨大複合体の同定を生化学的に行う。順次その機能解析を行うとともに、重要構成因子についてはノックアウトマウス等を用い、生体内高次機能を解析する(高田グループ)。

#### 2) 核内レセプターとその転写共役因子の生体内機能の評価

核内レセプターのノックアウトマウスでは、全身作用による変異か特定臓器での機能欠損かを区別することは不可能である。そこで、Cre-lox法を用いた時期組織特異的遺伝子破壊法により、核内レセプター群及びその転写共役因子群の機能を解析する(武山グループ)。

### 研究開始後の目的再設定

核内レセプター研究領域及びその周辺研究領域の進歩もあり、当初の目標から若干、研究構想を修正した。

#### 1) 核内レセプターと共役する新規核内因子及び複合体精製と同定

既定通り、核内レセプターに相互作用する核内巨大複合体の同定を生化学的に行

う。順次その機能解析を行うとともに、重要構成因子についてはノックアウトマウス等を用い、生体内高次機能を解析する（高田グループ）。

## 2) 核内レセプターとその転写共役因子の生体内機能の評価

既定通り、核内レセプターと転写共役因子の組織特異的生体内機能を評価する。また、高田グループの生化学的/プロテオミクスアプローチでは、取得困難な複合体構成因子あるいは複合体間仲介因子の存在が予想される。そこで、ショウジョウバエから未知なる複合体及び仲介因子を分子遺伝学的に同定する（武山グループ）

## 3 . 研究内容

### (1) 実施の内容

I) 核内レセプターと共役する新規核内因子及び複合体精製と同定（高田グループ）

#### 1) 核内レセプター転写共役因子複合体の同定と性状解析

近年、転写制御は巨大複合体形成が必須であると考えられるようになった。これまでの研究成果から、ER $\alpha$  AF2に結合するTRRAP/GCN5複合体は転写のみならず、細胞増殖を制御する。また、VDRに結合する新規複合体WINACを同定した。この複合体はATP依存的にクロマチン構造を修飾するばかりでなく、DNA複製にも関与する複合体であった。この複合体の一つの構成因子であるWSTFはウィリアムズ症候群と呼ばれる遺伝病で欠損している因子である。我々はこの疾患とこの新規複合体の機能低下との関与を明確にし、*in vitro*において精製した複合体が、*in vivo*の生体内高次機能の制御に重要であることを明らかにした。

#### A) 核内レセプターによる負の転写調節

脂溶性ホルモン/ビタミンD誘導性依存的な転写制御因子である核内レセプター群は様々な転写因子や転写共役因子複合体群と相互作用し、転写を制御することで脂溶性リガンドの生理作用を発揮する。リガンド依存的な転写活性化では、リガンド未結合時の核内レセプターは転写共役抑制因子複合体群と会合することでその転写機能が抑制化されている。リガンドと結合した核内レセプターは転写共役抑制因子複合体群と解離し、転写共役活性因子複合体群をリクルートし、基本転写因子群と共に転写を活性化する。

更に、核内レセプターとHDAC複合体群とのリガンド依存的な相互作用の他、他のクラスの転写因子との標的遺伝子プロモーター上に対するDNA結合阻害作用による転写抑制が知られている。しかしながら、核内レセプターのリガンド依存的な標的遺伝子の時期・組織特異的な発現制御作用を考慮すると、リガンド依存的に相互作用する転写共役抑制因子複合体群の同定や、未知なる転写抑制機構の解明は重要で

あると考えられる。

活性型ビタミンDである  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (VD) の産生を媒介する  $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  ( $1\alpha$ 水酸化酵素) の遺伝子発現は転写レベルでカルシウムおよび副甲状腺(PTH)により正に、VDにより負に制御されることが証明されている。今回、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  遺伝子のVD依存的な転写制御機構を探るために、プロモーター解析を行い、VDによる負の応答配列 ( $1\alpha\text{nVDRE}$ ) を同定した。この領域は既知の  $\text{nVDRE}$  と異なり、E-BOX配列 (CANNTG) から構成されることが見出された。更に、この領域に bHLH のドメインを介して直接結合する新たな転写因子 VDIR (VDR Interacting Repressor) を単離した。VDIR は PTH の下流シグナルである PKA によりリン酸化され、CBP/p300、HAT 転写共役活性因子との複合体形成により転写を活性化することを明らかにした。一方、 $1\alpha\text{nVDRE}$  上の VDIR は VD 依存的に VDR が相互作用すると HDAC がリクルートされ転写が抑制されることを明らかにした。更に、VDR 依存的な負の制御の遺伝子である副甲状腺(PTH) 及び副甲状腺関連ペプチド (PTHrP) 遺伝子プロモーターにも同様に共通な転写抑制機構が存在することを明らかにした(図1)。

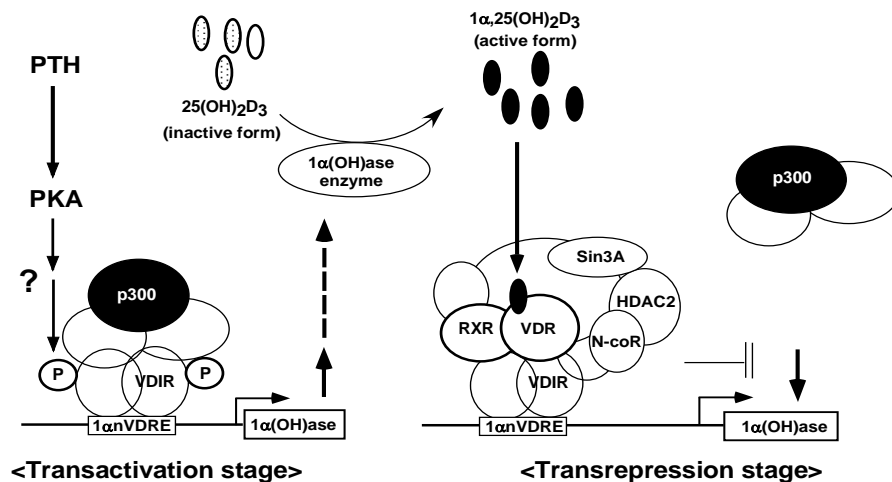


図1  $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  プロモーターにおける  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  による転写抑制機構

PTH 刺激により、VDIR は  $1\alpha\text{nVDRE}$  に結合し、coactivator をリクルート後、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  遺伝子発現を活性化する。一方、VD 結合した VDR は VDIR と結合し、転写抑制複合体をリクルート後、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  遺伝子発現を不活性化する。

## B) 核内レセプター転写共役因子の機能解析

核内レセプター PNR (photoreceptor cell-specific nuclear receptor) はリガンド未同定なオーファンレセプターであり、その発現は神経網膜に局限している。すでに PNR は神経網膜の前駆体細胞の増殖を負に制御しており、青色錐体細胞の分化

抑制していることを突きとめた。しかし、PNRは構成的に転写を抑制することが見出されているものの、その仲介因子は明らかにされていなかった。そこで、Yeast two-hybrid screeningを行い、新規転写抑制因子 DEVH-box CoRepressor (Dev-CoR)を見出した。

Dev-CoRの発現は比較的広範に見られ、網膜においてはPNR同様に視細胞のOuter Nuclear Layerに見い出された。本因子の転写抑制機構を解明する目的で、Dev-CoR強制発現細胞株を樹立し、複合体精製を試みた。その結果、複合体には核内レセプターのコリプレッサーであるHDACのみならず、細胞周期制御因子p107、さらに原癌遺伝子である転写因子Mybのコリプレッサーとして知られるNCoR、Myb binding protein 1A、CDK9などの細胞増殖制御関連因子が含まれることが明らかとなった。更にDev-CoRの強制発現によりG1期に停滞する細胞が増え、G1期制御因子の一つであることが判明した(図2)。つまり、PNRの生物学的機能である視細胞前駆細胞の増殖抑制が、Dev-CoRを介して制御されていることが推察された。

