

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

名和田 新

(九州大学医学部 教授)

## 「核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質」

### 1. 研究実施の概要

女性ホルモンであるエストロゲン、男性ホルモンであるアンドロゲンは、性腺の分化、発達や性機能、性行動の調節、ひいては男性、女性に特有の性格、すなわち脳の性分化に極めて重要な影響をもたらす。これらの性ステロイドホルモンは、細胞質に存在する受容体タンパク質（ステロイドホルモン受容体）と結合する。結合した受容体は、細胞質から核内へ移行し、標的遺伝子の転写調節領域に結合し、その遺伝子の転写を制御する。この際、転写共役因子と呼ばれる一連のタンパク質と複合体を形成し、さらにこの複合体が RNA ポリメラーゼ II を中心とする基本転写因子群と結合することによって標的遺伝子の転写が行われる。

エストロゲン受容体に結合してエストロゲン作用を発揮するごく一部の物質を除くと、現在までに内分泌かく乱物質として報告されている多くの化学物質の生化学的な作用機序は全く不明であるといっても過言ではない。我々のチームは、性ステロイドホルモン受容体および近年、性腺の発生に重要な役割をになっていることが明らかとなった結合ホルモン未知のステロイドホルモン受容体類似タンパク質（オーファン受容体）と転写共役因子群より構成される複合体に注目して研究を遂行している。内分泌かく乱物質が、この複合体形成さらには基本転写因子群とのコミュニケーションを障害することを生化学的、分子生物学的手法を用いて明らかにしたい。

性腺機能に特異的な障害が生じるためには、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体と特異的に結合する転写共役因子が存在することが想定される。エストロゲン受容体特異的共役因子の同定を柳沢グループ、アンドロゲン受容体特異的因子の同定を名和田グループが施行中であり、同時にこれらの特異的転写共役因子を障害する内分泌かく乱物質をスクリーニング中である。内分泌かく乱物質のスクリーニング作業は、従来実験動物を用いて行われてきた。名和田グループは、新しいスクリーニング作業を開発する目的で、レーザー顕微鏡と三次元画像解析装置を組み合わせ、蛍光タンパク質で標識したステロイドホルモン受容体と転写共役因子の結合を可視化することを試みている。予備実験として、強力な抗アンドロゲン作用を有する抗癌剤が、受容体、転写共役因子の核内における三次元分布に著明な変化をも

たらずことを明らかにした。さらに、雄性器発達抑制作用を有するメラトニンの効果発現が、実験動物の栄養状態によって異なることを明らかにした。内分泌かく乱物質の影響を発現または非発現させることにより、栄養学的に治療できる可能性を探っている。

## 2. 研究実施内容

### (1) 核内受容体/共役因子複合体に及ぼす内分泌かく乱物質の作用の三次元画像解析

#### ① 核内受容体、転写共役因子と蛍光タンパク質との融合タンパク質発現ベクターの作製

UV 発生装置を組み込んだ共焦点顕微鏡システムを Leica 社より、三次元画像構成システムソフトをラトック社より導入した。代表的な蛍光タンパク質である Green Fluorescent Protein (GFP, Clontech co.) を N 端側に持つアンドロゲン受容体、エストロゲン受容体との融合タンパク質発現ベクターを作製したが、リガンド依存性の核移行(nuclear translocation) が観察されなかった。抗受容体抗体を用いて Western blot 法にて生成タンパク質を確認したところ、truncate した分子量の小さなタンパク質（おそらく転写、翻訳のいずれかの段階で、premature termination したものと考えられた）が多数認められた。このため、以後の実験には GFP を C 端側に持つ融合タンパク質発現ベクターを用いることとした。このコンストラクトは、レポーターアッセイの結果、野生型の 30 から 40%の転写活性化能を有していた。C 端側 GFP 融合受容体をトランスフェクトした結果、それらの細胞はすべてリガンド依存性の受容体核移行を呈した。

#### ② 核内分布パターンの検討

当初の予想どおり、リガンド存在下での蛍光の核内への集積パターンは、ドット状であった。我々の仮説は、内分泌かく乱物質が結合した核内受容体/共役因子複合体は、その高次構造の変化を来し DNA 結合能の変化を惹起する、というものである。内分泌かく乱物質を実験に供する前に、強力な前述の作用を持つことが証明されている抗アンドロゲン製剤、hydroxy flutamide (OHF)、bicalutamide(B)を用いて予備実験を施行した。これらの製剤は、前立腺癌のホルモン療法に使用されるものである。GFP 結合アンドロゲン受容体(GFP-AR)を COS 細胞にトランスフェクトし、OHF、B を培地中に添加すると、核への集積はドット状分布をとらずに、びまん性の細かなメッシュ状分布となった。共焦点顕微鏡での観察と並行してレポーターアッセイを施行したが、ドット状分布とアンドロゲン受容体の転写活性化能は良い相関を示した。OHF は、高濃度を添加すると agonist としての作用が出現して来ることが知られているが、我々の実験系でも agonist として作用する濃度では部分的にドット状分布を呈した。さらに、

