



Title	核内レセプター転写共役活性化因子の機能に関する分子生物学的研究
Author(s)	荒井, 重紀
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184268
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文題名

核内レセプター転写共役活性化因子の機能に
関する分子生物学的研究

2001 年

荒井重紀



博士論文題名

核内レセプター転写共役活性化因子の機能に関する
分子生物学的研究

2001 年

荒 井 重 紀

目 次

緒論	1
本論	4
第一章 ニワトリ p160 ファミリー遺伝子の単離と機能解析	4
第一節 ニワトリ p160 ファミリー遺伝子の単離	5
第二節 p160 ファミリーの種属間における相同性の検討	10
第三節 ニワトリ p160 ファミリーの発現量の解析	11
第四節 ニワトリ p160 ファミリーと核内レセプターの相互作用の解析	12
第五節 考察および小括	15
第二章 ACTR ノックアウト細胞および TIF2 ノックアウト細胞の作製	18
第一節 ACTR ノックアウト細胞の作製	19
第二節 TIF2 ノックアウト細胞の作製	21
第三節 ACTR ^{-/-} 細胞と TIF2 ^{-/-} 細胞内における p160 ファミリーの発現量の解析	23
第四節 考察および小括	25
第三章 核内レセプター転写制御機構における ACTR と TIF2 の機能	28
第一節 核内レセプター転写制御機構における ACTR の機能の解析	28
第二節 核内レセプター転写制御機構における TIF2 の機能の解析	30
第三節 TIF2 ^{-/-} 細胞における TIF2 と SRC-1 の過剰発現の影響	32
第四節 考察および小括	34
総括	37
結論	39
謝辞	40
参考文献	41

Abbreviations

AIB1	: amplified in breast cancer 1
ACTR	: activator of the thyroid and retinoic acid receptor
AD	: activation domain
AR	: androgen receptor
ARA	: androgen receptor activator
bHLH	: basic helix-loop-helix
CARM 1	: coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CBP	: CREB-binding protein
CREB	: cAMP response element binding protein
DBD	: DNA binding domain
ER	: estrogen receptor
GR	: glucocorticoid receptor
GRIP1	: glucocorticoid receptor interacting protein 1
HAT	: histone acetyltransferase
HDAC	: histone deacetylase
LBD	: ligand binding domain
Nco-A	: nuclear receptor co-activator
NcoR	: nuclear receptor co-repressor
NID	: nuclear receptor interaction domain
PAS	: period/aryl hydrocarbon receptor/single minded
p/CIP	: p300/CBP co-integrator associate protein
p/CAF	: p300/CBP-associated factor
PCR	: polymerase chain reaction
PPAR	: peroxisome proliferator activated receptor
PR	: progesterone receptor
RAC3	: receptor-associated co-activator 3
RIP140	: receptor interacting protein 140
RT-PCR	: reverse transcriptase coupled polymerase chain reaction
RXR	: retinoid X receptor
SRC	: steroid receptor co-activator
SMRT	: silencing mediator for RXR and TR
TIF2	: transcriptional intermediary factor 2
TR	: thyroid hormone receptor
TRAM-1	: TR activator molecule
VDR	: vitamin D receptor

緒 論

エストロゲン、グルココルチコイドなどのステロイドホルモンやレチノイン酸、甲状腺ホルモンなどの低分子脂溶性リガンドに対するレセプターは核内で遺伝子発現を制御する転写因子であり、核内レセプターと総称される遺伝子ファミリーを形成している。核内レセプターは細胞の増殖や分化、恒常性の維持などに関わる遺伝子の発現を調節しており、これまでに線虫から哺乳類まで 50 種類を超えるファミリー遺伝子が単離されている (1-5)。近年、核内レセプターと結合する転写共役因子が見い出され、核内レセプターのリガンド依存性の転写制御機構として転写共役因子を介するモデルが考えられている (Fig. 1)。リガンドが結合していない状態の核内レセプターは N-CoR、SMRT (6, 7) といった転写共役抑制因子 (コリプレッサー) を介して標的遺伝子の転写を抑制しているが、リガンドと結合した核内レセプターは転写共役活性化因子 (コアクチベーター) を介して、標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。

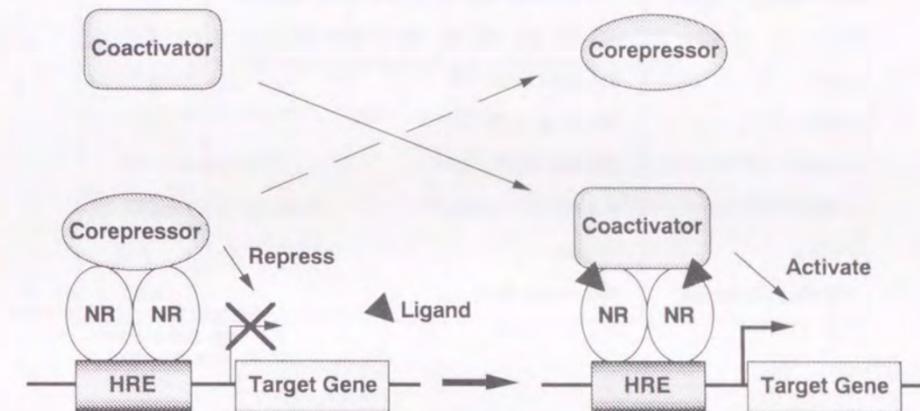


Fig. 1. Model of transcriptional regulation by nuclear receptor.

核内レセプターのリガンド依存的な転写活性化機構を考えると、リガンドが結合した時に初めてリクルートされてくる因子を想定すればその機構を説明することができる。そのような考えのもと核内レセプターとリガンド依存的に相互作用する因子が多数クローニングされてきた。現在までに報告されているコアクチベーター遺伝子には、一次構造が類似していることから p160 ファミリーまたは SRC ファミリーと呼ばれる SRC-1/NcoA-1 (8, 9)、TIF2/GRIP1 (10, 11)、p/CIP/ACTR/AIB1/RAC3/TRAM-1 (12-16) や、核内レセプター以外にも AP-1 や NF- κ B などの転写因子と相互作用をする CBP/p300 (17, 18)、アンドロゲンレセプター (AR) 特異的なコアクチベーターとして単離された ARA70 (19)、ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター γ (PPAR γ) 特異的なコアクチベーターとしてクローニングされた PGC2 (20)、TR や VDR とリガンド依存的に相互作用する複合体のサブユニットである TRAP220/DRIP205 (21, 22) などが単離されている。1996 年に CBP はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性をもつことが明らか

かにされ (23, 24)、その後、SRC-1 や ACTR も HAT 活性をもつことが明らかとなった (12, 13, 25)。また、コリプレッサー N-CoR と SMRT はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性を有するタンパク質と結合することが報告されている (26, 27)。これらの知見から、核内レセプターはリガンドと結合していない状態ではヒストン脱アセチル化酵素を含む複合体を形成し、ヒストンを脱アセチル化することにより転写を抑制しているが、リガンドと結合した核内レセプターはヒストンアセチル化酵素と会合することによりヌクレオソームを弛緩させ、転写を活性化するというモデルが提唱されている (28, 29)。

Table 1. Candidates of coactivators for nuclear receptors

Coactivator	Interactable Receptor	HAT Activity	
p160 family	ACTR	ER, RAR, RXR, TR, VDR	○
	SRC-1	AR, ER, GR, MR, PR, PPAR, RXR, TR, VDR	○
	TIF2	AR, ER, GR, MR, PR, RAR, RXR, TR, VDR	○
CBP	ER, RAR, RXR, TR	○	
p300	ER, RAR, RXR, TR	○	
p120	AR, TR	?	
ARA70	AR	?	
PGC-2	PPAR γ	?	
TRAP220/DRIP205	ER, PPAR, RXR, TR	N. D.	

? Not Determined
N. D. Not Detected

現在までに多数のコアクチベーター候補因子が単離されているが (Table 1)、これらのコアクチベーターとしての機能解析は遺伝子導入などの手法により、これらの分子を細胞内に過剰に発現させた条件で解析されており、過剰な発現による本来の基質以外の分子に働きかけている可能性や、内在するコアクチベーターの影響を受けるなどの問題点がある。これらの過剰発現の問題点を克服する方法として、酵母やマウス ES 細胞で行われている遺伝子ノックアウト法がある。すなわち、解析したい分子を細胞内から除去したときに、そこから消失する活性を解析する方法であり、この手法はコアクチベーターの機能を解明する上で有用な知見をもたらすと期待される。ゲノム上の特定遺伝子と相同的な配列をもつ DNA を細胞中に導入すると、ごく一部は染色体に組み込まれる (Fig. 2)。その大部分はランダムな位置での組換えだが、ごくまれに染色体上の相同部分と組換えを起こす。これは相同組換えと呼ばれ、遺伝子のノックアウトは解析したい遺伝子のゲノム配列を薬剤耐性遺伝子等に置換することにより行われる。しかし、通常の高等脊椎動物細胞では相同組換えの頻度が低く、酵母で用いられているような遺伝学的解析を適用した機能解析は容易ではない。ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 は例外的に相同組換えの確率が高く、そのため遺伝子のノックアウトが行いやすく、またホモ欠

損細胞の作製が可能のため、遺伝子の機能を細胞レベルで遺伝学的に解析することが可能である (30-32)。

本研究ではエストロゲンレセプター (ER)、甲状腺ホルモンレセプター (TR) をはじめ多くの種類の核内レセプターと結合し、*in vitro* における解析が最も行われている p160 ファミリーについて DT40 細胞を用いてノックアウト細胞を作製し、核内レセプターの転写制御における p160 ファミリーの機能上の差を検討した。

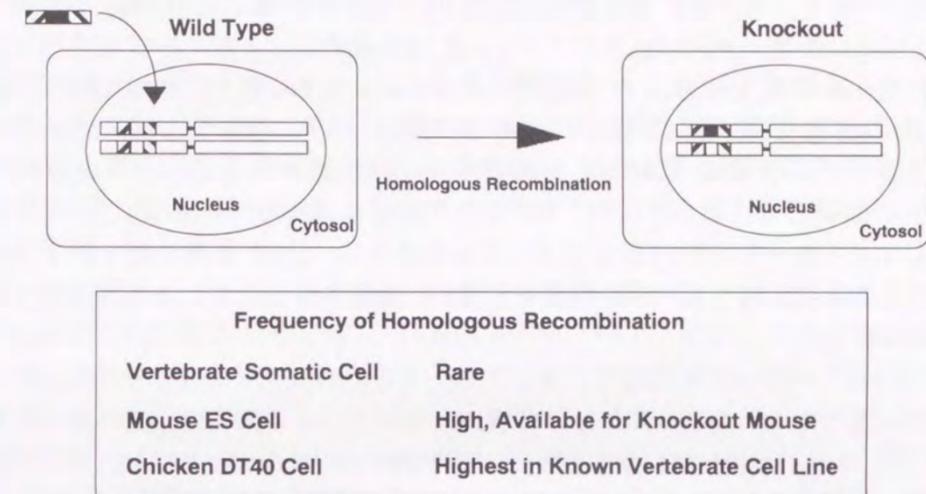


Fig. 2. Gene targeting by homologous recombination.

本 論

第一章 ニワトリ p160 ファミリー遺伝子の単離と機能解析

p160 ファミリーは一次構造の類似した分子量約 160 kDa のタンパク質をコードする遺伝子群であり (Fig. 3)、ACTR、SRC-1、TIF2 の 3 遺伝子がヒトとマウスから単離されている (8-16)。p160 ファミリーは N-末端側に basic helix-loop-helix (bHLH) ドメインと Per/Arnt/Sim タンパク質に保存された配列 PAS ドメイン (33)、中央に NR box と呼ばれる LXXLL 配列 (34) (L はロイシン、X は任意のアミノ酸) を 3 個含む核内レセプター相互作用領域 (NID)、C 末端側にグルタミンを多く含んだ領域を持つ。C 末端側には HAT 活性を持つ領域があり、CBP や P/CAF といった他の HAT 活性を持つ分子やヒストンメチル化酵素 CARM1 と相互作用する領域があることも報告されている (35-37)。これらのことから核内レセプターの転写制御における p160 ファミリーの機能はリガンドと結合した核内レセプターと相互作用し、HAT 活性を持つ因子等をリクルートすることによりクロマチン構造を変換し、転写を活性化させる作用を持つと予想されている。

p160 ファミリーを DT40 細胞でノックアウトするためには、ニワトリホモログの遺伝子情報が必要となる。ニワトリにおける核内レセプターの単離については多くの報告があるが (38, 39)、p160 ファミリー等のコアクチベーターの存在については全く明らかにされていない。そこでニワトリ p160 ファミリー遺伝子 cDNA のクローニングを、既知のヒトおよびマウスの p160 ファミリー遺伝子配列をもとにした RT-PCR 法およびスクリーニング法により行った。また、クローニングしたニワトリ p160 ファミリーについて yeast two-hybrid 法により機能解析を試みた。

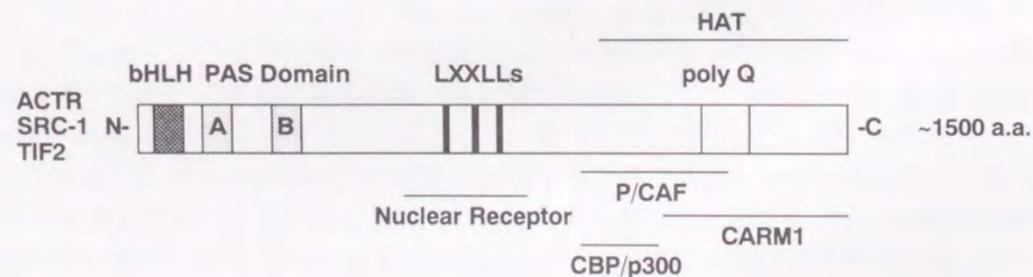


Fig. 3. Schematic representation of the structural domains of p160 family. The N-terminus contains the highly conserved bHLH and PAS A/B domains. The centrally located nuclear receptor interacting domain (NID) contains three LXXLL motifs. The C-terminus contains a glutamine-rich domain. The specific domains for interaction with nuclear receptor, P/CAF, CBP/p300 and CARM1, as well as the histone acetyltransferase (HAT) domain, are indicated.

第一節 ニワトリ p160 ファミリー遺伝子の単離

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬

制限酵素および修飾酵素は東洋紡績から購入した。ライゲーション反応には Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いた。その他の試薬は市販の特級試薬を使用した。ニワトリ脳 Poly (A)⁺ RNA は Clontech より購入した。

○ 細胞培養

ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 (京都大学 武田俊一教授より供与) は、RPMI1640 (日研生物医学研究所) に 0.24 mM 2-mercaptoethanol、10% 子牛血清 (GIBCO BRL)、1% ニワトリ血清 (JRH Bioscience) を加えて 39.5 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

○ RNA の調製

DT40 細胞 1 x 10⁷ 個あたり 1 ml の TRIzol (GIBCO BRL) を用いて total RNA を調製した。

○ RT-PCR (reverse transcriptase coupled polymerase chain reaction)

DT40 細胞より調製した total RNA またはニワトリ脳 Poly (A)⁺ RNA を鋳型として RNA PCRTM Kit (AMV) Ver 1.1 (宝酒造) を用いて逆転写反応を行った。続いてヒトおよびマウス p160 ファミリー遺伝子配列をもとに作製した以下のプライマーを使用して PCR 法 (30 サイクル、94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 1 分) を行った。

Primer 1 5' - TTGTATTTGTRTCAGARAATGTSAC - 3'

Primer 2 5' - GCTGWGACACAGYRAARCACTGCAT - 3'

R=A/G S=C/G W=A/T Y=C/T

プライマーの設計には以下の配列を使用した。

遺伝子名および GenBank 登録番号

human ACTR: AF036892, human SRC-1: U40396, human TIF2: X97674, mouse ACTR/p/CIP: AF000581, mouse SRC-1: T64828, mouse TIF2/GRIP1: U39060

○ PCR 産物のサブクローニング

pBluescript (Stratagene) を制限酵素 *EcoRV* により切断後、文献 (40) に従い T 化したプラスミドに増幅した DNA 断片を組み込んだ。

○ 塩基配列の決定

ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) のプロトコールに従って調整したサンプルを ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (PE

Biosystems) を用いて解析した。または Thermo Sequenase™ fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech) のプロトコールに従って調整したサンプルを DSQ-1000 (島津製作所) を用いて解析した。

○ cDNA ライブラリーのスクリーニング

chicken Intestinal Mucosa cDNA ZAP® library (Stratagene) のプロトコールに準じて行った。プローブとして RT-PCR で増幅されたニワトリ ACTR、SRC-1、TIF2 の PAS ドメインをコードする領域の cDNA を用いた。プローブは BcaBEST™ Labeling Kit (宝酒造) を用いて[α-³²P]-dCTP (~110 TBq/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech) により標識した。

(2) 実験結果

ヒトとマウスの p160 ファミリー間で高く保存されている N 末端側の bHLH/PAS ドメインをコードする塩基配列を基に設計したプライマーを用いて RT-PCR により増幅された約 300 bp の DNA 断片について塩基配列を決定した。DT40 細胞より調製した RNA を鋳型として増幅した DNA 断片は TIF2 および ACTR に相同性の高いタンパク質をコードしていた。また、脳より調製した RNA を鋳型として増幅した DNA 断片は SRC-1 に相同性の高いタンパク質をコードしていた (Fig. 4)。これらの結果からニワトリにおいても ACTR、SRC-1、TIF2 の 3 遺伝子が存在することが明らかとなった。

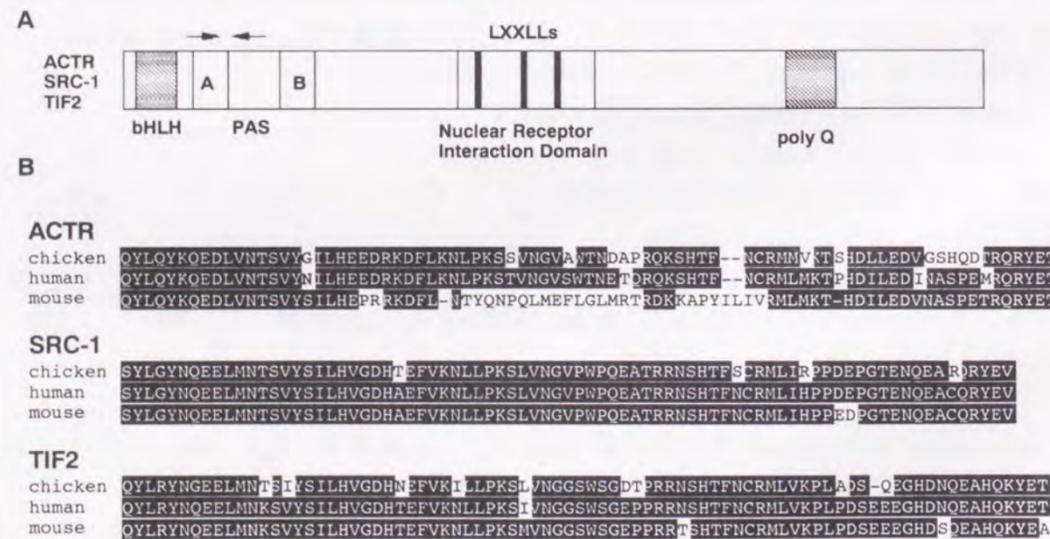


Fig. 4. Cloning of chicken p160 family. A) Structure of human and mouse p160 family. Positions of primers used for RT-PCR are shown by arrow. B) Sequence alignment of the PAS A region of chicken, human and mouse p160 family proteins. Identical amino acid residues are shaded in black.

