

《農芸化学奨励賞》

核内レセプターリガンドの生理作用発現機構に関する研究



東京大学分子細胞生物学研究所 助手 武山 健一

1. はじめに

ステロイドホルモン・ビタミンA・ビタミンDは生体の恒常性維持、生殖、発生など多彩な生理作用を有しているが、その作用機序は核内レセプターのリガンドとして、標的遺伝子の転写調節により発揮することが知られている。本研究ではこれら核内レセプターリガンドの生理作用を分子レベルで理解することを目的に、リガンド産生機構およびリガンド依存的な核内レセプターの転写制御機構を把握することに着目した。その過程で新たな手技を開発・展開し、新たな概念を提唱することができた。なかでも図1に示すよう、以下の3点について焦点を絞り報告したい。

2. 核内レセプターリガンド産生鍵酵素遺伝子の発現クローニング法の開発と制御解析

腎臓近位尿細管で機能する活性型ビタミンD3産生鍵酵素の1α(OH)aseはその存在が30年以上も古くから推測されていたが、遺伝子本体は不明であった。すでに同研究室ではビタミンDレセプター(VDR)遺伝子欠損マウスが作出され、血中活性型ビタミンD濃度が高値であることを見いだしていた。われわれはこれを1α(OH)aseの高発現と考えこのマウス腎臓由来cDNAライブラリーを作成し、探索を試みた。同時にVDR転写活性を指標とした新たな発現クローニング法を開発した。前駆体から産生される活性型ビタミンD3濃度をリガンドとして作用するVDR転写活性強度として評価した。すなわち前駆体である25(OH)D<sub>3</sub>はVDR転写活性を示さないが、1α(OH)aseが発現した細胞は活性型ビタミンD3である1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が産生され、VDRリガンドとして転写活性を示すようになる。転写活性はβ-ガラクトシダーゼの活性に置き換え、後に細胞を染色した。その結果、VDRKOマウス腎臓由来cDNAライブラリーの導入により、前駆体がリガンドとして作用する細胞を検

出することに成功した。そこでこの染色細胞からcDNAを抽出し、単離・同定することに世界に先駆け成功した。その結果、1α(OH)ase遺伝子は他のビタミンD合成にかかわる二つの酵素遺伝子と高い相同性を示し、かつ種を超えて高く保存されていることが明らかとなった。さらにこの遺伝子発現は活性型ビタミンD3によりVDRを介して転写レベルで負に制御されていることが判明した。これにより図2に示すよう、ビタミンD産生を制御する二つの酵素遺伝子の発現調節機構には各々独立したVDRを介した転写制御機構が存在し、ビタミンD産生・

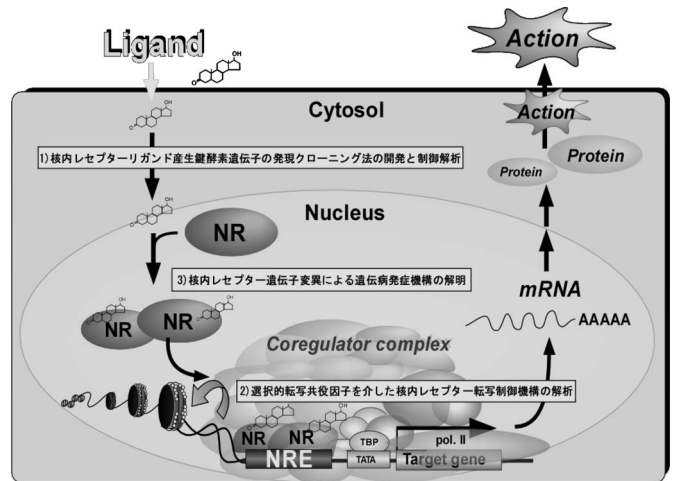


図1 核内レセプター転写制御機構の概念図  
核内レセプターリガンドは標的組織核内の核内レセプターと結合し、標的遺伝子の転写を制御してその生理作用を発揮する。本研究はリガンド産生機構とリガンド依存的な核内レセプターの転写制御機構解明を目的とし、新たな手技を開発し研究展開した。

