

細胞内シグナル伝達を攪乱する化学物質の新しい分析法

梅澤 喜夫 (東京大学大学院理学系研究科)

はじめに

環境中にはさまざまな内分泌攪乱化学物質 (Endocrine Disrupting Chemicals, 以下 EDC) が存在することが報告されており, ヒトの精子数減少や乳ガン増加などの一因と推測されている. このヒトの生体内恒常性を乱す原因は, “外因性化学物質の異常なホルモン制御によるホルモンの合成異常, その貯蔵もしくは放出の異常, その輸送あるいはクリアランスの異常, 受容体の識別あるいは結合の異常, 受容体結合後のシグナル伝達過程の異常” として説明されている. このような諸過程の異常を分子レベルで原因解明することは, 化学物質の毒性の決定や予防, さらには治療法の研究に多大な情報を提供するため, 各種 EDC に対する作用機序を解明するための体系的な研究を早急に実施せねばならない.

現在までに人類が創り出した合成化学物質の種類は約 10 万種類におよび, さらに焼却システムや排気ガスなどに含まれる未知の化学物質を合わせると, 内分泌攪乱化学作用として調査すべき化学物質は膨大な数になることが推測される. これら化学物質の分析目的は, (I) プラスチック器具等からの溶出や大気中に含まれる化学物質の同定および定量, (II) 特定化学物質の生体へのリスクアセスメント, に大別される. 前者は一連の分離カラムと質量分析機による同定, また最近では EDC センサーの開発も盛んに行われており, その技術は日進月歩の勢いである. 一方, 後者のリスクアセスメントに関しては, 天然物を含めた多くの化学物質と内分泌系との相互作用に関連したデータは極めて多量に存在するものの, その化学物質とリセプターの多様性や生体に影響を与える強度に関する化学的知見はまだまだ不足しており, 今後の課題となっている.

では, EDC のリスクアセスメントが容易でない原因は何か? 通常分析では, 分析対象 (analyte) か, またはそのリセプターが特定されている場合が多い. しかし, EDC に関しては, analyte となる化学物質が 10 万種類以上にも及び, さらにそれらの化学物質の各々の標的物質 (蛋白質に限らない) は生体内の様々なリセプターといった未知の要素を含んでいる. さらに化学物質の量的問題を考慮するとリスクアセスメントが如何に困難であるかが理解できる.

最近 IUPAC では, 内分泌かく乱化学物質について総覧, 問題点を指摘し¹⁾,

表 1. 米国 EPAのEDSTACが提案したリスク評価法の概略²⁾

TIER 1試験	齧歯類 3 日子宮試験—卵巣除去あるいは未成熟の雌のラット・マウスに 1～3 日間エストロゲン作用を持つ物質を皮下投与, 子宮重量の増加を測定
	齧歯類 20 日性成長試験—21 日令離乳ラットに被験物質を投与, 膣開口を測定
	齧歯類 5～7 日Hershberger試験—去勢雄ラットに 5～7 日間被験物質を投与, 前立腺, 貯精嚢の重量をテストステロン同時投与あるいは非投与時で比較
	カエル変態試験—50～54 日令のオタマジャクシ段階のXenopus laevisを被験物質に 14 日間暴露, 変態時の尾の再吸収変化, 甲状腺ホルモン効果を評価
	魚類の生殖能復帰試験—冬眠状態におき第二次性成長が後退した魚を, 被験物質に暴露して日照時間と水温を上昇させ, 成熟状態復帰時の影響を評価
TIER 2試験	哺乳動物試験—ラット, マウスに, 主に経口で被験物質を摂取させ, 行動変異, 妊娠率, 懐胎期間, 出産異常, 子孫の性比, 子供のメス化あるいはオス化, 生殖組織およびその他の組織変化を測定
	鳥類生殖試験—二種類 (ウズラとマガモ) を用い, 成鳥に被験物質を暴露した後, 排卵, 卵殻の厚さ, 孵化率, 孵化後の生存日数を調査
	魚類ライフサイクル試験—ハヤの受精卵に被験物質を暴露し, 発生, 成長, 生殖, 次世代の発生を300日間以上観察
	甲殻類のライフサイクル試験—甲殻類のAmericamysis bahiaを用い, 発生, 致死, 成長, 有性生殖などを観察
	両生類の発生と生殖—カエルなどの幼生期に暴露し, 変態に及ぼす影響などを観察

EPA や OECD ではそのヒトや野生動物へのリスク評価についての今までの研究結果を調査し、評価基準を提案している^{2,3)}。EPA ではヒトを最終目的とした多段階試験法の体系をまとめており、予備試験、第一段階スクリーニング試験 (TIER1)、第二段階確認試験 (TIER2) を行うことにしている (表1)。最初に実施すべき大量化学物質の短期間試験法としては、分子量 1,000 以下のポリマーを含む全化合物を対象とした high throughput pre-screening (HTPS) 法による receptor binding assay, reporter gene assay を行うことになっている。この際、例えばリセプターとしてはエストロゲン α , β , アンドロゲン, 培養細胞としては yeast 細胞等, レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ等を用い、一定数の化合物を用いて validation (方法の検定) を行う。さらにその実験条件の最適化や偽陽性の割合などを含め妥当性の確認を行ったうえで試験に供する。いうまでもなく、このような HTPS 法はいわゆる in vitro 法であり、生体がつ代謝能も含めたいわゆるホメオスタシス (動的平衡) は既に失われており、また核内リセプター蛋白を介さない作用様式を持つような化合物、たとえばメチル水銀や TBT などは検出することができない。これは化学物質のターゲットがエストロゲンやアンドロゲンといった核内転写因子だけではないことを示唆している。HTPS 法による陽性の化学物質に対しては、TIER1 さらに TIER2 in vivo 試験を行うとしている。OECD の場合も、EPA と類似の in vivo 動物試験と in vitro スクリーニング法の併用を報告している。しかし、TIER1 および TIER2 のような動物試験は人的資源と時間そして相当の資金を必要とし、また化学物質の多様性を考慮すると、動物試験の前段階としての HTPS スクリーニング法の意義は非常に大きいと思われる。この前段階試験には、細胞レベルで EDC 投与により変動する細胞内遺伝子発現の変動、情報伝達系の攪乱を体系的に簡便にスクリーニングするシステムが最も有効と思われる。

