

「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, AMY-1及び精巣で発現する遺伝子群の機能解析と内分泌かく乱物質との相関を、分子生物学、生化学、細胞生物学、発生生物学的手法で解析した。DJ-1は体細胞と精子での機能を有し、前者ではアンドロゲン受容体(AR)の正の制御因子、精子ではプロテアーゼとして直接受精に関与し、内分泌かく乱物質によるDJ-1の細胞内の局在変動、発現減少、リン酸化DJ-1の減少がAR機能、受精能低下をもたらすことが明かとなった。また、DJ-1は抗活性酸素能を有し、この機能不全が酸化ストレス、環境物質との関連が指摘されているパーキンソン病を誘発する。AMY-1は同様に体細胞と精子での機能を有し、A-kinaseを負に調節することから、精子形成においてAMY-1→DJ-1経路の存在が想定された。

2. 研究実施内容

(1) DJ-1の解析

(1)-1. DJ-1に作用する内分泌かく乱物質とDJ-1の量的・局在変動

DJ-1 はほとんどの体細胞で発現しているが、特に精巣での発現が高い。更に精子の頭部、体部で発現し、上記の化学物質投与により、DJ-1量の減少と同時に、精子頭部から体部への局在変動が見られる。DJ-1 は後述するように、受精時に精子の卵への結合、侵入に関与すると考えられており、化学物質による精子頭部への局在阻害が不妊をもたらすと考えられる。また、DJ-1はLynなどのよりチロシンリン酸化される。精子の運動性確保はA-kinaseでリン酸化されたチロシンキナーゼが精子、精巣タンパク質をリン酸化されることが必須であるとされ、ダイオキシン投与によりマウス精子内のチロシンリン酸化が低下する主たるタンパク質がDJ-1らしいことから、現在、DJ-1のリン酸化と種々の内分泌かく乱物質の相関を検討している。

本CREST「内分泌かく乱物質」の研究代表者である九州大学医学系研究科・名和田教授のグループは、AR活性低下をもたらす内分泌かく乱物質はARの核内の局在を変動させる事を報告した。そこで、我々も彼らの同定したAR活性抑制機能を有する内分泌かく乱物質を

細胞に作用させた時のAR活性、AR とDJ-1の細胞内局在を検討した。名和田グループの報告のようにヒドロキシフルタミド、ヴィンクロゾリン、DDE、ニトロフェンはAR活性を抑制しARの核内での局在をdot 状からdiffuseに変動させた。DJ-1 は薬剤未処理ではARと核内でdot状に共局在するが、これらの薬剤処理でAR 同様diffuseな局在に変動した。一方、オルニタゾール、エピクロロヒドリン(ECH)処理の場合、AR転写能は同程度に阻害されるが、ARは依然として核内でdot状に局在した。しかしながら、DJ-1 はその局在を核内でdiffuse、更には細胞質への大きく変動し、ARとの共局在が失われていた。これらの結果は、ARが活性を示すにはDJ-1 と核内でdotな場に共局在する事が重要である事を示唆している。現在、DJ-1 の核内 - 細胞質移動に関与する分子の探索を行っている。

(1)-2. DJ-1の精子での機能

DJ-1 の精子での機能を解析するために、オルニタゾール投与、非投与マウスよる精子、卵を単離し人工授精反応を行った。オルニタゾール処理により受精能は40%程に低下した。

次に、単離精子を抗DJ-1抗血清処理して同様な人工授精を行ったところ、受精能が有意に60%程阻害された。この抗DJ-1抗血清効果は透明帯除去卵では起こらないことから、DJ-1 が受精時にプロテアーゼとして卵透明帯への結合、侵入に関与している事を示唆していた。現在、卵透明帯構成タンパク質ZP1, ZP2, ZP3へのDJ-1の作用を検討している。

(1)-3. 男性ホルモン受容体制御因子としてのDJ-1

DJ-1 の体細胞での機能を明らかにする目的でDJ-1結合タンパク質をスクリーニングし、既知のもの10種、新規なもの1種を同定し、PIASx α に関しては昨年度報告した。新規タンパク質DJBPに関し解析した。DJBPは受容体(AR)とも結合し、転写コリプレッサーをリクルートすることでARを不活化させるが、DJ-1はDJBPと結合・吸収することでARを活性化させた。このように、DJ-1はPIASx α 、DJBPに対し異なった機構でARを活性化させる。また、DJ-1はLynなどのSrc kinaseでリン酸化されることが明らかとなった。リン酸化タンパク質は精子の運動性獲得に重要であり、リン酸化の意義を検討している。

(1)-4. DJ-1の構造解析

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。このプロテアーゼ活性は上述の受精時、及び後述のパーキンソン病での疾患と関連があると考えられる。

