

「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、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により、内分泌攪乱の原因解明が可能になる。

平成 13 年度は、開発した cGMP に対する蛍光プローブ分子を用いて、EDC 暴露による平滑筋肉腫内可溶性グアニル酸シクラーゼ蛋白質の発現変動を評価した。またプロテインプライミングを用いた蛋白質間相互作用検出法の開発、オルガネラ局在蛋白質を同定する発現クローニング法の開発、カルモジュリン依存性キナーゼの活性化、蛋白質リン酸化、脂質セカンドメッセンジャー類をそれぞれ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。このうちプロテインプライミングを用いた蛋白質間相互作用の検出法、カルモジュリン依存性キナーゼの活性化、蛋白質リン酸化を検出する蛍光プローブ分子については、既にステロイドホルモンの nongenomic な情報伝達系の各々特定の経路について可視化検出に用いることを検証し

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 17β -estradiol を添加した時発現変動する WISP-2 蛋白質を得た。この WISP-2 の機能解析を行うためのターゲットイングベクターの作製を行った。同様ダイオキ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。肝臓における遺伝子解析のためのデータベース作製、及び肝臓 DNA チップ作製を目指し遺伝子収集を行った。また TCDD 投与したマウスから肝臓を得て SAGE 法による解析を行った。ヒト神経細胞株(NB-1)へのメチル水銀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)法等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、 Ca^{2+} 情報伝達分子、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 濃度変化と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、 17β -estradiol(E2)投与したラットの子宮では、cGMP 産生酵素である可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の発現が大幅に低下していると近年報告されたが、我々はヒト子宮平滑筋肉腫(SKN)においても、E2 依存的に数時間で sGC の発現が低下することを RT-PCR 法で見い

出した。この SKN 細胞に CGY を発現させることにより、E2 依存的な sGC の発現抑制を、cGMP 産生速度の低下として蛍光顕微鏡下でイメージングすることができた。代表的なエストロゲン様の EDC である Bisphenol-A (BPA)、DES、Genistein について調べたところ、いずれも sGC 発現抑制効果が見られた。この方法は人工的に導入した遺伝子ではなく、sGC 発現という endogenous なシステムに基づく、環境エストロジェンの“より生理適合的な”“つまりリスクアセスメントにかなう”レポータージーンアッセイとして有用であろう。

(B) Ca²⁺情報伝達分子の活性化を可視化する蛍光プローブ分子

多くのペプチドホルモン・神経伝達物質のみならず、17β-estradiol (E2) も non-genomic に細胞内の Ca²⁺濃度を変動させることが、Ca²⁺蛍光プローブ分子を用いた Ca²⁺蛍光イメージングにより明らかとなっている。しかしながら、Ca²⁺により制御されるキナーゼ・ホスファターゼなど数十種類にも及ぶ Ca²⁺情報伝達分子が、Ca²⁺濃度変動に伴って細胞内のいつ・どこで・どの程度活性化され、機能しているのかについては明らかでない。そこで我々は、例として Ca²⁺依存性のセリン/スレオニンキナーゼ CaMK の活性化を可視化するために、CaMK と二色の蛍光蛋白質、CFP 及び YFP、からなるキメラ蛋白質を蛍光プローブ分子として開発した。この分子は Ca²⁺依存的に構造変化し、蛍光顕微鏡下で蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく大きな蛍光シグナルを与えた。野生型の CaMK は、活性化の際に構造変化に伴って自己リン酸化されることが必須であると知られているが、我々の開発した分子もこの性質を維持しており、得られた蛍光シグナルが CaMK の活性化の指標として十分であることを示した。

以上を踏まえて、エストロゲン感受性のヒト乳癌細胞株 (MCF-7) にこのプローブ分子を発現させ 100 μM ATP で刺激したところ、細胞全体で CaMK が活性化される様子が蛍光顕微鏡下で可視化できた。しかしながら、100 nM E2 刺激ではこの CaMK の活性化はほとんど見られなかった。活性化された細胞もあったが、細胞内局所での弱い活性化に留まっており、細胞全体で CaMK が効率よく活性化されることはなかった。一方既存の Ca²⁺蛍光プローブ分子をもちいて検討したところ、E2 刺激によって多くの MCF-7 細胞で Ca²⁺濃度上昇がおこるものの、ATP 刺激の際と比較してその Ca²⁺濃度は低いことが分かった。これらのことから、E2 は non-genomic に MCF-7 細胞内の Ca²⁺濃度上昇を誘起するが、その Ca²⁺濃度は下流の Ca²⁺情報伝達分子である CaMK の細胞内での活性化を誘起するには十分でないことが分かった。一方、代表的なエストロゲン様の EDC である Bisphenol-A (BPA) で細胞を刺激して、Ca²⁺及び CaMK の細胞内動態を観察したところ、BPA は E2 よりも高い Ca²⁺濃度上昇を誘起するため、下流の CaMK の活性化を誘起することが明らかとなった。

