

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310046

研究課題名（和文）エストロゲン様化学物質影響評価のための膜共役経路の解明

研究課題名（英文）Study of membrane-linked signaling pathways for evaluation of estrogenic chemicals

研究代表者

木山 亮一（KIYAMA RYOITI）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00240739

研究成果の概要（和文）：

本研究では、エストロゲン応答に関わるシグナル伝達系遺伝子（タンパク質）に関して様々な化学物質に対する応答を遺伝子発現レベルにおいてプロファイリングすることにより、エストロゲン応答を細胞内シグナル伝達経路の観点から包括的に解析することで、エストロゲン活性を示す化学物質について新たなシグナル伝達経路を見出し、また、化学物質の影響評価において新しい視点による評価法を作成した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we found new signaling pathways for estrogenic chemicals and created a new way of evaluation of such chemicals by means of the profiling of the expression of estrogen-responsive genes and a comprehensive analysis of intracellular signal transduction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・科学物質影響科学

キーワード：プロテオーム・エストロゲン・シグナル伝達・シグナルカスケード・脳神経系

1. 研究開始当初の背景

エストロゲンは女性ホルモンとして性分化、妊娠、性行動などにおいて様々な役割を担っている。また、エストロゲン活性を有する化学物質は、工業製品由来の内分泌攪乱化学物質やイソフラボンなどの植物エストロ

ゲンとして良い意味でも悪い意味でも我々の生活に関わっている。したがって、エストロゲンの作用を分子レベルで解析することは、医療や創薬の分野だけでなく、食品や化学物質管理など様々な分野にとって重要である。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伝達経路（膜受容体経路）について解析を行ってきた（科学研究費補助金・基盤 B, 平成 17-19 年度：以下の総説にまとめた： Tanji, M. and Kiyama, R. *Current Pharmacogenomics* 2, 255, 2004; Inoue, A., Tanji, M. and Kiyama, R. *Current Pharmacogenomics* 4, 245, 2006）。しかし、これらのシグナル伝達経路は、エストロゲンそのものだけでなく、エストロゲン活性を有する物質のすべての作用に関わる経路かどうかは不明であり、最近では新しい経路を示す知見も得られている。そのため、新しい手法を用いてエストロゲン様化合物に関する解析が必要になってきている。

2. 研究の目的

本研究では、エストロゲン及びエストロゲン様化合物に関して、DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム及び抗リン酸化タンパク質抗体を用いたプロテオーム解析を通じてシグナル伝達系に関わる遺伝子（タンパク質）を明らかにし、さらに、様々な化学物質（特に天然試料などの混合物）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することにより、エストロゲンに反応する遺伝子の機能をシグナル伝達経路の観点から包括的に解析し、それらの遺伝子が実際にどのようなネットワークを形成して生理機能へと結びついているかを明らかにすることを目的とする。特に、エストロゲン応答シグナル伝達系は、膜受容体経路とは別の成長因子などによる膜経路が重要な役割を担っていることが最近明らかになってきたことから、様々な成長因子に対する膜受容体経路のシグナル伝達経路との共役経路を明らかにすることで、従来明らかにされた核内受容体経路だけでは説明できない生理作用のメカニズムを明らかにしたい。

3. 研究の方法

【研究計画・方法の概要】

我々は、まず、DNA チップ解析によりエストロゲン応答遺伝子を明らかにして、それら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、プロテオーム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の解析に用いる方法は、すでいくつか報告されている（例えば： van Steensel., *Nat. Genet. Suppl.*: S18, 2005）が、本研究では、大きく分けて、シグナルの基点となる刺激を変えることで使われるシグナルカスケードを変えて、そのカスケードにのっているタン

パク質の応答を転写反応レベルでモニターする方法と、直接、タンパク質のリン酸化などのタンパク質レベルでの変化をモニターする方法の両方を行ない、両方の結果を総合的に評価した。さらに、細胞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ラット脳の性分化の系で検証することで、生体レベルにおいても検証を試みた。

【研究方法の詳細】

(1) エストロゲン応答遺伝子によるシグナルカスケードの同定

我々は本提案以前に、エストロゲン応答遺伝子のうち膜受容体経由のシグナルカスケード（ノンジェノミック経路）に関与する遺伝子について、転写及びタンパク質レベルの解析を行い、基本的な仮想カスケードに関して検証を行った（Tanji, M. and Kiyama, R. *Current Pharmacogenomics* 2, 255, 2004）。本研究では、その後シグナル伝達系に関与することが解った遺伝子に関して、それぞれの遺伝子について報告されたカスケードについて検証を行った。さらに、阻害剤などを利用してシグナル伝達経路の解析を行った。

