

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16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17年(2005)年 4月



平成 16 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  
分担研究者 柳澤 純 筑波大学応用生物系食品化学教授

### 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 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  $^3\text{H}$ -water 法に加えて新規開発の ELISA 法により新たに 200 化学物質をスクリーニングし、アロマトラーゼ活性を抑制する複数の化学物質を同定した。また、除草剤として頻用されている atrazine と simazine の内分泌攪乱作用機序として Ad4BP/SF-1 依存性の aromatase pomoter II 転写活性の増強作用があることを新たに明らかにした（名和田）。(2) 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 ( $\text{ER}\alpha$ ) の転写活性制御機構の解析を行い、変異型  $\text{ER}\alpha$  を選択的にユビキチン化し、分解するユビキチン・リガーゼ CHIP を同定した。乳癌患者 30 例から調製した RNA サンプルを用い、CHIP の発現量を癌部・非癌部で検討した結果、CHIP の発現は癌部において有意に低下していることが明らかとなった。さらに、これらの知見を踏まえ、新たな内分泌攪乱物質のスクリーニング系を開発した。本系は、従来法のようにレセプターへの化学物質の結合を検討するだけでなく、レセプターに結合する様々な蛋白質との相互作用も同時に観察することが出来るため、一回の実験で得られる情報量が格段に多いのが特徴である（柳澤）。

#### 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。本年度は我々自身が確立した *in vitro* アロマトラーゼ活性を指標としたスクリーニング系を用いた大量化学物質のスクリーニングと過去 2 年度に本系を用いて同定した化学物質の *in vivo* 評価を行った（名和田）また、 $\text{ER}\alpha$  の基礎的作用機構の継続研究と同時に  $\text{ER}\alpha$  の転写活性化因子・抑制因子・分解因子との結合を一度の実験で網羅的に調べることのできる新たなスクリーニング系の構築を試みた（柳澤）。

#### 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化学物質の影響:

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（Endocrinol142: 437, 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を、 $^3\text{H}_2\text{O}$  法により測定した。

また、大塚製薬との共同研究により KGN 細胞を用いた ELISA 法による新規アロマトラーゼアッセイ法を開発し（発表論文 20、米国特許取得）、日本で頻用されている産業化学物質上位 200 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) 化学物質の *in vivo* 効果

平成 14, 15 年度にアロマトラーゼ活性に影響することが判明した化学物質のうち、*in vivo* における雌性生殖機能評価の報告を認めない benomyl と bumetrizol について、メス SD ラットの血中 estradiol (E2) 濃度並びに卵巣、子宮重量に対する影響を検討した。具体的には、いずれの化合物もオリーブオイル中に懸濁液として溶解し、ラットに 400mg/Kg 重量あたりを 3 日間、強制経口投与し、血中 E2 濃度並びに子宮、卵巣重量に与える影響を検討した。

### (3) atrazine と simazine の aromatase 活性上昇機序に関する研究

アロマトラーゼ遺伝子は転写因子の Ad4BP/SF-1 依存性の転写活性を示すことが知られている。我々は NIH3T3 細胞系を用いて Ad4BP/SF-1 依存性のヒト aromatase promoter II (ArPII) の転写活性は protein kinase A (PKA) によって増強されることを報告した。このシステムを利用して、55 の化学物質をスクリーニングし、SF-1 作用に影響を与える化学物質の存在を新たに探求した。また、SF-1 は DAX-1 という他の転写因子によって抑制的にその転写活性が調節されている。上記スクリーニングで陽性となった化学物質については SF-1 と DAX-1 の相互作用に及ぼす影響についても fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) study を用いて解析した。

### (4) エストロゲン受容体機能を修飾する新しい蛋白質複合体の同定

HeLa 細胞の核抽出液より、ER $\alpha$  にリガンド依存的に結合または解離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 CHIP と NRDF、さらに新規転写活性化因子複合体 TFTC を同定した。ユビキチン・リガーゼの ER $\alpha$  の蛋白質量に与える影響を ER $\alpha$  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。また、CHIP の臨床的意義を明らかにする目的で、乳癌患者 30 名より癌部と非癌部を採取し、RNA を調製し、リアルタイム PCR にて mRNA 量を定量した。

### (5) ER $\alpha$ と結合蛋白質の相互作用に及ぼす内分泌かく乱物スクリーニング系の開発と探索

ER $\alpha$  に結合する蛋白質の結合領域を合成ペプチドで作成し、96穴プレート上に結合させた。大腸菌で産生した ER $\alpha$  蛋白質を精製し、ペプチドへの結合度を ELISA 法にて検討することによって内分泌かく乱物質の評価を行った (柳澤)。

(倫理面への配慮)

柳澤の担当したヒトの乳癌患者サンプルを用いた研究については患者すべての承諾を受けた上で、埼玉がんセンターにて同センターの規定に則り調製を行った (埼玉がんセンターとの共同研究)。動物実験に関しては九州大学、筑波大学の

