

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究

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

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。性ステロイドホルモンは核内レセプターを介した標的遺伝子群の転写制御によりその作用を現す。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性レセプターの転写促進領域の同定、及びこれらレセプターの転写共役因子を同定する。

A. 研究目的

核内レセプターを有する脂溶性ホルモンは、各組織において特徴ある生理活性を示す。このような組織特異的な生理作用はレセプターの生体内局在のみでは説明できず、むしろレセプターの細胞種特異的な機能によると考えられるようになってきている。このような組織特異性は、最近核内レセプターと相互作用する核内共役因子群が担うものと考えられている。従って、本研究では内分泌かく乱物質の標的分子としての転写共役因子の機能を探るものである。共役因子は、核内レセプターと基本転写因子群とを仲介し、転写制御に必須な構成因子と考えられているため、組織特異的なホルモン作用の理解にはこの共役因子の同定と性状解析は必須と考えられる。そこで本アプローチでは、特に組織特異的な作用が知られる性ステロイドホルモン（エストロゲン：女性ホルモン、アンドロゲン：男性ホル

モン）共役因子を中心に据える。

B. 研究方法及び結果

1. 核内性ステロイドホルモンレセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これに関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれらの転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター（ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ）をモデルとして、ER分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子（SRC-1/TIF2/AIB1、

p300/CBP) と女性ホルモンレセプター (TRAP/DRIP220) の相互作用を中心に調べp300/CBPはN末側転写促進能に関与することを明らかにした。

## 2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進する co-activator と転写を抑制する co-repressor の存在が知られている。しかしながらこれら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミンDレセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNAスクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。その結果、ERのN末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する p68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。p68はcDNAクローニングの結果、RNAヘリケースの1種であることが判明し、AR、MR、VDRへの効果についても調べたところ全く効果がなく、ER $\alpha$ 特異的であることが判明した。(FIG. 1-3)

## C. 考察及び結論

現在、同様の手法により p72 RNAヘリケースを同定しており、それらの性状解析を急いでいる。以上のアプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期

待している。

今後は同定した転写共役因子群が内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

## D. 研究発表

### 1. 発表論文 (原著)

1. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).

2. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).

3. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 2000 (in press).

4. Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, **21**, 138-141, 1999.

5. Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1049-1055, 1999.

6. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5363-5372, 1999.
7. Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional coactivators. *Science*, **283**, 1317-1321, 1999.
8. Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- $\beta$  signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12971-12974, 1999.
9. Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, **45**, 631-638, 1999.
10. Kitanaka, S., Murayama, A., Sakaki, T., Inoue, K., Seino, Y., Fukumoto, S., Shima, M., Yukizane, S., Takayanagi, M., Niimi, H., Takeyama, K., Kato, S.: No enzyme activity of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 4111-4117, 1999.
11. Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in intact animals. *Endocrinology*, **140**, 2224-2231, 1999.
12. Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, **140**, 2125-2133, 1999.
13. Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, **140**, 1005-1008, 1999.
14. Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S.,

Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase coexpression with adrenodoxin and NADPH-adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.*, **265**, 950-956, 1999.

15. Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase expressed in *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.*, **259**, 731-738, 1999.

16. Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: *In vivo* function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 247-251, 1999.

17. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **156**, 7-12, 1999.

18. Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A *trans*-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 248-255, 1999.

19. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **156**, 7-12, 1999.

20. Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., Kojima, S.: Increased 9,13-di-*cis*-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- $\beta$  mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, **30**, 1073-1080, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

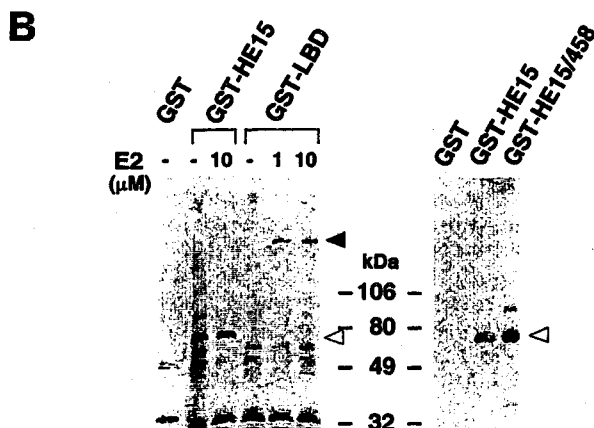
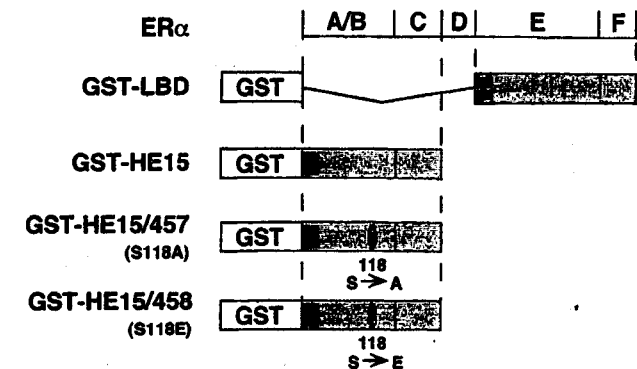


