

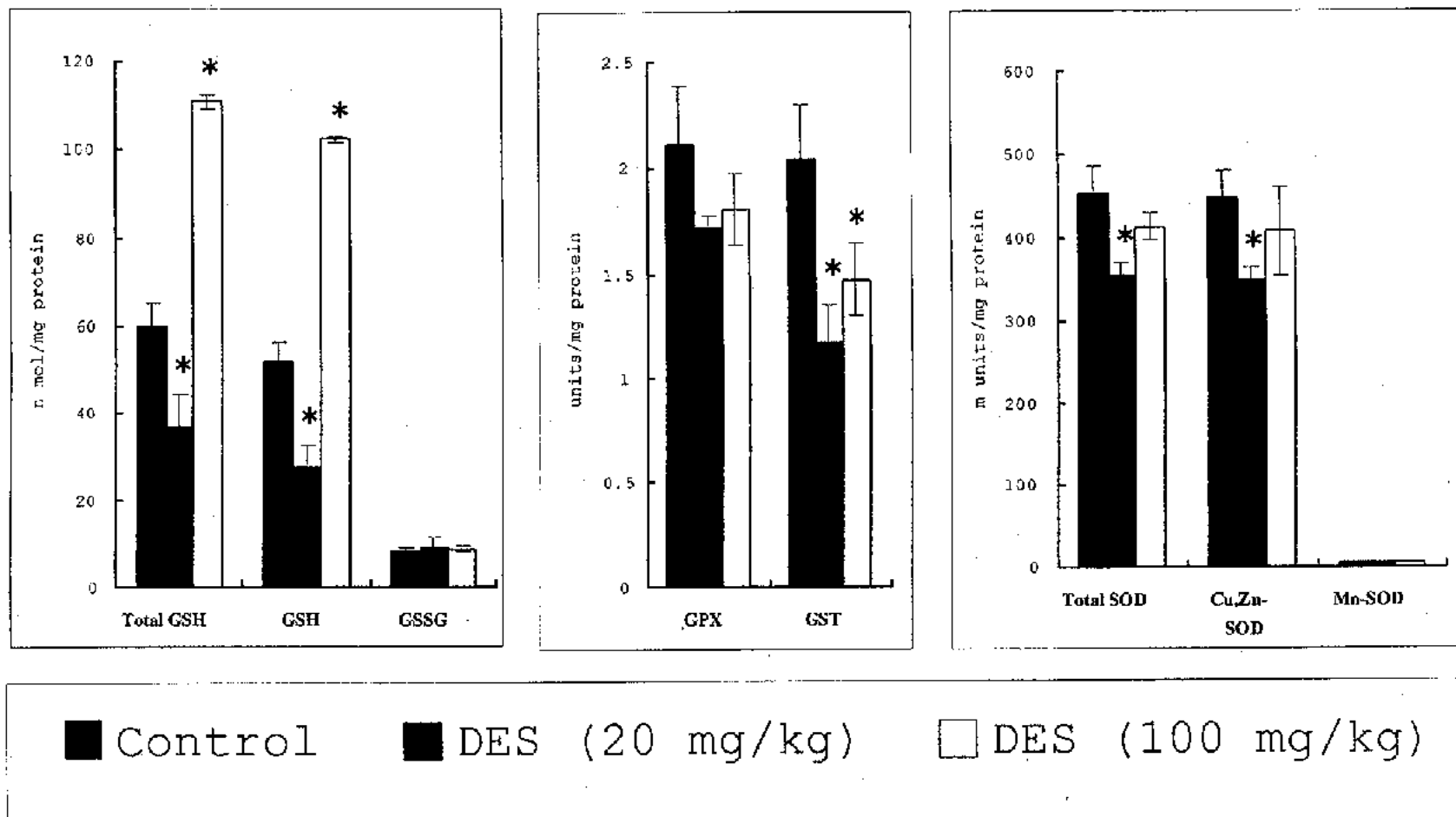