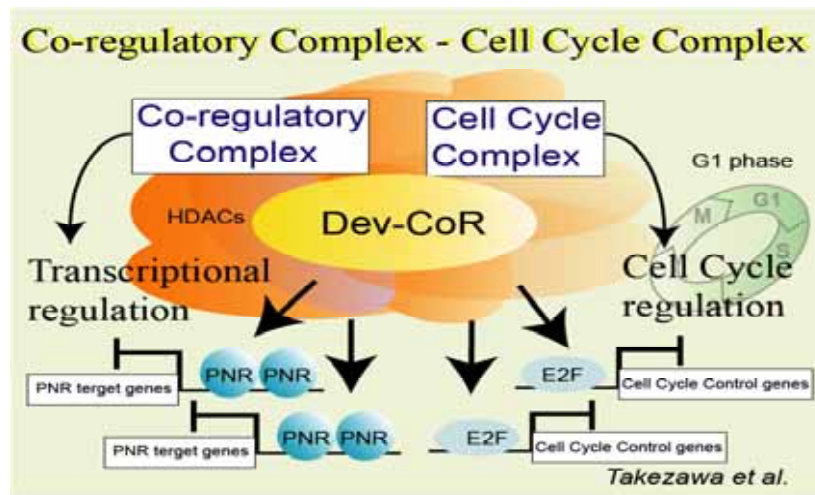


図2 細胞周期と転写制御を結ぶ複合体の概念図

## 2) 細胞増殖分化を制御する核内レセプターの細胞内シグナルクロストークの解析

ER $\alpha$ を始めとした、ステロイドホルモンレセプターは、レセプター蛋白N末端及びC末端の2ヶ所に転写促進領域(AF-1、AF-2)が存在することが知られている。研究代表者らは、成長因子によって活性化されるMAPキナーゼが、ER $\alpha$  AF1をリン酸化することで、その機能を亢進することを見出し、膜レセプターからの細胞間情報伝達と核内レセプターを介する情報伝達がクロストークすることを見出した。また、VDRは、TGF- $\beta$ シグナル伝達とSmad3を介し正に、PPAR $\gamma$ はNF $\kappa$ Bシグナルと負に制御されることを見出した。

### A) ダイオキシンレセプターの内分泌攪乱作用の機能解析

ダイオキシン類は発癌作用、免疫異常など多様な毒性を示し、これらの毒性作用の一つとして子宮内膜症の増悪の可能性など、主要な女性ホルモン・エストロゲン作用に対する攪乱作用の可能性が指摘されている。しかしその毒性の分子作用メカニズムは不明であった。ダイオキシン類の毒性作用は、転写制御因子であるダイオキシンレセプター (AhR) とパートナーArntのヘテロダイマーがリガンド依存的に標的遺伝子の転写制御を行うことにより発揮される。一方エストロゲンはER $\alpha$ 、ER $\beta$ を介した標的遺伝子の転写制御により発揮される。我々は両者のレセプターが転写制御因子であることに着目し、ダイオキシン類によるエストロゲン攪乱作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。既事業において、リガンド結合AhRがER $\alpha$ に直接結合し、エストロゲン未結合 (不活性型) ER $\alpha$ の転写促進能を正に、エストロゲン結合 (活性型) ER $\alpha$ の転写促進能を負に制御することを見出した。更に、この正の制御機構として、ER $\alpha$ に結合したAhRが転写共役因子p300をリクルートすることを明らかにした。一方、活性型ER $\alpha$ の転写促進能に対するAhRの抑制作用機構は不明であった。

まずエストロゲン存在下、AhRによるER $\alpha$ 転写活性抑制機構を検討した。マウス子宮を用いたin vivo系、及び乳癌由来MCF-7細胞を用いたin vitro系において、AhRリガンド3-Methycholanthrene(3MC)はエストロゲン17 $\beta$ -estradiol (E2) 依存的なER $\alpha$ 転写促進能を抑制した。更にMCF-7細胞を用いてこの分子機構を検討したところ、ER $\alpha$ 蛋白量が3MC依存的に減少することが判明した。プロテアソーム阻害剤であるMG132でこの効果が抑制され、ER $\alpha$ のユビキチン化が3MC依存的に亢進したこと、またAhRによるER $\alpha$ 転写機能抑制はMG132存在下では見られなかったことから、AhRによるER $\alpha$ 機能抑制はER $\alpha$ のユビキチン・プロテアソーム経路による分解制御を介していることが示された。

更にAhR自身のアゴニスト依存的分解の関与を検討した結果、AhRのアゴニスト依存的分解・アンタゴニスト依存的安定化に連動してER $\alpha$ の分解・安定化が規定されていることが明らかになった。これらの結果から、アゴニスト結合AhRがER $\alpha$ に結合し、AhRにアゴニスト依存的にリクルートされたユビキチンリガーゼがER $\alpha$ をユビキチン化し能動的に分解することで、ER $\alpha$ 機能を負に制御しているという分子モデルが推測された(図3)。今後、AhRによるER $\alpha$ 分解制御の詳細を解明するために、この分解制御を担うユビキチンリガーゼ複合体の同定を計画している。



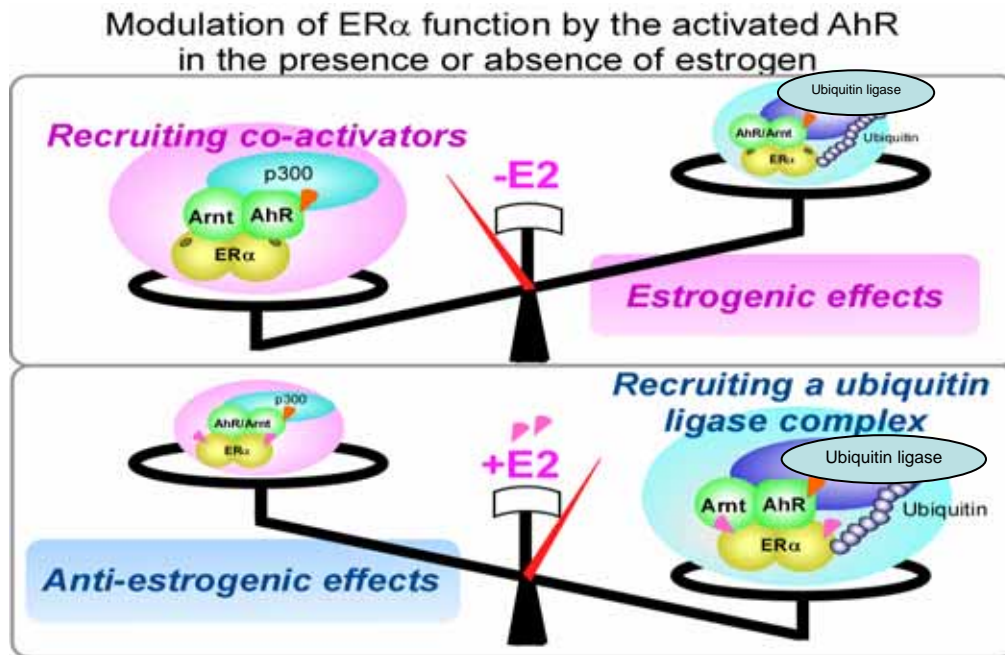


図3 エストロゲン有無の存在下、活性型 AhR による ER $\alpha$ 転写活性の制御

E2 非存在下、リガンド結合 AhR が ER $\alpha$ に直接結合し、エストロゲン未結合（不活性型）ER $\alpha$ の転写を促進させる。一方、E2 存在下、リガンド結合 AhR が ER $\alpha$ に直接結合し、エストロゲン結合（活性型）ER $\alpha$ に対し、リクルートされたユビキチンリガーゼが ER $\alpha$ をユビキチ化し能動的に分解することで、ER $\alpha$ 機能を負に制御している。