我々は新しい HTPS として、従来の receptor binding assay, reporter gene assay ではなく、細胞内信号過程に基づく分析法を基本概念として開発を行っている。つまり生きた細胞を化学物質で刺激し、細胞内情報 (signaling) の恒常性の変化を測定し、それを尺度に細胞内情報の増強・抑制化学物質をスクリーニングする。それは、近年ステロイドホルモンの非古典的経路が見いだされていることに基づいている (図1)。例えば、エストロゲンは古典的経路として知られる核内転写だけではなく、非古典的経路 (あるいは non-genomic pathway) を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘起することが明らかとなっている

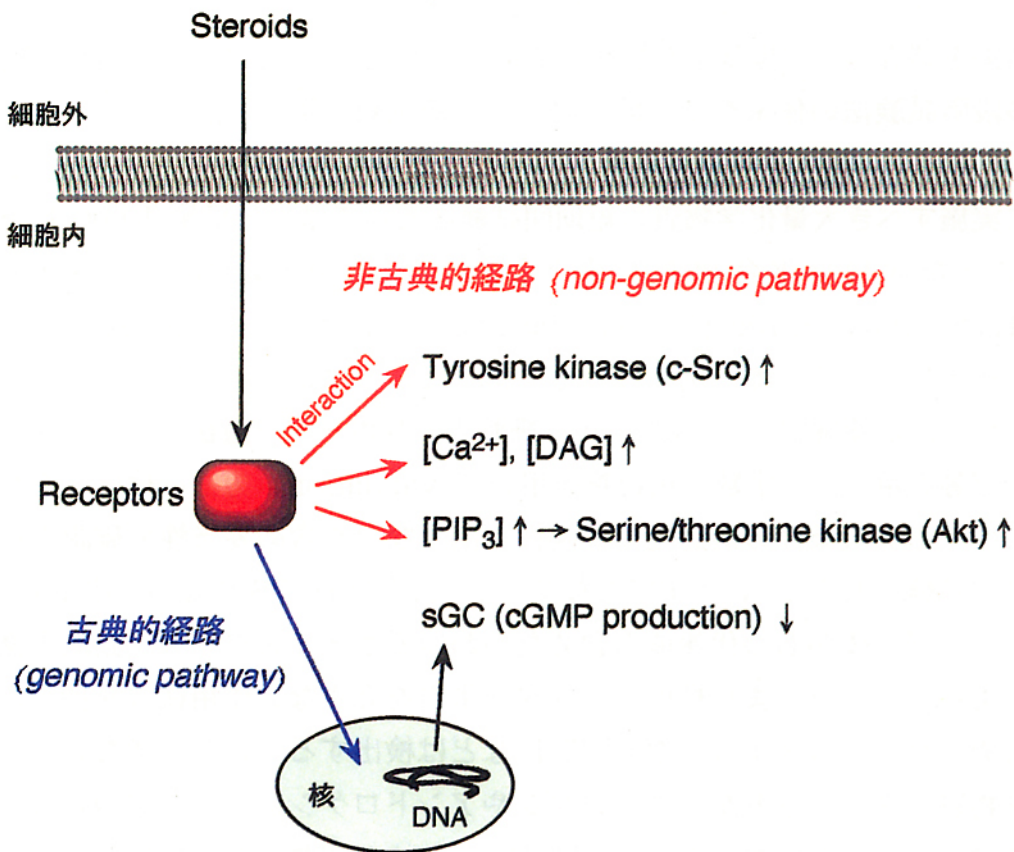


図1. ステロイド情報伝達の古典的経路と非古典的経路

ステロイドホルモンの非古典的経路 (non-genomic pathway) として、エストロゲン及びアンドロゲンリセプターはc-Srcと直接に相互作用し活性化する事がMCF-7細胞等で明らかになっている (EMBO J. 19, 5406-5417, 2000) . 同じくエストロゲンはMCF-7, 骨芽細胞等で Ca^{2+} , DAG濃度を上昇させることが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4686-4691, 2001, J. Cell. Physiol. 176, 435-444, 1998 etc.) . 血管内皮細胞においてはエストロゲン, 甲状腺ホルモン等が PIP_3 濃度を上昇させ, Aktを活性化する (Nature 407, 538-541, 2000) . 一方, 子宮においてはエストロゲンリセプターが古典的経路 (genomic pathway) を介してsGCの発現を数時間以内に一過性に抑制することが報告された (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 717-722, 2001) .

