

知られているNumbおよびNumb1の発現も上昇したが、Numb1の発現上昇はHes1, Hes5の発現上昇より早かった。なお、NotchのリガンドであるD111, D113の発現は変動しなかった。これらの結果は、甲状腺ホルモンによりNotchシグナル系がNumbファミリーによる抑制を受けつつ活性化されることを示唆している。Notchシグナル系の活性化が甲状腺ホルモン作用に必須であるかの検証は今後進める。

甲状腺ホルモンシグナルとエストロジェンシグナルとのクロストークの存在の可能性として、ER alpha, ER betaの発現を解析したところ、両者とも発現が上昇することが示された。オリゴデンドロサイト分化に伴い、ERの発現が上昇し、エストロジェン様作用を有する物質への何らかの応答性が増すことが想定された。

D. 考察

昨年度までに、後期胎児神経幹細胞では多種類の核内受容体mRNAが発現していることを明らかにした。特に、オーファンレセプターのRVR, TR4に加え、COUP-TF1, GR, PPARb, TRaなどの発現が高かった。この中でTRaの発現が高いことは甲状腺ホルモン様物質が神経幹細胞にシグナル伝達による影響を与えることを示唆するもので、実際に甲状腺ホルモンのオリゴデンドロサイト分化促進作用を確認した。網羅的遺伝子発現解析により、甲状腺ホルモンがNotchシグナル系を活性化することが示唆されたがその生理的意義の検証が必要である。甲状腺ホルモンと他の核内受容体系とのクロストークについてはエストロジェン受容体に

注目した解析を主としたが、エストロジェン受容体以外にも多数の核内受容体の発現が上昇することが示唆されている。これらの結果は、神経幹細胞における核内受容体間のクロストークは想像通りに多岐に渡り複雑であることを示唆し、1つの核内受容体系のかく乱により、他の核内受容体系にも影響が及ぶことを念頭に置いた研究の重要性を確認するものである。

E. 結論

胎児期のエストロジェン様化学物質への暴露により、神経幹細胞の自己複製能、分化能に影響が生じることが示唆された。また、胎児神経幹細胞では核内受容体TRaが高発現しており、実際に甲状腺ホルモンが作用を発揮しオリゴデンドロサイト分化を促進することが示された。神経幹細胞で高発現している核内受容体は他にもPPARbeta, RVR, GR, COUP-TF1, TR4などがあり、これらの神経幹細胞における生理機能を調べ、これら受容体に作用する化学物質が神経幹細胞に及ぼす影響を今後検討してゆく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T,

Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostral-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005

2. 学会発表

◎菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第15回環境ホルモン学会講演会、2005年6月2日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", Jun 5-10, 2005, NH, USA

◎菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害の Percellome トキシコゲノミクス研究、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

◎五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野 純、Gene

expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the "Percellome" system as a model for molecular developmental toxicity、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

菅野純、WHO Children's Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第17回神経行動毒性研究会、2005年8月5日、東京

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives", August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in

Mechanistic Toxicology, 9th ICEM
Satellite Meeting on
Toxicogenomics, August 30 - September
2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi
Ono, Yukio Kodama, "Percellome" mRNA
normalization system for microarrays
and quantitative PCR. 9th ICEM
Satellite Meeting on Toxicogenomics,
August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野純、
Diethylnitrosamine によるマウス肝遺
伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会
学術総会、2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎
健一、北嶋聡、菅野純、飼料中の植物エ
ストロジェンがトランスクリプトーム
に及ぼす影響、環境ホルモン学会第 8 回
研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、
北嶋聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおけ
る視床下部-下垂体-性腺系の性周期遺
伝子発現の Percellome 解析、環境ホル
モン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9
月 27-29 日、東京

◎Jun Kanno, Approaches by Basic
Biology to Reinforce the Screening and
Testing Strategy for the Endocrine
Disruptors, KFDA/NITR International
Symposium, Oct 11-12, 2005, Korea

