

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元共焦点顕微鏡
による内分泌代謝攪乱物質のスクリーニングシステムの
開発に関する研究

(研究課題番号：H14-食品・化学-009)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 名和田 新

(九州大学大学院医学研究院・病態制御内科)

平成15年(2003)年 4月

目次

I. 総括研究報告1
アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元 共焦点顕微鏡による内分泌代謝攪乱物質の スクリーニングシステムの開発に関する研究 名和田 新	
II. 分担研究報告	
1.アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元 共焦点顕微鏡による内分泌代謝攪乱物質の スクリーニングシステムの開発に関する研究5
名和田 新	
2. 内分泌攪乱物質がエストロゲンレセプターの転写活性に 及ぼす影響に関する研究8
柳澤 純	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表10

平成14年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：アロマトーゼ高発現 KGN 細胞および三次元共焦点顕微鏡による
内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムの開発

主任研究者 名和田 新 九州大学大学院医学研究院病態制御内科教授
分担研究者 柳澤 純 筑波大学応用生物系食品化学

研究要旨

内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムとして (1) ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞株高いアロマトーゼ活性を指標とする系 (2) アンドロゲン受容体(AR)の転写活性化能は細胞核内での AR のクラスター形成と相関することを利用して抗アンドロゲン活性を担う物質をスクリーニングする系 (3) 内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの作用を攪乱することから、エストロゲンレセプター (ER α) 転写活性に及ぼす影響を検討する系を立ち上げ、それぞれの系においていくつかの内分泌攪乱物質を同定した。さらにその分子基盤となる AR, ER の転写制御機構の研究の一環としてそれぞれ新しい共役因子 ANT-1 または複合体 TFTC を同定した。また、ダイオキシンのエストロゲン様作用の分子機構を解明し、Butyl benzyl phthalate (BBP) の ER α 活性化作用を見出した。

A. 研究目的

ホルモン類似の作用を持つ天然および人工化学物質である内分泌攪乱物質は、生殖系への不可逆的な作用が懸念されているが、鋭敏なスクリーニングシステムは確立されていない。本研究では、我々が開発した独自のシステムを用いて内分泌攪乱物質の効率的スクリーニングシステムを確立することを目的とした。すなわち、(1)我々が最近確立したヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞株高いアロマトーゼ活性 (エストロゲン合成活性) を有することから、アロマトーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングした (名和田)。

(2) 我々はアンドロゲン受容体(AR)の標的遺伝子の転写活性は細胞核内での AR のクラスター形成が必須であることを三次元共焦において証明した。この系を用いて AR の転写活性を阻害する物質をスクリーニングする。以上のことを主目的とするが、同時に今後、内分泌攪乱物質の作用機構を解明する上で、アンドロゲン受容体の作用機構並びに aromatase 活性の調節機構の基礎的研究についても平行して行った (名和田)。(3) 内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの作用を攪乱することから、エストロゲンレセプター (ER α) の転写活性に対して何らかの影響を及ぼすことが考えられる。そこで、多くの内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討するとともに、核内レセプターの転写制御機構の分子基盤および内分泌攪乱物質の作

用機構の解明を目標に研究を行った (柳澤)。

B. 研究方法

(1) アロマトーゼ活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響：KGN 細胞は FSH 受容体を発現し、高いアロマトーゼ活性を保持する。既報 (Endocrinology142: 437-445, 2001) にしたがって培養し、種々の化学物質を添加後、アロマトーゼ活性は androstenedione を基質として、³H₂O 法により測定した。また、aromatase 遺伝子の転写活性は CYP19 の卵巣顆粒膜細胞特異的 promotor (promotor II) と luciferase 遺伝子を連結し、luciferase assay にて解析した (名和田)。(2) アンドロゲン受容体 (AR) の作用機構並びに AR 活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響：AR 転写活性は androgen 応答配列を含む MMTV(mouse mammalian tumor virus) promotor 上流と luciferase を連結した MMTV-luciferase construct を用いた luciferase assay にて解析した。また、GFP-AR を COS-7 細胞で発現させ、核で融合たんぱく質が発する蛍光の分布パターンを取得すると同時に、Hoechst 33342 でクロマチン構造を染色し、共焦点顕微鏡でその核内局在について観察した (名和田)。(3) 60 種類の内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼ・ア