動物取り扱い倫理規定に則り実験を行った。

### C. 結果

#### (1) ELISA 法を用いたアロマトラーゼ活性を指標とした化学物質スクリーニング

$^3\text{H}_2\text{O}$  法による測定で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既に報告していた (BBRC 289, 189, 200) が、新たに同法にて nitrophen, vinclozolin, pp'-DDE, pp'-DDD, PCP 及び bisphenol A に抑制作用を見いだした。また、当初検討した 55 化学物質の中では benomyl に唯一、比較的強力なアロマトラーゼ活性亢進作用があることを見いだした。さらに benomyl の分解産物である carbendazim も、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。ELISA 法を用いた新しいアロマトラーゼ活性の測定系を用い、200 種類の化学物質をスクリーニングした結果、Thiophenol, Bumetizole, Hexabromocyclododecan, disulfiram, 4, 4'-oxybisbenzenamine, 4,4'-(hexafluoroisopropylidene) dianiline, 4-hydroxy-4'-dimethylaminoazobenzene, 6-hydroxy-2-naphthyl disulfide, 5-amino-1-naphthol の 9 つの化学物質をアロマトラーゼ活性を抑制する化学物質として新たに同定した。さらに benomyl に比べて弱いながらも、2, 2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diidobutyrate と 2,4-dihydroxybenzophenone にアロマトラーゼ活性の刺激作用を認めた。

#### (2) 化学物質の in vivo 効果

これらの物質のうち、aromatase 活性を上昇させる物質として benomyl をまた低下させる物質として, bumetizole を選択し、in vivo における生殖系への作用を検討したが、両物質の投与群は対照群に比べてとも血中 E2 濃度並びに子宮、卵巣重量を低下させる傾向を認めたものの有意差は認めなかった。

#### (3) atrazine と simazine の aromatase 活性上昇機序に関する研究

SF-1 を強制導入した NIH3T3 細胞において、スクリーニングした 55 化学物質のうち Chloro-s-Triazine タイプの除草剤である atrazine と simazine のみ

が SF1-依存性 の ArPII 転写活性を 2-3 倍増強した。SF-1 非存在下ではこのような効果はどの化学物質でも認められなかった。一方、KGN 細胞では内因性 SF-1 の発現レベルが高くないために、atrazine あるいは simazine による aromatase 活性の変化を認めなかったが、KGN 細胞に Adeno-SF1 virus を感染させ強制的に SF-1 を大量発現させたところ 対照細胞 (Adeno-LacZ virus 感染) に較べてアロマターゼ活性の顕著な誘導効果が認められた。この効果は、real-time RT-PCR による aromatase mRNA レベルの増加を伴った。興味深いことに、SF-1 とそのリプレッサーである DAX-1 の蛋白-蛋白相互作用はこれら二つの化学物質によって減弱し、両化学物質の ArPII 転写活性の促進効果には DAX-1 の SF-1 からの解離促進効果も関与すると考えられた。

#### (4) エストロゲン受容体機能を修飾する新しい蛋白質複合体の同定

昨年度、CHIP と呼ばれるユビキチン・リガーゼを含む蛋白複合体を同定し、CHIP を ER $\alpha$  と共発現させると ER $\alpha$  蛋白質の分解が促進し、ER $\alpha$  の転写活性の増強が認められることを報告した。本年度はさらに CHIP は変異型 ER $\alpha$  を好んで分解すること、さらに熱ショックを細胞に与えた際の ER $\alpha$  の分解も CHIP によって行われることを見出した。これらの結果から CHIP は ER $\alpha$  の品質管理を担っているものと考えられる。エストロゲンは乳癌の増悪因子であり、多くの乳癌では ER $\alpha$  の発現が亢進していることが知られている。CHIP は ER $\alpha$  の品質管理を行っていることから、CHIP の発現低下は ER $\alpha$  の品質の悪化を引き起こし、癌の発生や進展に結びつくものと考えられる。そこで、乳癌患者 30 例の癌部・非癌部で CHIP の mRNA 量を比較した。その結果、癌部では非癌部と比較して有意に CHIP の発現量が低下していることを見出した。CHIP の発現量の低下は、癌のステージが高いものほど著しいことから、品質管理機構の破綻が癌の増悪を引き起こす可能性が考えられた。

#### (5) ER $\alpha$ と結合蛋白質の相互作用に及ぼす内分泌かく乱物スクリーニング系の開発と探索

現行の内分泌かく乱物質のスクリーニングは ER $\alpha$  への化学物質の結合を検討す

ることによって行われる。この方法では、化学物質が ER $\alpha$  に結合した後の作用情報を得ることは不可能である。そこで、新たなスクリーニング系の確立を目指した。ER $\alpha$  結合蛋白質 SRC-1 の ER $\alpha$  との結合領域を合成ペプチドで作成し、96 穴プレート上に固定した。GST 融合 ER $\alpha$  蛋白質を大腸菌中で産生し、グルタチオンビーズを用いて精製したのち、ペプチドを結合したプレートにリガンドとともに添加した。プレートを PBS で 3 回洗浄したのち、抗 ER $\alpha$  抗体を用いて ELISA 法によりプレート上にペプチドを介して結合した ER $\alpha$  量を定量した。その結果、エストロゲンの濃度依存的に ER $\alpha$  がプレート上にトラップされることが明らかとなった (特許出願中)。

