

2003 | 279

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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15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16年(2004)年 4月

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：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 細胞株の高いアロマターゼ活性を指標とする系において従来の ^3H -water 法に加えて ELISA 法によりアロマターゼ活性を抑制する複数の化学物質を新たに同定した。

(2) アンドロゲン受容体(AR)の転写活性化能と AR の核内クラスター形成を指標としたスクリーニング系を用いて前立腺細胞癌で認められる変異 AR(T877A)の転写活性を刺激する化学物質としてピンクロゾリンを同定した。(3) マウスの始原生殖細胞の遊走能に対する抗アンドロゲン剤の抑制作用を指標とした新しいスクリーニング系を立ち上げ、化学物質のピンクロゾリンによる遊走能抑制を確認した。(4) 細胞核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 ($\text{ER}\alpha$) 作用機構の研究を行い、新たな $\text{ER}\alpha$ 結合蛋白として $\text{ER}\alpha$ の分解に関与する2種類のユビキチン・リガーゼ、CHIP と NRDF を同定した。CHIP は $\text{ER}\alpha$ の品質管理に関与し、NRDF は転写活性発現に必要なことを見出した。

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、内分泌攪乱物質の効率的スクリーニングシステムの確立を主目的とすると同時にその基盤的研究課題であるアンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体(ER)の作用機構についての研究も行う。本研究では、我々が開発した以下の(1)-(4)の4つのスクリーニング法を用いて内分泌攪乱化学物質の効率的スクリーニングシステムを確立する。すなわち、(1)独自に樹立した高いアロマターゼ(エストロゲン合成)活性を有するヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN を用いて、アロマターゼ活性に影響を与える物質をスクリーニング
(2) AR の転写活性と焦点顕微鏡画像

上、核内での活性化 AR のクラスター形成を指標としたスクリーニング (3) アンドロゲン作用抑制作用を指標とした *in vivo* スクリーニング系の確立

(4) 始原生殖細胞の遊走能障害を指標としたスクリーニングである(以上、名和田)。(5)エストロゲン受容体 ($\text{ER}\alpha$) の転写活性作用機構の研究の一環として $\text{ER}\alpha$ にリガンド依存的に結合する蛋白質群の同定を試みた(柳澤)。

B. 研究方法

(1) KGN 細胞のアロマターゼ活性調節並びに内分泌攪乱物質の影響:
KGN 細胞は FSH 受容体を発現し、高いアロマタ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、アロマターゼ活性は、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 法により測定した。また、大塚製薬が KGN 細胞と ELISA 法を組み合わせで開発した新規アロマターゼアッセイ法を用いて

日本で頻用されている産業化学物質上位100種類のスクリーニングを行った。また、この際、化学物質の毒性を除外する目的で MTT アッセイによる毒性評価も行った。(2) AR の転写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。(3) アクチビン受容体を恒常的に発現させたヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能、転移能を検討した。(4) 抗アンドロゲン作用を示すピンクロゾリン及びコントロールとして抗アンドロゲン剤であるフルタミドを受精卵の着床後より性腺の分化が開始される前、すなわち妊娠 4.5 日から 8.5 日までの間、妊娠マウスに経口投与 (5mg/kg 体重) し、胎生 8.5 日から 9.5 日にかけての仔胎を回収し、ALP 染色にて始原生殖細胞数を測定した (以上、名和田)。(5) 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ユビキチン・リガーゼを同定した。ユビキチン・リガーゼの ER α の蛋白質量に与える影響を ER α 抗体を用いて検討した。さらに、ユビキチン・リガーゼ遺伝子欠損細胞の解析を行った (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. 結果