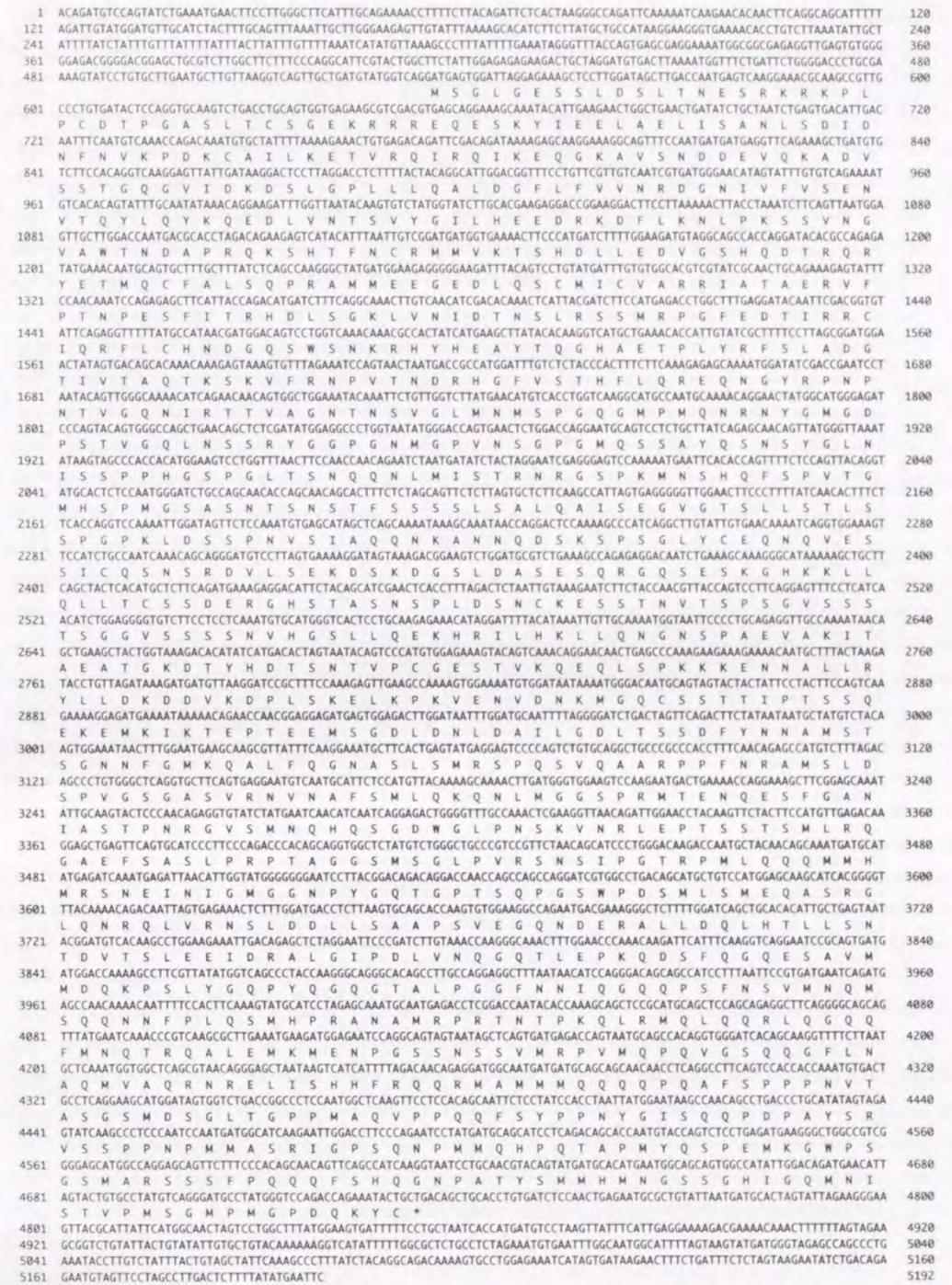


Fig. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequences of chicken ACTR.

1 CCCAGAGGTGAAAGTGGTTCAGATGAGTGGCTTGGGACAGCTGACAGACCCGCAACCCGACTCGCGGAAGAGGAGGGCTGCCCTGCATAGCCGAGAGCAAGAAAC 120
MSGLGDSSTDPANPDSPDRKRKSGSPCDTASNEKR 240
GGCGGGGAGCAAGAAACAAATTTGGAGGAGCTGGCAGAGCTGCTGCTCAACATTTGGGGACCTGACACCCCTGAGTGTCAACACAGCAAAATGCAAGATCCTGGAAGAGCG 240
RRELYLELEAELLANSANIGDIDTLLSVKPKDKKILKKTGV 360
TTGATCAGATCCAGCAATGAAGAGGTTGGAGCAAGAAAGAGCTGATGATGAAGTCAAGAGTGCACATCTCCTCAGCAGCCAGGAGTGATTTGAGAAGAGTCCGCTGGACCTC 360
DQIQQMKRLEQEKAADDEVQKSDISSSSSQGVIEKESLGL 480
TTCTGCTGGAGGATTTGGATGCTTCTTCTGCTGTAATCGCGAAGGGAGGATCGTCTGCTGCTGAGAACGTACCCAGCTACCTGGGTCAACAGGAGGAGCTCATGAACCA 480
LLEALDGFVFNREGRIVFVSENVTSYLVYNQEEELMNTS 600
GTGTCTACAGCATCTGCACCTGGGGACACACCGAGTTTGTCAAGAACTTGTCCCAAGTCTAGTGAATGGAGTTCCTGGCTCAGGAAGCACCAGCAAGCAAGCAAGCT 600
VYSLILHVGGDHTFVKNLLPKSLVNGVPPWPEATRNRNHTF 720
TCAGCTGAGGATGCTGATCGCCGACGAGCCGCTGAGAACAGGAGGCTGACAGGCTACGAGTGTGATGAGTCTTCCAGCTTCCAGCCCAAGCTTCAAGGAGG 720
SCRMLTIRPPDEPGETENQEARQRYEVMQCFVTVSQPKSFKEE 840
AAGGAGAGATTCAATCTGTGATGCAATCGGAGAGGTTACTCGACAGCAGCTCACCCCTTCCGAATCTCTGTCGACCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCA 840
GEDFQSLICLIARLRPRPAAVTPESEFVTKQDRTTKIISI 960
TCGACACAGCTCCCTGAGAGTGGCGGAGGAGGTTGGGAAGTATGAGGAAATGATGATGCTTCTCCAGCTCAGGCGAGAGGATCTTACGCGAAGCAGCTGTTT 960
DTSLSLRAAGRTGWEDLVRKCIYAFFQPQGGREPYSYAKQLFQ 1080
AAGAGTGTGACAGTGGCGGCTTCCAGCCATCTTATGATTCACCTGAGCAGCGGAGGCTGCTCAGCGCTCACCAAGTGAAGTCTGCTACCCCTCCAGCCAGAGTGC 1080
EVMTTRGTAFFSRYRFTLSGDVTMLVLSAHTKCKLCLYRPSPEVY 1200
AACCCTTCACTGGGCTCAGATCATGACAGGATCAGGATGCTGCCCCAGGAGCAACTACTGGCCTGCCCCCTCCGCGGCTCAGCCCTCTGACCCCAACATCT 1200
PIFMGIIDRIDRHGIMLSPEQENTNSAMALPRLVPSPLNPNIS 1320
CCCCGGGCAAGGATGGCTGCCCTCCATCCCTCCCTCAAGCGGAGCAGTGTGCCACCCCTGGAACAGCAGCCGCTGCCGCTCCACAGCAGCACTCAGCCAGCC 1320
PGQGMALPPSIPPSNGLATPQNGQPPGAGLHSSNSSTS 1440
AAACGAGCTTGGCTTCTGGGAACAGATAGGAGCAAGCTTAAAGCAGGAGCAAGCGGCTCCCAACAGTAAACCAATTTAAACCTCAGTAGCTCCCCATGAACA 1440
TSFGCGSPGNQITGANVALSQGAGPNNHNLNLSSPMNS 1560
GCCAGGAGTACCCCGGCAATCTCTAGGACCGGGTCAAGCAGGAGTGTCCCGGCGCCGGGGACAGCAATCCCTTCCCCACCATGCCACCAAGTGCATCC 1560
PGITPPQFMSPRHRVSPGLVPRPRGPPSPNPFSPMPTMHS 1680
CCGTGGGATGGTAAACGCGGGGGGGGCAAGCGGG 1680
VGMANSVGG 1800
CGGTGGGCTACCCAGCCCTGCTGAGCAGCTGGGCTCCAGAGTCCGCTGGCCGCTGGCATGAGCCATGAAGGGGAGTCAAGGACAGCAAGGAGTCCGCTCCA 1800
VGYSTPPVLRQLGSSQSSPGRRLGMQPMKAESKDSKEIASI 1920
TCCTGAGCAGATGATCCAGTGGCAGTGCAGGACGCGGAGGCTGGGCTGGTGTGATGCCAGCGAGAGGCTCAGGAGGGGAGAGCAAGTGTCCCAAGCAGCA 1920
LSEMIQSDGSAAGDKPLDSDGVLHASERLTEGESKCSQATS 2040
GCCAAGCTGGTCAAGTGGCAGCAGCGGAGGAGCAGTTCGGCAGCGGAGCGGACAGGCTGCAAGGATTCGTTGGCTGCGCGGGCACAGCGGAGCTGGTGG 2040
HKLVLASTALEQQLRHADADTSCKDLSLACAGTGTGLGAS 2160
GCAACCGGCGAGCAGCTGCTCCCTCCATAGCTGCTGACGAGCGGCAAGATTTGATAGTCCCTCAGGAGGGCAGCCCTTGCATCACACCTGGCCATGGAG 2160
NPPSSSLSLTERHKLHLRLLEGEPSDITTLAMEH 2280
ACGACAAAAGGATAACGTCACCAACCCGACCCGCGGCGCCGAGCCAGTCCGAGTGGAGTGGATGCGATGAAAAAGAGGATGCAAGGATGCAAGGATG 2280
DKKDNVNPATPTTAPSQPLPGTQDIKLES DAMKKKDVKD 2400
ACAGCTCTGGCTATGCTTGAAGGAGGAGGAGGAGTGGCTGCGCCAGGCTGAGTGAAGTGAAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2400
QLLRLYLDDKDEKELAAAPALSLLDDVKKVKEKTEQMEPCNT 2520
CCACCGGCTGGCTGGCAGCGCCGCGGAGGAGGAGTCAAGTGGAGTCAAGGCTCAAGGCTCAAGGCTCAAGGCTCAAGGCTCAAGGCTCAAGGCTCAAGGCTCAAG 2520
TPVPLAKPPAAEEVVKLESQGGQFAAELEQLDQLLPSLEKAA 2640
CCAGCTACCGGGCTGTGCGGGCCAGAGGAGTGAAGCGGGTGGTGAATGCAATGCAAGTGGAGCTGGCAGCCCTGCGAGCCAGCAGTCCCGAGCCCGCCAGCCCAAC 2640
QLPGLCGPERSESGVAVKSEMLAAPLQPSSTAPRAPRTGLLNR 2760
GGATGTCAGAGTGGAGTGGGGTGCAGATCAGAGTGGGCGCCGAGTGGGGAGCAGATGCCATGGAGCAGATAACAGCAGTGGCAGCCATGAACCGAGGCGCTGAGTAAC 2760
MSELEMVDPDHQFQGQPMMPWTDNSMAPMNRGTLKSP 2880
CTGAAGACCCCTGATCAGTGGCAGTGGAGGCTGCTGCTCCCAACCTCCGAGGCGGCAAGCAGTGAAGGCGCTGCTGGAGCAGTCTGCTCTTCTGATGGCAAG 2880
EDPCITTSQLDELLELCPPTTEPEGRNDEKALLEQLVSLSGKD 3000
ACGAGAGGAGTGGCTGGAGCAGGCTGGATCGACAACTGGTCAAGGGCGGGCTGGAAGCCCTGACGGAGCGGTTCCAGCCAGCAAGCAACCTCCGCTGATGA 3000
ETELALELDRALGLIDKLVLVQGGGLAALTERFQPPQQAATPPLM 3120
TGGAGCAGAAGCCCGCATACCCCGCTTCTCTGATCTCCACCAACCTCCCTGCCGCTCCCGGCGATGGTCCGCGAGAAGCCGCTCTCGGTCCATGCCGGTGC 3120
EQKPGMPYPPYSSASAPTTNLPAAFPFGMVVRQKPSFAGPMPVQ 3240
AGGTCCCGCGCGCGGTGCTTCCCAACCATGGCCATGGCCAGCCGCGGAGGCTGCGCCAGCCCGGCTCCCAACAGCTGCGACTTCAAGTGGCAGCAGCGGCTGCGAG 3240
VPPPRGAFPTTMMAMQPRQALSRRPPTAPNQLRLLQLLQRLQG 3360
GCCAGCAGCTGATCCATCAGAACCAGGAGGATCCTCAACAGTTTGCAGCCAGCTCCCTGTGGGATCAACATGAGGGCAGGATGACAGCAGATGACCCGCGAGCTCCCC 3360
QQQLIHQNRQAAILNQFAANSVPGIENMRAGMQQQMTPPQAPL 3480
TCAACGQCATGCTGGCCAGCCAGCGGATCTACAGCCAGCAGCAGCAGCGGAGCTATGACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC 3480
NAQMLAQRRQRELYSQQHRQRQLMQQRAILMRQQSFGNLLP 3600
CACCTCAGCGGGCTCCGCTGCAATGGGGGCGCGGCTCCCGAGGCTCCCGCAGCAGTCCCTTATCCCGCACTAGGATCAGGCCCCGGGAACCTCCACCTCCACCA 3600
PSAQLVQMGARLPPQAPPQQFPYPPNYGTSPPGNPPTST 3720
GCCCCCTTCCGAGCTGGCTCAGCCCTGAGCCGCTGGCCAGCCGCGGCGGATGGTGCACAGGGGATGAGGGAGGCTGGAGGGGAGTGGCCAGGATGACCGCAGA 3720
PFSQLASSPEAALANRGMVTRGMMGSSVGGQFGTGMTPQM 3840
TGCAGCAGAACATTTTCAATCCAGGATCGGTCAGCAGAAAGGAGCAGCTTCCGCGGCTGCTCAGCCAGCAGTCCCTGATCCAGCAGCTCCCTCATCAAAA 3840
QQNIFQSSGSMGQQNEPTFAPSLSLSPSSPLMSPQLPSSQS 3960
GCCAATGCTGAGCGGCGCTCCTGACCCGGCTCAGTCACTGACATGAAGACTGCGAGCAGGAGGAGCAGTGGGAGCAGCAAGTATTCAGCCAAACGAGCAGCAGCAG 3960
PMLQPAPPAPAGYQSPDMKTWQQGAMGNSNVFVSQTGTGTPA 4080
CACCGCCAGCAGGAGTGAACAACATGAGCATCCGCTCCATGGCAGGAGAAACCAACCTGCAAGCAATGAATCCATGGCGGACAGATGAGATGAACTCTGCAGA 4080
PAQQQGMYNMISTVSMAGGNTNVQNMNPMAGQMQLMNSLQM 4200
TGCTGGGATGAACTCATGTGCTGGAGCAGTAAACGAGCCCGGCTGAGACCAAGGCGCTTACTGCAACAGCTTCTCCACTGACCTTTGAAACAGAAAGCAGATGGGGCG 4200
PGMNSMCSSEQVNDPALRPTGLYCNQLSSTDLKTEADGAQ 4320
AGCAGGTACAGCAGTTTCAAGTGTGGCAGCTGACAGTGAAGTCTGGTAGAGGATCCCTACTGAAACCTCCGCTCCCTGGGCGCCGAAAGCGCCGCGGCTGCCGGA 4320
QVQQVQVFAVQCTVNLVGDPPYLNPPAPLPGA PKAAAVPPT 4320
CCCCGAGGGCAACAGAGAGGCTTCTCAGCAGTACTGACTGAATAACCGCTTTCCAGGAGTGAAGGAAATC 4339
PQQQKSLQLLLE*

Fig. 6. Nucleotide and deduced amino acid sequences of chicken SRC-1.