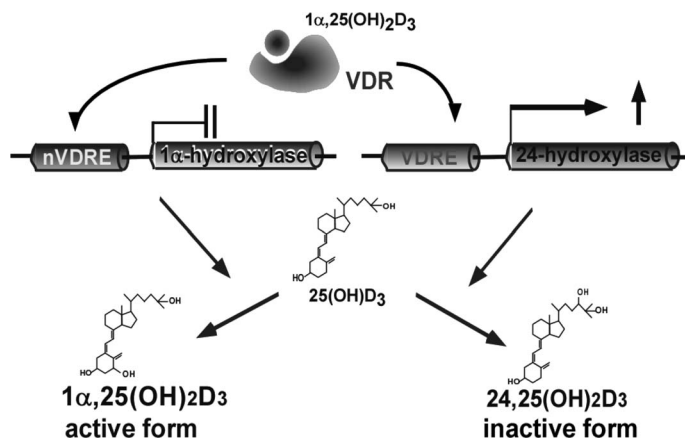


図2 活性ビタミンD3産生鍵酵素1α(OH)aseの遺伝子発現抑制機構  
1α(OH)aseは活性型ビタミンD3を産生する鍵酵素である。この遺伝子単離・制御解析により、活性型ビタミンD3依存的なVDRを介した1α(OH)ase遺伝子発現の抑制分子機構が明確となった。

代謝機構を分子レベルで明確にすることに成功した。またこの遺伝子の単離は VDR を介した新たな転写抑制化機構解明の糸口となる標的抑制遺伝子として基礎的研究進展を導いた。一方、取得したマウス遺伝子の相同性からヒト遺伝子を同定し染色体位置を確認した結果、この遺伝子が遺伝性くる病 I 型の連鎖解析による染色体位置と合致した。さらに遺伝性くる病 I 型患者末梢血由来 DNA を用いてこの遺伝子配列を解読したところ、この遺伝子中には変異が存在し、この遺伝子変異を発現させた  $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  が酵素活性を示さないことを見いだした。すなわち、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  遺伝子が遺伝性くる病 I 型の原因遺伝子であることが判明した。

### 3. 選択的転写共役因子を介した核内レセプター転写制御機構の解析

核内レセプターの転写制御機構は複数の転写共役因子複合体が仲介し合理的に成し遂げられている。転写共役因子の機能は主として標的遺伝子プロモーターの足場を整えるヒストン・ヌクレオソームを基本骨格としたクロマチン構造を認識し、その構造変換に重要と考えられている。現在までに約 6 種類の独立した転写共役因子複合体が経時的に核内レセプターと結合・解離することが提唱されている。なかでもヒストンアセチル化転移酵素活性をもつ転写共役因子群 p160 は構造・機能が保存される SRC-1、TIF2、AIB-1 の 3 種が存在するが、リガンド依存核内レセプターとの結合・認識特異性は認められなかった。すなわち選択的転写共役因子の使い分けの意味は判然としていなかった。そこで VDR とこれら SRC-1、TIF2、AIB-1 のリガンド依存結合能についてビタミン D3 合成アナログ OCT を用いて検討した。OCT は活性型ビタミン D3 に比べ強い細胞分化誘導能をもつことが知られる化合物である。

GST pull-down assay および細胞内 two-hybrid assay の結果、図 3 に示すように OCT が、VDR と TIF2 との結合を強く誘導するにもかかわらず、VDR と SRC-1 や AIB-1 との結合はほとんど誘導しないことが判明した。さらに OCT による VDR 転写活性は SRC-1 および AIB-1 では促進効果は認められず、TIF2 のみで顕著な促進が認められた。つまり活性型ビタミン D3 と OCT が結合した VDR のリガンド結合形態は異なる構造を招き、VDR と p160 の結合に選択性を示すことが示