#### B) 間葉系細胞におけるPPAR $\gamma$ のクロストーク解析

核内レセプターPPAR $\gamma$ はプロスタグランジン等の脂肪酸派生物やII型糖尿病改善薬として作用する合成化合物(チアゾリジン誘導体)等をリガンドとして標的遺伝子の転写を調節し、脂肪細胞・マクロファージ分化、糖・脂肪代謝関連酵素の制御、癌細胞の増殖制御など、様々な現象に関与している。また、PPAR $\gamma$ の転写活性化能はリガンド結合による調節の他にIL-1、TNF $\alpha$ を始めとする膜シグナルによっても調節を受けることが知られている。例えば、IL-1、TNF $\alpha$ においてはNF $\kappa$ Bが核へ移行し、PPAR $\gamma$ のDNA結合能を抑制する事で間葉系細胞の分化を脂肪細胞から骨芽細胞へ変化させる。今回新たに、PPAR $\gamma$ 転写活性を抑制するシグナルとして、CaMKII-TAK1/TAB2-NLKシグナルを見出した(図4)。このシグナルは現在Wnt/Ca $^{2+}$ 経路で活性化されることが報告されているが、最下流であるMAPキナーゼNLKについては他にもTcf/ $\beta$ カテニンを活性化するWnt1、Smadシグナルを活性化するTGF $\beta$ での活性化が報告されている。現在まで、細胞内カルシウム濃度を上昇させると骨髄由来間葉系幹細胞ST2細胞において脂肪細胞分化が抑制される事、更に下流のCaMKII-TAK1/TAB2-NLKシグナルがPPAR $\gamma$ 活性を抑制する事を見出した。現在、上流及び下流シグナルを検討している。

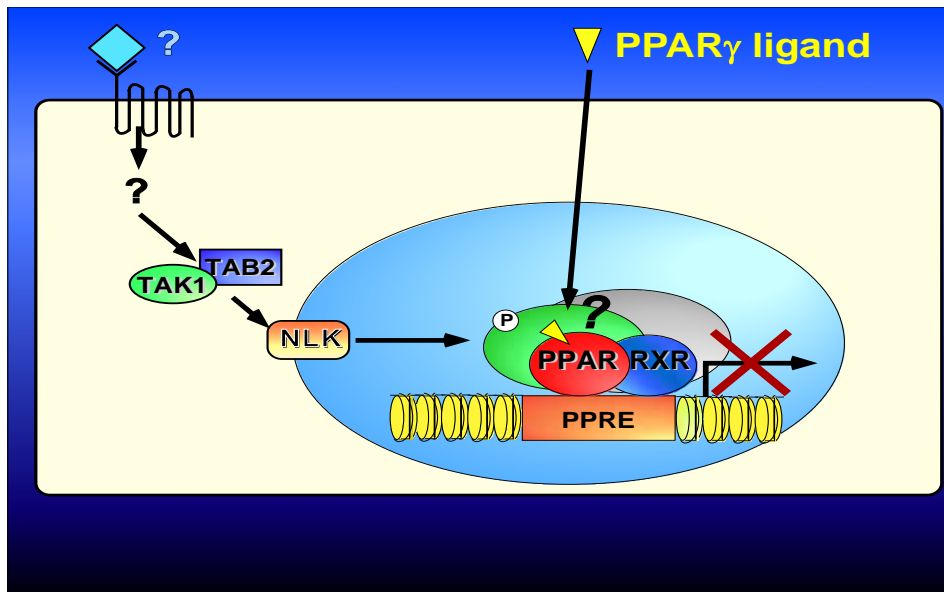


図4 PPAR $\gamma$ とCaMKII-TAK1/TAB2-NLKシグナルのクロストーク

## I I ) 核内レセプターとその転写共役因子の生体内機能の評価 (武山グループ)

生体内での核内レセプターシステムの生理的必須性を証明するには、遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) の作出と、その変異の観察が必要である。更に、ショウジョウバエを用いることにより、個体と分子レベルの両面で解析できるばかりでなく、生化学的/プロテオミクスで同定し難い因子を遺伝学的スクリーニングにより同定できる利点がある。

### 1) 核内レセプターの組織特異機能の解明

#### A) 核内レセプターVDRの骨組織における高次機能解析

核内レセプターは、脂溶性リガンドの作用機構において中心的な役割を果たすことがわかっている。しかし、実際の生物個体中における特徴的な器官、細胞での特異的機能を、*in vitro*系のみで解析することは不可能である。そこで生体内での核内レセプターシステムの生理的必須性を証明するために、遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) を作出し、その変異を観察した。作出されたビタミンDのノックアウトマウスにおいて、VDRは皮膚と骨組織に極めて重要な役割を果たすことを証明することができた。しかしながらVDR KOマウスでは重篤なカルシウム代謝異常を伴うために、観察された皮膚、骨組織での変異がVDRの直接的な機能なのか、カルシウム代謝異常により引き起こされる間接的な異常なのか明確にすることができなかった。このため、ビタミンDの骨芽細胞や破骨細胞を介した骨へのビタミンD直接作用の理解には単にVDRを欠損させただけでは不十分であり、骨の細胞種特異的にVDRを欠損させることが必須である。そこで、カルシウムの間接的作用のない骨芽細胞特異的にVDR遺伝子を欠損するマウスを作出する

ことでビタミンDの骨芽細胞を介した骨へのビタミンDの直接作用の検証を試みた。まず骨芽細胞特異的にCreを発現するcollagen $\alpha$ 1(I)-Cre TgマウスとVDR floxマウスとの交配により骨芽細胞特異的にVDR遺伝子が欠損したOb-VDRKO(VDRob-L-/L-)マウスを作出した。骨量が最大となる16週齢のマウスの大腿骨のX線解析を行ったところ、Conventional-VDR KOマウスやAll-VDRKOマウスでは著しい骨量の減少が観察されたが、Ob-VDRKOマウスは予想に反し野生型と比較し骨量が増加することを見出した(図5)。また、骨密度も野生型に比べ有意に上昇していたが、遠位側の骨端部および骨幹部でより顕著であった。この骨量および骨密度増加の減少を詳細に解析するために骨組織形態計測を行ったところ、Ob-VDRKOマウスは野生型に比べ骨吸収が抑制されたことにより骨量が増加していることが明らかになった。

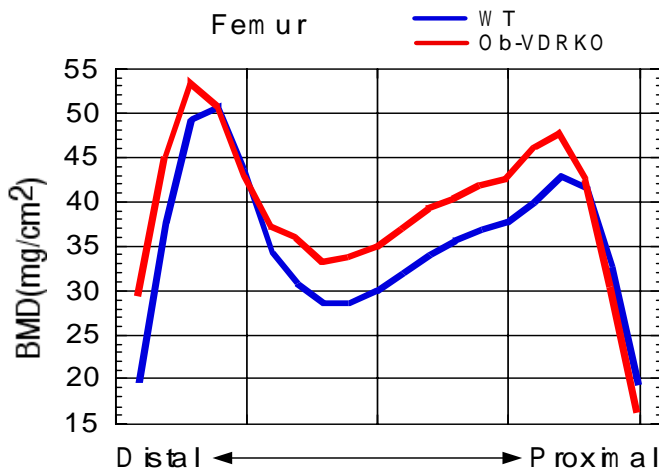


図5 Ob-VDRKO マウスの  
大腿骨の骨密度

16 週齢マウス大腿骨の X 線解析により、野生型と比較し、All-VDRKO マウスでは骨量及び骨密度が減少する一方、Ob-VDRKO マウスでは骨量及び骨密度の増加を示唆した。

## B) 核内レセプターARの骨組織特異的機能の解析

骨は身体の支持組織であると共に、カルシウム等のミネラル貯蔵器官として重要である。また、骨組織であるにも関わらず、内外からの刺激に応じて常に活発に再構築(骨リモデリング)を繰り返している。つまり、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の正負の調節下、骨リモデリングが重要である。多くの代謝制御因子の中でも、性ステロイドホルモンが主要な制御因子として知られている。

アンドロゲンの生理作用はリガンド依存性転写制御因子であるアンドロゲンレセプター(AR)を介した標的遺伝子の転写制御により発揮されると考えられている。AR遺伝子欠損(ARKO)マウスでは顕著な骨量低下が雄のみで観察された。しかし、ARを介した骨増強作用が骨組織内の破骨細胞または骨芽細胞の機能であるのか、あるいは骨組織以外の器官からの間接的な機能であるのか不明であった。

