

「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関与する 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パラレル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 体細胞でのDJ-1機能

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 $\alpha$ 、新規タンパク質DJBP、SUMO-1化にカップルさせる因子として知られているDaxx、リン酸化酵素HIPK1、p53結合タンパク質p53bP3/TOPORS、Abstraktを同定した。PIASx $\alpha$ 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 $\alpha$ 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130番目のリジンをアルギニンに変換した変異体では消失した。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、細胞増殖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。実際、DJ-1はSUMO-1化され、核内のPML body/ND10に局在することが機能発揮に重要であった。

DJBP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 $\alpha$ 、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はPIASx $\alpha$ 同様AR活性を抑制し、DJ-1はDJBPを結合吸収することでARを活性化した。このように、DJ-1はARの複数の抑制因子を吸収することでAR活性化因子として機能することが明らかとなった。

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、まずDJ-1遺伝子のプロモーター解析を行った。次に、ターゲットベクターに挿入し、現在ES細胞のスクリーニングを行っており、複数のpositive cellsを得ている。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は体細胞に加えて精子頭部に局在する。精子頭部はアクロシンなど直接受精に関与するタンパク質の局在部位であり、DJ-1も受精に関与する可能性がある。マウスにオルニタゾール、エピクロロヒドリンなどの内分泌かく乱物質を投与し、精子、精巣でのDJ-1発現を検討したところ、特に精子ではmRNAレベルでは変動はないが、タンパク質レベルでDJ-1の顕著な減少が見られたことにより、DJ-1がオルニタゾール、エピクロロヒドリンにより分解される可能性と、精子からの局在の変動を考えて検討している。更に、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検討している。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、玉井グループが作成したDJ-1 ELIZA系で検討している。

#### (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 と新規タンパク質AAT-1, No. 8 (命名していない)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。新規AMY-1結合タンパク質AAT-1は精巣に特異的発現し、AMY-1が精子形成過程の後期に発現するのに対し、前期に発現することから、AMY-1の負の制御因子として機能する可能性がある。

また、我々がc-Myc結合タンパク質として単離したtumor supressor 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、マウスAMY-1 cDNA, ゲノムDNAを単離し、まずAMY-1遺伝子のプロモーター解析を行った。次に、ターゲティングベクターに挿入し、現在ES細胞のスクリーニングを行っており、複数のpositive cellsを得ている。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。

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、これは母マウスの子宮の栄養飢餓による胎児の発育不良が原因でE2 5時点で死んでしまいます。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)

Ono, T., Kitaura, H., Ugai, H., Murata, T., Yokoyama, K., Iguchi-Arigo, S.M.M and Ariga, H. (2000)

TOK-1, a novel p21Cip1-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK 2 kinase.

J. Biol. Chem. 275, 31145-31154.

Maita, H, Harada, Y., Nagakubo, D., Kitaura, H., Ikeda, M, Tamai, K, Takahashi, K., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M.M. ( 2000 )

PAP-1, a novel target protein of phosphorylation by Pim-1 kinase.

Eur. J. Biochem. 267, 5168-5178.

Niki, T, Galli, I, Ariga, H. and Iguchgi-Ariga, S.M.M. ( 2000 )

MSSP, a protein binding to an origin of replication in the c-myc gene, interacts with a catalytic subunit of DNA polymerase alpha and stimulates its polymerase activity.

FEBS Lett. 475, 209-212.

Wagenfeld, A., Yeung, C., Shivaji, S., Sundareswaran, V.R., Ariga, H and Cooper, T.G. ( 2000 )

Expression and cellular localization of contraception associated protein 1.

J. Androl. 21, 954-963.

Taira, T. , Takahashia, K., Kitagawa, R., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. ( 2001 )

Molecular cloning of human and mouse DJ-1 genes and identification of Sp1-dependent activation of the human DJ-1 promoter.

Gene, 263, 285-292.