(C) 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出した。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。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 (Akt-phocus および Src-phocus) を開発した。Akt-phocus に関しては、インシュリンなどペプチドホルモン刺激による Akt の活性化を検出出来た。現在、血管内皮細胞においてステロイド依存的な Akt の活性化のイメージングを行っている。Src-phocus については、エストロゲン感受性のヒト乳癌細胞株 (MCF-7) において 17β -estradiol (E2) 刺激による Src の活性を可視化検出出来た。現在、この non-genomic pathway への EDC 影響を評価している。

(D) 脂質メッセンジャー (PIP₃, DAG) の蛍光プローブ分子

細胞内脂質セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール (DAG) およびホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP₃) を蛍光顕微鏡下で可視化検出する蛍光プローブ分子 (DAG-lipcus および PIP₃-lipcus) を開発した。脂質セカンドメッセンジャーを選択的に分子認識するリセプター (LBD : Lipid Binding Domain) として、それぞれ PKC δ の DAG 結合ドメイン (Cys1 ドメイン) と GRP1 の PIP₃ 結合ドメイン (PH ドメイン) を用いた。その分子認識を蛍光シグナル変化として抽出するために緑色蛍光蛋白質 (GFP) の異色変異体間の蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) に基づくアプローチを行った。GFP 変異体であるシアン色蛍光蛋白質 (CFP) と黄色蛍光蛋白質 (YFP) は FRET の優れたドナーおよびアクセプターであり、CFP と YFP 間の相対的距離および配向の変化が FRET 効率を変化させる。CFP-LBD-YFP 融合蛋白質を不飽和脂質 (ファルネシル基) 修飾配列 (FS) を介して細胞膜に結合させる。この融合蛋白質には非常にフレキシブルなリンカー配列 (Gly-Gly) が二カ所のみ含まれている。産生した当該脂質メッセンジャーに LBD が結合すると CFP-LBD-YFP 融合蛋白質内のフレキシビリティが大幅に減少し、CFP と YFP 間の相対的距離および配向の固定化により FRET 効率の変化が誘起される。培養細胞に導入してこの蛍光プローブを発現させ、蛍光顕微鏡下でアゴニスト刺激による CFP と YFP の蛍光強度比の変化を指標として脂質メッセンジャーが細胞内のどこで・いつ・どの程度産生されたのかを評価出来るようになった。現在、血管内皮細胞、骨芽細胞、およびヒト乳癌細胞株 (MCF-7) において、ステロイド依存的に産生される脂質セカンドメッセンジャーの可視化分析を行っている。