そこで、Cre/loxPシステムを利用し、カテプシンK遺伝子プロモーター下、破骨細胞特異的に発現するCre tg マウスとFloxedマウスを掛け合わせることで、破骨細胞特異的なARKOマウスを作出し、骨組織変異を解析した。結果として、破骨細胞が多く存在する大腿骨遠位の海綿骨が大幅に減少していた。詳細に検討したところ、骨組織中の破骨細胞数が大幅に増加し、骨吸収マーカである尿中デオキシピリジノリン濃度がWT群に対して優位に上昇していた。破骨細胞機能が亢進する事で骨代謝回転が高回転となり、海綿骨量の減少が起きていることが明らかになった(図6)。

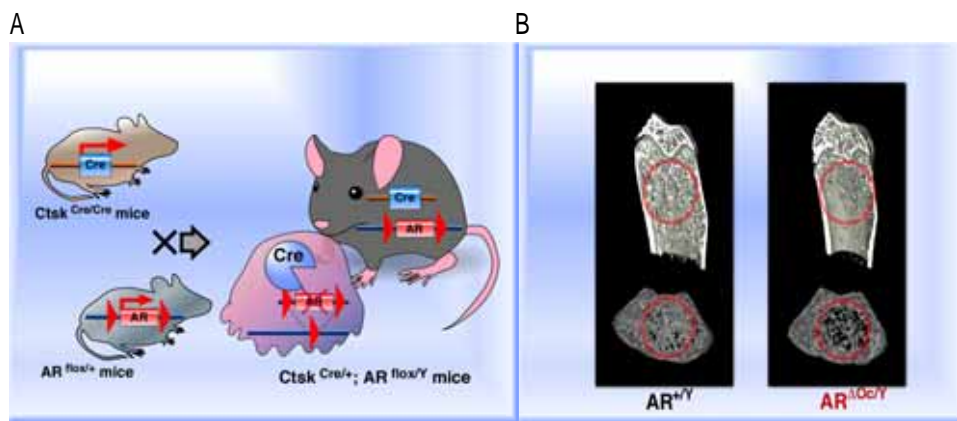


図6 破骨細胞特異的 AR KO マウスの作出法とその表現型

- A: AR<sup>flox/+</sup>マウスとカテプシン K プロモーター Cre マウスの交配により破骨細胞特異的 AR KO マウスを作出した。
- B: 野生型と比較しKO マウスは大腿骨遠位における海綿骨の減少を示唆した。

## 2) 核内レセプター転写共役因子の組織特異的機能の解析

核内複合体群の生理的重要性を検討する目的で、従来手法に従い、複合体主要構成因子遺伝子を破壊したマウスを作成し、その変異を観察する。我々は既に同定した新たな染色体構造調節因子複合体WINACの主要構成因子WSTFのノックアウトを行ったが、このマウスは左心室及びそこから派生する動脈の形成不全による胎生致死であった(図7)。当グループが既に見出したように、複合体主要構成因子遺伝子破壊マウスでは致死に至る例が多いため、当該遺伝子破壊による胎生致死の回避や特異的組織での特異機能を明確にする目的に、Cre-loxPシステムを用いた誘導性組織特異的遺伝子破壊法により、floxed WSTF マウスを作出したところである。

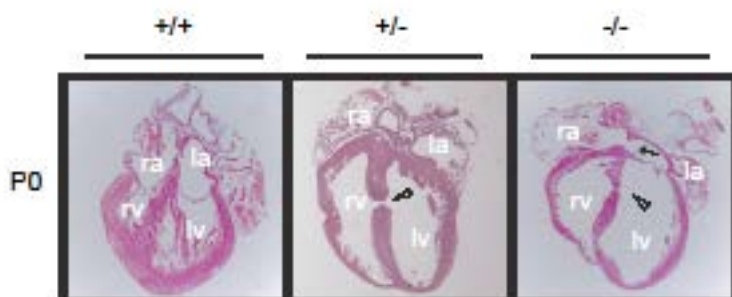


図7 WSTF KO マウスにおける心臓組織の表現型

WSTF KO マウスは胎生致死になる。P0 stage のパラフィン切片を作製し、観察すると、左心室及びそこから派生する動脈の形成不全を認める。

### 3) ショウジョウバエを用いた核内レセプター転写共役因子の分子遺伝学的検索

#### A. ショウジョウバエにおけるアンドロゲンレセプター転写制御因子の同定と機能解析

現在までに同定されてきた核内レセプター転写共役因子群の生理機能の重要性の証明するために、それらのノックアウトマウスの作出が不可避である。しかしながら、この解析は多大な労力を必要とするため、より迅速かつ生体内機能を解析する評価システムが必須である。特に既に成功している核内レセプター転写共役因子群のノックアウトマウスの多くは、顕著なレセプター機能障害や、機能不全を引き起こさないことからこれら転写共役因子の核内レセプター機能調節への関与は未だ明確ではない。加えて、生化学/プロテオミクス手法では得がたい複合体の存在を否定できないため、ハエの分子遺伝学的アプローチにより、新規複合体の同定が見込まれる。以上の二点を踏まえ、生体個体での核内レセプター及びその転写共役因子の機能を、より効率的に評価するシステム系の確立をショウジョウバエで試み、内因性核内レセプターシステムを阻害しないヒト男性ホルモンステロイドレセプター (hAR) を導入した transgenic fly line の確立に成功した。ハエで発現した hAR は動物細胞内で観察された機能を維持しており、また各種リガンドに対する反応性を保持していた。そのためこのハエラインは、hAR の機能解析やリガンド検索に適することがわかった。このラインと各種染色体欠損変異体ライブラリーとを掛け合わせることで、分子遺伝学的にレセプター転写制御機能に必須な遺伝子を検索した(図8)。現在、スクリーニングが終了し、取得した染色体構造調節因子数種の機能を解析している。また、他の核内レセプターヒト ER $\alpha$  についても同様の系を動かすことができ、染色体構造調節因子数種を取得し、機能を解析している。

