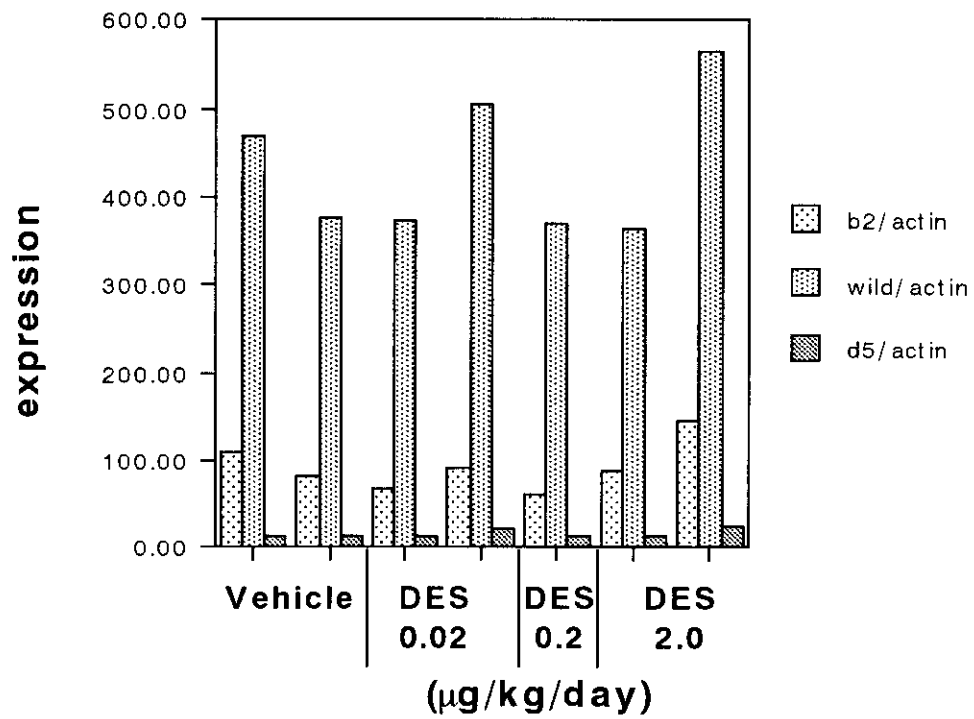


図4 C57BL/6マウス胎生11-18日
DES低用量暴露の胎児全脳



5. ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての 内分泌かく乱物質の解析

分担研究者 垣塚 彰 (財)大阪バイオサイエンス研究所 研究部長

研究要旨

神経機能におよぼす内分泌ホルモン様物質及び内分泌攪乱化学物質の作用をポリグルタミンが引き起こす神経細胞死を指標に解析した。また、PPAR γ のコファクターとして同定された PGC-1、PGC-2 の転写活性化能と脂肪細胞の分化における役割に関して機能解析を行った。

A. 研究目的

我々は、これまでに、ハンチントン舞踏病(HD)や Machado-Joseph 病(MJD)の原因遺伝子産物に共通に含まれる伸長したポリグルタミンが神経細胞を変性・死滅させることを示してきた。本研究では、ポリグルタミンを発現させる培養神経細胞系・トランスジェニックマウスを作成し、それらの実験系を用いて、核内受容体・そのコファクター・そのリガンド及び攪乱物質が神経変性の増悪因子として作用する可能性を検討し、その分子機構を解析することを目的とする。

B. 研究方法

(1) テトラサイクリン等の薬剤で遺伝子発現をコントロールし、同調してポリグルタミンを発現させる神経細胞株を用い、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的な解析を行う。

(2) 上記の培養細胞を用いて、種々の内分泌攪乱物質を培養系に添加し、その細胞死の増強及び阻害効果を定量的に解析し、内分泌かく乱物質がポリグルタミ

ンが引き起こす神経変性に及ぼす影響の解析を行う。

(3) 新規の核内受容体のコファクターを同定し、核内受容体と新規コファクターの相互作用における内分泌攪乱物質の作用を解析する。

(4) 内分泌攪乱物質の細胞分化に与える影響を PPAR γ リガンドが脂肪分化を促進する 10T1/2 細胞で検討する。

(5) 本研究で同定した核内受容体コファクター PGC-1・PGC-2 を恒常的に 10T1/2 細胞に発現させ、PPAR γ リガンドによって脂肪細胞へ分化する過程への影響を検討する。

(6) 本研究で同定した核内受容体コファクター PGC-1・PGC-2 を恒常的に発現させるトランスジェニックマウスを樹立解析する。

本研究は、培養細胞とトランスジェニックマウスを用いた研究であり、倫理的な問題点は極めて低い。

C. D. 研究結果と考察

背景

研究分担者は、1989 年～1992 年の米

国留学時より、核内受容体の研究に参加し、核内受容体のうち特にレチノイン酸受容体の研究において数々の業績を挙げてきた。1992年に帰国後は、核内受容体の一つであるアンドロゲン受容体の変異がもたらす球脊髄性筋萎縮症の研究にヒントを得て、神経変性疾患の研究を開始した。そして1994年に神経難病 Machado-Joseph 病の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内の CAG の繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを見いだした。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内の CAG の繰り返しが共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。研究分担者はこのことに着目し、これまでに、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が脱落し小脳失調を示すことを明らかにしてきた。

一方、近年大きな社会問題となっている内分泌かく乱物質は、その多様な作用が推測されているが、いまだ分子機構の解明に繋がる詳細な解析はなされていない。特に神経系の影響に関しては、適当な実験系が無いことが解析を遂行する上で大きな障害となっている。本研究は、研究分担者がこれまでに行ってきた神経変性疾患の解析系と研究分担者の別の得