(E) プロテインスプライシング反応を用いた蛋白質間相互作用検出法

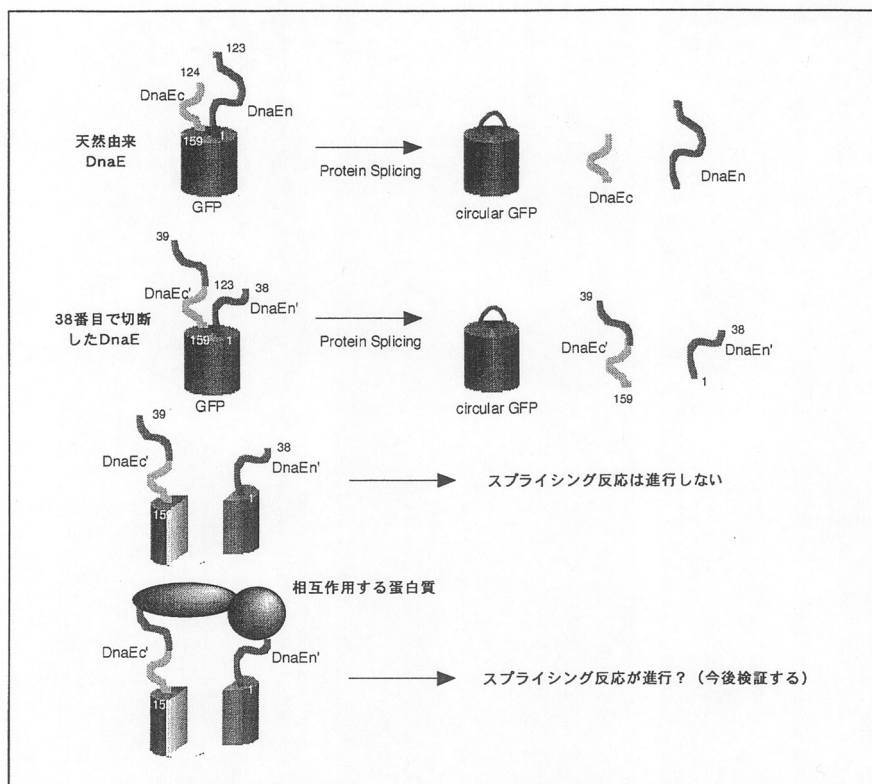
スプリット GFP システム

プローブ分子の改善-蛋白質間相互作用は、真核細胞内において酵素活性の調節、遺伝子発現、リン酸化・脱リン酸化蛋白質のシグナル伝達など重要な役割を果たしている。細胞が EDC に暴露されると、細胞内シグナル伝達の恒常性が攪乱され、蛋白質間相互作用の程度に変化が起きると推測される。従ってある特定の蛋白質間相互作用を生きた細胞内でモニターすることにより、EDC 暴露による細胞内の恒常性の変化を測定できると考えられる。

我々はこれまでにプロテインスプライシング反応を利用することにより、細胞内における蛋白質

—蛋白質間相互作用を GFP の形成により検出する新規プローブ分子を開発した。平成 13 年度はスプライシング蛋白質 DnaE を用いることにより、スプライシング効率が向上し高感度に検出できることを示した。またスプライシング反応に必要とする時間は4時間程度であり短時間に検出することが可能となった。しかし、DnaE 間の強い相互作用による大きなバックグラウンドシグナルが新たな問題点となった。そこでこのバックグラウンドを低減するための基礎研究を行った。

天然に存在する DnaE は、N 末から 123 番目のアミノ酸で N 末と C 末にスプリットしているが、新しい切断位置を見つけるため 26 番目から 40 番目まで各々切断した DnaE を作製し、スプライシング反応が進行するかどうかを検討した(図参照)。その結果、新しい切断位置 N 末から 38 番目でスプリットしても、123 番目のスプリットした天然の DnaE と同様にスプライシング反応が進行することを見いだした。さらにこの 38 番目で切断した DnaE は、N 末と C 末の相互作用は殆どないことが分かった。現在、相互作用する蛋白質を N 末、C 末のプローブに連結し、蛋白質間相互作用によりスプライシング反応が進行するかについて検討中である。



AR-cSrc 間相互作用の検出

AR と細胞内キナーゼ蛋白質 cSrc との蛋白質間相互作用が実際生きた真核細胞内で起きているかどうかを検証した。Split GFP プローブ分子を cSrc 及び AR にそれぞれ結合し、NIH3T3 細胞内で発現させた。AR のアゴニストである DHT を添加した後、フローサイトメーターを用いて蛍光性の細胞数をカウントした。その結果 DHT 添加した細胞は、DHT 非添加の細胞に比べ蛍光性の細胞数が増大することが分かった。これは cSrc と AR が細胞膜上で相互作用することを

