

9. レポーター遺伝子を導入した細胞培養系の確立

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

各種化合物の性ステロイドホルモン様活性を検索するシステムを構築することを目的に、性ステロイドホルモンレセプター [ヒトエストロゲンレセプター α 、 β (hER α 、hER β) 及びヒトアンドロゲンレセプター (hAR)] の安定した発現細胞株を外来遺伝子導入によって樹立することを試みた。

研究者協力者

柳澤 純 (東京大学分子細胞生物学研究所 助手)
武山 健一 (東京大学分子細胞生物学研究所 助手)

【はじめに】

内分泌攪乱物質による環境汚染によって引き起こされるヒトを含めた生物への害は、様々な形で、研究調査されている。

1) は、ダイオキシンを始めとした内分泌攪乱物質と目される化合物群の汚染源を調べる調査である。これによって大気中、地中、そして生物体中の存在量が調べられている。しかし前にも述べたように、内分泌攪乱物質群の作用点は複数であること、また化学的測定法に限界があって類似の化合物群や代謝体などを同時に測定できない。従って、このような調査においては、あくまでも代表的な内分泌攪乱物質を指標とした汚染の“目安”を示すにすぎない。全く内分泌攪乱作用点の異なる化合物群についての測定は、場合によっては完全に欠落してしまう可能性が考えられる。

2) としては、性転換生物個体数の調査である。内分泌攪乱物質の影響によると考えられる性転換が、様々な生物で報告されている。しかし、性決定は決して1つの段階で成り立つものではなく、複数の複雑なステップを経ていて、内分泌攪乱物質作用点は複数と予想される。従ってこのような方法は 1) の陥る

全く同じ欠点であり、これも異なった種類の化合物が異なった作用点に作用し性転換を引き起こしている可能性が否めない。従って性転換生物個体数もあくまでも汚染の1つの“目安”に過ぎないように思う。

この報告者は決して 1)、2) の有用性を否定するものではない。このようなアプローチがあつてこそ、内分泌攪乱物質汚染の実態が浮き彫りにされ、世間にも強い関心と認識を喚起することができたことは言を待たない。しかし次の最も重要な布石は、1)、2) の結果をふまえた内分泌攪乱物質作用点の解明であろう。このような作用点を決める研究は、1)、2) とは全く異質な方法論の開発が必要であり、さしあたっては、分子生物学的手法に基づいた基礎研究の展開が大いに期待できる。

そこで我々は、性ステロイドホルモンの分子作用メカニズムに着目した。核内ステロイドホルモンレセプター群が挙げられる。核内ステロイドホルモンレセプターは核内レセプタースーパーファミリーに属し、核内に局在するリガンド誘導性転写制御因子である。従って、後に詳細に述べるように、核内レセプターはリガンドのもつシグナルを遺伝情報へと伝達する変換器として働く(図)。このファミリーに属するレセプターは、リガンド未知のオーファンレセプターを含めると、ヒトではおよそ100種近くも存在すると考えられている。内分泌攪乱物質が、直接性ステロイドホルモンレセプターのリガンドとして働き、

内因性の性ステロイドホルモン作用を攪乱する可能性は最もわかりやすく、説得力のある可能性である。しかし、性ステロイドホルモン作用に完全拮抗するような、いわゆる合成ホルモンアンタゴニストには、性転換能がないことが知られている。従って、性ステロイドホルモンレセプターに作用するとしても、性ステロイドホルモンに対して完全に拮抗するものではなく、性決定という限られた時期にレセプター機能を調節するような効果が想像される。そのような調節作用は、後に詳しく述べるように、レセプターそのものへの効果よりむしろレセプター機能に必須な転写共役因子の機能への影響が考えられる。

同様に、内分泌攪乱物質がこのファミリーに属するオーファンレセプターのリガンドとして作用する可能性を検証することは、最も興味深い対象の1つである。特に最近同定されたPXRはステロイドホルモン代謝体をリガンドとするため、内分泌攪乱物質との関係は目を離せない。

A. 研究目的

低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内ステロイドレセプター群（核内レセプタースーパーファミリー）は、最も内分泌攪乱物質の作用する標的分子としての可能性が高い。そこで、性ステロイドホルモンレセプターの安定した発現細胞株を外来遺伝子導入によって樹立する。この細胞株を用いることで、各種化合物の性ステロイドホルモン様活性を検索するシステムを構築することを目的とする。