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認
に関する課題、三菱安全化学研究所講演
会、2005 年 12 月 1 日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun
Kanno, Mass Distributed Clustering :
A New Clustering Algorithm for
Repeated Measurements in Gene
Expression Data, The 16th
International Conference on Genome
Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉
幸夫、菅野純、Diethylnitrosamine 及び
N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝
遺伝子発現変動解析、第 28 回日本分子
生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野
純、マウス口蓋形成過程に発現する遺伝
子のマイクロアレイ解析、第 28 回日本
分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福
岡

北嶋 聡、Glenn I. Fishman、富田幸
子、井上 達、菅野 純、相賀裕美子、
転写因子 Mesp1 非発現細胞はマウス刺
激伝導系細胞に寄与する、第 28 回日本
分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福
岡

安彦 行人、原口 清輝、高橋 雄、菅
野 純、相賀 裕美子、Notch シグナル
は Tbx6 依存的に Mesp2 発現を活性化す
る、第 28 回日本分子生物学会、2005 年

12月7-10日、福岡

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 17 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

内分泌攪乱物質の中樞影響に関する研究

分担研究者 粟生修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授

研究要旨

内分泌攪乱物質の中樞神経系に及ぼす影響を行動およびニューロンレベルで解明することを目的とし、発達期の諸段階で内分泌攪乱物質を母ラットに投与し、仔ラットの成長後の行動特性を種々の行動評価法で調べた。BPA は主として雄に作用し、探索行動の性分化を障害し、雄のうつ反応を増強した。前者は出産前 1 週間、後者は出産後 1 週間がとくに感受性が高い。1-BP は主として雌に影響を及ぼし探索行動やうつ反応の性分化を障害した。BPA は耐用 1 日摂取量以下でも探索行動の性分化を障害し、うつ反応を増強する。前者は胎生期が、後者は新生児期が主要な臨界期と考えられる。1-BP も新たな内分泌攪乱物質の可能性が高い。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質の中樞神経系に及ぼす影響を行動およびニューロンレベルで解明することを目的とする。

本年度はビスフェノール A (BPA) の胎生期および新生児期曝露の行動の性分化および情動行動に及ぼす影響を比較検討した。またフロン代替物質として溶剤などに使われている 1-ブロモプロパン (1-BP) の行動の性分化に及ぼす影響も調べた。

B. 研究方法

発達期の諸段階で内分泌攪乱物質を母ラットに投与し、仔ラットの成長後の行動特性を種々の行動評価法で調べた。

活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十

字迷路試験、回避学習の評価に受動的回避学習試験、うつ反応の評価に強制水泳試験を用いた。0.1ppm の BPA を飲料水に混ぜて母ラットに投与し、仔ラットの行動を評価した。行動評価法として、1-BP は母ラットを曝露チェンバーに 1 日 6 時間置き、20 日間 700ppm の濃度で曝露した。行動評価法として、活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十字迷路試験、回避学習の評価に受動的回避学習試験、うつ反応の評価に強制水泳試験を用いた。

実験はすべて「九州工業大学大学院生命体工学研究科における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

C. 研究結果

BPA は主として雄に作用し、探索行動の性

分化を障害し、雄のうつ反応を増強した。前者は出産前1週間、後者は出産後1週間がとくに感受性が高い。1-BP は主として雌に影響を及ぼし探索行動やうつ反応の性分化を障害した。

BPA は立ち上がり行動の性差を消失させたが、その効果は胎児期曝露がより強かった。一方、強制水泳試験における不動時間の増加作用は新生児期曝露のほうが効果が強かった。高架十字迷路試験、受動的回避学習試験では影響は認められなかった。

本研究では妊娠ラットに 1-BP (700ppm) を day1-day20 までの 20 日間繰り返し曝露したのち、生まれた仔が成熟後に行動の性分化および海馬電気生理学的特性を調べた。性成熟や生後発達にははっきりとした影響はなかった。オープンフィールド試験における探索行動や強制水泳試験における不動時間（うつ反応の指標）の性差が消失し、行動の性分化が障害されることが明らかになった。受動的回避学習ならびに高架十字迷路試験では有意の変化は認められなかった。さらに 1-BP 曝露群の海馬切片標本で興奮性に変化が認められた。