意分野である核内受容体に関する経験を融合させ、内分泌かく乱物質の新たな作用とその作用点を分子レベルで明らかにすることを旨とする研究である。

結果の詳細と考察

I. ポリグルタミン発現 PC12 細胞の細胞死における内分泌攪乱物質の効果

代表的な内分泌攪乱物質(Bisphenol A, Nonylphenol, DDT, Dethylstilbestrol (DES))と β Estradiol についてポリグルタミンが引き起こす細胞死に対する効果を $10^{-10}M \sim 10^{-6}M$ の範囲内で検討した(図1)。しかし、いずれの物質もこの濃度の範囲内でポリグルタミンが引き起こす細胞死に対して、促進にも抑制にも効かなかった。

次に、植物等に含まれる内分泌様物質や他の物質について同様のアッセイを行ったところ、いくつかの物質で非常に高い濃度ではあるが細胞死を修飾する効果、特に細胞死促進作用が認められた(図2)。

II. 核内受容体のリガンド結合領域に対する内分泌攪乱物質の転写活性化能の解析

グルココルチコイド受容体(GR)、エストロゲン受容体(RE)、PPAR γ のリガンド結合領域を Gal4 蛋白質の DNA 結合領域と繋ぎ、レポーターアッセイによって、内分泌攪乱物質がこれらのリガンド結合領域に対して転写活性化能を持つかどうかを調べた。その結果、高濃度の DES

が PPAR γ のリガンド結合領域を活性化することが判明した (図 3)。さらにこの結果と符合して高濃度の DES によって、PPAR γ のリガンドと同様に、10T1/2 細胞の脂肪分化を促進した (図 4)。

III. PGC-1 (PPAR γ coactivator-1)、PGC-2 の解析

1) PGC-1、PGC-2 の 10T1/2 細胞への強制発現

昨年報告で、PPAR γ のリガンドによって脂肪細胞に分化誘導を受ける 10T1/2 細胞では、脂肪分化に伴い PPAR γ のみならず PGC-2 の顕著な発現誘導が引き起こされることを示した。また、この時 PGC-1 の発現量には変化が認められなかった。この知見を受け、10 T1/2 細胞に恒常的に PGC-1、PGC-2 を恒常的に 10 T1/2 細胞に発現させ、その表現型を脂肪分化という視点から解析した。いずれの場合も単に PGC-1、PGC-2 の強発現のみでは 10 T1/2 細胞に見た目の変化は観察されなかったが、これらの細胞に PPAR γ リガンドを添加すると PGC-2>PGC-1>control の順に脂肪細胞への分化の促進が観察された。従って、10T1/2 細胞の脂肪分化の過程で、PGC-2 の発現誘導は脂肪分化に対してより促進的な作用をもつことが判明した。

PGC-1 は、褐色脂肪細胞に特異的な因子で PGC-2 が脂肪細胞の中では白色脂肪細胞に特異的であること、また、文献的に PPAR γ が脂肪細胞の分化に必須

であることから PGC-1、PGC-2 は脂肪細胞の表現型を規定する因子であることが推測された。

2) PGC-1、PGC-2 のトランスジェニックマウスでの強制発現

PGC-1、PGC-2 の生体内での作用を解析する目的で PGC-1、PGC-2 を発現させるトランスジェニックマウスを作成しつつある。両者のトランスジェニックも従来のトランスジェニックマウスと同じぐらいの頻度で生まれてきたが、PGC-1 マウスのうち数匹が生後しばらくして死亡した。これらの死亡したマウスは痩せており、PGC-1 が褐色脂肪細胞に発現して、エネルギーの消費と熱産生に関わる uncoupling protein の発現を亢進させるという報告とよく符合する結果である。実際、同腹の野生型マウスと基礎エネルギーの消費量を比較したところ、その亢進が観察された。PGC-2 マウスについては、現在個体数を増やしているところで、今後、順次解析を行っていく。

E. 結論

植物等に含まれる内分泌様物質に神経変性を促進する可能性のあることが判明した。これらのものと構造的に類似する合成内分泌攪乱物質にも同様な増悪作用がある可能性が推測された。

ER と PPAR γ 間で、共通するリガンドが存在し、クロストークが行われている可能性が推測された。

PPAR γ のコファクターとして同定された PGC-1、PGC-2 は、単に PPAR γ の活性を修飾するのではなく、それぞれが脂肪細胞の分化に特異的な作用をもち、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞の表現型の決定に重要な機能をもつことが判明した。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Maeda, H., Segawa, T., Kamoto, T., Yoshida, H., Kakizuka, A., Ogawa, O., & Kakehi, Y. Rapid detection of candidate metastatic foci in the orthotopic inoculation model of androgen-sensitive prostate cancer cells introduced with green fluorescent protein. *Prostate*, 45:335-340, 2000
- 2) Yasuda, S., Hori, S., Maeda, H., Maeda, R., Gotoh, Y., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Kakizuka, A. As2O3 treatment recruits Daxx and ASK1 to re-organized PML bodies and activates the SEK1-JNK cell death kinase cascade in APL cells. (in revision)
- 3) Hirabayashi, M., Inoue, K., Nakadate, K., Higashiyama, H., Kamei, Y., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Sobue, G., Kimura, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. Identification of PIP1 as an effector of neurodegenerative phenotypes in polyglutamine-

expressing neuronal cells. (in revision)
4) Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., & Kakizuka, A. Genetical isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. (in revision)

2. 学会発表 (招待講演分)

- 1) 垣塚 彰
ポリグルタミン病の発症機構の分子解析と治療への展望
東北大学加齢研セミナー 平成 12 年 2 月 29 日 東北大学加齢研 (仙台)
- 2) 垣塚 彰
ポリグルタミン病発症の分子機構解析と治療への展望
ニューロサイエンスセミナー徳島 平成 12 年 3 月 6 日 徳島大学医学部 (徳島)
- 3) 垣塚 彰
優性遺伝性運動失調症の発症機構
第 35 回脳のシンポジウム 平成 12 年 3 月 11 日 北海道大学医学部 (札幌)
- 4) 垣塚 彰
ポリグルタミン病の分子機構
第一回梅園和彦氏メモリアルコンフェレンス 平成 12 年 4 月 23 日 けいはんな都ホテル (生駒)
- 5) 垣塚 彰
ポリグルタミン病発症の分子機構解析
第 41 回日本神経病理学会総会 平成 12 年 6 月 2 日 米子コンベンションセンター (米子)
- 6) 垣塚 彰