#### D. 考察

本研究により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。ELISA 法によるアロマターゼ活性の測定は  $^3\text{H}$ -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。なお、このスクリーニングの過程で発見されたアロマターゼ活性刺激剤の benomyl と抑制剤の bumetizol については標準法にのっとりメスラットの生殖器重量への影響を検定したが、顕著なエストロゲン様あるいは抗エストロゲン様効果は見出せなかった。In vivo 作用としては実際には弱いのか、実験方法の問題なのか、今後の課題としたい。特に benomyl はオスのげっ歯類では精子形成能をはじめとする精巣の機能障害を起こす物質として知られ、むしろ、その意義は胎生期や成熟期の暴露によってオスのメス化や性腺機能低下に関連する意義の方が高いのかもしれない。

除草剤として頻用されている atrazine、simazine は、aromatase の活性の刺激を介するオスのメス化に伴い両生類の数の減少に関連している可能性が指摘されている (PNAS 99: 5476, 2002)。またヒト副腎皮質細胞癌の H295R の aromatase 活性を直接、誘導することが報告されている (Toxicol Sci 54: 121-127, 2000) が、aromatase 活性の誘導に関する詳細な機序は不明であった。今回、その機序の詳細な検討を行なったところ、atrazine や simazine は SF1 依

存性の ArPII 活性の増強を介してアロマターゼ活性を誘導することが判明した。またその機序の一端として、SF-1 の抑制蛋白である DAX-1 を SF-1 から解離させることによって SF-1 の転写活性化を促進している可能性が示唆された。しかしながら、これらの化合物の効果は SF-1 を強く発現する H295R 細胞では認められるが、発現が弱い細胞（例えば KGN）では認められないことから、SF-1 の発現程度に応じた細胞特異性が存在すると考えられる。

ER $\alpha$  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 $\alpha$  の制御機構を理解する上で重要である。本研究において ER $\alpha$  のリガンド依存的・非依存的なユビキチン化機構と、それに引き続く分解機構の解明を目指し、2 種類のユビキチン・リガーゼ、NRDF と CHIP を単離・同定した。CHIP は ER $\alpha$  の品質管理を担い、CHIP の機能低下は ER $\alpha$  の品質低下を招くことから、癌につながるものと考えられる。CHIP は癌マーカーとして有望であるため、現在、モノクローナル抗体の作成を進めている。一部の内分泌かく乱物質や抗乳癌剤は ER $\alpha$  に結合して分解を抑制または促進することが明らかになりつつあり、ER $\alpha$  の分解は今後内分泌攪乱物質を評価する上で重要なファクターとなるであろう。

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 $\alpha$  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。このような観点から分解を指標とした新規スクリーニング系を確立し、日米において特許を出願中である。また、この知見に基づき、内分泌攪乱物質や医薬品をスクリーニングする新たなベンチャー企業を設立した（株式会社アックス：資本金 1000 万円 従業員 4 名）。市販されている内分泌攪乱物質のスクリーニングは ER $\alpha$  への化学物質の結合をエストロゲンとの競合によって検討する方法が使われている。この方法では、化学物質が ER $\alpha$  に結合して転写を活性化するのか、抑制するのか、または、分解を促進するのかなどの情報を得ることは不可能である。本研究では、転写活性化因子・抑制因子・分解因子との結合を一度の実験で網羅的に調べることでできるスクリーニング系を構築している。このスクリーニング系

によって一度の実験で得られる情報が段階に多くなるものと期待される。第一段階として、転写活性化因子と ER $\alpha$  との結合を簡便に検討するスクリーニング系を構築し、現在特許出願準備中である。

#### 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。benomyl の分解産物である carbendazim も、benomyl 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。また、除草剤として頻用されている atrazine と simazine は Ad4BP/SF-1 依存性の ArPII 転写活性の増強作用があることを新たに明らかにした。これらの物質のうち、それぞれ aromatase 活性を上昇、低下させる物質として benomyl と bumetrioazol の in vivo における子宮、卵巣重量を指標とする生殖系へ影響を評価したが、効果を認めなかった。

(2) ER $\alpha$  の転写活性を促進する蛋白質複合体 TFIIIC と ER $\alpha$  の分解に関わる因子、CHIP を同定・解析した。CHIP は変異の入った ER $\alpha$  を選択的に分解することから、ER $\alpha$  の品質管理に関与していると考えられた。また CHIP の発現量は乳癌で低下していることから、ER $\alpha$  の品質管理機構の破綻は、ER $\alpha$  の品質低下を招き、癌の悪性化につながる可能性が示された。