(1) アロマターゼ関連: 昨年度、有機ス

ズ化合物がアロマターゼ活性を抑制することを報告したのに加え、今回、ニトロフェン、ピンクロゾリン、pp'-DDE, pp'-DDD, PCP 及び bisphenol A に抑制作用を新たに見いだした。また、ベノミルに唯一、比較的強力なアロマターゼ活性亢進作用があることを前年度、既に見いだしていたが、本年度はさらにベノミルの分解産物であるカルペンダジムも、同様にアロマターゼ活性を上昇させること、またその作用機序として微小管の重合阻害機序に起因することを明らかにした。ELISA 法を用いた新しいアロマターゼ活性の測定系を用い、100 種類の化学物質のスクリーニングした結果、Thiophenol, Bumetrizole, Hexabromocyclododecan の 3 つの化学物質をアロマターゼ活性を抑制する化学物質として新たに同定した。

(2) アンドロゲン活性の in vitro スクリーニング系: 今回、新たにヒト前立腺癌の AR で高率に認められる T877A 変異がリガンド特異性を消失することに注目し、AR(T877A) に対する 55 種類の内分泌攪乱物質の影響を検討したところ唯一、ピンクロゾリンは AR(T877A) の転写活性を促進し、共焦点上、クラスター形成を伴うことを見いだした。ピンクロゾリンがこの変異 AR を有する前立腺癌の増殖促進物質として作用する可能性を示唆する。

(3) 抗アンドロゲン活性の in vivo スクリーニング系: アクチビン受容体を恒常的に発現させたヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植すると全身リンパ説転移を引き起こすこと、しかも去勢によりその遠隔転移が抑制されることを見出し、内分泌攪乱物質を含めた抗アンドロゲン作用物質の in vivo screening に有用なシステムである可能性を新たに提示した。

(4) 抗アンドロゲン活性の新たなスクリーニング系: 生殖腺が形成される以前の胎仔マウスの全身に AR が発現していること、化学物質のピンクロゾリン投与は抗アンドロゲン剤のフルタミド投与と同

様生殖腺原器へ遊走する始原生殖細胞の数と遊走を減少させることを明らかにした。

(5) 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 と結合または解離する2種類の蛋白質複合体を精製した。1つ目の蛋白質複合体は、CHIPと呼ばれるユビキチン・リガーゼを含み、リガンドの結合していないER α に対して選択的に結合することが明らかとなった。CHIPをER α と共発現させるとER α 蛋白質の分解が促進した。一方、CHIPの共発現によって、ER α の転写活性の増強が認められた。2つ目の蛋白質は、新規HECT型ユビキチン・リガーゼであり、CHIPとは逆にER α とエストロゲン依存的に結合することが示された。本リガーゼをER α と共発現させると、エストロゲン存在下においてER α の分解が亢進した。従って、本リガーゼは、CHIPとは異なり、エストロゲンの結合したER α を選択的に分解するものと考えられた。

D. 考察

既に環境庁の指定する内分泌攪乱物質69種類のうち、55種類の物質のスクリーニングを終え、有機スズ化合物がアロマトラーゼ活性を抑制することを報告したのに加え、今回、新たに複数の化合物にアロマトラーゼ活性の抑制作用を見いだした。さらに今回導入したELISA法は³H-water法に比べ、感度、簡便性の点でより優れ、大量検体のスクリーニングにおける今後の有用性が期待できる。また、その簡便性から、アロマトラーゼ阻害剤の薬剤開発に威力を発揮する可能性がある。

既に、55種類の化学物質のスクリーニングの結果、ニトロフェン、ピンクロゾリン、pp'-DDEが、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によりAR転写活性を抑制することを報告していた。これらの成績はある種の化学物質の生態生殖系への影響を示唆する成績であるが、今回、新たにある

種の化学物質はアンドロゲン依存性ヒト前立腺癌の増殖を促進する可能性を提示した。今後、さらにスクリーニング化学物質を増やす予定である。

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。

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。我々が今回、確立した前立腺癌の転移モデル系では精巣摘出により転移が抑制されたことから、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可能性がある。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スクリーニングを施行する予定である。

