

質が、Jurkat 細胞において、細胞内のタンパク質のチロシンリン酸化をおこすことが明らかになった。

年会, 千葉. 2002;要旨集 3;177.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Han BJ., Fukamachi K., Takasuka N., Ohnishi T., Maeda M., Yamazaki T., and Tsuda H. Inhibitory effects of 17  $\beta$ -estradiol and 4-n-octylphenol on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats, *Carcinogenesis*. 2002, 23(7) : 1209-1215.

### 2. 学会発表

Yamazaki T., and Ezaki O. Effect of endocrine disruptors on lymphocyte responses, *DIOXIN 2002*, Barcelona, 2002.

川口研、井之上浩一、吉村吉博、中澤裕之、山崎聖美. 食品用器具・容器包装に用いられるプラスチック可塑剤の E-SCREEN Assay による評価. 日本食品化学学会第 8 回総会・学術大会, 東京. 2002;要旨集 31.

川口研、山崎聖美、中澤裕之. 生活関連化学物質とその代謝物の E-SCREEN Assay による評価. 日本薬学会第 122



## ERR を介する転写を活性化する PGC-1 類似蛋白質 ERRL1

我々は、EST データベースに PGC-1 類似蛋白質が存在することに気が付いており、その蛋白質の全長 cDNA をすでに単利していた。そこで、この PGC-1 類似蛋白質も PGC-1 同様、pan 核内受容体性リガンドとして働き得るかを検討した。予想に反して、PGC-1 とは異なりこの分子は、ERR(estrogen receptor-related receptor)を選択的に活性化することが判明したので、この分子を ERRL1 (ERR Ligand 1) と呼ぶことにした(図 2)。ERR はリガンドが判明していない孤児受容体の一つではあるが、MCAD(medium chain acyl CoA dehydrogenase)を標的遺伝子として活性化することが報告されている。MCAD は、脂肪酸のβ酸化を担う重要な酵素で、MCAD の亢進により、脂肪の燃焼の亢進、すなわち、痩せることが考えられていたが、ERR の活性化法や MCAD 遺伝子の発現調節機構が不明であったため、この考えは検証されていなかった。

## ERRL1 トランスジェニックマウスは「痩せの大食い」

この考えを検証するために、マウスの生体内で ERRL1 を恒常的に発現させるトランスジェニックマウスを作成した。予想どおり、このマウスでは、筋肉等で MCAD の発現上昇を示し、痩せていた。この痩せは、特に高脂肪食を与えた時に顕著に現れた(図 3)。

この時、野生型マウスは糖尿病様の症状を示したが、ERRL1 マウスは食物摂取量が野生型マウスに比して優位に上昇しているにもかかわらず、肥満を呈さず、しかも血中の糖やインスリンの値も正常値を示した。さらに、遺伝的に肥満を示す KK<sup>ay</sup> マウスと ERRL1 マウスを掛け合わせる実験を行った。その結果、たとえ KK<sup>ay</sup> の肥満遺伝子を受け継いでも、ERRL1 の発現で肥満を防げることが判明した(図 4)。

## 抗肥満、抗糖尿病を防ぐ新規薬剤開発の可能性

上記の結果は、食事制限をせずに、肥満・糖尿病を防ぐ効果をもたらす薬物をこの ERRL1 マウスと同じ状態を作りだすことを指標に開発し得ることを示している。すなわち、1) ERRL1 の発現量を増加させる薬剤、2) ERR のリガンドとして転写を活性化する薬剤、3) ERRL1 と ERR の結合を促進して ERR の転写を活性化させる薬剤等を想定することができる。

## E. 結論

孤児受容体の一つ ERR は、PGC-1 類似の蛋白質性リガンド ERRL1 により、活性化を受けることが明らかになった。ERRL1 のトランスジェニックマウスは、痩せの大食いであり、この表現型は、ERR のターゲットの一つが、脂肪酸のβ酸化に関わる MCAD (medium chain acyl

CoA dehydrogenase)であることとよく符号する。ERRL1—ERR の活性化を指標に、新規の抗肥満薬、抗糖尿病薬を開発する可能性が開けた。

## F. 研究発表

- Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto T., Miura, S., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., Evans, R M. & Kakizuka, A. Identification of ERRL1/PGC-1β as an ERR 'protein ligand', whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity in mice. (submitted) 2002.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Dev.* 16:1345-1355, 2002
- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A. H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y. Uchiyama, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8: 977-984, 2001
- Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., & Kakizuka, A. Identification of ter94, Drosophila VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in Drosophila. *Cell Death Differ.* 9: 264-273, 2002.
- Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K. & Kakizuka, A., Functional ATPase activity of p97/VCP is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 47358-47365, 2002.
- Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. Circumvention of chaperone requirement for aggregate formation of a short polyglutamine tract by the co-expression of a long polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 277:37536-37541, 2002.
- Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., Ichijo, H., Ogawa, O., Kakehi, Y., & Kakizuka, A. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 61: 5432-5440, 2001.
- Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., & Kakizuka, A. Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death Differ.* 8: 871-873, 2001

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特願 2002-231999 号「受容体 ERR のリガンド分子 ERRL1 と、薬剤スクリーニング法」平成 14 年 8 月 8 日出願

