

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04343

研究課題名(和文)ゲノム解析技術を用いたエストロゲンシグナルカスケードの解明

研究課題名(英文)Study on the estrogen signaling pathways using the genome technologies

研究代表者

木山 亮一(Kiyama, Ryoiti)

九州産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：00240739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、女性ホルモンであるエストロゲンに類似した活性を有する化学物質の影響評価を細胞レベルで行うために必要なエストロゲンシグナルカスケードの全体像を解明し、得られた知見を様々な化学物質の影響評価に利用するための基礎を構築することを目的として、最新のゲノム解析技術を利用して以下に示す4点について遺伝子発現解析を行った。(1)遺伝子発現プロファイル解析による解析、(2)ゲノム編集技術を利用したエストロゲンシグナルカスケードの検証、(3)新規エストロゲン応答タンパク質の探索、(4)天然及び合成化合物を用いたエストロゲンシグナルカスケードの検証。得られた成果は論文などで発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は以下のようにまとめられる。まず、学術的な成果として、エストロゲン活性化合物を細胞レベルで評価するために必要なエストロゲンシグナルカスケードに関わる遺伝子(タンパク質)に関する情報を得ることができた。さらに、得られたカスケード情報を利用することでエストロゲン様の活性を有する新規の天然物や合成化合物に関する情報を得た。したがって、本研究で得られた情報を利用することで創薬や健康食品などの製品化に利用できる技術的基盤を作ることができ、学術的な成果だけでなく、産業的にも有用な情報を得ることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have tried to unravel the signaling pathways of estrogenic chemicals to understand their effects at the cellular level and to utilize the knowledge obtained by the study for the evaluation of various chemicals. To achieve this goal, we have analyzed the following points: (1) gene expression profiling to understand the genes associated with the signaling pathways, (2) evaluation of the signaling pathways by the genome editing technology, (3) identification of new estrogen-responsive genes, and (4) evaluation of the estrogen signaling pathways by the natural and industrial estrogenic chemicals. The results were published as research papers.

研究分野：高等動物の分子生物学

キーワード：シグナル伝達 内分泌かく乱物質 バイオテクノロジー 遺伝子発現 天然化合物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エストロゲンは女性にとって重要なホルモンであり、性分化、妊娠、性行動などに関わる重要な生理作用を制御している。近年、様々なエストロゲン活性を有する化学物質が工業製品として合成され、その一部がエストロゲン活性を有したまま環境に残留し内分泌かく乱作用を示すことが問題になっている。一方で、エストロゲンはイソフラボンなどの植物エストロゲンとして健康食品やサプリメントとして有効利用されている。したがって、エストロゲンの作用を理解することは、内分泌かく乱作用の解明だけでなく、医療や創薬、食品など様々な応用の分野にとっても重要である。本課題では、エストロゲン活性物質の影響評価や利用のための基礎となるエストロゲン作用の分子メカニズムを解明したい。

我々はこれまでエストロゲン受容体に関わるシグナル伝達経路に関して研究を進めてきた。エストロゲン受容体は核内受容体として様々な遺伝子(以下、エストロゲン応答遺伝子)の転写を調節しているが、我々は、核内受容体を經由しない、膜経由のエストロゲンのシグナルカスケード(膜受容体経路)について解析を行った(科学研究費補助金・基盤B;平成17~19年度:成果を *Current Pharmacogenomics* 4, 245-260, 2006 にまとめた)。さらに、様々な化学物質(天然試料も含めて)に対する応答を遺伝子の発現レベルにおいてプロファイリングし、エストロゲン応答遺伝子の機能をシグナルカスケードの観点から包括的に解析した(科学研究費補助金・基盤B;平成21~23年度: *Environ. Pollution*, 159, 212-218, 2011 他に発表)。さらに、50種以上のエストロゲン様化学物質の遺伝子発現プロファイルから新たなエストロゲン様化学物質を見出しサイレントエストロゲンと名付け、シグナルカスケードについて解析した(科学研究費補助金・基盤B;平成24~26年度: *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2065-2082, 2014、*Environ. Technol. & Innov.* 1-2, 16-28, 2014、及び、*Environ. Int.* 83, 11-40, 2015 に発表)。さらに、近年、エストロゲン様化学物質が単にエストロゲンに関連する内分泌系に影響を与えるだけでなく、他のホルモンや様々な成長因子(Growth Factor)を介して様々な生理作用にも影響を与えることが明らかになったため、エストロゲンシグナル伝達経路と他のシグナル経路との間において互いに影響を伝える機構(クロストーク機構)のメカニズムに関して解析を行った(科学研究費補助金・基盤B;平成29~31年度: *Eur. J. Pharmacol.* 815:405-415, 2017、*Am. J. Chin. Med.* 45(7):1365-1399, 2017、及び、*Nutrients* 11(6), 2019 に発表)。

