

「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・転写共役因子複合体と内分泌かく乱物質」

### 1. 研究実施の概要

エストロゲン、アンドロゲンなどの性ステロイドホルモンは、核（エストロゲン受容体）もしくは細胞質（アンドロゲン受容体）に存在する受容体タンパク質と結合する。ステロイドホルモンの結合した受容体は、標的遺伝子の転写活性を制御する。この際、転写共役因子と呼ばれる一連のタンパク質と巨大複合体を形成し、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。

ステロイドホルモンの特異的な作用は、ステロイドホルモン受容体のみではなく、特異的転写共役因子によっても規定されるものと考えられる。エストロゲン、アンドロゲンの受容体に対する特異的転写共役因子を同定することは、内分泌かく乱物質の作用機序を解明するうえで必須である。最近、ステロイドホルモン受容体のN端側に存在するAF-1領域が、受容体特異的、組織特異的な転写活性化調節に深く関与していることが明らかにされつつある。我々は両受容体に対する特異的共役因子のクローニングを施行し、新しいAF-1領域結合性の転写共役因子を同定した。

我々のチームは、従来のレポーター遺伝子を用いたスクリーニング法と、レーザー共焦点顕微鏡を用いた三次元画像解析システムを組み合わせ、47種類の化学薬品をスクリーニングした結果、新規の抗アンドロゲン活性を有する化学薬品を同定し、さらにエストロゲン受容体の $\alpha$ 、 $\beta$ の異なるサブタイプに特異的に、もしくは両者に共通して作用する化学薬品が存在することを明らかにしつつある。これらの薬品は、（アンドロゲン受容体に関するかぎり）AF-2領域作動性のものであることを明らかにしており、AF-1領域作動性の薬品の同定、ならびに今回クローニングしたAF-1領域結合性の転写共役因子におよぼす内分泌かく乱物質の作用は今後の課題である。さらに、今回新たに樹立したヒト卵巣顆粒膜由来のKGN細胞を用いて、アンドロゲンをエストロゲンに変換するアロマターゼ活性に及ぼす内分泌かく乱物質の作用も検討している。KGN細胞は、現在世界中で用いられている卵巣顆粒膜由来細胞株のなかでは、最も初代培養系細胞に近い形質を備えており高く評価されている。スクリーニングの結果、アロマターゼ活性を抑制する薬品、もしくはアロマター

ぜ活性を増強させる薬品の両者が存在することを明らかにした。また、胎生の極く初期においては、胚細胞が将来の性腺原器へと移動していくが、この胚細胞の移動に抗アンドロゲン作用を有するある種の内分泌かく乱物質が影響を及ぼすことを明らかにしており、現在その機序を解析中である。

## 2. 研究実施内容

### (1) 名和田新グループ

#### 1) アンドロゲン受容体 / 転写共役因子複合体形成に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

平成11年度はGFPで標識したアンドロゲン受容体を用いてアンドロゲン受容体の三次元的分布を共焦点顕微鏡と画像解析装置を用いて検討し、アゴニストが結合した活性化受容体は核内でドット状に分布し、反対にアンタゴニストが結合した不活性化受容体は核移行はするもののびまん性に分布することを見いだした。このシステムを用いて50種類の内分泌かく乱物質をスクリーニングし、*p,p'*-DDE、vinclozolinは前立腺ガン治療薬flutamide、bicalutamideと同様の機構により抗アンドロゲン活性をもたらすことを明らかにした。この過程で抗アンドロゲン物質として新たに除草剤nitrofenを同定した。

アンドロゲン受容体のAF-1、AF-2領域単独よりなるtruncated receptorを蛍光タンパク質で標識し、2種類の活性化領域に与える抗アンドロゲン剤の作用を検討した結果、標識AF-1がリガンド非依存性に核内にドット状分布をする事を見いだした。波長の異なる2種類の蛍光タンパク質でAF-1、AF-2それぞれを標識すると、AF-2はリガンド存在下においてもドット形成能は無いが、AF-1を共存させるとドット形成する事が明らかとなった。抗アンドロゲン作用を有する化学物質の主たる作用点はAF-2領域であり、さらにAF-1とAF-2の間の分子内相互作用が阻害されるものと考えられた。

#### 2) アンドロゲン受容体のAF-1結合性新規転写共役因子のクローニング

平成10および11年度で、アンドロゲン受容体のN端側に存在する転写活性調節領域、すなわちAF-1領域に特異的に結合する転写共役因子の機能障害に起因するアンドロゲン不応症患者を解析し、AF-1領域に結合する分子量約90kDaの蛋白質の欠損が発症原因である可能性を提唱した (N.Engl.J.Med. 390- (12) )。この新規転写共役因子は、抗アンドロゲン活性を有する内分泌かく乱物質の標的分子たりうる。初代培養ヒト線維芽細胞よりcDNAライブラリーを作製し、アンドロゲン受容体のAF-1をbaitとした酵母two-hybrid系を用いこのタンパク質の単離を試みた。