唆された。選択的な転写共役因子と結合する意義は、VDR の異なる標的遺伝子や VDR 機能を導くと予想され、化合物のもつ特異的作用の一端を担うと考えられる。

### 4. 核内レセプター遺伝子変異による遺伝病発症機構の解明

アンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子内のグルタミン残基をコードする CAG 配列伸長異常はポリグルタミン病の一種である球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の原因であり、中年男性のみ発症し最終的には致死となる極めて重篤な神経変性疾患を生じる。ところが SBMA の発症が男性特異的である分子機構は長年不明であった。ポリグルタミン病として類似した表現型にはハンチントン舞蹈病や脊髄小脳失調症が挙げられる。これら発症メカニズムやタンパク質局在、発症抑制などのさまざまな解析は、これら原因遺伝子を導入したトランスジェニックショウジョウバエ個体の光受容体の神経変性 rough eye で観察、検討されていた。そこでわれわれはポリグルタミン伸長異常型 AR (polyQ-AR) 遺伝子を導入したトランスジェニックショウジョウバエを作製し、発症メカニズムの分子解剖を試みた。

polyQ-AR を個体に発現させたショウジョウバエは、当初全く異常な表現型を示さなかった。この現象は強烈な神経変性を表す他のポリグルタミン病モデルショウジョウバエの表現型とは全く異なり、予想に反した。しかしこのショウジョウバエに男性ホルモンであるアンドロゲンを与えると顕著な rough eye が現れた。すなわち神経変性誘導はアンドロゲン依存的であった。この現象を詳細に詰めるため、各機能領域が欠損した polyQ-AR 変異体を用いて検討した。その結果、リガンド結合領域の欠損変異体ではリガンド有無にかかわらず、顕著な神経変性が現れた。またこの表現型はリガンド結合領域のみを発現するトランスジェニックショウジョウバエと交配させることで回復した。また核外移行シグナル (NES) 融合型 polyQ-AR 変異体でも全く表現型は現れないことが判明した。これらのことからアンドロゲンが結合した際の polyQ-AR の核内移行ならびに構造変化が神経変性誘導の引き金になると考えられ、SBMA はアンドロゲン依存性の神経変性疾患であることが強く示唆された。すなわち、SBMA の男性特異的な発症理由は、女性よりもアンドロゲン濃度が高い男性で生じると推測できた。この遺伝病の保因者は 5 万人に 1 人以下と希な遺伝性疾患

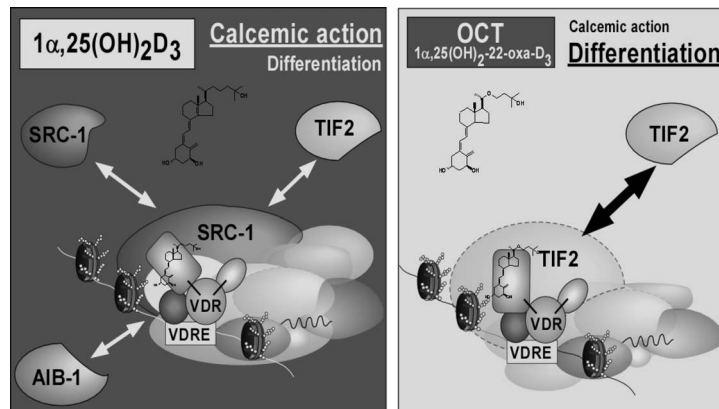


図 3 ビタミン D アナログによるビタミン D レセプターと転写共役因子の選択的相互作用機構

核内レセプターはリガンド依存的に転写共役因子と結合し転写抑制を発揮する。活性型ビタミン D3 に対し強い細胞分化誘導能を示すビタミン D アナログ (OCT) は、VDR と p160 (TIF2) との結合能に強い選択性を示した。すなわち OCT が VDR の特異的構造変化を伴い特異的な転写共役因子との結合を導くと考えられた。この意味は OCT が示す特異的生理作用は、選択的転写共役因子を介した特異的標的遺伝子や特異的 VDR の転写制御に依存する可能性が考えられた。