前立腺癌細胞 LNCaP の変異 AR は、リガンド特異性を喪失し、エストロゲン、プロゲステロンとも結合することが報告されている。現在、変異 AR/蛍光タンパク質発現ベクターを作製中である。

### ③ 二色蛍光を用いた核内受容体と共役因子の核内分布の検討

GFP-核内受容体と、黄色蛍光の YFP-共役因子融合タンパク質のそれぞれの発現ベクターを COS 細胞にトランスフェクトし、緑色蛍光スポットと黄色蛍光スポットが三次元的に重なるかどうかの確認を施行した。Leica 社の共焦点顕微鏡の光学的スリットを用いても GFP と YFP の分離は完全とは言えず、互いの励起蛍光のもれが生じた。共役因子に対する特異的抗体を Santa Cruz 社より購入し、Texas-Red にて抗体染色を施行したところ GFP との分離は良好であったが、生細胞での観察は不可能であるため、現在、受容体 cDNA をシアン蛍光タンパク質 CFP ベクターにクローニングし直しているところである。

### (2) アクチビン受容体ノックアウトマウスを用いた内分泌かく乱物質の新たな作用点の検討

医学部キャンパス内の放射線基礎医学講座の旧中性子実験室を改造して発生工学実験室を設置した。アクチビン Ib、IIa、IIb 受容体ノックアウトマウスを飼育する予定である。

### (3) エストロゲン受容体転写共役因子におよぼす内分泌かく乱物質の影響：新しいエストロゲン受容体転写共役因子のクローニング

エストロゲン受容体を中心にその転写制御の分子機構を解明するとともに、内分泌かく乱物質がこの転写制御機構におよぼす影響を検討した。yeast two hybrid 法、およびエストロゲン受容体結合たん白質を精製後マイクロシーケンス法にてそのアミノ酸配列を決定、cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより新しい転写共役因子をクローニングした。その結果、RNA 依存性の ATPase が存在することが明かとなり、さらにこの ATPase は RNA 転写活性化因子 SRA (steroid receptor RNA activator) と結合することが判明した。この ATPase 以外にも、リガンド依存性、非依存性にエストロゲン受容体と結合する新たなタンパク質複合体も取得しており、現在、内分泌かく乱物質がこれらの新しい転写共役因子群におよぼす影響を検討中である。

### (4) アンドロゲン受容体特異的共役因子の異常によるアンドロゲン作用発現障害の発見

従来報告されている転写共役因子は、そのほとんどが受容体ホルモン結合領域に存在する転写活性化領域(AF-2) 結合性であり、かつ複数のステロイドホルモン受容体と結合する。先天性疾患であるアンドロゲン不応症のなかに、転写共役因子の機能障害によるものがあることを証明した。この共役因子は、受容体 N 端側に存

在する AF-1 結合性であることが GST pull-down 解析で明かとなった。さらにグルココルチコイド受容体 AF-1 とは結合しないことから、アンドロゲン受容体に特異的と考えられた。一般に、内分泌かく乱物質は性腺機能が特異的に障害され、生命維持に必須のグルココルチコイド作用は障害されない。本共役因子は、micropenis など、男性の女性化を惹起するような内分泌かく乱物質の標的分子となる可能性がある。詳細な解析を施行するためには本共役因子のクローニングが必要であり、現在遂行中である。

#### (5) 内分泌かく乱物質の性腺発達障害におよぼす全栄養素の影響

雄性器発達抑制作用を有するメラトニンの効果発現が、実験動物飼育飼料中のビタミン、ミネラル含有量により左右されることを明らかにした。4 週齢ラットを用いた実験より、メラトニンの夕方投与、低パントテン酸、低葉酸、低ビタミン E、低亜鉛群で雄性器発達抑制作用が著明であった。この結果をもとに、内分泌かく乱物質が生体でその生殖器抑制作用を発現しにくい栄養条件を明らかにしつつある。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

なし