1 CGCCGTGACTGCCTCGCTGAGTCTCGGAAACCCCTGCTTACCRCGCGCAGGATGGACCTGCTGGGGATGAGCCTGGTCCCGGGGGGAGGCTGTTCCGTTGGTGGCCAGCC 120
TCGCTGACAGCAGGAGCCGATCGGATGCTTACCGAGCTGCGAGTSCCTGGGGTGGGATTTCTTCTGGCGGCTGACAGAGTCTGCTGTGATGCTGATGTTGTTCA 240
AGATGATGGGATGGGAGAAATCCTTGCACCTCAGGGCAGAGTCAAGAAAGCCAGGATCCCGATCAGCTGGACCCAGCCCTAAAAGAGCACTGAGAAGCCAGATCGTAGG 360
MSGMGENTSDPSRAESRKRKRDPPDQLGSPSPKRSTEKRRNEQ 480
AAGAGAATAACATAGAAGACTGACAGAGTGGTGTGCAATTTCAATGATTTGCAACTTTAACTTCAACTGACAAATGTGCAATCTTGAAGAAACTGTGAAGCAATTC 480
ENKYIELEALELIFANFNDIDNFNFKPDKKCAILKRETIIR 600
GTCAGATAAAGAACAGAAAAAGCAGCAGCTAATGAAGTGAAGTGAAGGCAAGAGCAGATGTCATCAGGGTCAAGTGTGATCGACAAGGATGCGTTGGCAAGTATGCTTG 600
QIKEREKAAAANEDDEVQKADVSSTGQSVI D K D A L G P M M L E 720
AGGCCCTGGATGGTCTTCTTGTGATGAAACAGAAAGTAAATGTTGTTTCCGAGAATGTGACGAGTAAAGTAAACAGAAAGAGCTGATGAACCAAGCAGATATA 720
ALDGGFFVFNPEGNVVFVSENVTSYLVYNQEEELMNTSIYS 840
GCATCTGCAGTGGGGACCAACTGTT 840
ILHVGDHNEFVKIILLPKSLVNGGSSWSGDTPRRNRNHTF 960
GGATGCTGTAACAGGCTGATGATCAAGAAAGCAGTGAATCAGAAAGCAGTGAATAAAGAAATGAAACTATGCAAGTGTGCTGTTTCCCAACCAAAATCTTCAAGGAGGAGC 960
MLVKKPLADSDQEGHDNQEAHQKYEETMQCFVAVSQPN SFKE 1080
GTGAAGATTTGAGTCTGCTGTT 1080
EADLQSLICLVARLPRAPMKEPRLPSSSESTTRQDLQGGKITS 1200
CACTGGATACAGTATGCTGAGCAGTGAACCTGCGTGGAGGATTTAGTGAAGATGATTCAGAGGTTCCATTCGAGCAGTGGAGGAGAAATATCTTTGCAAAAGGCACT 1200
LDTSSMRAAMKPPQGLVLRRCITQRFRHSHEGETSFAKRHH 1320
ACCAGGAAGTGTGAGGAGGACTAGCATTTAGTGTGTTTACGGTTCCTGCGGATGCAATGATGTTCTGCGCAACAGAGCAACTCATCCGTTCCAGCAGTACTAGT 1320
QEVLRQGGALAFSPVYRFLSLVSDGTIVSAQTKSKLIRSQTTSE 1440
AACCTCAGCTGTCATCTTGCATGCTTCCAGAGAGCAGATGCTGTTGAATGATCAGGATTTGACTGGACAAGGATGGGAAAGATTTGAAACCAATAGCTCCAGCAGCC 1440
PQLVLSLHMLHREQNVCGGMNDLDTGQGMGKILNPTSSSST 1560
CTGCCATCAGGCTGTCAGAGGGAGCCAGGATGCAACTCAGTAGCAATGAAATTTGCAATAAGCCCAAGGAGCAAAATGGGATGCCAGGAGCAAGTGGT 1560
AHOAMCSGNPQGDMMTISNNMNFANINGPKEQMGMPAGRFGG 1680
GTTCCAGGGGATGAACATGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCT 1680
SGGMHNVSSIQASTPQGSNYALKMNSPSSQSSPMMNPGQPN 1800
ACTTGTGTTTCCCAAGGCTGCGCTGAGCCGCTGGAGTGGAGGAGTCCGAACTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAGCTCAG 1800
SMLSPRHVRTPVGAVGSSPRI PPSQFSPA GSSLHSPVGVCSST 1920
CAGGAATAGCCATACTACACCAAGTCCCTGAATGCCCTCAGCCCTCAGTGGGCGTGGAGTTCCTAGGATGCTGTTGGCTCACCTGACATAAAATGGAAATTTAC 1920
GNSHNYTNSNLNALSSEHGVSLGSSLSLSPDLKMLNQL 2040
AAAATCCCTGTGAATGAAACCTCCAGTAAAGCAAGTGGGAGGCTGGACTTAAAGACTGCTTGGACTTATGGGAGCAATCAGAAAGTCAACTGGACAAACAGAGAGCA 2040
NSPVNMTNPQVLSMKGSLDSDKDFGLYGEQSEGTGTGTESS 2160
GCTGCTCAGGAGCAAGAAACAGTGAAGCAGCTGCTGGTGTGAGTGGCAGAGACCTGATGGCAGAAATAGCTGACAGTGGAAAGCCAGCAAGCTCTTAC 2160
CHSDGQKDNSESSVSGVSGERPDGQNKLHDGKSKQTKLLQ 2280
AGTTGCTGACCAAACTGGATGAGTGGAGCTTCCGCTTTGTCAGTACCATGGAGATCAGCAAGGACTCCACAGGAGGGTGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 2280
LLT T K S T G L T G S G S A H G T S 2400
TCAAGGAGAGCATAAAATTTGACAGACTATTGACAGGAGTGTCTCTGATGATTTGGCAAGTCAAGCAGGAGCCACAGGAAAAAGTGAACAGGAGTCCAGTAGCAG 2400
K E K H I L H R L L Q D S S S P V D L A K L T A E A T G K E L N Q E S S T A 2520
CTCTGCTCAGGCTGACTGTTAAACAGGAGCAGTGAAGTCAAGAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 2520
P G S E V T V K Q E P V S P K K N N N A L L R Y L L D K D D T K D I G L P D I G P 2640
CCCCAAAAGTGGAGCGTGGAGCAAGCAAGCCTTCTGGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAG 2640
PKLEERLDSKTDPSGSTKLIPMRTEKEEISFEPEPNEQPGSEEL 2760
TGGATAACTGGAGGAGTCTGGATGACCTACAGAAACAGCAGTACCCGAGCTTTTCCAGAGAGCCCGCAGGCGGCGGAGGCTGGTCCGACAAAGCAAGCCATCATGAGC 2760
DNLEELLDLQNSHVPPQLFPESRPGAPAGSVQDKQAIINDL 2880
TCATGAGCTCAGTGAAGCAGCCCGGCGAGGCTGGGCGCCAGAAACAGCAATGAGGATTTACAGAGCAGTAAATTAACCCAGGAGGCGCACTGGCAGGTTATTAC 2880
MQLTSSDSSSPQTAVATVAAISIQSQPNQLRLQLQHLRQLQNR 3000
CAAAAGCAAGTACCATCAGCTGAGCAAGCCCAAGCAGTGGAGGCTTCCCAACCAAGGAGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAG 3000
NQNLPLDITLPLPAGTGAAGFPPIRTSSPYSVIPQPLMGRN 3120
ATGAAGGATGATGAAGGCTCAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAG 3120
EGMIGSQGLALGNNGTGLGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAG 3240
GGTGAGCTGCGCCCGCCAGCGGCTGAACAGCGGCTGGAGCAGGCTGATCCGCAACCCAGCAGCAGTCCCTTGGAGCTAGCAGCAGCTGGCCAGGCGAGTGC 3240
VTCAPTASAMNRPVQAGLIRNPTASIPLRPSSSQPGPRQML 3360
TTCCATCAGTCAAGTGAATATGGGGCTCCGAATGGAGTGAACATAGGAGGAGTCAAGTGAAGCAGCAGGCTCCCTCAATCAGACTGACCATGGCAGAGCAGTCTTGC 3360
PSQVMMNMGPSLELMNIGGPPQYSQQQAPPNQTA P W P D S I L P 3480
CTATAGCCAGGCAACTTGGTGGTCAAGCAAGCAACTGTTGGGAGTCAACATGATCTTTGTAATCATCTTCACTGAATCACAAGTGAAGGAGTGGTCTCTGGTGC 3480
IDQATFAGGQNRQSFSSPDDLLCNHPSSESPSDEGALLDQ 3600
AGCTTATATGGCAAGAAATTTGATGGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAGTGAAGGAG 3600
LYMALRNFDGLEEIDRALGLPELVSQSQA V D P E T F S G Q D S 3720
CGAGCATGCTGGAGCAGAGGCTCAGTGTCTCCAGCAGTACAGGCTCAGGCTCAGTGGCTCAGGCGAGTCCAGCCATGCAAGCAGCAGCTCCAGCCATGGGCGAG 3720
SMLGLEQKAAQGSYAPMQDPSFHAMGQR 3840
GCGGCTGCGCCCTGCGCATGCGCCCGGCTGGCTAGCCGCGCAGCAGTCCAGGAGCAACCAACAGCTGGGCTCAGCTGAGCAGCTTCCAGGCAAGCAGAGAAC 3840
GYAALRMRPTAAVATAAISIQSQPNQLRLQLQHLRQLQNR 3960
GGCAGCCTGATAAATCAGATCAGCAGTGTCTCAATATGAACCTGATTGAGGCGGGGGTGCACACAGGGCCCACTCAATGACAGATGCTGGCAGAGGCAAGGAGATCC 3960
QPLINQJISVSNMNLRLPQVPTQGPIN AQMLAQRRLE 4080
TGATGACACTGCGGAGCAGATGACAGCAGCAGCAGCAGTGGCAGCAGGAGCAGTGGATGATGAGGCGGAGGCTGAGCAGTGGCTGCTCAGCCGAGCAGTGC 4080
SQHLRQRQMQQQQQQQQQQRTLMMRGQGLSMTMPLPPI 4200
4081 CAGCAACCTGAGCAACCCAGGATCCACAGGCGAACGACAGCAGTCCCATTTCCAAACTCAGGAATGTCAGCAGCAGTCAAGGCTTCCAGGCGGCGCAGCTCCAGA 4200
ATMSNPRIPQANAQQFPFPNYPNYGISQPPDPGFTGATTPQS 4320
4201 GTCCACTGATGCTCCAGGCTGGCTATACACAAAGCCCTGATTCAGCAGCAGTCAATCGCTTCAAGTCAAGTGAAGTGGTGGGCGCAAGGAAATGAGGTTG 4320
PLMSPLRLAHTQSPMIQQTQANPAYQSTEMNGWAQGNMGG 4440
4321 GAAACAGCATGTTTCAACAGCTCCCAACCACTTTGGGAGCAAGCAGCAGCAGTGAATAAATAAATGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACT 4440
NSMFSQQSPPHFQGQASTSMYNNMNNINVSMAATNTSGMNN 4560
4441 ACATGAACAGATGACAGGCGAGTCAAGTCACTCAGGCTTGTCTCATGGTCTGAGCAGTAAATGATCTGCTGATGAGGCGGAGCACTCAT 4560
MNQMTGQISMTS V P T S G L S M G P E Q V N D P A M R G L N L F 4680
4561 TTCCAAACAGCTGCTGGAATGGATGATAAAGCCAGAGGAGTCAACAGGAAACTGCTGAGCCTGAGGCGGCTGGTGGTCTCTTCCAGCTGAGCGGCGCCGCGCC 4680
PNQLP G M D M I K P D G A T R K Y C * 4800
4681 CACACCTTCCAGTGGAGGAGTGCACCTTTGTCGCGCGAGCCAGCTGCTGCTGGCCGAGCCCTGCTGCTGGGCGGCGCTGCTGCTGGGCGGCGCTGCTGCTGGGCGGCGCT 4800
4801 TTGCAAGCTGAGGCTATAGGCTACAGACTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCTCAGTCTGCT 4920
4921 CAGATGATGATTTAAATGATGATTTAAGGAAAG 4959

Fig. 7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of chicken TIF2.

続いてこれらの配列をプローブとして chicken intestinal mucosa cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、open reading frame (ORF) および 5'-untranslated region (UTR)、3'-UTR を含む cDNA クローンを単離し塩基配列を決定した (Fig. 5-7)。ニワトリ ACTR は 1399 アミノ酸をコードし、推定分子量は 152.7 kDa であった。SRC-1 についてはサブライシングの違いにより a-e までの 5 種類のアイソフォームが報告されているが (37)、cDNA ライブラリーより単離したニワトリ SRC-1 は C 末端に LXXLL 配列を持つ SRC-1a であり、1449 アミノ酸をコードし、推定分子量は 155.5 kDa であった。TIF2 は 1462 アミノ酸をコードしており、推定分子量は 158.1 kDa であった。ニワトリ p160 ファミリーのアミノ酸配列間の相同性は ACTR と SRC-1 間が 28%、ACTR と TIF2 間が 42.8%、SRC-1 と TIF2 間が 34.2% であり、bHLH/PAS ドメインに関してはファミリー間で 60-80% 程度の高い相同性を示した (Fig. 8)。

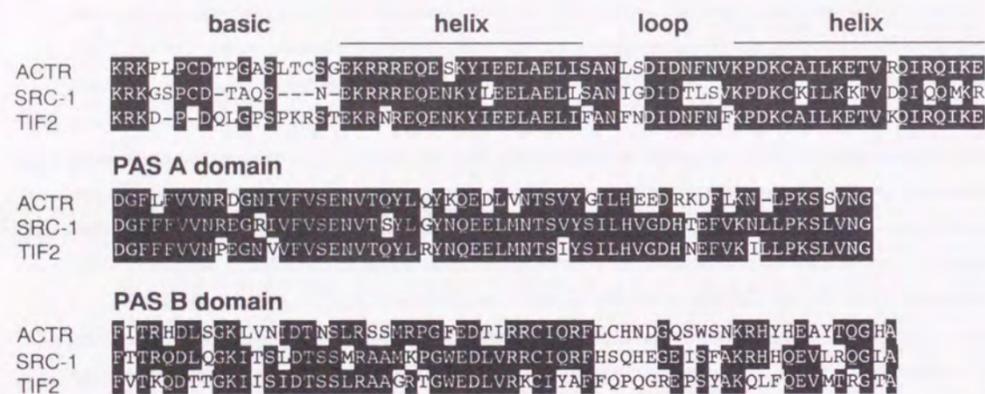


Fig. 8. Comparison of the bHLH and PAS domains of chicken p160 family proteins. Identical amino acid residues are shaded in black.

第二節 p160 ファミリーの種属間における相同性の検討

(1) 実験方法

○ ホモロジー解析

GENETYX-MAC 8.0 (ソフトウェア開発株式会社) を用いて行った。ヒト、マウス p160 ファミリーのアミノ酸配列は第一章、第一節で示した配列を使用した。

(2) 実験結果

ニワトリ ACTR、SRC-1、TIF2 のアミノ酸配列についてヒトおよびマウスの配列と比較した (Fig. 9)。ACTR についてはヒト、マウスとそれぞれ 74.4%、69.5% の相同性を示し、SRC-1 はヒト、マウス SRC-1a と比較し 74.1%、73.7% の相同性を示した。TIF2

はヒト、マウスとそれぞれ 86.0%、84.0% の相同性を示した。p160 ファミリー間で保存性の高い bHLH/PAS ドメインはヒトおよびマウスの配列と 90% を超える高い相同性を示した。また p160 ファミリーの機能上重要と考えられる 3 個の LXXLL 配列と CBP 結合に必要とされる LLXXLXXXL 配列 (36) はニワトリにおいてもほぼ完全に保存されており、ニワトリ p160 ファミリーの生体内での機能は哺乳類と同様であると予想された。

				a.a.	homology (%)
ACTR	chicken	bHLH/PAS	NID	1399	100%
	human	93.1%	84.6%	1412	74.4%
	mouse	85.1%	83.8%	1398	69.5%
SRC-1	chicken	bHLH/PAS	NID	1449	100%
	human	95.8%	70.8%	1441	74.1%
	mouse	95.8%	75.0%	1448	73.7%
TIF2	chicken	bHLH/PAS	NID	1461	100%
	human	91.6%	86.2%	1464	86.0%
	mouse	91.1%	87.9%	1462	84.0%

Fig. 9. Conservation of p160 family proteins.

