

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名

「内分泌かく乱物質による精子形成異常に関与する癌遺伝子産物DJ-1とAMY-1」

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 有賀 寛芳（北海道大学 大学院薬学研究科 教授）

主たる研究参加者 玉井 克之（医学生物学研究所 研究員）

### 3. 研究内容及び成果：

内分泌かく乱物質は生殖系、神経系、免疫系等に影響を与えられている。癌遺伝子研究の過程で単離した新規遺伝子DJ-1、AMY-1は、精巣、脳で強く発現しており、生殖系、神経系との関連性が示唆されている。特にDJ-1は、ラット雄性不妊において、不妊と並行して精子で減少する唯一の蛋白質であり、内分泌かく乱物質が生殖系に作用する際に関与する可能性が示唆されている。内分泌かく乱物質の作用は遺伝子発現を介する作用 (genomic action) と介さない作用 (non-genomic action) とに大別され、前者の代表例として各種化合物の女性ホルモン (エストロゲン) 様作用が知られているが、後者に関しては殆ど解明されていない。後者の一例として、蛋白質のリン酸化、酸化等による機能修飾が考えられる。酸化ストレスは、活性酸素による蛋白質、核酸、脂質の酸化損傷をもたらす、癌、脳疾患、不妊等の種々の疾患の原因になると考えられている。ある種の内分泌かく乱物質が、酸化ストレスを通して、種々の疾病の原因と成る可能性が危惧される。

これらの背景から、本研究では DJ-1、AMY-1等の機能を解明し、これらが関与する遺伝子発現 (genomic action)、機能 (non-genomic action) への内分泌かく乱物質の影響を解析し、作用機構を解明する事を目標とした。また、平成15年にDJ-1がパーキンソン病の原因遺伝子であることが判明した事から、DJ-1 / パーキンソン病 / 内分泌かく乱物質の関係を解明する事も目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

#### (1) DJ-1、AMY-1の機能と内分泌かく乱物質との相関 (有賀グループ)

DJ-1機能の主たるものは、転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼである事を明らかにした。化学物質等に起因する機能不全が、男性不妊症、パーキンソン病等を発症させる可能性が示唆された。

##### 1) DJ-1の転写調節機能と内分泌かく乱物質との相関

DJ-1は、男性ホルモン受容体 (AR) 転写制御因子PIAS $\alpha$  のAR結合領域と結合し、PIAS $\alpha$  のARからの解離による抑制解除を通して、AR転写活性化能を回復させる正の制御因子である事を明らかにした。精巣で特異的に発現しDJ-1と結合するDJB1は転写抑制複合体を形成しAR活性を抑制するが、DJ-1は、DJB1と結合して転写抑制複合体形成を阻害し、AR転写活性化能を回復させる正の制御因子である事を明らかにした。AR活性に影響を及ぼす物質はAR核内局在を変動させるが、AR活性にはAR/DJ-1核内ドット状共局在が必要である事を明らかにした。

##### 2) DJ-1の抗酸化ストレス機能と内分泌かく乱物質との相関

DJ-1は、活性酸素誘発剤や過酸化水素投与等によって、発現が誘導される事が知られている。ダイオキシン (TCDD)、ビスフェノールA (BPA) 投与マウスの脳、精子で、活性酸素が誘発されている事、DJ-1発現が上昇している事、を明らかにした。DJ-1の活性酸素除去機能は自己酸化に基づく事、機能発現には2量体形成が必須である事、機能発揮は分子内3システイン残基の内のC106の酸化に基づく事、過剰酸化により機能を喪失する事、を明らかにした。機能を喪失したDJ-1がパーキンソン病発症の原因となる事が示唆された。

##### 3) DJ-1のパーキンソン病原因遺伝子としての機能と内分泌かく乱物質との相関

DJ-1は、家族性パーキンソン病原因遺伝子として同定されている5種類の内の、PARK7の原因遺伝子として知られている。DJ-1がミトコンドリア complex 1 の正の制御因子として機能している

事を明らかにした。BPA投与により、マウス、ラット等にパーキンソン病様症状が誘発される事が知られている。内分泌かく乱物質がDJ-1機能を修飾する事によって、脳神経変性疾患(パーキンソン病、ピック病、レビー小体型痴呆 / DLB、多系統変性症 / MSA)を引起す可能性が示唆された。

#### 4) DJ-1のプロテアーゼ機能と内分泌かく乱物質との相関

DJ-1は、精子の頭部、体部で発現している事、卵透明体構成蛋白質(ZP1-3)を基質とするプロテアーゼ機能を有する事、精子の卵への接着・侵入過程を介して直接受精反応に関与している事、を明らかにした。DJ-1のプロテアーゼ基質は、Parkin ユビキチンリガーゼ基質として同定された、Pael受容体である事を明らかにした。DJ-1は、抗酸化ストレス、ミトコンドリア complex 1 の活性化、凝集蛋白質の分解、の複数の段階でパーキンソン病に関与している事が示唆された。DJ-1はトランスサイレチンを分解する事を明らかにした。トランスサイレチンは、凝集体を形成して家族性アミロイドーシスの原因となり、アルツハイマー病の原因となるA-beta を核から細胞質に輸送する機能を有する事から、DJ-1のプロテアーゼ機能が他の脳神経系疾患にも関与している可能性が示唆された。