FIG. 1. Detection of binding proteins to the hER $\alpha$  A/B domain in MCF-7 cells. (A) The hER $\alpha$  (with regions A to F shown) and the GST-ER fusion proteins used. (B) Binding proteins to the hER $\alpha$  A/B domain in MCF-7 cells. Aliquots of the  $^{35}\text{S}$ -labeled MCF-7 nuclear extract were incubated with glutathione-Sepharose beads loaded with GST alone, GST-HE15, GST-HE15/458, GST-HE15/457, or GST-LBD in the absence or presence of E2 at 1 and 10  $\mu\text{M}$ . The bound proteins were subjected to SDS-PAGE (5 to 20% polyacrylamide gradient gel) followed by autoradiography. Open arrowheads indicate the position of a protein of 68 kDa. Size markers are indicated in kilodaltons. The solid arrowhead indicates the position of the SRC-1/TIF2 160-kDa family proteins (9, 14).

MSGYSSDRDR GRDRGFGAPR FGGSRAGPLS GKKFGNPGEK LVKKKWNLDE LPKFEKNFYQ 60

EHPDLARITA QEVETYYRSK EITVRGHNCP KPVLNIFYEAN FPANVMDVIA RQNFTEPTAI 120

QAQGWPVALS GLDMVGVAQT GSGKTLLSYLL PAIVHINHQP FLERGDGPIC LVLAPTRELA 180

QQVQQVAAEY CRACRLKSTC IYGGAPKGPQ IRDLERGVEI CIATPGRLLID FLECGKTNLR 240

RTTYLVLDEA DRMLDMGFEP QIRKIVDQIR PDRQTLMWSA TWPKEVRQLA EDFLKDYIHI 300

NIGALELSAN HNLIQIVDVC HDVEKDEKLI RLMEEIMSEK ENKTIVFVET KRCDELTRK 360

MRRDGPAMG IHGDKSQOER DWVLNEFKHG KAPILIATDV ASRGLDVEDV KVVINYDYPN 420

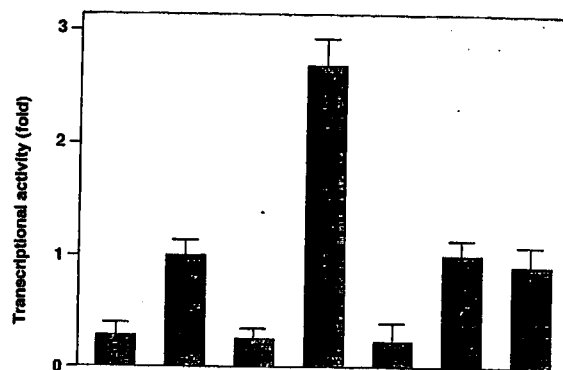
SSEDIHRIQ RTARSTKTGT AYTFFTPNNI KOVSDLISVL REANQAINPK LLQLVEDRGS 480

GRSRGRGGMK DRRDRYSAG KRGGFNTFRD RENYDRGYSS LLKRDFGAKT QNGVYSAANY 540

TNGSFGSNFV SAGIQTSFRT GNPTGTQYQNG YDSTQQYGSN VPMNHGMNQ QAYAYPATAA 600

APMIGYPMPT GYSQ 614

FIG. 2. Amino acid sequence of human p68 RNA helicase protein. The five sequences determined by microsequencing are underlined and completely matched to the reported p68 RNA helicase protein (GenBank accession no. X15729 and X52104). The nuclear receptor recognition motif (LXXLL motif [15]) is doubly underlined, and the DEAD box motif is boxed.



E2	-	-	-	-	-	-	+
GAL4	+	-	-	-	-	-	-
GAL4-p68	-	+	-	+	-	+	+
VP16-HE15	-	-	+	+	-	-	-
VP16-LBD	-	-	-	-	+	+	+

FIG. 3. p68 interacts with the hER $\alpha$  A/B domain but not with the LBD in vivo. p68 interacts with the hER $\alpha$  A/B domain in the mammalian two-hybrid system. A mammalian two-hybrid system with GAL4-p68 fusion protein and VP16-ER fusion proteins (VP16-HE15 and VP16-LBD) was used in COS-1 cells. COS-1 cells were cotransfected with 1  $\mu\text{g}$  of either GAL4-DBD, GAL4-p68, VP16-HE15, or VP16-LBD in the presence or absence of E2 ( $10^{-7}$  M), along with 2  $\mu\text{g}$  of 17M2G-CAT reporter plasmid. Significant interaction was detected only between p68 and the hER $\alpha$  A/B domain.