

厚生労働科学研究補助金
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14年度～16年度 総合研究報告書

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

目次

I. 総合研究報告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. 研究成果の刊行に関する一覧表、論文11

厚生労働省科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

「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」に関する研究

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、アロマタ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 promoter 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。(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 vinclozolin を同定した。(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すると全身リンパ節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* スクリーニングに有用なシステムである可能性を提示した。(4)マウス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 vinclozolin による遊走能抑制を確認した(以上、名和田)(5)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(柳澤)。(6) $\text{ER}\alpha$ 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化学物質を同定した。その一つである butyl benzyl phthalate (BBP) は、 $\text{ER}\alpha$ を活性化し、乳癌の増殖を促進することを見出した。また、ダイオキシンのエストロゲン様作用が $\text{ER}\alpha$ とダイオキシンレセプターとのクロストークに起因することを明らかにした。さらに、 $\text{ER}\alpha$ の転写活性制御機構の解析を行い、新しい共役因子複合体 TFTC と WINAC を同定した。また、 $\text{ER}\alpha$ と $\text{ER}\alpha$ 結合蛋白質 SRC-1 との結合を利用した新たな内分泌攪乱物質のスクリーニング系を開発した(柳澤)。

分担研究者：柳澤 純・筑波大学大学院応用生物系食品化学教授

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。本研究班では、平成 14-16 年において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エストロゲン受容体(ER)の作用機構についての詳細な研究も行なった。本研究では、以下の(1)-(5)の 5 つの基本的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ことをめざした。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 の転写活性と共焦点顕微鏡画像上、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)。また(5)従来の $\text{ER}\alpha$ への結合阻害や転写活性化能を指標としたスクリーニング系に加えて、 $\text{ER}\alpha$ への転写活性化因子・抑制因子・分解因子との結合を一度の実験で網

羅的に調べることでできる新たなスクリーニング系の構築(柳澤)も目標とした。

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 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 (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。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。

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(発表論文 9)。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。

(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) promoter 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、核で融合蛋白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) *in vivo* における抗アンドロゲン作用物質の新たなスクリーニング系:

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し、腫瘍形成能と転移能を検討した。

(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:

抗アンドロゲン作用を示す vinclozolin 及びコントロールとして抗アンドロゲン剤である flutamide 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) 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 α 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 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。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。

TFTC の ER α の転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。また、乳癌と TFTC との関連を探るため、TFTC のアンチセンス RNA を乳癌細胞内に発現させ、乳癌細胞の増殖に与える影響を検討した(柳澤)。

(6) 新規の内分泌かく乱物質のスクリーニング形の開発と探索:

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。この方法

によって検出・同定した Butyl benzyl phthalate (BBP)の乳癌細胞の増殖に対する効果を MCF-7 細胞を用いて検討した。

ER α 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 α 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)アロマトラーゼ関連結果:

$^3\text{H}_2\text{O}$ 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(発表論文 16)。

ELISA 法を用いた新しいアロマトラーゼ活性の測定系(発表論文 20)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。

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、卵巢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) に比べてアロマトラ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 の蛋白質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。

(2)アンドロゲン活性の *in vitro* スクリーニング系:

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 155 種類の化学物質の影響を検討したところ、vinclozolin が AR(T877A)の転写活性を促進し、共焦点上、転写活性化の指標であるクラスター形成を伴うことを見いだした。vinclozolin 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。また、3,3'-dichlorobenzidine dihydrochloride(DCB)にも弱いながらも同様の活性を見出した。興味深いことに、DCB は野生型の AR のリガンド依存性転写活性に対して、抗アンドロゲン剤 flutamide とほぼ同等の抑制活性を示し、新たな抗アンドロゲン性化学物質であることが判明した。

(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節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* スクリーニング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 vinclozolin 投与は抗アンドロゲン剤の flutamide 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) 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 α の転写制御機構の解明