(3) 内分泌攪乱物質の分類と生体への作用予測を可能とする新規スクリーニング系を開発し、新規ベンチャー（株式会社アックス）を設立した。

#### F. 研究発表（論文発表）

(1) 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* 145: 1860-1869, 2004

(2) 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

(3) Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H: SF-1/Ad4BP Transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes Cells* 9: 1239-47, 2004

(4) Ashida K, Goto K, Zhao Y, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nomura M, Nawata H: Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript. *Biochem Biophys Acta* 54; 1000-8, 2005

(5) Ohno, K, Araki N, Yanase T, Nawata H, Iida M: A Novel Nonradioactive Method for Measuring Aromatase Activity Using a Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line and an Estrone ELISA. *Tox Sci* 82: 443-450, 2004

(6) Chu S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Fuller PJ.: Transrepression of Estrogen Receptor (beta) Signaling by Nuclear Factor- $\kappa$ B in Ovarian Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology* : 18:1919-1928. 2004

(7) Yanase T, Adachi M, Goto K, Takayanagi R, Nawata H: Coregulator-related diseases. *Intern Med.* 43(5):368-73, 2004

(8) Fan W, Yanase T, Wei L, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H: Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$  and Retinoid X Receptor Inhibits CYP19 transcription through NF- $\kappa$ B in Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology* 146: 85-92, 2005

(9) Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Hu Y: The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: A possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 146: 237-46, 2005

(10) 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

(11) 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

(12) Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J : Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23:1598-1608, 2004

(13) Iwase S, Januma A, Miyamoto K, Shono N, Honda A, Yanagisawa J, Baba T. : Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun.* 17:322:601-8.2004

(14) Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S. : BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene.* 23: 60000-5, 2004

(15) 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* 23:1598-1608. 2004

(16) 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

(17) \*Tateishi Y, \*Kawabe Y(\*co-first author), Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J : Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23: 1598-1608, 2004

2. 学会発表

(1) 森永秀孝, 名和田 新 他: 変異型アンドロゲンレセプター(AR)T877A の転写活性に影響を与える内分泌攪乱物質のスクリーニング 第 77 回日本内分泌学会総会 (京都: 2004.6.24-26)

(2) Yanase T: Androgen receptor and prostate cancer The US-Japan Workshop on : The role of Nuclear receptors in carcinogenesis : March 22=23, 2004 (Hawai)

(3) Yanagisawa J, Kato S: Regulation of estrogen receptor mediated transactivation : International Congress

(4) 柳澤 純.; 様々な環境応答のメカニズム. 生産系特定産業技術研究推進機構 平成 11 年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」若手研究者支援型採択課題「環境化学物質応答の分子機構の解明」研究総括シンポジウム 「環境応答の分子機構の解明」, つくば, 2004.1

(5) Yanagisawa J : Estrogen receptor are Regulated by Two Independent Ubiquitin-Proteasome Pathways. The 3<sup>rd</sup> International Nuclear Receptor Meeting in Japan, Osaka, 2004.4

(6) 柳澤 純: 核内レセプターの転写制御機構. 第 19 回哺乳動物遺伝学研究会 2004.6.24.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許関連

(1) 特許取得 1 件

United States Patent US 6,803,206 B2

Date of Patent: Oct 12, 2004

Method for identifying endocrine disruptors and kit for carrying out the same.

Innovators: Hajime Nawata, Toshihiko Yanase

Assignee: Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka (JP)

(2) 公開特許 1 件

特開2003-259895

公開日: 平成15年9月16日

発明の名称: 内分泌攪乱物質の検出方法

発明者: 名和田 新、柳瀬 敏彦、大塚製薬株式会社

(3) 特許出願中 2 件

2. 実用新案登録 なし



平成 16 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 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  $^3\text{H}$ -water 法に加えて新規開発の ELISA 法により新たに 200 化学物質をスクリーニングし、アロマトラーゼ活性を抑制する複数の化学物質を同定した。

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系は確立されていない。本年度は我々自身が確立した ELISA によるアロマトラーゼ活性を指標とした大量化学物質のスクリーニングと同定した化学物質の *in vivo* 評価を行った。

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化学物質の影響:

KGN 細胞は高いアロマトラーゼ活性を保持する。既報 (Endocrinol 142: 437, 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を、 $^3\text{H}_2\text{O}$  法により測定した。

また、大塚製薬との共同研究により KGN 細胞を用いた ELISA 法による新規アロマトラーゼアッセイ法を開発し(発表論文 20、米国特許取得)、日本で頻用されている産業化学物質上位 200 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。

以上の方法により平成 14, 15 年度にアロマトラーゼ活性に影響することが判明した化学物質のうち、*in vivo* における雌性生殖機能評価の報告を認めない benomyl と bumetrizol について、メス SD ラットの血中 estradiol (E2) 濃度並びに卵巣、子宮重量に対する影響を検討した。いずれの化合物もオリーブオイル中に懸濁液として溶解し、ラットに 400mg/Kg 重量あたりを 3 日間、強制経口投与し、血中 E2 濃度並びに子宮、

