

内分泌攪乱物質AtrazineはSF-1依存性にアロマターゼ転写活性を誘導する

柳瀬 敏彦¹⁾, 范 呉強¹⁾, 小松 朋子²⁾, 諸橋 憲一郎²⁾, 高柳 涼一¹⁾, 名和田 新³⁾

1) 九州大学大学院医学研究院病態制御内科

2) 自然科学研究機構基礎生物学研究所

3) 九州大学大学院医学研究院

はじめに

除草剤のatrazineは米国で最頻用の除草剤であり、おそらく世界中でも最頻用と考えられているが、その使用の是非をめぐり、論争の渦中にある。土壌や表面水のもっともありふれた汚染化学物質として [1], その広範な使用が野生ガエルの世界的な減少を含め、生態系へのさまざまな影響を及ぼす可能性が懸念されている [2]。Atrazineがaromatase活性の上昇作用を介してオスガエルのメス化、半陰陽や不妊を引き起こす可能性が指摘されているが、aromatase活性の上昇に関しては異論もある。一方では、ヒトにおいても精子数の減少との関連を示唆する報告やエストロゲン依存性癌との関連で、その井戸水汚染と乳癌との関係 [3] やatrazine製造工場の周辺における高率の前立腺癌の発生 [4] 等も指摘され、懸念されている。今回、われわれは、chloro-s-triazine系の除草剤であるatrazine/shimazineは細胞環境によってはaromataseの活性化を引き起こすこと、すなわちSF-1/Ad4BP (以下SF-1) の高発現がその活性化には必須であることを見出したので、その機序の解析とともに報告する。

結 果

われわれは以前、NIH3T3細胞にSF-1を遺伝子導入した系において、forskolinはSF-1依存性aromatase promoter II (ArPII) 活性 (ルシフェラーゼアッセイによる) を増強することを見出し報告した [5]。今回、56種類の内分泌攪乱候補物質のうち、この系に干渉する化学物質が存在するか否かを検討した。その結果、atrazine/simazineが、NIH3T3細胞におけるforskolin刺

激下でのSF-1依存性ArPII転写活性をさらに増強することが判明した。さらのこの2化学物質は単独でSF-1依存性にArPII転写活性を濃度依存性に増強したが (図1 A), 10^{-5} Mにおけるその強度はforskolin単独の強度より、若干弱めであった (図1 B)。また、NIH 3 T 3 細胞にSF-1を発現導入しなければ、atrazine/simazineによるこのような効果は認められなかった (図1 C)。

同様の検討をわれわれ自身が樹立したaromatase発現細胞であるヒト卵巣顆粒膜細胞株KGN [6] とヒト副腎皮質細胞癌株H295R細胞を用いて検討した。その結果、すでにわれわれ自身が報告しているように [7], KGN細胞ではatrazine/simazineによるArPII活性の増強効果が認められなかったが、H295R (副腎癌細胞) では既報 [8] のとおりatrazineによるH295R細胞のaromatase活性の上昇を確認した (図2 A)。この違いが何に由来するかを検討するために内因性のSF-1発現量をRT-PCRにて比較検討したところ、H295RではKGN細胞に比べ、約60倍の内因性SF-1の高発現を認めた (図2 B)。またWestern blottingによる蛋白レベルにおける検討でも同様であった。

そこでアデノウイルスによる発現系を用いてKGN細胞にAdx-bSF-1 [9] を感染導入させ SF-1 を過剰発現させたところ、atrazine/simazineによりP450arom mRNAレベルも、アロマターゼ活性レベルも (図3 A) 上昇を認めた。一方、コントロールのAdx-lacZの発現導入では、以上の効果は認められなかった。すなわち、SF-1の発現量の増加に伴いatrazine/simazineに対するaromatase遺伝子の反応性を回復させ得ることが判明した。

次にH295R細胞におけるArPIIプロモーターとSF-1の相互作用を既報 [10] のごとく、SF-1抗体を用いたChromatin Immunoprecipitation assay (ChIP assay) にて行った。 10^{-5} M atrazine/simazineは 10^{-6} M forskolinほど強力ではなかったものの、SF1-ArPIIの相互作用を増強することが判明した。またaromatase promoter II 4Kbの欠失変異を用いた検討から、ArPIIの-516bp断片