同時にレセプターと相互作用する転写共役因子群の同定及び解析を行なう。核内レセプターに作用する転写共役因子はすべてが同定されたわけではなく、その一部のみが同定されている。これら核内レセプター転写共役因子は、薬物レセプターや性決定因子群の転写制御に対しても共通の転写共役因子として働く可能性が推察されているからである。

B. 研究方法

I. ヒト女性ホルモンレセプター (hERα)、ヒト男性ホルモンレセプター (hAR) 高発現細胞株を樹立する。更に、これらの株にレポーター遺伝子を導入することで、恒常的に発現するレポーター遺伝子-レセプターシステムを構築する。この細胞株は高感度に性ホルモンに応答するので、化合物のホルモン様活性をレセプターの転写促進能として検出できる。

実験手法は以下の通りである。

- 1) ヒト女性ホルモンレセプター (hERα)、及びヒト男性ホルモンレセプター (hAR) の転写促進能をエンハンサー応答配列を含むレポーター遺伝子を用いた transient expression assay により検討する。
- 2) ヒト女性ホルモンレセプター (hERα)、及びヒト男性ホルモンレセプター (hAR)、次に hERα, hAR cDNA を transfect させた後、薬剤耐性クローンを選択することで、これら cDNA が染色体 DNA に組み込まれた stable transformant を取得する。これらクローンのうち、レセプタータンパクを十分に発現し、リガンド応答能を有するものを選ぶ。
- 3) 2) で得られた有望クローンのいくつかに、同様の手法により、レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) が染色体 DNA に組み込まれた 2 重の stable transformant を作成する。

II.

- 1) 核内性ステロイドホルモンレセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これに関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれら

の転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター (ER α 、ER β) をモデルとして、ER分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子 (SRC-1/TIF2/AIB1、p300/CBP) と女性ホルモンレセプター (TRAP/DRIP220) の相互作用を中心に調べ p300/CBP はN末側転写促進能に関与することを明らかにした。

2) ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進する co-activator と転写を抑制する co-repressor の存在が知られている。しかしながらこれら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミン D レセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。その結果、ER の N 末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する P68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。P68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

C. 研究成果

I. hER α 、hER β AhAR の転写促進能について transient expression assay によって調べたところ、いずれも当該ホルモンによく応答した。このことから、本系で用いた cDNA から、本来の機能を有する hER α 、hER β AhAR タンパクが産生されることが確認できた。現在、hER α 、hER β AhAR cDNA を取り込んだ stable transformant が数クローン取得され、

更に、高発現するクローンを選択しているところである。

D. 考察

I. hER α 、hER β AhAR を高発現する細胞種が樹立できれば、同一クローン由来の細胞を用いることで、数多くの化学物質のホルモン活性を一度に評価することが可能である。一方、一般に核内レセプター高発現細胞においては、本来の細胞機能が損なわれるため、本課題の目的に合致する細胞系樹立は高度な技術と多くの労力を必要とすることがわかった。

