

論文の内容の要旨

論文題目 : *In vivo* and *in vitro* assay and screening of chemicals involved in cellular signaling through sex hormone receptors

(性ホルモンレセプター-のシグナル伝達を指標とした化学物質スクリーニング法の開発)

氏名 : 金 誠培

序

生態系にはさまざまな内分泌攪乱物質 (endocrine disrupting chemicals; EDC) が存在しており, 近年, 野生動物の生殖異常や催奇形性などの一因であることが指摘されている. この原因は EDC によって細胞内シグナル伝達の恒常性が攪乱され, 遺伝子発現の変動, 蛋白質間相互作用あるいは蛋白質-DNA 間相互作用の程度に変化が起きるためと推定される. EDC 投与による情報伝達系の攪乱を体系的にかつ簡便にスクリーニングする方法の開発は, 現在急務の課題である. 私は博士課程において, 1) 生きた COS-7 細胞内での androgen receptor (AR) の核内移行を指標にした EDC 定量分析法の開発 (細胞系) 2) 黄色蛍光蛋白質 (YFP) 融合 estrogen receptor (YFP-ER) と DNA とのホルモン依存的な結合を指標にした EDC 定量分析法の開発を行った (非細胞系).

1) AR の核内移行を指標にした EDC 定量分析法

原理 : シーパンジー由来の *Renilla luciferase* C 末側の 230 番から 311 番目のアミノ酸配列 (LucC) とシアノバクテリア由来のスプライシング蛋白質 DnaE の C 末側 (DnaEc) を AR に結合してミドリザル由来 COS-7 細胞の細胞質に局在させる (図 1 (1) ; *dra*). この細胞に *Renilla luciferase* の 1 番から 229 番目までのアミノ酸 (LucN) と DnaE の N 側 (DnaEn) との融合蛋白質に Flag 抗原認識アミノ酸配列 (DYKDDDDK) と核内移行シグナル (NLS) になるアミノ酸配列 (DPKKRKV) を連結して発現させ, 核内に局在化させる (*flud*). プロテインスプライシング反応の効率を上げるためにスプライシング junction にそれぞれ 6 アミノ酸配列 (KFAEYC) と 5 アミノ酸配列 (FNLSH) を導入した (図 1 (1)). 細胞に男性ホルモン (androgen) を添加すると, AR は androgen に結合して核内に移行する. この時 DnaEn と DnaEc が相互作用しスプライシング反応が起こり, *Renilla luciferase* の活性が回復する. この酵素活性を基質である coelenterazine を用いて発光強度により定量評価する (図 1 (2)).

