

「内分泌かく乱物質」  
平成10年度採択代表者

梅澤 喜夫

(東京大学大学院理学系研究科 教授)

## 「内分泌攪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、第二次情報伝達物質、蛋白質リン酸化、蛋白質間相互作用、蛋白質核内移行”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より、内分泌攪乱の原因解明が可能になる。

平成12年度は、第二次情報伝達物質であるcGMP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蛋白質間相互作用および蛋白質核内移行の検出法の開発、疎水場感受性蛍光プローブ分子の合成、蛋白質リン酸化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。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。同様ダ

イオキシシンによる遺伝子発現の評価系を構築するため、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。このSAGE解析の結果はDNAチップで発現解析した結果と相関を示した。ヒト神経細胞株(NB-1)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、完成したプローブ分子を用いて、エストロゲンおよびアンドロゲン等のnongenomicなステロイド情報伝達へのEDCの影響を評価する。遺伝子発現に関しては、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)ヒト神経芽細胞株(NB-1)・ヒト乳癌細胞株(MCF-7)などのモデル細胞、および血管平滑筋細胞などヒト正常細胞に対して、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cGMP、蛋白質リン酸化、蛋白質間相互作用、蛋白質核内移行を生きた細胞を用いて定性・定量評価するための分析手法を開発し、EDCによる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の蛍光プローブ分子

主要な第二次情報伝達物質の一つであるcGMPについて、単一細胞内で選択的にcGMPを分子認識する蛍光プローブ分子(CGY:シージー)を開発した。CGYは細胞内の主要妨害物質であるcAMPに対して、100倍程度の選択性を有することを確認した。CGYを用いることにより、細胞内のcGMP濃度は生理的アゴニストである一酸化窒素(NO)で刺激した際に、必ずしもNO濃度変化を平行に変化するわけではなく、ある低濃度のNO濃度刺激によってはcGMP濃度振動が起こることを見出した。一方、子宮血管平滑筋細胞において、17 $\beta$ -estradiolが急速にcGMP産生酵素の発現を抑制し、NO感受性を大幅に低下させることが最近明らかになっている。現在、このCGYを子宮平滑筋細胞に導入し、ステロイド及びEDC暴露によるcGMP情報伝達攪乱の評価系を構築して

いる。

(B) 蛋白質リン酸化の蛍光プローブ分子

生きた細胞内の蛋白質のリン酸化に基づく情報伝達を可視化検出するために、蛍光プローブ分子 (phocus: フォーカス) を開発し、インシュリン受容体による蛋白質のリン酸化を蛍光顕微鏡下でイメージングした。これにより、インシュリン受容体が集積したドット構造がインシュリン刺激によって細胞膜上に現れ、この構造における蛋白質リン酸化は細胞質のそれと比較して亢進していることを見い出した。またドット構造の出現は一過性で、出現とともに細胞膜上を動き回り、1000秒程度で消失する事を見い出した。このドット構造を新しいインシュリン情報伝達の間と考へて現在解析し、さらに他の受容体・非受容体のキナーゼについてもこのような新しいキナーゼ情報伝達の間を探索している。一方、エストロゲン作用のnon-genomic pathwayを誘起する分子として、血管内皮細胞におけるAkt、ヒト乳癌細胞株(MCF-7)におけるSrcというキナーゼ蛋白質が見い出されている。現在、これらキナーゼ蛋白質のステロイド依存的な活性化を、生きた単一細胞レベルで可視化検出するために、phocusを基本コンセプトとした新しい蛍光プローブ分子を開発し、EDC暴露によるnon-genomic pathwayへの影響を蛍光顕微鏡を用いて評価している。

(C) 蛋白質間相互作用の可視化とスクリーニング法の開発

平成11年度にプロテインスプライシングという新しい原理を用いた蛋白質間相互作用解析法スプリットGFPシステムを開発した。平成12年度は感度を向上させるために、スプライシング蛋白質としてSynechosystis由来のdnaE蛋白質を用い、大腸菌を用いたin vivo検出法を開発した。相互作用する蛋白質として、カルモジュリンとその標的ペプチドM13を用いた。カルモジュリンとN末側のGFP-dnaEを連結した蛋白質およびM13とC末側のdnaE-GFPを連結した蛋白質各々のcDNAを大腸菌に導入し、両蛋白質を共発現した。大腸菌のlysateに470nmの励起光を照射すると510nmの蛍光極大が観測された。これは前年度に開発したシステムにくらべ約100倍検出感度が良いことが分かった。またLBプレート上に形成された大腸菌コロニーの蛍光像を得たところ、カルモジュリン-M13を含むコロニーが選択的に蛍光を示すことが分かった。現在、estrogen receptorおよびandrogen receptorの二量体形成を大腸菌内でスクリーニングする系を構築している。また、スプリットGFP系を用いた真核細胞内における蛋白質間相互作用の検出法を開発している。