第三節 ニワトリ p160 ファミリーの発現量の解析

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬

第一章、第一節に準じた。ニワトリ脳および肝臓 Poly (A)⁺ RNA は Clontech より購入した。

○ Poly (A)⁺ RNA の調製

DT40 細胞の Poly (A)⁺ RNA の調製は Oligotex-dT30 <super> (宝酒造) のプロトコールに従い、total RNA より調製した。

○ ノザンプロット

Molecular Cloning (41) に準じて行った。Poly (A)⁺ RNA 1.0 μg をホルムアルデヒド含有 1.0% 変性アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブラン (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。プローブとしてニワトリ ACTR 506-1475 bp、SRC-1 1187-2860 bp、

TIF2 802-1905 bp の領域を使用した。β-actin 検出用のプローブはヒトβ-actin の配列を使用した。プローブの標識は第一章、第一節に準じた。

(2) 実験結果

ニワトリ脳、肝臓、B リンパ細胞株 DT40 における p160 ファミリー mRNA の発現量をノザンプロット解析により比較した (Fig. 10)。ACTR は約 11 kb、SRC-1 は 9 kb、TIF2 は 12 kb 付近にそれぞれ 1 本のバンドが検出された。DT40 細胞には ACTR と TIF2 は発現しているが、SRC-1 はほとんど発現していないことが示された。また SRC-1 は脳に多く発現していた。肝臓における p160 ファミリーの発現量はごくわずかであり、p160 ファミリーは組織により異なる発現パターンを示すことが明らかとなった。

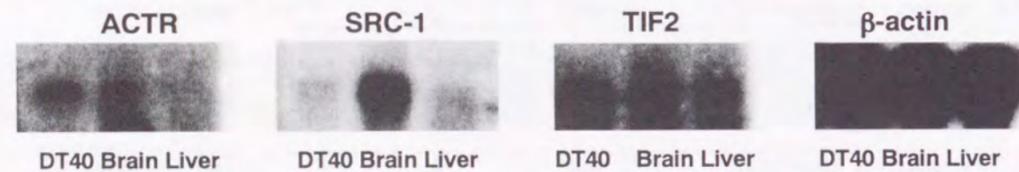


Fig. 10. Expression pattern of p160 family in chicken tissues. Northern blot analyses were performed with chicken tissues and DT40 cells. One μg of Poly (A)⁺ RNA was separated on a 1 % formaldehyde-agarose gel, blotted onto a nylon membrane, and hybridized with random-primed ³²P-labelled chicken ACTR, SRC-1 or TIF2 cDNA probes. β -Actin probe was used as a loading control.

第四節 ニワトリ p160 ファミリーと核内レセプターの相互作用の解析

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬

試薬および培地の作製は MATCHMAKER Two-Hybrid System (Clontech) のプロトコールに準じて行った。塩類や溶媒は市販の最高純度の試薬を使用した。

○ 宿主細胞 (酵母)

Y190 株を使用した。

○ プラスミド構築

ベイト: 酵母内で GAL4 DBD 融合タンパク質として発現できる pGBT9 (Clontech) に以下のラット核内レセプターの領域を PCR により増幅し、EcoRI-EcoRI サイトを利用して組み込んだ。

pGBT9-VDR : rat VDR 124-423 a.a. pGBT9-ER α : rat ER α 246-600 a.a.

pGBT9-TR α : rat TR α 171-461 a.a. pGBT9-PR : rat PR 610-923 a.a.

プレイ: 酵母内で GAL4 AD 融合タンパク質として発現できる pGAD424 (Clontech) に以下のニワトリ p160 ファミリーの領域を PCR により増幅し、EcoRI-SalI サイトを利用して組み込んだ。

pGAD424 ACTR-1 : cACTR 566-814 a.a.

pGAD424 ACTR-2 : cACTR 566-799 a.a.

pGAD424 SRC-1-1 : cSRC-1 586-833 a.a.

pGAD424 SRC-1-2 : cSRC-1 586-818 a.a.

pGAD424 TIF2-1 : cTIF2 578-813 a.a.

pGAD424 TIF2-2 : cTIF2 578-798 a.a.

○ 相互作用の検出

文献 (42) に従い、液体法により活性を測定した。レセプターのリガンドとして以下の物質と 4 時間反応させた後、 β -galactosidase 活性を測定した。

VDR : 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (終濃度 1×10^{-7} M) (中外製薬株式会社より供与)

TR : 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine (T₃) (終濃度 1×10^{-6} M) (Sigma)

PR : プロゲステロン (終濃度 1×10^{-6} M) (和光純薬)

ER : 17 β -estradiol (終濃度 1×10^{-7} M) (和光純薬)

(2) 実験結果

p160 ファミリーの NID 内の 3 個の LXXLL 配列、NR box 1 から 3 についてニワトリ、ヒト、マウス間で比較した (Fig. 11)。ニワトリにおいても LXXLL 配列は完全に保存され、LXXLL 配列前後のアミノ酸についてもほぼ完全に保存されていた。また、NR box 3 の約 50 アミノ酸下流には FXXLL または LXXIL からなる LXXLL 配列に類似した配列が存在した。イソロイシンとフェニルアラニンもロイシンと同様に疎水性アミノ酸であり、LXXLL 配列と同様にタンパク質-タンパク質間相互作用に働くことが予想されることからこの配列を NR box 4 と名付けた。

	NR box 1	NR box 2	NR box 3	NR box 4
cACTR	K K L L Q L L T C	R I L H K L L Q N	A L L R Y L L D K	D N L D A I L G D
hACTR	K K L L Q L L T C	R I L H K L L Q N	A L L R Y L L D R	D N L D A I L G D
mACTR	K K L L Q L L T C	R I L H K L L Q N	A L L R Y L L D R	D N L D A I L G D
	*****	*****	*****	*****
cSRC-1	H K L V Q L L A S	K I L H R L L Q E	Q L L R Y L L D K	E Q L D Q L L P S
hSRC-1	H K L V Q L L T T	K I L H R L L Q E	Q L L R Y L L D K	D Q F D Q L L P T
mSRC-1	H K L V Q L L T T	K I L H R L L Q E	Q L L R Y L L D K	D Q F D Q L L P T
	*****	*****	*****	*****
cTIF2	T K L L Q L L T T	K I L H R L L Q D	A L L R Y L L D K	D N L E E I L D D
hTIF2	T K L L Q L L T T	K I L H R L L Q D	A L L R Y L L D K	D N L E E I L D D
mTIF2	T K L L Q L L T T	K I L H R L L Q D	A L L R Y L L D K	D N L E E I L D D
	*****	*****	*****	*****

Fig. 11. Sequence alignment of the LXXLL motifs in p160 family. Residues common to chicken(c), human(h), and mouse(m) are shown by asterisk. The LXXLL motifs are shown by bold.

次にニワトリ p160 ファミリーと核内レセプターとの相互作用をタンパク質-タンパク質間相互作用を解析する方法として汎用されている yeast two-hybrid 法により解析した。酵母転写因子 GAL4 転写活性化ドメイン (GAL4 AD) とニワトリ p160 ファミリー NID の融合タンパク質および GAL4 DNA 結合ドメイン (GAL4 DBD) とラット核内レセプターリガンド結合ドメイン (LBD) の融合タンパク質を yeast 内に発現させ β -galactosidase 活性を指標に相互作用を調べた。Fig. 12 にはリガンド添加時の β -galactosidase 活性を溶媒のみ添加時の β -galactosidase 活性で割った値で示した。リガンド依存的な相互作用がビタミン D レセプター (VDR)、TR α 、プロゲステロンレセプター (PR)、ER α においてみられ、ニワトリ p160 ファミリーがリガンド依存的に核内レセプターと結合することが示された。また、p160 ファミリーは VDR と最も強く結合し、PR を除き TIF2 がどのレセプターとも強く結合することが明らかとなった。NR box 4 を欠失させたコンストラクトを用いるとすべてのコアクチベーターの相互作用は減少し、NR box 4 が核内レセプターとの相互作用に重要であることが示された。

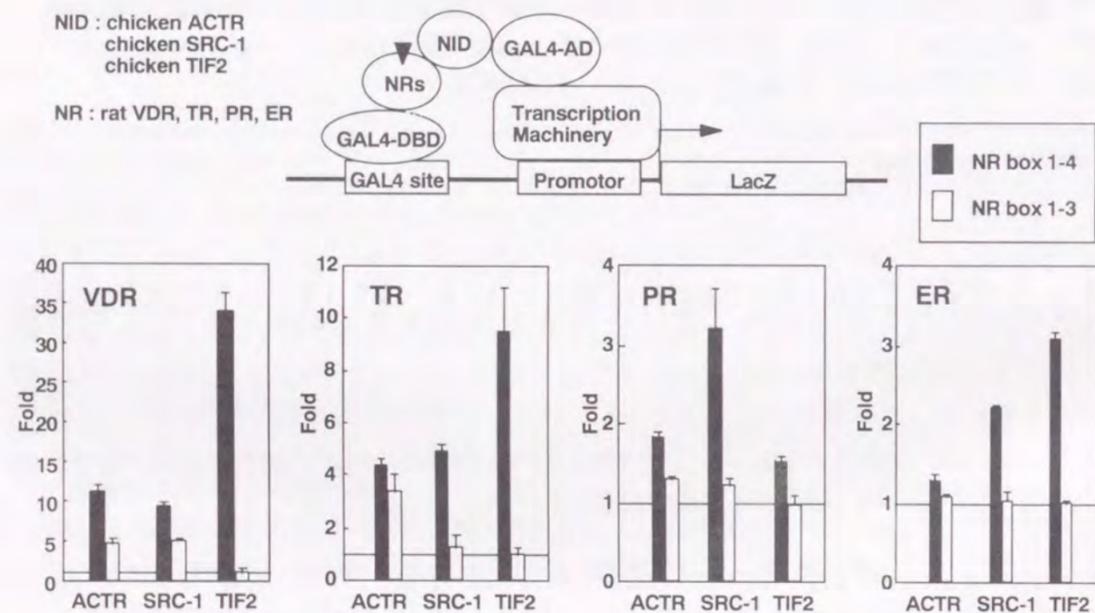


Fig. 12. Ligand-dependent interaction of chicken p160 family with nuclear receptors. Yeast two-hybrid assays were used to compare binding of NR LBDs to NR box 1-4 with NR box 1-3. Yeast strains were incubated with appropriate ligand before preparing cell extracts for β -gal assays.

第五節 考察および小括

(1) 考察

本章においてニワトリ p160 ファミリーのクローニングを行い、ニワトリにおいても哺乳類と同様に 3 種類の p160 コアクチベーター遺伝子が存在することを明らかにした。ヒトとマウス以外の生物種では p160 ファミリーの研究はほとんど行われておらず、アフリカツメガエルから ACTR と TIF2 遺伝子が単離されているのみである (43, 44)。ニワトリは 3 種類の p160 コアクチベーターが単離された生物種としては、ヒト、マウスに続き 3 例目であり、哺乳類以外の生物種では初めての例となる。既にゲノム解析が終了した線虫やショウジョウバエにおいては多数の核内レセプター遺伝子が存在することが明らかにされたが (45)、p160 ファミリーに相同性を示す遺伝子の報告はないため、p160 ファミリーは進化上、脊椎動物以降において獲得された遺伝子であると考えられる。

RT-PCR によるクローニングでは 3 種類の p160 コアクチベーターのすべてを増幅できる共通プライマーを設計し、実際に DT40 細胞から ACTR と TIF2 を、脳から SRC-1 を増幅することができた。DT40 細胞から SRC-1 が得られなかった理由としては、DT40 細胞に存在する SRC-1 の量が ACTR や TIF2 と比較し、極端に少ないためと考えられる。ノザンプロット解析により発現量を解析した結果からも、DT40 細胞では SRC-1 の発現量の少ないことが確かめられ、RT-PCR の結果と一致した。ただし、ニワトリ SRC-1 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行うと SRC-1 由来の DNA 断片が DT40 細胞においても増幅されることから (データ省略)、SRC-1 は少量ながらも発現していると考えられる。また、ACTR、SRC-1、TIF2 以外の新規の p160 コアクチベーターが存在すれば共通プライマーにより増幅される可能性が考えられるが、ニワトリ脳、DT40 細胞およびラットの様々な組織で検討した結果、既知の p160 コアクチベーター以外のものは増幅されず、発現量の低さや共通プライマーの配列の微妙な違いにより増幅できなかった可能性もあるが、ACTR、SRC-1、TIF2 以外の新規の p160 コアクチベーターが存在する可能性は低いと考えられる。しかし、今回設計した共通プライマーを使用することで、様々な生物種の p160 ファミリーを効果的にクローニングできると考えられ、まだ p160 ファミリーの単離されていない魚類等への応用が期待できる。

スクリーニングに用いたニワトリ小腸粘膜由来の cDNA ライブラリーからは ACTR、SRC-1、TIF2 の ORF の全長が単離できた。粘膜には未熟な B 細胞が存在しており (46)、B リンパ細胞株 DT40 において発現の認められた ACTR と TIF2 が単離され、小腸粘膜中の細胞には SRC-1 を発現している細胞もあるものと考えられる。SRC-1 については C 末側に LXXLL 配列を持つ SRC-1a と持たない SRC-1e アイソフォームがあり、SRC-1e の方が多く存在すると報告されているが (47, 48)、ニワトリ小腸粘膜由来の cDNA ライブラリーからは SRC-1e に相当するアイソフォームは得られなかった。ニワトリにおいてもおそらく SRC-1a と SRC-1e が発現していると考えられ、SRC-1 の多く発現し

ている脳などの組織で RT-PCR を行えば両方のアイソフォームが検出されると考えられる。

ニワトリ p160 ファミリーの発現パターンは、脳においては SRC-1 が最も多く発現し、肝臓では p160 ファミリーの発現量が少なかったが (Fig. 10)、この結果はヒト組織で観察された結果と一致している (49)。一方、アフリカツメガエルの ACTR ホモログ遺伝子、xSRC-3 の発現量は腎臓、肺、肝臓、および卵母細胞で解析されているが、卵母細胞と肝臓に多く発現することが報告されており (44)、肝臓の発現に関してヒトやニワトリとは異なっている。今回はニワトリ脳と肝臓および B リンパ細胞株 DT40 における発現量のみしか解析しなかったが、さらに多くの組織や発生過程における発現量の解析を行うことで、p160 ファミリーの発現パターンの種属間における差が明らかになると考えられる。

ニワトリ p160 ファミリーは哺乳類 p160 ファミリーと 70-85 % の相同性をもち、bHLH/PAS ドメインについてはヒト、マウス配列と 90 % 以上の相同性を示した (Fig. 8)。NID の相同性は全体では 70-85 % と bHLH/PAS ドメインと比較すると保存性は高くはないが、LXXLL 配列とその前後に関してはニワトリ、ヒト、マウス間でほぼ完全に保存されており、LXXLL 配列が核内レセプターとの結合に重要な役割を持つことが推定される。しかし yeast two-hybrid 法で検討したかぎりでは 3 個の LXXLL 配列を含む領域のみでは核内レセプターとの相互作用は弱く、LXXLL 配列のほかに FXXLL または LXXIL 配列からなる NR box 4 が必要であることが示された (Fig. 12)。NR box 4 が核内レセプターとの結合にどのように働くかは明らかではないが、直接的に核内レセプターに結合している可能性や、NR box 1-3 の領域が効果的に核内レセプターと結合できるように構造を安定化させる働きを持つ可能性が考えられる。最近の報告ではマウス TIF2 (GRIP1) の 1011-1121a.a 領域に AR やグルココルチコイドレセプター (GR) との結合に補助的に働く領域があるという報告や (50)、SRC-1 のポリグルタミン領域が AR の AF-1 に作用するという報告もあり (51)、核内レセプターと p160 ファミリーの相互作用には LXXLL 配列の重要性に加え、周囲の配列の影響も無視できないと考えられるようになってきている。NR box 4 もそのうちのひとつであると考えられるため、GST pull-down 法や yeast two-hybrid 法を用いて、NR box 4 単独の配列と核内レセプターの直接的な相互作用の検討や 1 アミノ酸置換したときの影響について解析を行うことにより NR box 4 の働きを明らかにすることは今後の課題である。

第四節の yeast two-hybrid 法では用いるレセプターや p160 ファミリーの種類により相互作用の強さが異なることが示された。それぞれの相互作用の強弱が yeast 内における融合タンパク質の発現量の差やリガンドの膜透過性の違いに由来していると解釈することも可能なため、融合タンパク質の確認や他の実験系での検討が必要とされる。しかし、p160 ファミリー間で NR box 1-3 の配列が極めて類似しているにもかかわらず、ACTR、SRC-1、TIF2 では TIF2 が PR を除き、どのレセプターとも強く結合することは、各 NR box 間の配列や距離の違いにより NID の構造の違いが生じ、核内レセプターとの相互作用に影響を与えていることを示唆する。実際の生体内において全長の構造をとったときに

は、NID 単独のときよりもさらにファミリー間で構造が異なっている可能性も推測され、その違いが機能上の違いを生むものと考えられる。これまでに SRC-1 の LXXLL を含むペプチドとリガンドの結合した PPAR γ の結晶構造が明らかとなっているが (52)、ACTR、SRC-1、TIF2 の全長の結晶構造解析に興味もたれる。

哺乳類 p160 ファミリーは CBP や P/CAF などの因子と相互作用することや、弱いながらも HAT 活性をもつことが明らかにされている。これらの性質について本研究では検討していないが、CBP については結合に必要な LLXXLXXXL 配列が、ニワトリにおいても保存されていることから哺乳類と同様に相互作用すると考えられる。P/CAF や CARM1 との結合や HAT 活性を示す領域の解析については哺乳類においても詳細には解析されていないため、アミノ酸配列の保存性から機能は予測できない。