ッセイによって検討した。また、HeLa細胞の核抽出液より、ER α にリガンド依存的に結合する蛋白質群を精製し、Massフィンガープリント法にて蛋白質を同定した（柳澤）。

（倫理面への配慮）

特にヒトや動物あるいは個人情報としての遺伝子を対象とした研究はなく、倫理的に問題はなかった。

C. 研究結果

（1）アロマトラーゼ活性におよぼす内分泌かく乱物質の作用：ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞を樹立し、60種類の化学物質をスクリーニングし、imposexの原因物質である有機スズ化合物が、転写段階でアロマトラーゼ活性を抑制することを示した。アロマトラーゼ活性を亢進させる化学物質として、新しくベノミルを同定した。（2）新たなステロイドホルモン受容体転写共役因子のクローニング：AR-AF-1 結合蛋白質 ANT-1 をクローニングし、pre-mRNA のスプライシングに関与する p102 U5snRNP-binding protein と同一であることを明らかにした。AR-AF-1 の強い恒常的転写活性化能は、AR の転写・翻訳カップリング複合体へのリクルートである可能性を提唱した。（2）内分泌かく乱物質の受容体/転写共役因子複合体への作用機序：蛍光蛋白質 GFP で標識した AR の、核内における空間的分布、クロマチン構造との関係を三次元的に再構成した共焦点レーザー顕微鏡画像により可視化した。すなわちこのシステムを用いて AF-1 と AF-2 のという二つの転写調節領域の相互作用により AR は転写活性化される。この際、AR が構成する核内の AR コンパートメントへは、p300/CBP 依存性に SRC-1、TIF-II などの転写共役因子がリクルートされること、さらに ER、グルココルチコイド受容体も同一のコンパートメントへ集積することなど、AR の作用機構に関する重要な知見を明らかにした。AR の転写活性は AR-AF-1 への結合蛋白質の欠損により完全型アンドロゲン抵抗症となった自験症例（Adachi: *New Engl J Med*343, 856, 2000）よりも明らかのように主に AF-1 が担う。我々はさらに AR の AF-1 に結合し、転写活性化を行なう新しい ANT-1 を見出したが、ANT-1 は異なるコンパートメント間のコミュニケーションを行っている

ことが予想された。（3）内分泌攪乱物質の AR への影響：抗アンドロゲン製剤のフルタミドは AR に結合し核移行するが標的遺伝子は活性化しない。我々は約 60 種類の科学物質の中からニトロフェン、ピンクロゾリン、pp'-DDE が、フルタミドと同様に AR のリガンド依存性の核内クラスター形成を阻害することを見出し、抗アンドロゲン作用を有する内分泌攪乱物質のスクリーニング方法を確立した。（4）primordial germ cell におよぼす内分泌かく乱物質の作用：生殖腺が形成される以前の胎仔マウスの全身に AR が発現しており、未分化胚細胞である ES 細胞においても AR が発現していた。抗アンドロゲン剤投与は、生殖腺原器へ遊走する primordial germ cell 数を減少させた。5. *in vivo* での抗アンドロゲン作用の検討：*in vitro* の細胞培養系では増殖抑制効果を示さない抗アンドロゲン剤が、*in vivo* では極めてユニークな遠隔転移抑制効果を発揮することを明らかにしつつある。（5）内分泌攪乱物質が ER α の転写活性に及ぼす影響：60種類の内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討した結果、多くの内分泌攪乱物質が ER α の転写活性を抑制または促進することが明らかとなった。（6）ER α の転写制御機構：HeLa 核抽出液より、エストロゲン依存的に ER α に結合する新規転写共役因子複合体 TF1C を精製し、この複合体が乳癌の増悪に関与することを示した。（7）内分泌攪乱物質の作用機構：ダイオキシンのレセプターである AhR/Arnt がリガンド未結合型 ER α に結合し、転写活性化因子をリクルートすることによって、ER α の転写活性を促進することを見出した。さらに、内分泌攪乱物質の一つである BBP が ER α に結合し、AF-1 活性を促進することによって乳癌の増悪を引き起こすことを明らかにした。