ポリグルタミン病発症の分子機構

広島大学医学部生化学セミナー 平成 12 年 6 月 15 日
広島大学医学部 特になし

7) 垣塚 彰

細胞死における PML body の役割

第 3 回造血器セミナー 平成 12 年 7 月 1 日
ホテルニューオータニ札幌 (札幌)

8) 垣塚 彰

神経変性疾患の分子メカニズムの解明と
新しい治療戦略の構築をめざして

第 2 回京都大学生命科学研究科シンポジウム
平成 12 年 7 月 12 日 京大会館 (京都)

9) 垣塚 彰

ポリグルタミン病

第 27 回岡山脳研究セミナー 平成 12 年
8 月 1 日 岡山大学医学部 (岡山)

10) 垣塚 彰

神経筋疾患におけるアポトーシス

第 17 回小児神経筋疾患懇話会 平成 12
年 8 月 19 日 経団連会館 (東京)

11) 垣塚 彰

ポリグルタミンが引き起こす細胞死の分
子機構解析

第 59 回日本癌学会総会 平成 12 年 10
月 4 日 パシフィコ横浜 (横浜)

12) 垣塚 彰

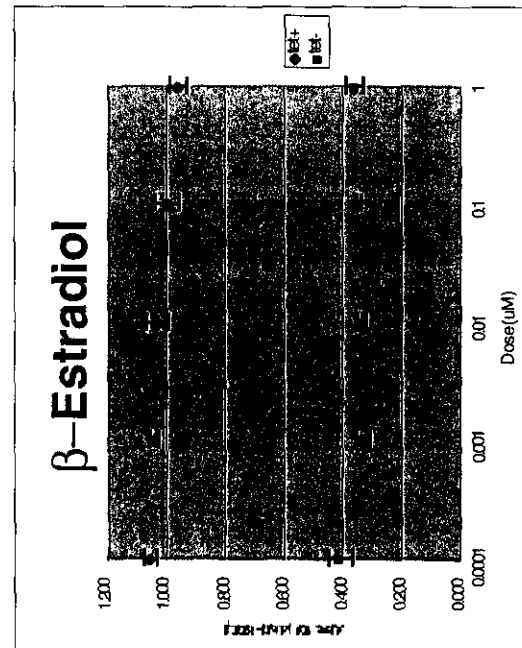
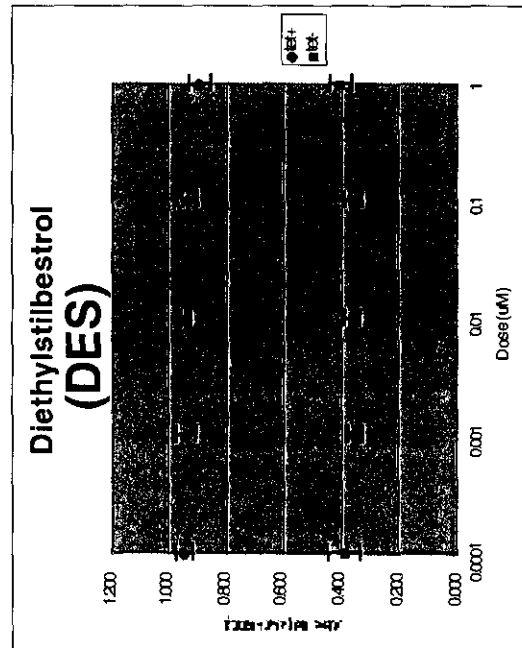
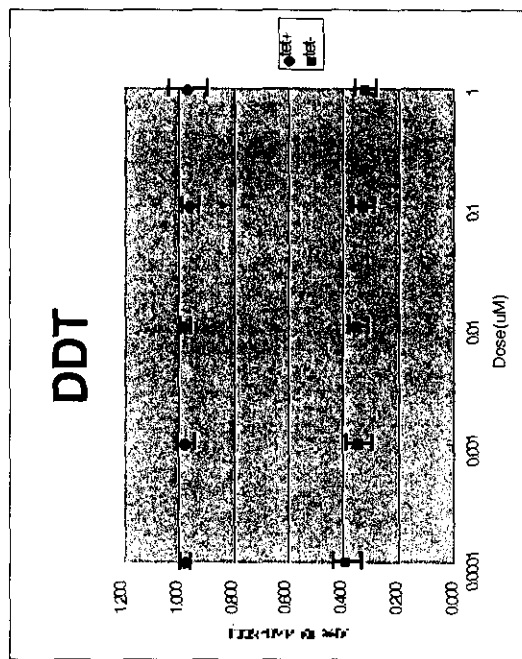
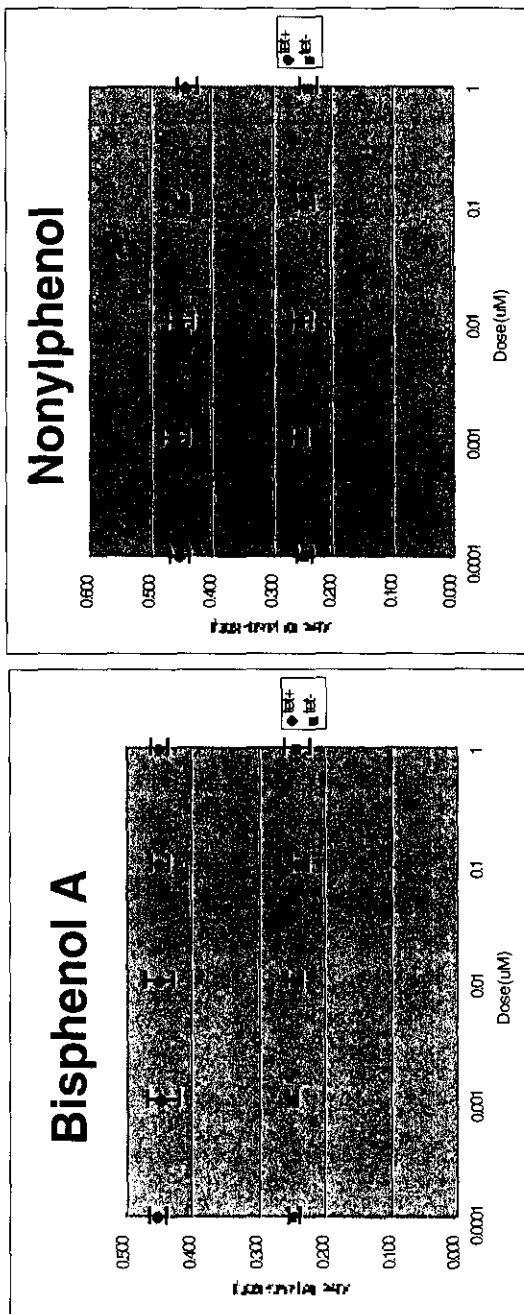
overview : 神経細胞死研究の過去・現
在・未来

