

「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, 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、発生生物学的手法により、内分泌かく乱物質による精子形成不全（不妊）、脳神経変性疾患、細胞癌化の分子機構を解明した。解析が進んだDJ-1は体細胞と精子で機能し、転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼの3つの機能を有し、その機能破綻が男性不妊、パーキンソン病の原因になることが明らかになりつつある。上記の疾患原因の1つとしては酸化ストレス、あるいは小胞体ストレスが考えられ、ダイオキシン、ビスフェノールAなどの内分泌かく乱物質は活性酸素を誘導し、ビスフェノールA投与マウスはパーキンソン病様の神経症状を起こす。抗酸化ストレス機能を有するDJ-1はダイオキシン、ビスフェノールにより誘発される活性酸素に伴い発現上昇し、自己酸化されることで活性酸除去を行った。また、DJ-1は小胞体ストレスが原因で異常凝集体を生ずるPael受容体を分解し、抗細胞死作用を示した。以上より、内分泌かく乱物質の生体に及ぼす分子機構の1つとして酸化ストレス、小胞体ストレスがあり、その防御因子としてのDJ-1が明らかとなった。

2. 研究実施内容

現在までに多数の内分泌攪乱物質が同定されているが、そのバイオマーカーとなるターゲット遺伝子、更に内分泌攪乱作用の分子機構は未だに不明な点が多く現在精力的に解析されている。本研究室では長らく癌遺伝子研究を行っており、その過程でras癌遺伝子と強制的に細胞を癌化する新規癌遺伝子DJ-1を同定した。DJ-1は種々の内分泌攪乱投与ラット、マウス、培養細胞で発現が顕著に変動する。また、DJ-1は男性不妊をもたらす化学物質投与マウス精子で不妊と平行に変動して減少することから、ある内分泌攪乱物質のターゲットタンパク質であると推定されるようになった。更に、活性酸素誘導物質によりDJ-1は発現誘導され、家族性パーキンソン病PARK7の原因遺伝子であることも今年度に入り報告された。パーキンソン病は活性酸素が発症原因の一つと考えられている。このような多様な機能を有するDJ-1の機能解明を行い、同時に内分泌攪乱物質の生体に及ぼす分子機構をDJ-1を基点として解明することを目的として研究した。

2-1. 実験方法

1) マウス、培養細胞におけるビスフェノールA (BPA), TCDD暴露におけるDJ-1の発現変動と活性酸素誘導

成熟雄マウス (BL/6、6週齢) を用いて、コーンオイルに溶解したBPA (100 mg/kg/day)、TCDD (100 ng/kg/day) を各々毎日経口投与した。0、2、4週間後にそれぞれ精巣、精子、脳を摘出し、Western blotによりDJ-1を定量した。また、セルトリ細胞株TM4, early spermatocyte 細胞株GC1に20, 100 nM BPAを処理し、DJ-1の発現変動をWestern blotにより、活性酸素産生をフローサイトメーターで定量した。

2) DJ-1の抗酸化ストレス能

過酸化水素H2O2, 活性酸素誘導を行う神経毒MPP+, 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を種々の濃度でDJ-1に対するsiRNA処理したドーパミン性神経芽腫細胞SH-SY5Yを処理し、死細胞を定量した。マウスNIH3T3細胞にwild-type, 及び種々のDJ-1変異体を導入した細胞株を樹立し、H2O2処理後のDJ-1の発現とpI変動を、また死細胞を定量した。

3) DJ-1のSUMO-1化と活性変動

H1299細胞におけるDJ-1の動態を抗DJ-1抗体、抗SUMO-1抗体で検討した。また、DJ-1に存在する全16種のリジンアルギニンに変換させた変異体を作成し、DJ-1のSUMO-1サイトを同定した。さらに、パーキンソン病に見られるDJ-1変異体のSUMO-1化と細胞内局在の変動を解析した。