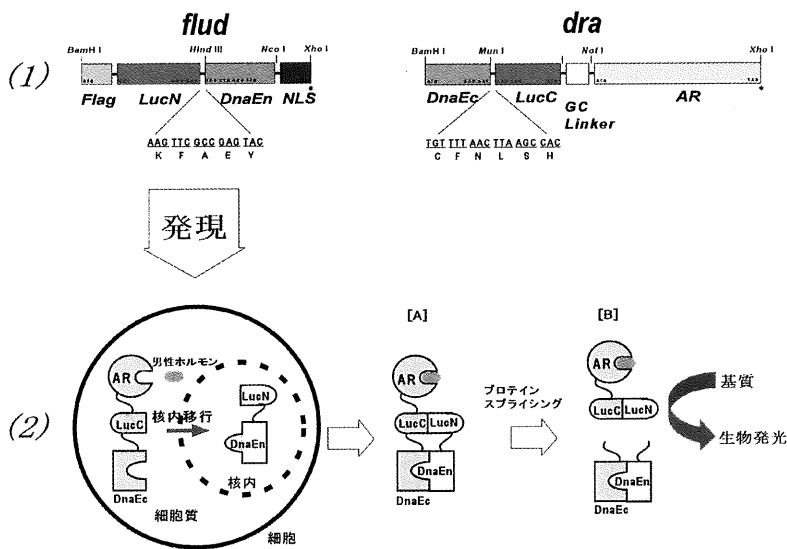


図 1. SplitLuciferase システムの原理図。(1) N と C 末側融合蛋白質の発現のために作成した DNA construct を示した。Flag は抗原認識配列 (8 アミノ酸) で、NLS は核内局在信号配列 (6 アミノ酸) である。GC Linker は柔軟性アミノ酸配列 (6 アミノ酸) である。(2) 細胞質に局在させた AR 融合蛋白質がホルモン濃度依存的に核内移行する。核内で DnaEc と DnaEn との相互作用によって、スプリットした *renilla luciferase* の活性が回復する。この活性を発光強度により定量評価する。

結果と考察： アンドロゲン添加による核内移行とそれに続くスプライシング反応を検証するために、抗 AR 認識抗体を用いて western blotting を行った (図 2 (A))。レーン(1)は COS-7 細胞, レーン(2)は融合蛋白質の N 側と C 側を共発現した COS-7 細胞に 5 α -dihydrotestosterone (DHT) を添加しない場合, レーン(3)は融合蛋白質の N 側と C 側を共発現した COS-7 細胞に DHT を添加した場合の結果である。DHT 添加した場合は, DHT 添加しなかった場合に比べ特異的なバンドが 161kD と 135kD に観察された。この 161kD のバンドはスプライシングの中間体 (図 1 [A]), 135kD のバンドはスプライシング産物 (図 1 [B]) の分子量に一致する。以上から細胞内で DHT 添加によりスプライシング反応が起こっていることが分かった。次に immunocytochemistry を利用して細胞内で発現した融合蛋白質の局在をイメージングした (図 2 (B))。図 2 (B) の A は蛍光イメージング結果, B は透過光と蛍光イメージをマージしたものである。DHT 添加前の AR 融合蛋白質 (LucC-fused AR) の蛍光イメージは細胞質に局在していることが分かった。一方, DHT 添加後, 核内に局在することが分かった。従って, DHT 刺激によって発現させた AR 融合蛋白質が核内移行することが分かった。一方, Flag 配列及び NLS のついている N 末側融合蛋白質は DHT 刺激有無に関係なく核内に留まっていることが分かった。以上の結果から, 図 1 に示した検出原理が細胞内で起きていることが分かった。

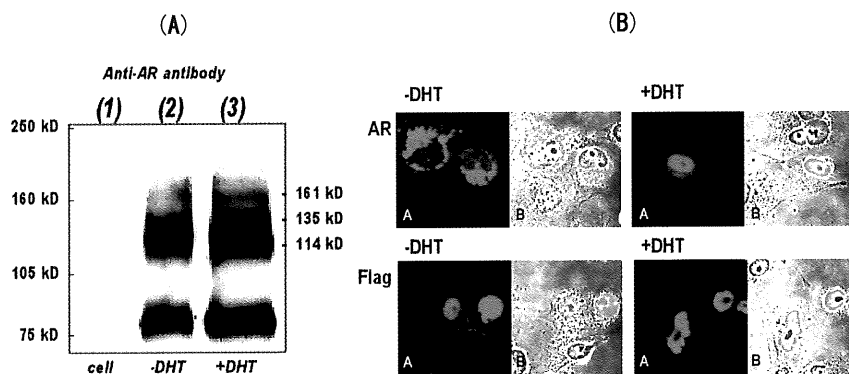


図 2. (A) Western blotting 結果。レーン (1) : Cell crude, レーン (2) : DHT 非添加細胞 (融合蛋白質の N 側と C 側を共発現), レーン (3) : DHT 添加細胞 (融合蛋白質の N 側と C 側を共発現)。バンド説明 : スプライシング反応中間体 (161 kD), spliced protein band (135 kD), LucC-fused AR (114 kD), AR 分解断片 (78 kD)。 (B) Immunocytochemistry による蛋白質局在のイメージング結果。A は蛍光イメージング図で, B は透過光と蛍光イメージをマージした結果である。蛍光イメージングのために一次抗体は AR 又は Flag 配列認識抗体を使い, 2 次抗体は Cy-5 修飾マウス 2 次抗体を使用した。