ER α がリガンド依存的に分解されることは以前から知られており、その分子的基盤を解明することはER α の制御機構を理解する上で重要である。今回、明らかにしたユビキチン・リガーゼはエストロゲン結合したER α を選択的に分解する。ER α の転写活性発現には、エストロゲン依存的なER α の分解が必要であることが以前より報告されており、今後、本ユビキチン・リガーゼによるER α の転写制御機構の解析を行う。また、ER α にリクルートされる蛋白質を指標にし、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スクリーニング系を確立し特許を出願中である。

E. 結論

(1) KGN細胞とELISA法を用いた新しいアロマトラーゼ活性の測定系の有用性を確認し、この方法を用いて新たなアロマトラーゼ活性抑制物質を複数を見いだした。(2) ベノミルの分解産物であるカルペンダジムも、ベノミル同様にアロマトラーゼ活性を上昇させること、またその作用機序として微小管の重合阻害機序に起因することを明らかにした。(3) ヒト前立腺癌で認められるT877A変異

を有する AR に対してピンクロゾリンが転写刺激活性を有することを見いだした。

(4) アクチビン受容体の恒常的発現ヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植すると全身リンパ説転移を引き起こすこと、しかも去勢によりその遠隔転移が抑制されることから、内分泌攪乱物質を含めた抗アンドロゲン作用物質の in vivo screening システムとなり得る可能性を提示した。(5) 抗アンドロゲン作用を有するピンクロゾリンが始原生殖細胞数とその移動を減少させることを明らかにし、新たな内分泌かく乱物質のスクリーニングシステムを確立した。

(6) エストロゲン作用機構の研究結果として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 を同定した。また ER α と結合するユビキチンリガーゼを同定し、ER α はリガンド存在下だけではなく、非存在下においてもユビキチン化を受け、分解されることを明らかにした。

F. 研究発表 (論文発表)

- 1) 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: 1603-11, 2003
- 2) Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Terakawa N.: Interleukin-8 gene and protein expression are up-regulated by interleukin-1beta in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line. *Fertil Steril*. 79 : 151-7, 2003
- 3) Fan W, Yanase T, Wei L, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Nawata H: Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 Variation, G146A *Biochem Biophys Res Commun* 311: 987-994, 2003
- 4) Goto K, Zhao Y, Saito M, Tomura A,

Moribaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R., Nawata H: Activation function-1 domain of androgen receptor contributes the interaction between two distinct sets of subnuclear compartments. *J Steroid Biochem Molec* 85: 201-8, 2003

5) Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H: A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line (KGN) *Endocrinology in press*, 2004

6) Fan W, Yanase T, Yin W, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol* 18:127-141, 2004

7) Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama KI, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *Br J Cancer* 25, 2004

8) Kahata K., Hayashi M., Asaka M., Hellman U, Kitagawa H, Yanagisawa J, Kato S, Imamura T, Miyazono K.: Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes Cells* 9:143-151, 2004

9) Yamamoto Y., Wada O., Takada I, Yogiashi Y, Shibata J, Yanagisawa J, Kitazato K, Kato S: Both N- and C-terminal transactivation functions of

DNA-bound ERalpha are blocked by a novel synthetic estrogen ligand.

Biochem Biophys Res Commun
312:656-662, 2003

8) Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J: Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells. J Biol Chem 278:26704-26714, 2003

10) Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y., Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome.

Cell 113:905-17, 2003

11) Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature 423: 545-550, 2003

11) Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S.: Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade.

Nature Cell Biol., 5:224-230, 2003

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|-----|
| 1. 特許出願中 | 2 件 |
| 2. 実用新案登録 | なし |

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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 細胞株の高いアロマトラーゼ活性を指標とする系において従来の ^3H -water 法に加えて ELISA 法によりアロマトラーゼ活性を抑制する複数の化学物質を新たに同定した。

（2）アンドロゲン受容体(AR)の転写活性化能と AR の核内クラスター形成を指標としたスクリーニング系を用いて前立腺細胞癌で認められる変異 AR(T877A)の転写活性を刺激する化学物質としてピンクロゾリンを同定した。（3）マウスの始原生殖細胞の遊走能に対する抗アンドロゲン剤の抑制作用を指標とした新しいスクリーニング系を立ち上げ、化学物質のピンクロゾリンによる遊走能抑制を確認した。