第 73 回日本生化学会大会 平成 12 年 10
月 12 日 パシフィコ横浜 (横浜)

G. 知的所有権の取得状況

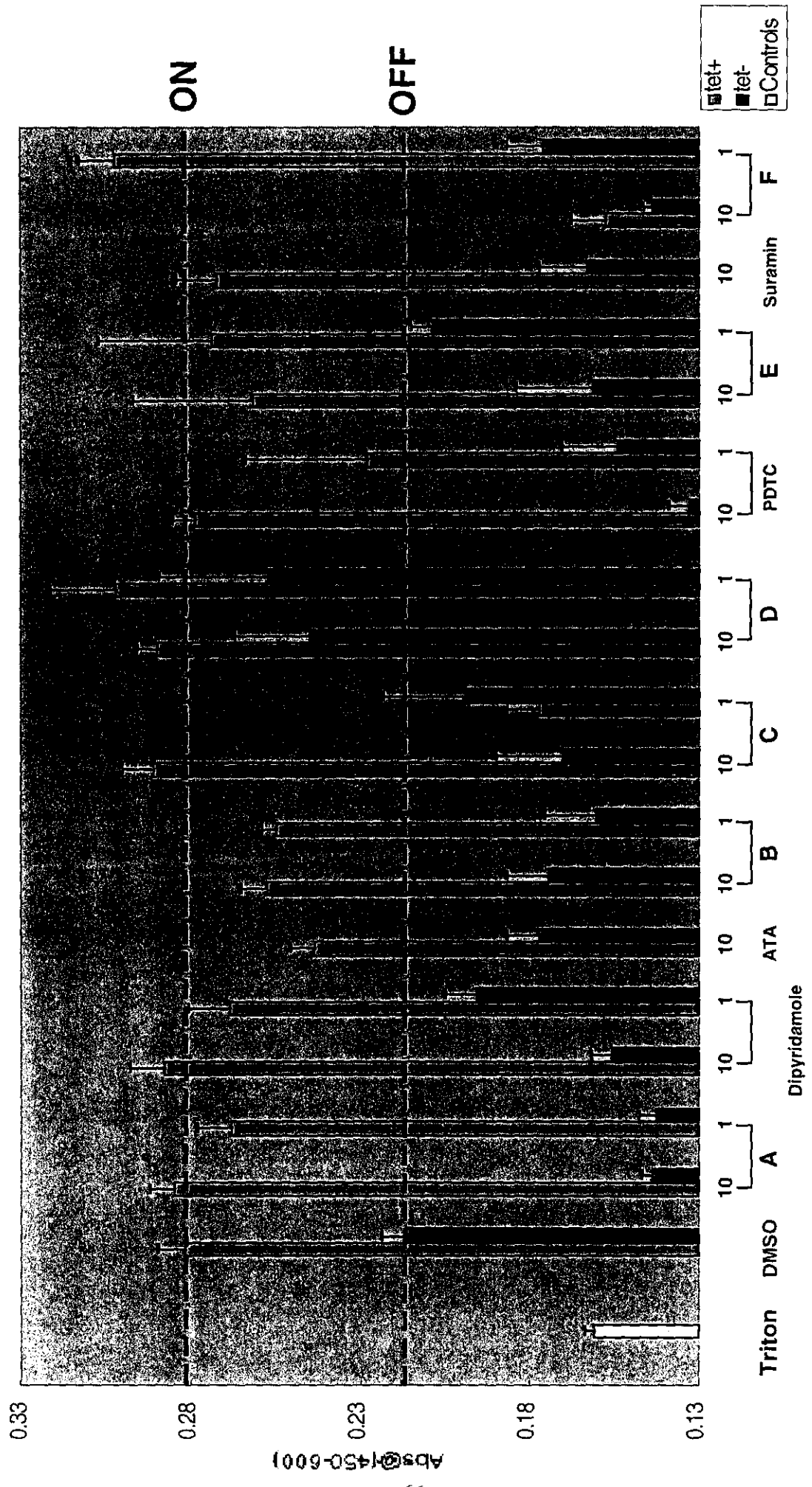


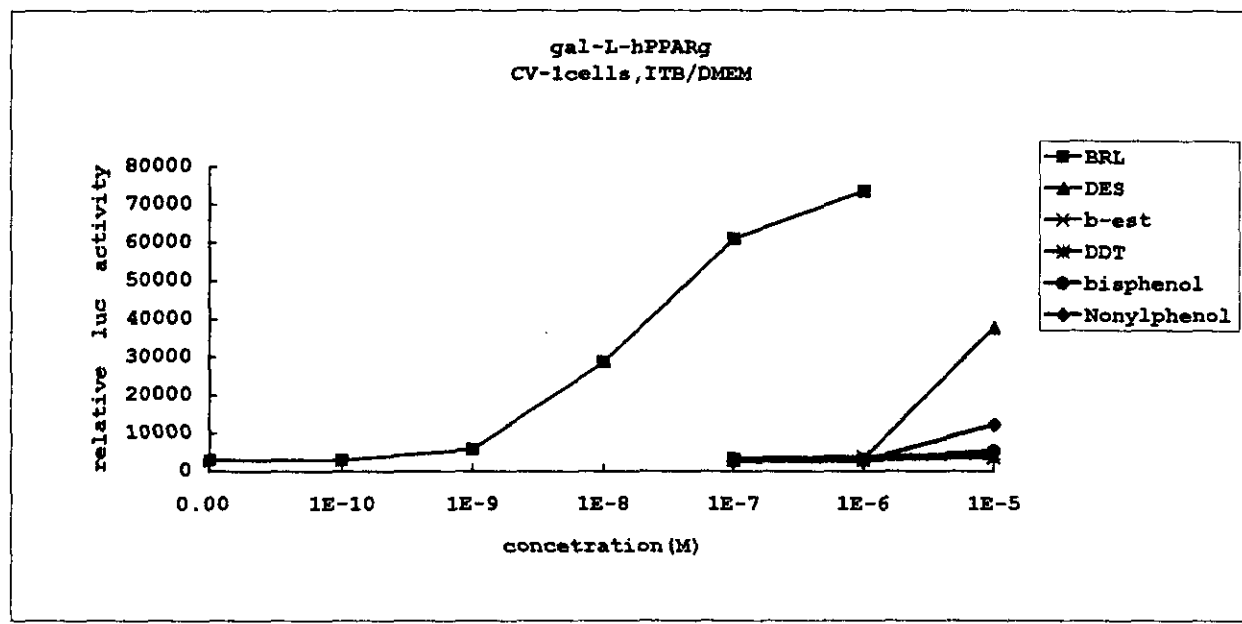