次に細胞系実験で EDG 濃度依存性を検証した。使用した男性ホルモン又は男性ホルモン様化学物質は次

の13種類である。内分泌男性ホルモンとしてDHT, testosterone, 19-nortestosteroneを, 女性ホルモンとしてE₂, progesteroneを, 前立腺癌治療薬としてCPA, flutamideを, 農薬としてvinclozolin, procymidone, o, p' -DDTを, プラスチック成分としてPCBを, リン酸化によるAR活性化試薬として, PMAとforskolinを分析に用いた。それぞれの化学構造式を図3に示した。結果を図4に示す。DHTを添加した場合, ホルモン濃度依存的に発光強度が1.0×10⁻⁹ Mから上昇し, 1.0×10⁻⁵ Mでほぼ最高値に到達した。一方, procymidoneの場合は同様の濃度範囲で発光強度の上昇は観測されなかった。vinclozolinは1.0×10⁻⁷ Mから有意な発光強度の差が観測された。各々のホルモン及び化学物質10⁻⁶ M刺激による発光強度の相対的な強さは次の順番であった。発光強度の強さの順(10⁻⁶ M point) : DHT (100%) > testosterone (72%) > 19-nortestosterone (64%) > vinclozolin (39%) = E₂ (36%) > CPA (26%) = progesterone (22%) = o, p' -DDT (25%) > PMA (22%) > flutamide (16%) > forskolin (11%) = PCB (11%) > procymidone (0.7%) = Control (C末側融合蛋白質だけを発現させた細胞にDHT刺激を加えた場合) (0.4%)。次にprocymidoneのantagonist効果を検証した(図4(C))。DHT10⁻⁷ M存在下, procymidoneの濃度を上げるにつれ, 発光強度が徐々に下がった。DHT10⁻⁷ Mとprocymidone10⁻⁴ Mとのmixtureで刺激した場合, DHT10⁻⁷ Mだけで刺激した場合に比べて, 14%まで発光強度が減少した(図4(C))。

以上の結果から, N-とC-末側融合蛋白質を共発現させたCOS-7細胞においてARの核内移行量を定量的に評価できることが分かった。

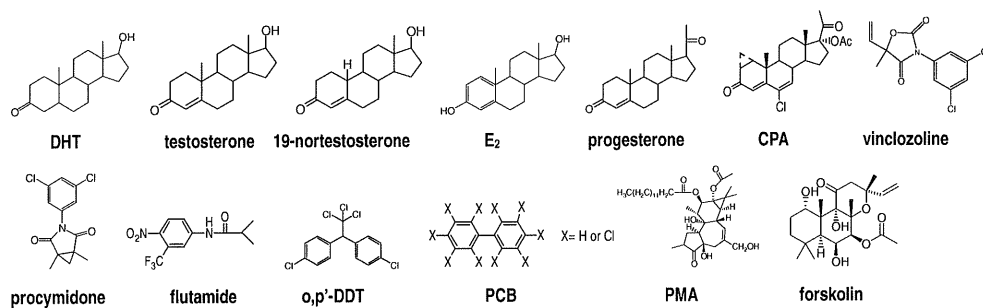


図3. 細胞実験で使用した男性ホルモン, 男性ホルモン様化学物質, 及び, ARリン酸化試薬の化学構造式。Abbreviations: DHT: 5 α -Dihydrotestosterone, E₂: 17 β -estradiol, CPA: cyproterone acetate, o, p' -DDT: 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2, 2, 2-trichloroethane, PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate, PCB: polychlorinated biphenyls.

