

「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系研究科 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、体細胞での機能として、アンドロゲン受容体(AR)の複数の負の因子を不活化することで AR を活性化すると、また、AR の活性化には DJ-1 との核内での共局在が必須であり、AR 機能を抑制する内分泌かく乱物質は DJ-1 の局在を大きく変動させる事が明らかとなった。一方、精子においては DJ-1 は精子頭部への局在による受精への直接的関与を明らかとした。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

1-1. DJ-1 結合タンパク質の同定と解析

DJ-1 結合タンパク質としてユビキチン様タンパク質修飾因子 SUMO-1、AR 制御因子 ARIP/PIASx α 、新規タンパク質 DJBP を同定した。PIASx α は AR の DNA 結合ドメインに結合することでセトリ細胞など多くの細胞で、AR の DNA 結合性を消失させ転写能を抑制するが、DJ-1 は PIASx α に結合・吸収することで AR を活性化した。PIASx α は HepG2 などの細胞では逆に AR 促進活性を有するが、DJ-1 は活性化された AR には作用しない。更に、複数の PIAS ファミリータンパク質の内、DJ-1 はタンパク質自身に転写抑制能を有する PIAS3, PIASx α , PIASy のみに結合した。また、DJBP も PIASx α と同様な機構で AR を抑制し、DJ-1 はその抑制を解除した。以上の事より、

DJ-1 は種々の因子により不活化された AR の救助因子として機能し、この機能が内分泌かく乱物質による DJ-1 の減少により阻害されると考えられる。

更に、DJ-1 は 130 番目のリジンが SUMO-1 化され、これが DJ-1 機能 -転写能、Ras と協調的細胞癌化能、細胞増殖能 -に必須であることが明らかとなった。更に、DJ-1 結合タンパク質として SUMO-1 化との関連で注目されている Daxx, TOPORS/p53BP, Abstrakt が得られ解析している。また、PIAS は SUMO-1 ligase として機能する事が極最近報告されたので、その点からも解析している。

1-2. 内分泌かく乱物質と DJ-1, AR との相互関係

本 CREST 研究チームである九州大学・大学院医学系研究科・名和田教授チームより AR 活性を不活化させる内分泌かく乱物質が同定され、その AR 抑制機構としてこれらの内分泌かく乱物質は AR の核内での局在をドット状から分散させることが報告された。まず、AR と DJ-1 の核内でドット状の共局在を観察した。次に、同種の内分泌かく乱物質、また DJ-1 を抑制するエピクロロヒドリンなどの内分泌かく乱物質を用いて AR 活性と AR, DJ-1 の細胞内局在を検討した。両者とも AR 活性を抑制するが、前者は AR の核内に分散させ、後者は AR のドット状局在を変動させなかった。しかしながら、DJ-1 は両者により局在が核内での分散、更には細胞質へと変動された。この事より AR 活性化には DJ-1 との核内ドット状の共局在が必須である事が明らかとなった。現在、内分泌かく乱物質による DJ-1 の細胞質移動機構を解析している。

一方、DJ-1 が活性酸素発生により発現誘導され、等電点が 6.2 から 5.8 に移動する事が報告された。実際、精製 DJ-1 は活性酸素発生源である過酸化水素を消費する活性が存在した。内分泌かく乱物質は活性酸素を発生するという報告もあるので、今後詳細に検討したい。

1-3. DJ-1 と細胞癌化

UV などの細胞への照射により DJ-1, p53 は共局在して誘導され、アポトーシス誘発後 DJ-1 は細胞質へ移行した。上記の TOPORS/p53BP3 はその p53, DJ-1 の間をつなぐタンパク質である。UV 照射により活性酸素が発生することが知られているので、内分泌かく乱物質—活性酸素—DJ-1 の細胞質移動の相関性の糸口が見つかるかと期待している。また、乳癌患者の半数では DJ-1 が高発現しており、更に血清中に分泌されている。個の事は DJ-1 が乳癌のバイオマーカーになる可能性を示している。