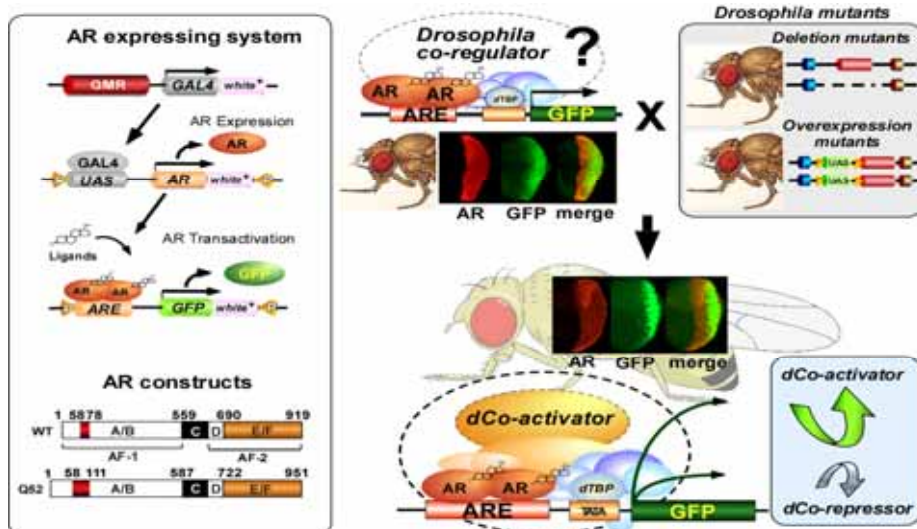


図8 ショウジョウバエにおける AR 発現システムと転写共役因子探索の概念図

B) ショウジョウバエ内在性核内レセプターEcRの転写制御の機能解析

ショウジョウバエには20種の核内レセプターが存在することが全ゲノム解読から判明した。このうちリガンドが判明している核内レセプターはエクダイソンレセプター (EcR) のみであり、変態ホルモンであるエクダイソンだけがリガンドとなる。Ultraspiracle(USP)はヒトレチノイドXレセプター(RXR)ホモログとして同定され、EcRとヘテロダイマーを形成し転写制御することが知られている。そこで、転写制御研究の格好の分子モデルとして用いられているリガンド誘導性転写制御因子、核内レセプターに着目し、高等真核生物のモデルであるショウジョウバエを解析系として選択した。ショウジョウバエの発生を促進するエクダイソンがEcR/USPの転写を活性化することが知られているが幼若ホルモンの拮抗的作用機構は不明である。そこで、幼若ホルモンのUSPリガンドとしてEcR/USPを介した転写の制御の可能性について、ショウジョウバエembryo由来細胞株、S2細胞を用いて検討したところ、エクダイソン依存的なEcR/USP転写活性化は幼若ホルモンで顕著に抑制された。更にHDAC阻害剤であるTSA投与により幼若ホルモン依存的な転写抑制が解除されたことから、未知のEcR/USP転写共役因子複合体が存在すると考えられた。そこで、新規複合体がとれた際の評価系として、クロマチンテンプレートin vitro転写系の構築を試みた。HeLa細胞より精製したヒストン八量体を用いて、塩希釈法によりヌクレオソームをランダムに形成させた。次にATP依存的なクロマチンリモデリング複合体であるショウジョウバエACF complexを加えることでヌクレオソーム間のスペーシングを整えた。転写因子として、GAL4-VP16、核内レセプターとしてEcR/USPを用いた。GAL4-VP16は大腸菌、EcR/USPはバキュロウイルス発現系にて全長ヘテロダイマーとしてそれぞれ精製した。転写装置は核抽出液としてHeLa細胞より調製した。さらに、ヒストンアセチル化活性を有するコアクチベーター、human p300をバキュロウイルス発現系より精

製した。その結果、*in vitro* で再構築したクロマチンは GAL4-VP16、EcR/USP の有無にかかわらず、抑制的であり、p300 によるヒストンアセチル化によって初めて転写活性化され、クロマチンテンプレート *in vitro* 転写系の構築に成功した(図9)。今後、このシステムを用いて、取得が見込まれる複合体構成因子群の性状を解析する予定である。

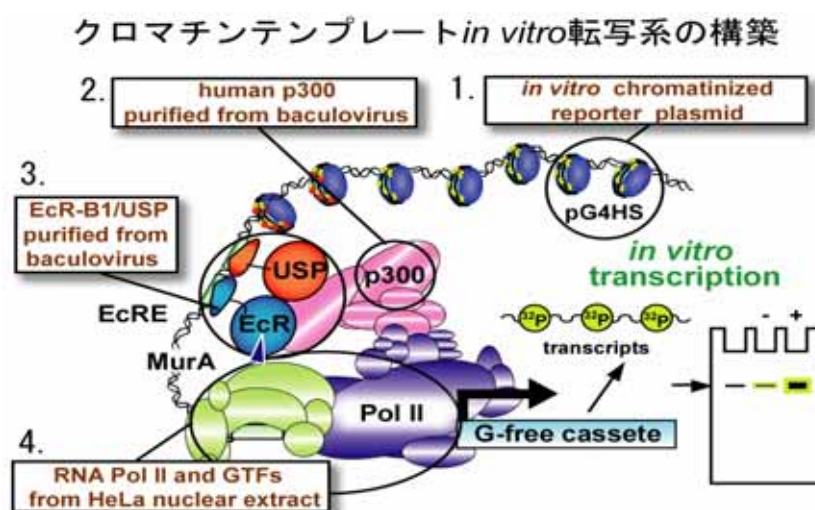


図9 核内レセプターEcR 転写制御機構の *in vitro* 評価系

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

以上二つの大きな流れで研究を実施し、その成果としては科学論文として公表した。その成果にあるように、国際的に見ても、当該分野において十分競合もしくはリードしたと考えている。また、このような成果の一部については、以下二点につき社会的にも話題となった。

### 1) ダイオキシンによる内分泌かく乱作用の機能解析

内分泌かく乱化学物質(環境ホルモン)のダイオキシン類が、細胞内で女性ホルモンの働きを乱す仕組みを解明した。ダイオキシンはエストロゲン存在下、女性ホルモンが作る蛋白産生を阻害するが、非エストロゲン存在下、女性ホルモンが作る蛋白を産生することを突き止め、英科学誌ネイチャーに発表した(平成15年5月)。

### 2) ビタミンDレセプター転写共役因子複合体の生化学的同定と機能解析

ビタミンDレセプターに結合する新しい「染色体構造調節因子複合体」を生化学的に同定した。この蛋白質は13種類で構成され、この機能不全がウィリアムス病(多臓器不全の遺伝病)の原因の一つであることを突き止め、米科学誌セルに発表した(平成15年6月)。

このように、基礎研究が直接的に病態の分子機構を解析し、治療の分子標的を明

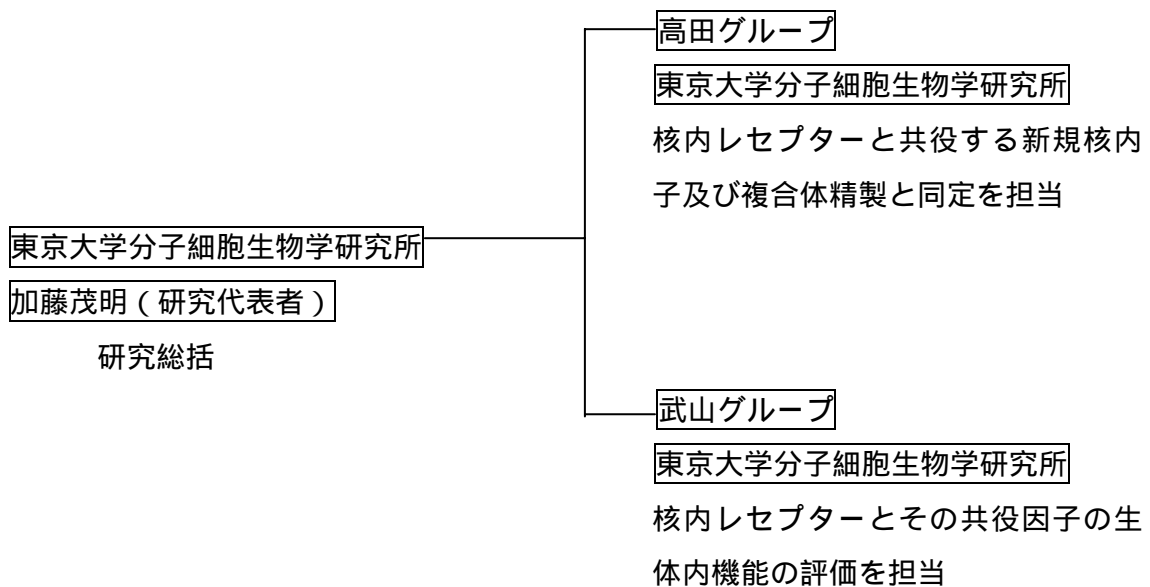
確にできた典型的な例といえる。このような社会的に理解されやすい成果だけではなく、産業的な基盤を築く研究成果をいくつか挙げる事ができた。転写共役因子複合体群と核内レセプター群との選択的相互作用は、リガンドの組織特異的作用を担うと予想されているため、この相互作用を逆手にとった化合物のスクリーニングが可能である。従って、この相互作用を利用した大規模な創薬展開が可能になると期待される。

また、核内レセプターの生体内高次機能を解明したことにより、病態や関連疾患の原因解明に大きく貢献することができた。実際、核内レセプター合成リガンドは複合的な疾患に対して効果的であることが証明されているが、このような研究成果は、具体的な薬物スクリーニングや関連疾患の原因解明に大きく貢献することができた。