#### 5) 癌化との関連性

DJ-1は、Rasと協調的に作用する癌遺伝子産物として見出され、細胞増殖活性を有し、乳癌患者の半数では血清中分泌蛋白質として高発現している。前立腺癌、肺癌患者でも高発現しており、DJ-1機能を介した、内分泌かく乱物質と癌化との関連性が示唆された。

#### 6) DJ-1によって発現変動する遺伝子の解析

DJ-1応答遺伝子探索、シグナル伝達経路解明を目的として、DJ-1ノックダウン細胞(ノックアウト細胞はES細胞段階で死滅する為)と、パーキンソン病に見られるL166P変異DJ-1遺伝子導入NIH3T3細胞での遺伝子発現をDNAマイクロアレイで解析し、発現変動する遺伝子を多数同定した。酸化ストレス、炎症、シャペロン、アポトーシス関連遺伝子群の発現が変動している事、BPA投与での発現変動が報告されている遺伝子群とかなり重複する事、を明らかにした。

#### 7) AMY-1の機能解析

AMY-1は、精子の運動性に影響を与えている事、DJ-1とは逆に精子形成機構を負に制御している事、を明らかにした。

### (2) 特殊抗体作成及びアッセイ系の確立(玉井グループ)

DJ-1定量用高感度ELISA系を構築した。岩本チームとの共同研究として、男性不妊症患者精子中DJ-1量定量、DJ-1遺伝子変異解析を実施した。男性不妊症とDJ-1量低下間に弱い相関が認められ、男性不妊バイオマーカーへの応用の可能性が示唆された。乳癌患者ではDJ-1が血清中に分泌されている。抗DJ-1抗体の血液を用いた乳癌診断法への応用の可能性が示唆された。抗酸化型DJ-1抗体のパーキンソン病等の脳神経変性疾患診断・治療への応用の可能性が示唆された。

## 4. 事後評価結果

### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

DJ-1は、転写調節因子、抗酸化ストレス因子、プロテアーゼ等の多彩な機能を有する事、パーキンソン病の原因遺伝子であり、抗酸化ストレス、ミトコンドリア complex 1 の活性化、凝集蛋白質の分解等の複数の段階で発症に関与している可能性がある事、等を明らかにした。これらは、癌遺伝子関連研究の観点からはインパクトの高い成果であり、内分泌かく乱物質関連研究成果とは独立して、高く評価されるべきものと言える。しかし、疾病と機能との関連は未だ可能性が示唆された段階であり、今後の研究を通して、疾病・生理作用に果す役割を明らかにし、疾病・生理的状態の理解を深める事を期待したい。

内分泌かく乱物質との関連では、ARとDJ-1との共局在等の新事実を明らかにした事、酸化ストレスを介する経路が存在する可能性を示した事、は評価に値する。しかし、DJ-1の抗酸化ストレス作用及び内分泌かく乱物質の新規作用経路を疑念の余地なく示す為にはさらなる検討が必要と思

われる。

研究成果は J. Biol. Chem., Cancer Res.等の質の高い国際誌に39報、国内誌に3報掲載されている。DJ-1とパーキンソン病との関連、DJ-1機能に関する多数の論文は大きな注目を集め、2003年度に英語、仏語、独語、中国語等のインターネットで広く紹介された。学会発表も国際学会2件、国内学会94件行われた。研究の性質から、特許出願はない。

#### 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究の成果を簡略に表現するならば、CREST本来の役割である基礎研究の観点からは癌遺伝子関連研究として高く評価されるが、「内分泌かく乱物質」問題に対処すべき本領域の特性を勘案すれば、目標達成が難しい課題であるにしても、期待していた程の成果ではなかった、という事ができる。

内分泌かく乱物質はその全てが共通の特性を示すものではなく、様々な物質の様々な作用が並存している、との認識が定着してきている。本研究の成果は、内分泌かく乱物質の中で酸化ストレスを惹起する物質について、酸化ストレスを介する影響のモデルを提示したものとして意義が有るという事ができる。しかし、酸化ストレスを介する新規経路を内分泌かく乱物質の作用機構の一つとして説得力を持って提示する為には、複数種の内分泌かく乱物質について、その悪影響が認められる場面でのDJ-1の作用を検討する必要があると思われるが、その基本的研究手順が踏まれていない。研究の中心的関心が内分泌かく乱作用では無くDJ-1の機能解析にあり、その抗酸化ストレス作用に注目する余り、作業仮説に合致する物質や濃度での結果を安易に一般化している様に思われる。また、岩本チームとの共同研究に関しても、当初期待していた程の結果が得られなかった為止むを得ない面もあるが、中途半端に終わってしまった。

DJ-1とパーキンソン病等の疾病との関連性が解明されるにつれ、創薬ターゲットとしての重要性が認識され始め、既に極めて激烈な研究開発競争が始まっているものと聞いている。逸早く産業応用にまで繋がることを期待したい。また、開発した特殊抗体には、基礎・臨床医学分野での様々な応用場面が想定されるため、今後の展開を期待したい。

#### 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

特になし。