る。従来法の receptor binding assay, reporter gene assay ではこの非古典的経路に対する EDC の攪乱に対応できないのに対し、細胞内シグナル伝達、例えば細胞内 Ca^{2+} 濃度あるいは Ca^{2+} 情報伝達分子の活性をモニターすることにより、HTPS の目的を達成できると考えられる。このようにキーポイントとなる細胞内信号過程を検出する手法の開発を我々の出発点とした。

このアプローチは、“化学物質により細胞内に何が起きているか” をスクリーニングの指標としているため、より生理適合な分子レベルでの細胞生物学的知見を抽出できるであろう。非古典的経路に対するステロイド系 EDC 候補物質、メチル水銀、TBT など、必ずしも転写因子を標的としない化学物質のスクリーニングに有用であろう。

我々はさらに、化学物質暴露による発現遺伝子の変化を正確かつ高感度検出を目的とした、遺伝子チップの作製を行っている。遺伝子チップを作製するには、EDC により変動する発現遺伝子群を特定しなくてはならない。我々は、細胞内 RNA 発現レベルの系統的解析法 (Serial Analysis of Gene Expression: SAGE) を用いて発現遺伝子群の同定を行っている。

1. 細胞内情報伝達を可視化する蛍光プローブ分子

細胞内の生理活性物質の量と分布、およびそれに続く情報変換・増幅過程を非破壊分析する目的で、(1) サイクリック GMP (cGMP)、脂質メッセンジャーなどの第二次情報伝達物質、(2) Ca^{2+} 情報伝達分子の活性化、(3) 蛋白質のリン酸化、(4) 蛋白質間相互作用、を可視化検出する新規蛍光プローブ分子を創案・開発した。これらの蛍光プローブ分子の最大の特徴は、生きている細胞内における生理活性物質の機能をリアルタイムで測定できることにあるが、単一細胞を用いた基礎研究のみならず、一度に多量のサンプルを扱うスクリーニング目的まで応用可能であり、EDC スクリーニングにも効力を発揮するものと考えている。

cGMP

循環器系および神経系の主要な第二次情報伝達物質の一つである cGMP について、単一細胞内の cGMP 濃度を可視化する蛍光プローブ分子 (CGY:シージー) を開発した。CGY は細胞内の主要妨害物質である cAMP に対して、100 倍程度の選択性を有している。CGY を用いることにより、細胞内の cGMP 濃度は生理的アゴニストである一酸化窒素 (NO) で刺激した際に、必ずしも NO

濃度変化をパラレルに変化するわけではなく、ある低濃度の NO 濃度刺激によっては cGMP 濃度振動が起こることを最近見出した。一方、 17β -estradiol (E2) 投与したラットの子宮では、cGMP 産生酵素である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) の発現が大幅に低下していると今年報告されたが、我々は正常ヒト子宮平滑筋細胞 (UtSMC) およびヒト子宮平滑筋細胞株 (SKN) においても、E2 依存的に数時間で sGC の発現が低下することを見出した。本講演においては、子宮平滑筋細胞内の cGMP 濃度の蛍光イメージングを紹介し、エストロゲン様の EDC 暴露による循環器系での cGMP 情報伝達の攪乱について議論する。

Calmodulin dependent protein kinase (CaMK)

多くの神経伝達物質のみならず、 17β -estradiol も non-genomic に細胞内の Ca^{2+} 濃度を変動させることが、 Ca^{2+} 蛍光プローブ分子を用いた Ca^{2+} 蛍光イメージングにより明らかとなっている。しかしながら、 Ca^{2+} により制御されるキナーゼ・ホスファターゼなどの Ca^{2+} 情報伝達分子が、 Ca^{2+} 濃度変動に伴って細胞内のどこで・いつ・どのように活性化され、機能しているのかについては明らかでない。そこで我々は、細胞内での Ca^{2+} 依存性のセリン/スレオニンキナーゼ CaMK の活性化を可視化するために、CaMK と緑色蛍光蛋白質の二つの異色変異体からなるキメラ蛋白質を蛍光プローブ分子として開発した。この分子は Ca^{2+} 依存的に構造変化し、蛍光顕微鏡下で大きな蛍光シグナルを与えた。野生型の CaMK は、活性化の際に構造変化に伴って自己リン酸化されることが必須であると知られているが、我々の開発した分子もこの性質を維持しており、得られた蛍光シグナルが CaMK の活性化の指標として十分であることを示した。この蛍光プローブ分子を用いて、エストロゲン様作用を示す EDC による Ca^{2+} 情報伝達の攪乱について議論する。

蛋白質のリン酸化

生きた細胞内の蛋白質のリン酸化に基づく情報伝達を可視化検出するために、蛍光プローブ分子 (phocus:フォーカス) をインシュリン情報伝達をモデルに開発し、インシュリン受容体による蛋白質のチロシン-リン酸化を蛍光顕微鏡下でイメージングした。その結果、インシュリン受容体が集積したドット構造がインシュリン刺激によって一過性に細胞膜上に出現し、蛋白質リン酸化が亢進した新しいキナーゼ情報伝達の間が構築されていることを見出した。この

ドット構造は出現とともに細胞膜上を動き回り、1000 秒程度で消失する様子が観察された。本講演では、エストロゲン作用の non-genomic pathway を誘起するチロシンキナーゼ Src およびセリン/スレオニンキナーゼ Akt の活性化を蛍光イメージングするために phocus を改変し、EDC 暴露によるそれぞれのキナーゼ情報伝達への影響について蛍光顕微鏡下の生きた単一細胞で議論する。