プロテインスプライシング法により蛋白質間相互作用を真核細胞内で定量検出する目的で、スプリットルシフェラーゼシステムを開発した。生物発光タンパク質であるルシフェラーゼ(Luc)をスプリットし、スプライシング蛋白質

dnaEのN末及びC末に各々結合した。相互作用を示すタンパク質を、アミノ酸リンカーを介してこのスプリットプローブ (Luc-dnaE) のN末及びC末に結合した。蛋白質間相互作用を評価する系として、インシュリンにより誘起されるリン酸化されたIRS-1とPI3KのSH2ドメインとの相互作用を用いた。スプリットプローブ分子 (Luc-dnaE) に結合したIRS-1とSH2ドメインを、インシュリン受容体を過剰発現させたCHO-IR細胞に発現させた。細胞にインシュリンを添加すると、インシュリン濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇することが分かった。開発したスプリットルシフェラーゼシステムは、真核細胞内蛋白質間相互作用を定量評価する一般性のある方法である。今後、エストロゲンのnon-genomicな情報伝達におけるタンパク質間相互作用の定量評価システムを確立する。

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、細胞内標識可能な疎水場感受性蛍光試薬 (BArNile) を開発し、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可視化検出した。

#### (D) 蛋白質核内移行の検出法の開発

蛋白質のスプライシング反応を用いて、核内移行する蛋白質を定量評価する新規方法を開発した。生物発光タンパク質ルシフェラーゼをスプリットし、そのC末にdnaEのC末および核移行シグナルNLSを結合したタンパク質を作成した。このcDNAをCOS-7細胞に遺伝子導入し形質転換した。Androgen receptorのC末にdnaEのN末及びルシフェラーゼのN末を結合したcDNAを作成した。このcDNAを形質転換したCOS-7細胞に遺伝子導入した。Androgenの添加によりandrogen receptorは核内に移行し、スプライシング反応が起こる。その結果、ルシフェラーゼ蛋白質が形成され、ルミノアッセイを行うことにより移行したアンドロゲンの量を定量評価できることが分かった。今後、アンドロゲンのアゴニスト、アンタゴニスト添加によるアンドロゲンの核内移行の影響を定量評価する予定である。さらに、MCF-7細胞内におけるestrogen添加による核内移行蛋白質を同定する予定である。

#### (II) 遺伝子発現の系統的解析

##### (A) エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞株 (MCF-7)

エストロゲンおよび環境エストロゲンの作用分子機構を明らかにし、エストロゲン暴露のバイオマーカーを探索する目的で、エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞株MCF-7細胞に、 $17\beta$ -estradiol (E2) を10nM添加し、24時間後に添加、非添加の細胞よりRNAを調製し、SAGE法により遺伝子発現の変動を系統的に解析した。各々約3万個のtagの塩基配列を決定し、遺伝子発現プロフィールを比較

し、発現が有意に変動する遺伝子を複数得た。Northern blotにて、発現変動遺伝子の確認を行なったところ、既知のエストロゲン応答遺伝子pS2、cathepsin D、high-mobility group protein 1 以外に新規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った。また代表的な環境エストロゲンであるbisphenol-A、nonylphenol、DES、genisteinを添加することでも発現が誘導された。MCF-7細胞においてはWISP-2の発現は、progesterone、dexamethasone、thyroid hormone、2,3,7,8-TCDDの添加では誘導されず、E2特異的であった。WISP-2は、その構造より細胞外に分泌されることが予想され、環境エストロゲン暴露を評価するためのバイオマーカー分子となることが期待される。そこで大腸菌にて発現したWISP-2蛋白をウサギに免疫しポリクローナル抗体を作成した。さらにヒト及びマウスWISP-2に対するペプチド抗体も作成した。今後はこれらの抗体を用いて、タンパクレベルでのエストロゲン応答性を確認する。WISP-2のRNAは、精巣、卵巣など生殖器系で強く発現しており、得られた抗体を用いて、組織内での局在も確認する。

#### (B) ヒト肝細胞

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、正常肝、慢性肝炎肝、肝細胞癌を対象にSAGE法により異なる3つの発現遺伝子ライブラリーを作成し、肝臓における統合的な発現遺伝子の変化を解析する基礎検討を行った。正常肝から31,381遺伝子、慢性肝炎から32,217遺伝子、肝細胞癌から32,217遺伝子、あわせて94,580遺伝子が解析された。共通して検出される遺伝子は全体の8.6%であり、また各ライブラリー内で24.3%から28.7%の遺伝子は2度以上出現するものであった。こうした多く発現している遺伝子の統合的な変化を観察することは十分に可能と考えられた。一方、各々のライブラリーでは、特異的ながらもhit数の少ない遺伝子が70%程度に存在することが明らかとなった。こうした検出限界に相当する発現量の少ない遺伝子の存在は、SAGEの情報をもとにしてDNAチップの解析を行っていく上で、重要な問題であることが明らかになった。引き続きSAGEで見いだされた遺伝子群をDNAチップにのせてEDC投与の系統的解析を行うことを予定しているた