本章においてニワトリ p160 ファミリーをクローニングし、その性質を解析した。ニワトリにおける他のコアクチベーターの存在については RIP140 (53)、p300、TRAP220 の cDNA の一部を当研究室でクローニングしている (データ省略)。また、DT40 細胞の EST データベース (<http://genetics.hpi.uni-hamburg.de/estonline.html>) (54) には核内レセプターコリプレッサーのニワトリホモログとして SMRT と N-CoR が、またコアクチベーターでは N-CoA62 (55) が登録されている。これらのことから哺乳類で単離された核内レセプターコアクチベーター候補因子は鳥類においても保存されていることが推定され、これらの因子を DT40 細胞内でノックアウトし、機能解析を行うことは核内レセプターの転写制御機構を解明する上で意義のあることと考えられる。続く、第二章において ACTR および TIF2 遺伝子ノックアウト細胞を作製し、第三章では核内レセプターの転写制御における ACTR と TIF2 の役割をノックアウト細胞を用いて解析した。

(2) 小括

- (1) ニワトリ ACTR、SRC-1、TIF2 をクローニングし、哺乳類以外の種属においても 3 種類の p160 コアクチベーター遺伝子が存在することを初めて明らかにした。
- (2) ニワトリ脳と肝臓および B リンパ細胞株 DT40 における p160 ファミリーの発現量を解析し、組織により異なる発現パターンを示すことを明らかにした。
- (3) ニワトリ p160 ファミリーが核内レセプターとリガンド依存的に相互作用することを yeast two-hybrid 法を用いて明らかにし、NR box 4 が結合に重要であることを示した。

第二章 ACTR ノックアウト細胞および TIF2 ノックアウト細胞の作製

DT40 細胞を用いてホモノックアウト細胞を作製するまでの過程を Fig. 13 に示した。DT40 細胞で両方の染色体をノックアウトするには 2 種類のターゲティングコンストラクトを必要とする（例外として DT40 細胞の第 2 染色体はトリソミー (56) なので 3 種類のコンストラクトを必要とする）。ヘテロノックアウト細胞を作製するには 1 種類目のターゲティングコンストラクトを正常細胞に導入し、薬剤選択により得られたクローンについてサザンプロット解析により相同組換えを確認する。DT40 細胞は相同組換えの頻度が高く、ランダムな組換えがおこったクローンと相同組換えがおこったクローンがほぼ 1 対 1 の割合で得られると報告されている (31, 32, 57)。また、ホモノックアウト細胞は 2 種類目のターゲティングコンストラクトをヘテロノックアウト細胞に導入し、同様に相同組換えの起こったクローンを単離する。DT40 細胞で選択に使用できる薬剤マーカー遺伝子は、現在 7 種類あり 3 種類までの遺伝子を一つの細胞内でノックアウトすることが可能である。また、DT40 細胞では Cre-loxP 組換えシステム (58) やテトラサイクリン誘導プロモーター (59)、温度感受性変異株を用いたコンディショナルミュータントの実験系が使用されており細胞レベルで致死遺伝子である場合でも解析を行うことができる。第一章で、ニワトリにおいても p160 ファミリーの 3 種のコアキチペーターが存在することを明らかにし、核内レセプターと相互作用することを示した。また、DT40 細胞では ACTR 遺伝子と TIF2 遺伝子が主に発現することを示した。そこで、本章では DT40 細胞を用いて ACTR 遺伝子および TIF2 遺伝子ノックアウト細胞を作製した。

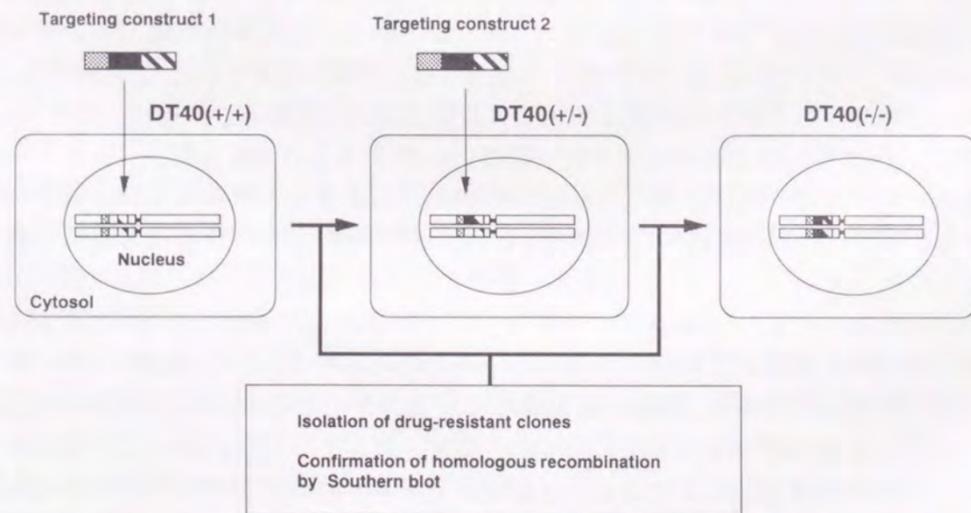


Fig. 13. Strategy of gene-knockout in DT40 cells.

第一節 ACTR ノックアウト細胞の作製

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬

実験試薬、酵素類は第一章、第一節に準じた。なお、L-Histidinol は Sigma から、Hygromycin B はロシュ・ダイアグノスティックスより購入した。エレクトロポレーションはジーンパルサー (Bio Rad) を使用し、0.4 cm キュベットは Bio Rad から購入した。

○ 細胞培養

第一章、第一節に準じた。

○ ゲノム DNA の調製

Molecular Cloning (41) に準じて行った。1 x 10⁷ 個の細胞を遠心分離したペレットに 500 μl の digestion buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5 % SDS, 0.1 mg/ml Proteinase K) を添加し混合した後、50 °C で一晩反応させ、フェノール抽出、エタノール沈殿により調製した。

○ ターゲティングコンストラクトの作製

DT40 細胞より調製したゲノム DNA を鋳型として、LA PCR™ Kit Ver. 2.1 (宝酒造) を使用し、以下のプライマーを用いて増幅した DNA 断片を pBluescript に組み込み、塩基配列を決定した。cDNA 配列との比較によりエキソン/イントロンの位置を決定し、PAS A をコードするエキソンを *in vitro* mutagenesis により欠失させ、制限酵素 BgIII サイトを導入した。BgIII サイトに chicken β-actin プロモーター支配下に薬剤耐性遺伝子を発現する chicken β-actin Hygromycin B 耐性遺伝子または chicken β-actin Histidinol 耐性遺伝子 (京都大学 武田俊一教授より供与) を組み込んだ。

primer ACTR-F 5' - AAGGAAAACTATTTCCAGTGATGATGATGTTTC - 3'

primer ACTR-R 5' - CGAATTGTATCCTCAAAGCCAGGTCTCATGG - 3'

○ サザンプロット

Molecular Cloning (41) に準じて行った。ゲノム DNA 10 μg を制限酵素 EcoRV により切断したサンプルを 0.7 % アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。プローブの標識は第一章、第一節に従った。

○ トランスフェクション

文献 (31) に準じた。1 x 10⁷ 個の DT40 細胞を PBS (1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl) により洗浄後、500 μl の PBS に懸濁し、ターゲティングコンストラクト 30 μg (制限酵素 BamHI で切断し、エタノール沈殿後、30 μl の TE (pH 8.0))

に溶解したもの)と混合後キュベットに入れ、10分間氷冷した。ジーンパルサーを用いてパルス(550 V, 25 μ F)を1回かけた後、10分間氷冷した。90 mlのRPMI1640(0.24 mM 2-mercaptoethanol, 10%子牛血清, 1%ニワトリ血清)に細胞を懸濁後、Hygromycin B(終濃度 1 mg/ml)またはL-Histidinol(終濃度 1 mg/ml)を添加し、4枚の96穴プレートに200 μ l/wellで撒き、5~7日間培養してコロニーを形成させた。

(2) 結果

DT40細胞を用いてACTR遺伝子をノックアウトするため、第一章でクローニングしたcDNA配列を基にbHLH/PASドメインを増幅するプライマーを設計した。ゲノムDNAを鋳型としたPCRにより増幅された約6.5 kbのDNA断片をpBluescriptベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定し、cDNA配列との比較からエキソン/イントロンの位置(Ea-Eh)を決定した(Fig. 14. A)。増幅したゲノムDNA配列のうちPAS A領域をコードするエキソン(Ec)をハイグロマイシン耐性遺伝子またはヒスチジノール耐性遺伝子で置換し、薬剤耐性遺伝子の5'側と3'側それぞれに約2 kbのACTRゲノムDNA配列の相同領域を持つターゲティングコンストラクト、ACTR Hygro および ACTR Hisを作製した。これらのコンストラクトをFig. 13で示した手順に従ってDT40細胞に導入し、薬剤耐性を示すクローンについてサザンプロット解析により相同組換えを確認した。Fig. 14. BはACTR Hygroを導入して作製したヘテロノックアウト細胞にACTR Hisを導入し、得られた薬剤耐性クローンについて相同組換えを確認したときのサザンプロットを示している。ターゲティングコンストラクトの外側に設定したプローブを用いると正常細胞のゲノムでは5.5 kbの位置にバンドが検出される(レーン1)。ヘテロノックアウト細胞ではACTR Hygroが相同染色体の片方のアレルに相同組換えされることにより3.5 kbにバンドが検出されるようになる(レーン2-6)。さらにACTR Hisが相同組換えされるとレーン2と6のクローンのように3.5 kbと8.5 kbにバンドが検出され、ホモノックアウト細胞が作製できた。このように解析したクローンの約1/3で相同組換えが確認され、DT40細胞の相同組換えの頻度が高いことが確認できた。また、ターゲティングコンストラクト内に設計したプローブを用いてサザンプロット解析を行い、薬剤耐性を示すクローンのすべてにおいてターゲティングコンストラクトが染色体上の相同領域またはランダムな領域の1箇所のみ組み込まれていることが確認され(データ省略)、薬剤選択と使用したトランスフェクションの条件が正常に働いていることが確認できた。以上の操作によりACTRヘテロノックアウト細胞を9クローン、ACTRホモノックアウト細胞5クローンを作製した。ホモノックアウトが得られたことからACTR遺伝子は細胞レベルにおける致死遺伝子ではないことが明らかになった。得られたノックアウトクローン間における性質の差はなく、また、ノックアウト細胞は正常細胞と比較し細胞増殖能や形態に著しい変化は認められなかった。

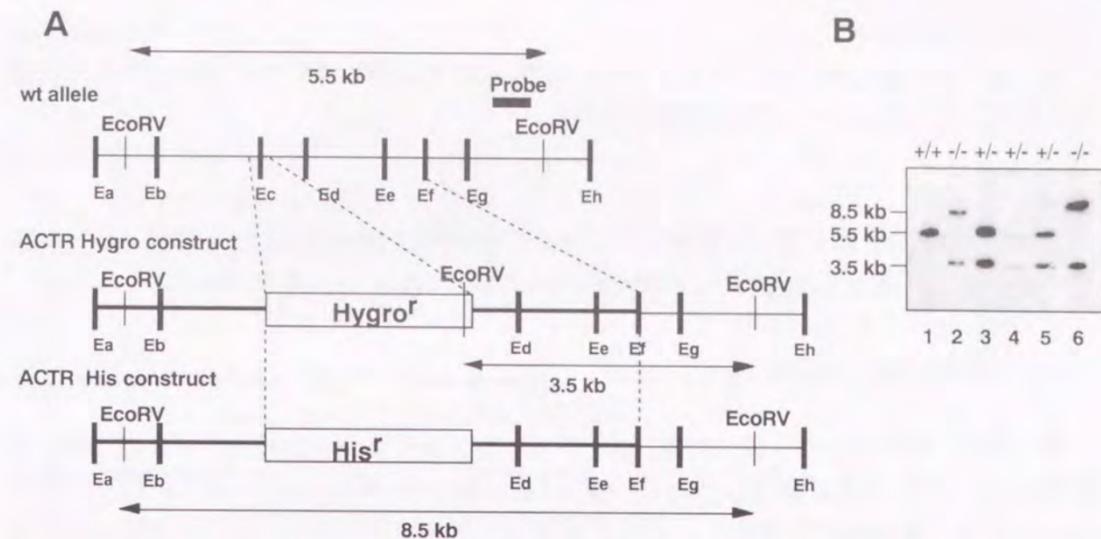


Fig. 14. Targeted disruption of ACTR gene in DT40 cells. (A) Schematic representation of the targeting vectors. The configuration of the wild-type allele is shown at the top. In the targeting vectors, exon encoding PAS-A domain (Ec) is replaced by hygromycin (Hygro^r) or histidinol (His^r) resistance gene cassette. Closed boxes indicate the position of exons deduced from the cDNA sequence. The location of the external probe used to confirm correct targeting events and the relevant EcoRV recognition sites are indicated. (B) Southern blot analysis of targeted integration. A DT40 cell line in which one ACTR allele had been disrupted by targeting construct ACTR-Hygro, was transfected with the second construct ACTR-His. Genomic DNAs from untransfected DT40 cells (lane 1) and 5 doubly resistant clones (lane 2-6) were digested with EcoRV and hybridized with the probe shown in A. Clones of lane 2 and 6 were completely knocked out.

第二節 TIF2 ノックアウト細胞の作製

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬

第二章、第一節に準じた。なお、Blasticidin SはCalbiochemより、PuromycinはSigmaより購入した。

○ ターゲティングコンストラクトの作製

第二章、第一節に準じた。以下のプライマーを用いて増幅した12 kbのDNA断片をpBluescriptに組み込み、PAS AをコードするエキソンをBlasticidin S耐性遺伝子、Histidinol耐性遺伝子またはPuromycin耐性遺伝子(京都大学 武田俊一教授より供与)に置換した。

primer TIF2-F 5' - GAGAAAGCAGCAGCTGCCAACATAGATGT - 3'

primer TIF2-R 5' - AGTAATCATCAGACTCTTGCCTACTCAAAACGA - 3'

○ サザンプロット

第二章、第一節に準じた。ゲノム DNA は *Bam*HI で切断し 0.7 %アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブランに転写した。

○ トランスフェクション

第二章、第一節に準じた。薬剤耐性クローンの選別には Blasticidin S (終濃度 20 μ g/ml)、L-Histidinol (終濃度 1 mg/ml)、Puromycin (終濃度 0.5 μ g/ml) を使用した。

(2) 結果

第一章でクローニングした cDNA 配列をもとにプライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅した約 12 kb の DNA 断片を pBluescript ベクターにサブクローニング後、塩基配列を決定し、cDNA 配列との比較からエキソン/イントロンの位置 (Ea-Ef) を決定した (Fig. 15. A)。PAS A ドメイン (Eb) をコードするエキソンをヒスチジノール耐性遺伝子、ブラスチシジン S 耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子で置換し、薬剤耐性遺伝子の 5'側と 3'側それぞれに約 8 kb と約 3 kb の TIF2 ゲノム DNA 配列の相同領域を持つターゲティングコンストラクト、TIF2 Bsr、TIF2 His および TIF2 Puro を作製した。これらのコンストラクトを DT40 細胞に導入し、薬剤耐性を示すクローンのゲノム DNA についてサザンプロット解析により相同組換えを確認した (Fig. 15. B)。TIF2 は 2 種類のターゲティングコンストラクトで相同組換えを起こした場合においても、正常細胞の染色体由来の 5.5 kb の位置にバンドが検出された。相同組み換えにより出現したバンドと 5.5 kb の位置に検出されるバンドのシグナルの強さの比率が 2 対 1 であったことから (レーン 3)、TIF2 遺伝子はトリソミーである DT40 細胞の第 2 染色体上に存在すると考えられた。そのため 3 種類目のコンストラクトを導入し完全に TIF2 遺伝子をノックアウトした (レーン 4)。TIF2^{+/+}細胞と TIF2^{-/-}細胞の作製の際には、サザンプロット法により解析したクローンの 1/2 から 1/3 の高い確率で相同組換えが確認されたが、TIF2^{+/+}細胞から TIF2^{-/-}細胞が得られる確率は 1/20 程度と低かった。これはゲノム DNA 配列上に組み込まれたターゲティングコンストラクトとトランスフェクションした 3 種類目のターゲティングコンストラクトが入れ替わって相同組換えがおこっているためであると考えられる。また、ターゲティングコンストラクト内に設計したプローブを用いてサザンプロット解析を行い、薬剤耐性を示すクローンのすべてにおいてターゲティングコンストラクトが染色体上の相同領域またはランダムな領域の 1 箇所のみ組み込まれていることを確認し、トランスフェクションの条件および薬剤選択が正常に働いていることを確認した (データ省略)。以上の操作により TIF2^{+/+}細胞を 4 クローン、TIF2^{+/+}細胞を 9 クローン、TIF2^{-/-}細胞を 2 クローン作製した。ホモノックアウト細胞が得られたことから TIF2 遺伝子は細胞レベルにおける致死遺伝子ではないことが明らかとなった。作製したノックアウト細胞はクローン間における性質の差はなく、またノックアウト細胞は正常細胞と比較し細胞増殖能や形態に著しい変化は

認められなかった。

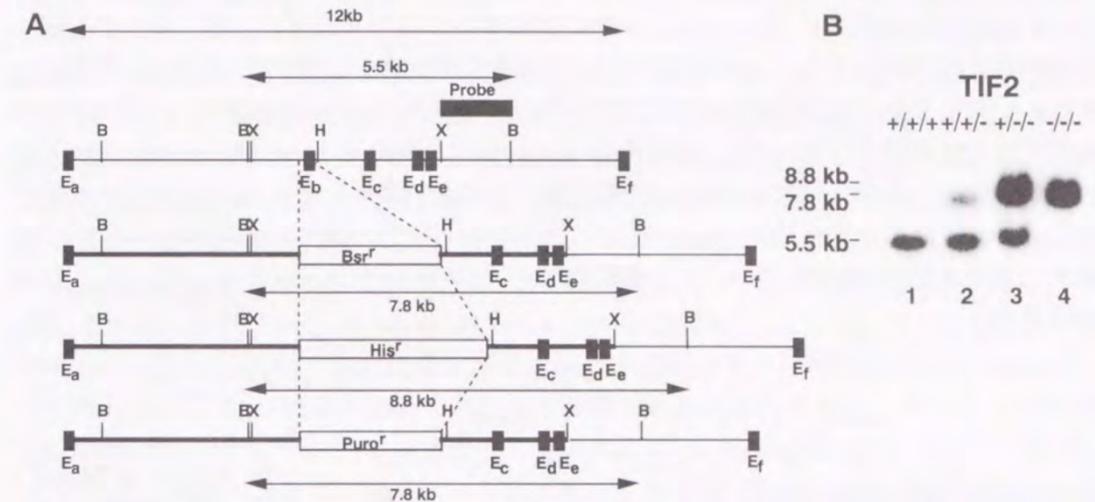


Fig. 15. Disruption of the TIF2 gene in DT40. (A) Schematic representation of the targeting vectors. The configuration of the wild-type allele is shown at the top. In the targeting vectors, exon encoding PAS-A domain (Eb) is replaced by blasticidin S (Bsr), histidinol (His) or puromycin (Puro) resistance gene cassette. Closed boxes indicate the position of exons deduced from the cDNA sequence. The location of the external probe used to confirm correct targeting events and the relevant BamHI (B), Xba I (X) and Hinc II (H) recognition sites are indicated. (B) Southern blot analysis of genomic DNAs from wild-type DT40 (lane 1), TIF2^{+/+} (lane 2), TIF2^{+/+} (lane 3), TIF2^{-/-} (lane 4) clone. The DNA was digested with BamHI and detected by hybridization to the probe shown in A.