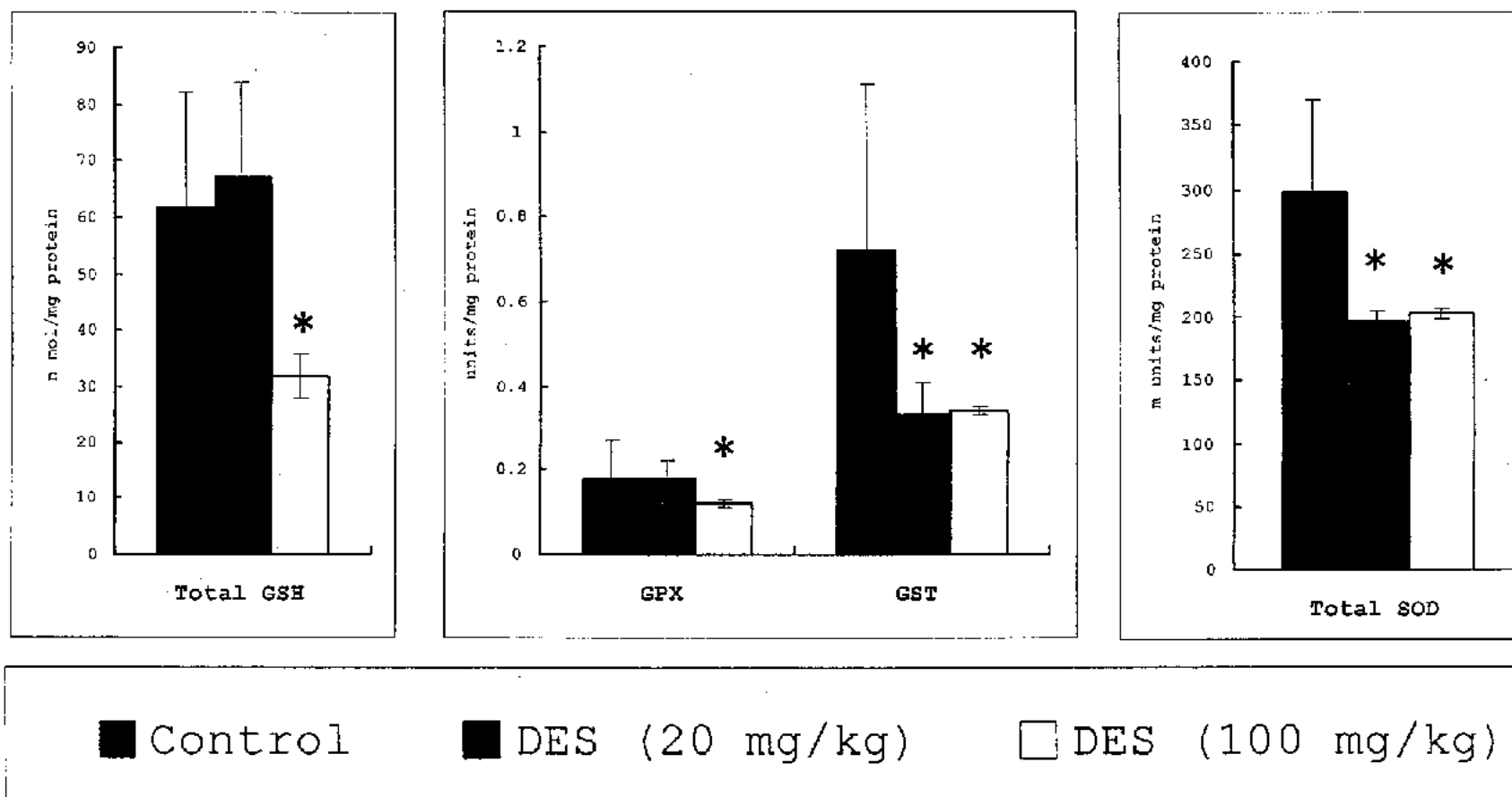