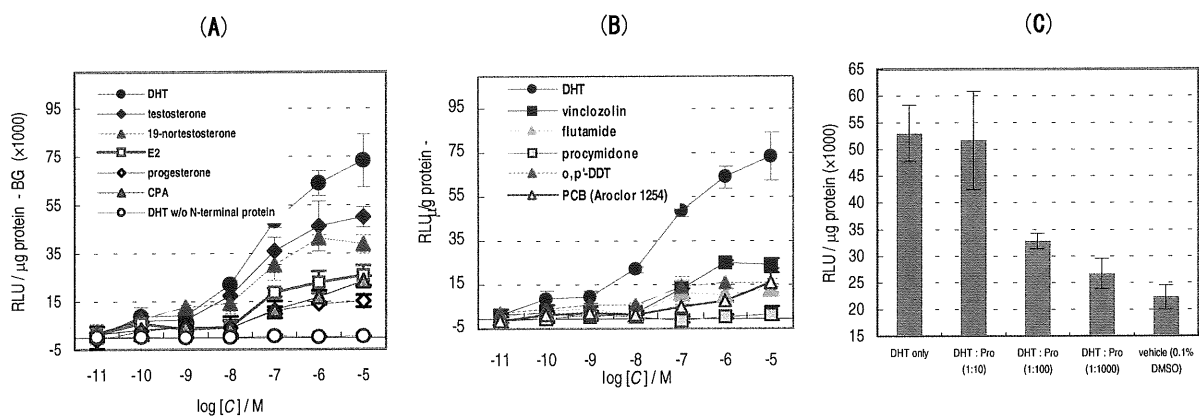


図4. ホルモン濃度依存的な発光信号の変化グラフ。(A) ステロイドホルモンの刺激による発光強度の変化グラフ。(B) ノンステロイド系化学物質の刺激による発光強度の変化グラフ。分析したホルモンは内分泌性男性ホルモン(DHT, testosterone, 19-nortestosterone), 女性ホルモン(E₂, progesterone), 前立腺癌薬(CPA, flutamide), 農薬(vinclozolin, procymidone, o, p' -DDT), 工業化学物質(PCB)を含む。(C) 細胞系におけるprocymidoneによる発光強度の抑制の程度を検証。DHT 10⁻⁷ Mに異なる濃度のprocymidone (10⁻⁶ M (1:10), 10⁻⁵ M (1:100), 10⁻⁴ M (1:1000), 以上, mole ratio)を同時に刺激する。Vehicleとしては0.1% DMSOを, DHT onlyとしてはDHT 10⁻⁷ Mだけを添加する。

次に生きたマウス個体内のアンドロゲン検出法の開発を行った。図5は5週齢のマウスの四肢の四箇所(1) COS-7細胞そのもの、(2) C側の融合蛋白質を発現させたCOS-7細胞、(3) N側の融合蛋白質を発現させたCOS-7細胞、(4) N、C側の融合蛋白質を共発現させたCOS-7細胞をそれぞれ移植した(図5(A))。移植して2時間後腹腔にDHT 1.0×10^{-5} Mを投入した。16時間後マウス体内でスライシングにより形成した luciferase の生物発光を CCD カメラでイメージングした。その結果、複合蛋白質の N 側と C 側が共に発現した右下(4)の場合のみに強い発光強度が得られた。そのマウスの四肢4箇所の発光強度の経時変化を基質添加後35分間測定した(図5(B))。その結果、10分から15分頃に発光強度が peak に達することが分かった。次に同様に細胞移植したマウスにおいて DHT 刺激有無による発光強度を検証した(図5(C))。移植した部位からの発光強度を比較してみると DHT 刺激した場合、DHT を刺激しなかった場合より、平均3.5倍強い発光強度が得られた。この結果は生きた動物内で、DHT 刺激により AR の核内移行に伴い形成された *renilla luciferase* の酵素活性を、非侵襲的に検出出来ることを示している。