第三節 ACTR^{-/-}細胞と TIF2^{-/-}細胞内における p160 ファミリーの発現量の解析

(1) 実験材料および実験方法

- 実験材料および実験試薬
第一章、第一節に準じた。
- RNA の調製
第一章、第一節に準じた。
- ノザンプロット解析
第一章、第三節に準じた。

(2) 結果

ACTR^{-/-}細胞および TIF2^{-/-}細胞内の p160 ファミリー mRNA の発現についてノザンブロット法により解析した (Fig. 16)。ACTR 遺伝子のノックアウトにより、ACTR mRNA の発現は完全に消失した。ACTR^{-/-}細胞では正常細胞と比較し、TIF2 mRNA の発現量は変化しなかったが、SRC-1 mRNA の発現量の増加がみられた。TIF2^{-/-}細胞では TIF2 mRNA の発現は完全に消失した。また TIF2 遺伝子ノックアウトにより ACTR mRNA の発現量は変わらなかったが、SRC-1 mRNA の発現量の増加が観察された。ACTR 遺伝子、TIF2 遺伝子のいずれをノックアウトした場合においても SRC-1 mRNA の発現量の増加が観察されることから、p160 ファミリー間で互いの発現量をコントロールしていることが示唆された。

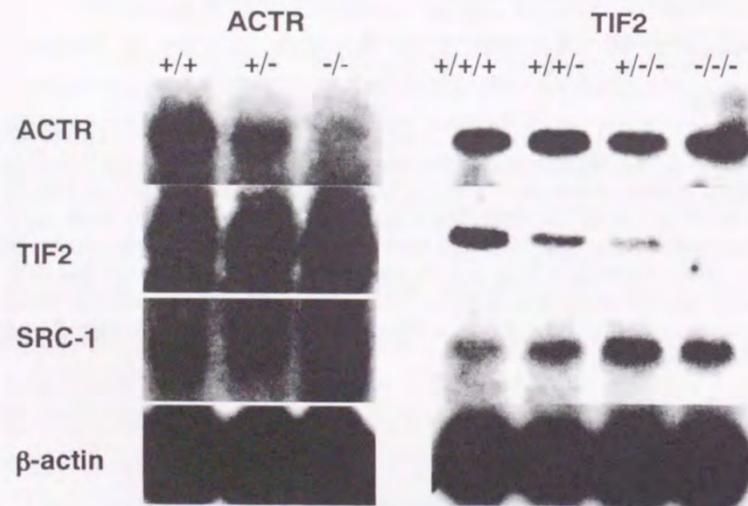


Fig. 16. Expression of p160 family in ACTR-null DT40 (left panel) and TIF2-null DT40 cells (right panel). Total RNAs (30 μ g) from wild-type and knockout cells were electrophoresed on an agarose gel, transferred to nylon membrane, and probed with cACTR, cSRC-1, cTIF2 or β -actin cDNA.

第四節 考察および小括

(1) 考察

本章において DT40 細胞を用いて p160 ファミリーのうち、ACTR 遺伝子と TIF2 遺伝子についてノックアウト細胞を作製した。近年、DT40 細胞の相同組換えの頻度の高さを利用し多くの遺伝子のノックアウトが報告されている。それらの遺伝子は、組換えに関わる因子 RAD54 (55)、RAD51 (56)、Ku70 (60) や、細胞周期調節因子 cyclin D1 (32)、リン酸化酵素 Btk (61)、Syk (62)、転写調節因子 TAF_{II}31 (63)、HDAC-2 (64) 等、多岐にわたる。DT40 細胞は相同組換えとランダムな組換えがほぼ 1 対 1 で起こると報告されているが、本研究においては相同組換えよりもランダムな組換えの方がやや多く観察された。これは薬剤耐性遺伝子の両側のゲノム相同領域の長さ由来すると考えられ、相同領域を長くすることで改善されると考えられる。ただし、TIF2 遺伝子の様にトリソミーの第 2 染色体上に存在する場合、最後の染色体のターゲッティングは 3 本の染色体中 2 本にターゲッティングコンストラクトが組み込まれた状態にあるため、トランスフェクションしたターゲッティングコンストラクトと染色体上のターゲッティングコンストラクトとの相同組換えが起こり、見かけ上、相同組換えの確率が低下するため、ホモノックアウト細胞を作製するためにはたくさんのクローンを解析する必要がある。DT40 細胞が高い相同組換え能力を持つ理由については、ニワトリ B 細胞では抗体遺伝子の多様性を相同組換えを利用して作り出すためと説明されているものの、はっきりとしたことはわかっておらず、その仕組みが明らかになれば哺乳類細胞株においてもノックアウト細胞の作製が可能になると考えられる。

ACTR と TIF2 遺伝子のターゲッティングは N 末端側の bHLH/PAS ドメインのうち PAS A をコードしているエキソンを薬剤耐性遺伝子に置き換えることにより行った。ノックアウト細胞を作製する場合には遺伝子座全体を完全に除去することが理想的だが、p160 ファミリーは cDNA のサイズが 5 kbp と長いと、ゲノムのサイズは数 10 kb に及ぶと予想され、遺伝子全体を除去することは技術的に困難である。そのため最も N 末端側に位置し、ファミリー間や種属間で高く保存されている bHLH/PAS ドメインをノックアウトする領域とした。bHLH/PAS ドメインは転写因子 Ah レセプターや HIF1 については 2 量体形成に関与することが明らかにされているが (65, 66)、p160 ファミリーの bHLH/PAS ドメインの機能についてはこれまで不明であった。最近、この領域に転写因子 TEF ファミリーや MEF2 が結合することが報告され (67, 68)、p160 ファミリーにおいても bHLH/PAS ドメインがタンパク質-タンパク質間相互作用に働く重要な機能ドメインに相当すると考えられ、この領域をノックアウトすることは妥当であると考えられる。

第三節において相同組換えが起こった細胞についてノザンブロット解析をした結果、ACTR、TIF2 のいずれについてもノックアウトに伴い、それぞれの mRNA は検出されなくなった。また、相同組換えで破壊したエキソンの下流に別のプロモーターが存在し、

そこからアイソフォームが発現する可能性も考えられるが、ノザンプロット解析ではそのような産物由来のバンドは検出されなかった。また、TIF2 についてはウェスタンプロットにおいて TIF2 が検出されなくなることを確認した（データ省略）。これらの結果から作製したホモノックアウト細胞では、ACTR または TIF2 が完全に消失していると考えられる。

ACTR または TIF2 遺伝子をノックアウトすることにより、正常細胞でほとんど発現していなかった SRC-1 の mRNA 量が増加した。この増加が転写レベルの上昇によるものか、mRNA の安定性の増加によるものかについては不明であるが、p160 ファミリー間で互いの発現量をコントロールするシステムの存在が予想される。また、SRC-1 のノックアウトマウスでは、ACTR mRNA の発現量は変化しないが、TIF2 mRNA の増加が認められることが報告されており（69）、p160 ファミリーの一つの因子をノックアウトすると他の p160 ファミリーの発現量が増加するという点で一致した。そのメカニズムを解明するためにはさらなる検討が必要であるが、一つの仮説として以下のようなことが考えられる。p160 ファミリーは DNA 結合能を持たないと考えられているが、bHLH は DNA 結合ドメインとしても機能することが知られていることから、何らかのコファクターと会合した場合、もしくはリン酸化やアセチル化等の修飾を受けた際に p160 ファミリーは DNA に結合し、転写レベルを調節している可能性が考えられる。例えば ACTR/TIF2 ヘテロダイマーが SRC-1 遺伝子を抑制しており、ACTR/SRC-1 ヘテロダイマーが TIF2 遺伝子の抑制に働いているといったメカニズムが考えられる。

p160 ファミリー遺伝子自身の発現制御機構についてはほとんど解析されていないことから、今後 p160 ファミリーのプロモーター解析やその上流の制御領域に関する解析を行い、その発現制御に関わる因子と p160 ファミリーの関連性を明らかにすることや、p160 ファミリーのプロモーターや制御領域をレポーター遺伝子上流に組み込み、p160 ファミリーの存在量の異なる細胞に導入した際の活性を比較することで、p160 ファミリー間で互いの発現量をコントロールするメカニズムについての解明の糸口が見つかるのではないかと考えられる。特に ACTR 遺伝子は乳癌細胞で過剰に発現することが認められており（15）、乳癌細胞の増殖と密接な関係があると推測されるため、発現制御メカニズムを解析することによりその病態の解明や治療薬の開発につながるものと期待される。

本章においてホモノックアウト細胞が作製できたことから ACTR 遺伝子、TIF2 遺伝子ともに細胞レベルにおける致死遺伝子ではないことが示された。作製したノックアウト細胞は形態や細胞増殖に対する明らかな影響はみられなかった。しかし、通常の培養条件において明らかな異常は認められなくても、熱、放射線照射、酸化剤、抗癌剤などの環境ストレスや化学ストレスを与えた場合に正常細胞との差が認められる可能性も予想できる。最近、2つのグループから ACTR 遺伝子ノックアウトマウスに関する報告がされている。ACTR は個体レベルにおいて致死遺伝子ではないが、生殖能力が正常マウスと比較し弱いことが示されている（70）。また mouse embryonic fibroblasts (MEF) 細胞を樹立し解析した結果、ACTR ホモノックアウトマウス由来の MEF 細胞が、血清除

去の条件において培養したのち、IGF-1 や Growth Hormone の増殖刺激を与えた場合、正常細胞よりも増殖能力が低下することが示されている（71）。この MEF 細胞でみられる現象が DT40 細胞のノックアウトでも確認されるかについて検討し、そのメカニズムを解明することは今後重要な課題であると考えられる。

最近になり、SRC-1 ノックアウトマウスと ACTR ノックアウトマウスが報告されたが、核内レセプターを介した転写制御における p160 ファミリーの機能については、SRC-1 ノックアウトマウスにおいて PPAR の標的遺伝子の発現誘導が正常マウスと同様に起こるという報告があるのみでほとんど解析されていない（72）。続く第三章において、本章で作製したノックアウト細胞を用いて核内レセプター転写制御における ACTR および TIF2 の役割について検討を行った。

（2） 小括

- （1） ACTR^{-/-}細胞および TIF2^{-/-}細胞を作製した。
- （2） ACTR^{-/-}細胞および TIF2^{-/-}細胞では正常細胞と比較し、SRC-1 の発現量が増加することを明らかにし、p160 ファミリー間で互いの発現量を調節していることを示唆した。

第三章 核内レセプター転写制御機構における ACTR と TIF2 の機能

第一節 核内レセプター転写制御機構における ACTR の機能の解析

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬
第一章、第一節に準じた。

○ プラスミド構築

エフェクタープラスミド：
human ER α 全長の発現プラスミドには pCXN2-hER α (村松正實氏より供与) を使用した。rat GR, rat TR α , rat VDR, rat RXR β の全長を発現するプラスミドとして pRc/RSV-rGR, pRc/RSV-rTR α , pH β Apr1-rVDR, pH β Apr1-rRXR β を使用した。

レポータープラスミド：
ルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に SV40 プロモーターを持つ PGV-P (東洋インキ製造) に以下の応答配列を組み込んだものを使用した。

- (ERE) x 4 - PGV-P : アフリカツメガエルのビテロゲニン遺伝子 (73) の ERE を 4 個つないだ配列 (徐 明旭氏より供与) を PGV-P に組み込んだものを用いた。
- GRE - PGV-P : GRE のコンセンサス配列 1 個を PGV-P に組み込んだものを用いた。
- (TRE) x 2 - PGV-P : TRE のコンセンサス配列 2 個を PGV-P に組み込んだものを用いた。
- (mSpp-1) x 3 - PGV-P : マウスオステオポンチン遺伝子 (74) の VDRE 3 個をタンデムに組み込んだものを用いた。

○ トランスフェクション

1×10^7 個の DT40 細胞を RPMI1640 (フェノールレッドフリー) により洗浄後、500 μ l の RPMI1640 (フェノールレッドフリー) に懸濁し、レポータープラスミド 20 μ g、エフェクタープラスミド 5 μ g (TR α と VDR は 2.5 μ g の RXR β と合わせて 5 μ g とした)、pRSV- β -gal 5 μ g と混合後キュベットに入れ、10 分間室温で放置した。ジーンバルサーを用いてパルス (250 V, 960 μ F) を 1 回かけ、その後 10 分間水冷した。20 ml の RPMI1640 (フェノールレッドフリー、デキストラン - 活性炭処理した 10 % 子牛血清、1 % ニワトリ血清) で懸濁後、2 枚のプレートに 10 ml ずつ分け、片方にはリガンドを 10 μ l、もう一方には溶媒のみを 10 μ l 加え 24 時間培養した。

リガンドとして以下の物質を使用した。

ER : 17 β -estradiol (和光純薬) を終濃度 1×10^{-7} M になる様に添加した。溶媒は DMSO を用いた。

GR : dexamethasone (Sigma) を終濃度 1×10^{-7} M になる様に添加した。溶媒はエタノールを用いた。

VDR : 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (中外製薬株式会社より供与) を終濃度 1×10^{-8} M になる様に添加した。溶媒はエタノールを用いた。

TR : 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine (T₃) (Sigma) を終濃度 1×10^{-7} M になる様に添加した。溶媒は 0.02 M NaOH を用いた。

○ ルシフェラーゼ活性測定

トランスフェクションした細胞を遠心分離により集め、PBS で洗浄したペレットに細胞溶解液 150 μ l を加えて 15 分間静置した。その溶液を 15000 rpm x 10 秒 (TMP-11 roter; TOMY) で遠心し、その上清を細胞抽出液とした。測定はピッカジーン発光キット (東洋インキ製造) の発光基質液 100 μ l に対し細胞抽出液 2 μ l を加え、10 秒間の発光量をルミノメーター (Lumat LB9501; Berthold) により測定した。その測定値を β -galactosidase 活性値により補正した。

(2) 結果

ACTR⁺細胞について核内レセプターの転写への影響をルシフェラーゼアッセイにより解析した。ER α 、GR、TR α 、VDR の発現プラスミドと各々のレセプターの応答配列を組み込んだレポーター遺伝子発現プラスミドとともに正常細胞または ACTR⁺細胞にトランスフェクションし、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。リガンドを添加していない場合のルシフェラーゼ活性は、正常細胞と ACTR⁺細胞でほとんど差はなく、Fig. 17 にはリガンドを添加した時のルシフェラーゼ活性を溶媒のみを添加した時のルシフェラーゼ活性で割った値 (fold induction) で表わした。正常細胞と比較し、ACTR ノックアウト細胞ではどのレセプターに対してもリガンドによる転写活性化能に若干の低下がみられるものの、大きな低下は認められず、核内レセプターのリガンド依存性の転写活性化能への ACTR の関与はあまり大きくないと考えられた。

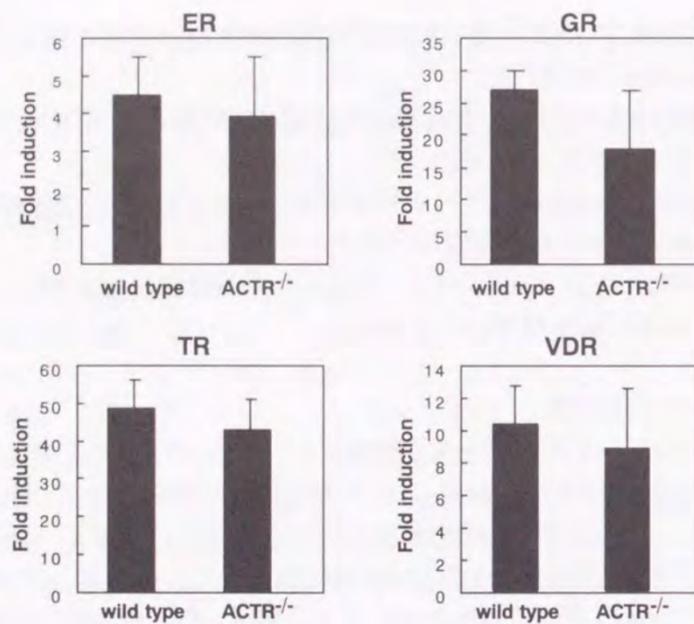


Fig.17. Effect of ACTR-knockout on ligand-dependent transactivation of nuclear receptors. Luciferase reporter gene activities under the control of GRE, ERE, TRE, or VDRE were measured from extracts of wild type DT40 cells, and ACTR^{-/-} DT40 cells after the cells were transiently transfected by the corresponding reporter and receptor expression plasmids. Relative luciferase activities to the internal β -galactosidase activities were determined. The values are represented as fold stimulation compared the ligand treated activity to vehicle treated activity. The ligands and their final concentrations used in these assays are as follows: Dex (100 nM) for GR; estradiol (100 nM) for ER; T₃ (100 nM) for TR; 1, 25-(OH)₂D₃ (10 nM).