A. 研究目的

ホルモン類似的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、内分泌攪乱物質の効率的スクリーニングシステムの確立を主目的とすると同時にその基盤的研究課題であるアンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体(ER)の作用機構についての研究も行う。本研究では、我々が開発した以下の(1)-(4)の4つのスクリーニング法を用いて内分泌攪乱化学物質の効率的スクリーニングシステムを確立する。すなわち、(1)独自に樹立した高いアロマトラーゼ（エストロゲン合成）活性を有するヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN を用いて、アロマトラーゼ活性に影響を与える物質をスクリーニング
(2) AR の転写活性と焦点顕微鏡画像上、核内での活性化 AR のクラスター形成を指標としたスクリーニング (3) アンドロゲン作用抑制作用を指標とした *in vivo* スクリーニング系の確立
(4) 始原生殖細胞の遊走能障害を指標としたスクリーニングである。

B. 研究方法

(1) KGN 細胞のアロマトラーゼ活性調節並びに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、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 法により測定した。また、大塚製薬が KGN 細胞と ELISA 法を組み合わせで開発した新規アロマトラーゼアッセイ法を用いて日本で頻用されている産業化学物質上位 100 種類のスクリーニングを行った。また、この際、化学物質の毒性を除外する目的で MTT アッセイによる毒性評価も行った。(2) AR の転写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。(3) アクチビン受容体を恒常的に発現させたヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能、転移能を検討した。(4) 抗アンドロゲン作用を示すピンクロゾリン及びコントロールとして抗アンドロゲン剤であるフルタミドを受精卵の着床後より性腺の分化が開始される前、すなわち妊娠 4.5 日から 8.5 日までの間、妊娠マウスに経口投与 (5mg/kg 体重) し、胎生 8.5 日から 9.5 日にかけての仔胎を回収し、ALP 染色にて始原生殖細胞数を測定した。

(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. 結果

(1) アロマターゼ関連：昨年度、有機スズ化合物がアロマターゼ活性を抑制することを報告したのに加え、今回、ニトロフェン、ピンクロゾリン、pp'-DDE, pp'-DDD, PCP 及び bisphenol A に抑制作用を新たに見いだした。また、ベノミルに唯一、比較的強力なアロマターゼ活性亢進作用があることを前年度、既に見いだしていたが、本年度はさらにベノミルの分解産物であるカルベンダジムも、同様にアロマターゼ活性を上昇させること、またその作用機序として微小管の重合阻害機序に起因することを明らかにした。ELISA 法を用いた新しいアロマターゼ活性の測定系を用い、100 種類の化学物質のスクリーニングした結果、Thiophenol, Bumetizole, Hexabromocyclododecan の 3 つの化学物質をアロマターゼ活性を抑制する化学物質として新たに同定した。

(2) アンドロゲン活性の *in vitro* スクリーニング系：今回、新たにヒト前立腺癌の AR で高率に認められる T877A 変異がリガンド特異性を消失することに注目し、AR(T877A) に対する 55 種類の内分泌攪乱物質の影響を検討したところ唯一、ピンクロゾリンは AR(T877A) の転

写活性を促進し、共焦点上、クラスター形成を伴うことを見いだした。ピンクロゾリンがこの変異 AR を有する前立腺癌の増殖促進物質として作用する可能性を示唆する。

(3) 抗アンドロゲン活性の *in vivo* スクリーニング系：アクチビン受容体を恒常的に発現させたヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植すると全身リンパ説転移を引き起こすこと、しかも去勢によりその遠隔転移が抑制されることを見出し、内分泌攪乱物質を含めた抗アンドロゲン作用物質の *in vivo* screening に有用なシステムである可能性を新たに提示した。

