

遺伝子発現モニタリングによる脂質異常症の新たな診断法の開発

伊藤 太二 (管理栄養学科・講師)・大村 正史 (管理栄養学科・教授)

山崎 俊介 (管理栄養学科・准教授)

緒言

脂質異常症は、遺伝的要因に、生活習慣を主とする環境的要因が加わり発症する。環境的要因とは主に栄養であり、栄養状態により種々の遺伝子の発現が変化して脂質異常症が発症することが最近明らかになってきた。例えば、高脂質食は、飽和脂肪酸の摂取過多となり、細胞内小器官である小胞体にストレスを与える。これに対する応答として遺伝子発現変化が起こる。そしてこの一連の過程は脂質異常症発症に十分、寄与している。

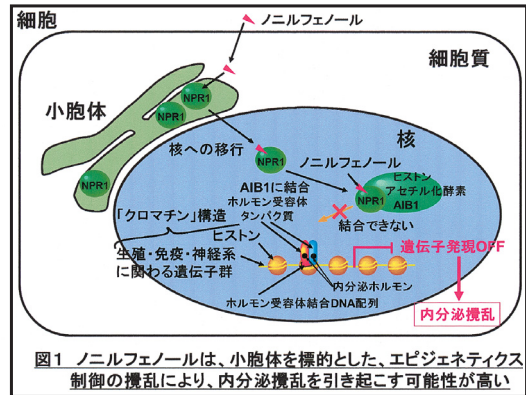
脂質異常症の診断と治療には、患者様の病態変化を迅速かつ低侵襲の方法で把握することが重要である。従って本研究では、脂質異常症の病態の進行度を詳細かつ確に把握し加療したり、治療効果・予後を検証したりするための新たなツールを確立することを目的としている。

アルキルフェノール類のノニルフェノール (以下、NP と略記) は非イオン界面活性剤が河川等で微生物分解されたり、プラスチック製品の酸化防止剤が酸化・加水分解されて生じる。NP は主に生殖器系 (前立腺・精巣) 及び神経系を標的とし、生殖細胞の癌化、精子数の減少、神経発達障害との関わりが考えられている¹⁴⁾。

生体内の内分泌ホルモンは細胞内の種々のホルモン受容体タンパク質に結合することでその生理作用を発揮する⁹⁾。ホルモン受容体は様々な遺伝子の転写を調節する機能を持つ^{6,7)}。そして、ホルモン受容体による転写活性化には、転写共役因子と呼ばれる一群のタンパク質との結合が重要である。AIB1⁸⁾ は、中央部分の「LxxLL」モチーフを介して、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体等の様々なホルモン受容体タンパク質と結合する⁹⁾。そして、AIB1 HATドメインのもつヒストンアセチル化酵素活性により転写が活性化される¹⁰⁾。真核生物の遺伝情報は、DNAとこれに結合するヒストン (タンパク質) の修飾状態が規定しており、これらを合わせて「エピゲノム」と呼ぶ。すなわち AIB1 は、ヒストンアセチル化という「エピゲノム修飾」により、遺伝子発現をグローバルに制御する「司令塔」的役割を持つ。

NP は、男性生殖器系 (精巣・前立腺) を主な標的とし、小胞体内カルシウムの恒常性攪乱等により小胞体ストレッサーとして働く。本研究では平成25年度に、NP の受容体として、ヒト前立腺正常細胞から新規タンパク質 NPR1 (Nonylphenol Receptor 1) を同定した。そして、NP により小胞体が発ストレスを受けた場合、小胞体中のNPR1がNPを受容して核内に移行し、小胞体ストレストランスデューサーとして、エピジェネティカルな遺伝子発現制御を担うヒストンアセチル化酵素AIB1と直接結合する (図1) ことを明らかにした¹¹⁾。NP は、炭化水素基であるノニル基をもつことから、NPR1 は本来、炭化水素基を有する化合物をリガンドとする受容体として機能すると予測された。さらに平成26年度には、NPR1 がヒト以外の生物種でどの程度保存されたタンパク質であるかを解析して、

真核生物全般に対して NPR1 が普遍的な機能を有している可能性が考えられた。さらに、上記の化合物候補として脂肪酸を取りあげ、NPR1 と種々の脂肪酸、あるいはこうした脂肪酸を含むリン脂質との結合性に関する生化学的解析を行い、NPR1 は、不飽和脂肪酸に対する受容体として機能し、遊離脂肪酸のみならず、膜構造を形成するホスファチジルコリンのうち、不飽和脂肪酸からなるものにも特異的に結合すると考えられた。ここでは、以上の成果をふまえた本年度の NPR1 の細胞内局在性解析とあわせ、3 年間の研究成果を総括して報告する。