第二節 核内レセプター転写制御機構における TIF2 の機能の解析

(1) 実験材料および実験方法

- 実験材料および実験試薬
第一章、第一節に準じた。
- トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ
第三章、第一節に準じた。

(2) 結果

TIF2^{+/+}細胞について核内レセプターを介した転写制御への影響をルシフェラーゼアッセイにより解析した。ER α 、GR、TR α 、VDR の発現プラスミドと各々のレセプターの応答配列を組み込んだレポーター遺伝子発現プラスミドを正常細胞または TIF2^{+/+}細胞にトランスフェクションし、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。レセプター発

現プラスミドの量は3段階に分けて解析を行い、Fig. 18にはリガンド存在時のルシフェラーゼ活性を非存在時の活性で割った値 (fold induction) で表わした。レセプター発現プラスミドを全く加えない条件では、GR のリガンドであるデキサメタゾンや ER のリガンドであるエストラジオールの添加による転写活性化は正常細胞においても TIF2^{+/+}細胞においても全く観察されず (データ省略)、DT40 細胞には内在性の GR や ER はほとんど発現していないと考えられた。正常細胞に ER または GR の発現プラスミドをレポーターとともにトランスフェクションするとリガンドによる転写活性化が観察され、レセプター発現プラスミドの量に依存して ER に関しては約 4.5 倍、GR では約 27 倍まで転写活性化能は増強された。一方、TIF2^{+/+}細胞においては ER のリガンド依存的な転写活性化は全ての条件で約 1.5 倍程度であり、正常細胞と比較し ER の転写活性化能は大きく低下した。また同様に、GR についても全ての条件において転写活性化能は正常細胞よりも低下しており、GR 5 μ g の条件では正常細胞では約 27 倍の転写活性化能を示すのに対して TIF2^{+/+}細胞では約 6 倍と転写活性化能が大きく低下していた。これらの結果から ER と GR を介した転写制御に TIF2 が重要な働きをしていることが示された。TIF2^{+/+}細胞においては GR のリガンド添加による転写活性化能が若干認められ、内在するコアクチベーター作用を持つ因子が存在すると示唆されるが、その因子の候補としては TIF2 遺伝子をノックアウトすると発現量の増加する SRC-1 であることが予想される。TIF2^{+/+}細胞においては正常細胞の場合の様にレセプター発現プラスミドの量に依存して転写活性化能は増強されず、2.5 μ g から 5 μ g にかけては若干低下した。これは GR 量が多くなると、TIF2^{+/+}細胞に存在する微量の SRC-1 に対する競合が起こっているためと推察される。この結果から、細胞内に存在する TIF2 と SRC-1 の存在量が ER と GR の転写制御に非常に重要であることが考えられる。

TR と VDR に関してはそれぞれの発現プラスミドおよび結合補助因子 RXR の発現プラスミドをトランスフェクションしない条件でもリガンド添加による転写活性化がみられ、DT40 細胞には内在性の VDR、TR、RXR が存在すると考えられる。内在性のレセプターを用いても、レセプター発現プラスミドを導入した場合においても TIF2^{+/+}細胞では正常細胞と比較し、転写活性化能の著しい低下は認められず、TR と VDR の転写制御における TIF2 の関与はあまり大きくないと考えられる。

以上の結果から TIF2 が GR と ER の転写制御に必要であることが示された。また、TIF2^{+/+}細胞では TR と VDR の転写活性化能は正常細胞と変わらないことから、*in vivo* では TIF2 は核内レセプターのすべてに働くのではなく選択的に働いていることが示唆される。

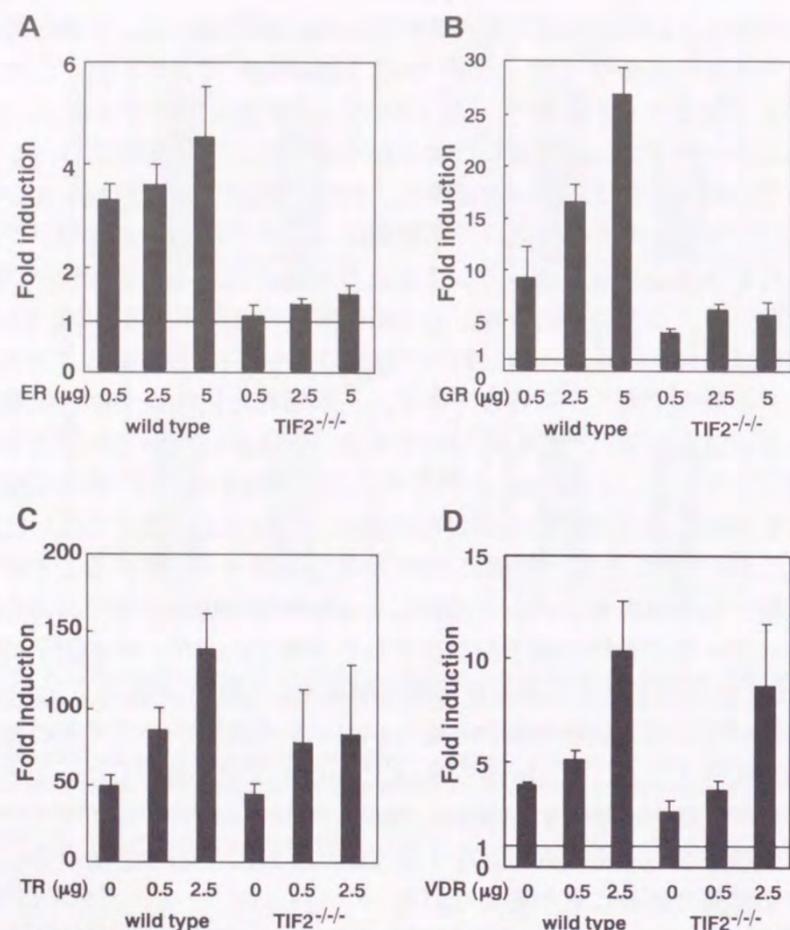


Fig.18. Effect of TIF2-knockout on ligand-dependent transactivation of nuclear receptors. Luciferase reporter gene activities under the control of ERE (A), GRE (B), TRE (C), or VDRE (D) were measured from extracts of wild type DT40 cells, and TIF2^{-/-} DT40 cells after the cells were transiently transfected by the corresponding reporter and indicated amount of receptor expression plasmids. Relative luciferase activities to the internal β -galactosidase activities were determined. The values are represented as fold stimulation compared the ligand treated activity to vehicle treated activity. The ligands and their final concentrations used in these assays are same as Fig. 17.

第三節 TIF2^{-/-}細胞における TIF2 と SRC-1 の過剰発現の影響

(1) 実験材料および実験方法

○ 実験材料および実験試薬

第一章、第一節に準じた。なお、薬剤耐性クローンの選別には G418 二硫酸塩 (ナカライテスク) を用いた。

○ プラスミド構築

human TIF2 または human SRC-1 の全長を、真核細胞における選択マーカー遺伝子と

してネオマイシン耐性遺伝子を持ち、CMV プロモーター支配下に目的遺伝子を発現する真核細胞発現プラスミド pBK-CMV (Stratagene) に組み込んだ。

○ human TIF2 または human SRC-1 過剰発現細胞の作製

トランスフェクションは第二章、第一節に準じた。薬剤耐性クローンの選別には G418 二硫酸塩 (終濃度 1 mg/ml) を用いた。

○ ルシフェラーゼアッセイ

第三章、第一節に従った。

(2) 結果

TIF2^{+/+}細胞で観察された GR の転写活性化能の低下が TIF2 遺伝子ノックアウトによる影響であることを確かめるため、TIF2^{+/+}細胞にヒト TIF2 遺伝子を強制発現させた細胞を作製し、同様にルシフェラーゼアッセイにより解析した。また、TIF2 遺伝子をノックアウトした細胞では、SRC-1 の発現量が上昇し、これら 2 つの因子は相互に補い合う関係にある可能性が考えられる。そこで、ヒト SRC-1 遺伝子を導入した細胞を同様に作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 19)。その結果、TIF2^{+/+}細胞に TIF2 または SRC-1 を導入した細胞で GR の転写活性化能の回復が観察され、ER と GR の転写活性化能の低下は TIF2 の発現が消失したことによるものであり、また、SRC-1 は TIF2 の機能を代替できることが示された。

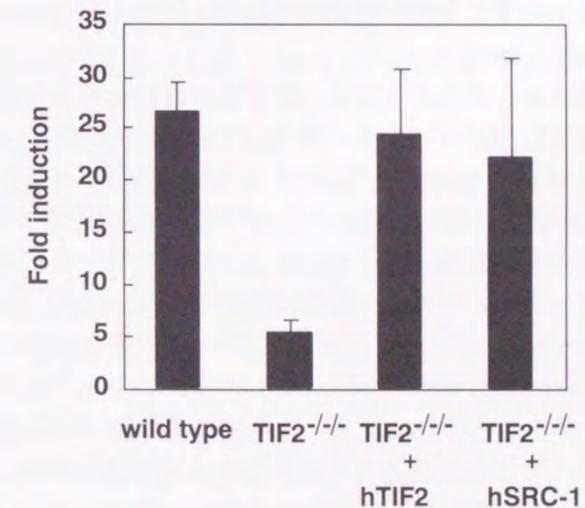


Fig.19. Recovery of transcriptional activity of glucocorticoid receptor by ectopic expression of human TIF2 or human SRC-1. hTIF2 or hSRC-1 was stably introduced into TIF2^{-/-} DT40 and assayed for their ability to stimulate transcription by GR.

第四節 考察および小括

(1) 考察

本章において ACTR^{-/-}細胞と TIF2^{-/-}細胞を用いて核内レセプターの転写制御におけるこれらの因子の役割について解析した。第一節において ACTR^{-/-}細胞では核内レセプターの転写活性化能は正常細胞に較べほとんど変化しないこと、第二節において TIF2^{-/-}細胞では ACTR が正常細胞と同程度発現しているにもかかわらず、ER と GR の転写活性化能が低下することを示した。これらの結果より、ACTR は核内レセプターの転写制御には大きく関与していないことが考えられる。また、第二節と第三節において TIF2 が存在しない細胞では ER と GR の転写活性化能が大きく低下することを明らかにし、さらにこの低下が TIF2 を発現させることによって回復することを示し、TIF2 が ER と GR の転写活性化に機能していることを明らかにした。また第三節において TIF2^{-/-}細胞に SRC-1 を過剰に発現させた細胞を用いて SRC-1 と TIF2 の機能が重複していることを明らかにした。以上のことから細胞内に存在する TIF2 と SRC-1 の量が ER と GR の転写活性化能力を決定する細胞内の限定因子であると考えられる。つまり、SRC-1 と TIF2 は核内レセプターの転写制御に関しほぼ同じ機能を持っており、細胞内に TIF2 もしくは SRC-1 のどちらかが存在することが ER と GR の転写活性化の必要条件と考えられる。Shim らにより蛍光抗体染色を用いてシングル細胞レベルで SRC-1 と ER α 、その標的遺伝子 PR の細胞内の発現量を解析した結果、SRC-1 の存在の認められない細胞でも、ER α さえあれば標的遺伝子である PR が発現しているという報告がある (75)。このことは、SRC-1 が ER α の転写活性化に必須ではなく、他に代替できる因子の存在を想定させる。また、SRC-1 ノックアウトマウスがほぼ正常であることも TIF2 が SRC-1 の機能を代替しているためだと考えられる。

しかし、TIF2 や SRC-1 がどのようなメカニズムにより転写活性化に働いているかは不明であり、さらなる解析が必要である。TIF2 はリガンドと結合したレセプターと相互作用し CBP/p300 や P/CAF といった HAT 活性をもった因子をリクルートするというモデルから考えると、今回は HAT 活性やクロマチン構造の変換に関しては全く検討しておらず、今後はクロマチン構造に焦点をしばった解析を行うことが課題である。今回の実験系ではレポータープラスミドを一過性に細胞内に発現させており、レポータープラスミドは生体内でみられるような完全なクロマチン構造をとっていないと考えられる。しかし、そのような条件下でも TIF2^{-/-}細胞において ER と GR の転写活性化能が大きく低下することは TIF2 がこれらのレセプターの転写制御に非常に重要な機能を果たしていることの証拠であり、染色体上の標的遺伝子について同様に解析した場合には同程度またはそれ以上の転写活性化能の低下がみられるものと考えられる。また、この実験系においてほとんど影響のみられなかった VDR と TR についてもクロマチン構造をとった染色体上の標的遺伝子の転写に関しては ACTR や TIF2 が関与することも考えられる。DT40 細胞には内在性の VDR と TR が存在していることから、VDR と TR の内在性の標

的遺伝子の発現制御における ACTR と TIF2 の関与について検討することが今後の課題である。

TIF2 ノックアウト細胞と ACTR ノックアウト細胞で影響のみられなかった VDR と TR の結果に関しては、細胞内に大量の TIF2 または ACTR が発現しており、一方の因子をノックアウトしても他方の因子が代替し、その影響がみられないと解釈することもできる。第一章において、*in vitro* では TIF2 と ACTR は VDR や TR と非常に強く結合できることが示されており、細胞内における TIF2 または ACTR の存在量が少ない場合でも、TR と VDR は他の核内レセプターよりも優先的に p160 ファミリーと複合体の形成ができるといった見方も可能である。TIF2 と ACTR を同時にノックアウトした細胞を作製し、同様に解析することでこの可能性を追求することが今後の課題である。しかし、TR や VDR のリガンド結合ドメイン (LBD) を細胞内に発現させ抗体により精製した複合体 TRAP/DRIP complex 中には p160 ファミリーは含まれないという結果から考えると、*in vitro* では TIF2 と ACTR は VDR や TR と非常に強く結合できるが、生体内ではそれほど強く結合していないと考える方が現段階では妥当であると考えられる。今後、TRAP220/DRIP205 をはじめ p160 ファミリー以外のコアアクチベーター候補因子についても DT40 細胞を用いて解析することにより、VDR や TR の転写制御に必要なコアアクチベーターが明らかになると考えられる。

ACTR は核内レセプターの転写制御には深く関与せず、TIF2 は ER と GR の転写制御に大きく関与していることから、ACTR と TIF2 は機能が異なることが明らかとなった。この機能上の違いがどこから生じるのかについてはいまのところ明確ではない。第一章で示した NID と核内レセプターの相互作用の解析からは、ファミリー間では TIF2 が最も強く核内レセプターと結合した。この NID と核内レセプターの結合能力の強弱が p160 ファミリーの機能を規定しているのか、それとも ACTR と TIF2 では NID 以外に何らかの違いを持つのかについてはさらなる解析が必要である。Shang らのクロマチン免疫沈降法を用いた実験ではクロマチン上のエストロゲン応答配列 (ERE) 付近に ER とともに ACTR が存在していることが示されている (76)。この結果から、ACTR と TIF2 の機能上の違いを説明するならば、TIF2 はクロマチン上の ERE に ER を誘導するという段階で働いている仮説 (Fig. 20) が考えられる。ER や GR はリガンドと結合していない状態では細胞質に存在し、リガンドが結合すると核へと移行するといわれている。TIF2 は ER や GR がリガンドと結合して核内に移行したときにこれらのレセプターと複合体を作り、クロマチン上の応答配列まで誘導し、クロマチン構造を変換させることによりレセプターと DNA との結合を促進する作用をもっている。ACTR には、そのような誘導作用はないが、クロマチン上に結合したレセプターとは結合できると考えると、Shang らのデータと本研究のデータが説明できると考えられる。また、TIF2 は通常核内に存在するが、核移行シグナルを欠損させた TIF2 変異体はエストロゲン存在下では細胞質から核に移行するという免疫染色の報告もあり (10)、このことは生体内でも ER と TIF2 がリガンド依存的に強く相互作用することを示唆し、この仮説を支持する。また、この仮説ならば、リガンドのない状態で核内に存在し、クロマチン上で転写を抑制している

TR や VDR の転写制御に TIF2 が働かないことを説明できる。今回は 4 種類の核内レセプターに関してのみしか解析していないため、さらに多くのレセプターについても同じことがいえるのかを確認することでこの仮説の信頼性が明らかにされると考えられる。

最近、ACTR ノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞のレチノイン酸レセプター (RAR) を介した転写制御に関して、10 % 血清存在下においては正常な転写活性化能を示すが、血清非存在下においてはレチノイン酸依存的な転写活性化能の低下がみられること、またインターフェロン γ 刺激により誘導される転写活性化能についても同様な条件下で低下することが報告された (71)。これらの結果が ACTR をノックアウトした DT40 細胞においても観察されるかを調べることや、p160 ファミリーは核内レセプター以外にも転写因子 HIF-1、NF- κ B などのコアクチベーターとして機能するといった報告もあり (77, 78)、これらの転写因子への関与を解析することも今後の課題といえる。

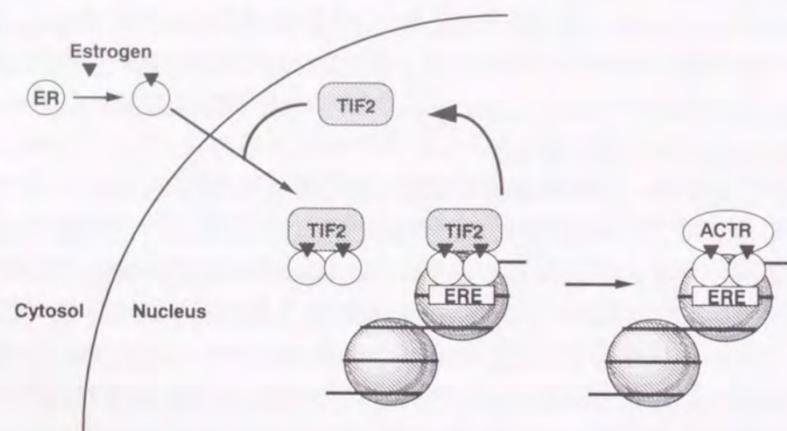


Fig. 20. Speculative model of TIF2 function.

