

「生命活動のプログラム」
平成9年度採択研究代表者

加藤 茂明

(東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

「遺伝情報制御分子としてのステロイドレセプター」

1. 研究実施の概要

核内ステロイドレセプターの転写制御能を解析することを目的に、核内ステロイドレセプターと相互作用する転写共役因子群の同定・性状解析を行なった。今年度は、ヒトエストロゲンレセプター(hERα)に相互作用する転写共役因子p72を同定した。p72は、既に我々が報告したp68RNAヘリケースと同様の機能を有すること、更に昨年見出されたRNA共役因子の結合タンパクであることを証明した。その他、いくつかの転写共役因子候補因子群の性状解析を行なっている。

2. 研究実施内容

「目的」

核内ステロイドレセプターによる転写促進制御の分子メカニズム解明を目的に、新規核内ステロイドレセプター転写共役因子群の同定及び性状解析を行なった。同定された転写共役因子群の機能をin vitro系及びin vivo系で評価する。

「方法」

ヒトステロイドレセプター(ERα)、ヒト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)の2ヶ所にある転写促進領域のうち、レセプタータンパクN末端A/B領域に存在するAF-1に相互作用する因子群の同定を酵母two-hybrid法や生化学的手法により試みた。同様の手法により転写共役因子(AIB1)の相互作用因子の同定を試みた。

「結論」

ERα、AR、MRのAF-1に相互作用するいくつかの転写共役因子候補因子群を取得し、その性状解析を行なっているところである。一方、AIB1の相互作用因子の1つ、p72DEAD-boxタンパクは、我々が既に報告したERαAF-1転写共役因子p68と構造と機能が酷似した1つのサブファミリーを形成することが判明した。p72/p68は、ともにDEAD-boxを持ちRNA結合能を有するが、実際RNA転写共役因子SRAと直接結合し、SRAと協調的にERαの機能を亢進することも見出した。このことから、p72/p68は、ERαAF-1と既知AF-2転写共役因子AIB1と機能的な橋渡しをするとともにSRAとも転写共役因子複合体を形成すると考えられた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 410-414, 2000.

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.*, 267, 311-316, 2000.

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.

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.

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 α . *Mol. Cell. Biol.*, 19, No. 8, 1999.

Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.

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- β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 12971-12974, 1999.

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 D3 1 α -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4111-4117, 1999.

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.

Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Koderu, Y., Kawacushi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 α -

hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ in intact animals. *Endocrinology*, 140, 2224-2231, 1999.

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.

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.

Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D $_3$ 1 α -hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 731-738, 1999.

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- β mediated fibrogenesis in vivo. *J. Hepatol.*, 30, 1073-1080, 1999.

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.

Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inoue, S., Hirose, K., Iino, M., Hagiwara, M.: Detection of cAMP-induced phosphorylation with a novel fluorescent indicator. *Nat. Biotechnol.*, 18, 313-316, 2000.

Sakaguchi, H., Wada, K., Maekawa, M., Watsuji, T., Hagiwara, M.: Song-induced phosphorylation of cAMP response element binding protein in the songbird brain. *J. Neuroscience*, 19, 3973-3981, 1999.

Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A., Hagiwara, M.: The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by the direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.*, 274, 11125-11131, 1999.

Sanchez, I., Xu, C.-J., Juo, P., Kakizuka, A., Blenis, J., Yuan, J.: Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron*, 22, 623-633, 1999.

Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Sasaki, H., Takeda, K., Ichijo, H., Kakizuka, A.: Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated

SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes to Cells*, 4, 743-756, 1999

Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Orimo, A., Inoue, M.: Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.*, 59, 5917-5921, 1999.

Orimo, A., Inoue, S., Minowa, O., Tominaga, N., Tomioka, Y., Sato, M., Kuno, K., Hiroi, H., Shimizu, Y., Suzuki, M., Noda T., Muramatsu, M.: Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein (efp) gene, which is a direct target of estrogen receptor α (ER α). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 12027-12032, 1999.

Inoue, S., Urano, T., Ogawa, S., Saito, T., Orimo, A., Hoshi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M.: Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 412-418, 1999.

Orimo, A., Tominaga, N., Suzuki, M., Kawakami, T., Kuno, J., Sato, M., Minowa, O., Inoue, S., Kato, S., Noda, T., Muramatsu, M.: Successful germ-line transmission of chimeras generated by coculture aggregation with J1 ES cells and eight-cell embryos. *Anal. Biochem.*, 269, 204-207, 1999.

Hiroi, H., Inoue, S., Watanabe, T., Goto, W., Orimo, A., Momoeda, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Muramatsu, M.: Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. *J. Mol. Endocrinol.*, 22, 37-44, 1999.

Watanabe, T., Inoue, S., Hiroi, H., Orimo, A., Muramatsu, M.: NMDA receptor type 2D gene as target for estrogen receptor in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 63, 375-379, 1999.