卵巣重量に与える影響を検討した。

アロマトラーゼ遺伝子は転写因子の Ad4BP/SF-1 依存性の転写活性を示すことが知られている。我々は NIH3T3 細胞系を用いて Ad4BP/SF-1 依存性のヒト aromatase promoter II (ArPII) の転写活性は protein kinase A (PKA) によって増強されることを報告した。このシステムを利用して、55 の化学物質をスクリーニングし、SF-1 作用に影響を与える化学物質の存在を新たに探求した。また、SF-1 は DAX-1 という他の転写因子によって抑制的にその転写活性が調節されている。上記スクリーニングで陽性となった化学物質については SF-1 と DAX-1 の相互作用に及ぼす影響についても fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) study を用いて解析した。

C. 結果

$^3\text{H}_2\text{O}$  法による測定で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既に報告していた(BBRC 289, 189, 200)が、新たに同法にて nitrophen, vinclozolin, pp'-DDE, pp'-DDD, PCP 及び bisphenol A に抑制作用見いだした。また、当初検討した 55 化学物質の中では benomyl に唯一、比較的強力なアロマトラーゼ活性亢進作用があることを見いだした。さらに benomyl の分解産物である carbendazim も、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。ELISA 法を用いた新しいアロマトラーゼ活性の測定系を用い、200 種類の化学物質をスクリーニングした結果、Thiophenol, Bumetrizole, Hexabromocyclododecan, disulfiram,

4, 4'-oxybisbenzenamine, 4,4'-(hexafluoroisopropylidene) dianiline, 4-hydroxy-4'-dimethylaminoazobenzene, 6-hydroxy-2-naphthyl disulfide, 5-amino-1-naphthol の 9 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。さらに benomyl に較べて弱いながらも、2, 2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diidobutyrate と 2,4-dihydroxybenzophenone に アロマターゼ活性の刺激作用を認めた。

これらの物質のうち、aromatase 活性を上昇させる物質として benomyl をまた低下させる物質として、bumetriozol を選択し、in vivo における生殖系への作用を検討したが、両物質の投与群は対照群に比べてとも血中 E2 濃度並びに子宮、卵巣重量を低下させる傾向を認めたものの有意差は認めなかった。

SF-1 を強制導入した NIH3T3 細胞において、スクリーニングした 55 化学物質のうち Chloro-s-Triazine タイプの除草剤である atrazine と simazine のみが SF1-依存性の ArPII 転写活性を 2-3 倍増強した。SF-1 非存在下ではこのような効果はどの化学物質でも認められなかった。一方、KGN 細胞では内因性 SF-1 の発現レベルが高くないために、atrazine あるいは simazine による aromatase 活性の変化を認めなかったが、KGN 細胞に Adeno-SF1 virus を感染させ強制的に SF-1 を大量発現させたところ対照細胞 (Adeno-LacZ virus 感染) に較べてアロマターゼ活性の顕著な誘導効果が認められた。この効果は、real-time RT-PCR による aromatase mRNA レベルの増加を伴った。興味深いことに、SF-1 とそのリプレッサーである DAX-1 の蛋白-蛋白相互作用はこれら二つの化学物質によって減弱し、両化学物質の ArPII 転写活性の促進効果には DAX-1 の SF-1 からの解離促進効果も関与すると考えられた。

#### D. 考察

本研究により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。ELISA 法によるアロマターゼ活性の測定は <sup>3</sup>H-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。なお、このスクリーニングの過程で発見されたアロマターゼ活性刺激剤の benomyl と抑制剤の bumetrisol については標準法にのっとりメスラットの生殖器重量への影響を検定したが、顕著なエストロゲン様あるいは抗エストロゲン様効果は見出せなかった。In vivo 作用としては実際には弱いのか、実験方法の問題なのか、今後の課題としたい。特に benomyl はオスのげっ歯類では精子形成能をはじめとする精巣の機能障害を起こす物質として知られ、むしろ、その意義は胎生期や成熟期の暴露によってオスのメス化や性腺機能低下に関連する意義の方が高いのかもしれない。

除草剤として頻用されている atrazine、simazine は、aromatase の活性の刺激を介するオスのメス化に伴う両生類の数の減少に関連している可能性がある (PNAS 99: 5476, 2002)。またヒト副腎皮質細胞癌の H295R の aromatase 活性を直接、誘導することが報告されている (Toxicol Sci 54: 121-127, 2000) が、aromatase 活性の誘導に関する詳細な機序は不明であった。今回、その機序の詳細な検討を行なったところ、atrazine や simazine は SF1 依存性の ArPII 活性の増強を介してアロマターゼ活性を誘導することが判明した。またその機序の一端として、SF-1 の抑制蛋白である DAX-1 を SF-1 から解離させることによって SF-1 の転写活性化を促進している可能性が示唆された。これらの化合物の効果は SF-1 を強く発現する H295R 細胞では認められるが、発現が弱い細胞 (例えば KGN) では認められないことから、SF-1 の発現程度に応じた細胞特異性が存在すると考えられる。