図3：DES投与によるマウス肝における抗酸化機構の変化

成熟雄マウスにDESを20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に肝組織を採取し、抗酸化機能に關与する物質並びに酵素活性の測定を行った。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与したものを用いた。ここで、total GSH:還元型と酸化型グルタチオンの総和、GSH:還元型グルタチオン、GSSG:酸化型グルタチオン、GPX:グルタチオン過酸化酵素、GST:グルタチオンS-トランスフェラーゼ、SOD:スーパーオキシドディスムターゼ、total SOD:Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ活性とMn-スーパーオキシドディスムターゼ活性の総和、であった。*: P < 0.05



* P<0.05

図4: DES投与によるマウス精巣における抗酸化機構の変化

成熟雄マウスにDESを20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、抗酸化機能に関与する物質並びに酵素活性の測定を行った。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与したものを用いた。ここで、total GSH:還元型と酸化型グルタチオンの総和、GPX:グルタチオン過酸化酵素、GST:グルタチオンS-トランスフェラーゼ、total SOD:Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ活性とMn-スーパーオキシドディスムターゼ活性の総和、であった。*: P < 0.05

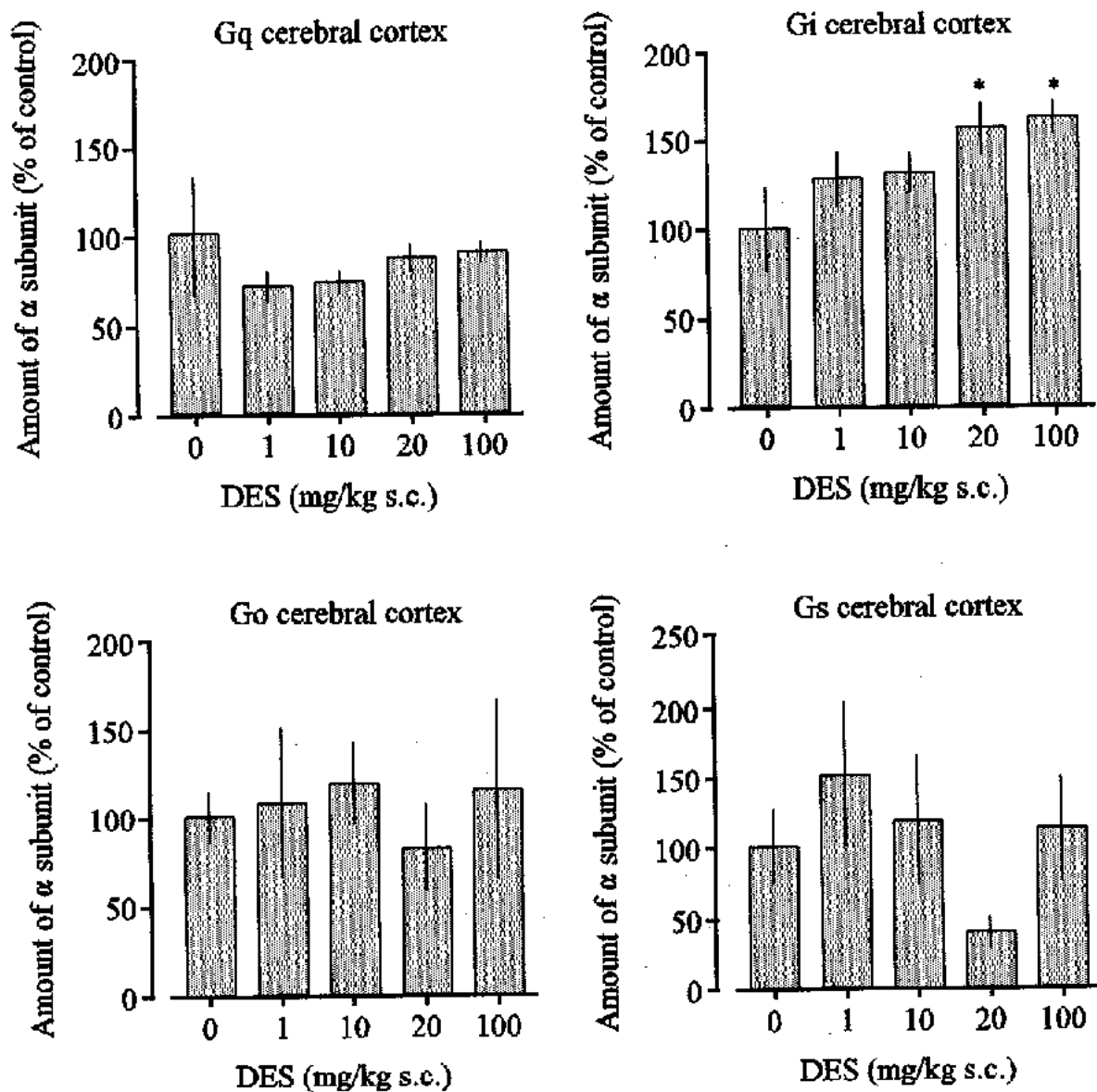


図5：DES投与による大脳皮質における各種G蛋白質 α サブユニット量の変化

成熟雄マウスにDESを1 mg、10 mg、20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に大脳皮質部位を摘出し、各種G蛋白質 α サブユニット量を測定した。*： $P < 0.05$