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複数の蛋白質複合体を精製した。精製した蛋白質複合体の1つである TFRC 複合体は、TRRAP と呼ばれる巨大な足場分子と、ヒストンアセチル化活性を持つ GCN5 とを含み、エストロゲンと結合した ER α に結合して、その転写活性を促進することを明らかとし (発表論文 4, 13)、TFRC の細胞内での機能を探るために、TRRAP のアンチセンス RNA を乳癌細胞株である MCF-7 に発現させたところ、エストロゲン依存的な乳癌細胞の増殖促進が認められなくなったことから、TFRC は乳癌細胞のエストロゲン依存的増殖において重要な役割を担っているものと考えられた。

2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 (発表論文 27)。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。これらの結果から CHIP は ER α 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 α の発現が亢進していることが知られている。CHIP は ER α の品質管理を行っていることから、CHIP の発現低下は ER α 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。

・内分泌かく乱物質のスクリーニング系の開発と探索

60 種類の内分泌攪乱物質と思われる化学物質について、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り検討した。その結果、多くの化学物質が 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。このような化学物質の一つである Butyl benzyl phthalate (BBP)は、ER α に結合し、AF-1 転写活性化因子をリクルートすることによって AF-1 活性を促進する。また、BBP が乳癌細胞の増殖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 (発表論文 12)。この結果は、内分泌攪乱物質が乳癌の増悪に関与する可能性を示唆する。

さらに、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 (発表論文 14)。ダイオキシンが内分泌系、特に女性ホルモン系を攪乱するメカニズムを明らかにしたものである。

現行の内分泌攪乱物質のスクリーニングは ER α 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 α 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 α 結合蛋白質 SRC-1 の ER α 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 α 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 α 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 α 量を定量した。その結果、エストロゲンの濃度依存的に ER α 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。さらに今回導入した ELISA 法によるアロマターゼ活性の測定は ^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。なお、このスクリーニングの過程で発見されたアロマトラーゼ活性刺激剤の benomyl と抑制剤の bumetrizol 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トラ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。

我々は既に、55 種類の化学物質のスクリーニングの結果、nitrophen、vinclozolin、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た (J Biol Chem 276, 28395, 2001)。これらはある種の化学物質が生殖系へ影響する可能性を示唆する成績であるが、今回、抗アンドロゲン剤でありながら vinclozolin 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。また新たに 100 化学物質をスクリーニングする過程で、今まで報告のない新たな抗アンドロゲン剤として、DCB を同定した。

生殖細胞は、生命の継承を担う極めて重要な細胞である。マウスでは胎生 8.5 日に

は尿膜基部に分布し、この始原生殖細胞その後分裂増殖をくり返しつつ腸管膜に沿って移動、11.5 日には将来性腺が発生する生殖隆起に達し、以降は性腺と一体となり成熟した精子、卵子といった生殖細胞へ分化する。生殖隆起から始まる性腺の分化に、アンドロゲン、エストロゲンをはじめとする性ステロイドが必須であり、したがってこれら性ステロイドの作用に変化を与える内分泌かく乱物質が性腺の分化に影響を与えることが予想される。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 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得る可能性がある。本システムを用いて、抗アンドロゲン性内分泌かく乱物質の in vivo スクリーニングを施行する予定である。

本研究では、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った。その結果、ER α にエストロゲン依存的に結合する新たな転写活性化因子複合体である TCTF を同定した。TCTF のアンチセンス RNA を乳癌細胞内で発現させるとエストロゲン依存的な乳癌の増殖が抑制された。したがって、この転写活性化因子複合体は、乳癌の増悪に関与するものと考えられる。

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。本研究において ER α 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 α 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 α 以外にも存在するものと推測される。一方、CHIP は ER α の品質管理を担い、CHIP の機能低下は ER α 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 α 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 α 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。

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、その分子機序に関しては不明であった。本研究では、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。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。

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。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 α 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 α 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の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 α 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、*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。

(2) ヒト前立腺癌で認められる T877A 変異を有する AR に対して vinclozolin は転写刺激活性を有した。

(3) 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節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* スクリーニングシステムとなり得る可能性を提示した。

(4) 抗アンドロゲン作用を有する vinclozolin 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系を確立した。