(4) 抗アンドロゲン活性の新たなスクリーニング系：生殖腺が形成される以前の胎仔マウスの全身に AR が発現していること、化学物質のピンクロゾリン投与は抗アンドロゲン剤のフルタミド投与と同様生殖腺原器へ遊走する始原生殖細胞の数と遊走を減少させることを明らかにした。

D. 考察

既に環境庁の指定する内分泌攪乱物質 69 種類のうち、55 種類の物質のスクリーニングを終え、有機スズ化合物がアロマターゼ活性を抑制することを報告したのに加え、今回、新たに複数の化合物にアロマターゼ活性の抑制作用を見いだした。さらに今回導入した ELISA 法は ³H-water 法に比べ、感度、簡便性の点でより優れ、大量検体のスクリーニングにおける今後の有用性が期待できる。また、その簡便性から、アロマターゼ阻害剤の薬剤開発に威力を発揮する可能性がある。

既に、55 種類の化学物質のスクリーニングの結果、ニトロフェン、ピンクロゾリン、pp'-DDE が、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により AR 転写活性を抑制することを報告していた。これらの成績はある種の化学物質の生態生殖系への影響を示唆する成績であるが、今回、新たにある

種の化学物質はアンドロゲン依存性ヒト前立腺癌の増殖を促進する可能性を提示した。今後、さらにスクリーニング化合物を増やす予定である。

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。

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。我々が今回、確立した前立腺癌の転移モデル系では精巣摘出により転移が抑制されたことから、*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可能性がある。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* スクリーニングを施行する予定である。

E. 結論

(1) KGN 細胞と ELISA 法を用いた新しいアロマターゼ活性の測定系の有用性を確認し、この方法を用いて新たなアロマターゼ活性抑制物質を複数を見いだした。(2) ベノミルの分解産物であるカルベンダジムも、ベノミル同様にアロマターゼ活性を上昇させること、またその作用機序として微小管の重合阻害機序に起因することを明らかにした。(3) ヒト前立腺癌で認められる T877A 変異を有する AR に対してピンクロゾリンが転写刺激活性を有することを見いだした。

(4) アクチピン受容体の恒常的発現ヒト前立腺癌細胞株 ALVA 細胞をヌードマウスに移植すると全身リンパ説転移を引き起こすこと、しかも去勢によりその遠隔転移が抑制されることから、内分泌攪乱物質を含めた抗アンドロゲン作用物質の *in vivo* screening システムとなり得る可能性を提示した。(5) 抗アンドロゲン作用を有するピンクロゾリンが始原生殖細胞数とその移動を減少させることを明らかにし、新たな内分泌かく乱物質のスクリーニングシステムを確立した。

F. 研究発表 (論文発表)

- 1) 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: 1603-11, 2003
- 2) Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Terakawa N.: Interleukin-8 gene and protein expression are up-regulated by interleukin-1beta in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line. *Fertil Steril.* 79 : 151-7, 2003
- 3) Fan W, Yanase T, Wei L, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Nawata H: Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 Variation, G146A *Biochem Biophys Res Commun* 311: 987-994, 2003
- 4) Goto K, Zhao Y, Saito M, Tomura A, Moribaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R., Nawata H: Activation function-1 domain of androgen receptor contributes the interaction between two distinct sets of subnuclear compartments. *J Steroid Biochem Molec* 85: 201-8, 2003
- 5) Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H: A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulose-Like Tumor Cell Line (KGN) *Endocrinology* in press, 2004
- 6) Fan W, Yanase T, Yin W, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of

the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol* 18:127-141, 2004

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願中 なし
2. 実用新案登録 なし

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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 ）の転写活性制御機構の解析を行った。ER α にはエストロゲン依存的に多くの種類の蛋白質が結合し、その活性を制御していることが明らかとなった。近年、ER α 蛋白質がユビキチン化され、分解を受けることが示されたが、本研究では、ER α の分解に関与する2種類のユビキチン・リガーゼ、CHIP と NRDF を同定した。CHIP は ER α の品質管理に関与し、NRDF は転写活性発現に必要であることを見出した。