示している。今後 EDC 暴露により AR-cSrc 相互作用にどのような影響があるかについて検討する。

スプリットルシフェラーゼシステム

我々はこれまでに蛍光由来の luciferase 蛋白質を用いて真核細胞内での蛋白質間相互作用を、高感度かつ短時間に検出する新規方法を開発した。インシュリン情報伝達をモデル実験として、インシュリン刺激によりリン酸化される IRS-1 蛋白質のチロシン残基と、リン酸化チロシンと特異的に結合する SH2ドメインとの蛋白質間相互作用を検出した。平成13年度は更に高感度検出プローブの開発を目的として、Renilla ルシフェラーゼを用いた新しいプローブ分子の開発を行った。Renilla ルシフェラーゼは蛍光由来ルシフェラーゼに比べ分子量が約半分であり、また基質が膜透過性を持つ特徴を有する。Renilla ルシフェラーゼのスプリット位置を検討した結果、73 番目のシステイン残基でスプリットするとルシフェラーゼ活性が失活することが分かった。一方、蛋白質間相互作用によりスプライシング反応が起こると、ルシフェラーゼ活性が回復することが分かった。単位時間あたりの発光強度は、蛍光由来のルシフェラーゼに比べ約1万倍大きかった。今後はスプリット renilla ルシフェラーゼ系を用いて、cSrc から MAPK に至るシグナル伝達に参与する蛋白質間相互作用を定量評価する方法の開発を行う。

新しい発現クローニング法の開発とマーカー蛋白質の探索

蛋白質の細胞内オルガネラ局在は、細胞内情報伝達において重要な役割を果たしている。EDC 暴露により細胞内オルガネラ局在蛋白質量がどのように変化するかを調べる新規方法の開発を目的とした。平成13年度は、ミトコンドリア内に発現する蛋白質の発現クローニング法の開発を行った。GFP をスプリットし、その C 末に dnaE の C 末およびミトコンドリア移行シグナルを結合したタンパク質を作成した。この cDNA をラット肝細胞に遺伝子導入し、予めミトコンドリアにプローブを局在させた。ラット肝細胞から抽出した cDNA ライブラリーに dnaE の N 末及び GFP の N 末を結合した cDNA を作成しラット肝細胞に遺伝子導入した。ライブラリーにコードされたミトコンドリアに移行する蛋白質は、スプライシング反応により GFP 蛋白質を形成することが分かった。フローサイトメトリー (FACS) で蛍光性の細胞を回収した後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で各クローン細胞の観察を行った。その結果、ミトコンドリアの形態や細胞質でのミトコンドリア局在に変化を示すクローンが存在することが分かった。今後遺伝子解析を行い、ミトコンドリア内発現蛋白質の同定を行う。さらに EDC 暴露によるミトコンドリア蛋白質への影響について検討する。

(II) 遺伝子発現の系統的解析

(A) エストロゲン様作用を有する EDC の標的遺伝子の探索とスクリーニング系の確立

EDC の多くは、女性ホルモンであるエストロゲン受容体に結合し、エストロゲン様作用を有することが明らかにされており、野生生物のみならず、ヒトにおいても精子数の減少や乳癌発症増加などとの関連が危惧されている。現在までこれらの化学物質の作用分子機構は十分明らかにされておらず、また暴露を推定する有用なバイオマーカーは得られていない。本研究は EDC の生体侵襲機構を分子レベルで明らかにし、さらに有効で簡便な EDC スクリーニング系を確立することを目的とする。そのために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、発現が変動する遺伝子群を Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)法を用い系統的に解析し、エストロゲンの標的遺伝子群を明らかにした。その結果エストロゲン応答遺伝子として新たに見出された WISP-2(Wint-1 inducible signaling pathway protein 2)は分泌蛋白であることが明らかとなり、被験化学物質を乳癌細胞株に添加し培養上清中の WISP-2 蛋白量を定量化することにより、被験化学物質のエストロゲン様作用の有無を評価しうるものと思われた。

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、 17β -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 等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 WISP-2 に対する抗体を作成し、Western blot をおこない蛋白レベルでのエストロゲン応答性を確認した。また WISP-2 蛋白は MCF-7 細胞の全細胞抽出物のみならず培養上清中にも検出され、分泌蛋白であることが明らかとなった。培養上清中における WISP-2 蛋白は 72 時間まで継時的に増加し、添加するエストロゲンの濃度依存的に誘導された。

WISP-2 は細胞の増殖や死をつかさどる CCN 遺伝子ファミリーに属するがその生理的な役割は不明である。WISP-2 は精巣・卵巣において発現が強く認められ、生殖器系での役割が示唆される。この遺伝子の機能を明らかにするためには、遺伝子のターゲッティングを行うことが最適であると考えられる。平成 13 年度はマウス WISP-2 の遺伝子構造を明らかにするとともに、ターゲッティングベクターの作成を行った。

