

「内分泌かく乱物質」
平成11年度採択研究代表者

有賀 寛芳

(北海道大学大学院薬学研究科 教授)

「内分泌かく乱物質による精子形成異常に關与する 癌遺伝子産物 DJ-1 とAMY-1」

1. 研究実施の概要

新規癌遺伝子として単離、同定されたDJ-1は、ある種の内分泌かく乱物質によるラット精子形成異常とそれに伴う雄の不妊において平行に減少する精子タンパク質として同定され、内分泌かく乱物質のターゲットタンパク質と考えられた。

一方、c-Myc結合タンパク質として単離同定されたAMY-1はその強制発現により雄マウスの不妊を誘発し、精子形成過程で重要な機能を有するA-kinase anchorタンパク質であるAKAP84結合タンパク質であり、更に本研究室で同様に単離同定された精巣特異的に発現する複数のc-Myc結合タンパク質とともに、DJ-1同様精子形成過程に重要な機能を有することが想定されている。DJ-1は解析の結果、アンドロゲン受容体(AR)の負の因子を不活化することでARを活性化することが判明した。そこで、DJ-1,AMY-1および複数の精巣特異的に発現するc-Myc結合タンパク質の精子形成における機能と細胞癌化機構との接点を分子生物学的、発生生物学的に解析することで内分泌かく乱物質による精子形成異常と、癌を含む疾患原因を分子レベルで解析する。更に男性不妊患者中でのDJ-1, AMY-1等の挙動を検討し、臨床サイドからこれらのタンパク質の機能を研究する。

2. 研究実施内容

(1) DJ-1の解析

DJ-1結合タンパク質の同定と解析

DJ-1をベイトとしてTwo-hybrid法にてスクリーニングし、ユビキチン様タンパク質修飾因子SUMO-1、ARの負の制御因子として最近同定されたARIP/PIASx、新規タンパク質DJBP(仮の名前)を同定した。PIASxはARのDNA結合ドメインに結合することでARのDNA結合性を消失させ転写能を抑制するが、細胞質、核内に局在するDJ-1は核内でのみPIASxに結合し、吸収することでARを活性化した。内分泌かく乱物質によりDJ-1が減少し、精子形成阻害が起こることの1つの原因が示されたと考えられる。この機能はDJ-1のSUMO-1化されると考えられる63,130番目のリジンをアルギニンに変換した変異体は消失し

た。また、DJ-1はRasと協調的に細胞を癌化する遺伝子として最初同定されたが、このアルギニン変異体はDJ-1の細胞癌化能も同時に減少することから、SUMO-1修飾はDJ-1変異に重要な役割を果たしている可能性が高い。DJBP（仮）は精巣特異的に発現する新規タンパク質であるが、DJ-1に加え、PIASx、ARとも結合し、特にARとはテストステロン存在下時のみ結合した。従って、DJBP（仮）はDJ-1/AR/PIASxを結ぶアダプタータンパク質である可能性があり現在検討している。

また、DJ-1ノックアウトマウス作成のために、マウスDJ-1 cDNA, ゲノムDNAを単離し、現在ターゲティングベクターに挿入しており、今年度中にノックアウトマウス作成を完成する予定である。

DJ-1と内分泌かく乱物質

DJ-1トランスジェニックマウスを作成し、オルニタゾール、エピクロロヒドリンなどの内分泌かく乱物質投与に対するマウス精子の応答を現在兼用している。

また、不妊とDJ-1との関連を臨床面から明らかにするために、聖マリアンナ医科大学岩本教授グループとの共同研究で男性不妊患者精子中のDJ-1量を検討している。

(2) AMY-1の機能解析

AMY-1結合タンパク質のスクリーニングを行い、A-kinase anchorタンパク質であるS-AKAP84, AKAP149, AKAP95, WAVE と複数の新規タンパク質が同定単離された。

A-kinase anchorタンパク質はA-kinaseのRIIサブユニットに結合し、細胞内でのA-kinaseの局在を決定するタンパク質であり、AKAP84は精子ミトコンドリアに発現し、A-kinaseによる精子形成機構への関与を規定するタンパク質である。AMY-1はミトコンドリア上でAKAP84, RIIと3量体を形成することでAKAP84/RII複合体形成を促進するようである。現在、組み替えAMY-1アデノウイルスをマウス精巣に感染させ、AMY-1の精子形成への影響を検討している。一方、WAVEはアクチン重合を促進するタンパク質でありRacの下流に位置している。AMY-1はWAVE, AKAP84/149と3量体を形成しアクチン重合の場をミトコンドリアに移動することが明らかとなった。今後精子形成機構との関連が期待される。また、我々がc-Myc結合タンパク質として単離したtumor suppressor MM-1はc-Mycに対してはAMY-1と機能が逆であり、相関が考えられていたが、AMY-1, MM-1が共にAKAP95に結合することが判明し、現在AKAP84など結合を通じたMM-1の精子形成機構への関与を検討している。更にAMY-1の細胞分化促進機能を明らかにした。

一方、AMY-1トランスジェニックマウスでは雄が不妊傾向を示すことから、AMY-1はDJ-1とは逆に精子形成機構の負に制御している可能性がある。その点を個体レベルで明らかにすることを目的としてAMY-1ノックアウトマウスの作成を行っており、現在までに、マウスAMY-1 cDNA、ゲノムDNAを単離後、ターゲティングベクターに挿入し、組み換えES細胞のスクリーニングを行っている。

また、男性不妊患者精子、あるいは精液中のAMY-1量を泌尿器科との連携でスクリーニングを計画している。

(3) 他の精巣特異的発現タンパク質の解析

c-Myc結合タンパク質であるMSSPは精子形成過程の後期に発現し、最終的な精子には存在しない。MSSPノックアウトマウスを作成したところ、ホモ欠損体においては出産数の顕著な減少が見られ、これは出産直後の子マウスの異常に由来するらしい。現在、胎児の精巣関連組織の詳細な解析を行っている。また、内分泌かく乱物質投与マウスにおけるMSSPの量的変化を検討することで、MSSPと内分泌かく乱物質との接点を探っている。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Niki, T., Izumi, S., Saegusa, Y., Taira, T., Takai, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. MSSP promotes the ras/myc cooperative cell transforming activity by binding to C-MYC. *Genes Cells* 5, 127-140 (2000) .

Fujimoto, M., Matsumoto, K., Iguchi-Ariga, S.M.M and Ariga, H. Structure and comparison of genomic and complementary DNAs of mouse MSSP, a c-Myc binding protein. *Int. J. Onc.* 16, 245-251 (2000) .

Furusawa, M., Onishi, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. AMY-1 is a trigger for the erythrocyte differentiation of K562 cells. *Int. J. Onc.* 16, 339-345(2000) .