

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

梅澤 喜夫

(東京大学大学院理学系研究科 教授)

「内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と

新しいバイオモニタリング」

### 1. 研究実施の概要

環境中には様々な内分泌攪乱化学物質 (endocrine disrupting chemicals 以下 EDC) が存在することが報告されており、ヒトの精子数減少や乳癌増加などの一因と推測されている。このヒトの生体内恒常性を乱す原因は、“外因性化学物質の異常なホルモン制御によるホルモンの合成異常、その貯蔵もしくは放出の異常、その輸送あるいはクリアランスの異常、受容体の識別あるいは結合の異常、受容体結合後のシグナル伝達過程の異常”として説明されている。この様な諸過程の異常を分子レベルで原因解明することは、化学物質の毒性の決定や予防、更には治療法の研究に多大な情報を提供するため、各種 EDC に対する作用機序を解明するためのスクリーニング法の開発を目指した体系的な研究を、早急に実施する必要があると思われる。

本研究は EDC 暴露による生体侵襲の機序を分子レベルで明らかにし、更に有効で簡便な EDC スクリーニング系を確立することを目的とする。すなわち、生体内ホルモンの合成、分泌、情報伝達に関わる諸過程“遺伝子発現、Ca<sup>2+</sup>、cAMP、diacylglycerol、リン酸化チロシン・セリン・トレオニン、蛋白質間相互作用、細胞内小胞のエキソサイトーシス”を定性・定量評価するための分析手法を開発し、EDC に対する情報伝達諸過程の影響を詳細に解析することを目的とする。この様な情報伝達過程において化学物質をスクリーニングすることにより、膨大な化学物質の中から EDC となり得る化学物質を限定することが可能となる。この限定された化学物質に対して生物化学的手法、即ちその情報伝達に関わる酵素や遺伝子群等の EDC 暴露による酵素活性の変化や発現する塩基配列を詳細に解析することより、内分泌攪乱の原因解明が可能になる。

平成10年度は、diacylglycerol、及び cGMP、の第二次情報伝達物質に対する蛍光プローブ分子の設計及び合成を行った。また蛋白質間相互作用を検出するための疎水場感受性蛍光プローブ分子の合成、及びリン酸化チロシン・セリン・トレオ

ニンを検出するための蛍光共鳴エネルギー移動に基づく蛍光プローブ分子の開発を行った。これらの蛍光プローブとしての機能評価を単一細胞レベルで行うため、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡のシステムの立ち上げを行った。また、ヒト神経芽細胞(NB1)に対する EDC 暴露による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の恒常性攪乱を定量評価するため、Fura2 を用いた高速励起波長切り替え可能な蛍光顕微鏡システムの立ち上げを行った。遺伝子発現に関しては、エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) に  $17\beta$ -estradiol を添加し、SAGE 法により遺伝子発現の変化を検討した。今後は上記蛍光プローブが合成でき次第、NB-1 細胞内の情報伝達の攪乱を評価する。遺伝子発現に関しては、ダイオキシンをヒト肝癌細胞株に添加した時に発現が変動する遺伝子を解析する。更に、EDC により発現が顕著に変化する遺伝子をスライドガラス基板に整列させた DNA チップを作製し、遺伝子発現の変化を指標とした EDC スクリーニング法を開発する。

## 2. 研究実施内容

EDC の作用機序を解明するためには、特定の細胞に実際に化学物質を作用させ、その細胞内情報伝達の諸過程を詳細に探査する必要がある。本研究では、EDC の細胞内標的分子及び標的遺伝子を同定するスクリーニングシステムを構築することを最終目的として、(I) ヒト神経芽細胞 (NB-1) などのモデル細胞に対して細胞内情報伝達の諸過程を指標とした、EDC のスクリーニング法の開発と作用機序を解明するための蛍光プローブ分子の設計・合成およびその分析法の創製を行う。(II) EDC 投与により発現が変化する遺伝子群を Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)法を用い系統的に解析すると共に、DNA チップを用いた EDC バイオモニタリングシステムを確立する。