D. 考察

1-ブロモプロパン(以下 1-BP)は産業界では洗浄溶剤として多く使われているフロン代替化合物であり、1-BP の生殖器ならびに成熟脳への影響が報告されている。BPA は、出産前後いずれの曝露でも探索行動の性差を障害させ、不動時間を増強させる。しかし、探索行動の性差は出産前曝露による影響により強く影響され、不

動時間の増強は出産後曝露においてより顕著に確認された。探索行動の発現には海馬、青斑核が関与していることが示唆されており、胎生期間におけるこれらの発達に BPA が深く関わっていると考えられる。一方、不動時間で評価されるうつ反応の発現は、特に新生児期のセロトニン系の発達の阻害に基づいていることが種々のモデル動物の実験で示されており、今回の不動行動の結果が新生児期に強く発現したことは、BPA が特に新生児期にセロトニン系の発達に影響を与えた可能性がある。

1-BP は産業界では洗浄溶剤として多く使われているフロン代替化合物であり、1-BP の生殖器ならびに成熟脳への影響が報告されている。今回の結果は、1-BP が新たな環境ホルモン類似物質としての可能性を示したものであり今後、性行動試験、空間学習試験、脳の組織学的評価による性差確認など、さらなる評価が必要である。

E. 結論

BPA は耐用 1 日摂取量以下でも探索行動の性分化を障害し、うつ反応を増強する。前者は胎生期が臨界期であり、うつ反応の増強の臨界期は新生児期と考えられる。1-BP も新たな内分泌攪乱物質の可能性が高い。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. ©Fujimoto T, Kubo K, Aou S (2005)

- Prenatal exposure to Bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rat. Brain Res in press
2. Aou S, Inoue T, Fujimoto T, Mizuno M, Oomura Y (2005) Brain strategy for energy saving and environmental preservation: perspective from brain-inspired technology. Brain-Inspired IT II in press
 3. Oomura Y, Aou S, Hori N, Fukunaga H, Sasaki K (2005) Plastic effect of glucose increased in the brain during food intake Neuroscience 2005 Press Book Part II in press.
 4. ©Kubo K, Aou S, Nakagawa T, Komune S (2005) Estrogenic chemical disrupt sexual differentiation of the locus coeruleus in Wistar rats. Neuroscience 2005 Press Book Part II in press.
 5. Aou S, Uchida N, Matsunaga Y, Kubo K, Li XL, Hatanaka A (2005) Green odor reduces pain sensation and fatigue-like responses without affecting sensori-motor function. Chemical Sense, 30 (Suppl), 262-263
 6. Kim J, Ishibashi M, Nakajima K, Aou S, Hatanaka A, Oomura Y (2005) Effects of green odor on expression of Fos-immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the thalamus in forced swimming rats. Chemical Sense, 30 (Suppl), 266-267
 7. ©栗生修司、藤本哲也、久保和彦、荒井興夫 (2005) ビスフェノールA暴露の脳の性分化への影響～青斑核における影響～. 性差と医療. 2 (2)、175-178
2. 学会発表
1. 松浦弘典、立野勝巳、栗生修司 (2005) 睡眠リズムのモデル研究による自閉症児脳内過程の理解. 第7回ブレインサイエンスセミナー総合テーマ「物質と脳」. 平成17年5月14日-15日、福岡
 2. ©藤本哲也、久保和彦、荒井興夫、栗生修司 (2005) ビスフェノールA暴露の脳と行動の性分化への影響. 第82回日本生理学会大会サテライトプログラム第一回環境生理学プレコングレス. 平成17年5月17日、仙台
 3. 水野雅晴、栗生修司 (2005) メスザルの視床下部正中隆起におけるパルス状LHRH分泌に対するエストロゲンによる負のフィードバック調整. 第82回日本生理学会大会. 平成17年5月18日-20日、仙台
 4. ©藤本哲也、久保和彦、栗生修司 (2005) 低用量ビスフェノールA新生児期曝露のラットの情動・探索行動への影響：胎生期曝露との比較. 第82回日本生理学会大会. 平成17年5月18日-20日、仙台
 5. ©市原有美、松浦弘典、笛田由紀子、石田尾徹、保利一、栗生修司 (2005) 1-Bromopropaneの胎生期曝露はラット行動の性分化を障害する. 第82回日本生理学会大会. 平成17年5月18日-20日、仙台
 6. ©Aou S, Fujimoto T, Kubo K (2005) NON-TOXIC DOSES OF ENDOCRINE DISRUPTER IMPAIR SEXUAL DIFFERENTIATION OF BEHAVIORS AND ENHANCE DEPRESSIVE BEHAVIOR IN RATS. International Behavioral Neuroscience Society, June 1-4, 2005, Santa Fe.
 7. ©Aou S, Inoue T, Fujimoto T, Kubo K, Hatanaka Akikazu (2005) Chemical impacts on higher brain function in monkeys and rats. p47, The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of