D. 考察

ベノミルのアロマトラーゼ活性抑制機序として cAMP-PKA および PKC 系以外のシグナル伝達経路の関与を明らかにしつつある。また、共焦点顕微鏡画像を用いたスクリーニングシステムは抗アンドロゲン作用を有する化学物質のスクリーニングに極めて有用であるとともに、核内コンパートメントと核内受容体という新たな研究領域を開拓した。今後、内分泌攪乱物質のスクリーニング検体をさ

らに増やし、検討する予定である。

未分化胚細胞から始原生殖細胞への分化にARが関与していることが考えられ、内分泌かく乱物質は始原生殖細胞の増殖、移動にとどまらず、その分化自身にも影響を及ぼす可能性が示された。我々は *in situ hybridization* 法にてこの時期におけるARの発現を初めて明らかにしており未発表)、ARは期の胎児発生に根幹的役割を担っていることを示唆する。

従来、抗アンドロゲン作用の *in vivo* での効果判定は主に生殖腺重量測定で行われてきた。我々は前立腺癌の転移モデルマウス系の作成に成功しつつある。このユニークな転移モデル系では精巣摘出および移植後の *flutamide* 投与はこの遠隔転移を完全に抑制したことから、*in vivo* における抗アンドロゲン作用物質の有力なスクリーニングシステムと成りうる。本システムを用いて、抗アンドロゲン性内分泌攪乱物質の *in vivo* における大規模なスクリーニングを施行する予定である。

代表的内分泌攪乱物質であるダイオキシンは、エストロゲン様作用を示すことが従来より知られているが、その分子メカニズムに関しては不明であった。本研究者は、ダイオキシンのレセプターである AhR/Arnt がリガンド未結合型 ER α に結合し、転写活性化因子をリクルートすることによって、ER α の転写活性を促進することを見出した(Nature in press)。これらの結果は AhR/Arnt による内分泌攪乱の分子メカニズムを説明するものである。さらに、内分泌攪乱物質の一つである BBP が ER α に結合し、AF-1 活性を促進することによって乳癌の増悪を引き起こすことを明らかにした。この結果は乳癌に対する内分泌攪乱の作用を分子レベルではじめて明確にしたものであり、内分泌攪乱物質の危険性を再認識させるものである(J. Biol. Chem. revision)。内分泌攪乱物質が示すさまざまな作用は、それらの物質の結合によって誘導される ER α の構造変化の違いと、その結果生じる転写共役因子のリクルートの違いに起因するものと考えられる。同じように ER α に結合する内分泌攪乱物質でも、どのような転写共役因子を ER α にリクルートするかを *in vitro* で検討することによって、生体内での影響を予測することが可能となる。ER α の転写活性制御機構を分子レベルで詳細に知るために、新たな転写共役因子の探索と解析を行う。

さらに、リクルートする転写共役因子を指標にし、内分泌攪乱物質を分類するとともに生体への作用を予測する予定である。

E. 結論

内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムとして (1) ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞株高いアロマターゼ活性を指標とする系 (2) アンドロゲン受容体 (AR) の転写活性化能は細胞核内での AR のクラスター形成と相関することを利用して抗アンドロゲン活性を担う物質をスクリーニングする系 (3) 内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの作用を攪乱することから、エストロゲンレセプター (ER α) ER α の転写活性に及ぼす影響を検討する系を立ち上げ、それぞれ、いくつかの内分泌攪乱物質を同定した。さらにその分子基盤となる AR, ER の転写制御機構の研究の一環としてそれぞれ新しい共役因子 ANT-1 または複合体 TF1C を同定した。また、ダイオキシンのエストロゲン様作用の分子機構を解明し、BBP の ER α 活性化作用を見い出した。