1-4. DJ-1 の精子での機能

DJ-1 の X 線結晶構造解析が完了し、DJ-1 自身が単独で1つの構造体を取り、 β -sheet を介した2量体活形成が活性に重要である事が明らかとなった。また、DJ-1 は原核生物のプロテアーゼ I と構造が酷似しており、事実 DJ-1 は弱いながらプロテアーゼ活性が存在した。更に、単離精子、卵を使用した人工授精系で内分泌かく乱物質投与マウス由来の精子は受精能が低下している事、坑 DJ-1 血清は受精能を抑制した。以上より、DJ-1 は卵への結合と、プロテアーゼ活性によるその後の侵入に関与するらしい事が明らかとなった。

DJ-1 マウス DJ-1 cDNA, ゲノム DNA を単離し、構造解析、プロモーター解析を行った。現在ターゲットベクター作成後、組替え ES 細胞をスクリーニングしており、来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。

1-5. DJ-1 と男性不妊

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、DJ-1 遺伝子変異の有無を検討している。後述の玉井グループが DJ-1 量の定量化のための ELISA 系を構築したので、岩本教授グループが大量にストックしている精子検体をこの ELISA 系を利用して定量し、不妊男性患者精子での DJ-1 量低下の相関が弱いながら観察された。

(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 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 は精子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 複合体形成し A-kinase 活性を抑制した。同様に新規 AMY-1 結合タンパク質 AAT-1 は A-kinase のリン酸化ターゲット因子である事が判明した。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。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、現在までにキメラマウスまで作成した。

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た。解析の結果、4細胞期までは正常であるがその後が致死となること、これを逃れて生まれたホモ体も精巣の萎縮による生殖能の低下が見られた。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。

(4) 新規タンパク質に対する抗体作成と DJ-1 の高感度検出系の作成

分子生物グループが同定した複数の新規タンパク質に対する標識抗体を含む抗体を作成した。更に、男性不妊患者精子、血漿、血清中の DJ-1 量の定量的ために ELISA 法を確立し、分子生物グループ、聖マリアンナ医科大学岩本教授グループに提供した。現在、DJ-1 は男性不妊、乳癌のバイオマーカーになる可能性が高く、この系は今後極めて有用であると考えられる。

3. 研究実施体制

分子生物・マウスグループ

- ① 有賀寛芳(北海道大学薬学研究科、教授)
- ② DJ-1 及び AMY-1 の機能解析、精巣特異的蛋白の機能解析

抗体グループ

- ① 玉井克之(医学生物学研究所(MBL)・研究リーダー)
- ② 新規タンパク質に対する抗体作成と DJ-1 の高感度検出系の作成

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Taira, T., Takahashia, K., Kitagawa, R., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Arigo, 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.
- Takahashi, K., Taira, T., Niki, T., Seino, C., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Arigo, H. (2001). DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx α to the receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 37556-37563.
- Furusawa, M., Ohnishi, T., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Arigo, H. (2001). AMY-1, a c-Myc-binding protein, is localized in the mitochondria of sperm by association with S-AKAP84, an anchor protein of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 36647-36651.
- Ishibashi, Y., Maita, H., Yano, M., Koike, N., Tamai, K., Arigo, H. and Iguchi-Arigo, S.M.M. (2001). Pim-1 translocates sorting nexin 6/TRAF4-associated factor 2 from cytoplasm to nucleus. *FEBS Lett.* 506, 33-38.
- Fujioka, Y., Taira, T., Maeda, Y., Tanaka, S., Nishihara, H., Iguchi-Arigo, S.M.M., Nagashima, K. and Arigo, H. (2001). MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/lymphoma and tongue cancer. *J. Biol. Chem.* 276, 45137-45144.
- Satou, A., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Arigo, H. (2001). A novel transrepression pathway of c-Myc-Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 46562-46567.
- Fujimoto, M., Matsumoto, K., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Arigo, H. (2001). Disruption of MSSP, c-myc single-strand binding protein, leads to embryonic lethality in some homozygous mice. *Genes Cells*, 6, 1067-1075.

(2) 特許出願

なし