連絡先: 柳瀬敏彦, 九州大学大学院医学研究院病態制御内科
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

TEL: 092-642-5276

FAX: 092-642-5297

E-mail: yanase@intmed3.med.kyushu-u.ac.jp

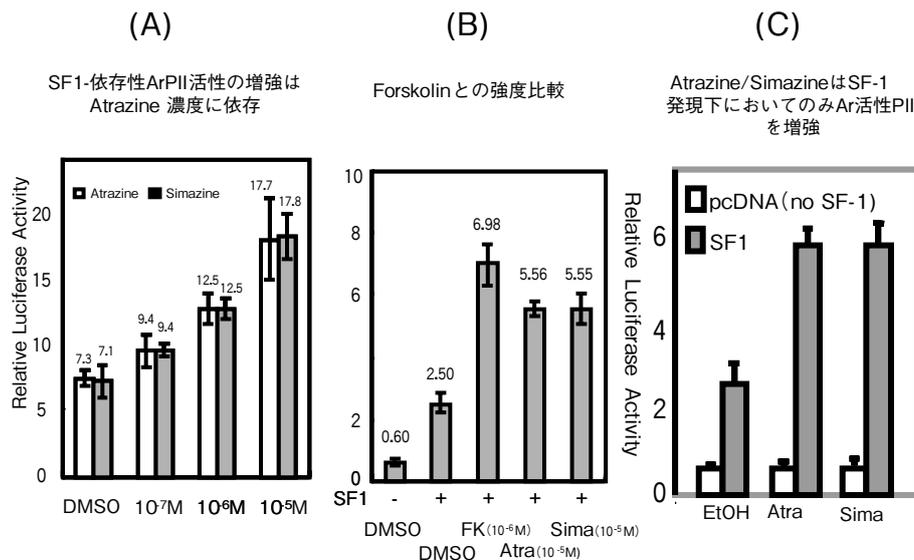


図1 atrazine/simazineはNIH3T3細胞においてSF-1依存性にArPII転写活性を増強する。NIH3T3細胞にArPII-Luc並びにpcDNA3.1 (control) あるいはpcDNA3.1-hSF-1を遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイを行なった。(A) 濃度依存性 (B) Forskolinとの強度比較 (C) SF-1発現導入の有無での比較 (化学物質濃度は10⁻⁵M)

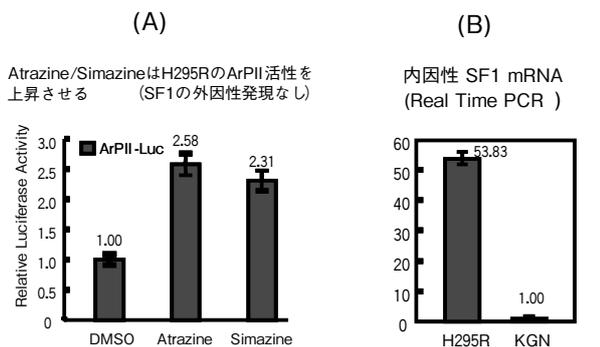


図2 (A) H295R細胞ではSF-1の外因性発現なしにArPII活性が上昇 (濃度は10⁻⁵M)。(B) H295R細胞とKGN細胞におけるreal-timePCRによる内因性SF-1mRNAの発現比較。

中のSF-1サイトはatrazineによるArPIIの活性化に必須であることが判明した (図3B)。atrazine/simazineがSF-1依存性のArPII活性を増強する機序として、SF-1発現量を変化させる可能性はWestern blottingにより否定された。

われわれは、atrazine/shimazineがSF-1と結合しうるか否かをBiacore T100システムによる表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, SPR) 法を用いて検討した。SF-1蛋白の産生と精製は、既報 [11] のごとく、baculovirusの系を用いて行った。精製SF-1はaminocoupling法によりsensor chip (CM5, Biacore) に