F. 研究発表 (論文発表)

(1) Saito M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H: The presence of the amino- and carboxy-terminal domains in androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: A three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16: 694-706, 2002 (2) Zhao Y, Goto K, Saitoh M, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H: Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment; Identification of the p102 U5 snRNP binding protein as a coactivator for the receptor *J Biol Chem* 277 : :30031-9, 2002 (3) Nawata H, Goto K, Morinaga H, Yanase T, Yanagisawa J, Kato S, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R:

Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences* 9: 57-70, 2002 (4) Yanase T, Mu Yi-M, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H: Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Molec* 79 : 187-192, 2002 (5) Mukasa C, Nomura M, Tanaka T, Tanaka K, Nishi Y, Okabe T, Goto K, Yanase T, Nawata H: Activin signaling through type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like KGN cells. *Endocrinology in press* 2003 (6) Fumiaki Ohtake, Ken-ichi Takeyama, Takahiro Matsumoto, Hirochika Kitagawa, Yasuji Yamamoto, Keiko Nohara, Chiharu Tohyama, Andree Krust, Junsei Mimura, Pierre Chambon, Junn Yanagisawa, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Shigeaki Kato: Modulation of estrogen receptor signaling by an association with the activated dioxin receptor *Nature*, In press (7) Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Suppressive cytokine actions in adipogenesis and PPAR gamma function through the TAK1/TAB1-NIK cascade. *Nature Cell Biol.* In press (8) Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., Yanagisawa, J., Kato, S., Meisterernst, M., Tora, L. TATA-binding Protein-free TAF-containing Complex (TFTC) and p300 Are Both Required for Efficient Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* 277(36), 32875-32882 (2002). (9) Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., McMahon, S. B., Cole, M. D., Tora L., Takahashi, N., Nagasawa, H., Kato, S.: Nuclear Receptor Function Requires a TFTC-Type Histone Acetyl Transferase Complex. *Mol. Cell* 9(3), 553-62 (2002). (10) Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato,

S.: Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol. Cell Biol.* 22(11), 3698-706 (2002).

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |

平成14年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：アロマトラーゼ高発現 KGN 細胞および三次元共焦点顕微鏡による
内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムの開発

主任研究者 名和田 新 九州大学大学院医学研究院病態制御内科教授

研究要旨

内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムとして (1) ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞株高いアロマトラーゼ活性を指標とする系 (2) アンドロゲン受容体(AR)の転写活性化能は細胞核内での AR のクラスター形成と相関することを利用して抗アンドロゲン活性を担う物質をスクリーニングする系を検討する系を立ち上げ、それぞれ、いくつかの内分泌攪乱物質を同定した。さらにその分子基盤となる AR の転写制御機構の研究に関連して ANT-1 という新規の共役因子を同定した。また、抗アンドロゲン作用をもつ内分泌攪乱物質の新しいスクリーニングとして、前立腺癌転移モデルマウスを作成した。

A. 研究目的

ホルモン類似の作用を持つ天然および人工化学物質である内分泌攪乱物質は、生殖系への不可逆的な作用が懸念されているが、鋭敏なスクリーニングシステムは確立されていない。本研究では、我々が開発した独自のシステムを用いて内分泌攪乱物質の効率的スクリーニングシステムを確立することを目的とした。すなわち、(1)我々が最近確立したヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞株高いアロマトラーゼ活性（エストロゲン合成活性）を有することから、アロマトラーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングした。(2)我々はアンドロゲン受容体(AR)の標的遺伝子の転写活性は細胞核内での AR のクラスター形成が必須であることを三次元共焦点顕微鏡において証明した。この系を用いて AR の転写活性を阻害する物質をスクリーニングする。以上のことを主目的とするが、同時に今後、内分泌攪乱物質の作用機構を解明する上で、アンドロゲン受容体の作用機構並びに aromatase 活性の調節機構の基礎的研究についても平行して行った。