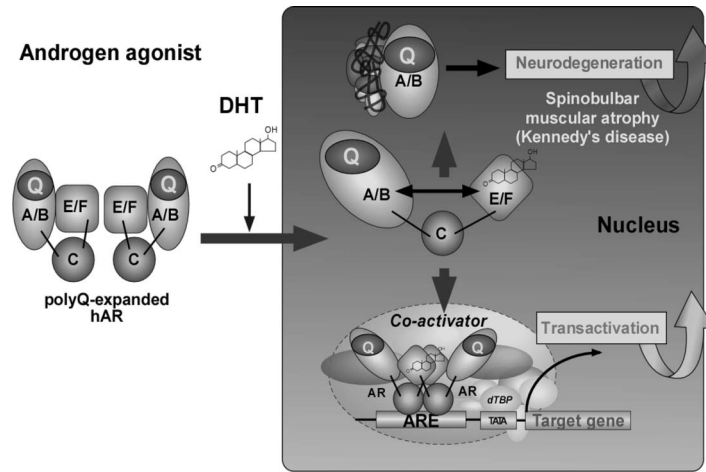


図4 ポリグルタミン伸長異常型アンドロゲンレセプターはアンドロゲン依存的に神経変性を呈する。アンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子内のグルタミン残基をコードする CAG 配列伸長異常は球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) を誘導する。SBMA は中年男性のみ発症し致死となる神経変性疾患である。この神経変性機構は polyQ-AR のアンドロゲン依存的な構造変化と核内移行で生じることを見いだした。

ではあるが、致死であることを考慮すると抗アンドロゲン治療薬の開発は必須といえ、今後このトランスジェニックジョウバエは創薬探索に貢献できると予想する。

おわりに

本研究が多くの方々に支援され成し遂げることができたことに深く敬意を表し、謝辞を述べさせていただきます。本研究は東京大学分子細胞生物学研究所において遂行しました。研究遂行にあたり終始ご指導ご鞭撻を賜り、本奨励賞にご推薦くださいました東京大学分子細胞生物学研究所・加藤茂明教授に心より厚く御礼申し上げます。加藤教授にはこれまで15年間、研究の魅力と厳しさの礎を導いていただくことに始まり、研究概念の本質を探究する視点、実験から論文作成まで実践的内容の細部に至るまで、つねにご丁寧にご指導いただきました。その研究生活は非常に有意義でありました。さらにその間、多くの方々に会うことができ共同研究をさせていただいたことは、研究の枠を超え大きな糧となりました。農芸科学者としての精神は東京農業大学の舛重正一名誉教授および大学院時代の諸先

輩方に授かりました。共同研究者であった北中幸子先生、村山明子先生、東京大学分子細胞生物学研究所・多羽田哲也教授、谷本拓博士には労をいとわず多大なるご支援を賜りましたこと御礼申し上げます。当教室の助手をされていた筑波大学の柳沢純教授、同期生の新潟大学歯学部助手・吉沢達也先生、日本大学大学院総合科学研究科講師・舛広善和先生とは昼夜を問わず徹しく楽しい研究生活が励みになりました。また現在一緒に研究に没頭しご討論いただく助手の北川浩史先生、高田伊知郎先生、松本高広先生、支援して下さる伊藤紗弥博士、沢津橋俊博士、金美善博士、大学院生の鈴木絵里子氏、田辺真彦氏、木村周平氏をはじめとした多くの在校生、卒業生に深く感謝申し上げます。最後に本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・太田明德先生に厚く御礼申し上げます。奨励賞授与を研究の励みとして慎んで受け止め、今後さらなる生命科学の基礎研究発展に貢献できるよう精進して参りたく思います。