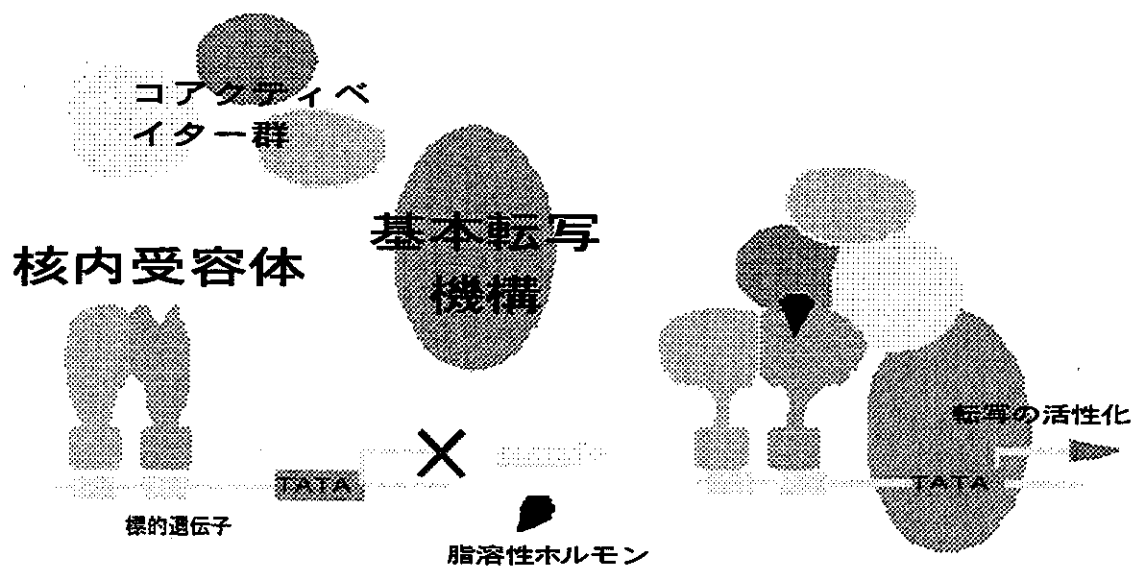


図1. 脂溶性ホルモンによる核内受容体を介する標的遺伝子の転写の活性化機構

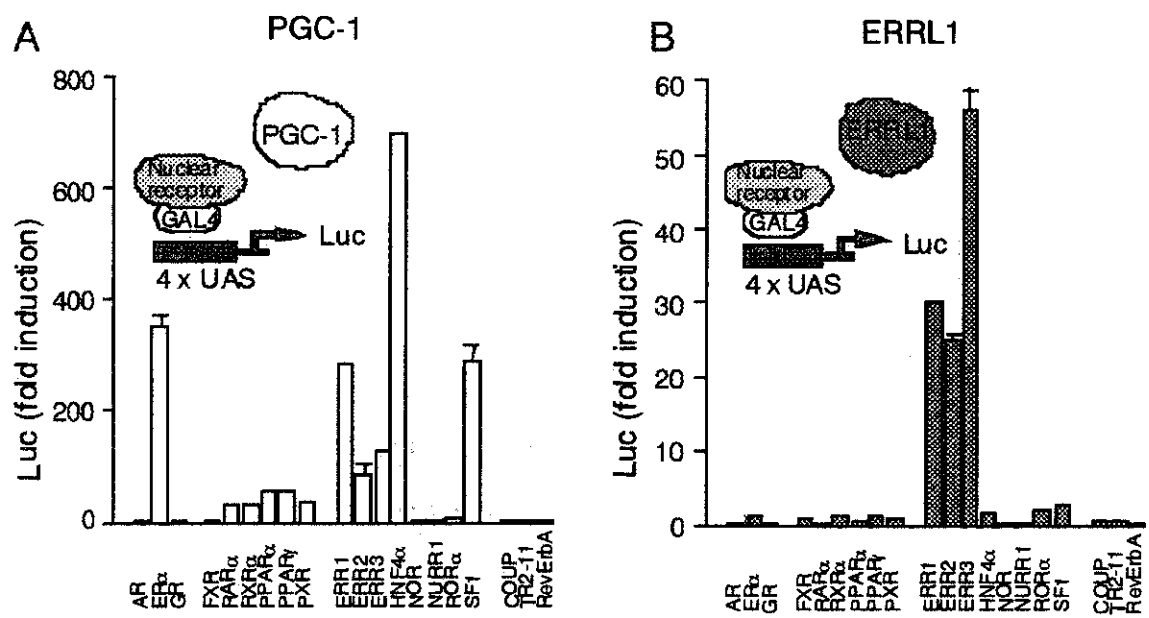


図2. PGC-1 とその類似蛋白質(ERRL1)の種々の受容体に対する転写活性化能

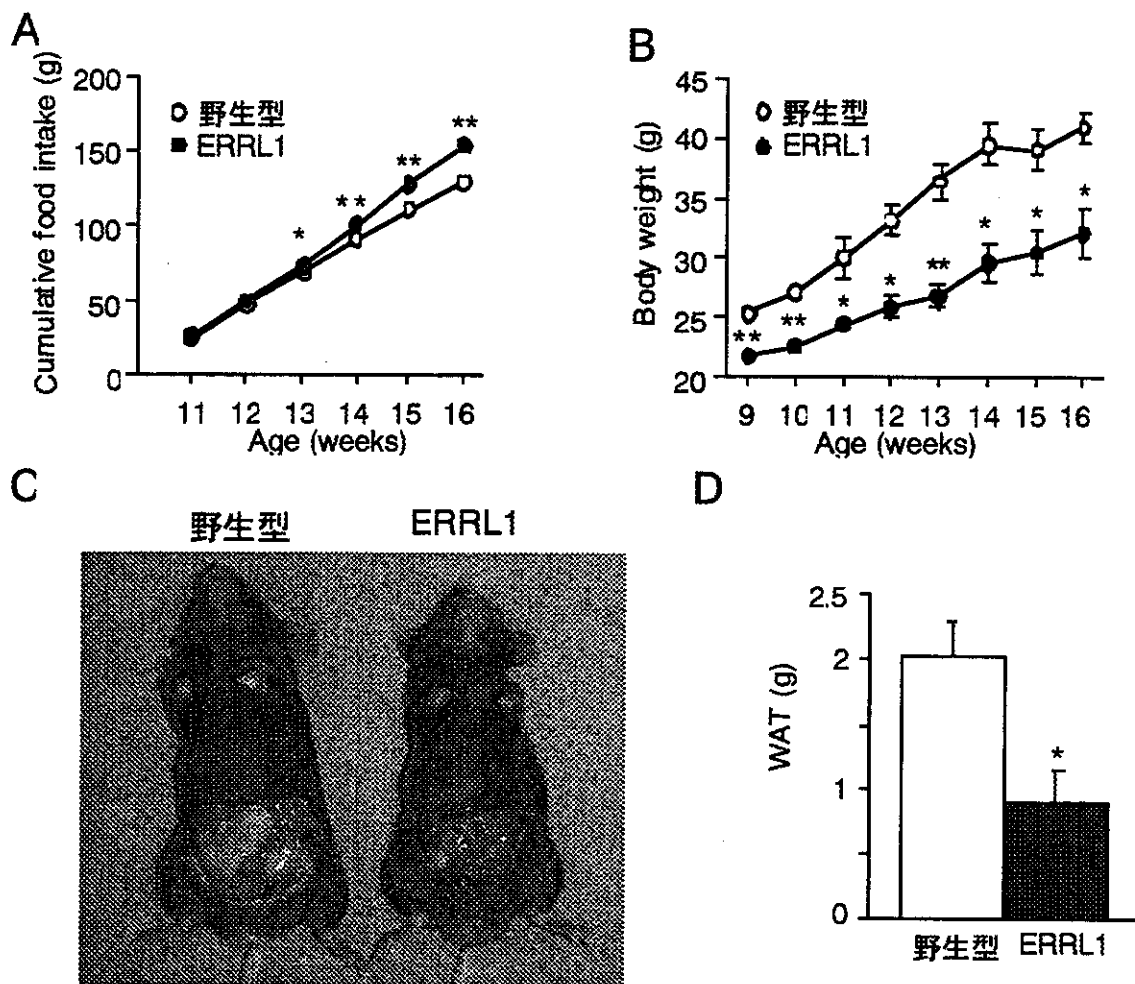


図3. 高脂肪食を与えた時の野生型マウスと ERRL1 マウスの表現型。  