(B) 内分泌攪乱化学物質投与によりヒト肝臓細胞にて発現が変化する遺伝子の系統解析

内分泌攪乱化学物質投与により変化する肝臓内の発現遺伝子を系統的に解析するため、はじめに正常肝臓における発現遺伝子の種類と発現頻度を包括的に明らかにした。SAGE 法を用いて正常肝臓において発現している 30,982 遺伝子を得た。ヒトゲノムプロジェクト等により構築されてきたデータベースと照合し、この正常肝臓においては 8,596 の固有の遺伝子が発現していること、およびその発現頻度を明らかにした。続いて病態の変化により肝臓内において発現している発現遺伝子が増加し、包括的遺伝子解析によって、それを系統的に解析することが可能であることを明らかにするため、SAGE 法により慢性肝炎の肝組織および肝細胞癌の肝組織より発

現遺伝子ライブラリーを作成した。あわせて 94,580 遺伝子を比較解析した。病態の変化によって、大きく変動する遺伝子が存在することが明らかとなったが、肝臓内には発現量の低い遺伝子が多く存在し、この変化を系統的に解析することは容易でないことが示された。このことは内分泌攪乱物質を投与した際に変動する遺伝子を明らかにし、系統的に解析する手法を開発していく上で大きな問題点と考えられた。一方で、発現量が多く、かつ重要な遺伝子が明らかにされれば、系統的な解析が可能であることも示唆した結果であった。

正常肝で発現している 8,596 の遺伝子のうち、GenBank では 2,986 (34.7%) がその機能が未知の遺伝子であった。そのうち 3hits 以上と発現が高く、かつ遺伝子を特定することが困難であったものが、156 遺伝子であった。各種データベースとの比較により、このうち 151 個 (96.8%) の遺伝子の位置を特定することが可能となった。これらの遺伝子はその機能が未だ知られていない遺伝子が 92 個 (59.9%) にもおよぶことから、今後はそれらの遺伝子の機能を明らかにする予定である。この事実は、内分泌攪乱物質投与によって変動する遺伝子群の包括的 SAGE 解析においても同様な割合で、未知の遺伝子が存在することを示唆していた。現在は世界の多くの機関で未知の遺伝子の同定が精力的にすすめられていることから、こうしたデータベース解析を進めるとともに、ヒト肝臓における未知の遺伝子の同定をさらにすすめていくことが重要であると思われる。

SAGE 法では詳細な発現遺伝子プロファイルの解析が可能であるものの、多数のサンプルを系統的に解析することは困難である。このため内分泌攪乱物質の系統的解析には DNA チップを使用することを予定している。これまでの解析から、内分泌攪乱物質投与によって変動する重要な遺伝子であって、かつ系統的解析に役立つ遺伝子が明らかにされるか否かは不明であり、むしろ肝臓内で変動する多数の遺伝子の変動を包括的に解析することによって、系統的に解析ができる可能性が考えられる。そこで、これらの SAGE 遺伝子情報と肝臓における各種の代謝にかかわる遺伝子情報をもとに、肝臓における統合的な遺伝子解析するためのデータベースを作成し、約 9,000 におよぶ肝臓特異的遺伝子群をファイルし、これらの遺伝子を用いた肝臓 DNA チップ作製を目指して遺伝子の収集を開始した。

またマウスに TCDD を投与し、7 日後の肝臓を得て、SAGE 法を行い、TCDD 投与による肝臓内の発現遺伝子の変動を解析した。はじめに正常のマウス肝臓より、56,420 遺伝子を得た。解析により 14,117 個の固有の発現遺伝子が確認された。TCDD 投与したマウスより 56,647 遺伝子を得て、解析により 15,696 個の固有の発現遺伝子を確認した。TCDD 投与により有意に変動した遺伝子は 346 遺伝子であった。これまで予測されたように、この中には機能が未知の 94 個の Expressed Sequence Tag (EST) が見いだされた。また TCDD 投与によって変動する遺伝子は薬物代謝にかかわる遺伝子だけでなく、各種の機能を有する遺伝子が広汎に変動していた。こうした結果をもとに、包括的発現遺伝子解析によって内分泌攪乱物質の系統的解析が可能か、および未知の遺伝子の機能は何であるのかを研究する予定である。

(C) 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

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。我々は、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を行い、内分泌攪乱性が疑われている化学物質のうち、少なくともフタル酸ジエチルヘキシル、塩化カドミウム、ならびにメチル水銀が、NB-1 細胞の突起伸展に有意な影響を与えることを認めている。