B. 研究方法

(1) アロマトラーゼ活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響：KGN 細胞は FSH 受容体を発現し、高いアロマトラーゼ活性を保持する。既報（Endocrinology142: 437-445, 2001）にしたがって培養し、種々の化学物質を添加後、アロマトラーゼ活性は androstenedione を基質として、³H₂O 法により測定した。また、aromatase 遺伝子の転写活性は CYP19

の卵巣顆粒膜細胞特異的 promotor

(promotor II) と luciferase 遺伝子を連結し、luciferase assay にて解析した。

(2) アンドロゲン受容体(AR)の作用機構並びに AR 活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響：AR 転写活性は androgen 応答配列を含む MMTV(mouse mammalian tumor virus) promotor 上流と luciferase を連結した MMTV-luciferase construct を用いた luciferase assay にて解析した。また、GFP-AR を COS-7 細胞で発現させ、核で融合たんぱく質が発する蛍光の分布パターンを取得すると同時に、Hoechst 33342 でクロマチン構造を染色し、共焦点顕微鏡でその核内局在について観察した。

(倫理面への配慮)

特にヒトや動物あるいは個人情報としての遺伝子を対象とした研究はなく、倫理的に問題はなかった。

C. 研究結果

(1) アロマトラーゼ活性におよぼす内分泌かく乱物質の作用：ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞を樹立し、60 種類の化学物質をスクリーニングし、imposex の原因物質である有機スズ化合物が、転写段階でアロマトラーゼ活性を抑制することを示した。アロマトラーゼ活性を亢進させる化学物質として、新しくベノミルを同定した。(2) 新たなステロイドホルモン受容体転写共役因子のクローニング：AR-AF-1 結合蛋白質 ANT-1 をクローニングし、pre-mRNA のスプライシングに参与する p102 U5snRNP-binding

protein と同一であることを明らかにした。AR-AF-1 の強い恒常的転写活性化能は、AR の転写・翻訳カップリング複合体へのリクルートである可能性を提唱した。(2) 内分泌かく乱物質の受容体/転写共役因子複合体への作用機序：蛍光蛋白質 GFP で標識した AR の、核内における空間的分布、クロマチン構造との関係を三次元的に再構成した共焦点レーザー顕微鏡画像により可視化した。すなわちこのシステムを用いて AF-1 と AF-2 のという二つの転写調節領域の相互作用により AR は転写活性化されること、その際、AR が構成する核内の AR コンパートメントへは、p300/CBP 依存性に SRC-1、TIF-II などの転写共役因子がリクルートされること、さらに ER、グルココルチコイド受容体も同一のコンパートメントへ集積することなど、AR の作用機構に関する重要な知見を明らかにした。AR の転写活性は AR-AF-1 への結合蛋白質の欠損により完全型アンドロゲン抵抗症となった自験症例 (New Engl J Med 343, 856, 2000) よりも明らかなように主に AF-1 が担う。我々はさらに AR の AF-1 に結合し、転写活性化を行なう新しい ANT-1 を見い出したが、ANT-1 は異なるコンパートメント間のコミュニケーションを行っていることが予想された。(3) 内分泌攪乱物質の AR への影響：抗アンドロゲン製剤のフルタミドは AR に結合し核移行するが標的遺伝子は活性化しない。我々は約 60 種類の科学物質の中からニトロフェン、ピンクロゾリン、pp'-DDE が、フルタミドと同様に AR のリガンド依存性の核内クラスター形成を阻害することを見い出し、抗アンドロゲン作用を有する内分泌攪乱物質のスクリーニング方法を確立した。(4) primordial germ cell におよぼす内分泌かく乱物質の作用：生殖腺が形成される以前の胎仔マウスの全身に AR が発現しており、未分化胚細胞である ES 細胞においても AR が発現していた。抗アンドロゲン剤投与は、生殖腺原器へ遊走する primordial germ cell 数を減少させた。5. in vivo での抗アンドロゲン作用の検討：in vitro の細胞培養系では増殖抑制効果を示さない抗アンドロゲン剤が、in vivo では極めてユニークな遠隔転移抑制効果を発揮することを明らかにしつつある。