## 4 . 研究実施体制

### (1)体制

東京大学分子細胞生物学研究所（研究実施場所 東京大学）



### (2)メンバー表



核内レセプターと共役する新規核内因子及び複合体精製と同定グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
加藤茂明	東京大学分子細胞生物学研究所	教授	研究総括・核内レセプターの機能・転写共役因子・遺伝子欠損動物	平成14年11月～平成17年3月
高田伊知郎	同上	助手	核内レセプターの機能・転写共役因子	平成14年12月～平成16年9月 (平成14年12月～平成15年6月はSORST研究員)
北川浩史	同上	助手	同上	平成14年11月～平成15年3月
金井由美子	同上	技官	転写共役因子	平成14年11月～平成16年9月
KOUZMENKO, Alexandre	派遣先	SORST研究員	同上	平成15年2月～平成16年9月
竹澤慎一郎	派遣先	SORST研究員	核内レセプターの機能	平成15年4月～平成16年9月
福田 亨	派遣先	SORST技術員	転写共役因子	平成14年11月～平成15年3月
過足 芳子	派遣先	SORST技術員	転写共役因子	平成14年11月～平成16年9月
樋口 青子	派遣先	SORST 研究補助員	研究事務・データ収集解析	平成14年11月～平成16年9月
堀口佐知子	派遣先	SORST 研究補助員	研究事務	平成15年12月～平成16年3月
五十嵐 庸	東京大学分子細胞生物学研究所	博士研究員	核内レセプターの機能	平成16年4月～平成16年9月
目崎 喜弘	同上	同上	核内レセプターの機能	平成14年11月～平成16年9月
石谷 健	東京大学大学	博士課程	同上	平成14年11月～

	院農学生命科 学研究科			平成15年3月
大竹 史明	同上	同上	核内レセプターの高 次機能の解析	平成14年11月～ 平成16年9月
金 美善	同上	同上	核内レセプターの機 能	平成14年11月～ 平成16年9月
中村 貴	同上	同上	核内レセプターの高 次機能の解析	平成14年11月～ 平成16年9月
澤津橋 俊	同上	同上	同上	平成14年11月～ 平成16年9月
藤木 亮次	同上	同上	核内レセプターの機 能	平成15年4月～ 平成16年9月
三木ひろみ	同上	同上	核内レセプターの高 次機能の解析	平成16年4月～ 平成16年9月
神津 円	同上	同上	核内レセプターの機 能	平成16年4月～ 平成16年9月

核内レセプターとその共役因子の生体内機能の評価グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
加藤茂明	東京大学分子 細胞生物学研 究所	教授	研究総括・核内レセプ ターの機能・転写共役 因子・遺伝子欠損動物	平成14年11月～ 平成17年3月
武山 健一	同上	助手	核内レセプターの機 能・転写共役因子	平成14年11月～ 平成16年9月
佐藤 裕子	同上	技官	転写共役因子	平成16年4月～ 平成16年9月
山形 薫	派遣先	SORST 研究員	同上	平成14年11月～ 平成17年3月
城出 裕子	派遣先	SORST 技術員	同上	平成15年1月～ 平成16年9月
松本 高広	日本学術振興 会	特別研究 員	核内レセプターの高 次機能の解析	平成14年11月～ 平成16年9月

岸本 正彦	日本学術振興会	特別研究員	核内レセプターの高次機能の解析	平成16年4月～平成16年9月
趙 越	東京大学分子細胞生物学研究所	博士研究員	転写共役因子	平成16年4月～平成16年9月
盛 真友	同上	同上	核内レセプターの機能	平成14年11月～平成16年9月
山本 陽子	同上	同上	遺伝子欠損動物	平成14年11月～平成16年9月
渡辺 資之	東京大学大学院農学生命科学研究科	博士課程	同上	平成14年11月～平成16年3月
吉村 公宏	同上	同上	核内レセプターの高次機能の解析	平成14年11月～平成16年9月
伊藤 沙弥	同上	同上	同上	平成15年4月～平成16年9月
目々澤 愛	同上	同上	遺伝子欠損動物	平成16年4月～平成16年9月
武政さゆり	同上	同上	同上	平成16年4月～平成16年9月

## 5 . 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年 3月22日～ 3月23日 (2日間)	日米科学協力事業 「癌化における核内 レセプターの機能」	ハワイ マウイ島	18名	趣旨：癌の発症、増悪の分子機構、更にこれら疾患に対する治療法の分子基盤について、日米双方の最新成果を持ち寄り、共同研究等を通じ、更にこの研究成果を発展させることを目的とする。

				内容：癌化における核内レセプターの機能について講演を行うとともに、会期中に双方あるいは国内研究者間の交流を図る。
--	--	--	--	--

(2) 招聘した研究者等

なし

6 . 主な研究成果

(1) 論文発表 (海外16件)

14年度

高田グル - プ

1 . M. Suzawa, I. Takada, J. Yanagisawa, F. Ohtake, S. Ogawa, T. Yamauchi, T. Kadowaki, Y. Takeuchi, H. Shibuya, Y. Gotoh, K. Matsumoto, and S. Kato. : Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- $\gamma$  function through the TAK1/TAB1/NIK cascade . *Nature . Cell . Biol.*, 5, 224-230 , 2003.

15年度

高田グル - プ

1. F. Ohtake, K. Takeyama, T. Matsumoto, H. Kitagawa, Y. Yamamoto, K. Nohara, C. Tohyama, A. Krust, J. Mumura, P. Chambon, J. Yanagisawa, Y. Fujii-Kuriyama, and S. Kato.: Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550, 2003.

2. H. Kitagawa, R. Fujiki, K. Yoshimura, Y. Mezaki, Y. Uematsu, D. Matsui, S. Ogawa, K. Unno, M. Okubo, A. Tokita, T. Nakagawa, T. Ito, Y. Ishimi, H. Nagasawa, T. Matsumoto, J. Yanagisawa and S. Kato.: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell*, 113, 905-917, 2003.

3. K. Ishitani, T. Yoshida, H. Kitagawa, H. Ohta, S. Nozawa and S. Kato. : p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 660-665, 2003.

4. Y. Yamamoto, O. Wada, I. Takada, Y. Yogiashi, J. Shibata, J. Yanagisawa,

K. Kitazato and S. Kato.: Both N-and C-terminal transactivation functions of DNA-bound ER are blocked by a novel synthetic estrogen ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 656-662, 2003.

#### 武山グループ

1. T. Matsumoto, K. Takeyama, T. Sato and S. Kato.: Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 85, 95-99, 2003.
2. H. Kawano, T. Sato, T. Yamada, T. Matsumoto, K. Sekine, T. Watanabe, T. Nakamura, T. Fukuda, K. Yoshimura, T. Yoshizawa, K. Aihara, Y. Yamamoto, Y. Nakamichi, D. Metzger, P. Chambon, K. Nakamura, H. Kawaguchi and S.Kato.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *PNAS*, 100, 9416-9421, 2003.
3. T. Sato, T. Matsumoto, H. Kawano, T. Watanabe, Y. Uematsu, K. Sekine, T. Fukuda, K. Aihara, A. Krust, T. Yamada, Y. Namichi, Y. Yamamoto, T. Nakamura, K. Yoshimura, T. Yoshizawa, D. Metzger, P. Chambon and S. Kato.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *PNAS*, 101, 1673-1678, 2004.

#### 16年度

#### 高田グループ

1. A. Murayama, MS. Kim, J. Yanagisawa, K. Takeyama and S. Kato.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO Journal*, 23, 1598-1608, 2004.
2. O. Wada, H. Oishi, I. Takada, J. Yanagisawa, T. Yano and S. Kato.: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene*, 23, 6000-6005, 2004.
3. 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.

#### 武山グループ

1. A. Maki, S. Sawatsubashi, S. Ito, Y. Shiode, E. Suzuki, Y. Zhao, K. Yamagata, A. Kouzmenko, K. Takeyama and S. Kato.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 262-267, 2004.
2. S. Sawatsubashi, A. Maki, S. Ito, Y. Shiode, E. Suzuki, Y. Zhao, K. Yamagata, A. Kouzmenko, K. Takeyama and S. Kato.: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly(ADP-ribosylation). *Biochem. Biophys. Res.*

*Commun.*, 320, 268-272, 2004.