2-2. 実験結果

1) 内分泌攪乱物質によるDJ-1の応答

今回のBPA, TCDDと昨年度報告した他の内分泌かく乱物質暴露に対するDJ-1の応答を以下の表にまとめる (表1)。

表1. 各種薬剤投与に対するDJ-1の応答

内分泌攪乱物質、化学物質	DJ-1の発現	DJ-1の局在変動	動物 or 細胞	活性酸素誘導
アンドロゲンアンタゴニスト ビクロゾリン、p,p'- DDE、ニトロフェン	変動なし	核から細胞質 核内でdiffuse	CosI細胞	検出できず
ビスフェノールA	減少 (精巣) 上昇 (精子) 上昇 (脳)	変動なし	マウス、 TM4細胞 GC1細胞 Nero2A細胞	誘導
ダイオキシン	減少 (精巣) 上昇 (精子) 上昇 (脳)	変動なし	マウス	誘導
精巣上体毒 オルニタゾール、 エピクロロヒドリン	減少 (精子)	核から細胞質 核内でdiffuse	CosI細胞 ラット、 マウス、	未テスト

また、BPA処理によりTM4、GC1、Neuro2A細胞で活性酸素が誘導されることが明らかとなった。DJ-1はこの活性酸素に応答して発現変動したと考えられる。

2) 活性酸素消去因子としてのDJ-1

過酸化水素投与細胞ではDJ-1の酸化が観察された。更に、過酸化水素と精製DJ-1を反応させたところ、DJ-1自身の酸化に伴う過酸化水素の消去が観察され、DJ-12量体形成を阻害する変異DJ-1ではその活性が半減していた。従って、DJ-1は自己酸化されることで過酸化水素を消去することが明らかとなった。DJ-1は過酸化水素、MPP⁺、6-OHDA処理による細胞死に対し抵抗性を示し、パーキンソン病で見られる変異、2量体形成、SUMO-1化変異体ではこの活性が消失していた。

3) DJ-1のSUMO-1化

DJ-1は130番目のリジンがSUMO-1化され、全てのDJ-1機能にSUMO-1化が必須であった。パーキンソン病で見られる変異体で過剰にSUMO-1化され、一部にミトコンドリアに局在し、不溶化していることにより機能消失していた。

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はプロテアーゼ活性が存在した。このプロテアーゼ活性は受精時、のパーキンソン病での疾患と関連があると考えられる。

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変異など現在まで11個の変異が報告されている。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は自らが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を分解した。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。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。

2-3. 結論

このように異なる作用点を有すると考えられる内分泌かく乱物質、化学物質に対してDJ-1は反応する。アンドロゲン受容体(AR)活性は転写活性を発揮するためには細胞核内のドット状に見える一定の場にDJ-1を含む複数の転写調節因子と共局在することが必須であるが、アンドロゲンアンタゴニストはARを核内にdiffuse(一様)に拡散させ、同時にDJ-1は細胞質まで移動させARとの共局在を解離させる。一方、オルニタゾールなどの精巣上

体毒はアンドロゲンアンタゴニスト同様にAR転写活性を抑制する。しかしながら、ARの核内でのドット状局在は変えないがDJ-1は細胞質まで移動させARとの共局在を解離させる。以上の事より、ARはDJ-1を共局在することが活性発揮に必須と考えられ、AR作用を攪乱させる内分泌攪乱物質の一つの作用点がここに存在すると推定された。

一方、ビスフェノールA、ダイオキシンなどはエストロゲン受容体を始めとする複数の作用点があることが予想されている。DJ-1はビスフェノールAにより発現減少し、ダイオキシン投与マウスでは臓器により発現は上昇、減少する。これらに共通する機構はなんだろうか。ビスフェノールA、ノニルフェノール、ダイオキシンなどは細胞内に活性酸素を誘導する報告が最近あいついでいる。活性酸素はDNA、タンパク質、糖などにダメージを与え、癌、脳疾患、不妊等を誘発すると考えられている。我々は自己酸化されることで活性酸素を消去し、活性酸素の1つである過酸化水素による細胞死に抵抗性を与える機能がDJ-1に存在し、パーキンソン病に見られる変異DJ-1はこの活性を失っていることから、DJ-1は酸化ストレス防御因子であることを明らかにした。ビスフェノールA、ノニルフェノール、ダイオキシンなどの作用を活性酸素だけで説明することはできないが、1つの作用点として考えることができ、そこにDJ-1が関与するものと考えられる。モデルを図1に示す。