#### 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。benomyl の分解産物である carbendazim も、benomyl 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。  
(2) 除草剤として頻用されている atrazine と simazine は Ad4BP/SF-1 依存性の ArPII 転写活性の増強作用があることを新たに明らかにした。

(3) aromatase 活性を上昇、低下させる物質として benomyl と bumetrioazol, in vivo における子宮、卵巣重量を指標とする生殖系へ影響評価では効果を認めなかった。

#### F. 研究発表 (論文発表)

(1) 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* 145: 1860-1869, 2004

(2) 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

(3) Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H: SF-1/Ad4BP Transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes Cells* 9: 1239-47, 2004

(4) Ashida K, Goto K, Zhao Y, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nomura M, Nawata H: Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript. *Biochem Biophys Acta* 54: 1000-8, 2005

(5) Ohno, K, Araki N, Yanase T, Nawata H, Iida M: A Novel Nonradioactive Method for Measuring Aromatase Activity Using a Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line and an Estrone ELISA. *Tox Sci* 82: 443-450, 2004

(6) Chu S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Fuller PJ.: Transrepression of Estrogen Receptor {beta} Signaling by Nuclear Factor-{kappa}B in Ovarian Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology* : 18:1919-1928. 2004

(7) Yanase T, Adachi M, Goto K, Takayanagi R, Nawata H: Coregulator-related diseases. *Intern Med.* 43(5):368-73, 2004

(8) Fan W, Yanase T, Wei L, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H: Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$  and Retinoid X Receptor Inhibits CYP19 transcription through NF- $\kappa$ B in Ovarian Granulosa Cells *Endocrinology* 146: 85-92, 2005

(9) Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Hu Y: The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIIB modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: A possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 146: 217-46, 2005

#### 2. 学会発表

(1) 森永秀孝, 名和田 新 他: 変異型アンドロゲンレセプター(AR)T877A の転写活性に影響を与える内分泌攪乱物質のスクリーニング 第77回日本内分泌学会総会(京都:2004.6.24-26)

(2) Yanase T: Androgen receptor and prostate cancer The US-Japan Workshop on : The role of Nuclear receptors in carcinogenesis : March 22=23, 2004 (Hawaii)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許関連

(1) 特許取得 1件  
United States Patent US 6,803,206 B2  
Date of Patent: Oct 12, 2004  
Method for identifying endocrine disruptors and kit for carrying out the same.  
Innovators: Hajime Nawata, Toshihiko Yanase  
Assignee: Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka (JP)

(2) 公開特許 1件  
特開2003-259895  
公開日:平成15年9月16日  
発明の名称:内分泌攪乱物質の検出方法  
発明者:名和田 新、柳瀬 敏彦、大塚製薬株式会社

2. 実用新案登録 なし

平成 16 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 $\alpha$ ) の転写活性制御機構の解析を行い、変異型 ER $\alpha$  を選択的にユビキチン化し、分解するユビキチン・リガーゼ CHIP を同定した (Tateishi *et al.*, *EMBOJ.* in press)。乳癌患者 30 例から調製した RNA サンプルを用い、CHIP の発現量を癌部・非癌部で検討した結果、CHIP の発現は癌部において有意に低下していることが明らかとなった。さらに、これらの知見を踏まえ、新たな内分泌攪乱物質のスクリーニング系を開発した。本スクリーニング系は、従来法のようにレセプターへの化学物質の結合を検討するだけでなく、レセプターに結合する様々な蛋白質との相互作用も同時に観察することが出来るため、一回の実験で得られる情報量が格段に多いのが特徴である (日米特許出願中)。本スクリーニング系を用い、ER $\alpha$  の分解を制御する新たな化合物を見出した。本スクリーニング系の創薬への応用を検討している。

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 $\alpha$ ) 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、本研究では以下の 2 つを目的に研究を進めた。(1) 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 (2) 内分泌かく乱物質のスクリーニング形の開発と探索

B. 研究方法

1) 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

HeLa 細胞の核抽出液より、ER $\alpha$  にリガンド依存的に結合または解離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 CHIP と NRDF を同定した。ユビキチン・リガーゼの ER $\alpha$  の蛋白質量に与える影響を ER $\alpha$  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。

乳癌患者 30 名より癌部と非癌部を採取し、RNA を調製し、リアルタイム PCR

にて mRNA 量を定量した。

2) 内分泌かく乱物質のスクリーニング形の開発と探索

ER $\alpha$  に結合する蛋白質の結合領域を合成ペプチドで作成し、96穴プレート上に結合させた。大腸菌で産生した ER $\alpha$  蛋白質を精製し、ペプチドへの結合度を ELISA 法にて検討することによって内分泌攪乱物質の評価を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては筑波大学の倫理規定に則り実験を行った。ヒトのサンプルについては患者すべての承諾を受けた上で、埼玉がんセンターにて当センターの規定に則り調製を行った (共同研究)。