(5) ER α の転写活性を促進する蛋白質複合体 TFTC と ER α 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 α を選択的に分解することから、ER α 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 α の品質管理機構の破綻は、ER α 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。また、TFTC のアンチセンス RNA はエストロゲン依存的な乳癌細胞増殖を抑制することから、TFTC が乳癌増殖促進に関与することが示唆された。

(6) 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。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確立し、多くの内分泌攪乱物質を同定した。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 活性化作用を見出した。

F. 研究発表

1. 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) 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.* ;9:553-62, 2002

(5) 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.* 6;277:32875-32882, 2002

(6) 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 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol. Cell Biol.* 22:3698-706, 2002

(7) 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

(8) 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 β in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line. *Fertil Steril.* 79:151-7, 2003

(9) 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

(10) 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

(11) 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 ER α are blocked by a novel synthetic estrogen ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 312:656-662, 2003

(12) 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

(13) 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* 27;113:905-17, 2003

(14) 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* 29;423: 545-550, 2003

(15) 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

(16) 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

(17) 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

(18) 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

(19) 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

(20) 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

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

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

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

(24) 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

(25) 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

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

(27) 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: 4813-23, 2004

(28) 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

(29) 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, 6000-5, 2004

(30) 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

2. 学会発表

(1) 名和田 新: 特別講演「社会ニーズに応えた 21 世紀の内分泌・糖尿病の研究と臨床」第 19 回日本臨床内科医会総会 (名古屋: 2002.3.30)

(2) 名和田 新: 教育講演「転写因子・共役因子の臨床の展望」第 75 回日本内分泌学会総会 (大阪: 2002.6.28-30)

(3) 柳瀬敏彦, 名和田 新他: シンポジウム: 核内受容体の新展開 アンドロゲン受容体 (AR) 並びに同拮抗剤の作用機構 第 75 回日本内分泌学会総会 (大阪: 2002.6.28-30)

(4) 後藤公宣, 名和田 新他: 新規 AR AF-1 結合性転写共役因 ANT-1 の核内分布 第 75 回日本内分泌学会総会 (大阪: 2002.6.28-30)

(5) 野村政壽, 名和田 新他: 妊娠初期の抗アンドロゲン剤暴露による始原生殖細胞の発生分

化への影響 第75回日本内分泌学会総会 (大阪:2002.6.28-30)

(6) 斎藤雅之, 名和田 新他: AF-1 及び AF-2 領域は完全なアンドロゲン受容体(AR)転写活性に必須であり、活性化 AR は他の活性化ステロイドレセプター(SR)と同一の核内 compartment に集積する 第75回日本内分泌学会総会 (大阪:2002.6.28-30)

(7) 向笠千寿, 名和田 新他: 卵巣顆粒膜細胞におけるアクチビンシグナル伝達とその役割 第75回日本内分泌学会総会 (大阪:2002.6.28-30)

(8) 田中公貴, 名和田 新他: 前立腺癌細胞におけるアンドロゲンシグナルとアクチビンシグナルの相互作用 第75回日本内分泌学会総会 (大阪:2002.6.28-30)

(9) 森永秀孝, 名和田 新他: CYP19 (アロマターゼ) 活性に影響を及ぼす内分泌攪乱物質の検討 第75回日本内分泌学会総会 (大阪:2002.6.28-30)

(10) 趙 越, 名和田 新他: 新規 AR AF-1 結合性転写共役因子 ANT-1 の解析 第75回日本内分泌学会総会 (大阪:2002.6.28-30)

(11) 後藤公宣, 名和田 新他: シンポジウム: 脂溶性メディエーターと受容体研究 アンドロゲン受容体と核内コンパートメント 第75回日本生化学会 (京都:2002.10.14-17)

(12) 野村政壽, 名和田 新他: シンポジウム: 内分泌攪乱作用研究の進展 化学物質の抗アンドロゲン作用の発現機構 第75回日本生化学会 (京都:2002.10.14-17)