本実験結果から生きた動物の皮下に移植した細胞の発光強度を指標に、性ホルモンの検出が可能であることが示された。

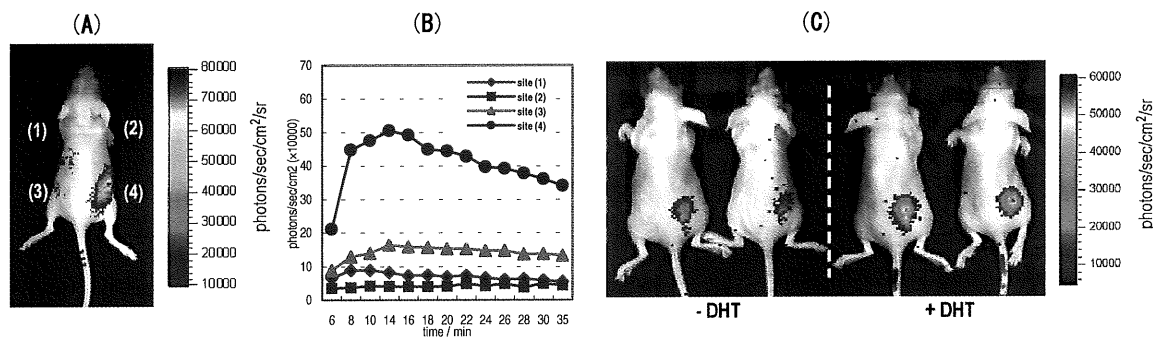


図 5. 生きたマウスの体内での luciferase 活性の回復による発光。(A) 5 週齢のマウスの四肢の四箇所(1) COS-7 細胞そのもの、(2) C 末側の融合蛋白質、(3) N 末側の融合蛋白質、(4) N、C 末側の融合蛋白質を共発現させた COS-7 細胞をそれぞれマウスに移植した。DHT 刺激をしてから 2 時間を経過する。後、基質の腹腔添加後、2 分おきに CCD カメラで発光強度を測定した。(B) 細胞を移植したマウスの四肢四箇所からの発光強度の経時変化。(C) DHT 刺激有無による発光強度の差の測定。刺激した DHT の濃度: 100 μ g/kg body weight. Unit of the (A) and (C) is photons/sec/cm²/sr.

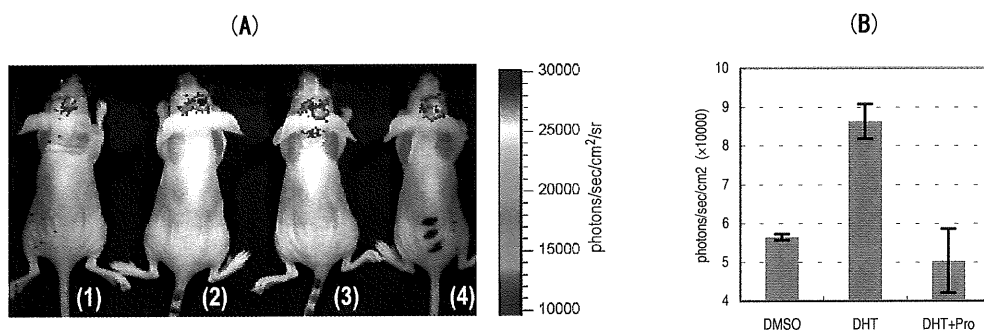


図 6. 生きたマウス脳内での procymidone 及び PCB による影響を検証する。5 週齢マウスの脳に直径 0.5mm 程度の穴を掘り細胞を移植する。腹腔を経由して DHT (10 μ g/kg body weight) と procymidone (10 mg/kg body weight) 又は PCB (10 mg/kg body weight) を投与する。基質投与して発光強度を CCD カメラで測定する。(A) 生きたマウスの脳内での発光イメージ。(1): 1% DMSO で刺激した場合、(2): DHT のみ投与 (3): DHT plus procymidone (1:1000) (4): DHT plus PCB (1:1000) (B) マウス頭部での発光強度の平均値の比較。