II. 現在、同様の手法により P72RNA ヘリケースを同定しており、それらの性状解析を急いでいる。以上のアプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。

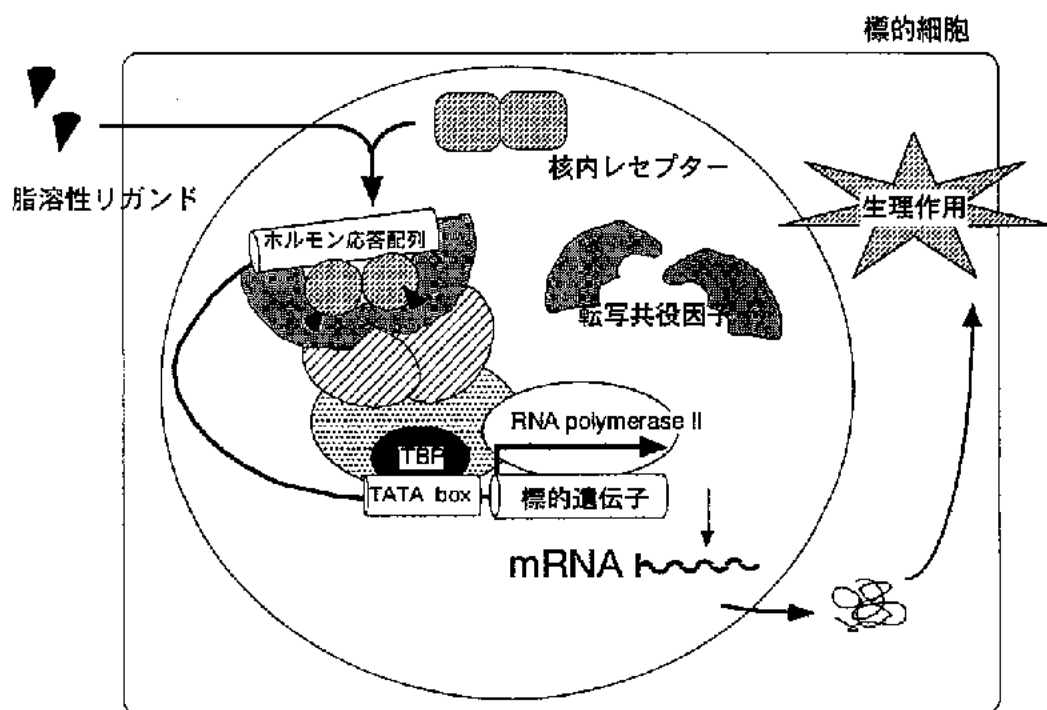
今後は同定した転写共役因子群が内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, **127**, 717-722, 2000.
- 2) Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G.: Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development*, **127**, 2471-2479, 2000.
- 3) Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645-15651, 2000.

- 4) Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).
- 5) Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 410-414, 2000.
- 6) Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen- dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 311-316, 2000.
- 7) Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1049-1055, 1999.
- 8) Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5363-5372, 1999.
- 9) Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, **283**, 1317-1321, 1999.
- 10) Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12971-12974, 1999.
- 11) Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A *trans*-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 248-255, 1999.



10. 内分泌攪乱化学物質をはじめとする環境汚染物質の 野生動物に対する影響と環境評価

ーバイオマーカーを用いた新環境リスク評価システム確立に向けてー

研究者 藤田 正一（北海道大学大学院獣医学研究科・環境獣医科学講座・教授）

研究要旨

肝臓の異物代謝酵素 Cytochrome P450 をバイオマーカーとして、環境汚染の野生生物に対する影響を評価できる可能性を検討することとした。まず、先の我々の研究で、シベリアから飛来するオオワシがPCBやDDTに高度に汚染されていることが明らかになったことから、同じ海域で魚を食べているアザラシに同様の汚染を疑った。そこで、PCBによって誘導される Cytochrome P450 分子種 CYP1A1 について、その含量と活性の両面から検討したところ、それらには大きな個体差があり、アザラシの脂肪に蓄積したコプラナーPCBの濃度と正の相関があった。従って、肝臓の酵素 P450 は汚染の指標として有望なバイオマーカーとなり得る可能性が示された。ついで、アザラシおよびクジライルカ類の Cytochrome P450 のクローニングを行い、一次配列から導かれる系統樹と分類学上の系統樹の対応を考察した。海棲哺乳類間での類縁関係は顕著では無く、鯨類と鯨類はそれぞれが独立した群を構成し、鯨類は肉食獣であるイヌのそれと近縁の関係であることが示され、従来の系統樹と一致した。発現系で得られた Cytochrome P450 の活性を比較し、種差についても考察した。

研究者協力者

数坂 昭夫（北海道大学大学院獣医学研究科
助教授）

岩田 久人（北海道大学大学院獣医学研究科助手）

升田真木彦（元北海道大学大学院獣医学研究科
助教授）

千葉 一成（北海道大学大学院獣医学研究科大学
院生）

A. 研究目的

環境汚染の指標となるバイオマーカーの開発が急務とされている。我々は、異物が生物体内に侵入すると、生体防御反応として誘導されてくる肝臓の異物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) をバイオマーカーとして、環境汚染の野生生物に対する影響を評価できる可能性を検討することとした。今回は、調査対象の動物種として、アザラシ等の海棲哺乳動物を対象とすることとした。

