

内分泌かく乱物質のホルモンレセプターを介する作用発現機構に関する研究

分担研究者 西原 力 大阪大学大学院・薬学研究科 教授

研究要旨

酵母 Two Hybrid System を用いて、コアクチベーターの介在するホルモンレセプターの転写活性化に及ぼす影響の検出系を樹立し、このプロセスにおける内分泌かく乱物質の影響を検討した。ほとんどの物質で SRC-2, TIF I, TIII, RIP140 などの コアクチベーターの違いによるレスポンスに大差はなかった。また、ER β の系を新たに作成したところ、一部の物質で ER α の系とレスポンスの程度に違いが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の主要な作用点の一つとして、化学物質のホルモンレセプターに対するアゴニストやアンタゴニストとしての作用が考えられる。エストロゲンははじめとするステロイドホルモンのレセプターは DNA 結合性の転写調節因子であり、ホルモン依存的に標的遺伝子の発現を誘導する。ホルモンはレセプターに結合したのち、レセプターの構造変化を引き起こし、これが引き金となり転写を活性化するが、その途中プロセスの詳細な分子メカニズムは不明である。そこで、本研究課題ではホルモンレセプターを介する転写活性化のプロセスを明らかにすることを目的とし、これらのプロセスに対する内分泌かく乱物質の影響を調べる。尚、ホルモンレセプターの中でも、

内分泌かく乱作用においては特にエストロゲンレセプター (ER) が重要であると考えられるので、本研究課題においては ER を中心に研究を行う。

B. 研究方法

コアクチベーターが ER にエストロゲン依存的に結合することに着目し、これを化学物質のエストロゲン様活性測定法に応用しようと考えた。タンパク質間相互作用の測定には酵母 Two-hybrid 法を用いた。これまでにクローニングされているコアクチベーターのうち CBP, P300, SRC1, RIP140, TIF1, TIF2 について ER α とのエストロゲン依存的な相互作用を調べ、次に、エストロゲン様活性を持つことが知られている既知の化学物質についても検討した。ER β についても同様のシステム

を構築し、一部の化学物質についてはER α とER β の差異について検討した。

C. 研究結果

1. 酵母細胞内でのエストロゲンレセプターとコアクチベーターの相互作用

ER α と転写共役因子の相互作用を酵母 two-hybrid 法で調べた。この方法は、酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4DBD) 及び転写活性化領域 (GAL4AD) に相互作用を調べたいタンパク質を繋ぎ、もし2つのタンパク質が相互作用すれば、 β -galactosidase 遺伝子が発現するという原理に基づいている。

この方法で ER α とコアクチベーターの相互作用に対する β -estradiol の影響を調べた。ER α の β -estradiol 依存的な相互作用は TIF2 が一番強く、次に SRC1、RIP140、TIF1 の順であり、CBP、P300 はほとんど相互作用しなかった。また、 β -estradiol の濃度を変化させてその応答を調べたところ、TIF2、SRC1、RIP140、TIF1 について 10^{-9} M から β -galactosidase 活性の上昇が認められ、 10^{-7} M で飽和し、それ以上濃度を上げて活性は変わらなかった。

2. 既知のエストロゲン様化合物によるアッセイ系の検証

次に、これまでにエストロゲン様活性を持つことが知られている化学物質について、用量依存曲線を作成した。用いた化合物は天然のエストロゲンである estrone と estriol、アンドロゲンの DHT

と testosterone、植物由来のエストロゲン様物質である genistein、同じ植物由来のステロイドであるがエストロゲン様活性は持たない β -sitosterol、合成化学物質で β -estradiol と同等のエストロゲン様活性を持つことが知られている diethyl stilbestrol、プラスチックからの溶出や洗剤の分解物質でエストロゲン様活性を持つとして問題になっている p-nonylphenol と bisphenol A の10種類である。diethyl stilbestrol と estrone は β -estradiol と同等の活性を示し、ついで estriol、genistein、p-nonylphenol、DHT、bisphenol A の順でエストロゲン様活性を示した。また、他のステロイドの testosterone や β -sitosterol には 10^{-9} M まで全く応答性を示さなかった。