D. 考察

ベノミルのアロマトラーゼ活性抑制機序として cAMP-PKA および PKC 系以外のシグナル伝達経路の関与を明らかにしつつある。また、共焦点顕微鏡画像を用いたスクリーニングシステムは抗アンドロゲン作用を有する化学物質のスクリーニングに極めて有用であるとともに、核内コンパートメントと核内受容体という新たな研究領域を開拓した。今後、内分泌攪乱物質のスクリーニング検体をさらに増やし、検討する予定である。

未分化胚細胞から始原生殖細胞への分化に AR が関与していることが考えられ、内分泌かく乱物質は始原生殖細胞の増殖、移動にとどまらず、その分化自身にも影響を及ぼす可能性が示された。我々は in situ hybridization 法にてこの時期における AR の発現を初めて明らかにしており未発表)、AR は期の胎児発生に根幹的役割を担っていることを示唆する。

従来、抗アンドロゲン作用の in vivo での効果判定は主に生殖腺重量測定で行われてきた。我々は前立腺癌の転移モデルマウス系の作成に成功しつつある。このユニークな te 転移モデル系では精巣摘出および移植後の flutamide 投与はこの遠隔転移を完全に抑制したことから、in vivo における抗アンドロゲン作用物質の有力なスクリーニングシステムと成りうる。本システムを用いて、抗アンドロゲン性内分泌攪乱物質の in vivo における大規模なスクリーニングを施行する予定である。

E. 結論

内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムとして (1) ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞株高いアロマトラーゼ活性を指標とする系 (2) アンドロゲン受容体 (AR) の転写活性化能は細胞核内での AR のクラスター形成と相関することを利用して抗アンドロゲン活性を担う物質をスクリーニングする系それぞれ、いくつかの内分泌攪乱物質を同定した。さらにその分子基盤となる AR の転写制御機構の研究の一環としてそれぞれ新しい共役因子 ANT-1 を同定し、核内コンパートメントとしてのその機能を解明した。

F. 研究発表 (論文発表)

(1) Saito M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H: The presence of the

amino- and carboxy-terminal domains in androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors : A three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16: 694-706, 2002 (2) Zhao Y, Goto K, Saitoh M, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H: Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment; Identification of the p102 U5 snRNP binding protein as a coactivator for the receptor *J Biol Chem* 277 : :30031-9, 2002 (3) Nawata H, Goto K, Morinaga H, Yanase T, Yanagisawa J, Kato S, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences* 9: 57-70, 2002 (4) Yanase T, Mu Yi-M, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H: Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Molec* 79 : 187-192, 2002 (5) Mukasa C, Nomura M, Tanaka T, Tanaka K, Nishi Y, Okabe T, Goto K, Yanase T, Nawata H: Activin signaling through type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like KGN cells. *Endocrinology* in press 2003

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

平成14年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：内分泌攪乱物質がエストロゲンレセプターの転写活性に及ぼす影響

分担研究者 柳澤 純 筑波大学応用生物系食品化学

研究要旨

内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムとして（3）内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの作用を攪乱することから、エストロゲンレセプター（ER α ）の転写活性に及ぼす影響を検討し、その転写を促進あるいは抑制する多くの内分泌攪乱物質を同定した。さらにその分子基盤となる AR, ER の転写制御機構の研究の一環として新しい共役因子複合体 TFTC を同定した。また、ダイオキシンのエストロゲン様作用の分子機構を解明し、Butyl benzyl phthalate (BBP) の ER α 活性化作用を見出した。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの作用を攪乱することから、エストロゲンレセプター（ER α ）の転写活性に対して何らかの影響を及ぼすことが考えられる。そこで、多くの内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討するとともに、核内レセプターの転写制御機構の分子基盤および内分泌攪乱物質の作用機構の解明を目標に研究を行った。