(2) 化学物質を用いた膜共役系を含めた遺伝子応答のプロファイリング

(1) 項で解析したシグナルカスケードをさらに様々な化学物質を用いて検証することにより、それぞれの化学物質の影響を評価するための基本となるプロファイルを得ることができ、さらに、シグナルカスケードとの関係についても解析することができる。本研究の基礎として、我々は、すでにフェノール系化合物など様々な化学物質について遺伝子応答プロファイルを取得し、また、基準に用いた MCF-7 細胞とは異なる受容体システムとカスケードを持つと考えられる細胞株（T-47D 細胞など）について様々な化学物質に対する遺伝子応答プロファイルを取得した。これらを基礎として、異なる化学物質あるいは異なる細胞に対するシグナルカスケードレベルでの応答を調べることにより、膜共役系に関して特徴的な化学物質や細胞種に関する情報を得た。

(3) ラット脳の分化におけるエストロゲン応答シグナル伝達系の解析

我々はすでに、AGR, NPY-Y1R, BSN, N-cadherin, CtIP などの遺伝子について、ラットの脳、子宮、肝臓などにおけるエストロゲン応答に関して、DNA マイクロアレイアッセイ、ウエスタンブロット解析などによりエストロゲン応答に関する解析を行った。これらに遺伝子を含めて、エストロゲン応答遺伝子に関してラット脳（特に脳下垂体視床下部について）の性分化のとの関連について、ア

ポトシス関連遺伝子、細胞移動関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子などに分けて日齢による遺伝子発現の変動と組織的な分化との関係を解析した（連携研究者との共同研究）。

（４）天然試料などの混合物を用いた遺伝子応答のプロファイリング

本項目では、（１）～（３）で得られた基本的な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）に対して応用が可能かについて検討を行った。特に、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。本項目では、すでに得られたフェノール類やフタル酸エステル類、あるいは、植物エストロゲン類（イソフラボン、フラバノールなど）などの遺伝子発現プロファイルを、甘草、朝鮮人参などの漢方抽出物や、アガリクスなどのきのこ類の抽出物について得られたプロファイルと比較して遺伝子機能レベルで効能に関する評価を行った。手法としては、相関解析、クラスター解析、遺伝子機能別の統計的検定（t テストや ANOVA）などを用いた。

【年次計画】

以下の年次計画にしたがって計画を進めた。

（１）エストロゲン応答遺伝子によるシグナルカスケードの同定（平成 21～22 年度）

（２）化学物質を用いた膜共役系を含めた遺伝子応答のプロファイリング（平成 21～22 年度）

（３）ラット脳の分化におけるエストロゲン応答シグナル伝達系の解析（平成 21～23 年度）

（４）天然試料などの混合物を用いた遺伝子応答のプロファイリング（平成 22～23 年度）

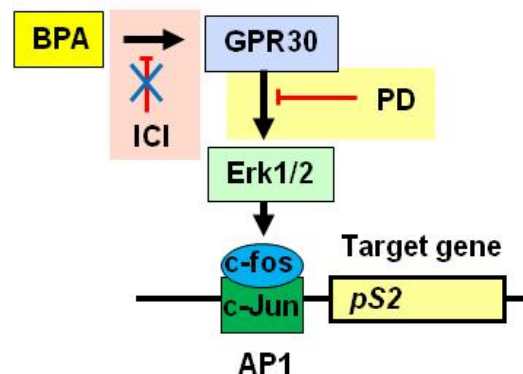
4. 研究成果

本研究では、トランスクリプトーム及びプロテオーム解析を通じて明らかになったシグナル伝達系に関わる遺伝子（タンパク質）に関して、様々な化学物質（特に天然試料などの混合物）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することにより、様々な成長因子に対する膜受容体経路のシグナル伝達経路との共役経路を明らかにすることで、従来明らかにされた核内受容体経路だけでは説明できない生理作用のメカニズムを明らかにすることを目指した。

我々は、まず、（１）エストロゲン応答遺伝子によるシグナルカスケードの同定を行ない、さらに、（２）様々な化学物質（ビスフェノール A など）を用いた膜共役系を含め

た遺伝子応答のプロファイリングを取得した。さらに、様々な阻害剤を用いて受容体やシグナル伝達経路について解析し、新しい GPR30 受容体経路のシグナル伝達経路を明らかにし、論文として発表した（Dong, S., Terasaka, S. and Kiyama, R. (2011) Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. Environ. Pollution, 159, 212-218 ; 図参照）。