蛋白質間相互作用

蛋白質間相互作用は、真核細胞内において酵素活性の調節、遺伝子発現、リン酸化・脱リン酸化蛋白質のシグナル伝達など重要な役割を果たしている。細胞が EDC に暴露されると、細胞内シグナル伝達の恒常性が攪乱され、蛋白質間相互作用の程度に変化が起きると推測される。従ってある特定の蛋白質間相互作用を生きた細胞内でモニターすることにより、EDC 暴露による細胞内の恒常性の変化を測定できると考えられる。これまで、蛋白質間相互作用を評価するためには、細胞をすりつぶして測定する破壊分析が主に行われてきた。しかし、何万種類も存在する化学物質の細胞に対する影響を煩雑な破壊分析法を利用して評価することは困難である。そこで生きた細胞のまま簡便に、究極的には非破壊的に測定する新規方法の開発が望まれる。我々は、細胞内における蛋白質間相互作用を“プロテインスプライシング”という現象を利用することにより、緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescent Protein: GFP) の蛍光、あるいはルシフェラーゼの生物発光に情報変換し簡便に測定できる方法を開発した。

split GFP システム

プロテインスプライシングは、細胞内で mRNA からポリペプチドに翻訳された後、N末側のペプチド (A) とC末側のペプチド (B) の間に介在するペプチド (intein) が切り出されると共に、残されたペプチドAとペプチドBのアミド結合が形成される化学反応である。我々はこれまでにプロテインスプライシング反応を利用することにより、細胞内における蛋白質-蛋白質間相互作用を GFP の形成により検出する新規プローブ分子を開発した。蛋白質相互作用検出用プローブは、相互作用する2つの蛋白質に各々連結される2つのプローブ分子 a, b からなる (図2)。プローブ a は、*Synechocystis* sp. PCC6803 由来のスプライシング蛋白質 (intein) dnaE のN末側のポリペプチドに GFP のN末側ペプチドを結合する。またプローブ b は、dnaE のC末側のポリペプチドに GFP のC末側のペプチドを結合する。これらのプローブ a, b 各々に相

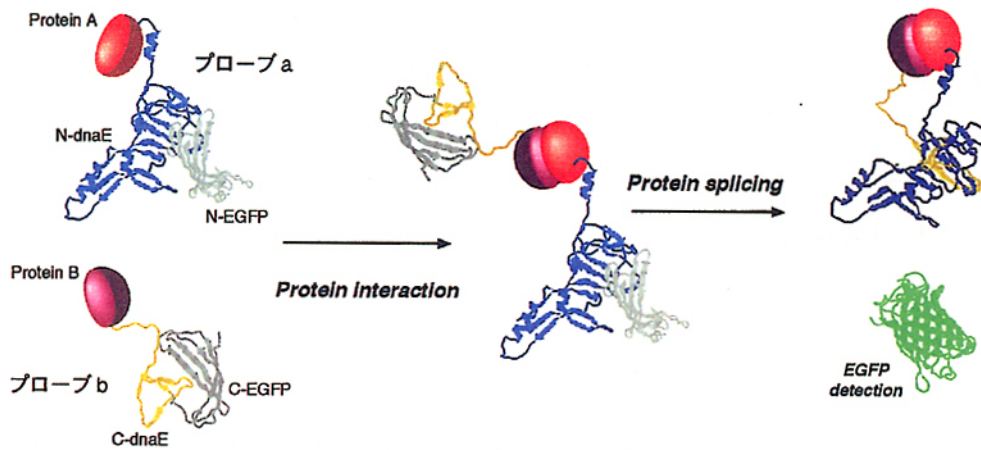


図2. Split GFPシステムの原理図

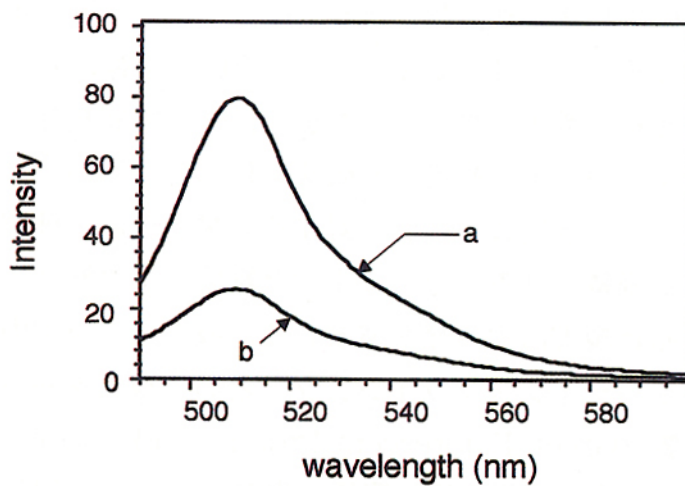


図3. スプリットGFPシステムのプローブ分子の検証. カルモジュリン-M13を連結したプローブ分子 (a), プローブ分子のみ (b) を大腸菌内で発現させ、470 nmで励起した時の蛍光スペクトル変化を測定した.