(13) 野村政壽, 名和田 新他: ワークショップ: 環境化学物質に対する生物応答の分子基盤 化学物質による性ステロイドホルモン系の攪乱作用の分子機構 第25回日本分子生物学会年会(横浜:2002.12.11-14)

(14) 名和田 新: 会頭講演 21世紀の内分泌代謝学の展望: 予防から先端医療まで 第100回日本内科学会総会 (福岡:2003.4.1-3)

(15) 森永秀孝, 名和田 新他: 内分泌かく乱物質 Benomyl の CYP19 (アロマターゼ) に対する作用機序の解析 第76回日本内分泌学会学術総会 (横浜:2003.5.9-11)

(16) 斎藤雅之, 名和田 新他: ステロイド受容体(AR,GR)の転写活性化能に及ぼす NcoR、AP-1 の作用 第76回日本内分泌学会学術総会(横浜:2003.5.9-11)

(17) 田中公貴, 名和田 新他: 前立腺癌細胞の in vivo 増殖におけるアクチビン受容体シグナルの役割 第76回日本内分泌学会学術総会 (横浜:2003.5.9-11)

(18) 范 吳強, 名和田 新他: 共焦点顕微鏡並びに FRAP を用いた Ad4BP と DAX-1 の核内相互作用の解析 第76回日本内分泌学会学術総会 (横浜:2003.5.9-11)

(19) 名和田 新: ステロイドホルモンとステロイドホルモン受容体と内分泌攪乱物質 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム (湘南:2003.6.13-14)

(20) 渡辺哲博, 名和田 新他: アンドロゲン受容体依存性転写活性を抑制する内分泌攪乱物質の作用機序 第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム (東京:2003.10.21-22)

(21) 森永秀孝, 名和田 新他: 内分泌かく乱物質 Benomyl の CYP19 (アロマターゼ) に対する作用機序の解析 第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム (東京:2003.10.21-22)

(22) 田中公貴, 名和田 新 他: 前立腺癌細胞におけるアンドロゲン受容体とアクチビンシグナルのクロストーク 第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム (東京:2003.10.21-22)

(23) 野村政壽, 名和田 新 他: 妊娠初期の抗アンドロゲン剤暴露による始原生殖細胞の発生分化への影響 第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム (東京:2003.10.21-22)

(24) 范 妹麗, 名和田 新 他: アンドロゲン受容体 AF-1 領域結合タンパク質 ANT-1 の同定と機能解析 第4回内分泌かく乱物質領域シンポジウム (東京:2003.10.21-22)

(25) 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)

(26) 柳澤 純, 加藤茂明: 骨と核内レセプター: 第75回日本内分泌学会学術総会シンポジウム(大阪)平成14年6月29日

(27) 柳澤 純, 北川浩史, 加藤茂明: 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: 第3回ホルモンと癌研究会(仙台)平成14年8月2日-3日

(28) Yanagisawa J, Kato S: Regulation of estrogen receptor mediated transactivation: International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer, 11th International Congress on Hormonal Steroids (ICHS)/7th International Congress on Hormones and Cancer (ICHC), Fukuoka, October 21-25, 2002,

(29) 柳澤 純: 核内レセプターの転写制御メカニズム: 第4回分子血管研究会 (東京)2003年1月10日-11日

(30) 柳澤 純: ユビキチン・ネットワークによる核内レセプターの制御: 第26回日本分子生物学会(神戸)2003年12月10日-13日

(31) 柳澤 純: エストロゲンレセプター (ER α) の制御機構: 川辺洋一、第 26 回日本分子生物学会(神戸) 2003 年 12 月 10 日-13 日

(32) 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

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

(34) 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

研究成果の刊行に関する一覧表

1

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, <u>Nawata H</u> :	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, <u>Nawata H</u> :	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
<u>Nawata H</u> , 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
<u>Yanagisawa J</u> , 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: 553-62	2002