ビスフェノール A によるカスケード （Dong et al., Environ. Pol. 2011）

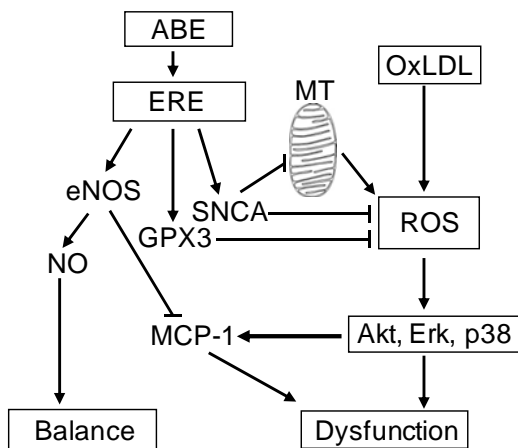


また、連携研究者との共同研究においては、（３）ラット脳の分化におけるエストロゲン応答シグナル伝達系の解析を進め、日齢変動によるタンパク質のリン酸化などの変動を解析することで性分化に関与するシグナル伝達経路について解析を行った（Chiaki Suzuki, Tomohiro Hamada, Ryoiti Kiyama, Yasuo Sakuma, Yuko Wada-Kiyama : Estradiol-induced signaling involved in the sexual differentiation of the rat preoptic area. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010 年 12 月 7 日, 神戸; Y. Wada-Kiyama, C. Suzuki, T. Hamada, R. Kiyama, Y. Sakuma : 「Actin dynamics in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area during the critical period.」. 第 89 回日本生理学会大会. 2012 年 3 月 31 日, 松本 ; その他「5. 主な発表論文等」参照）。

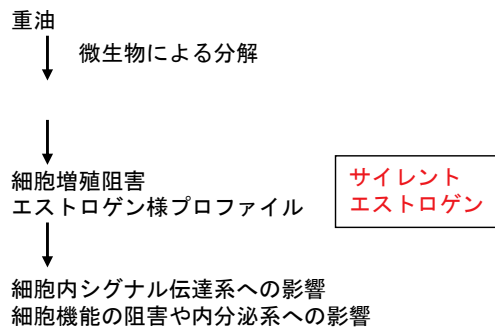
さらに、上記の（１）～（３）項の成果をもとに、（４）天然試料などの混合物を用いた遺伝子応答のプロファイリングを進め、様々な天然試料や環境試料（アガリクス抽出物及び石油分解物）、及び、その成分や植物エストロゲンについて、エストロゲン活性評価を行ったところ、いくつかの試料についてはエストロゲン様プロファイルを示しながら MCF-7 細胞の増殖活性は示さなかった（Dong, S., Furutani, Y., Suto, Y., Furutani, M., Zhu, Y., Yoneyama, M., Kato, T., Itabe, H., Nishikawa, T., Tomimatsu,

H., Tanaka, T., Kasanuki, H., Masaki, T., Kiyama, R. and Matsuoka, M. (2012) Estrogen-like activity and dual roles in cell signaling of an *Agaricus blazei* Murrill mycelia-dikaryon extract. *Microbiol. Res.* 167, 231-237 (図参照); Zhu, Y., Kitamura, K., Maruyama, M., Higashihara, T., Kiyama, R. (2012) Estrogenic activity of bio-degradation products of C-heavy oil revealed by gene expression profiling using an oligo-DNA microarray system. *Environ. Pollution* 168, 10-14 (図参照); その他「5. 主な発表論文等」参照。

アガリクス抽出物によるカスケード
(Dong *et al.*, *Microbiol. Res.* 2012)



石油分解物によるカスケード
(Zhu *et al.*, *Environ. Pol.* 2012)



このような化学物質は他にも存在することから、これらの化学物質を総称して「サイレントエストロゲン」と命名した。これらの新しいタイプのエストロゲン様化合物は、膜共役系や細胞増殖シグナル伝達経路を含めてエストロゲンシグナル伝達経路に特徴があるものと考えられる。

以上のように、エストロゲン活性を示す化学物質について、細胞内シグナル伝達経路の解析により、新たなシグナル伝達経路を見出

し、また、化学物質の影響評価として新しい視点による評価法を見出すことに成功した。したがって、本研究は当初の目的を達成したと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計11件)

①Zhu, Y., Kitamura, K., Maruyama, M., Higashihara, T., Kiyama, R. Estrogenic activity of bio-degradation products of C-heavy oil revealed by gene expression profiling using an oligo-DNA microarray system. *Environ. Pollution* 査読有、*Environ. Pollution* 168、10-14、DOI:10.1016/j.envpol.2012.04.005