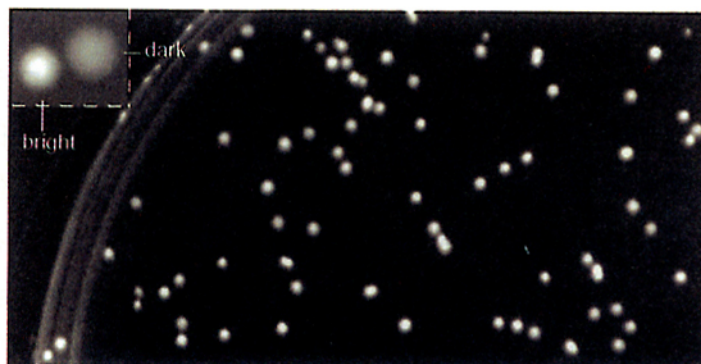


図4. 大腸菌コロニーの蛍光イメージ像. カルモジュリン-M13を含む遺伝子と含まない遺伝子を混合したプラスミドを大腸菌に導入し、形成されたコロニーの蛍光像を測定した. 左上: コロニーの拡大像. カルモジュリン-M13を含む大腸菌はbrightなコロニーを形成する.

相互作用を解析したい蛋白質, protein A 及び protein B を連結する. 蛋白質が相互作用すれば, dnaE の N 末と C 末が近接し再構成するため, スプライシング反応が起こる. その結果 GFP が形成され 510 nm に蛍光が観測される. 従って 510 nm の蛍光強度をモニターすることにより, 蛋白質間相互作用の有無を評価することができる.

考案したプローブ分子が機能するかどうかを検証するために, 相互作用する蛋白質としてカルモジュリンとその標的ペプチド M13 を用いた. カルモジュリンとプローブ分子 a を連結した蛋白質をコードする遺伝子, 及び M13 とプローブ分子 b を連結した蛋白質をコードする遺伝子各々を大腸菌に導入し, 1 個の大腸菌内で両蛋白質を発現させた. 大腸菌の lysate に 470 nm の励起光を照射すると 510 nm に極大を持つ蛍光が観測された (図 3). 一方プローブ分子 a, b のみを発現させた場合, 510 nm の蛍光極大はほとんど観測されなかった. 以上の結果からプローブ分子 a, b は蛋白質間相互作用が起きた時に GFP を産生することがわかった. 次にこれらのプローブ分子を発現するプラスミドを大腸菌に transformation し, 24 時間後に形成された LB プレートの蛍光像を測定した. その結果, カルモジュリンと M13 を含むプラスミドを導入した大腸菌のコロニーは, 蛍光を示すことが分かった (図 4). これは, 細胞内で蛋白質間相互作用を非破壊的に分析できることを示している.

本研究で開発したプローブ分子は, 細胞種を問わず, 原理的には真核細胞内でも蛋白質間相互作用を検出できる一般性を有している. したがって, split GFP システムは真核細胞を用いた EDC スクリーニングにも応用可能である. 一例としてアンドロゲンリセプター (AR) と c-Src との相互作用を示す. 男性ホルモンであるアンドロゲンは, 細胞内に存在する AR に結合し細胞増殖を誘導することが知られている. 近年 AR が細胞膜に存在する cSrc 蛋白質のキナーゼ活性を上昇し, 細胞内情報伝達系を活性化することが乳ガン細胞株や骨芽細胞で明らかになっている. 我々は, 開発した split GFP システムを用いて, cSrc と AR の蛋白質間相互作用が実際生きた真核細胞内で起きているかどうかを検証している. Split GFP プローブ分子を cSrc 及び AR にそれぞれ結合し, NIH3T3 細胞内で発現させた (図 5 A). AR のアゴニストである DHT を添加すると細胞が蛍光を示す様子が観測される (図 5 B). これは DHT 添加により cSrc と AR が細胞膜上で相互作用し GFP が形成されたことを示している. またフローサイトメトリーを用いると, DHT 添加により蛍光性の細胞集団が増加することが観測できる (図 5 C). このように split GFP システムは生きた細

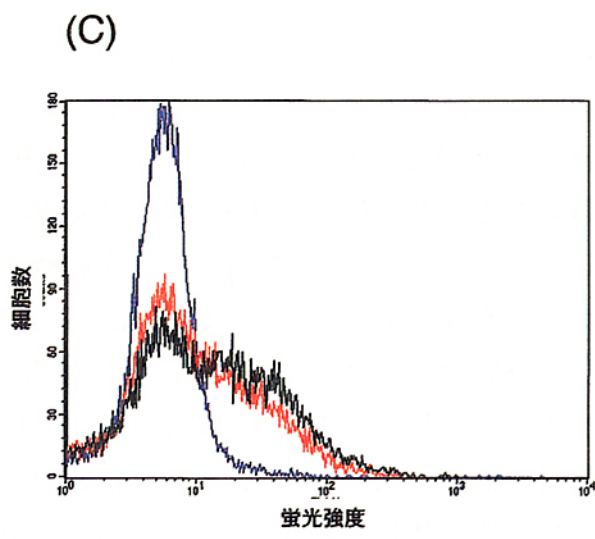
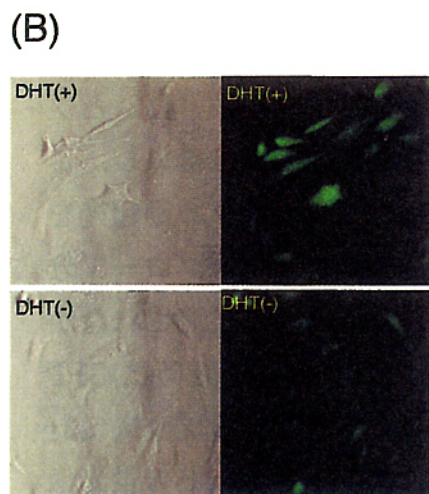
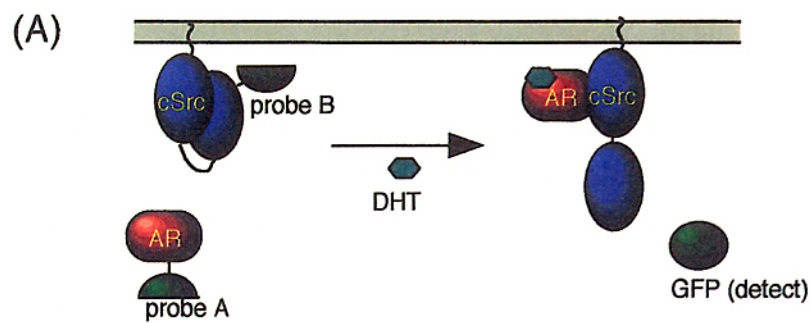