 A 摂食量、B 体重、C 内蔵脂肪、D 精巣上皮の脂肪量の比較

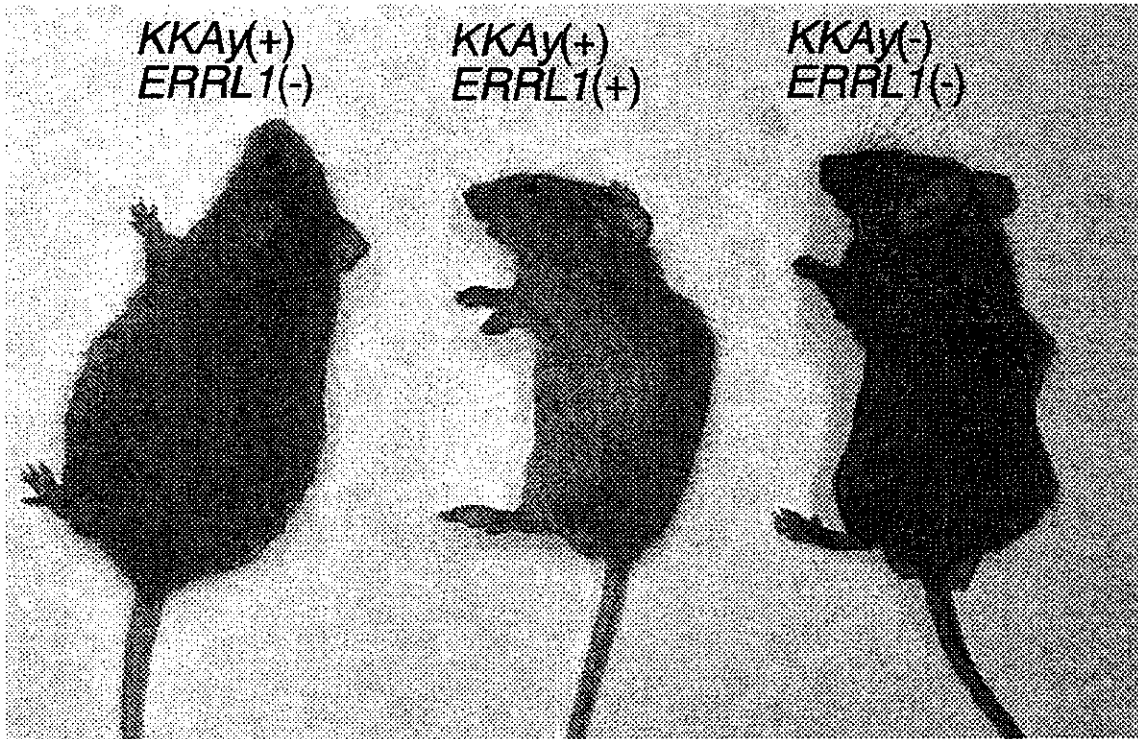


図4. ERRL1 マウスと遺伝性肥満マウスの交配実験。  
ERRL1 の発現により、遺伝性の肥満を抑制することができた。  
KKAY マウスはコートカラーで肥満遺伝子を持つことを識別できる。

研究課題名=[神経系初期発生におけるエストロゲンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析]