本年度は、NB-1 細胞へのメチル水銀暴露に伴って発現が変化する遺伝子の系統的解析を DNA マクロアレー法 (Atlas Array) により行った。ヒト遺伝子全般を網羅したアレーシート (1,278 個; AtlasTM 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; AtlasTM 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、heat shock 蛋白質である mtHSP70 と phospholipaseA₂ の発現が抑えられることが明らかになった。これらの遺伝子について RT-PCR 法やノーザンブロット分析を行ったところ、マクロアレー法での結果が確認された。

また、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から同定された、カドミウムにより顕著に発現が亢進される遺伝子 (かずさ DNA 研究所がヒト脳より単離したクローン KIAA1712 と相同性をもつ) について更に解析を進めた。これまでに全長 cDNA を組み込んだ発現ベクターを構築して、リコンビナント蛋白質を調製し、現在抗体の作成を試みている。

新たに、神経系前駆細胞の分化過程に対する内分泌攪乱物質の影響を解析するため、マウス胎仔より調製した神経系前駆細胞の初代培養系の確立を試みた。

2. 研究実施体制

梅澤グループ

- ① 梅澤喜夫 (東京大学大学院理学系研究科 教授)
- ② 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

稲寺グループ

- ① 稲寺秀邦 (東京大学環境安全研究センター 助教授)
- ② エストロゲン様作用を有する EDC の標的遺伝子の探索とスクリーニング系の確立

橋本グループ

- ① 橋本真一 (東京大学大学院医学系研究科 助手)
- ② 乳癌細胞株の SAGE 法による遺伝子群の系統的解析

金子グループ

- ① 金子周一 (金沢大学大学院医学研究科 助教授)
- ② 内分泌攪乱化学物質投与によりヒト肝臓細胞で発現が変化する遺伝子の系統解析

国本グループ

- ① 国本 学 (北里大学薬学部 教授)
- ② 内分泌攪乱化学物質投与によりヒト神経細胞で発現が変化する遺伝子の系統解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells. M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano, and Y. Umezawa, *Nature Biotechnol.*, **20**, 287–294 (2002).
- Assay and Screening Methods for Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways. Risk Assessment for Potential Endocrine Disruptors. Y. Umezawa, T. Ozawa and M. Sato, *Environmental Sciences*, **9**, No. 1, 23–35 (2002).
- Assay and Screening Methods for Bioactive Substances Based on Cellular Signaling Pathways. Y. Umezawa, *Reviews in Molecular Biotechnology, special issue on “Biomolecular Sensors and Bioelectronics”*, **82**, 357–370 (2002).
- Detection of Protein–Protein Interactions in Vivo Based on Protein Splicing. T. Ozawa and Y. Umezawa, *Current Opinion in Chemical Biology; Section Analytical Techniques*, **5**, 578–583 (2001).
- Protein Splicing–Based Reconstitution of Split Green Fluorescent Protein for Monitoring Protein–Protein Interactions in Bacteria: Improved Sensitivity and Reduced Screening Time. T. Ozawa, M. Takeuchi, A. Kaihara, M. Sato and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **73**, No. 24, 5866–5874 (2001).
- A Screening Method for Antagonists that Inhibit the Binding of Calmodulin to a Target Peptide Using Surface Plasmon Resonance. K. Sasaki, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chim. Acta*, **447**, 63–74 (2001).
- Imaging of Conformational Changes of Proteins with a New Environment–Sensitive Fluorescent Probe Designed for Site–Specific Labeling of Recombinant Proteins in Live Cells. J. Nakanishi, T. Nakajima, M. Sato, T. Ozawa, K. Tohda and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **73**, No. 13, 2920–2928 (2001).
- Split Luciferase as an Optical Probe for Detecting Protein–Protein Interactions in Mammalian Cells Based on Protein Splicing. T. Ozawa, A. Kaihara, M. Sato, K. Tachihara and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **73**, No. 11, 2516–2521 (2001).
- Cloning and characterization of the 5′-flanking region of human cytokeratin 19 gene in human cholangiocarcinoma cell line. M. Kagaya, S. Kaneko, H. Ohno, K. Inamura and K. Kobayashi, *J. of Hepatology*, **35**, 504–511 (2001).
- Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Y. Shirota, S. Kaneko, M. Honda, H. F. Kawai and K. Kobayashi. *Hepatology*, **33**, 832–840 (2001).

(2) 特許出願

なし