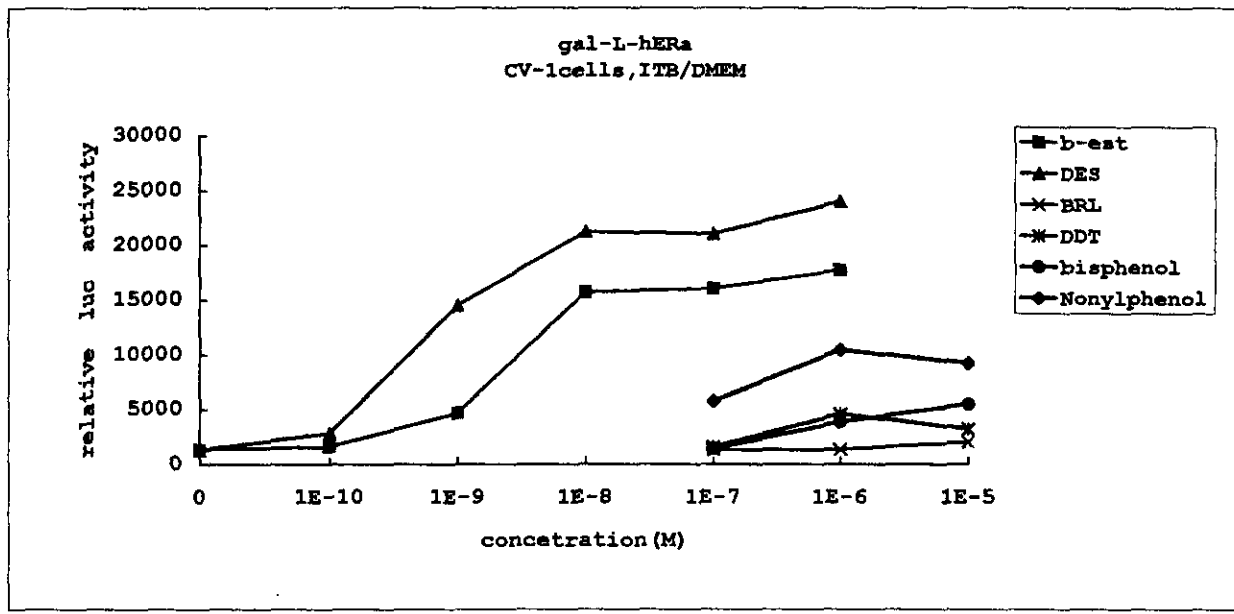
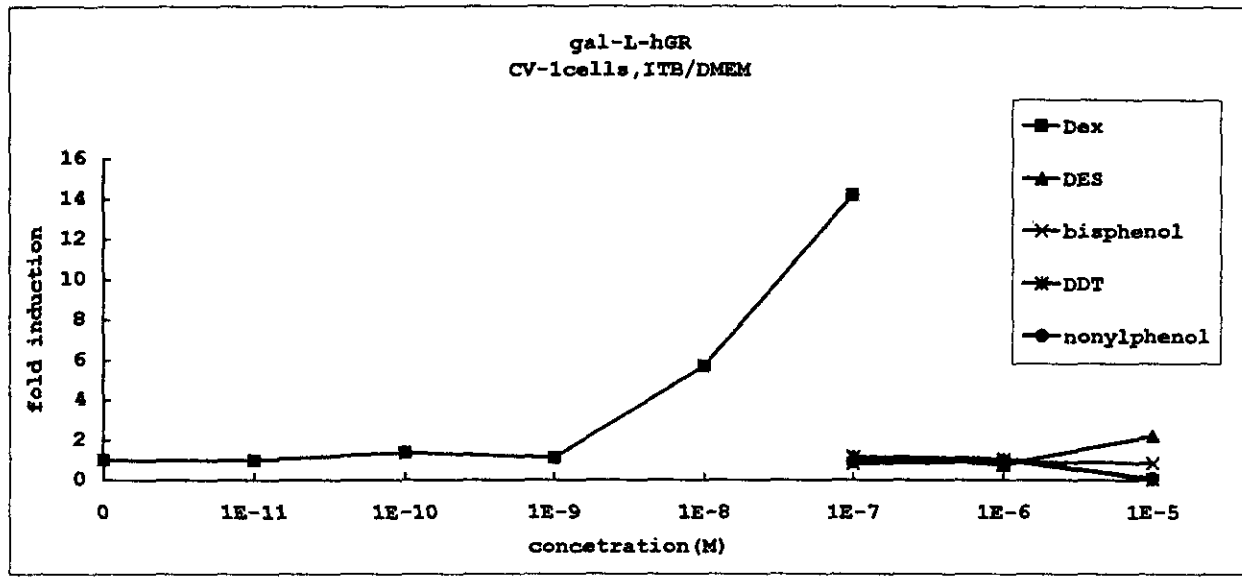
Effect of Representative Environmental Hormones on Polyglutamine-Induced Cell Death