B. 研究方法

60種類の内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼ・アッセイによって検討した。また、HeLa 細胞の核抽出液より、ER α にリガンド依存的に結合する蛋白質群を精製し、Mass フィンガープリント法にて蛋白質を同定した（柳沢）。

（倫理面への配慮）

特にヒトや動物あるいは個人情報としての遺伝子を対象とした研究はなく、倫理的に問題はなかった。

C. 研究結果

（1）内分泌攪乱物質が ER α の転写活性に及ぼす影響：60種類の内分泌攪乱物質について、ER α の転写活性に及ぼす影響を検討した結果、多くの内分泌攪乱物質が ER α の転写活性を抑制または促進することが明らかとなった。（6）ER α の転写制御機構：HeLa 核抽出液より、エストロゲン依存的に ER α に結合する新規転写共役因子複合体 TFTC を精製し、この複合体が乳癌の増悪に関与すること

を示した。（2）内分泌攪乱物質の作用機構：ダイオキシンのレセプターである AhR/Arnt がリガンド未結合型 ER α に結合し、転写活性化因子をリクルートすることによって、ER α の転写活性を促進することを見出した。さらに、内分泌攪乱物質の一つである BBP が ER α に結合し、AF-1 活性を促進することによって乳癌の増悪を引き起こすことを明らかにした。

D. 考察

代表的内分泌攪乱物質であるダイオキシンは、エストロゲン様作用を示すことが従来より知られているが、その分子メカニズムに関しては不明であった。本研究者は、ダイオキシンのレセプターである AhR/Arnt がリガンド未結合型 ER α に結合し、転写活性化因子をリクルートすることによって、ER α の転写活性を促進することを見出した(Nature in press)。これらの結果は AhR/Arnt による内分泌攪乱の分子メカニズムを説明するものである。さらに、内分泌攪乱物質の一つである BBP が ER α に結合し、AF-1 活性を促進することによって乳癌の増悪を引き起こすことを明らかにした。この結果は乳癌に対する内分泌攪乱の作用を分子レベルではじめて明確にしたものであり、内分泌攪乱物質の危険性を再認識させるものである (J. Biol. Chem. revision)。内分泌攪乱物質が示すさまざまな作用は、それらの物質の結合によって誘導される ER α の構造変化の違いと、その結果生じる転写共役因子のリクルートの違いに起因するものと考えられる。同じように ER α に結合する内分泌攪乱

物質でも、どのような転写共役因子を ER α にリクルートするかを in vitro で検討することによって、生体内での影響を予測することが可能となる。ER α の転写活性制御機構を分子レベルで詳細に知るために、新たな転写共役因子の探索と解析を行う。さらに、リクルートする転写共役因子を指標にし、内分泌攪乱物質を分類するとともに生体への作用を予測する予定である。

E. 結論

内分泌攪乱物質の多くは、エストロゲンの作用を攪乱することから、内分泌攪乱物質のスクリーニングシステムとしてエストロゲンレセプター (ER α) の転写活性に及ぼす影響を検討する系を立ち上げ、多くの内分泌攪乱物質を同定した。さらにその分子基盤となる ER の転写制御機構の研究の一環としてそれぞれ新しい共役因子複合体 TF α を同定した。また、ダイオキシンのエストロゲン様作用の分子機構を解明し、BBP の ER α 活性化作用を見い出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fumiaki Ohtake, Ken-ichi Takeyama, Takahiro Matsumoto, Hirochika Kitagawa, Yasuji Yamamoto, Keiko Nohara, Chiharu Tohyama, Andree Krust, Junsei Mimura, Pierre Chambon, Junn Yanagisawa, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Shigeaki Kato: Modulation of estrogen receptor signaling by an association with the activated dioxin receptor Nature, In press
- (2) Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Suppressive cytokine actions in adipogenesis and PPAR gamma function through the TAK1/TAB1-NIK cascade. Nature Cell Biol. In press (3) Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., Yanagisawa, J., Kato, S., Meisterernst, M., Tora, L. TATA-binding Protein-free TAF-containing Complex (TF α) and p300 Are Both Required for Efficient Transcriptional Activation. J. Biol. Chem. 277(36), 32875-32882