次に AR antagonist の PCB と procymidone などの化学物質の脳への影響を検証した。生きたマウスでの化学物質による発光強度の変化を検証してみた。DHT (10 μ g/kg body weight) と PCB 又は procymidone (10 mg/kg body weight) mixture による刺激を加えたところ、DHT (10 μ g/kg body weight) のみに比べて、脳からの発光強度が抑えられることが分かった(図6(A))。その発光強度の平均値を図6(B)に示した。

Control である 1%DMSO で刺激した場合、又は、DHT と PCB や procymidone との混合液で刺激した場合に比べて、DHT のみの刺激を施した場合に選択的に強い発光を示すことが観測された。以上の結果から PCB と procymidone はマウス体内での様々な障壁（排出、代謝など）及び脳の blood brain barrier (BBB) を通過して、脳室内に影響を与えることが分かった。

以上より二分した *renilla luciferase* のプロテインプライシングによる再構成法を利用して、AR の核内移行を発光強度で定量分析する新たな EDC スクリーニング法を確立した。この方法の特徴は以下のことを含む。(i) AR 以外の核内移行蛋白質にも応用可能な一般方法である。核のみならず、細胞小器官に輸送される標的蛋白質の同定に応用できる一般性を持つ。(ii) この方法は臓器内又は皮膚など関心のある部位での標的シグナル伝達過程のイメージングが可能である。(iii) 細胞内での分子の移動及びシグナル伝達をマウス個体レベルでほぼ同時に且つ非侵襲的に分析できる。(iv) 従来の非特異的なイメージング法である MRI や CT 撮影法に比べて、この分子レベルの特異的な定量イメージングが可能である。(v) 製薬又は環境ホルモン分析において、薬の副作用検証又は毒性検証に応用できる。(vi) gene therapy 又は新薬の効果を生きたマウス個体で経時的に評価できる。

2) 性ホルモンリセプターと DNA との結合を指標にした EDC 分析方法の開発

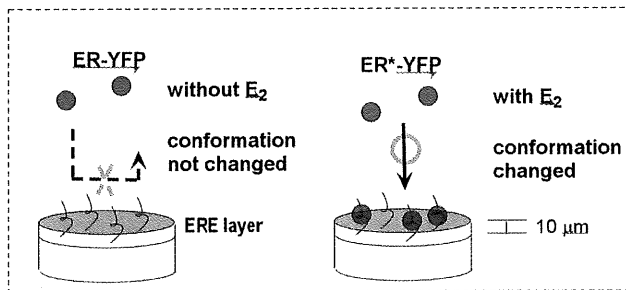


図 7. DNA Glass Slide (A)とその分析原理図 (B), (C). Abbreviation : ER, estrogen receptor, E, 17 β -estradiol, YFP, Yellow fluorescence protein, ERE, estrogen responsive element

原理：小さなガラス基板の上に、女性ホルモンリセプター（estrogen receptor: ER）が特異的に結合する DNA 配列（estrogen response element: ERE）を固定化する（図 5）。大腸菌発現系を利用して合成した YFP 融合 ER を化学物質とインキュベーション後、そのガラス基板の上に添加する。YFP-ER が女性ホルモン（E₂）と結合すると、ER 内構造変化が起こり、YFP-ER は ERE と結合する（図 5 (B)）。一方、エストロゲンが無い場合、ER は ER 内構造変化を起こ

さず ERE には結合しない（図 5 (A)）。このガラス基板の上に結合した YFP-ER の量を蛍光強度（Ex_{max}=488nm, Em_{max}=528nm）