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。本年度は、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い、分解制御に関わる2種類の因子を取得・解析した。

B. 研究方法

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ユビキチン・リガーゼを同定した。ユビキチン・リガーゼの ER α の蛋白質量に与える影響を ER α 抗体を用いて検討した。さらに、ユビキチン・リガーゼ遺伝子欠損細胞の解析を行った。

（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

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 と結合または解離する2種類の蛋白質複合体を精製した。1つ目の蛋白質複合体は、Hsp90, Hsp70, Hsc70 などのシャペロン蛋白質とともに CHIP と呼ばれるユビキチン・リガーゼを含み、リガンドの結合していない ER α に対して選択的に結合することが明らかとなった。CHIP を ER α と共発現させると ER α 蛋白質の分

解が促進した。一方、CHIP の共発現によって、ER α の転写活性の増強が認められた。CHIP は、変異型 ER α を好んで分解する。さらに、熱ショックを細胞に与えた際の ER α の分解も CHIP によって行われることを見出した。2つ目の蛋白質は、新規 HECT 型ユビキチン・リガーゼであり、CHIP とは逆に ER α とエストロゲン依存的に結合することが示された。本リガーゼを ER α と共発現させると、エストロゲン存在下において ER α の分解が亢進した。従って、本リガーゼは、CHIP とは異なり、エストロゲンの結合した ER α を選択的に分解するものと考えられた。

D. 考察

ER α がリガンド依存的に分解されることは以前から知られており、その分子的基盤を解明することは ER α の制御機構を理解する上で重要である。本研究では、ER α が、リガンド存在下だけではなく、非存在下においてもユビキチン化を受け、分解されることを明らかにした。リガンドの結合していない ER α はシャペロン蛋白質と複合体を形成し、正常な折りたたみ構造をとる。この過程で折りたたみ構造に異常が生じると、シャペロン複合体に CHIP ユビキチン・リガーゼが加わり、異常な構造の ER α をユビキチン化して分解へと導くことを見出した。細胞に熱ショックを加えると、ER α の折りたたみ構造が異常になるため、CHIP による ER α 蛋白質の分解が亢進する。CHIP 遺伝子欠損細胞では、熱ショックによる ER α の分解が認められないことから CHIP が ER α の品質管理において重要な役割を担っているこ

とが確認された。

一方、リガンド存在下では、CHIP とは異なるユビキチン・リガーゼが ER α の分解に関与することが明らかとなった。本ユビキチン・リガーゼはエストロゲン結合した ER α を選択的に分解する。ER α の転写活性発現には、エストロゲン依存的な ER α の分解が必要であることが以前より報告されており、今後、本ユビキチン・リガーゼによる ER α の転写制御機構の解析を行う。また、ER α にリクルートされる蛋白質を指標にし、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スクリーニング系を確立し特許を出願中である。

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、エストロゲンレセプター (ER α) の転写活性制御機構に注目し、ER α の分解に関わる因子を取得・解析した。ER α の蛋白質量は、2種類のユビキチン・リガーゼによって制御されていることを見出した。これらの研究成果から、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新規スクリーニング系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Murayama A., Kim MS., Yanagisawa J., Takeyama KI., Kato S.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *Br. J. Cancer*, Mar 25,(2004)
- (2) Kahata K., Hayashi M., Asaka M., Hellman U., Kitagawa H., Yanagisawa J., Kato S., Imamura T., Miyazono K.: Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes Cells*, Feb;9(2):143-151 (2004)
- (3) Fan W.; Yanase T., Wu Y., Kawate H., Saitoh M., Oba K., Nomura M., Okabe T., Goto K., Yanagisawa J., Kato S., Takayanagi R., Nawata H.: Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of

the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol.*, Jan;18(1):127-141 (2004)

(4) Yamamoto Y., Wada O., Takada I., Yogiashi Y., Shibata J., Yanagisawa J., Kitazato K., Kato S.: Both N- and C-terminal transactivation functions of DNA-bound ERalpha are blocked by a novel synthetic estrogen ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, Dec 19;312(3):656-662 (2003)

