

「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、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、Ca²⁺、cAMP、cGMP、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、転写因子や、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により、内分泌攪乱の原因解明が可能になる。

平成11年度は、diacylglycerol、及びcGMPなど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。またプロテインスプライシングを用いた新規蛋白質間相互作用検出法の開発、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。これら蛍光プローブ分子の機能評

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、ヒト神経芽細胞腫（NB-1）に対するEDC暴露による細胞内Ca²⁺及びIP₃の恒常性攪乱を定量評価するため、高速励起波長切り切り換え可能な蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて17 β -estradiolのnongenomicな情報伝達系の基礎研究を行った。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 β -estradiolを添加し、SAGE法により遺伝子発現の変化を検討した。同様にヒト正常肝細胞、硬変肝細胞、肝臓癌由来培養細胞についても遺伝子発現プロファイルをSAGEにより解析し、総計94,580tagを得た。NB-1細胞へのEDC暴露により発現が誘導される遺伝子をジーンアレイ法により得た。今後はリン酸化チロシン・セリン・トレオニンに対する蛍光プローブおよびin vivo標識可能な疎水場感受性蛍光プローブの合成を引き続き行い、完成したプローブ分子を用いてEDCのnongenomicな情報伝達系への影響を評価する。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Ca²⁺、cAMP、cGMP、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。

(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

cGMPに対する蛍光プローブ分子を作成した。cGMP依存性プロテインキナーゼのNとC末端に緑色蛍光蛋白質（GFP）の変異体であるシアン蛍光蛋白質（CFP）及び黄色蛍光蛋白質（YFP）を各々融合した蛋白質のcDNAを作成し

た。このcDNAを発現ベクターに挿入し、CHO-K1細胞に導入した。cGMPアナログである8-Br-cGMPで蛍光プローブCGYを発現する細胞を刺激したところ、CFPの蛍光が減少し、YFPの蛍光が増加した。cGMPの結合により蛍光プローブ分子内のFRETは増加することが明らかとなり、CFPとYFPの蛍光強度比が細胞内cGMP濃度の指標となることが分かった。次にCGY蛍光プローブをhuman embryonic kidney (HEK) 293細胞に導入し、NO刺激によるcGMP応答を確認した。また、cGMP合成酵素及び分解酵素の阻害剤を用いることにより、cGMPプローブ分子がcGMP濃度可逆的に応答することを確認した。

Ca²⁺はCa²⁺蛍光指示薬fura 2を用いて、EDC投与によるCa²⁺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を行っている。平成11年度は、NB-1細胞に17- β -estradiol (ED) を添加した時のnongenomicな細胞内情報伝達の活性化について検討した。Ca²⁺蛍光指示薬Fura2-AMを用いて、NB-1細胞にEDを1 nM添加した後、約10分間の細胞内Ca²⁺濃度変化を蛍光顕微鏡を用いて観測した。injectionした後30秒後から細胞内Ca²⁺濃度は一過性の濃度上昇がおり、その後最大を示した後にCa²⁺濃度は減少し平衡状態となった。平衡状態のCa²⁺濃度はbasalより高い値を示すことが分かった。さらにIP₃の蛍光プローブをNB-1細胞内で発現させ共焦点レーザー顕微鏡下でIP₃濃度変化のリアルタイム測定を行った。同濃度のEDを添加したとき、Ca²⁺と同様のphaseを示す一過性のIP₃濃度変化が起きていることがわかった。今後、本研究室で開発したdiacylglycerolとCa²⁺により活性化されるprotein kinase C (PKC) の構造変化に基づく蛍光プローブを用いて、EDの作用によるdiacylglycerolの濃度変化を調べる予定である。又、エストロゲン様作用を示すEDCを用いて、非古典的経路への影響を評価している。

(B) リン酸化チロシン・セリン・トレオニンを探るプローブとした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

プロテインスプライシングという蛋白質レベルでのスプライシングを利用した全く新規な蛋白質間相互作用検出法を開発した。蛋白質Xと蛋白質Yが相互作用するとシグナル分子Aとシグナル分子Bがスプライシングにより結合し、新しいA - Bという蛋白質がシグナル分子として形成される原理に基づいている。シグナル分子として、緑色蛍光蛋白質 (GFP) をsplitして利用した。

すなわち、GFPの1～136番目までのアミノ酸と137～269番目までのアミノ酸を各々A、Bとし、蛋白質間相互作用によりスプライシングが起きるとGFPが形成され、緑色の蛍光を観測することが可能である。平成11年度は、相互作用する蛋白質としてカルモジュリン (CaM) とその標的蛋白質M13をモデルとして、実際に大腸菌内でCaMとM13の相互作用によりスプライシングが起こり、GFPが形成されることを示した。今後は高感度検出のためのsplit luciferase systemの開発、スプライシング効率の改善、真核細胞内での蛋白質リン酸化による蛋白質間相互作用の検出を行う予定である。