(1)-5. DJ-1とパーキンソン病

パーキンソン病は老年とともに発症する弧発性のパーキンソン病と、若年で発症する遺伝的パーキンソン病が存在する。DJ-1は遺伝性パーキンソン病(PARK7)の原因遺伝子であることが報告された。PARK7患者ではDJ-1遺伝子の欠失、あるいはL166P変異が見られる。DJ-1は酸化ストレスで発現誘導されるので酸化ストレスとの関連を検討し、DJ-1は自ら酸化されることで活性酸素を除去し、活性酸素誘導細胞死を防御する事が明らかとなった。Dimer形成に必要なC57, SUMO-1化に必要なK130、L166変異ではこの活性が失われ活性酸素

誘導細胞死が生じた。また、パーキンソン病ではPael-Rなどが脳黒質に蓄積するが、DJ-1はプロテアーゼとしてPael-Rを分解するらしい結果を得ている。弧発性パーキンソン病は酸化ストレス、化学物質の作用などがその原因と想定されている。一方、内分泌かく乱物質は活性酸素を産生すると紹介されることもあるが実験的証拠はない。そこで、DJ-1の弧発性パーキンソン病、内分泌かく乱物質に共通に存在する機構の存在を想定して解析している。

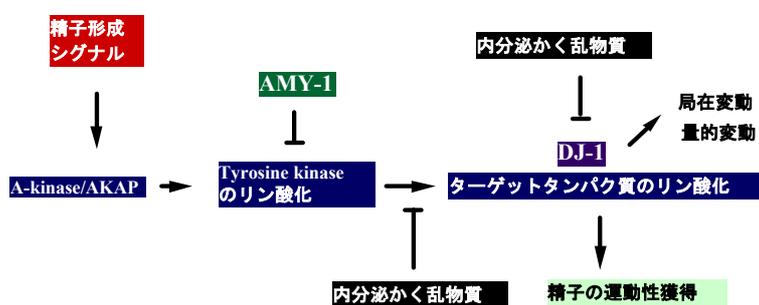
(2) AMY-1の機能解析

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 と複数の新規タンパク質が同定単離された。

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。AMY-1ノックアウトマウスを作成したところ、AMY-1ホモ欠損体は胎生10日頃までは生育するが、その後致死となることが明らかとなった。雄AMY-1トランスジェニックマウスが不妊傾向を示す

AMY-1, DJ-1, 内分泌かく乱物質が精子形成に関与するモデル

ことから、上述のようにAMY-1は精子運動性、精子形成機構においてDJ-1の上流に位置し、A-kinaseリン酸化カスケードによるチロシンリン酸化酵素を調節する可能性が存在し解析している(図1)。



(3) 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量の定量のために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 グループ長名：有賀寛芳（北海道大学薬学研究科、教授）

② 研究項目

(1) DJ-1の解析

- (1)-1. DJ-1に作用する内分泌かく乱物質とDJ-1の量的・局在変動
- (1)-2. DJ-1の精子での機能
- (1)-3. 男性ホルモン受容体制御因子としてのDJ-1
- (1)-4. DJ-1の構造解析
- (1)-5. DJ-1とパーキンソン病
- (2) AMY-1の機能解析

抗体グループ

- ① グループ長名：玉井克之（医学生物学研究所(MBL)・研究リーダー）
- ② 研究項目
 - (1) 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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Okada, M., Matsumoto, K., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2002)
DJ-1, a target protein for an endocrine disrupter, participates in the fertilization in mice.
Biol. Pharm. Bull. 25, 853-856
- Yukitake, H., Furusawa, M., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2002)
AMAP-1, a novel testis-specific AMY-1-binding protein, is differentially expressed during the course of spermatogenesis
Biochim. Biophys. Acta, 1577, 126-132.
- Yukitake, H., Furusawa, M., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2002)
AAT-1, a novel testis-specific AMY-1-binding protein, forms a quarterly complex between AMY-1, A-kinase anchor protein 84 and a regulatory subunit of cAMP-dependent kinase, and is phosphorylated by its kinase.
J. Biol. Chem. 277, 45480-45492.
- Furusawa, M., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2002)
AMY-1 interacts with S-AKAP84 and AKAP95 in the cytoplasm and the nucleus, respectively, and inhibits cAMP-dependent protein kinase activity by preventing binding of its catalytic subunit to AKAP complex
J. Biol. Chem. 277, 50885-50892.
- Ariga, H., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Taira, T. (2003)
DJ-1, a target protein of androgen-related endocrine disrupters (minireview).
Environmental Sci. 10, 13-21.

- Furusawa, M., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Ariga, H. (2003).
Molecular cloning of the mouse AMY-1 gene and identification of the synergistic activation of the AMY-1 promoter by GATA-1 and Spl
Genomics 81, 221-233.
- Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M.M. and Ariga, H. (2003).
DJBP, a novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex.
Mol. Cancer Res. 1, 247-261.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）