3. A. P. Kouzmenko, K. Takeyama, S. Ito, T. Furutani, S. Sawatsubashi, A. Maki, E. Suzuki, Y. Kawasaki, T. Akiyama, T. Tabata and S. Kato.: Wnt/  $\beta$ -catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J. Biol. Chem.*, 279, 40255-40258, 2004.

4. S. Ito, K. Takeyama, A. Yamamoto, S. Sawatsubashi, Y. Shiode, A. Kouzmenko, T. Tabata and S. Kato.: In vivo potentiation of human estrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells*, 9, 983-992, 2004.

5. Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shiode, 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(6), 1209-1215, 2004.

## (2) 口頭発表

招待、口頭講演 (国際学会18件、国内学会4件)

1) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“Function of steroid hormone receptors in gene regulations”

NUS-IMCB-IMSUT Joint Symposium on Integrative Biotechnology

Clinical Research Centre Auditorium, National University of Singapore, Singapore

November 29, 2002

2) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“Co-regulator complexes for nuclear receptors”

The 2nd International Nuclear Receptor Meeting in Japan

Osaka International Convention Center, Japan

February 14-16, 2003

3) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“A novel cross-talk of estrogen signaling”

7th Annual Frontiers in Estrogen Action Symposium

The Homestead Hot Spring, USA

April 6-8, 2003

4) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“The function of androgen receptor in reproductive organs”

International Conference on the Female Reproductive Tract

Frauenwoerth, Germany

May30-June 2, 2003

5) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ SERMs: Molecule Level Action Mechanism Update ”

First Joint Meeting for International Bone and Mineral Society-Japanese Society  
for Bone and Mineral Research 2003

Osaka, Japan

June 3-7, 2003

6) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ Function of Androgen Receptor ”

EMBO Workshop Biology of Nuclear Receptors

Villefrance, France

June5-8, 2003

7) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ A novel chromatin remodeling complex for Vitamin D receptor ” (Session VI)

12th Vitamin D Workshop

Maastricht, The Netherlands

July 5-10, 2003

8) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ Genetic analysis of androgen receptor ” (Plenary Lecture)

12th Vitamin D Workshop

Maastricht, The Netherlands

July 5-10, 2003

9) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ Co-regulator Complexes for Nuclear Receptors ”

HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX World Congress

Montreal, Canada

October 8-11, 2003

10) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ Osteoblast differentiation and chromatin remodeling by nuclear receptors ”

International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2003

Vienna, Austria

November 27-29, 2003

11) 「核内ステロイドレセプター共役因子複合体群の機能」

北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、目崎喜弘、植松良勝、松井大輔、時田章史、伊藤敬、

石見幸男、松本俊夫、長澤寛道、柳沢純、加藤茂明（東大・分生研）

（日本分子生物学会、神戸、平成 15 年 12 月 10 日～12 月 13 日）

12) 「ビタミン D 受容体転写制御に関する新規クロマチンリモデリング因子複合体 WINAC の機能解析」

北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、目崎喜弘、植松良勝、松井大輔、時田章史、伊藤敬、

石見幸男、松本俊夫、長澤寛道、柳沢純、加藤茂明（東大・分生研）

（日本分子生物学会、神戸、平成 15 年 12 月 10 日～12 月 13 日）

13) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“Co-regulator complexes for nuclear receptors and genetic analyses of AR function”

Keystone Symposia

Keystone Resort, USA

February 28-March 4, 2004

14) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“Estrogen receptor coregulators”

The US-Japan Workshop on “The Role of Nuclear Receptors in Carcinogenesis”

Hawaii, USA

March 22-23, 2004

15) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“Co-regulator complexes for nuclear receptors”

The 3rd International Nuclear Receptor Meeting in Japan

Osaka, Japan

April 15-17, 2004

16) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“A novel chromatin remodeling complex for vitamin D receptor”

ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society

Gui Lin, China

May 15-18, 2004

17) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“Classes of nuclear receptor coregulatory complexes”

ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society

New Orleans, USA

June 16-19, 2004

18) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)



“ Co-regulator complexes for nuclear receptors ”

77th Annual Meeting of the Japan Endocrine Society, International Satellite Symposium, “ New Horizon in Endocrinology and Metabolism ”

Kyoto, Japan

June 27, 2004

19) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ Transcriptional controls by nuclear receptors ”

UT Forum 2004 in Sweden

Stockholm, Sweden

August 24-25, 2004

20) Shigeaki Kato (IMCB, The University of Tokyo)

“ The VDR function in gene regulation ”

The 12th International Congress of Endocrinology

Lisbon, Portugal

August 31-September 4, 2004

21) 「 脳の性差とその性分化を誘導するアンドロゲン受容体の機能 」

松本高広、佐藤隆史、渡辺資之、中村貴、椎名博子、宮本純子、武山健一、加藤茂明 ( 東大・分生研 )

( 日本分子生物学会、神戸、平成 16 年 12 月 8 日 ~ 12 月 11 日 )

22) 「 ビタミンDの骨芽細胞への直接作用の分子機構 」

山本陽子、吉澤達也、福田亨、加藤茂明 ( 東大・分生研 )

( 日本分子生物学会、神戸、平成 16 年 12 月 8 日 ~ 12 月 11 日 )

ポスター発表 ( 国内26件、海外2件 )

14年度

日本農芸化学会大会 ( 藤沢・平成 15 年 3 月 31 日 ~ 4 月 3 日 )

1) 「 アンドロゲンレセプター転写制御機構における mediator TRAP 240 の機能解析 」

武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、加藤茂明 ( 東大・分生研 )

2) 「 ショウジョウバエを用いたヒトエストロゲンレセプター転写制御機構の解明 」

伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、加藤茂明 ( 東大・分生研 )

平成 15 年度

日本分子生物学会大会 ( 神戸・平成 15 年 12 月 10 日 ~ 12 月 13 日 )

1) 「 脳の性差とその性分化を誘導するアンドロゲン受容体の機能 」

松本高広、佐藤隆史、河野博隆、渡辺資之、植松良勝、福田亨、山田高嗣、山本陽子、中村貴、吉村公宏、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、加藤茂明 ( 東大・分生研 )

- 2)「アンドロゲンレセプター転写制御機構における mediator TRAP 240 の機能解析」  
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、山形薫、趙越、Alexander Kouzmenko、加藤茂明（東大・分生研）
- 3)「癌抑制遺伝子 BRCA1 は GCN5 複合体と結合し、転写活性と DNA 損傷修復の両機能を促進する」  
大石元、北川浩史、高田伊知郎、和田修、柳沢純、加藤茂明(東大・分生研)
- 4)Williams Syndrome transcription factor (WSTF) 遺伝子欠損マウスの作製と解析」  
吉村公宏、北川浩史、植松良勝、福田亨、山本陽子、渡辺資之、中村貴、田中佐依子、椎名博子、宮本純子、松本高広、加藤茂明（東大・分生研）
- 5)「骨格パターンニングにおける性差形成因子の同定」  
田中佐依子、松本高広、山田高嗣、盛真友、佐藤隆史、Pierre Chambon、加藤茂明(東大・分生研)
- 6)「MAPkinaseNLK による新たな核内レセプターPPAR 転写抑制機構の解析」  
高田 伊知郎、須澤 美幸、武山 健一、松本 邦弘、加藤 茂明（東大・分生研）
- 7)「Cre/loxP システムを用いたアンドロゲン受容体点変異マウスの作成」  
渡辺資之、松本高広、渡部徹郎、福田亨、関根圭輔、中村貴、吉村公宏、田中佐依子、椎名博子、宮本純子、宮園浩平、加藤茂明（東大・分生研）
- 8)「グルココルチコイド受容体抗炎症性共役因子群同定の試み」  
清水崇史、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明（東大・分生研）
- 9)「ダイオキシン受容体を介したエストロゲン受容体制御機構の解析と相互作用複合体精製の試み」  
大竹史明、馬場敦史、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明  
(東大・分生研)
- 10)「破骨細胞特異的性ステロイドホルモンレセプター遺伝子欠損マウス作出の試み」  
中村 貴、渡辺 資之、福田 亨、山本 陽子、松本 高広、吉村 公宏、宮本 純子、椎名 博子、田中 佐依子、盛 真友、中道 裕子、佐藤 隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤 茂明（東大・分生研）
- 11)「新規クロマチンリモデリング複合体WINACによるビタミンD<sub>3</sub> 1-水酸化酵素遺伝子発現調節機構の研究」  
藤木亮次、金美善、北川浩史、加藤茂明（東大・分生研）
- 12)“ Study of the mechanism of Cell Cycle regulation by a novel Nuclear Receptor Co-Repressor Dev-CoR ”  
竹澤慎一郎、柳靖雄、高田伊知郎、加藤茂明（東大・分生研）