固定後、Biacore T100 biosensing system (Biacore, Tokyo) による表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて精製SF-1蛋白と内因性リガンド16PC (1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) ならびに化学物質との結合の有無を検討した。精製SF-1と16PCとの結合を検討したところ、強度の結合を認めた (図4A)。一方、atrazineもSPR値は低いながらも、SF-1との濃度依存性の結合を認め (図4B)、SF-1の弱い外因性リガンドである可能性が示唆された。一方、shimazineおよびネガティブコントロールのp-nitrotolueneとSF-1の結合を認めなかった。

考 察

atrazine/shimazineがaromatase活性を上昇させるか否かについては論争があり、細胞によっては上昇させ、細胞によっては不変であるとの報告がなされていた [7, 8]。今回の研究において、SF-1発現量の低いKGN細胞では、atrazineの効果が認められないのに対し、KGN細胞の60倍以上のSF-1の高発現を認める副腎皮質細胞癌H295R細胞では、atrazineによりaromatase活性の上昇を認めること、その差異は、KGN細胞へのSF-1導入実験からSF-1の発現量の差異によって生じていることを明らかにした。報告者によるaromatase活性の上昇に関する結論の差異もこの点に起因する可能性があ

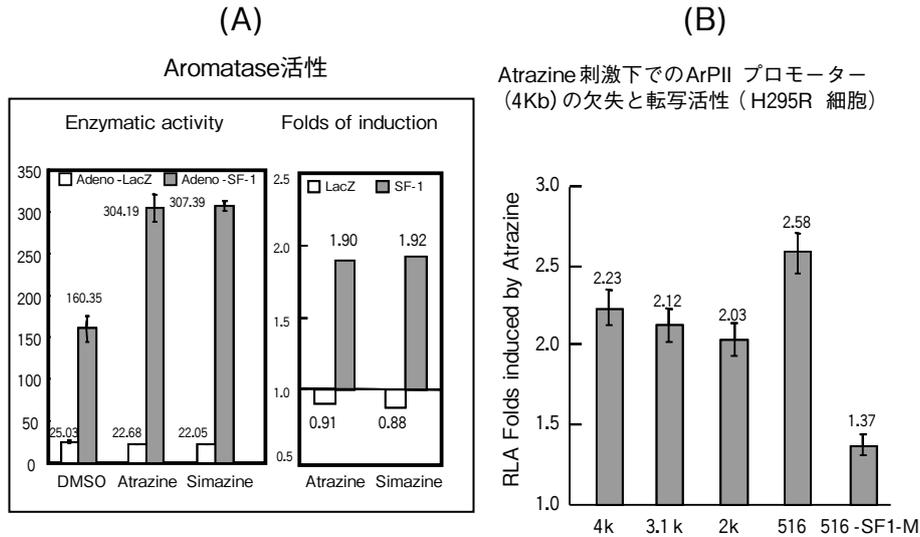


図3 (A) Adx-SF1導入はKGN細胞のatrazine/simazineに対するaromatase活性の反応性を回復させる (濃度は 10^{-5} M). (B) ArPIIの-516 bp断片中のSF-1配列はatrazineによるArPIIの活性化に必須である. 516SF-1-MはSF-1サイトへの変異導入コンストラクト.