②Liao, Y., Wang, J., Huang, Q.-s., Fang, C., Kiyama, R., Shen, H. and Sijun Dong, S. Evaluation of cellular response to perfluorooctane sulfonate in human umbilical vein endothelial cells. *Environ. Pollution* 査読有、印刷中、2012

③Dong, S., Furutani, Y., Suto, Y., Furutani, M., Zhu, Y., Yoneyama, M., Kato, T., Itabe, H., Nishikawa, T., Tomimatsu, H., Tanaka, T., Kasanuki, H., Masaki, T., Kiyama, R. and Matsuoka, M. Estrogen-like activity and dual roles in cell signaling of an *Agaricus blazei* Murrill mycelia-dikaryon extract. *Microbiol. Res.* 査読有、167、2012、231-237、DOI:10.1016/j.micres.2011.09.003

④Li, C.-C., Kuo, J.-C., Waterman, C. M., Kiyama, R., Moss, J. and Vaughan, M. Effects of BIG1 and KANK1 on cell polarity and directed migration during wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有、108、2011、19228-19233、DOI:10.1073/pnas.1117011108

⑤Kiyama, R. and Wada-Kiyama, Y. A conserved regulatory element in the mammalian beta-globin promoters. *J. Mol. Evol.* 査読有、73、2011、101-108、DOI:10.1007/s00239-011-011-9459-y

⑥Zhu, Y., Ogaeri, O., Suzuki, J.-i., Dong, S., Aoyagi, T., Mizuki, K., Takasugi, M., Isobe, S.-i. and Kiyama, R. Application of Fluolid-Orange-labeled probes for DNA microarray and immunological assays.

Biotechnol. Letts. 査読有、33、2011、
1759-1766、
DOI:10.1007/s10529-011-0646-0

⑦Kakinuma, N., Zhu, Y., Ogaeri, T.,
Suzuki J.-i. and Kiyama, R. Functions of
Kank1 and carcinogenesis. "Tumor
Suppressors" (Richard Schortemeyer III,
ed.) 査読有、2011、161-173、
URL:http://www.novapublishers.com

⑧Dong, S., Terasaka, S. and Kiyama, R.
Bisphenol A induces a rapid activation of
Erk1/2 through GPR30 in human breast
cancer cells. Environmental Pollution
査読有、159、2011、212-218、
DOI:10.1016/j.envpol.2010.09.004

⑨Kakinuma, N., Zhu, Y., Wang, Y., Roy B.
C. and Kiyama R. Kank proteins: Structure,
functions and diseases. Cellular and
Molecular Life Sciences 査読有、66、2009、
2651-2659、
DOI:10.1007/s00018-009-0038-y

⑩ Kakinuma, N. and Kiyama, R. A major
mutation of KIF21A associated with
congenital fibrosis of the extraocular
muscles type 1 (CFEOM1) enhances
translocation of Kank1 to the membrane.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 査読有、386、
2009、639-644、
DOI:10.1016/j.bbrc.2009.06.109

⑪ Parveen, M., Zhu Y. and Kiyama, R.
Expression profiling of the genes
responding to zearalenone and its
analogues using estrogen-responsive genes.
FEBS Letters 査読有、583、2009、2377-2384、
DOI:10.1016/j.febslet.2009.06.035

[学会発表] (計18件)

①Y. Wada-Kiyama, C. Suzuki, T. Hamada, R.
Kiyama, Y. Sakuma、Actin dynamics in the
sexually dimorphic nucleus of the rat
preoptic area during the critical period
第 89 回日本生理学会大会 2012/3/31 長野県
松本文化会館

②朱耘、木山亮一、ジャトロファ精製油お
よび搾りかすの生理活性評価第 11 回産総
研・産技連LS-BT合同研究発表会 2012/1/31
茨城県 産総研共用講堂

③Dilibaier Wuxiuer、魚返拓利、朱耘、鈴
木順一郎、青柳貞一郎、磯部信一郎、木山
亮一、新規蛍光物質Fluolidを用いた多重染
色法によるヒト腎臓癌の病理診断法の開発
第 11 回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
2012/1/31 茨城県 産総研共用講堂

④木山亮一、テーラーメイド医療用診断機
器 (DNAチップ) : DNAチップ<開発ガイドラ
イン> 次世代医療機器 開発ガイドラ
イン・評価指標セミナー 2012/1/20 東京都 日
本教育会館