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
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. 6; 277:32875-32882	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 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex.	Mol. Cell Biol. 22: 3698-706	2002
Mukasa C, Nomura M, Tanaka T, Tanaka K, Nishi Y, Okabe T, Goto K, Yanase T, <u>Nawata H</u> :	Activin signaling through type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like KGN cells.	Endocrinology144: 1603-11	2003
Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, <u>Nawata H</u> , 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
Fan W, Yanase T, Wei L, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, <u>Nawata H</u> :	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., <u>Nawata H</u> :	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

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Yamamoto Y., Wada O., Takada I, Yogiashi Y, Shibata J, <u>Yanagisawa J.</u> 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
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 J.</u> :	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
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</u> <u>J.</u> ,Kato S:	The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome.	Cell 27: 113:905-17	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 423: 545-550	2003

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Suzawa M, Takada I, <u>Yanagisawa J</u> , 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
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
Ashida K, Goto K, Zhao Y, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nomura M, <u>Nawata H</u> :	Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript.	Biochem Biophys Acta 54: 1000-8	2005

著者氏名	論文タイトル名	発表紙名・号・ページ	出版年
Ohno,K, Araki N, Yanase T, <u>Nawata</u> <u>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</u> <u>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: 368-73	2004
Fan W , Yanase T, Wei L, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, <u>Nawata</u> <u>H</u> :	Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor g and Retinoid X ReceptorInhibits CYP19 transcription through NF-kB in Ovarian Granulosa Cells	Endocrinology 146: 85-92	2005
Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, <u>Nawata H</u> , Hu Y;	The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB mudulate aromatase gene expression in ovarian granulose cells: A possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge.	Endocrinology 146: 237-46	2005
Murayama A, Kim MS, <u>Yanagisawa</u> <u>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
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 ignaling by transcriptional coactivator GCN5.	Genes Cells 9:143-151	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, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, <u>Yanagisawa J.</u> :	Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor.	EMBO J 23: 1598-1608	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 322: 601-8.	2004
Wada O, Oishi H, Takada I, <u>Yanagisawa J,</u> Yano T, Kato S. :	BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220.	Oncogene. 23: 6000-5	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. 327: 933-8	2005

The Presence of Both the Amino- and Carboxyl-Terminal Domains in the AR 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

MASAYUKI SAITOH, RYOICHI TAKAYANAGI, KIMINOBU GOTO, AKIYOSHI FUKAMIZU, ARIHIRO TOMURA, TOSHIHIKO YANASE, AND HAJIME NAWATA

Departments of Medicine and Bioregulatory Science (M.S., K.G., A.T., T.Y., H.N.) and Geriatric Medicine (R.T.), Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan; and Center for Tsukuba Advanced Research Alliance (A.F.), Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan; and CREST (Core Research for Evolutional Science and Technology), JST (Japan Science and Technology) (R.T., K.G., T.Y., H.N.), Kawaguchi 332-0012 Japan

To clarify the physiological significance of the intranuclear speckled distribution, or foci formation, of liganded steroid receptors, the subnuclear distribution of green (GFP), yellow (YFP), and cyan (CFP) fluorescent protein-tagged receptors and coactivators was investigated. The foci formation of 5 α -dihydrotestosterone (DHT)-bound AR-GFP in COS7 cells was abolished by the cotransfection of a CBP Δ (118–2393) fragment eliciting a dominant negative effect on the transactivation capacity of the AR. The N-terminal AR fragment (AR-AF-1-YFP), which has a strong constitutive transactivation function, formed foci without DHT, whereas the C-terminal AR fragment (AR-AF-2-CFP), which has a quite low transactivation function, was distributed homogeneously even in the presence of DHT. The reporter gene assay showed a synergism between the transactivation functions of AR-AF-1 and AR-AF-2. This synergism was not reflected by the above two-dimensional imaging. In contrast, a

three-dimensional imaging method clearly showed a difference in the intranuclear spatial distribution. The DHT-bound wild-type AR-GFP alone or AR-AF-1-YFP plus DHT-bound AR-AF-2-CFP was distributed as approximately 300 discrete spots in one nucleus, whereas AR-AF-1-YFP alone was distributed as one volume in a reticular pattern. Furthermore, not only AR but also the glucocorticoid receptor-YFP, ER α -GFP, and YFP-tagged SRC-1, TIF2, and CBP were found to be accumulated in identical spots in the presence of ligand. All of the above results indicate that CBP is one of the factors essential for foci formation of the AR, and may propose the hypothesis that transcriptionally activated steroid receptors, regardless of the type of receptor, are transferred to common compartments (foci) and form a complex with coactivators, and this process is essential to full transactivation. (*Molecular Endocrinology* 16: 694–706, 2002)