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11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い、目的の化合物の一つの合成を完了した。今後合成した蛍光団の機能性評価を行い、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、 17β -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。各々約3万個の遺伝子tagの塩基配列を決定し、遺伝子発現のプロファイルを比較した結果、発現が有意に変動する遺伝子を複数個得た。Northern blotにて発現変動遺伝子の確認を行った結果、既知のエストロゲン応答遺伝子cathepsinD、pS2以外に新たなエストロゲン応答遺伝子としてWISP-2 (Wint-1 inducible signaling pathway protein 2) が得られた。E2によるWISP-2遺伝子の発現誘導は濃度依存的であり、エストロゲン受容体のアンタゴニストであるICI182,780を同時添加することにより完全に抑制されることから、エストロゲン

受容体を介したものであることがわかった。代表的なEDCの中でエストロゲン作用を有する、bisphenol-A及びnonylphenolを添加することでも発現が誘導され、同時添加すると相加的に発現の誘導が認められた。WISP-2がエストロゲン応答遺伝子として明らかになったことは、エストロゲンの新たな作用分子機構の理解に繋がるものと期待される。またWISP-2はその構造から分泌蛋白質であることが予想されるため、今後はWISP-2蛋白質を大腸菌で発現後、抗体を作成し、蛋白質レベルでのエストロゲン応答性の有無を検討する予定である。

生体内における蛋白質の合成・異化を専門とする臓器である肝臓において、EDCを投与した際に生じる発現遺伝子の変化の系統的解析をSAGE法により行っている。EDC投与によって変動する遺伝子を統合的に解析するには、EDC非投与時における遺伝子の発現プロファイルを作成することが必要である。しかしこれまでに正常肝における発現遺伝子を統合的に解析した報告はないため、11年度は正常肝における遺伝子発現のプロファイルを作成した。これまでに、臨床生化学および病理学所見から正常肝と診断され、本人が研究を承諾した肝臓組織を用いてRNAを抽出し、SAGEを行った。全31,287の遺伝子tagを得た。解析の結果この肝臓内においては8,598の異なる遺伝子が発現していた。個々の遺伝子で最も多く発現していた遺伝子はalbuminで1,088回出現し全体の3.5%を、つづいてapolipoprotein A-Iが876回で2.8%であった。最も多く発現を認めたタンパクの種類としてはplasma proteinであり全体の22%以上を占めていた。つぎにはcytoplasmic proteinが8.6%以上であり、つづいてenzymeが4.8%以上、protease inhibitorが1.7%以上、complementおよびcoagulation factorが1.1%以上であった。これらのSAGEによる発現の頻度の検討が正しく発現量を現わしているかどうかを検討するため、発現の頻度が異なる8種類の遺伝子を用いてRT-PCR法による解析を行った。SAGEによる発現回数とRT-PCR法の結果は一致していた。今回の検討により、正常肝の遺伝子発現プロファイルが作製された。又、肝機能の低下している硬変肝臓を用いてSAGEを行い、全31,381の遺伝子tagを得た。現在正常肝臓における遺伝子発現プロファイルとの比較解析を行っている。又、EDC投与を行う肝臓癌由来培養細胞株の遺伝子発現プロファイルを解析し、全32,217遺伝子tagを得、正常肝と障害肝との発現プロファイルの比較解析も行っている。今後はEDC投与による発現プロファイルの変動を解析する予定である。

内分泌攪乱化学物質投与によりヒト神経細胞株で発現が変化する遺伝子の系統的解析のため、細胞株としてはヒト神経芽細胞腫NB-1細胞を選定し、内分泌攪乱性が疑われている化学物質を対象として、形態的变化を指標として予備スクリーニングを行った。

その結果、17 β -estradiol代謝体を始め、フタル酸ジエチルヘキシル、塩化カド

ミウム、メチル水銀などで、有意な影響が認められた。また、2,3,7,8-TCDDの影響についても予備的な検討を行い、高濃度領域で影響が発現する可能性が示唆された。これら陽性を示す dibutyl cAMP、TCDD、 estradiol 17-acetate、塩化カドミウム、メチル水銀の5物質を対象として、NB-1細胞への暴露に伴って発現が変化する遺伝子の系統的解析をジーンアレイ法 (Atlas array) を用いて行った。Array sheetには1,176個のヒト遺伝子がスポットされている。現在までの予備実験では、ハウスキーピング遺伝子とされるものやカドミウムによるメタロチオネインの誘導が検出された。しかし、他の遺伝子発現に関しては情報が得られておらず、検出感度以下の発現のためであるかについて再現性を含め検討中である。またSAGEを用いて同様の遺伝子発現の系統的解析を行う予定である。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

An SPR-based Screening Method for Agonist Selectivity for Insulin Signaling Pathways Based on the Binding of Phosphotyrosine to its Specific Binding Protein. T. Yoshida, M. Sato, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, 72, No. 1, 6-11 (2000).

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

Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. T. Yamashita, S. Hashimoto, S. Kaneko, S. Nagai, N. Toyoda, T. Suzuki, K. Kobayashi and K. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 110-116 (2000).

Metal Ion Selectivity for Formation of the Calmodulin-Metal-Target Peptide Ternary Complex Studied by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. T. Ozawa, K. Sasaki and Y. Umezawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 1434, 211-220 (1999).