2

Some Compounds (incl. Natural Ones) Enhanced Polyglutamine-Induced Cell Death

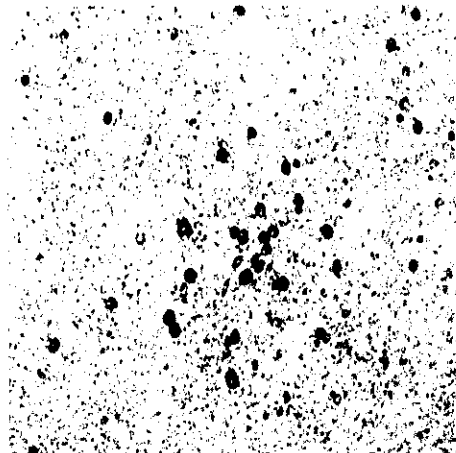




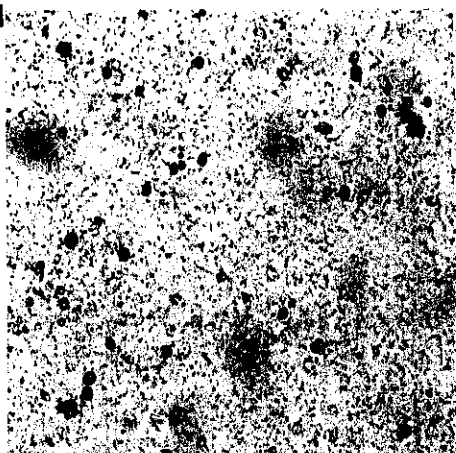
cont



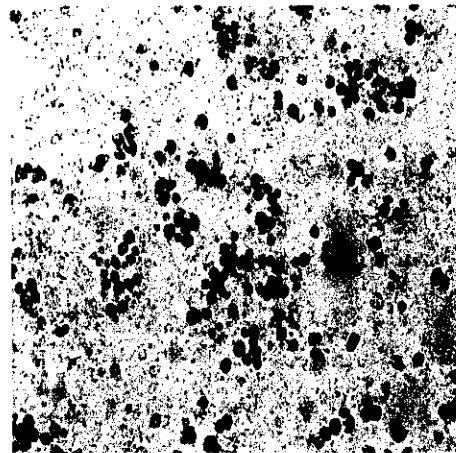
BRL 10nM



DES 20uM

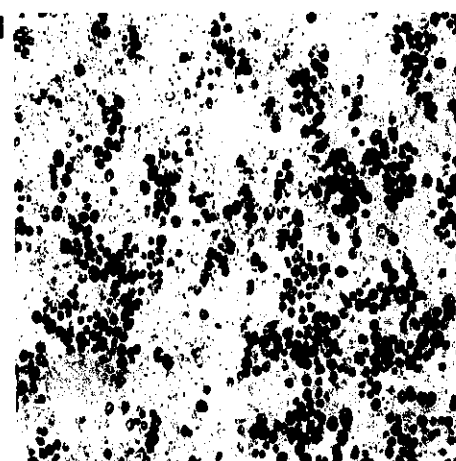


BRL 100nM



DES 50uM

BRL 1uM



6. 性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。性ステロイドホルモンは核内レセプターを介した標的遺伝子群の転写制御によりその作用を現す。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性レセプターの転写促進領域の同定、及びこれらレセプターの転写共役因子を同定する。

A. 研究目的

核内レセプターを有する脂溶性ホルモンは、各組織において特徴ある生理活性を示す。このような組織特異的な生理作用はレセプターの生体内局在のみでは説明できず、むしろレセプターの細胞種特異的な機能によると考えられるようになっている。このような組織特異性は、最近核内レセプターと相互作用する核内共役因子群が担うものと考えられている。従って、本研究では内分泌かく乱物質の標的分子としての転写共役因子の機能を探るものである。共役因子は、核内レセプターと基本転写因子群とを仲介し、転写制御に必須な構成因子と考えられているため、組織特異的なホルモン作用の理解にはこの共役因子の同定と性状解析は必須と考えられる。そこで本アプローチでは、特に組織特異的な作用が知られる

性ステロイドホルモン（エストロゲン：女性ホルモン、アンドロゲン：男性ホルモン）共役因子を中心に据える。

B. 研究方法及び結果

1. 核内性ステロイドホルモンレセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これに関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれらの転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター（ER α 、ER β ）をモデルとして、

ER 分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子 (SRC-1/ TIF2/ AIB1 、 p300/ CBP) と女性ホルモンレセプター (TRAP/ DRIP220) の相互作用を中心に調べた。その結果、p300/ CBP はN末端側転写促進能に関与することを明らかにし、またC末端側転写促進領域と橋渡しすることで、ER α 、ER β 転写促進に関与することを明らかにした (Kobayashi et al., JBC, 275, 15645- 15651, 2000)。

2. ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプターの機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサにアンドロゲンを加えると、GFP による蛍光が観察された。このハエのラインに、更に CBP 欠損変異体 (Nejire) のラインを掛け合わせたところ、蛍光は半減した。このことは、AR も ER α 、ER β 同様に

CBP/ p300 を必須な転写共役因子であることを証明するものであった。

3. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進する co-activator と転写を抑制する co-repressor の存在が知られている。しかしながらこれら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミンDレセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。その結果、ER のN末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する p68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。p68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの1種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