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

本研究は、エストロゲンレセプターの神経系初期発生における機能を解析し、以て低用量内分泌かく乱候補化学物質の影響を、分子レベルで解明することを目的とする。

本研究では、エストロゲンレセプターがマウス胎児神経幹細胞に発現していることを、mRNA レベルおよび蛋白質レベルで明らかにした。さらに、胎生期中期に一時的に DES 暴露を受けた後期胎児脳神経幹細胞が *ex vivo* 培養環境下で自己複製不良となることがわかり、そのメカニズムとして EGF receptor 発現の低下を含む多種の増殖分化関連遺伝子の持続的変調が関係している事を示唆する結果を得た。

本研究により、エストロゲンレセプターを介したシグナル伝達の中枢神経系発生機能制御への関わりについて新たな展望が開け、低用量内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点を明確にすることが可能となると期待される。

キーワード：

エストロゲン受容体、胎生初期暴露、神経管細胞、自己複製、分化誘導、不可逆的変化（遅発影響）

A. 研究目的

本研究は、エストロゲンレセプターの神経系初期発生における機能を解析し、低用量内分泌かく乱候補化学物質の影響を、分子レベルで解明することを目的とする。

ほ乳類の脳は雌型がデフォルトであり、雄型脳は、自身の精巣が発達するに伴って分

泌されるテストステロンが、脳内でアロマトーゼによってエストロゲンに変換され、その作用によって形成されると考えられている。マウスではテストステロンの分泌が起こるのは、胎生 16 日頃からとされ、主にこの時期を含む胎生後期から新生児期を対象に、エストロゲンシグナルの脳神経系発達に対する影



響の検討が行われてきた。一方で、エストロジェンレセプター(ER)の発現は胎生初期から脳内で確認されており、胎生初期の脳発達においてERが機能している可能性が指摘される。胎生初期の脳においては未熟な神経幹細胞が多く含まれる時期であることから、胎児神経幹細胞にERが発現し、機能している可能性が考えられるが、その研究は進んでいない。

本研究により、エストロジェンレセプターを介したシグナル伝達機構が中枢神経系発生のいかなる機能制御に寄与しているかを解析する新たな展望が開け、低用量内分泌かく乱候補化学物質の中枢神経系への作用点を分子レベルで明確にすることが可能となる。

## B. 研究方法

### マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) には bFGF (10ng/ml) および EGF (25 ng/ml) を添加したものをを用い、10cm シャーレ (ヌンク社) に  $10^6$  個/6ml の密度で生細胞を播種する。7日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊 (ニューロスフェア) の数と直径の測定、RNA 抽出および遺伝子発現検討を実施した。

### マウス胎児神経上皮細胞培養（接着培養）

マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に bFGF (10ng/ml) を添加したものをを用い、あらかじめポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした 10cm シャーレ (ヌンク社) に 1 胎児分の細胞/6ml の密度で細胞を播種。4日間培養後、ピペッティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 $2 \times 10^5$ /200 $\mu$ l の細胞密度で 8well チャンバースライドに継代後、免疫染色に供した。

### 免疫染色

チャンバースライドから培地を除き、4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定し、一次抗体 (マウス抗 nestin, マウス抗 MAP2, ラット抗 GFAP)、二次抗体 (FITC ラベル抗マウス IgG, Texas Red ラベル抗ラット IgG) をを用い、蛍光免疫染色した。抗 ER alpha 抗体、抗 ER beta 抗体を用いた染色においては、Tyramide Signal Amplification (TSA) 法による高感度検出を図った。そのために二次抗体として Horse radish peroxidase ラベル抗体を用い、蛍光基質として fluorescein もしくは TMR を用いた。TSA 法における基質反応時間は室温 5 分

とした。

#### DES *in utero* 暴露

DES はコーンオイルに溶解し、妊娠 11.5 日目から 14.5 日目まで 2 µg/kg 連日皮下投与した。

#### Genechip 解析

形成されたニューロスフェアを回収し、ISOGEN (日本ジーン社) を用い、全 RNA を抽出した。得た全 RNA をキアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 µg を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット) を用い、ビオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、300-500bp になるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip にはマウス MGU74Av2 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

#### C. 研究結果

神経幹細胞におけるエストロジェンレセ

#### プターの発現

今年度は、個々の細胞における ER の発現を確認するために、mRNA については *in situ* hybridization 法による ER alpha, beta の mRNA 検出検討、蛋白質については免疫染色、特に神経幹細胞マーカーの一つである Nestin との二重染色検討、を進めた。用いた細胞は、胎生 14.5 日のマウス胎児終脳細胞を bFGF 存在下、フィブロネクチンおよびオルニチンをコーティングしたシャーレで 4 日間培養後、再播種した細胞を用いた。この培養条件で得られる細胞の 9 割以上が Nestin 陽性である。

*In situ* hybridization については、通常の方法では検出出来ないことが判明し、感度向上のため、現在、probe 配列の再検討、ハイブリ洗浄条件検討、および検出基質検討を進めており、次年度には結果を得られる見込みである。特に probe 配列の選定においては NIEHS の Kenneth Korach のラボと積極的な情報交換を行っている。

蛋白質検出については ER に対しては Tyramide signal amplification を併用し、Nestin に対しては直接蛍光ラベルした抗 Nestin 抗体を用いることによって、二重染色することに成功した。その結果、細胞のレベルにおいて ER alpha, beta とともに Nestin 陽性細胞と二重染色されることを確認した (Fig. 1)。