その結果、分子量96kDaの分子を、アンドロゲン受容体AF-1領域結合タンパク質として同定した。このタンパク質はその分子内にTPR (Tetratrico

Peptide Repeat)モチーフを19回反復し、その中央部分にleusine zipper構造を持つというユニークな構造を有していた。レポーターアッセイの結果、本タンパク質の過剰発現は、アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体のリガンド依存性転写活性化能を、主にAF-1活性に作用することによりそれぞれ約5倍と3倍増加させたが、エストロゲン受容体のリガンド依存性転写活性化能には影響を及ぼさなかった。GST pull-down、immunoprecipitation法により、アンドロゲン受容体およびグルココルチコイド受容体のAF-1領域との結合を証明した。現在、本タンパク質とアンドロゲン受容体との相互作用に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を検索中である。

### 3) P450CYP3A系を介した内分泌かく乱物質の代謝

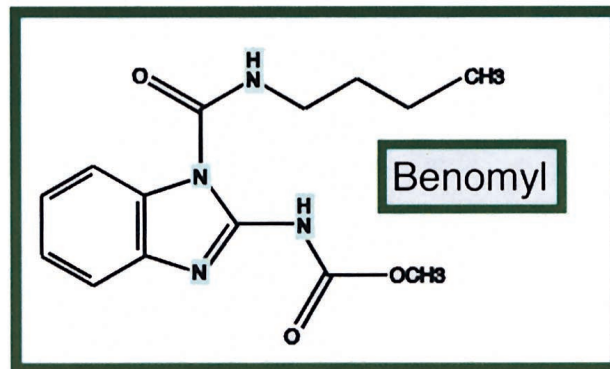
内因性ステロイドホルモン、および外因性に投与された化学物質の約60%はチトクロームP450系酵素であるCYP3Aにより代謝されることが明らかとなっている。CYP3AはSXR(PXR)と呼ばれるオーファン受容体によって転写誘導を受ける。

ヒトSXR発現ベクターと、レポータープラスミドとしてチミジンキナーゼ(tk)lucの上流にそれぞれIR6型、DR3型結合部位配列を持つオリゴヌクレオチドを3コピー結合してCV-1細胞にトランスフェクトし、50種類の内分泌かく乱物質で処理し、転写活性化能の差を検討した結果、14種類の化学物質をヒトSXRを活性化する薬品として同定した。この結果、ある薬剤より派生する近似の誘導体であってもSXRの活性化能には大きな差があることが明らかとなった。DDTおよびその代謝産物、誘導体であるDDD、KelthaneはSXRを活性化したが、抗アンドロゲン作用を有する内分泌かく乱物質DDEはSXRを活性化しなかった。内分泌かく乱物質としての作用発現には、薬物代謝の及ぼす影響を考慮する必要がある事が明らかとなった。

### 4) 卵巣顆粒膜細胞KGNのアロマターゼ活性におよぼす内分泌かく乱物質の影響

卵巣顆粒膜細胞より我々が今回樹立したKGN細胞は、FSH受容体を発現しており、豊富なアロマターゼ活性を有するなど、現在使用可能な卵巣顆粒膜細胞株のなかでは最も生理的細胞に近いという特色を有する。この細胞株を用いて、アロマターゼ活性におよぼす内分泌かく乱物質の影響を検討したところ、活性を阻害する薬剤として有機スズ化合物を同定した。有機スズ化合物は従来よりimposexの原因であることが示唆されていたが、今回初めてこれが実証されたと言える。さらに注目すべき成果として、農薬benomylがアロマターゼ活性を約3倍増加させることが明らかとなった。Benomylは男性不妊を惹起することが知られていたが、アロマターゼ活性亢進による相対的エストロゲン過

剰も原因の一つとして考慮せねばならないと思われる。(図1)



1. microtubule阻害効果
2. 造精機能障害による男性不妊 ← アロマトラーゼ活性増強??