C. 研究結果

1) 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

ER $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  と共発現させると ER $\alpha$  蛋白質の分解が促進した。一方、CHIP の共発現によって、ER $\alpha$  の転写活性の増強が認められた。CHIP は、変異型 ER $\alpha$  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 $\alpha$  の分解も CHIP によって行われることを見出した。これらの結果から CHIP は ER $\alpha$  の品質管理を担っているものと考えられる (Tateishi et al., EMBO J. in press)。

エストロゲンは乳癌の増悪因子であり、多くの乳癌では ER $\alpha$  の発現が亢進していることが知られている。CHIP は ER $\alpha$  の品質管理を行っていることから、CHIP の発現低下は ER $\alpha$  の品質の悪化を引き起こし、癌の発生や進展に結びつくものと考えられる。そこで、乳癌患者 30 例の癌部・非癌部で CHIP の mRNA 量を比較した。その結果、癌部では非癌部と比較して有意に CHIP の発現量が低下していることを見出した。CHIP の発現量の低下は、癌のステージが高いものほど著しいことから、品質管理機構の破綻が癌の増悪を引き起こす可能性が考えられた。

## 2) 内分泌かく乱物質のスクリーニング形の開発と探索

現行の内分泌攪乱物質のスクリーニングは ER $\alpha$  への化学物質の結合を検討することによって行われる。この方法では、化学物質が ER $\alpha$  に結合して転写を活性化するか、抑制するか、または、分解を促進するのかなどの情報を得ることは不可能である。そこで、現在までの研究で得られた知見を基に新たなスクリーニング系の確立を目指した。ER $\alpha$  結合蛋白質 SRC-1 の ER $\alpha$  との結合領域を合成ペプチドで作成し、96穴プレート上に固定した。GST 融合 ER $\alpha$  蛋白質を大腸菌中で産生し、グルタチオンビーズを用いて精製したのち、ペプチドを結合したプレートにリガンドとともに添加した。プレートを PBS で 3 回洗浄したのち、抗 ER $\alpha$  抗体を用いて ELISA 法によりプレート上にペプチドを介して結合した ER $\alpha$  量を定量した。その結果、エストロゲンの濃度依存的に ER $\alpha$  がプレート

上にトラップされることが明らかとなった (特許出願中)。

## D. 考察

本研究では ER $\alpha$  のリガンド依存的・非依存的なユビキチン化機構と、それに引き続く分解機構の解明を目指し、2 種類のユビキチン・リガーゼ、NRDF と CHIP を単離・同定した。NRDF は ER $\alpha$  の転写活性を促進することから転写とカップルした分解を掌る分子であると考えられる。NRDF の遺伝子欠損マウスは、胎生 8 日で死亡することから、NRDF の標的分子は ER $\alpha$  以外にも存在するものと推測される。一方、CHIP は ER $\alpha$  の品質管理を担当しており、CHIP の機能低下は ER $\alpha$  の品質低下を招くことから、癌につながるものと考えられる。一部の内分泌かく乱物質や抗乳癌剤は ER $\alpha$  に結合して分解を抑制または促進することが明らかになりつつあり、ER $\alpha$  の分解は今後内分泌攪乱物質を評価する上での重要なファクターとなるであろう。このような観点から分解を指標とした新規スクリーニング系を確立し、日米において特許を出願中である。また、この知見に基づき、内分泌攪乱物質や医薬品をスクリーニングする新たなベンチャー企業を設立した (株式会社アックス: 資本金 1000 万円 従業員 4 名)。

市販されている内分泌攪乱物質のスクリーニングは ER $\alpha$  への化学物質の結合をエストロゲンとの競合によって検討する方法が使われている。この方法では、化学物質が ER $\alpha$  に結合して転写を活性化するか、抑制するか、または、分解を促進するのかなどの情報を得ることは不可能である。本研究では、転写活性化因子・抑制因子・分解因子との結合を 1 度の実験で網羅的に調べることでできるスクリーニング系を構築している。このスクリーニング系によって 1 度の実験で得られる情報が格段に多くなるものと期待される。第一段階として、転写活性化因子と ER $\alpha$  との結合を簡便に検討するスクリーニング系を構築し、現在特許出願準備中である。

## 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 $\alpha$ ) の転写活性制御機構に注目し、ER $\alpha$  の分解に関わる因子、CHIP を取得・解析した。CHIP は変異の入った ER $\alpha$  を選択的に分解することから、ER $\alpha$  の品質管理に関与しているものと考えられた(Tateishi et al., *EMBO J.* in press)。CHIP の発現量は乳癌で低下していることから、ER $\alpha$  の品質管理機構の破綻は、ER $\alpha$  の品質低下を招き、癌の悪性化につながる可能性が示された。CHIP は癌マーカーとして有望であるため、モノクローナル抗体の作成を進めている。さらに、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開発し、新規ベンチャー(株式会社アックス: 資本金 1000 万円従業員 4 名) を設立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Unno A, Takada I, Takezawa S, Oishi H, Baba A, Shimizu T, Tokita A, Yanagisawa J, Kato S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 Feb 18;327(3):933-8.
- (2) \*Tateishi Y, \*Kawabe Y(\*co-first author), Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J. : Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.* 2004 23:4813-4823
- (3) Iwase S, Januma A, Miyamoto K, Shono N, Honda A, Yanagisawa J, Baba T. : Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 17;322(2):601-8.
- (4) Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S. : BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene.* 2004 Jun 21
- (5) 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.* 2004 23:1598-1608