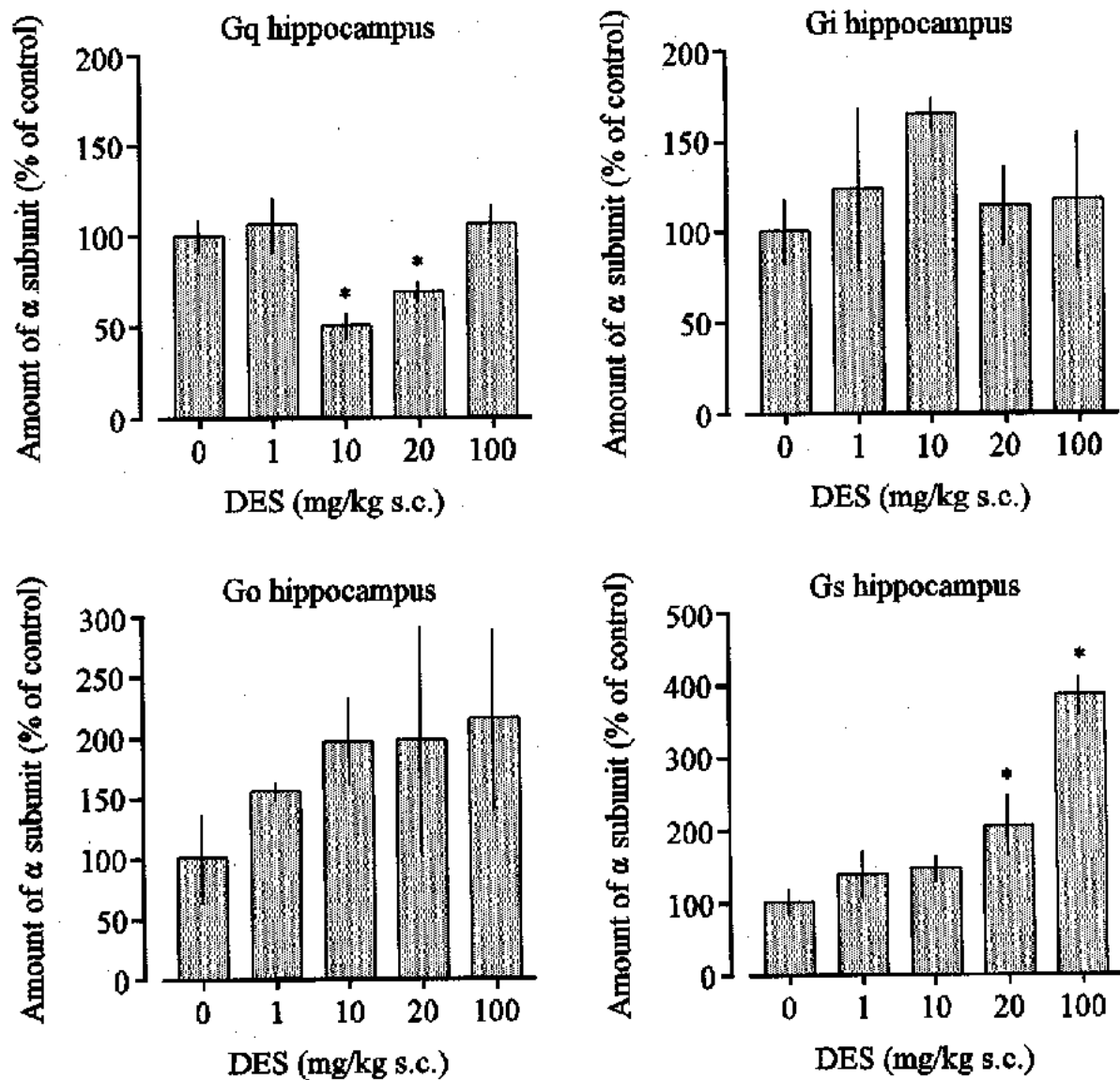


図6: DES 投与による海馬における各種G蛋白質 α サブユニット量の変化

成熟雄マウスにDESを1 mg、10 mg、20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に海馬部位を摘出し、各種G蛋白質 α サブユニット量を測定した。*: $P < 0.05$

4. 新たな核内内分泌攪乱化学物質レセプターの同定及びレポーター遺伝子を導入した細胞の培養

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の構築を目的とする。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)] の安定発現細胞株の既知オーファンレセプターリガンド応答系の確立、新規転写共役因子群の同定を行なった。

【研究協力者】

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

【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。そこで本研究では、既知性ステロイドホルモンレセプターの高発現細胞株を樹立する。この細胞株を用いることで、性ステロイドホルモン様活性物質を検索するシステムを構築することを目的とする。また、更に高感度検出法の確立を目的に、核内レセプターの転写促進機能に必須な転写共役因子群の同定を試みた。同時に、リガンド未知の核内オーファンレセプターに対して内分泌攪乱物質がリガ

ンドとして作用するか否かを検討することにある。

【研究方法】

1. 核内レセプターを用いたステロイドホルモン様活性物質の検索:

性ステロイドホルモンレセプターの転写促進能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を検索するシステムを構築する。具体的には、恒常的に性ステロイドホルモンレセプターを発現する細胞株を樹立する。