- Brain Science ,and Cardiac and Smooth Muscles, July 22-24, 2005, Kitakyusyu.
8. Mizuno M, Aou S, Terasaw E (2005) Search for mediators of estrogenic inhibition of pulsatile LHRH secretion in female rhesus monkeys. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Science ,and Cardiac and Smooth Muscles, July 22-24, 2005, Kitakyusyu.
 9. ©Fujimoto T, Kubo K, Aou S (2005) Low dose effects of pre-and postnatal exposure to bisphenol A exploratory and emotional behaviors in rats. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Science ,and Cardiac and Smooth Muscles, July 22-24, 2005, Kitakyusyu.
 10. ©Aou S, Ichida Y, Matsuura H, Fueta Y, Ishidao T, Hori H (2005) Effects of prenatal exposure to 1-Bromopropane on sexual differentiation of rat behaviors. The 28th Annual Meeting Of The Japan Neuroscience Society, July 26-28, 2005, Yokohama.
 11. © Fujimoto T, Kubo K, Aou S (2005) Neonatal exposure to bisphenol A affects the exploratory and emotional behaviors in rats : Comparison with prenatal exposure. The 28th Annual Meeting Of The Japan Neuroscience Society, July 26-28, 2005, Yokohama.
 12. Aou S (2005) Environmental chemicals influence brain function and psychosomatic problems. 18th World Congress on Psychosomatic Medicine, August 22-26, Kobe.
 13. Aou S, Inoue T, Fujimoto T, Mizuno M, Oomura Y (2005) Brain strategy for energy saving and environmental preservation: perspective from

brain-inspired technology. P63
The Second International Conference on Brain-inspired Information Technology, October 7-9, 2005, Kitakyusyu.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他 (データベース等)
なし

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

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性ホルモンレセプターの転写共役因子を同定するとともに、ダイオキシンレセプターの相互作用を解析した。その結果、この2者のレセプターが直接相互作用することで、女性ホルモン作用がかく乱することが明らかになった。

A. 研究目的

低容量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。すなわち、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べる。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、特に本年度はダイオキシンレセプターを介した女性ホルモンレセプターへの影響について検討した。

B. 研究方法

男性ホルモン、女性ホルモンレセプターの転写機能を担う転写共役因子の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークを検討した。すなわち、性ホルモンレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定する。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、

ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。

C. 研究結果

男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子のいくつかを同定した。また、ダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターが核内で会合することを見出した。すなわち、

1) ホルモン活性を規定するレセプター
転写共役因子の検索及び同定

男性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子として p54, PSF, PSP1 等を生化学的に同定した。これら因子は、直接男性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に会合することで、転写促進能を亢進することが分かった。また p54は女性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に会合すると、逆に転写機

能を抑制することが分かった。このように p54 は、性ホルモンレセプター群のグローバルな調節因子である可能性が示唆された。

また、女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子複合体として、RNA のスプライシングに関与する複合体の構成因子である SF3a p120 を含む新規転写共役因子複合体を同定した。この複合体は、女性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に Ser¹¹⁸ のリン酸化を認識して特異的に結合し、転写機能を活性化することが分かった。また、この複合体は、女性ホルモンレセプター依存的な RNA のスプライシングにも関与し、それには女性ホルモンレセプターの Ser¹¹⁸ のリン酸化が必須であることも明らかとなった。

2) ダイオキシシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム

ダイオキシシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討することで、活性化されたダイオキシシンレセプターが核内に移行し、結果として、女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。興味深いことに、エストロゲンが結合していないエストロゲンレセプターは、ダイオキシシンレセプター結合により、その転写促進機能が惹起された。一方、エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。また、ダイオキシシンレセプターの分解に関する新規複合体の同定に成功した。この新規複合体はダ

イオキシシンレセプターをユビキチン化することにより分解していることが明らかとなった。また、この複合体はエストロゲンレセプターをもユビキチン化する活性を有していることも明らかとなった。その過程で、エストロゲンレセプターがこの新規複合体によりモノユビキチン化を受けるという全く新しい現象を発見した。現在、エストロゲンレセプターのユビキチン化部位の同定とモノユビキチン化の意義の解析を進めている。

3) 新たな染色体構造調節因子複合体の同定

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER \cdot のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の3つの転写共役因子複合体に加え、第4の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。更に、この複合体群の中にはヒストンメチル化酵素活性を持つものも見出された。そこで、この酵素活性を指標にこの複合体の精製を行っている。

4) ショウジョウバエを用いた男性、および女性ホルモンレセプター転写共

役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒトARを組織特異的に発現する系の構築に成功したが、今年度はER発現ハエラインも樹立した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ERのリガンド依存的な転写機能はGFPの発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFPによる蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、ARを強制発現させたいずれの組織においても観察されている。また、ER・のSer¹¹⁸のリン酸化がCdk7によってなされており、そのリン酸化によってERの転写活性が増強されていることをショウジョウバエの個体レベルで証明した。

D. 考察

性ホルモンレセプターには、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが分かった。しかしながら、これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは判断できなかった。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われる。また、ダイオキシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた。

E. 結論

性ホルモンレセプターの転写制御能を

レセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、男性及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、それらが内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。また、ダイオキシンレセプターとの会合による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

© Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, in press.

© Masuhiro Y, Mezaki Y, Sakari M, Takeyama K, Yoshida T, Inoue K, Yanagisawa J, Hanazawa S, O'Malley B W, Kato S. Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 8126-8131, 2005.

Fujiki R, Kim M, Sasaki Y, Yoshimura K, Kitagawa H, Kato S. Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated

- histones. *EMBO J.*, 2005, in press.
- Oishi H, Kitagawa H, Wada O, Takezawa S, Tora L, Kouzu-Fujita, M, Takada I, Yano T, Yanagisawa J, Kato S. An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J. Biol. Chem.*, 2005, in press.
- ©Furutani T, Takeyama K, Koutoku H, Ito S, Taniguchi N, Suzuki E, Kudoh, M, Shibasaki M, Shikama H, Kato S. Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J. Pharm. Experim. Therapeutics*, 2005, in press.
- © Ogawa S, Oishi H, Mezaki Y, Kouzu-Fujita M, Matsuyama R, Nakagomi M, Mori E, Murayama E, Nagasawa H, Kitagawa H, Yanagisawa J, Kato S. Repressive domain of unliganded human estrogen receptor α associates with Hsc70. *Genes to Cells*, 2005, in press.
- Furutani T, Takeyama K, Koutoku H, Ito S, Taniguchi N, Suzuki E, Kudoh M, Shibasaki M, Shikama H, Kato S. A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, in press.
- 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.*, 327, 933-938, 2005.
- Takada I, Suzawa M, Kato S. Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor γ and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 97, 184-189, 2005.
- Kato S, Fujiki R, Kitagawa H. Chapter 17, Promoter targeting of vitamin D receptor through a chromatin remodeling complex. *In Vitamin D*, 2nd Edition, ed. by Feldman, D, Pike, JW, Glorieux, FH, Elsevier, Inc, San Diego, CA, pp. 305-312, 2005.
- Capuano P, Radanovic T, Wagner C A, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, St-Arnaud R, Murer H, Biber J. Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1 α -OHase deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288, C429-C434, 2005.
- Meindl S, Rot A, Hoetzenecker W, Kato S, Cross S, Elbe-Burger, A. Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br. J. Dermatol.*, 152, 231-241, 2005.