SINCE GREEN FLUORESCENT protein (GFP), which can be observed in living cells, was first introduced into the research of steroid hormone receptors (1–3), understanding of the intracellular dynamics of these receptors along with transcriptional activation has been further deepened. The GFP-GR chimera was found to shift upon ligand-binding from the cytoplasm to the nucleus (1) and to be distributed in a speckled pattern

Abbreviations: AF, Activation function; CBP, CREB-binding protein; CFP, cyan fluorescent protein; DBD, DNA-binding domain; DHT, dihydrotestosterone; GFP, green fluorescent protein; LBD, ligand-binding domain; MMTV, mouse mammary tumor virus; NLS, nuclear localization signal; NTD, N-terminal domain; OHF, hydroxyflutamide; SRC-1, steroid receptor coactivator-1; TIF2, transcriptional intermediary factor 2; YFP, yellow fluorescent protein.

(indicating foci formation) in the nucleus (2). Similar foci formation in the nucleus was thereafter reported in the MR (4), ER α (5, 6), vitamin D receptor (7), and AR (8, 9). Furthermore, in the MR and AR the foci formation of the steroid hormone receptor was shown to be closely linked to transcriptional activation by the receptor. As evidence, the MR and AR were also translocated from the cytoplasm to the nucleus by the addition of an antagonist that inhibited transcriptional activation; however, they were diffusely distributed in the nucleus without making any foci (4, 8, 9). In the MR, ER α , and AR, the foci, distributed in a speckled pattern, were reported to be closely associated with the nuclear matrix (4, 6, 8). However, the mechanism and physiological significance of such foci formation have yet to be elucidated. The steroid hor-

steroid receptors have two major domains for transcriptional activation, activation function 1 (AF-1) in the N-terminal domain (NTD) and activation function 2 (AF-2) in the C-terminal ligand-binding domain (LBD). The transactivation function of the AF-1 region is constitutive, namely, ligand independent and autonomous, and that of the AF-2 is ligand dependent (10). It is known that the transcriptional activation function of the steroid receptor is enhanced by direct binding with coactivators (11) such as CREB-binding protein (CBP) (12), steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) (13) and transcriptional intermediary factor 2 (TIF2) (14). The AR has been reported to be different from the other steroid hormone receptors such as the ER, GR, TR, and PR in that the AF-2 activity in the LBD is negligible or quite low in mammalian cells (15), whereas the intrinsic AF-1 activity is clearly detectable (16–19). In the present study, based on analysis of a chimera of the AR and the fluorescent protein, CBP was found to be essential for the foci formation of the AR in the nucleus. Furthermore, a three-dimensional imaging method that has recently been developed (9) demonstrated that the intranuclear distribution pattern of the N-terminal fragment of the AR containing AF-1 was different than that of the full-length AR, although such differences in foci formation could not be detected by the previous two-dimensional imaging method. Three-dimensional imaging also revealed that in the presence of ligand, the AR, GR, and ER α were all accumulated in identical compartments (foci) containing coactivators. These present findings may suggest that compartmentalization (complete foci formation) in the nucleus is one of the indispensable and common steps for steroid hormone receptor-mediated transactivation.