2. 研究の目的

本研究では、化学物質の影響評価に必要なエストロゲンシグナルカスケードの全体像を解明し、さらに、エストロゲンシグナルカスケードに関与するシグナルタンパク質を低分子量Gタンパク質の中から見出すことで細胞機能との関係を明らかにし、その情報を様々な化学物質の影響評価に利用する。我々はこれまで、明らかにしたエストロゲン応答遺伝子によって作られた仮想的なシグナルカスケードを作業仮説として、DNAチップ解析などによりそのカスケードの証明を進めた。DNAチップ解析によって得られた情報(遺伝子発現変動の情報)をシグナルカスケード(タンパク質レベルでの情報伝達)の解析に用いた結果、様々な遺伝子(タンパク質)がエストロゲンシグナルカスケードに関係していることがわかり、他の受容体とのクロストークなどを通して細胞運動などの細胞機能や抗動脈硬化作用などの生理作用との関係について解明を進めた。本研究では、これまでに分かったエストロゲンシグナルカスケードについてさらに詳細なメカニズムを理解するために新しいゲノム解析方法であるRNA-seq法と、ゲノム編集技術を利用する。ゲノム編集技術によって受容体を改変した細胞を用いてRNA-seq法により遺伝子レベルで影響を評価することでエストロゲンシグナルカスケードの詳細が明らかになると期待される。さらに、細胞及び個体レベルでの解析によって得られたカスケードに関する情報をより複雑な天然及び合成化合物で検証することで、化学物質のリスク評価だけでなく、創薬や食品利用などの応用に関する知見も得る。

3. 研究の方法

本研究では次に示す項目を表示の時系列により進める。

(1) 遺伝子発現プロファイル解析によるエストロゲンシグナルカスケードの解析(令和2~3年度):我々は、すでにフェノール系化合物など50種類以上の化学物質について遺伝子応答プロファイルの解析を行い、細胞増殖や細胞内輸送などの遺伝子機能との関係について情報を得た(*Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2065-2082, 2014)。さらに、トランスクリプトーム解析としてRNA-seqを行い、ヒトのほぼすべての遺伝子(約3万個)の中からエストロゲン応答遺伝子を網羅的に取得した(令和元年日本分子生物学会発表)。これらに関与するエストロゲンシグナルカスケードとして、ゲノミック及びノンゲノミック経路、シグナルクロストーク経路、GPR30による膜共役系、Ras(低分子量Gタンパク質のひとつ)やMAPK/AP-1などを經由する転写活性化経路などを明らかにした。また、食用キノコであるハナヒラタケの抽出物から、乳がん由来のMCF-7細胞の増殖は活性化しないがエストロゲンと似た遺伝子発現プロファイルを示すサイレントエストロゲン様の化合物の存在を報告し、新しいカスケードに関しても報告した(*Sci. Rep.* 8,