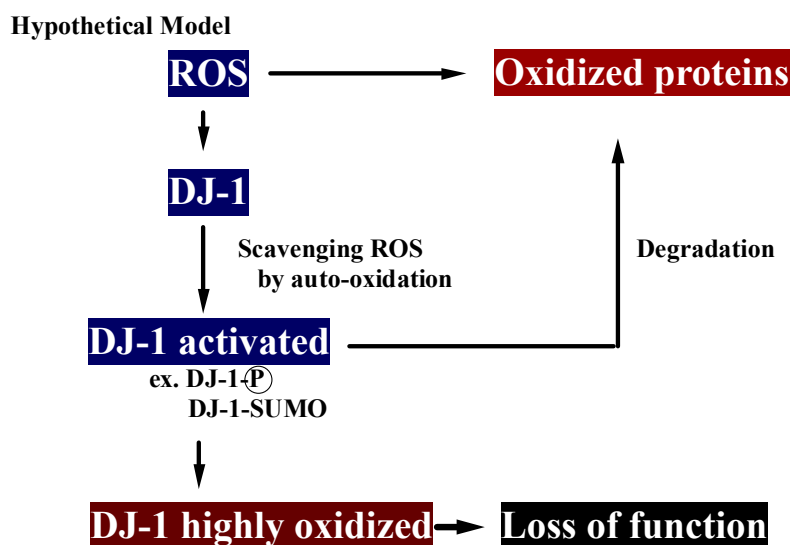


図1. DJ-1の作業モデル

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（北海道大学大学院薬学系研究科、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に機能解析
- (1)-3. DJ-1の構造解析
- (1)-4. 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

- 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-Ariga, 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 Sp1
Genomics 81, 221-233.
- Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Ariga, 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.
- Yoshida, K., Sato, Y., Yoshiike, M., Nozawa, S., Ariga, H. and Iwamoto, T. (2003).
Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue.
Mol. Reprod. Dev. 66, 391-397.
- Honbou, K., Suzuki, N.N., Horiuchi, M., Niki, T., Taira, T., Ariga, H. and Inagaki, F. (2003)
The Crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease.
J. Biol. Chem. 278, 31380-31384.
- Honbou, K., Suzuki, N.N., Horiuchi, M., Niki, T., Taira, T., Ariga, H. and Inagaki, F. (2003)
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of DJ-1, a protein associated with male fertility and Parkinsonism.

Acta Cryst. D59, 1502-1503.

- Yokota, T., Sugawara, K., Ito, K., Takahashi, R., Ariga, H. and Mizusawa, H. (2003).
Down regulation of DJ-1 enhances the cell death by oxidative stress, ER-stress and proteasome inhibition.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, 1342-1348.
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A., Cookson, M., Reid, A., Evans, I., Hope, A., Pittman, A., Lashley, T., Canet-Aviles, R., Miller, D., Mc Lendon, C., Strand, C., Leonard, A., Ariga, H., Wood, N., de Silva, R., Hardy, J., Holton, J., Lees, A. and Revesz, T. (2004)
The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease.
Brain 127, 420-430.
- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., Takahashi, K. and Ariga, H. (2004)
DJ-1 plays a role in anti-oxidative stress to prevent cell death.
EMBO Rep. 5, 213-218.
- Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2004)
Co-localization with DJ-1 is essential for the androgen receptor to exert its transcription activity that has been impaired by androgen-antagonists
Biol. Pharm. Bull. 27, 574-577.
- Kinumi, T., Kimata, J., Taira, T., Ariga, H. and Niki, E. (2004)
Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 317, 722-728.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）