© Wada-Hiraike O, Yano T, Nei T, Matsumoto Y, Nagasaka K, Takizawa S, Oishi H, Arimoto T, Nakagawa S, Yasugi T, Kato S, Taketani Y. The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator or oestrogen receptor . . *Br. J. Cancer*, 92, 2286-2291, 2005.

Fan W, Yanase, T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Sato T, Kawano H, Kato S, Nawata H. Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*, 54, 1000-1008, 2005.

Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa, H, Miyamoto K, Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 280, 2543-2549, 2005.

Bando T, Sekine K, Kobayashi S M. Watabe A, Rump A, Tanaka M, Suda Y, Kato S, Morikawa Y, Manabe T, Miyajima A. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 4166-4175, 2005.

Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda

E, Okano T. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26, 429-440, 2005.

Nakagawa K, Sasaki Y, Kato S, Kubodera N, Okano T. 22-Oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis*, 26, 1044-1054, 2005.

Kallay E, Bises G, Bajna E, Bieglmayer C, Gerdenitsch W, Steffan I, Kato S, Armbrecht H J, Cross H S. Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases—a possible approach for tumor prevention. *Carcinogenesis*, 2005, in press.

Yamamoto K, Uchida E, Urushino N, Sakaki T, Kagawa N, Sawada N, Kamakura M, Kato S, Inouye K, Yamada S. Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D₃ whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I. *J. Biol. Chem.*, 2005, in press.

Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Kuwahata M, Saito H, Fukushima N, Kato S, Kanayama H, Miiyamoto K. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism.

Biochem. J., 390, 325-331, 2005.

2. 学会発表

【国内】

平成17年度年度日本農芸化学会大会

◎ER・の細胞周期依存的機能の解析

岡田 麻衣子、竹沢 慎一郎、目崎 善弘、高田 伊知郎、加藤 茂明

◎ポリグルタミン鎖伸長異常アンドロゲンレセプターによって引き起こされる神経変性はRb/E2F-1 転写調節機能の抑制化により回復する

鈴木 絵里子、武山 健一、伊藤 紗弥、沢津橋 俊、城出 裕子、真木 彰郎、山形 薫、趙 越、Alexander Kouzmenko、相垣 敏郎、多羽田 哲也、加藤 茂明

ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析

盛 真友、松本 高広、秋本 千央、加藤 茂明

分子遺伝学的アプローチによるヒト核内レセプター転写共役因子の探索と機能解析

武山 健一、伊藤 紗弥、沢津橋 俊、城出 裕子、鈴木絵里子、真木 彰郎、趙越、山形 薫、Alexander Kouzmenko、田辺 真彦、多羽田 哲也、加藤 茂明

non-canonical Wnt pathway による核内レセプターPPAR γ 転写抑制機構の解析

高田 伊知郎、須沢 美幸、松本 邦弘、加藤 茂明

クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節

機構の解析

大矢 博之、藤木 亮次、目崎 喜弘、北川 浩史、高田 伊知郎、加藤 茂明

第28回日本分子生物学会

クロマチン構造を介したエクダイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究

沢津橋 俊、武山 健一、伊藤 紗弥、鈴木 絵里子、田辺 真彦、趙 越、山形 薫、城出 裕子、多羽田 哲也、加藤 茂明

◎選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 結合エストロゲン受容体転写制御機構の解析

目崎 喜弘、神津 円、高田 伊知郎、北川 浩史、加藤 茂明

クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析

大矢 博之、藤木 亮次、吉村 公宏、目崎 喜弘、北川 浩史、高田 伊知郎、加藤 茂明

ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する

五十嵐 庸、過足 芳子、三原 正朋、高田 伊知郎、北川 浩史、加藤 茂明

◎ユビキチン化を介したダイオキシン受容体のエストロゲン・シグナル制御

大竹 史明、馬場 敦史、藤井 義明、加藤 茂明

新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC を介した、リガンド依存性ビタミンD レセプター転写抑制機構の解明
藤木 亮次、金 美善、佐々木 康匡、吉村 公宏、北川 浩史、加藤 茂明