16053, 2018)。我々は、これまでに同じ食用キノコであるアガリクスからサイレントエストロゲン活性物質としてプレフェルディンAを単離した(J. Agri. Food Chem. 61, 128-136, 2013)。プレフェルディンAはゴルジ輸送の阻害剤であり、低分子量 G タンパク質の Arf タンパク質に結合してその機能を阻害する。本項目では、遺伝子発現プロファイル解析をもとにして、エストロゲン活性物質によるエストロゲンシグナルカスケードの相違について解析する。

(2) ゲノム編集技術を利用したエストロゲンシグナルカスケードの検証(令和2~3年度):

(1) 項で検討したエストロゲンシグナルカスケードに関して、ゲノム編集技術を利用して作成したエストロゲン応答細胞(エストロゲン受容体をノックアウトした MCF-7 細胞)を利用して、細胞機能に関するカスケードについて細胞機能の共通性や相違点を検証し、また、シグナル伝達阻害剤を用いることで、シグナルカスケードに関与するタンパク質について明らかにする。エストロゲン受容体として核内受容体である ER /ER の他に膜受容体 GPR30 (GPER) などが存在しており、それらの受容体をノックアウトした細胞をゲノム編集技術を用いて作成し、遺伝子発現プロファイル解析や細胞機能解析を行うことでそれぞれの受容体の役割とエストロゲンシグナルカスケードを検証することができる。

(3) エストロゲンシグナルカスケードの解析による新規エストロゲン応答タンパク質の探索(令和2~4年度): 本研究では、(1) 項で得られた新たなエストロゲン応答遺伝子と(2) 項で得られた新しいシグナルタンパク質に関してエストロゲンシグナルカスケードとの関係を解析することで新しいマーカータンパク質(新規エストロゲン応答タンパク質)を得ることを目標とする。(2) 項では特に低分子量 G タンパク質に注目して解析を行うことから、本項目では Rho や Rac1 などの細胞移動関連低分子量 G タンパク質を中心にシグナルカスケードを解析し、これまでに我々が解析を行った細胞分裂や細胞運動に係る低分子量 G タンパク質(Exp. Cell Res. 353, 79-87, 2017; J. Cell Biol. 2008; J. Cell Biol. 2009 など)を中心にエストロゲンシグナルクロストーク機構を明らかにしたい。

(4) 天然及び合成化合物を用いたエストロゲンシグナルカスケードの検証(共同研究: 令和2~4年度): (1) ~ (3) で得られたエストロゲンシグナルカスケードに関する情報をさらに複雑な刺激(特に複数の刺激が同時に起る場合)の解析に対して応用が可能かについて合成化合物を用いて検討する。方法としては、(2) 項で作成したノックアウトした細胞を用いて遺伝子発現解析を行い、遺伝子とエストロゲンシグナルカスケードの両方について合成化合物の影響を比較する。さらに、ER アンタゴニスト(IC1 182,780)やシグナル伝達系阻害剤(PD98059 や AG1478 など)の影響を調べることで、それぞれの化合物の影響を評価する。天然試料については、我々はすでに、漢方薬の効能の探索に利用できるような遺伝子発現プロファイルの取得を行ってきた(Am. J. Chin. Med. 45, 1365-1399, 2017; Trends Food Sci. Tech. 54, 186-196, 2016 など)。また、合成化合物に関しては、50 種類以上の単体化合物だけでなく、重油の分解産物の解析も行い、環境評価への応用に関して実績を有する(Environ. Pollution 168, 10-14, 2012)。本研究では天然及び合成化合物誘導体についてカスケード情報を得て、(1) 及び(2) 項で得られた化学物質によるエストロゲンシグナルカスケードと細胞機能との関係を理解する。