- (2002). (3) Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., McMahon, S. B., Cole, M. D., Tora L., Takahashi, N., Nagasawa, H., Kato, S.: Nuclear Receptor Function Requires a TF α -Type Histone Acetyl Transferase Complex. Mol. Cell 9(3), 553-62 (2002).
- (4) Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato, S.: Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. Mol. Cell Biol. 22(11), 3698-706 (2002).

2. 学会発表

- (1) 骨と核内レセプター: 柳澤 純、加藤茂明 第75回日本内分泌学会学術総会シンポジウム (大阪) 2002年6月
- (2) 新たな核内ステロイドホルモンレセプター転写共役因子複合体の機能: 柳澤純、北川浩史、加藤茂明 第3回ホルモンと癌研究会 (仙台) 2002年8月2日-3日
- (3) Regulation of estrogen receptor mediated transactivation Junn Yanagisawa, Shigeaki Kato International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer 11th International Congress on Hormonal Steroids (IHS)/7th International Congress on Hormones and Cancer (IHC), (Fukuoka) October 21-25, 2002

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究者名 名和田 新

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Saito M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H	The presence of the amino- and carboxy-terminal domains in androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors : A three-dimensional imaging study.	Mol Endocrinol 16: 694-706,	2002
Zhao Y, Goto K, Saitoh M, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H	Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment; Identification of the p102 U5 snRNP binding protein as a coactivator for the receptor	J Biol Chem 277 : :30031-9,	2002
Nawata H, Goto K, Morinaga H, Yanase T, Yanagisawa J, Kato S, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R	Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals.	Enviromental Sciences 9: 57-70,	2002
Mukasa C, Nomura M, Tanaka T, Tanaka K, Nishi Y, Okabe T, Goto K, Yanase T, Nawata H	Activin signaling through type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like KGN cells.	Endocrinology 144 : 1603-1611	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

研究者名 柳澤 純

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Fumiaki Ohtake, Ken-ichi Takeyama, Takahiro Matsumoto, Hirochika Kitagawa, Yasuji Yamamoto, Keiko Nohara, Chiharu Tohyama, Andree Krust, Junsei Mimura, Pierre Chambon, <u>Junn</u> <u>Yanagisawa,</u> Yoshiaki Fujii- Kuriyama, and Shigeaki Kato	Modulation of estrogen receptor signaling by an association with the activated dioxin receptor	Nature 印刷中	2003
Suzawa, M., Takada, I., <u>Yanagisawa,</u> J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matumoto, K., Kato, S	Suppressive cytokine actions in adipogenesis and PPAR gamma function through the TAK1/TAB1-NIK cascade.	Nature Cell Biol 印刷中	2003
) Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., <u>Yanagisawa,</u> J., Kato, S., Meisterernst, M., Tora, L.	TATA-binding Protein-free TAF-containing Complex (TFTC) and p300 Are Both Required for Efficient Transcriptional Activation.	J. Biol. Chem. 277(36), 32875-32882	2002

研究成果の刊行に関する一覧表

研究者名 柳澤 純

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M.Oishi, H., Yamamoto, Y., McMahon, S. B., Cole, M. D., Tora L., Takahashi, N., Nagasawa, H., Kato, S	Nuclear Receptor Function Requires a TFIIIC-Type Histone Acetyl Transferase Complex.	Mol. Cell 9(3), 553-62	2002
Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato, S	Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function (AF-1) by a CBP-containing HAT complex.	Mol. Cell Biol. 22(11), 3698- 706	2002