(5) Fujita T., Kobayashi Y., Wada O., Tateishi Y., Kitada L., Yamamoto Y., Takashima H., Murayama A., Yano T., Baba T., Kato S., Kawabe YI., Yanagisawa J.: Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, Jul 18;278(29):26704-26714, (2003)

(6) Kitagawa H., Fujiki R., Yoshimura K., Mezaki Y., Uematsu Y., Matsui D., Ogawa S., Unno K., Okubo M., Tokita A., Nakagawa T., Ito T., Ishimi Y., Nagasawa H., Matsumoto T., Yanagisawa J., Kato S.: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell*, Jun 27;113(7):905-17, (2003)

(7) Ohtake F., Takeyama K., Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujii-Kuriyama Y., Kato S.: Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, May29;423(6939): 545-550,(2003)

(8) Suzawa M., Takada I., Yanagisawa J., Ohtake F., Ogawa S., Yamauchi T., Kadowaki T., Takeuchi Y., Shibuya H., Gotoh Y., Matsumoto K., Kato S.: Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through

the TAK1/TAB1/NIK cascade.
Nature Cell Biol., Mar,5(3):224-230
(2003)

2. 学会発表

- (1) エストロゲンレセプター (ER α)
の制御機構:川辺洋一、柳澤 純 第26回
日本分子生物学会(神戸) 2003年12月
10日-13日
- (2) ユビキチン・ネットワークによる核
内レセプターの制御: 柳澤 純 第26回
日本分子生物学会(神戸)2003年12月10
日-13日
- (3) 核内レセプターの転写制御メカニズ
ム: 柳澤 純 第4回分子血管研究会
(東京)2003年1月10日-11日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願中 2件
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
Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Terakawa N	Interleukin-8 gene and protein expression are up-regulated by interleukin-1 beta in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line.	Fertil Steril. 79 : 151-7	2003
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: 1603-11	2003
Fan W, Yanase T, Wei L, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Nawata H	Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 Variation, G146A	Biochem Biophys Res Commun 311: 987-994	2003
Goto K, Zhao Y, Saito M, Tomura A, Moribaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H	Activation function-1 domain of androgen receptor contributes the interaction between two distinct sets of subnuclear compartments.	J Steroid Biochem Molec 85: 201-8	2003

<p>Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata</p>	<p>A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line (KGN)</p>	<p>Endocrinology in press</p>	<p>2004</p>
<p>Fan W, Yanase T, Yin W, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H</p>	<p>Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re- integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells.</p>	<p>Mol Endocrinol 18; 127-141</p>	<p>2004</p>

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
Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama KI, Kato S.	Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching.	EMBO J. 印刷中	2004
Kahata K, Hayashi M, Asaka M, Hellman U, Kitagawa H, Yanagisawa J, Kato S, Imamura T, Miyazono K.	Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5.	Genes Cells Feb;9(2):143-151.	2004
Fan W, Yanase T, Wu Y, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H.	Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells.	Mol. Endocrinol. Jan;18(1):127-141.	2004
Yamamoto Y, Wada O, Takada I, Yogiashi Y, Shibata J, Yanagisawa J, Kitazato K, Kato S.	Both N- and C-terminal transactivation functions of DNA-bound ERalpha are blocked by a novel synthetic estrogen ligand.	Biochem. Biophys. Res. Commun Dec 19;312(3):656-662.	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, <u>Yanagisawa</u> J.	Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function- 1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells.	J. Biol. Chem. Jul 18;278(29):26704-26714.	2003
Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, <u>Yanagisawa J.</u> Kato S.	The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome.	Cell Jun 27;113(7):905-917.	2003
Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, <u>Yanagisawa J.</u> Fujii-Kuriyama Y, Kato S.	Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.	Nature 29;423(6939):545-550	May 2003

研究者名 柳澤 純