以上より、ER は alpha, beta とともに少なくとも蛋白質レベルで個々の神経幹細胞において発現していると結論した。

## DES *in utero* 暴露影響検討

胎生初期におけるエストロゲン受容体系への異常入力に神経幹細胞に対して如何なる影響を及ぼすかを検討するために、妊娠11.5日目から14.5日目まで母体にDES 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与し、胎生15日目に胎児終脳を分離し、 $10^6$ 個/6ml/10cm径シャーレの細胞密度で播き込み、ニューロスフェア（神経幹細胞を多く含む細胞集団）培養をDES非存在下で継続した。この細胞密度は、個々のニューロスフェアが単一の細胞に由来すると考えられる密度である。7日間の培養後、形成されたニューロスフェアの数をその直径毎に区分して計数した。その結果、*in utero* DES投与を受けた胎児由来のニューロスフェアは、Vehicle投与胎児由来のニューロスフェアに比べ、総数には大きな差はないが、径の分布が小径側に移っていた (Fig. 2, Fig. 3)。この結果は、*in utero*でのDES暴露が、胎児終脳中の神経幹細胞のその後の増殖（自己複製能）に影響を与えたことを示唆する。また、この影響はDES非存在培養下で数日を掛けて顕在化することから、*in utero*暴露時に神経幹細胞に何らかの不可逆的な遺伝子発現変化が生じている可能性が示唆された。

## 網羅的遺伝子発現解析

*In utero* DES 暴露を受けたニューロスフェアの遺伝子発現にどのような変化が生じているかを検討するために、Genechip を用いた網

羅的遺伝子発現解析を行った。

昨年度は、Genechip 解析の結果、*in utero* DES 暴露によって、ニューロスフェアの細胞周期に関連した遺伝子発現が低下していることを見出したと報告した。今年度は、更に、網羅的遺伝子発現結果からの意味の抽出を目的に、データ解析を幅広く進めた。まず、*in utero* 暴露により2倍以上の発現差を認めた遺伝子群をリストアップした (Fig. 4)。発現が2倍以上上昇していた遺伝子は56種、2分の1以下に減少していた遺伝子は129種検出された。

遺伝子機能の情報から、特に注目されるものを以下に指摘する。発現が上昇していた遺伝子としては、post-mitotic neural gene-1, PDGF receptor が挙げられた。減少していた遺伝子としては、Cell cycle 関連5種 (Cyclin A, Cyclin B1 等), Cell signal 関連5種 (PHAS-I (insulin stimulated phosphoprotein-1), CIS, Ves-1 等), Transcription factor 16種 (c-fos, Nurrl 等), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2), EGF receptor, Egr1, ABC transporter8, Lp56 (Selenium-binding protein) が挙げられた。これらの発現差の意義については以下の考察で議論した。

## D. 考察

今年度までの検討により、ER alpha, ER beta が神経幹細胞においてmRNAレベル、蛋白質レ

ベルともに発現していること、特に蛋白質レベルでは神経幹細胞マーカーの一つであるNestin蛋白質の発現している細胞でER alpha, betaも共発現していることを確認した。ニューロン及びアストロサイトにおいてER alpha, betaが発現していることはよく知られている事実であることを踏まえると、ER alpha, betaは神経系の未分化な細胞から分化した細胞まで広く発現している蛋白質であると改めて位置づけることができる。これまで胎生期中枢神経系に於けるER alpha, betaの機能の解析は、性的2型核などの性分化に関わる中枢神経系発生の比較的後期における神経細胞分化の時期にほぼ限られていたが、本研究により、更に初期の未分化な神経幹細胞を対象にした分化制御、自己複製制御にER alpha, betaがいかに関わっているかを明らかにすることが、内分泌かく乱物質の低用量影響解明のための基盤研究として意味のあるものとなったと考える。

Genechipを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、*in utero* DES暴露により、細胞分化に関わる遺伝子の発現 (post-mitotic neural gene-1, PDGF receptor)が上昇し、cell cycle, cell signal, EGF receptor等、自己複製に関わると考えられる遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった。すなわち、DESはER受容体を介すると推定される何らかの機構により、神経幹細胞を分化しやすい状態に保つ作用を持つことが予想される。よって、*in utero* DES暴露により、神経幹細胞の自己複製

能の抑制と同時に、潜在的分化能の促進によるさらなる自己複製能の低下が加わり、*ex vivo*培養における自己複製障害として現れ、ニューロスフェア径が増加できなくなったものと考えられる。

また、興味深い遺伝子としてSelenium binding protein (Lp56)の発現の低下が挙げられる。ニューロスフェア培養時に細胞の保護の目的でセレンを加えていることから、この発現低下はDES影響によりニューロスフェア形成が不良になることと関連している可能性があるからである。さらに、*c-fos*, VEGF, *Egr1*等、子宮を始めとする他の臓器においてestrogenによって発現が誘導されることが知られている遺伝子の発現が低下していること、estrogenと作用の一部を共有することが判明しているinsulin系シグナルに関わるIGFBP-2遺伝子の発現が低下していることは、*in utero* DES暴露により、本来estrogenによって誘導されるべき遺伝子群が誘導されない状態に固定されている可能性が示唆され、胎児期のエストロジェンシグナルのかく乱による影響を検討する上で興味深い。これら*in utero* DES暴露により遺伝子発現に影響が生じるメカニズムとして、プロモーター部位の修飾状況変化の可能性があり、今後検討すべきポイントであると考えられる。

なお、胎児体内では実際には何らかのホメオスタシス維持機構あるいは発生プログラム監視機構が働き、それにより外来性刺激影響の緩和が起こっている可能性がある。ここで

得られた低濃度 DES の神経幹細胞に対する影響は、そのような緩和機構が取り除かれた in vitro 実験環境で増幅された結果である可能性は考慮しておかなければならない (In vivo との比較を進めれば、ホメオスタシス維持機構の解析にも繋がると期待される)。

#### E. 結論

神経幹細胞に ER が発現していることは、脳発生初期に内分泌かく乱候補化学物質に暴露されることにより、ER シグナルのかく乱が生じ神経幹細胞機能に影響が生じる可能性を示唆するものである。その影響の可能性として、本研究の結果から、神経幹細胞の増殖能及び分化能の両方のかく乱が考えられた。今後、更に影響が生じるメカニズムの検討を進めると共に、不可逆的影響 (遅発影響) の一つとして成熟期の中樞神経系に存在する神経幹細胞の機能への影響についても検討し、低用量内分泌かく乱候補化学物質の神経系への作用点およびその影響の範囲の明確化を図りたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. kayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. J Gastroenterol Hepatol. 2002, 17(10): 1078-83.

2. Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T. Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. J Agri Food Chem. 2002, 50(13): 3883-5.

3. Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses Phase 1 Environ Health Perspect. 2001, 109(8): 785-94.

##### 2. 学会発表

1. Jun Kanno Reverse toxicology and data normalization /standardization Toxicogenomics International Forum 2002、Okazaki、2002
2. Jun Kanno Toxicogenomics の現状 ゲノム創薬フォーラム ゲノム創薬へのパラダイムシフト、東京、2002

##### 3. 知的所有権の取得状況

###### A. 特許取得

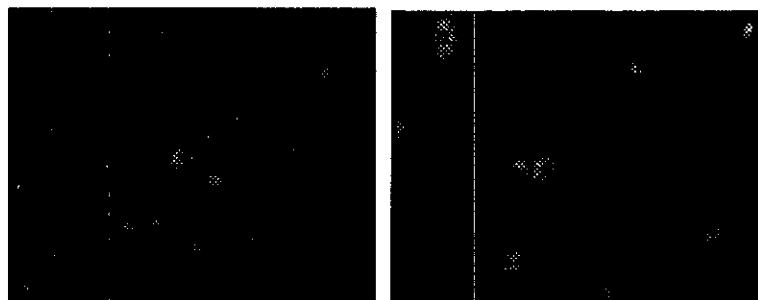
なし

###### B. 実用新案登録

なし

###### C. その他

なし

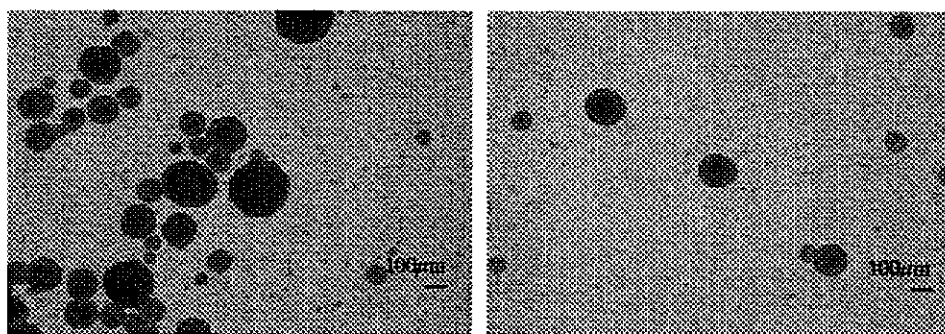


A:  
ER alpha: FITC (Green)  
Nestin: Alexa Fluora 594 (Red)

B:  
ER beta: Texas Red (Red)  
Nestin: FITC (Green)

Fig. 1 神経幹細胞におけるEstrogen receptor alpha, betaの発現

胎生14.5日のマウス胎児終脳細胞をbFGF存在下、フィブロネクチン、オルニチンコートしたシャーレで4日間培養し増やした後にまき直した細胞について、A: Estrogen receptor alpha, B: Estrogen receptor betaとNestinの二重免疫染色を実施した。