#### 5) 胚細胞移動におよぼす内分泌かく乱物質の作用

マウス発生初期において、未分化胚細胞から生殖系列に決定がなされた始原生殖細胞は胎生8.5日には尿膜基部に分布し、その後分裂増殖をくり返しつつ腸管膜に沿って移動、11.5日には将来性腺が発生する生殖隆起に達し、以降は性腺と一体となり分化する(図2)。近年、生殖隆起から始まる生殖腺の分化の分子機構の解明は目覚ましく、性ホルモンが重要な役割を担うことが明かとなった。内分泌かく乱物質により性分化の異常がおこることも数多く報告されている。では、生殖隆起に達するまでの始原生殖細胞に特徴的な増殖、移動の機構に関してはどうであろう?我々はこの生殖隆起へと移動、増殖する始原生殖細胞への性ホルモンの関与を初めて明かにした。すなわち抗アンドロゲン作用を示す内分泌かく乱物質であるビクロゾリンを妊娠4.5日から8.5日までの間経口投与した群で、胎生8.5日から9.5日にその仔胎で始原生殖細胞の移動、個数を調べたところ、始原生殖細胞数の有意な低下を認め、生殖腺の発生以前の初期胚に対して内分泌かく乱物質が影響を与えることを明らかにした(図3)。次にこのビクロゾリンの作用機構を解明することを目的に、初期胚におけるアンドロゲン受容体の発現をRT-PCR、Whole mount In Situ Hybridization法を用いて調べたところ、胎生8.5日から9.5日の仔胎に発現を認め、恐らくはアンドロゲン受容体を介して作用していることが示唆された。この時期のアンドロゲン受容体の発現を調べた報告はこれまでに無く、ホルモン受容体の新たな機能を示唆する重要な発見と考えられる。胎児性腺の形成以前でのアンドロゲン受容体の存在は、母体由来のアンドロゲンが胎児初期発生に関与していることを示しており、その一つが始原生殖細胞の発生、分化であると思われる。妊娠期の内分泌かく乱物質への暴露が生殖腺の分化のみならず、その初期の暴露によ



り生殖細胞自身の発生に影響を与えることを示唆しており、学問的さらには社会的、公衆衛生学的にみても重要な知見である。

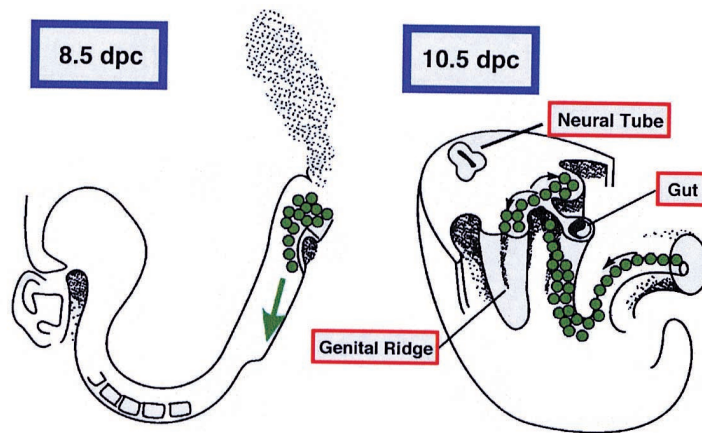


図2 胎生初期におけるGerm Cellの移動

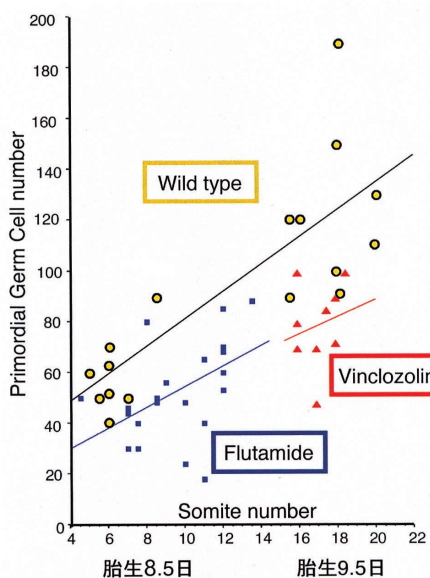


図3 始原生殖細胞の増殖・移動におよぼす抗アンドロゲン剤の影響

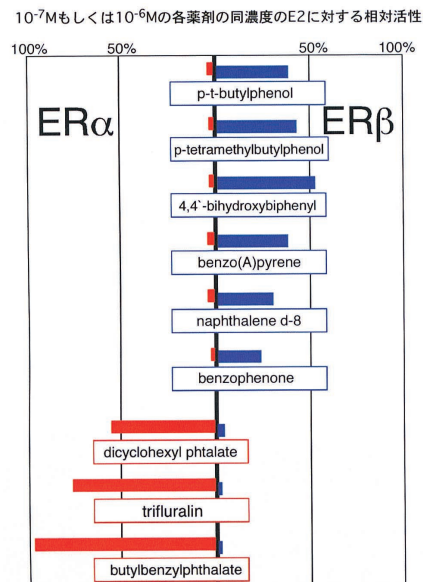


図4  $\alpha$ ,  $\beta$  isoform 特異的誘導

(2) 分子生物学研究所グループ

内分泌かく乱物質のエストロゲン受容体を介した転写調節制御に及ぼす影響を引き続き探っている。昨年までの手法(タンパク質精製法による転写共役因子複合体の構造決定)を用いてエストロゲン受容体と結合する転写調節因子を単離している。