これらの結果は、他の方法で調べたエストロゲン様活性の強さとよく相関していた。また、コアクチベーター間での化学物質による応答性に大差は認められなかった。

3. ER α とER β の差異

ER α とER β に対する、化学物質の結合特異性の差異を調べるために、ER α とER β のリガンド結合領域を GAL4DBD に繋ぎ、コアクチベーターの TIF2 との相互作用を調べる系を作製した。ER α とER β のいずれを用いた時にも、 β -estradiol への応答性は 10^{-9} M からみられ、ER α とER β で本来のリガンドである β -estradiol への結合親和性は同程度であると考えられ

た。それに対し、植物エストロゲンである genistein で処理した時には、ER α への応答性は 10⁻⁷ M からしかみられなかったのに比べ、ER β では 10⁻⁹ M から応答性が見られた。同様のことが防腐剤として知られているパラベン類においても観察された。これらのことから、ER α と ER β で化学物質の構造によって結合特性が違うことが推察された。

D. 考察

ER α とコアクチベーターの相互作用の強さは、溶液中のエストロゲン濃度に依存しており、このアッセイ系がエストロゲン活性の定量に利用可能であると考えられた。また、コアクチベーター間で β -galactosidase 活性にかなりの違いが認められたが、この違いが何を意味するのかについては現在のところ不明である。

ER α とER β に関しては、内分泌かく乱物質がどちらのレセプターをターゲットにしているは全く判っておらず、現状としてはいずれのレセプターに対しても試験を進めていく必要がある。また、ER α とER β の生体内におけるそれぞれの役割に関してもまだよく分かっていない部分が多く、ER α とER β に特異的な化学物質の探索はこれらのレセプターの作用機構の解明にもつながると期待される。今後、ER α とER β の違いについて、培養細胞でのレポーター遺伝子アッセイによりさらに検討し、アゴニスト活性についても酵母Two-hybrid法と培養細胞でのレポータ

ー遺伝子アッセイで検討する予定である。また、コアクチベーターのin vivoでの役割を明らかにすることを目的に、コアクチベーターのノックアウト細胞の作製を試み、ホルモンレセプターを介する転写活性化プロセスにおけるコアクチベーターの役割を検討していく。

E. 結論

酵母 Two Hybrid System において、ほとんどの物質では SRC-2, TIF I, TIII、RIP140 などの コアクチベーターの違いによりレスポンスの程度に少し違いがみられた。ER β の系を新たに作成したところ、一部の物質で ER α の系とレスポンスの程度に違いが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dateyama F, Matsuo M, and Nishihara T, New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivation. (1999) Toxicol. Appl. Pharmacol., 154:76-83
2. Yamada T, Tsuchiya T, Osada S, Nishihara T and Imagawa M, CCAAT/enhancer binding protein δ gene expression is mediated by autoregulation through downstream binding sites. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 242:88-92

3. Nishihara T, Yano M, Kato K and Takasaki A, Neutralizing effect of sodium laurate on the bactericidal action of a quaternary ammonium disinfectant against *Staphylococcus aureus*. (1998) *Biocontl. Sci.*, 3:1-5
4. Sakoda K, Suzuki A, Arai S, Imagawa M, Nishikawa J and Nishihara T, Identification of a novel vitamin D response element from the rat genome. (1997) *J. Biochem.*, 121:89-94
5. Nishihara T, Hasebe S, Nishikawa J and Kondo M, Biodegradation of aniline, anthracene, chlornitrophen, fenitrothion and linear alkylbenzene sulphonate in pond water. (1997) *J. Appl. Microbiol.*, 82: 441-447
6. Xu M, Osada S, Imagawa M and Nishihara T, Genomic organization of the rat nuclear factor 1-A gene. (1997) *J. Biochem.*, 122:795-801