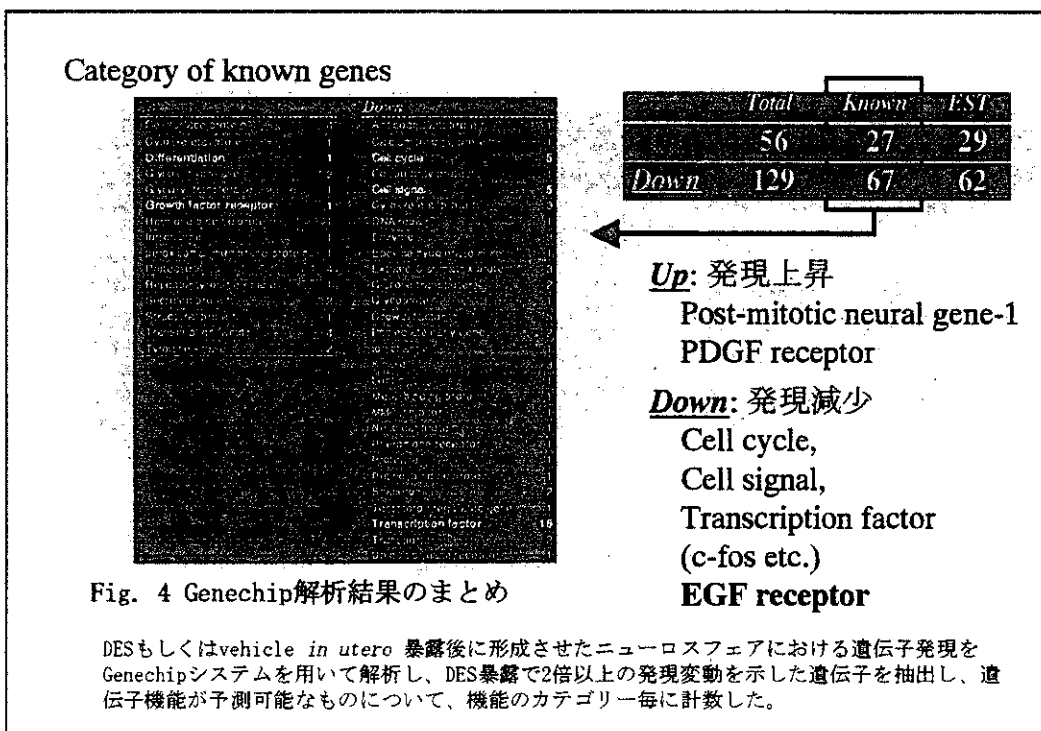
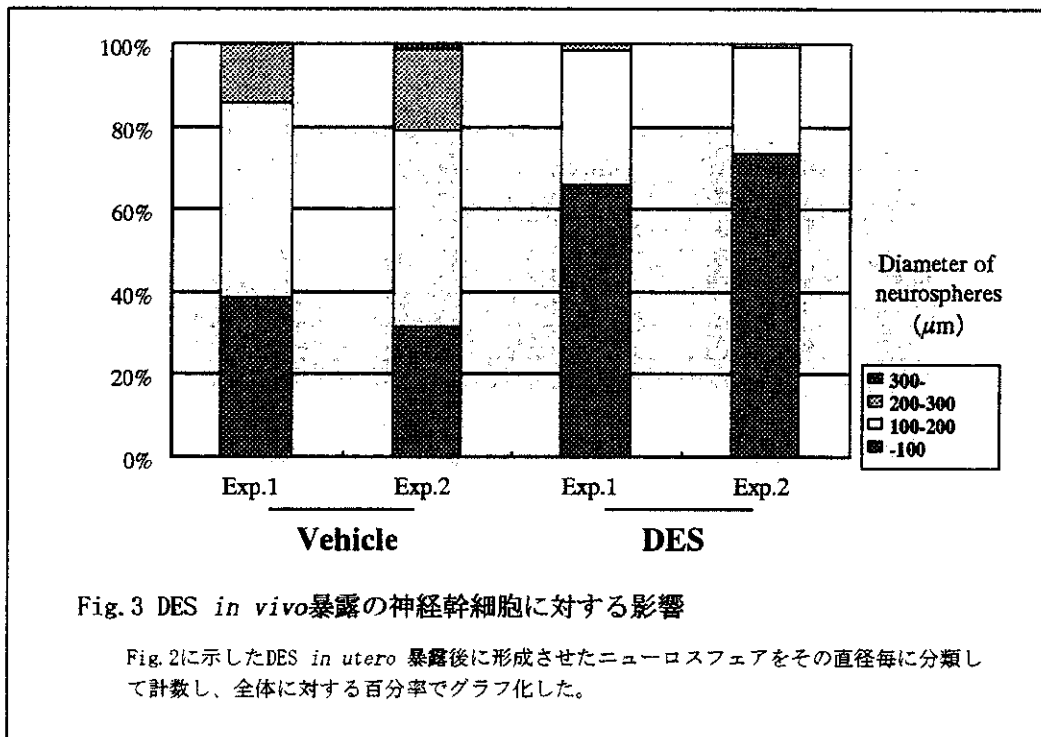


Vehicle

DES

Fig. 2 DES *in vivo*暴露の神経幹細胞に対する影響

胎生11日～15日までDESを2µg/kg/day母体皮下に投与し、胎児終脳よりニューロスフェア培養を行った。培養後7日に形成されたニューロスフェア像を示す。DES投与された胎児終脳細胞から形成されたニューロスフェアはvehicle投与胎児終脳細胞から形成されたものより径が小さい。



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

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きている。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

核内レセプターの転写共役因子は、最近になって複合体を形成することが明らかになっている。現在までに、ヒストンアセチル化酵素(HAT)活性を有し CBP-p300、p160 ファミリーを含む複合体と、HAT 活性を持たない DRIP/TRAP 複合体の2種が存在する。いずれの複合体も多くの核内レセプターに作用することから、核内レセプター共通の転写共役因子複合体と考えられる。

##### 1. ホルモン活性を規定するレセプター転写共役因子の同定

本研究課題において、ER 特異的な転写共役因子(p68、p72)の同定及び機能解析を行ってきた。更に既知転写共役因子複合体との相互作用を検索した結果、CBP-



p300、p160 ファミリーを含む複合体と相互作用することを明らかにした (Watanabe et al., 2001)。しかしながら、この結果のみで ER の組織特異的機能は説明できない。そこで HeLa 細胞核抽出液より、新たな転写共役因子複合体の精製を試みた。その結果 TRRAP 及び GCN5 を含む複合体が ER にリガンド依存的に結合することが分かった。更にこの複合体は、ER のみならず AR や VDR などの他の核内レセプターにも作用することが判明し、第 3 のクラスの新たな転写共役因子複合体と考えている (Yanagisawa et al., 2002)。更にこの複合体のエストロゲン依存性乳癌細胞の増殖における役割を検討したところ、TRRAP が鍵分子であることが判明した。現在、この複合体の転写制御機能における機能の詳細を解析しているところである。

## 2. 新たな染色体構造調節因子複合体の同定

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 $\alpha$  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 3 つの転写共役因子複合体に加え、第 4 の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。同様の方法を用い

ヒトビタミン D レセプター (VDR) に相互作用する核内複合体を単離同定したところ、13 の因子から構成される新規染色体構造調節因子複合体の同定に成功した。この複合体は VDR のみならず、他の核内レセプターにも作用するようであり、現在、その詳細を検討しているところである。

## 3. ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

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が、今年度は ER 発現ハエラインも樹立した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER 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。エサに性ホルモンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。このハエのラインに、更に CBP 欠損変異体 (Nejire) のハエ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、ER $\alpha$ 、ER $\beta$  は同様に 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。次に各種転写共役因子遺伝子を欠損したハエライン群とヒト AR、ER を発現するハエを掛け合わせることで、当該転写共役因子のヒトレセプタ

一に対する生体内機能を探った。その結果、CBP/p300、p160 ファミリータンパクを含む複合体構成因子に変異のあるハエにおいては、ヒト AR/ER の機能に著しい低下がみられたことから、この複合体が生体内で性ホルモンレセプターの機能に必須であることが分かった。

### 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. Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S.: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 167-171, 2003.