RESULTS

Effects of SRC-1, TIF2, and CBP on the Subnuclear Distribution of Fluorescent Protein-Fused AR

When pCMV-AR-cyan fluorescent protein (CFP), in which CFP was fused to the C terminus of AR, was transfected into COS7 cells, the AR-CFP was located in the cytosol in the absence of ligand (Fig. 1A) but was translocated into the nucleus upon exposure to dihydrotestosterone (DHT). Moreover, the nuclear distribution of AR-CFP was not uniform, but showed a speckled pattern with the formation of foci (Fig. 1B). When pCMV-yellow fluorescent protein (YFP)-SRC-1 and pCMV-YFP-TIF2, in which YFP was fused to the N termini of SRC-1 and TIF2, respectively, were transfected into COS7 cells, these YFP-tagged coactivators of AR were distributed diffusely in the nucleus (Fig. 1, C and I). Cotransfection of pCMV-AR-CFP in the presence of DHT in addition to pCMV-YFP-SRC-1 or pCMV-YFP-TIF2 changed the subnuclear distribution of these coactivators from a uniform pattern to a foci-forming one (Fig. 1, F and J). The liganded AR-CFP was colocalized with these foci of the coactiva-

tors, indicating that the transcriptionally activated AR recruited YFP-SRC-1 and YFP-TIF2 and rearranged them in the nucleus (Fig. 1, G, H, K, and L). The cotransfection of pCMV-AR-CFP without DHT or the addition of DHT alone did not change the diffuse distribution pattern of the coactivators (Fig. 1, E and D). YFP-CBP, a general integrator for nuclear receptors, was distributed in a mixed pattern with fine foci formation in a diffuse background in the nucleus of COS7 cells (Fig. 2A), unlike YFP-SRC-1 and YFP-TIF2. Upon exposure to DHT, the expressed AR-CFP was translocated from the cytosol (Fig. 2A) to the nucleus, coinciding with CBP and making clear foci (Fig. 2B). Endogenous CBP, which was detected by immunostaining using commercially available anti-CBP antibodies, was found to be distributed in a finely speckled (microparticulate) pattern (Fig. 2C) in the nucleus of pCMV-AR-CFP-transfected cells in the absence of DHT. However, endogenous CBP was not stained immunologically in the AR foci in DHT-exposed cells (Fig. 2D). AR-CFP was diffusely distributed without forming any foci in the nucleus by exposure to the antiandrogenic agent hydroxyflutamide (OHF) instead of DHT as reported (8, 9) (Fig. 2E), *i.e.* the transcriptionally inactive AR does not form foci in the nucleus. Endogenous CBP was detectable immunostaining when this antiandrogen was added (Fig. 2F). These observations suggest that the AR, activated by the addition of DHT, bound to endogenous CBP and masked the anti-CBP antibody recognition site of CBP, and thus might suggest that the DHT-bound AR was immediately recruited by CBP and distributed in a foci-forming pattern. To confirm the essential role of CBP in foci formation, the effect of mutated CBP, which exerts a dominant negative effect on the transactivation function of the AR, on the foci formation of the AR was examined. A series of domain-deletion mutants of CBP were prepared. Among these CBP mutants, the CBP Δ (118–2393) fragment, consisting of only the N-terminal and C-terminal regions, suppressed the AR-dependent transactivation in a dose-dependent manner, and this suppression was recovered by cotransfection of the expression vector for wild-type CBP (Fig. 3). When this CBP Δ (118–2393) expression vector was cotransfected, the foci of AR-GFP were not formed (Fig. 2G), but the foci formation was recovered by further transfection of the wild-type CBP expression vector (Fig. 2H). The foci formation was not affected by cotransfection of the expression vector for CBP Δ (738–2393) (Fig. 2I), CBP Δ (313–468) or CBP Δ (1570–1891) (data not shown), which did not show any dominant negative effect on transactivation (Fig. 3). The above findings show endogenous CBP to be indispensable for the foci formation of the AR. When only the CBP Δ (118–2393) expression vector was transfected, this mutated CBP was found to be distributed diffusely in the nucleus (Fig. 2J), but the distribution of endogenous CBP was not affected by the forced expression of CBP Δ (118–2393) and showed a microparticulate pattern (Fig. 2K) as seen in Fig. 2C. Similar results were obtained when pCMV-AR-CFP was cotransfected and exposed to DHT (Fig. 2, L and M). These