(2) 小括

- (1) ACTR^{-/-}細胞では、核内レセプターの転写活性化能は正常細胞とほとんど変化せず、ACTR は核内レセプターの転写制御に深く関与しないことを示した。
- (2) TIF2^{-/-}細胞を用いて核内レセプターの転写制御について解析し、ER と GR の転写制御に TIF2 が重要であることを明らかにした。
- (3) TIF2^{-/-}細胞に TIF2 または SRC-1 を発現させることで GR の転写活性化能の低下が回復することを明らかにし、TIF2 と SRC-1 の機能が重複していることを明らかにした。

総括

p160 ファミリーはリガンドと結合した核内レセプターと相互作用する因子として yeast two-hybrid スクリーニングにより単離された因子であり、yeast two-hybrid 法や GST pull-down 法では多数の核内レセプターと相互作用すること、一過性のトランスフェクションを用いた実験によりコアクチベーター作用を示すことが報告されている。本研究の第一章においてニワトリ p160 ファミリーを単離し、哺乳類以外の脊椎動物でも 3 種類の p160 ファミリー遺伝子が存在することを初めて明らかにし、ニワトリ p160 ファミリーも哺乳類と同様に核内レセプターと相互作用することを yeast two-hybrid 法により確認した。第二章において DT40 細胞を用いて ACTR^{-/-}細胞と TIF2^{-/-}細胞を作製し、ノザンプロット法により p160 ファミリーが互いの発現量をコントロールする機構が存在することを示した。続く第三章において核内レセプターの転写制御における p160 ファミリーの機能についてルシフェラーゼアッセイにより解析した結果、TIF2 が ER α と GR の転写制御に重要な働きをもつことを明らかにした。また、TIF2 は yeast two-hybrid 法では VDR や TR と強い結合を示すが、ノックアウト細胞を用いた実験では、TIF2 は VDR と TR の転写制御にはほとんど関与していないことを示した。これらの結果は、核内レセプターを介した転写制御機構におけるコアクチベーターの機能を考えるとき、*in vitro* におけるデータのみではその機能を説明できないことを意味しており、核内レセプターコアクチベーターの機能を解明する上で DT40 細胞を用いた実験系が非常に有用であることを示している。

最後に本研究から得られた知見から予想される p160 ファミリーの機能について Fig. 21 にまとめた。核内レセプターはホモダイマーを形成しパリンドローム配列に結合して働くステロイドレセプターと、RXR とのヘテロダイマーを形成しダイレクトリピート配列に結合して働く非ステロイドレセプターに大別される。ステロイドレセプターはリガンドと結合し、核内に移行し、標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。一方、非ステロイドレセプターはリガンドと結合していない状態ではコリプレッサーと複合体を形成してクロマチン上で転写を抑制していると考えられている。本研究により TIF2 および SRC-1 はステロイドレセプター選択的なコアクチベーターとして機能することが示された。また、ACTR は核内レセプターの転写にはほとんど関与しておらず、一次構造の類似した p160 ファミリー内で各遺伝子産物の機能が異なることが示された。

1998 年に SRC-1 のノックアウトマウスが、また 2000 年に 2 つのグループから ACTR ノックアウトマウスが報告されている (69-72)。これらのマウスから得られた知見によると、ACTR ノックアウトマウスでは生殖系器官の成熟化の遅れが観察される。一方、SRC-1 ノックアウトマウスは若干の子宮重量の低下が認められるがほぼ正常であり、SRC-1 と ACTR では機能上の違いがあることが指摘されている。これらの結果は本研究で得られた p160 ファミリーの欠損はそれぞれ異なった表現型を示すという点で一致している。また本研究では、SRC-1、ACTR ノックアウトマウスではほとんど解析されていない核内レセプターの転写制御について解析を行い、p160 ファミリーの機能上の違

いを明らかにできたことは非常に意義のある結果であるといえる。

p160 ファミリーの関与が認められなかった非ステロイドレセプターの転写に関わるコアクチベーターとしては、TRAP/DRIP 複合体などが働いていることが予想される。これらの因子についても DT40 細胞を用いた遺伝学的解析を行うことで核内レセプターの転写制御メカニズムに関する重要な知見がもたらされるものと考えられる。また、DT40 細胞ではダブルノックアウト細胞やトリプルノックアウト細胞を作製することが可能であり、それらの細胞における解析の結果にノックアウトマウスより得られる知見をプラスすることで、脂溶性リガンドによる転写制御メカニズムがより一層明らかにされることが期待される。

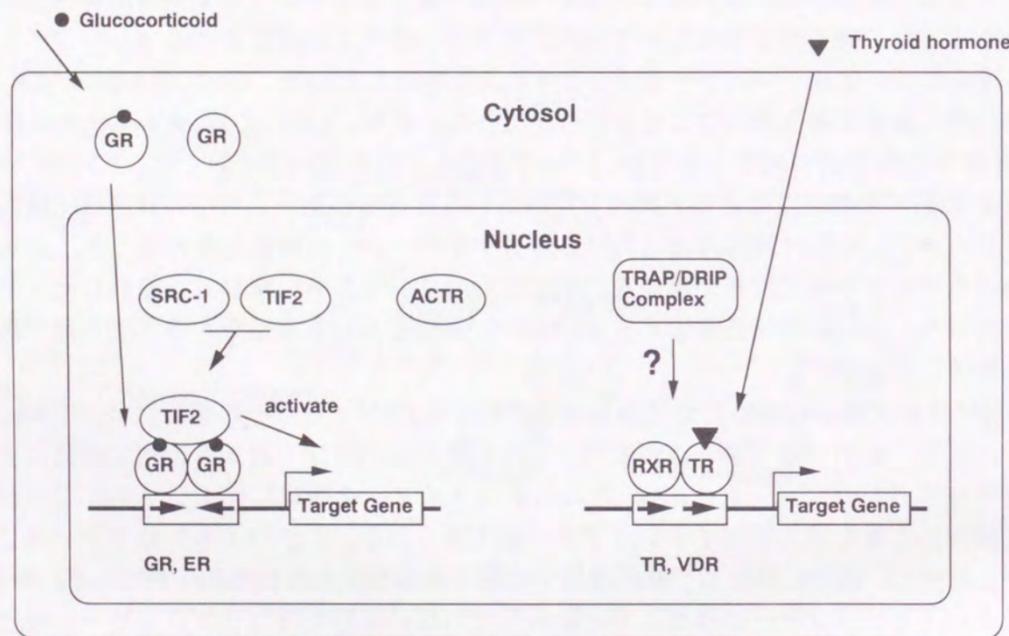


Fig. 21. Model of function of p160 family in transcriptional activation of nuclear receptors.

結論

- (1) p160 ファミリー遺伝子 ACTR、SRC-1、TIF2 のニワトリホモログ遺伝子を単離した。
- (2) ニワトリ p160 ファミリーがリガンド依存的に核内レセプターと相互作用することを示し、その相互作用に LXXLL 様配列 NR box 4 が必要であることを示した。
- (3) DT40 細胞を利用して ACTR^{-/-}細胞および TIF2^{-/-}細胞を作製した。
- (4) ACTR^{-/-}細胞と TIF2^{-/-}細胞では正常細胞と比較し、SRC-1 の発現量が増加することを明らかにした。
- (5) TIF2^{-/-}細胞において ER α と GR のリガンド依存的な転写活性化能が低下することを明らかにし、TIF2 が ER α と GR の転写制御に必要であることを示した。また ACTR は、核内レセプター ER α 、GR、TR、VDR の転写制御に大きな関与はしていないことを示し、TIF2 と ACTR の機能上の差を明らかにした。
- (6) TIF2^{-/-}細胞において SRC-1 を過剰に発現させることで GR の転写活性化が回復することを示し、SRC-1 と TIF2 の機能が重複していることを明らかにした。

謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授、西原 力先生に心から篤く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、熱心な御指導、御鞭撻をいただきました大阪大学大学院薬学研究科助教授、西川淳一先生に深く感謝いたします。

研究途上有益な御助言をいただきました、名古屋市立大学薬学部教授、今川正良先生、大阪大学大学院助手、長田茂宏先生、はじめ微生物動態学分野の皆様には感謝いたします。

実験に熱心にご協力いただきました小川和也修士、山近伸一郎学士、濱口壽雄学士、堀口喜久美学士、山際千恵美学士、牧戸直紀氏に感謝いたします。

DT40 細胞、cDNA ライブラリー、薬剤耐性遺伝子の御供与および実験の御指導をいただきました京都大学大学院医学研究科教授、武田俊一先生に感謝いたします。

活性型ビタミン D を御供与いただきました中外製薬株式会社に感謝いたします。

本研究活動に関して経済的御支援をいただきました財団法人日本学術振興会に感謝いたします。

最後に、常日頃から激励、ご援助をいただきました、諸先生、友人、両親に深く感謝いたします。

参考文献

- 1 Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R. M. (1995) *Cell* **83**, 835-839
- 2 Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995) *Cell* **83**, 841-850
- 3 Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995) *Cell* **83**, 859-869
- 4 Thummel, C. S. (1995) *Cell* **83**, 871-877
- 5 Beato, M., Herrlich, P., and Schütz, G. (1995) *Cell* **83**, 851-857
- 6 Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995) *Nature* **377**, 454-457
- 7 Hörlein, A. J., Näär, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A. J., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1995) *Nature* **377**, 397-404
- 8 Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Mally, B. W. (1995) *Science* **270**, 1354-1357
- 9 Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10626-10631
- 10 Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996) *EMBO J.* **15**, 3667-3675
- 11 Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L., and Stallcup, M. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4948-4952
- 12 Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997) *Nature* **387**, 677-684
- 13 Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997) *Cell* **90**, 569-580
- 14 Li, H., Gomes, P. J., and Chen, J. D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8479-8484
- 15 Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1997) *Science* **277**, 965-968
- 16 Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. -S., and Chin, W. W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27629-27634
- 17 Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R. M. (1996) *Nature* **383**, 99-103
- 18 Hanstein, B., Eckner, R., Drenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R., and Brown, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11540-11545
- 19 Yeh, S., and Chang, C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5517-5521
- 20 Castillo, G., Brun, R. P., Rosenfield, J. K., Hauser, S., Park, C. W., Troy, A. E., Wright, M. E., and Spiegelman, B. M. (1999) *EMBO J.* **18**, 3676-3687
- 21 Fondell, J. D., Ge, H., and Roeder, R. G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8329-8333
- 22 Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C. P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst,

- P., and Freedman, L.P., (1998) *Genes Dev.* **12**, 1787-1800
- 23 Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996) *Nature* **384**, 641-643
- 24 Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996) *Cell* **87**, 953-959
- 25 Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B. W. (1997) *Nature* **389**, 194-198
- 26 Nagy, L., Kao, H.-Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997) *Cell* **89**, 373-380
- 27 Heinzl, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T.-M., Söderström, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997) *Nature* **387**, 43-48
- 28 Wade, P. A., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 128-132
- 29 Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G., (2000) *Genes Dev.* **14**, 121-141
- 30 Buerstedde, J. M., and Takeda, S. (1991) *Cell* **67**, 179-188
- 31 Takeda, S., Masteller, E. L., Thompson, C. B., and Buerstedde, J. M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4023-4027
- 32 Lahti, J. M., Li, H., and Kidd, V. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 10859-10869
- 33 Ponting, C.P., and Aravind, L., (1997) *Curr. Biol.* **7**, 674-7
- 34 Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G., (1997) *Nature* **387**, 733-736
- 35 Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999) *Science* **284**, 2174-2177
- 36 Voegel, J. J., Heine, N. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H., (1998) *EMBO J.* **17**, 507-519
- 37 Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. -C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G., (1996) *Cell* **85**, 403-414
- 38 Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennström, B. (1986) *Nature* **324**, 635-640
- 39 Krust, A., Stephen, G., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornet, J.-M., and Chambon, P. (1986) *EMBO J.* **5**, 891-897
- 40 Trower, M. K., and Elgar, G. S. (1994) *Methods Mol. Biol.* **31**, 19-33
- 41 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- 42 Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M., and Nishihara, T. (1999) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 76-83
- 43 de la Calle-Mustienes, E., and Gómez-Skarmeta, J. L. (2000) *Mech. Dev.* **91**, 119-129
- 44 Kim, H.-J., Lee, S.-K., Na, S.-Y., Choi, H.-S., and Lee, J. W. (1998) *Mol. Endocrinol.* **12**, 1038-1047
- 45 Enmark, E., and Gustafsson, J. A. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 85-87
- 46 Bienenstock, J. (1984) *Ann. Allergy* **53**, 535-540
- 47 Hayashi, Y., Ohmori, S., Ito, T., and Seo, H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 83-87
- 48 Kalkhoven, E., Valentine, J. E., Heery, D. M., and Parker, M.G. (1998) *EMBO J.* **17**, 232-243
- 49 Li, H., and Chen, J. D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8479-8484
- 50 Hong, H., Darimont, B. D., Ma, H., Yang, L., Yamamoto, K. R., and Stallcup, M. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3496-3502.
- 51 Ma, H., Hong, H., Huang, S. M., Irvine, R. A., Webb, P., Kushner, P. J., Coetzee, G. A., and Stallcup, M. R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6164-6173
- 52 Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T. M., Glass, C. K., and Milburn, M. V. (1998) *Nature* **395**, 137-143
- 53 Cavailles, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J., and Parker, M. G. (1995) *EMBO J.* **14**, 3741-3751
- 54 Abdrakhmanov, I., Lodygin, D., Gerth, P., Arakawa, H., Law, A., Plachy, J., Korn, B., and Buerstedde, J. M. (2000) *Genome Res.* **10**, 2062-2069
- 55 Baudino, T. A., Kraichely, D. M., Jefcoat, S. C. Jr., Winchester, S. K., Partridge, N. C., and MacDonald, P. N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16434-16441
- 56 Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J. M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998) *EMBO J.* **17**, 598-608
- 57 Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S., and Buerstedde, J. M. (1997) *Cell* **89**, 185-193
- 58 Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Sonoda, E., Takeda, S., Yamada, K., Masuko, T., Katada, T., and Enomoto, T. (2000) *EMBO J.* **19**, 3428-3435
- 59 Wang, J., Takagaki, Y., and Manley, J. L. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2588-2599
- 60 Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998) *EMBO J.* **17**, 5497-5508
- 61 Takata, M., and Kurosaki, T. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 31-40
- 62 Qin, S., Minami, Y., Hibi, M., Kurosaki, T., and Yamamura, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2098-2103
- 63 Chen, Z., and Manley, J. L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5064-5076
- 64 Takami, Y., Kikuchi, H., and Nakayama, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23977-23990
- 65 Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29270-29278
- 66 Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 789-794
- 67 Belandia, B., and Parker, M. G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30801-30805

- 68 Chen, S. L., Dowhan, D. H., Hosking, B. M., and Muscat, G. E. (2000) *Genes Dev.* **14**, 1209-1228
- 69 Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1998) *Science* **279**, 1922-1925
- 70 Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C., and O'Malley, B. W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6379-84
- 71 Wang, Z., Rose, D. W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13549-13554
- 72 Qi, C., Zhu, Y., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., Maeda, N., Subbarao, V., Pulikuri, S., Hashimoto, T., and Reddy, J. K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1585-1590
- 73 Druege, P. M., Klein-Hitpass, L., Green, S., Stack, G., Chambon, P., and Ryffel, G. U. (1987) *Nucleic Acids Res.* **14**, 9329-9337
- 74 Noda, M., Vogel, R. L., Craig, A. M., Pahl, J., DeLuca, H. F., and Denhardt, D. T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9995-9999
- 75 Shim, W. S., DiRenzo, J., DeCaprio, J. A., Santen, R. J., Brown, M., and Jeng, M. H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 208-213
- 76 Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., and Brown, M. (2000) *Cell* **103**, 843-852
- 77 Carrero, P., Okamoto, K., Coumilleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., and Poellinger, L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 402-415
- 78 Na, S. Y., Lee, S. K., Han, S. J., Choi, H. S., Im, S. Y., and Lee, J. W. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 10831-10834