め、SAGEの発現レベルとDNAチップにおける発現レベルとの相関が問題となる。そこで両者の関連を検討した。発現量の少ない遺伝子では相関に問題が残るものの、全体として発現量は良く相関しており、SAGE解析の結果をDNAチップ解析に導入することは可能であることが示された。これまでDNAチップ解析の基礎技術を確立してきたが、今年度は1)組織材料から安定して遺伝子を調製できるか、2)ハイブリダイゼーション等のステップは培養細胞からの調製遺伝子で確立した手法で可能か、3)発現遺伝子の変化を情報処理して解析することが可能であるかについて検討した。正常肝6例、慢性肝炎26例の組織より遺伝子を調製し、10種の培養細胞より得られた調製遺伝子と比較し解析を行った。組織からの調製法として新たな改変を加えたものの、良好な遺伝子が得られ、その後のステップはこれまで培養細胞を用いて確立した方法と同様に行うことが出来た。発現遺伝子の変化を検討する際、クラスター解析は可能であったが、詳細な検討には新たな解析法を導入することが必要であった。

(C) ヒト神経細胞株 (NB-1)

内分泌攪乱物質が、脳神経系の発生・分化に影響を及ぼす可能性が指摘されてきているが、その詳細については不明なところが多い。ヒト神経芽細胞腫NB-1細胞における神経突起伸展度を指標に、環境での汚染が問題となっている化学物質を中心にスクリーニングしたところ、内分泌攪乱性が疑われている化学物質4種(β-エストラジオール17-アセテート、フタル酸ジエチルヘキシル、塩化カドミウム、メチル水銀)が、NB-1細胞の突起伸展に有意な影響を与えることを認めた。スクリーニングは継続しており、さらにその数は増えつつある。次に、β-エストラジオール、塩化カドミウム、メチル水銀に、陽性対照としてのdibutyryl cAMPを加えた4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DNAアレー法(Atlas Array)を用いて行った。ヒト遺伝子全般を網羅したアレーシート(1,278個; Atlas™ Human 1 2 Array II; クロンテック社)と神経系に特異的な遺伝子をスポットしたアレーシート(588個; Atlas™ Human Neurobiology Array; クロンテック社)を用い、コントロール細胞あるいは各化学物質暴露細胞より、mRNAを単離後、RT-PCRにより作製したcDNAとハイブリダイズさせることにより遺伝子発現変動を調べた。その結果、dibutyryl cAMP暴露より得られた遺伝子発現変動は既報のものとも一致するため、行われた実験の信頼度は極めて高い。また、カドミウム暴露では、メタロチオネインの誘導の他に、例えばハウスキーピング遺伝子と呼ばれるものやこれまで報告のない遺伝子発現変動がみられた。一方、メチル水銀暴露ではheat shock蛋白質の発現が抑えられることが明らかになった。さらに、RT-PCR法やノーザンブロット分析を行ったところ、アレー

シートでの結果が確認された。本研究で用いた化学物質暴露による未知の遺伝子発現変動を調べるために、ディファレンシャルディスプレイ法による遺伝子発現の系統的解析も進めた。その結果、カドミウムにより顕著に発現が亢進される遺伝子が部分同定された。そのクローンの一次構造配列は、かずさDNA研究所がヒト脳より単離したクローンKIAA1712と相同性を持つことが明らかになった。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

How Can  $\text{Ca}^{2+}$  Selectively Activate Recoverin in the Presence of  $\text{Mg}^{2+}$ ? Surface Plasmon Resonance and FT-IR Spectroscopic Studies. T. Ozawa, M. Fukuda, M. Nara, A. Nakamura, K. Kohama and Y. Umezawa, *Biochemistry*, 39, No. 47, 14495-14503 ( 2000 )

Fluorescent Indicators for Cyclic GMP Based on Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Ia and Green Fluorescent Proteins. M. Sato, N. Hida, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, 72, No. 24, 5918-5924 ( 2000 )

A Fluorescent Indicator for Detecting Protein-Protein Interactions in Vivo Based on Protein Splicing. T. Ozawa, S. Nogami, M. Sato, Y. Ohya and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, 72, No. 21, 5151-5157 ( 2000 )

Electrochemical Detection of a One-Base Mismatch in an Oligonucleotide Using Ion-Channel Sensors with Self-Assembled PNA Monolayers. H. Aoki, P. Bühlmann and Y. Umezawa, *Electroanalysis*, 12, No. 16, 1272-1276 ( 2000 )

A Screening Method for Substrates of Multidrug Resistance-associated Protein ( MRP ) Z. Quan, T. Ozawa, M. Sato and Y. Umezawa, *Anal. Chim. Acta*, 423, 197-203 ( 2000 )

WISP-2 as a Novel Estrogen-Responsive Gene in Human Breast Cancer Cells. H. Inadera, S. Hashimoto, H-Y. Dong, T. Suzuki, S. Nagai, T. Yamashita, N. Toyoda and K. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 108-114 ( 2000 )