### (I) 細胞内情報伝達の諸過程を指標とした EDC スクリーニング

第二次情報伝達物質である  $\text{Ca}^{2+}$ 、cAMP、diacylglycerol、蛋白質のチロシン・セリン・トレオニンのリン酸化、カルモジュリンとその標的蛋白質との蛋白質間相互作用、ホルモンの放出過程に関与する細胞内小胞膜のエキソ・エンドサイトーシスの恒常性攪乱を評価することを目的とする。平成10年度は、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社製) のシステムのセットアップを行った。又以下に示す蛍光プローブ分子合成のために必要とする DNA シークエンサー (ABI 社製) 及び PCR (ABI 社製) を購入し、遺伝子実験設備の拡充および整備を行った。

#### (A) 第二次情報伝達物質をプローブとした EDC スクリーニング

$\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 fura 2 を用いて、EDC 投与による  $\text{Ca}^{2+}$  の恒常性攪乱の程度を、単一細胞レベルで励起波長高速切り換え型蛍光顕微鏡を用いて定量評価する。そのための蛍光顕微鏡システムの立ち上げを行った。Diacylglycerol に

対しては、diacylglycerol の細胞内リセプターである protein kinase C (PKC) を用いて、diacylglycerol が結合した時に細胞膜にトランスロケーションするプローブ分子を遺伝子工学的手法を用いて作製した。NB-1 細胞中で phorbol ester 刺激に対して作製したプローブ分子が細胞質から細胞膜にトランスロケーションすることが分かった。今後 EDC 刺激に対してこのプローブを用いて、内分泌攪乱の程度を定量評価する予定である。

(B) リン酸化チロシン・セリン・トレオニンを用いた EDC スクリーニング標的とする蛋白質 (MAP kinase 等) をフルオレセインで標識する。次に我々の開発したリン酸ホストをテトラメチルローダミンで標識する。細胞内でのチロシン・セリン・トレオニンのリン酸化により、リン酸基にリン酸ホスト分子が結合し、フルオレセインとローダミンの間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が生起する。この FRET による蛍光強度・波長変化を蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で測定することにより、EDC 投与によるリン酸化量の変化を単一細胞レベルで定量評価する。これまでにリン酸化チロシン特異的ホスト分子の設計及び合成を行っており、合成が完了次第、細胞内でのリン酸化チロシンの変化を定量的に評価する予定である。

(C) カルモジュリン標的蛋白質間相互作用の可視化とスクリーニング法の開発

カルモジュリン (CaM) と標的蛋白質との相互作用は主に疎水性相互作用であることが知られている。本研究では、チオール標識可能な疎水場感受性蛍光団を設計・合成する。次に標的蛋白質、CaMKII、NO synthase、adenylate cyclase、guanylate cyclase 各々の CaM 結合部位に疎水場感受性蛍光色素を導入する。CaM と前記標的蛋白質との蛋白質間相互作用に基づき蛍光団の疎水環境が変化することによる、蛍光強度及び波長が大きく変化することを *in vitro* で検討する。疎水場感受性蛍光団をホルモン放出細胞に導入し、内分泌攪乱作用が考慮されている化学物質を細胞に作用させ蛍光強度及び波長変化をプローブとしてスクリーニングを行う。平成 10 年度は細胞内標識可能な疎水場感受性蛍光団の有機合成を行った。今後合成した蛍光団の機能評価を行い、CaM とその標的蛋白質との蛋白質間相互作用を単一細胞レベルで検出する予定である。

## (II) 遺伝子発現の系統的解析

エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) に、 $17\beta$ -estradiol : 10nM を添加し、24 時間後、添加、非添加の細胞より RNA を調製し、SAGE により遺伝子発現の変化を検討した。その結果、従来報告されているカテプシン D、pS2 以外にエストロゲンにより発現が増加する複数の遺伝子が明らかとなった。また従来全く明らかにされていなかった、エストロゲン添加により発現が減少する遺伝子を複数見出した。遺伝子バンクに登録されていない新規遺伝子で発現が顕著に変化する

ものについては全長の cDNA クローニングを行うとともに、それらの機能検索を行なう予定である。また Bisphenol-A を MCF-7 細胞に添加した時に発現が変動する遺伝子についても系統的に解析する予定である。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○A Fluorescent Indicator for Tyrosine Phosphorylation-Based Insulin Signaling Pathways in the Cell. M. Sato, T. Ozawa, T. Yoshida and Y. Umezawa, Anal. Chem., 71, No. 18, 3948-3954 (1999).