一方、160KDa の核内レセプター転写共役因子 (SRC-1/ TIF2/ AIB1) 群のC末端に位置する転写促進活性化領域

(AD2) に相互作用する因子を MCF7 細胞 cDNA ライブラリーから検索し、p72 を単離した。p72 は、p68 と極めて相同性の高い RNA ヘリケースで、p68 同様 ER α AF-1 に結合し、かつ p68 は、SRC-1/ TIF-2 の AD2 に結合した。また p68/ p72 は核内に局在しており、エストロゲン依存的に ER α 、TIF2 と核内に共存することがわかった。免疫沈降実験から、p68/ p72 は、エストロゲン結合 ER α 、TIF2 ととも共沈した。更に、最近同定された RNA 転写共役因子 SRA と直接結合すること、SRA と p68/ p72 は協調的に ER α の転写促進能を増強することを見出した。p68 は CBP/ p300 と相互作用することから、p68/ p72 は、CBP/ p300、SRC-1/ TIF2/ AIB1、SRA を含む転写共役因子複合体必須構成因子と考えている。

4. 新たな転写共役因子複合体同定の試み

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の 2 つの転写共役因子複合体に加え、第 3

の転写共役因子複合体が存在することを見出した。現在この複合体の構成成分を同定しているところである。

C. 考察及び結論

以上のアプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。

今後は、同定した転写共役因子群が核内レセプターを介した転写制御能において、内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

D. 研究発表

1. 発表論文 (原著)

1. Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR α mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, **407**, 633-636, 2000.
2. Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.: Androgen-insensitivity syndrome as a possible

- coactivator disease. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 856-862, 2000.
3. Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S.: Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33201-33204, 2000.
 4. Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G.: Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, 2000 (in press).
 5. Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N.: FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).
 6. Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, **150**, 873-879, 2000.
 8. Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S.: A nuclear matrix-associated factor,
 9. SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 228-236, 2000.
 10. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H.,
 11. Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, **5**, 593-601, 2000.

12. Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, **127**, 717-722, 2000.
13. Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M.,
14. Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G. Formation. *Development*, **127**, 2471-2479, 2000.
15. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D.,
16. Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 Mediates functional synergism between AF-1 and
17. AF-2 of estrogen receptor **a** and **b** by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645-15651, 2000.
18. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 889-899, 2000.
19. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, **141**, 1317-1324, 2000.
20. Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F.: Metabolism of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, **39**, 2123-2129, 2000.
21. Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 410-414, 2000.
22. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear

- receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 311-316, 2000.
23. Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T.: Identification of novel human *GH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1290-1295, 2000.

7. ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討に関する研究

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授

研究要旨 エストロジェン受容体(ER)を介した AP-1 の応答系について、昨年度に引き続き報告する。1) ヒト ER を介した AP-1 応答においては、ER α と β は拮抗的に働く。2) 今まで報告のないラット ER を介したエストロジェン依存性 AP-1 応答系を再構築した結果、ラット ER β ではヒト ER β と異なりエストロジェンによる転写活性化がみられた。3) この系で、エストロジェン様の内分泌かく乱物質の作用を検討したが、全て単純な弱いエストロジェン様物質として作用した。

A. 研究目的

子宮や乳管の発達、性周期の調節などのエストロジェン(女性ホルモン)の作用は、核内受容体の一つであるエストロジェン受容体を介することは周知の通りである。この受容体はリガンドが結合することでコンフォーメーション変化し、エストロジェン応答配列(ERE)と呼ばれる DNA の特定の配列を認識して結合できるようになり、その下流の遺伝子の転写を開始する。最近数年間の精力的な研究により、その際リクルートされるコファクターの存在とその役割が次々と明らかになってきた。しかし、エストロジェン受容体を介したホルモン応答の機構には、このトラディショナルなエストロジェン応答配列を介したものだけでなく、AP-1(c-fos/ c-jun 複合体)結合配列である AP-1 部位や Sp1 の結合する Sp1 部位を介した応答- ノントラディショナルな応

答- が知られてきた。これらは多くの遺伝子に偏在するプロモーターであるので、それらを介したエストロジェン応答は、広範な生理作用を惹起しうるはずであり、ホルモン依存性の細胞増殖などの生理作用はこの応答系の関与によりもたらされるものと考えられる。しかし、このノントラディショナルなエストロジェン応答については、その生理作用についても、その遺伝子転写活性化の機構についても詳細はよく知られていない。

我々は本研究班において、ヒト ER の発現ベクターを用いて、エストロジェン依存性 AP-1 応答系をモデル化し、エストロジェン及び内分泌かく乱物質の作用を検討してきた。ここでは、さらに hER β の hER α に対する作用を明らかにし、次にこの系でラットの ER を発現させたときの AP-1 応答について報告する。

B. 方法

試薬類

17 β エストラジオール、エストリオール、OH-タモキシフェン、ゲニスタイン、ジエネストロール、pp'ビフェノールは、Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A.から、クロロデコン、DDT およびその誘導体は、Aldrich, Milwaukee, WI, U.S.A.および Wato Chemicals, Osaka から購入し、エタノール溶液としてストックした。

細胞培養

NIH/3T3 細胞および MCF-7 細胞の培養はそれぞれペニシリン/ストレptomycin 含有の DEM (Sigma Chemicals)+5%CS (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.)および MEM 培地+5%FBS にて行った。アッセイ前にはそれぞれ DC 処理血清を含むフェノールレッド(-)の培地に交換した。

プラスミド

ラット rER α , β およびヒト hER α , β はいずれも pSG5 発現ベクターへ挿入した。AP-1 レポーターとして、合成オリゴ(Ap-1)₆を pGL3-SV40-luc へ挿入しもの作成した。(Ap-1)₆-luc を Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.より購入した。ERE レポーターは、(ERE)₃-SV40-luc を用い、内部標準に pRL-CMV (Promega, Madison, WI, U.S.A.)を使用した。

トランジェントトランスフェクション

細胞は、12 穴プレートに 5x10⁴ / well で播き、24 時間後に、TransFast transfection reagent (Promega) を用いて全量で 0.5 μ g の DNA をトランスフェクションした。薬剤処理 24 時間後に細胞を溶解し、Dual luciferase assay substrates (Promega)をそれぞれ加えた。発光測定は、Micro-beta scintillation counter (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)により行った。