研究の背景

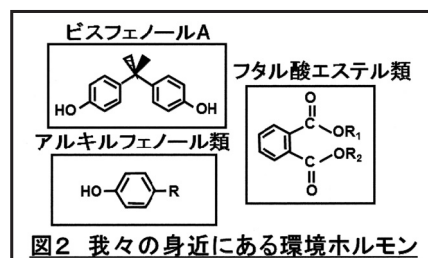
脂質異常症は脂質等の作用により発症する疾病であり、これには脂質等に応答する遺伝子発現のエピジェネティクス制御機構が深く関与すると考えられ、この機構を解明することが発症機序解明の鍵となる。

一方、細胞小器官である小胞体内でのタンパク質折りたたみ機構の制御は、細胞の恒常性維持に必須であるばかりか、細胞分化過程にも機能する。この過程では、XBP1、ATF4、ATF6α、ATF6βをはじめとした小胞体ストレス応答メディエータータンパク質による標的遺伝子の転写を介した遺伝子発現調節が行われる。タンパク質折りたたみ機構の制御機構がウイルス感染・炎症性サイトカイン・タンパク質変異・環境有害物質への曝露といった小胞体ストレスをきっかけに破綻すると、骨代謝異常、癌、神経変性等の疾患が引き起こされることもわかってきた。一方最近、小胞体ストレスが糖尿病発症に深くかかわっていることも報告されており、脂質との関連では、飽和脂肪酸が小胞体ストレス応答を惹起し、不飽和脂肪酸はこれを抑制することも解明されつつある。しかしながら、小胞体が脂質をどのように検知し応答するのか、そしてその応答シグナルはどのようにして、核内に伝達され、遺伝子発現を調節するのかといった詳細なメカニズムは不明である。

環境有害物質である環境ホルモンは、内分泌にかかわる諸現象を攪乱する物質であり、生体のホルモンと類似した構造により、nM (nmol/L) や pM レベルの極微量で作用する。

環境ホルモンは、ヒト生殖系（生殖器癌、精子数の減少）、免疫系（喘息、アトピー性皮膚炎）、及び神経系（発育障害）に対して主に毒性を発現すると考えられている。特に胎児・小児期は環境ホルモン暴露に高い感受性を示すこともわかってきた。

現在、プラスチック製品やビニル製品、合成洗剤等は身近にあるが故、使用頻度が高い。しかし、これらの原料・添加剤・分解物から様々な環境ホルモン（図2）が検出されている。



アルキルフェノール類のノニルフェノールは非イオン界面活性剤が河川等で微生物分解されたり、プラスチック製品の酸化防止剤が酸化・加水分解されて生じる(図3)。ノニルフェノールは主に生殖系(前立腺・精巣)及び神経系を標的とし、生殖細胞の癌化、精子数の減少、神経発達障害との関わりが考えられている。

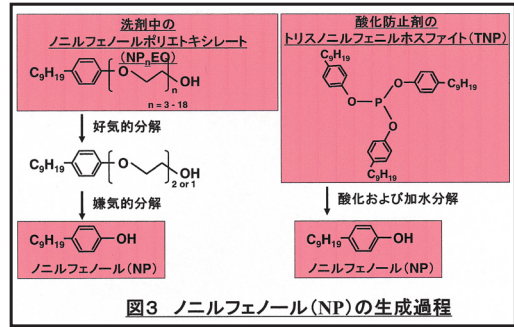


図3 ノニルフェノール(NP)の生成過程

生体内の内分泌ホルモンは細胞内の種々のホルモン受容体タンパク質に結合することでその生理作用を発揮する。ホルモン受容体は様々な遺伝子の転写を調節する機能を持つ。そして、ホルモン受容体による転写活性化には、転写共役因子と呼ばれる一群のタンパク質との結合が重要である。転写共役因子の一つである AIB1 のアミノ酸一次構造と、既知の機能ドメイン、モチーフを図4に示す。AIB1は、中央部分の「LxxLL」モチーフを介して、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体等の様々なホルモン受容体タンパク質と結合する。そして、AIB1 HATドメインのもつヒストンアセチル化酵素活性により転写が活性化される。真核生物の遺伝情報は、DNAとこれに結合するヒストン(タンパク質)の修飾状態が規定しており、これらを合わせて「エピゲノム」と呼ぶ。すなわち AIB1は、ヒストンアセチル化という「エピゲノム修飾」により、遺伝子発現をグローバルに制御する「司令塔」的役割を持つ。