○ 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.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR $\gamma$  function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 2003 (in press).

3. Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S.: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 2003 (in press).

○ 4. Furutani, T., Watanabe, T., Tanimoto, K., Hashimoto, T., Koutoku, H., Kudoh, M., Shimizu, Y., Kato, S., Shikama, H.: Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 779-784, 2002

○5. Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFIIA-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 9, 553-562, 2002.

○6. Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., Kato, S.: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron*, 35, 855-864, 2002 .

○ 7. Kato, S.: Androgen receptor structure and function from Knock-out Mouse. *Clin Pediatr Endocrinol*, 11, 1-7, 2002

8. Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama,

K.:Molecular Genetics of Vitamin D-Dependent Hereditary Rickets. *Hormone Research*, 57, 73-78, 2002.

○9. 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-1 (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3698-3706, 2002.

○10. Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5alpha-reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Res.*, 30, 1387-1393, 2002.

11. Sakaue, H., Konishi, M., Ogawa, W., Asaki, T., Mori, T., Yamasaki, M., Takata, M., Ueno, H., Kato, S., Kasuga, M., Itho, N.: Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes & Development*, 16, 908-912, 2002.

○12. Nawata, H., Goto, K., Morinaga, H., Yanase, T., Yanagisawa, J., Kato, S., Nomura, M., Okabe Taijiro, Takayanagi, R.: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences*, 9, 057-070, 2002.

13. Shimosawa, T., Shibagaki, Y., Ishibashi, K., Kitamura, K., Kangawa, K., Kato, S., Ando, K., Fujita, T.: Adrenomedullin, an endogenous peptide,

counteracts cardiovascular damage. *Circulation*, 105, 106-111, 2002.

14. Mailloux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillion, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dichson, C., Thiery, J. P., Bellusci, S.: Role of FGF 10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, 129, 53-60, 2002.

15. Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K., Ohuchi, H.: FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, 129, 1533-1541, 2002.

16. Suzawa, M., Tamura, Y., Fukumoto, S., Miyazono, K., Fujita, T., Kato, S., Takeuchi, Y.: Stimulation of smad1 transcriptional activity by ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 17, 240-248, 2002.

○17. Lee, H.-S., Miyauchi, K., Nagata, Y., Fukuda, R., Sasagawa, S., Endoh, H., Kato, S., Horiuchi, H., Takagi, M., Ohta, A.: Employment of the human estrogen receptor b ligand-binding domain and co-activator SRC1 nuclear receptor-binding domain for the construction of a yeast two-hybrid detection system for endocrine disrupters. *J. Biochem.*, 131, 399-405, 2002.

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射線医科学研究所

**研究要旨** 内分泌かく乱物質の低用量作用の一要因と考えられるエストロゲン受容体(ER)発現の変化と調節について検討した。ラットおよびマウス前立腺では ER $\beta$  はテストステロン(T)による発現調節を受けており、さらにエストロゲンによっても修飾されることが明らかになった。前立腺での ER $\beta$  mRNA は基本的には1分子種のみであり、その遺伝子上流域にプロモータ活性があることが示された。基本転写活性のみならず T による発現調節も部分的にはこの領域が関与していると考えられた。

### A. 研究目的

ラットおよびマウスの前立腺をモデルに、そのエストロゲン受容体 (ER)  $\beta$  型の発現機構の解析を *in vitro* のみならず *in vivo* で行い、受容体発現調節を介した内分泌かく乱物質の低用量作用に關与する基本的な機構を理解する。

### B. 研究方法

B-1. 動物：F344 系雄ラットおよび BDF1 雄マウスを購入して用いた。ホルモン処置は、動物に去勢およびホルモンペレットの皮下投与を施しておこなった。動物実験は、本大学の動物取り扱い倫理規定に沿っておこなった。

B-2. 細胞培養：チャーコル処理血清を含む培地でおこなった。

B-3. 各種 mRNA 定量：Real-time RT-PCR 法により組織中の ERmRNA 等の定量をおこなった。

B-4. ラット ER $\beta$  プロモーターのクローニングと解析：cDNA の 5'端を同定し、それを起点に上流域を 5'端 PCR 法により配列決定した後、その領域を遺伝子 DNA より PCR クローニングした。その全域および断片を pGL3-luc レポーターへ挿入したものをを用い、培養細胞で発現を解析した。

### C. 研究結果

前立腺 ER $\beta$  の調節はテストステロン(T)によっていることが示され、これはラット、マウスで共通見られた。ER $\beta$  mRNA は基本的には1分子種のみであり、その直ぐ上流域がプロモータ活性をもつことが明らかになった。

C-1. ラットおよびマウス前立腺の ER 発現とテストステロン(T)による調節

1 週齢マウスの前立腺では、ER $\alpha$  が強く発現していたが 4,9 週齢でみると  $\beta$  型の発現が亢進していた。また、ER $\beta$  の発現は、去勢により低下し、T の補充により回復した (Fig. 1)。この ER 発現の週令および T 依存性は、ラット前立腺においてみられたものと同様であった。

C-2. T+エストラジオール(E)の作用

5 週齢 F344 ラットに、T を 2,4,8 週間投与すると前立腺重量の増加がみられ、さらに E の同時投与はそれに相乗的に作用した。このとき、前立腺の ER $\alpha$  の発現が亢進していること、および T 単独投与で観察されるアンドロゲン受容体レベルの低下が抑制されることが明らかになった。VEGF 発現との相関はなかった (Fig. 2, 3)。

C-3. ラット ER $\beta$  mRNA と遺伝子上流域のクローニング

RACE 法による解析から、前立腺で転写され