C. 研究結果

1. hER α および hER β を介した AP-1 応答

NIH/3T3 細胞に pSG5-hER α または β と、(AP-1)₆-luc をトランジェントにコトランスフェクションすることで、エストロゲン依存性の AP-1 応答系を確立できた(昨年度研究結果)。そのエストロゲン、タモキシフェン、ICI 化合物に対する応答を、(ERE)₃-luc をコトランスフェクションしての系と比較すると、ERE 応答については、hER α と hER β の間に大きな差はなく、エストロゲンで応答が惹起され、タモキシフェン、ICI では応答が見られなかった。それに対し、AP-1 応答は、ER α を介するときにはE2、タモキシフェンで誘導されたが、hER β ではタモキシフェンでのみ応答がみられた(Fig.1A-D)。また、ER α を発現しているヒト乳ガン細胞株 MCF-7 に AP-1 レポーターを導入することによっても、ER α 型の応答が観察された(Fig.1E,F)。なお、

この細胞での ER α 、 β の mRNA 比を競合的 RT-PCR によって測定した結果、hER α が 2.2 ± 0.19 pg/ μ g 全 RNA に対し、 β が 0.028 ± 0.004 であり、量比はおおよそ 80:1 であった。

2. AP-1 のエストロゲン応答における hER β の抑制作用

NIH/3T3 において、hER α および β を割合を変えてトランスフェクションし、AP-1 応答を観察した。hER α を介するエストロゲンの AP-1 の応答は、hER β の比率が増すにつれて低下したが、タモキシフェンに対する AP-1 応答には影響しなかった。一方で、ERE の応答は、 α 型 β 型の比率に関わらず同程度であった。(Fig. 2)。また、もともと ER α を発現している MCF-7 細胞に、hER β 発現させた場合も、同様にトランスフェクションするベクター量が増加するに伴ない、AP-1 を介したエストロゲン応答は低下した (Fig. 3)。

3. ラット ER を介したエストロゲン依存性 AP-1 応答

上記の系において hER に代えて、ラットの ER 発現ベクター-pSG5-rER α 、 β を導入し、ERE 応答および AP-1 応答系を再構築した。ERE 応答においては、rER α と rER β の間に大きな差はなかった。つまり、エストロゲンで応答が活性化され、タモキシフェンは抑制的に作用した。一方の AP-1 応答においては、rER α を導入した細胞は、エストロゲンとタモキ

シフェンの両方が転写を促進 (アゴニスト作用) したが、rER β を導入した系においては、AP-1 応答はエストロゲンによって誘導され、タモキシフェンの作用はほとんど見られなかった (Fig. 4)。

4. 内分泌かく乱物質による rER 依存性 AP-1 の応答

今回再構築したラット ER による AP-1 の応答系により、rER α を介する場合と rER β を介する場合で、いくつかの内分泌かく乱物質の作用を比較検討した (Fig. 5)。結果、これらの内分泌かく乱物質による AP-1 部位特異的な転写活性化というものは見られなかった。

D. 考 察

本研究では、エストロゲン受容体を介したホルモン応答のうち AP-1(c-fos/ c-jun 複合体)結合配列である AP-1 部位を介した応答系を再構成し、内分泌かく乱物質の作用を検討することを試みてきた。AP-1 は多くの遺伝子に遍在するプロモーターであるので、それらを介したエストロゲン応答は、ホルモン依存性の細胞増殖などを含む広範な生理作用を惹起しうるはずであり、内分泌かく乱物質のエストロゲン様作用を理解する上で重要な応答経路であると考えられる。AP-1 を介するエストロゲン依存性応答は、既にコラゲナーゼのプロモーターを用いたレポーター系において報告があったが、我々は、単純な AP-1 モチーフのみをもつレポーターとヒト ER 発現ベクターによっても、エストロゲン依存性応答系を再構築できることを示した(昨年度成果)。AP-1 を介する系においては、hER α と hER β を介した応答が全く異なっていることが特徴であり、hER β を介した AP1 作用は、エストロゲンによっては惹起されず抗エストロゲン剤によって誘導される。今回我々は、hER β が実際に ER α によるエストロゲン作用を競合的に抑制しうることを示した。さらに、より現実的なモデルと考えられるヒト乳ガン細胞 MCF-7 においても、内在性に発現している ER α を介したエストロゲン依存性 AP-1 応答を見ることができると示したが、さらにその系においても、hER β を導入することによって

エストロゲンによる AP-1 作用をブロックすることができた。

ラット ER を介した応答をヒト ER の結果と比較するため、ラットの ER α 及び β を発現ベクターに組み込み ERE 応答系、AP-1 応答系を再構成した。その結果、ERE の応答は、ヒト ER と同様であり ER α と β の間に差はなかった。しかし、AP-1 を介する応答はヒト ER と大きく異なっており、rER β を介した AP-1 応答は、エストロゲンで誘導されタモキシフェンは作用しないというように、むしろ ERE 応答に近いことが示された。この現象は、さらに別のモデル系での検証が必要である。ER β の組織局在性はヒトと齧歯類ではかなり異なっていることが知られる。例えば、ラットでは前立腺や膀胱で ER β が高発現していることが知られるが、ヒトではこれらの臓器での発現は非常に低い。ERE を介した応答はラットでもヒトでも ER α と β で差がないことから、AP-1 を介した作用がこれらの種差における ER α 、 β 発現の大きな差に関係している可能性がある。

今回再構成したラットの ER を介する AP1 応答系で、内分泌かく乱物質の作用を検討した。ラットの β を介した AP-1 応答様式は、ヒト型とは違っていたものの、ここで検討した物質に関する限り、内分泌かく乱物質に特異的な応答は観察されなかった。一方、昨年度の報告に引き続いてヒト ER を介した AP-1 応答について、より広範な物質について検討してきたが、同様に AP-1 応答に特異的な作