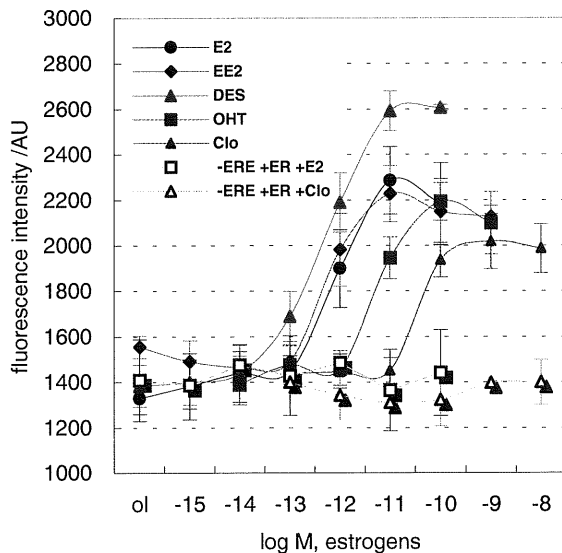


図 8. YFP 融合蛋白質 (YFP-hER α) とエストロゲン応答因子 (ERE) との化学物質依存的な結合を指標にした、女性ホルモン様化学物質のホルモン活性測定. Abbreviation : DES, diethyl stilbestrol, E₂, 17 β -estradiol, EE₂, ethynyl estradiol, OHT, 4-hydroxy-tamoxifen, Clo, clomiphene, ER, estrogen receptor, ERE, estrogen responsive element.

を指標に定量する。

実験： ガラス基板の上に約 0.17mm の agarose ゲル層を作成し、その上に ERE を avidin-biotin 反応によって固定化した。次に大腸菌発現系により合成した YFP-ER を、化学物質と共に 3 時間 (4°C) インキュベーションした。基板を洗浄した後、ERE に結合した YFP-ER からの蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。

結果： 図 6 に化学物質濃度依存性を示す。女性ホルモンの 17β -estradiol (E_2) は 1.0×10^{-13} M から蛍光強度の上昇が観られ 1.0×10^{-11} M で最高値に到達した。合成女性ホルモンである ethynylestradiol (EE_2) は 17β -estradiol の濃度依存性曲線とほぼ一致した。最も結合力の強い合成女性ホルモンとして知られている DES を添加した場合、蛍光強度が 0.33×10^{-13} M から上昇して 1.00×10^{-11} M でほぼ最高値に到達した。一方、弱い合成女性ホルモンである OHT は 1.00×10^{-12} M から蛍光強度の上昇が観られ 1.00×10^{-10} M で最高値に達した。合成女性ホルモンである clomiphene の場合、 1.00×10^{-11} M から蛍光強度の上昇が観測された。今実験で用いた女性ホルモンのホルモン活性の序列は $DES > E_2 \cong EE_2 > OHT > Clo$ であることが分かった。開発した方法は (i) 短時間かつ高感度で、多数のエストロゲン様化学物質の分析が可能であること、(ii) ガラス基板の上での反応であるため、少量のサンプルで分析ができ、(iii) 基板が小さいので持ち運びが容易であるため、汚染現場での分析が可能である特徴を有している。

まとめ

以上、本研究 1 は細胞系 EDC 分析法として AR のホルモン依存的な核内移行を指標にした EDC 定量分析法を開発した。この分析法は AR の核内移行によりスプライシング反応が起こり、その産物である *renilla luciferase* の活性が回復し、その酵素活性を発光強度により定量評価することを特徴とする。更に開発した細胞を生きたマウスの体内に移植することにより、マウス固体内でのアンドロゲンを非侵襲的に検出出来ることを示した。

本研究 2 の非細胞系として、ガラス基板上に ER と DNA との結合を指標にした EDC 分析法を開発した。この方法は、ガラス基板上で ER と ERE との結合を誘導し、その結合した YFP-ER の量から蛍光強度を指標に定量することを特徴とする。開発した方法を利用して、知られている五つの女性ホルモン様化学物質のホルモン活性を分析した。