実験方法: 1) ヒト女性ホルモンレセプター (hER α)、及びヒト男性ホルモンレセプター (hAR) cDNA を transfect させた後、薬剤耐性クローンを選択する。2) 更にクローンのいくつかは、同様の手法により、リポーター遺伝子 (ルシフェターゼ) が染色体 DNA に組み込まれた 2 重の stable transformant を作成する。

2. 既知オーファンレセプター機能に

対する内分泌攪乱物質の影響：

核内レセプターは転写制御因子であるので、オーファンレセプター群を cDNA クローニング後、GAL4DNA 結合領域と置換したキメラタンパクを作製、各種内分泌攪乱作用を検討する。

3. 新たな転写共役因子の検索：

核内レセプターには、2つの転写促進領域 (AF-1、AF-2) を有するが、現在知られている転写共役因子群は、AF-2 に作用するものがほとんどで、AF-1 に関しては不明のままである。

現在核内受容体の転写には2段階の反応が必要とされている。これはまずヒストンアセチラーゼなどの機能を持つ転写共役因子 (p300, SRC-1 など) が機能し、クロマチン構造をほどこし、続いて DRIP/TRAP complex などの別の転写共役因子群が結合し、基本転写因子群との橋渡しをするというものである。既に核内受容体の AF2 に関してはいくつかの受容体でこのメカニズムが証明されている。しかし AF1 に関してはそのメカニズムは分かっていないため、AF1 転写共役因子の同定を行い、そのメカニズムに迫ることを考えている。

そこで AF-1 に作用する転写共役因子複合体を HeLa 核抽出液から生化学的に精製・同定し、これら因子を用いた新たなアッセイ系を検討する。

【研究結果】

1. hER α 、hER β 、hAR 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た。これら高次発現クローンはいずれも当該ホルモンに良く応答した。そこで外来リポーター遺伝子導入株の確立を試している。

2. hER α 、hER β 、hAR に加え、RAR α 、RAR β 、RAR γ 、RXR α 、RXR β 、RXR γ 、VDR、TR α 、PPAR γ のリガンド結合領域 (LBD) を酵母 GAL4DNA 結合領域と融合したキメラタンパクを作製し、リガンド応答系を確立した。また、オーファンレセプター PNR についても同様の系を作成したが、応答するリガンドを見出せなかった。

3. 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 α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、ブ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2つの転写共役因子複合体に加え、第3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。

現在この複合体の他の構成成分を同定しているところである。

4. MRAP1 の存在領域として N 末端の 1-169a. a. と 450-600a. a. の 2 つの領

域を同定した。さらに既知の AF2 転写共役因子の内 p300 は以上 2 つの領域両方の転写を活性化したが、TIF2 は後者の転写活性のみを上昇させた。そこで AF1 の新規転写共役因子は前者に結合する可能性を考え、1-169a. a. の GST fusion protein を baculovirus 発現系を用いて作成する。それをプローブとして MR の活性がある HeLa 細胞の核抽出液から結合因子群を抽出し、SDS-PAGE にて展開し、in gel digestion を行い、MALDI-TOF-MS を用いて MS fingerprinting によってそれらの同定を試みている。

【考察及び結論】

hER α 、hER β 、hAR 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。しかしながら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には到っていない。

【研究発表】

論文発表

1. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 1341-1352, 2001.
2. Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K.: Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.
3. Sasagawa, S., Kato, S.: A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.
4. Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.
5. Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR α mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, 407, 633-636, 2000.
6. Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N. Engl.*

J. Med., **343**, 856-862, 2000.

7. Koderu, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S.: Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33201-33204, 2000.

8. Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G.: Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, **481**, 53-56, 2000

9. Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N.: FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 643-649, 2000.

10. Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, **150**, 873-879, 2000.

11. Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S.: A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 228-236,

2000.

12. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, **5**, 593-601, 2000.

13. Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, **127**, 717-722, 2000.

14. 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.

15. 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.

16. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of

- rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 889-899, 2000.
17. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, **141**, 1317-1324, 2000.
18. Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F.: Metabolism of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, **39**, 2123-2129, 2000.
19. 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.
20. 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.
21. Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T.: Identification of novel human *CH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1290-1295, 2000.

【英文のアブストラクト】

Establishment of stable transformants expressing nuclear receptor and search for novel receptors for endocrine disruptants

Shigeaki Kato, Professor

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Key Word:

nuclear receptor, sex steroid hormone, stable transformant, co-factor, luciferase assay

Abstract:

Establishment of assay systems to assess sex steroid hormone-like activity of chemical compounds is under trial. Stable transformants expressing hER α , hER β and hAR have been established, and transactivation assay for orphan receptors and search for novel coactivators were performed.