1) 内分泌攪乱物質の $ER_{\alpha, \beta}$ 転写活性に及ぼす影響

内分泌かく乱物質60種類について $ER_{\alpha, \beta}$ の転写活性に及ぼす影響を検討した(図4)。COS細胞にER発現プラスミドを導入し、各物質の転写活性に及ぼす

影響をルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、trifuralin, ethynylestradiol, molinate, vinclozolin, clofentezine, ziram, procymidone, bisphenolA, genistein等が強い転写活性を、また、fenoxycarb, hexestol, zineb, ethylene thiourea, clofentezine, dicyclohexyl phthalate, octachlorostyrene, propyzamide, methyl-2-benzimidazolecarbamate, p-hexylphenol, iprodione, metribuzin, atrazine aminotrizol, aldicarb, p-heptylphenol, diflubenzuron, linuron, daidzein, chrolo-IPC, estradiol beta等は中程度の活性を示した。今後クロマチン構造をとったDNAを鋳型に用いた転写活性化能測定等、より簡便で生体に近いスクリーニング系でさらに多くの化合物を検討するとともに、これらの化合物がどのような機構でERを活性化するのかを解析する予定である。

## 2) ERに結合する蛋白質複合体の精製

ERにはリガンド未結合と結合時に異なった転写共役因子が相互作用するものと推測される。様々な報告から、転写共役因子は通常大きな複合体を形成していると考えられている。そこで、これらの因子群を単離、同定するため、GSTと融合したER(D/E/F)領域を用いてリガンド存在下、非存在下でHeLa核抽出液より相互作用する蛋白質複合体を精製した。その結果、リガンド依存的にERに結合もしくは解離する複数の蛋白質の単離に成功した。これらをMS-fingerprinting法にて同定したところ、リガンド依存的に解離する因子として、シャペロン蛋白質であるhsc70が、また、リガンド依存的に結合する複合体として、TRRAP/GCN5 complexを取得した。

GCN5はヒストンアセチル化活性を有することから、クロマチンの構造変換を介してERの転写活性を制御しているものと考えられる。また、乳癌細胞株であるMCF7にTRRAPのアンチセンスmRNAを導入したところ、エストロゲン依存的な細胞増殖が抑制された。したがってこの複合体はエストロゲン依存的な癌の増悪に関与する可能性が考えられる。また、hsc70はリガンド未結合のERと選択的に結合することから、DNAとERとの結合を阻害している可能性が考えられ、現在検討中である。

## (3) 国立健康栄養研究所グループ

全てのステロイドホルモン受容体に共通の転写共役因子であるPCAF (p300/CBP-associated factor) の欠損マウスを作製し、内分泌かく乱物質が確実に生殖腺発達を傷害するモデル動物系の確立を試みている。すでに、PCAFをホモ欠損したマウスは作製を完了し、サザンプロット、ウェスタンプロット解析にてホモ欠損を証明したが、PCAFと非常にホモロジーの高いPCAF-B/GCN5の発現が代償性に過剰発現していることが明らかとなった。現在、PCAF-B/GCN5欠損マウスの作製を進めると同時に、PCAFホモ欠損マウスの表現型を

内分泌かく乱物質の影響を含めて解析中である。

3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

Adachi M., Takayanagi R., Tomura A., Imasaki K., Kato S., Goto K., Yanase T., Ikuyama S., Nawata H.

Shono T., Kai H., Suita S., Nawata H.

Time-specific effects of mono-n-butyl phthalate on the transabdominal descent of the testis in rat fetuses.

BJU International 86 : 121-125, 2000

Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kogayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.

Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells* 5 : 593-601, 2000

Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.

p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  by interacting directly with the N-terminal A/B domains.

*J. Biol. Chem.* 275 : 15645-15651, 2000

Yamauchi J.\*, Yamauchi T.\*, Kuwata T.\*, Tamura T., Yamashita T., Bae N., Westphal H., Ozato K., Nakatani Y. \*Equally contribution.

Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97( 21 ): 11303-11306, 2000

Nishi Y., Yanase T., Mu Y-M., Oba K., Ichino I., Saitoh M., Goto K., Takayanagi R., Kashimura T., Haji M., Nawata H.

Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa cell tumor-like cell line, KGN as a useful model to study various aspects of physiological regulation of human granulosa cells.

*Endocrinology* 142 : 437-445, 2001

Watanabe M., Yanagisawa J., Kitagawa H., Takeyama K., Arai Y., Suzawa M., Kobayashi Y., Ogawa S., Yano T., Yoshikawa H., Masuhiro Y., Kato S.

A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor  $\alpha$  coactivator through the N-terminal activation domain ( AF-1 ) with an RNA coactivator, SRA.

*EMBO J.*, 20, 1341-1352, 2001