Keystone Symposium 2004 (米国、コロラド・平成 16 年 2 月 28 日 ~ 3 月 4 日)

13) “Androgen Receptor Functions in Brain Masculinization and Behaviors”

松本高広、佐藤隆史、河野博隆、渡辺資之、植松良勝、福田亨、山田高嗣、山本陽子、中村貴、吉村公宏、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、加藤茂明（東大・分生研）

14) “Suppression of PPAR $\gamma$  function by CaMKII-TAK1-NLK signaling”

高田伊知郎、須沢美幸、加藤茂明（東大・分生研）

日本農芸化学会大会（広島・平成16年3月28日～3月31日）

15) 「破骨細胞特異的性ステロイドホルモンレセプター遺伝子欠損マウス作出の試み」

中村貴、渡辺資之、福田亨、山本陽子、松本高広、吉村公宏、宮本純子、椎名博子、田中佐依子、盛真友、中道裕子、佐藤隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤茂明（東大・分生研）

16) 「MAPkinaseNLKによる新たな核内レセプターPPAR 転写抑制機構の解析」

高田伊知郎、須沢美幸、武山健一、松本邦弘、加藤茂明（東大・分生研）

17) 「アフィニティーカラムを用いた FXR 新規転写共役因子複合体の精製の試み」

馬場敦史、大竹史明、高田伊知郎、加藤茂明（東大・分生研）

18) 「ショウジョウバエにおけるエクダイソン/幼若ホルモンによるエクダイソンレセプター転写制御メカニズムの解明」

真木彰郎、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、城出裕子、趙越、山形薫、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明（東大・分生研）

19) 「マウスY染色体ライブラリー作製および機能遺伝子群同定の試み」

秋本千央、池郁生、盛真友、松本高広、加藤茂明（東大・分生研）

20) 「組み換えヒストンタンパクを用いたクロマチンアッセイ系の構築」

佐々木 康匡、藤木 亮次、北川 浩史、高田 伊知郎、加藤 茂明（東大・分生研）

平成16年度

日本分子生物学会（神戸・平成16年12月8日～12月11日）

1) 「non-canonical Wnt pathwayによる核内レセプターPPAR 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（東大・分生研）

2) 「ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体のクロストークを制御するユビキチンリガーゼ複合体の精製」

大竹史明、馬場敦史、三木ひろみ、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明（東大・分生研）

3) 「分子遺伝学的アプローチによるヒト性ステロイドホルモンレセプター新規転写制御因子の網羅的Screening系の構築」

伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、城出裕子、鈴木絵里子、真木彰郎、Yue Zhao、山形薫、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明（東大・分生研）

4) 「ショウジョウバエエクダイソンレセプター転写制御を介したエクダイソン/幼若ホル

モン拮抗的作用メカニズムの解明」

真木彰郎、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、城出裕子、趙越、山形薫、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明（東大・分生研）

5)「アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である」

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、菅野純、吉川裕之、加藤茂明（東大・分生研）

6)「アンドロゲンレセプターを介した E2F-1/Rb 転写制御機構の解析」

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、Alexander Kouzmenko、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明（東大・分生研）

(3)特許出願

なし

(4)新聞報道等

新聞報道

1)掲載誌：毎日新聞

年月日：平成15年5月29日

表題：ダイオキシンの作用 東大教授ら解明 特定蛋白と結合

2)掲載誌：読売新聞

年月日：平成15年5月29日

表題：ダイオキシンの環境ホルモン作用 東大教授ら解明

仕組みの詳細解明

3)掲載誌：日刊工業新聞

年月日：平成15年6月27日

表題：遺伝性ウィリアムス病 東大教授ら発見 原因物質を発見

4)掲載誌：日本工業新聞

年月日：平成15年6月27日

表題：ウィリアムス病の原因 東大教授ら発見 ビタミンD受容体と結合

受賞

1)学会名：日本骨代謝学会

受賞名：日本骨代謝学会奨励賞

年月日：平成16年8月6日

(山本陽子)

- 2) 学会名：日本骨代謝学会  
受賞名：日本骨代謝学会優秀演題賞  
年月日：平成16年8月6日  
(中村貴)
- 3) 学会名：アメリカ骨代謝学会  
受賞名：Young Investigator Award  
年月日：平成16年10月4日  
(山本陽子)
- 4) 学会名：アメリカ骨代謝学会  
受賞名：Young Investigator Award  
年月日：平成16年10月4日  
(中村貴)
- 5) 学会名：日本農芸化学会  
受賞名：BBB論文賞  
年月日：平成17年3月28日  
(武山健一)

#### (5) その他特記事項

なし

## 7. 結び

CRESTでの研究成果が一定の評価を得てSORSTの支援の下、約2年間研究を継続・展開できたことは非常に幸運であった。しかしながら、SORST提案期間終了を待たずにERATOに移行できたことは、更なる幸運ではあったが、一方でSORST提案を途中で断念せざるを得ない部分があったことは、残念であった。また、CRESTでの研究成果を十二分には発展できなかった部分も認めざるを得ないことを付け加えたい。

CREST/SORSTの研究経費の運用については、研究代表者にほぼ一任されるため、かなり思い切った研究展開を考えることができた。一般に、科研費の多くは三年単位であること、また教室員の多い研究室運用には一部のみでしか満たないため、どうしても短期的な成果を求める傾向にあると思う。それに比べ、CREST/SORSTのような大規模かつ長期的なグラントは、申請した研究課題に加え、派生した研究課題にも十分吟味する時間と余裕を与えてくれたと思う。このことは、今回ERATOに発展できた大きな理由の一つであった。当初、核内ステロイドレセプター群による遺伝子発現制御の分子機構を、レセプター機能から詳細に解析したが、CREST後半からレセプターに結合する共役因子群の重要性に気付き、軸足

を移した。その成果は、SORST の支援の下大きく結実することができたと思う。更に、SORST ではこの共役因子群が複合体を形成することが必須であることに気付き、ERATO ではこの複合体機能に絞って研究を展開する予定である。このように連続的に科学技術振興機構に支援頂いたことは、当研究チームにとって正しく生命線であったと言える。

この SORST 期間中に、旧棟から新棟に引っ越しを行い、若干ではあったがスペースを拡大することができた。そのため、研究の効率化を図るため、数多くの実験機器を購入することができ、写真にあるように効率的な研究室に増強することができた。SORST での研究成果については未発表のものが多いが、ERATO 期間内には公表し、一つの研究発展の証しとしたい。改めて、科学技術振興機構に厚く御礼申し上げたい。

※本プロジェクトの研究代表者であった加藤茂明 氏については、同氏が主宰する研究室において論文の不正行為があったことが東京大学において認定されています。認定された不正行為には、本プロジェクトの研究成果とされた論文の一部が含まれています。詳細は、下記をご参照下さい。

[http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01\\_261226\\_j.html](http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_261226_j.html). <http://www.u-tokyo.ac.jp/content/400007786.pdf>. [http://www.jst.go.jp/osirase/20160325\\_oshirase-2.html](http://www.jst.go.jp/osirase/20160325_oshirase-2.html)