図5. NIH3T3細胞中におけるAR-cSrc蛋白質間相互作用。(A)ARとcSrcとの相互作用によりGFPが形成される模式図。(B) DHT添加および非添加における細胞の蛍光像(右)と透過光像(左)。(C)フローサイトメトリーを用いたNIH3T3細胞の蛍光強度変化の測定。青:何も蛋白質を発現していない正常細胞(コントロール)。赤:AR及びcSrcを発現した細胞(DHT非添加)。黒:AR及びcSrcを発現した細胞(DHT添加)。

胞内での蛋白質間相互作用を、非破壊的に観測することができる。本方法を用いれば、EDC が AR を介した non-genomic 情報伝達に及ぼす影響を評価できると期待している。

split luciferase システム

蛍光由来の luciferase 蛋白質は、酵素基質を添加すると ATP の化学エネルギーを光エネルギーに変換する。この生物発光を利用した分析法は、GFP などの蛍光測定に比べて一般に千倍以上の検出下限 (detection limit) を達成することができる。これは蛍光測定は外部から励起光を照射するため、光のノイズが常に伴うのに対し、発光分析は完全に暗箱の中で測定するため、luciferase により変換された光子のみを測定することができるためである。従って、細胞内蛋白質間相互作用を発光分析により検出できれば、精度の高い定量分析が可能になる。我々は真核細胞内での蛋白質間相互作用を、ルシフェラーゼを用いたプロテインスプライシング反応を利用することにより、高感度かつ短時間に検出する新規方法を開発した。インシュリン情報伝達をモデル実験として、インシュリン刺激によりリン酸化される IRS-1 蛋白質のチロシン残基と、リン酸化チロシンと特異的に結合する SH2 ドメインとの蛋白質間相互作用を検出した。

スプリット luciferase システムの原理を以下に示す。dnaE の N 末及び C 末にスプリットした luciferase を結合した (図 6)。このプローブ分子に相互作用を示す IRS-1 の断片ペプチド及び SH2 ドメインをアミノ酸リンカーを介して結合し、その cDNA をインシュリンリセプターを過剰発現させた Chinese hamster ovary cell (CHO-IR) に遺伝子導入した。目的の蛋白質を発現させた後インシュリンを添加し、リン酸化 IRS-1 と SH2 ドメインとの相互作用により形成される luciferase の量をルミノメーターを用いて測定した。

インシュリン添加 3 時間後から、インシュリンを添加しない場合に比べ大きな発光強度が観測された (図 7)。インシュリン添加によりリン酸化されるチロシン残基をアラニンに置換したペプチドで同様の実験を行うと、インシュリンを添加した場合としない場合とでは有意な変化は観測されなかった。これは、本システムが、インシュリン添加によりリン酸化されたチロシン残基と SH2 ドメインとの相互作用により、luciferase 形成が起きたことを示している。また、luciferase 活性はインシュリン濃度依存的に変化することが分かった。

ER や AR が cSrc に結合するとキナーゼ活性が上昇し、Shc 蛋白質をリン酸化する。リン酸化された Shc は Grb2 蛋白質と相互作用し、Raf→Ras →MAPK へと細胞内情報伝達が誘起されることが知られている。EDC がこの