海棲哺乳動物は、海洋生態系食物連鎖の最上位に位置し、生物濃縮による環境汚染物質

の体内蓄積が知られている。1970年代後半より発生した海棲哺乳類の生殖障害と大量死は、環境汚染物質が直接的あるいは間接的原因と考えられてきた(1-5)。PCB、DDT等の有機塩素系化合物が、原因物質として挙げられてきたが未知の汚染物質の寄与も無視出来ない。我が国近海の海洋環境を考える上で、海棲哺乳動物の汚染とその生体影響は重要な指標となることは間違い無い。現在の状況では、我が国近海では、海棲哺乳類の大量死等の目に見える影響はまだ報告されていないが、近海に海棲哺乳類に PCB等の汚染の報告や、イボニシのインボセックスの報告があることから、汚染の影響として、目に見える変化ではなくても、生体に何らかの変化が起きている可能性はある。汚染による生物への影響が不可逆的なものになってしまう以前に、汚染の生物に対する負荷を検知し、対応策を検討しなければならない。

実験動物においては、Cytochrome P450

(CYP)を含む異物代謝酵素が有機塩素化合物をはじめ、様々な汚染物質の曝露により誘導されることが知られている(6)。従って、海棲哺乳類の異物代謝酵素の変動は、未知の汚染物質を含めた複合的な海洋汚染物質への曝露を反映する可能性がある。また、それらの海棲動物種間の種差は、海洋汚染物質に対する感受性の違いをも反映していると考えられる。さらに、異物代謝酵素、特にCYPは、性ステロイド等生理活性物質の合成・代謝に関わる重要な酵素群であり、内分泌攪乱による影響を反映している可能性もある。

従来の海棲哺乳類における異物代謝酵素に関する報告例は断片的であり、体系的な研究はまだなされていない(7)。これまで、分子種の欠落あるいは低酵素活性といった海棲哺乳類に特異的であると思われる性質が示されてきたのみである。また、従来の研究はCYP酵素活性を中心とした蛋白レベルに留まるもので、遺伝子レベルにおける検討もなされてこなかった。

これらの事を考慮し、本研究では、海棲哺乳類がもつ異物代謝酵素の変動を複合的な海洋汚染のモニターのバイオマーカーとして用いることの有用性を検討した。また、環境汚染物質による内分泌攪乱の可能性について、異物代謝酵素によって代謝される生理活性物質の動態から注目した。さらに、海棲哺乳類CYP遺伝子のクローニングを行い、予想されるアミノ酸配列を用いた系統解析と *in vitro* 系での発現実験によるCYP蛋白の機能解析を行った。

B. 研究方法

1997年冬に北海道沿岸で駆除されたミンククジラ、イシイルカ、トド、ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシの成獣を試料として用いた。ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシから、酵素測定用の新鮮肝臓と血清を、また、化学分析用の皮下脂肪を入手した。一方、各種動物の肝臓から常法によりcDNA Libraryを得た。

皮下脂肪中の環境汚染物質濃度はGC/ECD

とGC/MSにより定量した。また、汚染物質のダイオキシン毒性換算等量(TEQ)は、van den Bergら(8)の毒性換算係数(TEF)を用いて算出した。CYP各分子種の活性はmethoxy-, ethoxy-, pentoxy-, bezylloxy-resorfinおよびtestosteroneを基質とする脱アルキル化酵素活性(MROD, EROD, PROD, BROD,)および水酸化酵素活性の測定から、また各分子種の含量はWestern blotting法(Anti-Rat CYP1A, 2B, 3A antiserumを使用)の測定から定量した。新規遺伝子の増幅は、Degenerate PCR法を用いた。予想されるアミノ酸配列を用いた系統解析、RACE法によるCYPのcDNA全長のクローニング、および発現CYP蛋白の機能解析等を行った。蛋白機能解析は、クローニングした各海棲哺乳類CYPをヒト胎児腎臓細胞293Tに過剰発現させ、その細胞から抽出したミクロソーム画分を用いてEROD代謝活性を測定することにより行った。

C. 研究結果、D. 考察

皮下脂肪に蓄積された環境汚染物質質量ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシとも、それらの皮下脂肪に代表的な環境汚染物質であるPCB、DDTのほか各種農薬が検出された(Fig. 1)。そしてDDT、PCB濃度は最高値で海洋表面濃度の各々10億倍、1億倍に濃縮されていた。しかし、それらの値でもアザラシの大量死があった北海、バイカル湖等汚染地域でのそれらよりは低かった。

(a) CYPをバイオマーカーとした環境汚染の評価

複合的な環境汚染の生体に対する影響の強度を評価するために、CYPをバイオマーカーとして使用することの適否を判断するためには、まず、CYPの濃度および活性が汚染物質の生体内あるいは環境中濃度と相関することを確認する必要がある。