4. 研究成果

本研究では、女性ホルモンであるエストロゲンに類似した活性を有する化学物質の影響評価を細胞レベルで行うために必要なエストロゲンシグナルカスケードの全体像を解明し、さらに、そのカスケードに関与するシグナルタンパク質について細胞機能を明らかにすることで様々な化学物質の影響評価に利用するための基礎を構築することを目的とした。そのために、本研究では最新のゲノム解析技術のうち RNA-seq 法とゲノム編集技術を利用し、エストロゲン受容体をノックアウトした細胞を作製して RNA-seq 法により様々な天然化合物や合成化合物に対する遺伝子発現解析を行った。さらに、得られた情報についてより複雑な天然及び合成化合物を用いて検証を行った。全体として以下の成果が得られた。

(1) 遺伝子発現プロファイル解析によるエストロゲンシグナルカスケードの解析: 本項目では、まず、緑茶とショウガの成分でもあるフラボノイドのエストロゲン活性に関する情報をまとめ、次に、代表的な化合物(ダイゼインやゲニステインなど)について RNA-seq 解析をまとめた(論文発表・特許出願完了)。

(2) ゲノム編集技術を利用したエストロゲンシグナルカスケードの検証: 本項目ではゲノム編集技術によりエストロゲン受容体をノックアウトした MCF-7 細胞の作成をほぼ終了した。解析については継続して行う予定である。

(3) エストロゲンシグナルカスケードの解析による新規エストロゲン応答遺伝子(タンパク質)の探索: 本項目では(1) 項の RNA-seq 解析をもとに新規エストロゲン応答遺伝子を選択し、リアルタイム RT-PCR 法による検証とデータベースを利用した機能解析を実施した。新規遺伝子に関する解析を行い、成果は論文として発表した。

(4) 天然及び合成化合物を用いたエストロゲンシグナルカスケードの検証: 本項目では(1) 項に基づいて合成化合物の解析と並行して天然化合物(ジンゲロールやショウガオールなど)に関する解析結果を終了し、論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishi Kentaro, Fu Wenqiang, Kiyama Ryoiti	4. 巻 17
2. 論文標題 Novel estrogen-responsive genes (ERGs) for the evaluation of estrogenic activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0273164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyama Ryoiti	4. 巻 114
2. 論文標題 Estrogenic flavonoids and their molecular mechanisms of action	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 109250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2022.109250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyama Ryoiti	4. 巻 86
2. 論文標題 Nutritional implications of ginger: chemistry, biological activities and signaling pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2020.108486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyama Ryoiti	4. 巻 95
2. 論文標題 Estrogenic biological activity and underlying molecular mechanisms of green tea constituents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 247 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tifs.2019.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今村育実、木山亮一
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたKANK1ノックアウト細胞の樹立と表現型の研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西健太郎、付文強、木山亮一
2. 発表標題 エストロゲン活性評価のための新規エストロゲン応答遺伝子の同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永取旅人、西堀優起、今村育実、西健太郎、木山亮一、満生慎二
2. 発表標題 クララ根エキス由来プレニルフラボノイドのエストロゲン活性
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西健太郎、付文強、木山亮一
2. 発表標題 新規エストロゲン応答遺伝子の同定と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今村育実、木山亮一
2. 発表標題 がん抑制遺伝子KANK1の異常によって引き起こされる細胞分裂異常の研究
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西健太郎、楊潔、木山亮一
2. 発表標題 RNA-seq法を用いたエストロゲン応答メカニズムの解析と評価
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西健太郎、竹本拓矢、伊賀和宏、木山亮一
2. 発表標題 発酵させた豆乳の抽出物および大豆化合物を用いたエストロゲン応答メカニズムの解析と評価
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuzuki Niwa, Kentaro Nishi, Wenqiang Fu, Shin-ichiro Isobe, Ryoiti Kiyama
2. 発表標題 Evaluation of estrogenic activity of ginger compounds
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エストロゲン様活性の評価方法	発明者 木山亮一、西健太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-039670	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	磯部 信一郎 (Isobe Shinichiro) (80435099)	九州産業大学・生命科学部・教授 (37102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------