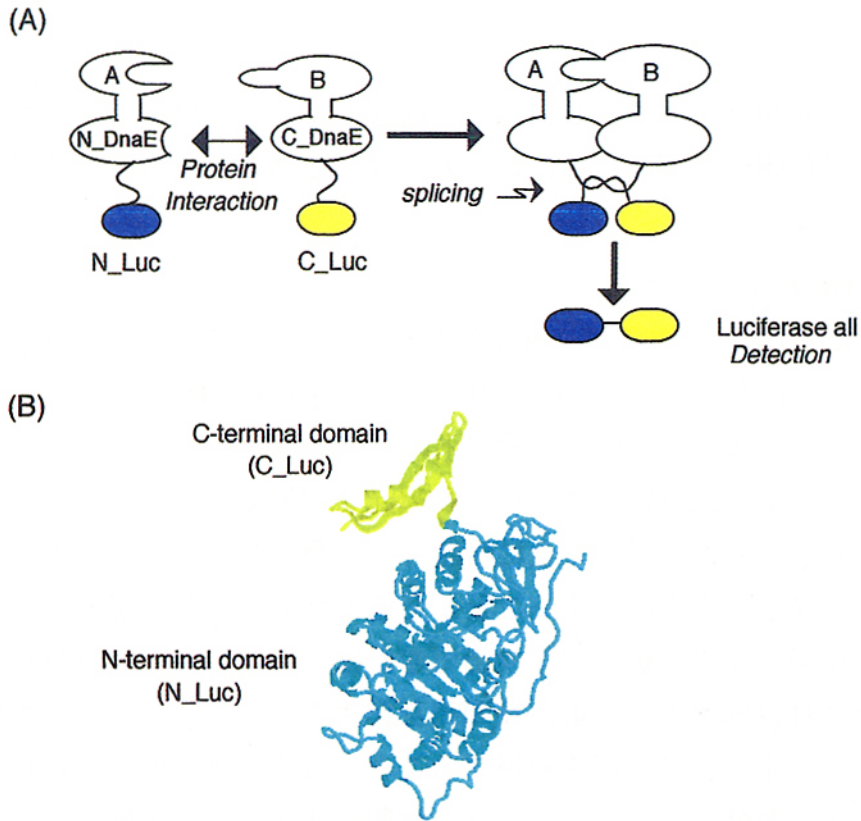


図6. Split luciferase システムの原理図。(A) 蛋白質Aと蛋白質Bが相互作用するとN_dnaEとC_dnaEが近接し、スプライシング反応が起こる。その結果スプリットしたluciferase蛋白質が形成され、luciferase活性を持つ。形成されたluciferaseをルミノメーターを用いて定量分析する。(B) luciferase蛋白質の構造。N末とC末の2つのドメインからなり、活性中心は二つのドメインに挟まれる形で存在する。

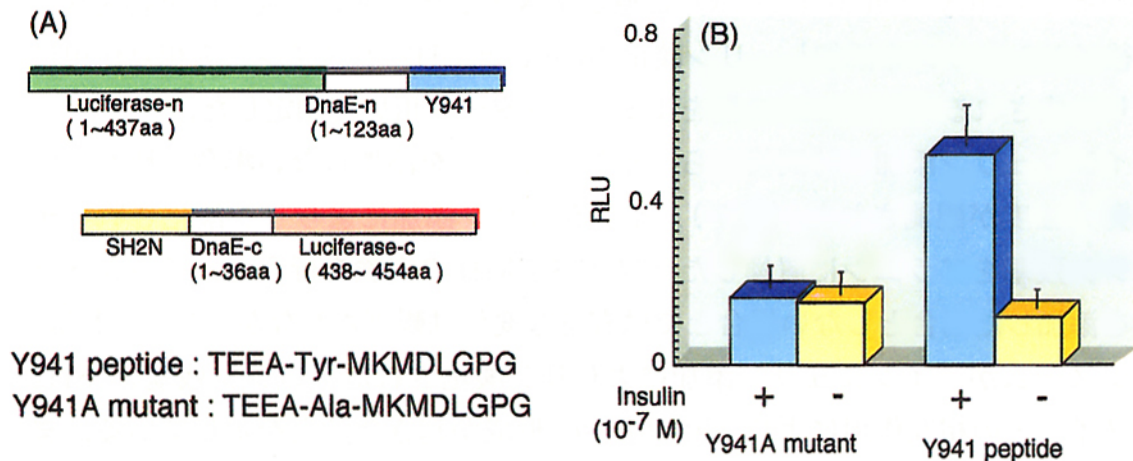


図7. リン酸化ペプチドとSH2ドメインとの蛋白質間相互作用の検出。(A) 作製したDNA。Y941 mutantはTyr残基をAlaに置換してある。(B) インシュリン添加、非添加によるルミネッセンス(生物発光)の測定。

一連のシグナル伝達にどのような影響を与えるかは興味深い。例えば大豆に多く含まれるダイゼインは、cSrc のインヒビターとして知られている。現在、我々は cSrc の情報伝達の下流に存在する Shc と Grb2, 及び Raf と Ras との相互作用を split luciferase システムを用いてアッセイする測定系を作成している。アッセイ系が確立出来次第、EDC 暴露による cSrc の情報伝達システムの攪乱を評価する予定である。

2. 遺伝子発現

エストロゲンなどのステロイドホルモンの作用として最も重要な核内転写因子としての機能を含めた reporter gene assay は、リセプターの転写因子としての活性まで含めた情報伝達能を評価しているが、エストロゲンを正常な標的細胞に作用させたときの遺伝子の発現頻度はどのようなものであろうか？近年のテクノロジーの発展により、遺伝子チップとよばれる数百から数千の遺伝子の発現を一度に調べる方法が開発されている。内分泌攪乱化学物質の影響を評価するためのチップ開発も進められてはいるが、どのような遺伝子をチップにのせるのが適切かという疑問に対する明確な答えはない。チップ技術を EDC スクリーニングに応用するためには、エストロゲンなどを標的組織や細胞に作用させたときに変動する一連の遺伝子群を系統的に解析し、それらをチップにのせるのがもっとも有効である。我々は、ヒト乳ガン細胞株、ヒト神経細胞株及びヒト肝臓組織につき、細胞内の遺伝子発現を SAGE 法を用いて系統的解析を進めている。

ヒト乳ガン細胞株 (MCF7)

現在まで MCF7 細胞における EDC の作用分子機構は十分明らかにされておらず、また暴露を推定する有用なバイオマーカーも得られていない。エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞株(MCF-7)に 17β -estradiol(E2)を添加し、発現が変動する遺伝子群を SAGE 法を用い系統的に解析し、エストロゲンの標的遺伝子群を明らかにすることを試みた。

エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞に、E2 を 10nM 添加し、24 時間後に添加、非添加の細胞より RNA を調製し、SAGE 法により遺伝子発現の変動を系統的に解析した。各々約 3 万個の tag の塩基配列を決定し、遺伝子発現プロフィールを比較し、発現が有意に変動する遺伝子を複数得た (表 2)。Northern blotting にて、発現変動遺伝子の確認を行なったところ、既知のエ

表 2. MCF-7 細胞においてエストロゲン添加により発現が上昇する遺伝子

Tag number		Fold	Tag Sequence	UniGene Cluster	Description
untreated	treated				
41	241	5.9	CTGGCCCTCG	1406	pS2 protein
104	266	2.6	ATGGCTGGTA	182426	ribosomal protein S2
20	76	3.8	GAAATACAGT	79572	cathepsin D
8	51	6.4	AGTAGGTGGC	mito	tag matches mitochondrial sequence
1	16	16.0	CACACGGGCG	194679	WNT1 inducible signaling pathway protein 2
1	16	16.0	GAAATTTAAA	189509	high mobility group 1 protein
3	27	9.0	GGCAGAGGAC	118639	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in

Table represents the increased tags showing differentials with confidence $P < 0.01$.

The tag sequence represents the 10-bp SAGE tag. Tag number indicates the number of times the tag was identified.

エストロゲン応答遺伝子 pS2, cathepsin D, high-mobility group protein 1 以外に新規エストロゲン応答遺伝子として WISP-2 (Wint-1 inducible signaling pathway protein 2) が得られた。E2 による WISP-2 遺伝子の発現誘導は濃度依存的であり, エストロゲン受容体のアンタゴニストである ICI182,780 を同時添加することにより完全に抑制されることから, エストロゲン受容体を介したものであった。また代表的な環境エストロゲンである bisphenol-A, nonylphenol, DES, genistein を添加することでも発現が誘導された。MCF-7 細胞において WISP-2 の発現は, progesterone, dexamethasone, thyroid hormone, 2,3,7,8-TCDD の添加では誘導されず, E2 特異的であった。WISP-2 は, その構造より細胞外に分泌されることが予想され, 環境エストロゲン暴露を評価するためのバイオマーカー分子となることが期待される。そこで大腸菌にて発現した WISP-2 蛋白をウサギに免疫しポリクローナル抗体を作成した。また, ヒト及びマウス WISP-2 に対するペプチド抗体も作成した。この抗体を用い Western blotting を行なったところ, 蛋白レベルでのエストロゲン応答性が確認された。また WISP-2 蛋白は MCF-7 細胞の培養上清中に確認され, 分泌蛋白であることが明らかとなった。現在 WISP-2 蛋白質が EDC 暴露によるバイオマーカーとして機能するかどうかについての検討を行っている。

ヒト肝臓細胞

生体内における蛋白質の合成・異化を専門とするヒト肝臓において, EDC を投与した際に生じる発現遺伝子の系統的解析を行う目的で SAGE による解析を行った。これまでに正常肝, 慢性肝炎, 肝臓の遺伝子発現プロファイルを解析し, 肝臓由来の 152,076 遺伝子の情報が得られ, 固有の遺伝子数は 34,439 遺伝子となった。また, 肝臓 DNA チップを作製するために, SAGE ライブラリーから得られた遺伝子, 肝臓内で発現していると想定される各種代謝関連遺伝子から約 9000 遺伝子を選択した。一方, 基礎的検討として SAGE の発現レベルを DNA チップにおける発現レベルと比較したところ, 発現量の少ない遺伝子では相関に問題が残るものの, 全体としては発現量が良く相関していることから, SAGE の結果を DNA チップ解析に導入できることをすでに明らかにしている。

おわりに

以上、我々が開発を進めている EDC のスクリーニングのための種々のプローブと今後の展望について述べてきた。外因性ホルモン様化合物の、生態系、人間におよぼす作用は生物と化学物質との相互作用の結果であり、短期的には顕在化していなくても世代間にわたる長期的な影響まで見据えなくてはならない。今後の人類の福祉と環境の保全のために化学物質への依存がますます高まることを考え合わせると、HTPS によるリスク評価は不可欠なものと思われる。本講演で紹介するプローブ分子を用いた HTPS 法の展望は、改めて言うまでもなく、生体自身の持つホメオスタシスは既に失われており、HTPS の結果はあくまで毒性としての可能性を示唆するものである。しかし、10 万をこえる工業化学物質や新規薬物、農薬など新規化学物質のリスクアセスメントを行うためには、前段階としてのふるい分け作業は必要不可欠であり、そのための分析方法ならびに技術の更なる開発はリスクアセスメントの一助となることを期待している。

この CREST プロジェクトは以下のチームメンバーによってなされている。
梅澤喜夫、小澤岳昌、佐藤守俊（東京大学大学院理学系研究科）、稲寺秀邦（東京大学環境安全研究センター）、橋本真一（東京大学大学院医学系研究科）、金子周一（金沢大学大学院医学系研究科）、国本学（北里大学薬学部）。

参考文献

1. “Natural and Anthropogenic Environmental Oestrogens: The Scientific Basis for Risk Assessment”. *Pure&Appl. Chem., special issue*, 70, No. 9, September 1998.
2. “Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report”, *EPA, USA*, August 1998.
3. “Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals”. *OECD Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment*, No. 21, *OECD*, Paris, May 2001.