⑤Y. Wada-Kiyama, C. Suzuki, T. Hamada, R.
Kiyama, Y. Sakuma、Signaling of estrogen
to actin dynamics via cofilin controls
sexually dimorphic formation of the rat
preoptic area. 第 34 回日本分子生物学会年
会 2011/12/16 神奈川県 パシフィコ横浜

⑥朱耘、北村恵子、丸山明彦、東原孝規、木
山亮一、DNAマイクロアレイアッセイを用い
た重油微生物分解産物のエストロゲン活性
の評価、第 34 回日本分子生物学会年会
2011/12/16 神奈川県 パシフィコ横浜

⑦Dilibaier Wuxiuer、魚返拓利、朱耘、
鈴木順一郎、青柳貞一郎、磯部信一郎、木
山亮一、新規蛍光色素Fluolidを用いた多重
染色法によるヒト腎臓癌の病理診断法の開
発、第 34 回日本分子生物学会年会
2011/12/13 神奈川県 パシフィコ横浜

⑧木山亮一、オミックス解析による天然・人
工化合物のエストロゲン活性評価第 29 回内
分泌代謝学サマーセミナー 2011/7/7 宮城県
艮陵会館

⑨北村恵子、丸山明彦、東原孝規、朱耘、木
山亮一、オリゴDNAマイクロアレイアッセイ
による重油微生物分解産物のエストロゲン
活性評価、第 10 回産総研・産技連LS-BT合同
研究発表会 2011/2/1 茨城県 産総研共用講
堂

⑩魚返拓利、鈴木順一郎、Roy BC、垣沼直人、
木山亮一、Kank1 によるDaaml 及びRhoを介す
る中心体複製と細胞質分裂の制御、第 10 回
産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
2011/2/1 茨城県 産総研共用講堂

⑪朱耘、木山亮一、Expression profiling o
f the estrogen-responsive genes in resp
onse to capsaicinoids using an oligo-DN
A microarray assay system 第10回産総研
・産技連LS-BT合同研究発表会 2011/2/1 茨
城県産総研共用講堂

⑫C. Li, J. Kuo, R. Kiyama, J. Moss, M. Vaughan, Effects of BIG1 and KANK1 on Cell Polarity and Directed Migration during Wound Healing. 50th Annual Meeting of the American Society of Cell Biology 2010/12/11 Philadelphia Convention Center, (米国ペンシルベニア州)

⑬Ryoiti Kiyama, Intracellular signalling stimulated by synthetic estrogenic chemicals and natural phytoestrogens. (招待講演) 2nd Xiamen International Forum on Urban and Environment (XIFUE) 2010/12/11 厦門市 (中国) 中国科学院都市環境研究所

⑭鈴木順一郎, Badal. C Roy, 垣沼直人, 木山亮一, Kank1 によるDaam1 及びRhoを介する細胞質分裂の制御、第 33 回日本分子生物学会年会 2010/12/10 神戸 ポートアイランド

⑮Yun Zhu, Ryoiti Kiyama, Evaluation of Estrogenic Activity of Flavonoids by an Oligo-DNA Microarray Assay. 第 33 回日本分子生物学会年会 2010/12/8 神戸 ポートアイランド

⑯Chiaki Suzuki, Tomohiro Hamada, Ryoiti Kiyama, Yasuo Sakuma, Yuko Wada-Kiyama, Estradiol-induced signaling involved in the sexual differentiation of the rat preoptic area. 第 33 回日本分子生物学会年会 2010/12/7 神戸 ポートアイランド

⑰Chun-Chun Li, Xiaoyan Shen, Ermanno Puxeddu, Jean-Cheng Kuo, Ryoiti Kiyama, Gustavo Pacheco-Rodriguez, Joel Moss, and Martha Vaughan, Diverse Regulatory Actions of BIG1 and 2 Related to their ARF-activating and AKAP Functions. FASEB meeting (Arf Family G Proteins) 2010/8/15 Carefree Resort ホテル Carefree (米国アリゾナ州)

⑱木山亮一, DNA microarray analysis for evaluation of estrogenicity of natural and synthetic compounds. 中国科学院都市環境研究所「環境及び健康研究学術報告会」環境研究所 2009/11/26 中国 厦門

[図書] (計 1 件)

木山亮一 他、三和書籍 バイオ知財入門、2010、257 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木山 亮一 (KIYAMA RYOITI)

独立行政法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00240739

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

佐久間 康夫 (SAKUMA YASUO)

日本医科大学・医科研究科・教授

研究者番号：70094307

木山 裕子 (KIYAMA YUKO)

日本医科大学・医科研究科・講師

研究者番号：60234390