実験動物では四つの主要なCYP familyからなる酵素分子種が環境汚染物等により誘導を受けることが明らかになっている。これらはしかし、高濃度で数日間の短期投与の実験

結果である。低濃度の化学物質による長期暴露の影響についての情報は少ない。はたして、海棲哺乳動物のアザラシで、誘導の現象が見られるであろうか。また、見られるとすれば、どの CYP 分子種が誘導されるのであろうか。

本研究では CYP1A1, 1A2, 2B1 および 3A2 の各分子酵素群について注目した。

Table 1 には、ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシで得られたアルコキシマリン脱アルキル化 (AROD) およびテストステロン水酸化酵素活性の測定結果を示した。両アザラシとも、活性に大きなばらつきがあり、平均値を出すことに意味は無いと思われたので、活性の幅で示した。ゴマフアザラシでは特に CYP1A1 依存の EROD 活性が大きな個体間のばらつきを示した。これらの値を個体ごとに汚染物質の濃度と対応させて相関をとると、Table 2 and 3 に示すように有意な相関を示すものが認められた。

特にアルコキシマリン脱アルキル化活性と TEQ および、コプラナー PCB 濃度には有意な相関があり (Fig. 2)、蓄積された汚染物質が汚染濃度に対応する P450 の誘導を起こしていることが強く示唆された。

(b) アザラシ肝臓における CYP2B 分子種

Western blotting 法による CYP 蛋白の染色強度の比較から、アザラシ肝には他動物種と比較して非常に微量の CYP2B 分子種しか存在しないと云う興味ある事実が見出された。しかし、アザラシ肝ミクロソームにもラットなら CYP2B によって触媒されているはずの PROD 活性は検出される。ところが、アザラシ肝ミクロソームでは PROD 活性と CYP2B 含量には相関が無く、むしろ、PROD 活性と CYP1A1 の含量に有為な相関が認められた。アザラシ肝ミクロソームの酵素反応においては CYP1A 分子種が CYP2B 分子種様に作用することが考えられた。このことは、Anti-Rat CYP1A, 2B antisera を用いた阻害実験からも明らかになった (not shown)。

(c) CYP 遺伝子のクローニングと系統解析

CYP1A および CYP3A の P450 分子種についてクローニングを行い、cDNA フラグメントを得た。P450 命名委員会の定義に基づいて、各フラグメントについて得られた塩基配列と翻訳したアミノ酸配列をもとに、CYP3A フラグメントはそれぞれミンククジラ、イシイルカ、トド、ゴマフアザラシ、クラカケアザラシの順に、CYP3A32 から 3A36 と命名をうけた。また、CYP1A フラグメントは CYP1A1 もしくは CYP1A2 のいずれかに分類された。

アミノ酸配列をもとに作製した CYP3A サブファミリーの系統樹を分類学上の系統樹と比較すると、動物種の分類を反映したグルーピングによく一致することが分かった。ここで、ラット、マウス、ハムスターからなる齧歯類グループ、ヒトとサルの霊長類グループ、および独立したモルモットグループ等が見られる。さらに、新しく同サブファミリーに加わった鯨類 CYP はウシ、ヒツジおよびブタからなる偶蹄類とひとつのまとまりを形成していることがわかる。また、鰭脚類 CYP は、イヌからクローニングされた CYP3A12 と近縁の関係にあって食肉類グループを形成している。

一方、CYP1A サブファミリーについて作製した系統樹では、魚類グループ、鳥類グループ、さらに、哺乳類グループ等がクラスターを形成していることがわかる。哺乳類グループは、更に CYP1A1 および 1A2 に大別されている。海棲哺乳類では、鯨類と鰭脚類はそれぞれが独立した群を構成し、鰭脚類は肉食獣であるイヌのそれと近縁の関係であることが示されている。

また、RACE 法によってイシイルカおよびクラカケアザラシの CYP1A1 分子種の全長 cDNA クローニングを行ったところ、CYPcDNA の塩基配列から予想されるこれら二つのアミノ酸配列は 85.7% の相同性を示すことが明らかになった。

(d) 発現 CYP 蛋白の機能解析

各 CYP1A1 cDNA をヒト胎児腎臓細胞 293 T