◎ER α の細胞周期依存的な ER α の機能解析

岡田 麻衣子、竹沢 慎一郎¹、目崎 喜弘、高田 伊知郎、北川 浩史、加藤 茂明

ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析

盛 真友、松本 高広、秋本 千央、加藤 茂明

第23回日本骨代謝学会

間葉系幹細胞における核内レセプター PPAR γ 転写機能制御機構の解析
高田 伊知郎、須沢 美幸、松本 邦弘、加藤 茂明

◎アンドロゲンの骨増強作用は破骨細胞内ARを介して発揮される

中村 貴、中道 裕子、東 由明、福田 亨、落合 鋭士、加藤 茂明

DNA メチル化制御による 1 α (OH) ase 遺伝子の活性化型ビタミンD 依存的な転写制御機構の解明

金 美善、村山 明子、武山 健一、加藤 茂明

【国際】

EMBO Conference 2005

Ligand-induced transrepression

mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes

S. Kato, A. Murayama, M.-S. Kim, R. Fujiki, H. Kitagawa

1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ -induced transrepression on 1 α -hydroxylase gene promoter is mediated by chromatin remodeling through WINAC

R. Fujiki, M.-S. Kim, Y. Sasaki, H. Kitagawa, S. Kato

ASBMR 27th Annual Meeting

◎ Differentiation switch of mesenchymal stem cells through suppression of

PPAR γ function by NLK

I. Takada, M. Suzawa, S. Takezawa, Y. Yogiashi, Y. Mezaki, M. Igarashi, S. Kato

◎Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts

T. Nakamura, T. Watanabe, Y. Nakamichi, Y. Azuma, K. Yoshimura, T. Matsumoto, T. Fukuda, E. Ochiai, D. Metzger, P. Chambon, T. Sato, S. Kato

The 2nd Advanced Bone and Joint Symposium

◎The function of steroid receptors in bone

S. Kato

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他（データベース等）

なし

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

核内レセプターを介した内分泌かく乱物質の生体影響

分担研究者 ISHWAR S. PARHAR 日本医科大学 第一生理学 講師

研究要旨

GnRH ニューロンにおけるステロイドのゲノミックまたはノンゲノミックな作用には未知の部分が多い。近年では、ステロイドのゲノミック作用が、ある種の G タンパク共役型受容体によって調節されることが示唆されている。硬骨魚類ティラピアより 3 種類の GnRH 受容体の同定し、複数種の GnRH 受容体の発現が同一の下垂体細胞中に認められたことから、正常な性的発達が機能的に heterogeneous な仕組みによって制御されていることが示唆された。さらに、新規 G タンパク共役型受容体 GPR54 が GnRH ニューロンの細胞移動を抑制したことから、GPR54 は GnRH の分泌抑制因子として機能する可能性が示唆された。

A. 研究目的

脊椎動物の生殖機能調節の最終共通路である性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の受容体が、核内受容体を介したステロイドホルモンの作用によって調節を受けることが指摘されている。本研究では、新規に同定した GnRH 受容体および GPR54 の単一 GnRH ニューロンおよび下垂体細胞における発現を解析し、ステロイドホルモンによる G タンパク質共役型受容体の調節作用を解析する。

B. 研究方法

ティラピアより 3 種類の GnRH 受容体および GPR54 遺伝子を同定した。レーザーキャプチャー顕微鏡を用いて採取した単一 GnRH ニューロンおよび下垂体細胞における GnRH 受容体および GPR54 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。