(6) 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)

(7) 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)

(8) 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)

(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*, Dec 19;312(3):656-662 (2003)

(10) 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)

(11)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)

(12)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, May 29;423(6939): 545-550, (2003)

(13)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)Transcriptional regulation through ubiquitin-proteasome pathways. Junn Yanagisawa. Nagasaki Symposium on The Nuclear System to Decipher Operation Code (DECODE) for Biological Responses. (文部科学省特定領域研究 遺伝情報発現における DECODE システムの解明 長崎シンポジウム), 長崎, 2004.2.28-3.1

(2)核内レセプターの制御ネットワークとクロマチン. 柳澤 純. 第 27 回日本分子生物学会, 神戸, 2004.12.8-12.11 (1)核内レセプターの転写制御機構. 柳澤 純. 第 19 回哺乳動物遺伝学研究会 2004.6.24.

(3) Estrogen receptor are Regulated by Two Independent Ubiquitin-Proteasome Pathways. Junn Yanagisawa. The 3<sup>rd</sup> International Nuclear Receptor Meeting in Japan, Osaka, 2004.4

(4)様々な環境応答のメカニズム. 柳澤 純. 生産系特定産業技術研究推進機構

平成 11 年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」若手研究者支援型採択課題「環境化学物質応答の分子機構の解明」研究総括シンポジウム「環境応答の分子機構の解明」, つくば, 2004.1

(5)エストロゲンレセプター (ER $\alpha$ ) 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

(6)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

(7)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
Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, <u>Nawata H</u>	A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line (KGN)	Endocrinology 145: 1860- 1869,	2004
Fan W, Yanase T, Yin W, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, <u>Nawata H</u>	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
Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, <u>Nawata H</u>	SF-1/Ad4BP Transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells.	Genes Cells 9: 1239-47	2004
Ohno,K, Araki N, Yanase T, <u>Nawata H</u> , Iida M	A Novel Nonradioactive Method for Measuring Aromatase Activity Using a Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line and an Estrone ELISA.	Tox Sci 82: 443-450	2004
Chu S, Nishi Y, Yanase T, <u>Nawata H</u> , Fuller PJ	Transrepression of Estrogen Receptor {beta} Signaling by Nuclear Factor-{kappa}B in Ovarian Granulosa Cells.	Molecular Endocrinology 18:1919-1928	2004
Yanase T, Adachi M, Goto K, Takayanagi R, <u>Nawata H</u>	Coregulator-related diseases.	Intern Med. 43(5):368-73	2004



<p>Ashida K, Goto K, Zhao Y, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nomura M, <u>Nawata H</u></p>	<p>Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript.</p>	<p>Biochem Biophys Acta 54: 1000-8</p>	<p>2005</p>
<p>Fan W , Yanase T, Wei L, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, <u>Nawata H</u></p>	<p>Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor <math>\gamma</math> and Retinoid X Receptor Inhibits CYP19 transcription through NF-<math>\kappa</math>B in Ovarian Granulosa Cells</p>	<p>Endocrinology 146: 85-92</p>	<p>2005</p>
<p>Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, <u>Nawata H</u>, Hu Y</p>	<p>The orphan Nuclear receptors NURR1 and NGFIB modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: A possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge.</p>	<p>Endocrinology 146: 237-46</p>	<p>2005</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
Kahata K., Hayashi M., Asaka M., Hellman U., Kitagawa H., <u>Yanagisawa J.</u> , Kato S., Imamura T., Miyazono K.:	Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5.	Genes Cells , 9(2):143-151	2004
Murayama A., Kim MS., <u>Yanagisawa J.</u> , Takeyama KI., Kato S.:	Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching.	Br. J. Cancer , Mar 25,	2004
Murayama A., Kim MS, <u>Yanagisawa J.</u> , Takeyama KI, Kato S. :	Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching.	EMBO J. 23:1598-1608	2004
Wada O, Oishi H, Takada I, <u>Yanagisawa J.</u> , Yano T, Kato S. : B	RCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220.	Oncogene. 2004 Jun 21	2004
Iwase S, Januma A, Miyamoto K, Shono N, Honda A, <u>Yanagisawa J.</u> , Baba T. :	Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression.	Biochem Biophys Res Commun. 17; 322(2):601-8.	2004

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
:Tateishi Y, Kawabe Y(*co- first author), Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, <u>Yanagisawa J.</u> : L	Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor.	EMBO J. 23:4813-4823	2004
Unno A, Takada I, Takezawa S, Oishi H, Baba A, Shimizu T, Tokita A, <u>Yanagisawa J,</u> Kato S.:	TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 18; 327(3):933- 8.	2005