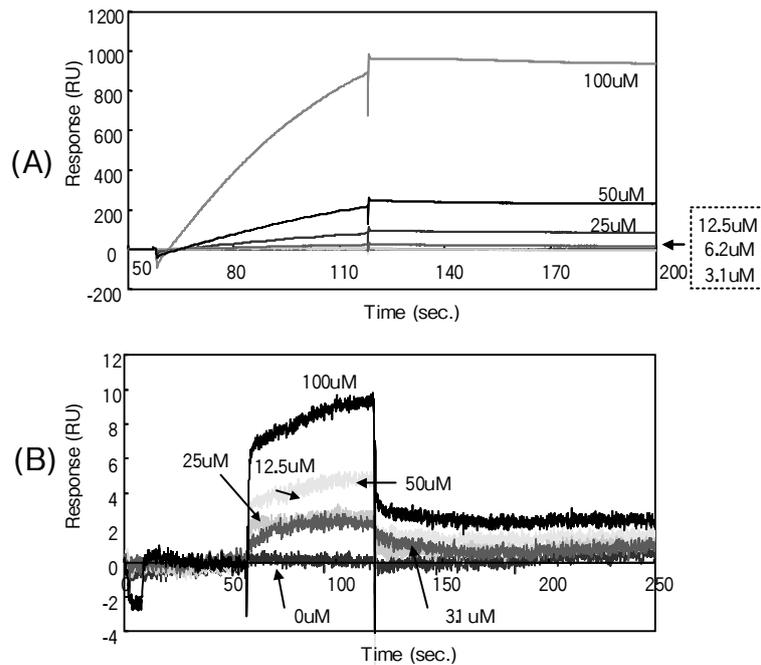


図4 SPR法を用いた精製SF-1と16PC (内因性SF-1 リガンド) (A) あるいはatrazine (B) との濃度依存性の結合

る. このことはきわめて重要で, ヒトにおいてSF-1高発現という条件下では, aromataseの活性上昇により atrazineが局所的な高エストロゲン環境を作り出す可能性を示唆している. 臨床疫学的に懸念されている atrazineとエストロゲン依存性癌の乳癌や前立腺癌との関連が示唆される.

SF-1は長い間, 内因性リガンドが未同定のオーファ

ン受容体として認識されてきた. ごく最近, その生理学的意義ははまだ未解明であるが, リン脂質がSF-1の内因性リガンドとして同定された [12, 13]. 今回の研究では, その内因性リガンドの1つである16-PCがSF-1と相互結合することを, in vitroにおける親和性研究によって初めて示し得た. また, 16PCに比べるときわめて弱い, atrazineはSF-1に結合することを示し, SF-1

の外因性リガンドとして作用する可能生を提示した。atrazineのaromatase活性の上昇機序として、phosphodiesterase活性の抑制を介したcAMPの上昇による機序が報告されているが[8]、そのみではなく、SF-1のリガンドとしてSF-1とaromatase promoter IIの相互作用を増強する機序も関与している可能性が示唆された。環境中には、このような未知のSF-1リガンドが存在し、生態系に少なからず影響を与えている可能性があり、今後の重要な検討課題と考えられる。

結 語

atrazine/simazineによるヒトaromatase遺伝子の転写活性化は、aromatase promoter IIを介して転写レベルで起こり、その転写活性の刺激にはSF-1の高発現が、必須であった。atrazineとSF-1の直接的結合が認められたことから、atrazineは弱いながらもSF-1の外因性リガンドとして作用している可能性が示唆された。

文 献

1. Kolpin D, Barbash J, Gilliom R (1998) Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assessment Program. *Environ. Sci Technol* 32, 558-566.
2. Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffle C, Vonk A (2002) Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419, 895-896.
3. Kettles MA, Browning SR, Prince TS, Horstman SW (1997) Triazine exposure and breast cancer incidence: An ecologic study of Kentucky counties. *Environ Health Perspect* 105, 1222-1227.
4. MacLennan P, Delzell E, Sathiakumar N, Myers SL, Cheng H, Grizzle W, Chen VW, Wu X (2002) Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. *J Occup Environ Med* 44, 1048-1058.
5. Fan W, Yanase T, Wu Y, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H. (2004) Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control non-repressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1 : a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol* 18, 127-141.
6. Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H (2001) Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 142, 437-445.
7. Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H (2004) A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* 145, 1860-1869.
8. Heneweer M, van den Berg M, Sanderson J (2004) A comparison of Human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol Letters* 146, 183-194.
9. Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H (2004) SF-1/Ad4BP Transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes to Cells* 9, 1239-1247.
10. Fan W, Yanase T, Morinaga H, Mu YM, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H (2005) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor inhibits aromatase transcription via nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* 146, 85-92.
11. Komatsu T, Mizusaki H, Mukai T, Ogawa H, Baba D, Shirakawa M, Hatakeyama S, Nakayama KI, Yamamoto H, Kikuchi A, Morohashi K. (2004) Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad 4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Mol Endocrinol* 18, 2451-2462.
12. Li Y, Choi M, Cavey G, Daugherty J, Suino K, Kovach A, Bingham NC, Kliever SA, Xu HE (2005) Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor Steroidogenic Factor-1. *Mol Cell* 17, 491-502.
13. Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, MacKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williams SP, Guy RK, Thornton JW, Fletterick RJ, Wilson TM, Ingraham HA (2005) Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120, 343-355.