C. 研究結果

PCR 法により 3 種類すべての GnRH 受容体遺伝子の発現が GnRH ニューロンにおいて確認された。また 8 種類の下垂体細胞すべてにおいて、複数種の GnRH 受容体遺伝子が同一の細胞内に発現していた。一方、GPR54 は未成熟に比べて成熟個体の GnRH ニューロン中に有意に高頻度で発現が認められた。

D. 考察

下垂体細胞における複数種の GnRH 受容体の発現は、正常な性的発達が機能的に heterogeneous な仕組みによって制御されることを示唆するものと考えられた。GPR54 が GnRH ニューロンの細胞移動を抑制したことから、GPR54 は GnRH の細胞成長および分泌抑制の制因子として機能する可能性が示唆された。また、これらはステロイドホルモンによる制御も受けるこ

とが知られていることから、今後、ステロイドホルモンと G タンパク質共役型受容体の関係を解析する。

E. 結論

複数種の G タンパク質共役型受容体の発現は、正常な性的発達が機能的に heterogeneous な仕組みによって制御されることを示唆するものと考えられた。

F. 健康危険情報：該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2005). 102 (6): 2204-2209.
2. Parhar IS, Soga T, Ogawa S, Ogawa S, Pfaff DW, Sakuma Y. Nonmammalian gonadotropin-releasing hormone molecules in the brain of promoter transgenic rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2005) 102 (16): 5880-5885.
3. Soga T, Ogawa S, Millar RP, Sakuma Y, Parhar IS. Localization of the three GnRH types and GnRH receptors in the brain of a cichlid fish: Insights into their neuroendocrine and neuromodulator functions. J Comp Neurol. 2005 Jun 20;487(1):28-41.

4. Uchida H, Ogawa S, Harada M, Matushita M, Iwata M, Sakuma Y, Parhar IS. The olfactory organ modulates gonadotropin-releasing hormone types and nest-building behavior in the tilapia *Oreochromis niloticus*. J Neurobiol. 2005 Oct ; 65(1):1-11.

5. Kitahashi T, Sato H, Sakuma Y, Parhar IS. Cloning and functional analysis of promoters of three GnRH genes in a cichlid. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Oct 21;336(2):536-43.

H. 知的所有権の取得状況：該当なし

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

[マイクロアレイ基盤整備]

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立

分担研究者 五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究要旨

本研究は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することを目指すものである。そのために、我々が開発した Percellome 手法を適用した Affymetrix 社の Genechip システムによる網羅的遺伝子発現解析による各班員の研究サポートを実施する。技術基盤整備の一環としてマウス下垂体組織など微量組織サンプルの網羅的遺伝子発現解析を可能とするプロトコルの整備にも成功している。今年度実施中のサポート研究は、マウス前立腺における BPA の作用の網羅的遺伝子発現変動解析、及びマウス胎児培養神経幹細胞の網羅的遺伝子発現解析である。

A. 研究目的

本研究の目的は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することである。

すなわち、ホルモン受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多

種多様であると考えられる。例えば、ホルモン活性物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試験や Hershberger 試験における比較的単純な endpoint でさえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方法が開けてきた。そこで本研究では、当班へ DNA マイクロアレイ技術を導入し、各班員が実施中の研究を

網羅的遺伝子発現解析という側面からサポートする体制を整えることを目的とする。

B. 研究方法

各班員との協議の下、共同研究を行い、組織もしくは細胞の検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析データ解析結果を班員にフィードバックすることで研究をサポートする。

すなわち、

各班員からの検体の RNA の分離精製

生体組織もしくは培養細胞を材料とする。生体組織の場合は、採取後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが 5mm 以下となるように細切する。その後、RNA 抽出操作までは -80℃ にて保存する。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製し、破碎液の 10uL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。培養細胞の場合は、細胞に直接 RLT buffer を添加し、

細胞破碎液を調製する。21G の注射針を通して、ゲノム DNA を裁断した後、破碎液の 10uL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。以降は生体組織の場合と同様である。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬まで、もしくは培養細胞 RLT 破碎液調製までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施した。

Genechip 解析

全 RNA 5 μg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス)、Human Genome 133 2.0 (ヒト) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃ にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

微量組織サンプル解析