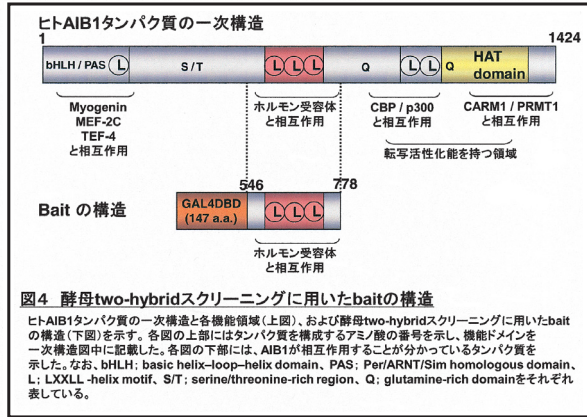


図4 酵母two-hybridスクリーニングに用いたbaitの構造

ヒトAIB1タンパク質の一次構造と各機能領域(上図)および酵母two-hybridスクリーニングに用いたbaitの構造(下図)を示す。各図の上にはタンパク質を構成するアミノ酸の番号を示し、機能ドメインを一次構造図中に記載した。各図の下部には、AIB1が相互作用することが分かっているタンパク質を示した。なお、bHLH: basic helix-loop-helix domain, PAS: Per/ARNT/Sim homologous domain, L: LXXLL-helix motif, S/T: serine/threonine-rich region, Q: glutamine-rich domainをそれぞれ表している。

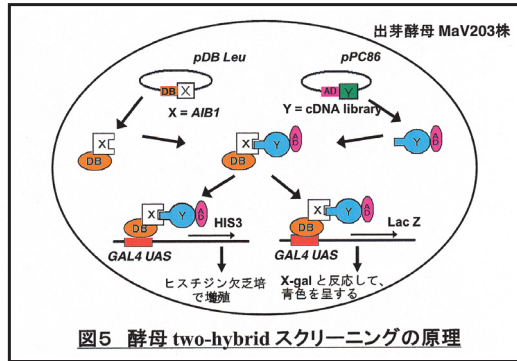


図5 酵母 two-hybrid スクリーニングの原理

酵母 two-hybrid 法は、出芽酵母を使用し、タンパク質間相互作用を調べる手法である(図5)。

酵母の GAL4 タンパク質は DNA 結合ドメイン (DB) と転写活性化ドメイン (AD) とに分割できる。ここで、結合を調べたい遺伝子 (bait) を融合

サンプル	ノニルフェノール (NP)	X-galによる染色強度の経時変化(時間)				
		0.5	1.5	3	6	24
DB + AD	-	-	-	-	-	-
(negative control)	-	-	-	-	-	-
DB-Rb + AD-E2F1	-	-	-	-	±	±
(positive control (weak))	+	-	-	-	±	±
DB-dDP + AD-dE2F1	-	+	++	++	+++	+++
(positive control (moderate))	+	+	++	++	+++	+++
DB-c-Fos + AD-c-Jun	-	+	++	++	+++	+++
(positive control (strong))	+	+	++	++	+++	+++
DB-GAL4full + AD	-	+	++	++	+++	+++
(positive control (very strong))	+	+	++	++	+++	+++
DB-AIB1 + AD	-	-	-	-	-	-
(negative control)	+	-	-	-	-	-
DB-AIB1 + AD-T28	-	±	++	++	+++	+++
	+	+	++	++	+++	+++

した DB と、cDNA ライブラリーを融合した AD をそれぞれコードするプラスミドを両方、酵母内に導入する。cDNA ライブラリーとはヒト mRNA を逆転写して得られる約100万種類の DNA である。酵母内で各プラスミドから、各融合タンパク質が発現する。酵母の LacZ、HIS3 遺伝子は bait と cDNA ライブラリーがそれぞれコードするタンパク質同士が結合しなければ転写されない。HIS3 が転写されると、酵母はヒスチジン欠乏培地でも生育できる。LacZ (β -ガラクトシダーゼ) は、X-gal を分解し、青色を呈する物質 (4-Cl-3-Br-indigo) を生成する。実際のスクリーニングは SC (-L、-T、-H、+3AT、+ノニルフェノール) 培地で行う。ノニルフェノール依存的結合性は、ノニルフェノール (+) 又は (-) 培地で生育させた酵母の β -ガラクトシダーゼ活性測定で調べる。

こうして選択された酵母から、Bait に結合するタンパク質をコードする AD-cDNA プラスミドを抽出して di-deoxy 法で DNA 配列を決定し、その配列を NCBI BLAST 検索にかけ、タンパク質の種類を同定する。本法は、弱いタンパク質間相互作用でも高い特異性で検出できる特徴を持つ。NP が内分泌攪乱作用を持つことを考えると、NP を認識して結合するタンパク質が細胞内には存在し、これに AIB1 が結合することが、NP の環境ホルモン毒性発現に重要なのではないかと考えられた。そこで、この NP 結合タンパク質を単離すべく、Bait として図 4 に示す「LxxLL」領域のみを GAL4DBD と融合させた。cDNA ライブラリー 70 万種を SC (-L、-T、-H、+10mM 3AT、10 μ M ノニルフェノール (NP)) プレートでスクリーニングした。その結果、このヒスチジン欠乏培地で 50 コロニーが得られ、これらに対して、X-gal を用いた β -ガラクトシダーゼ活性測定を行った。この際、酵母は 10 μ M のノニルフェノール (NP) を含む培地と含まない培地で培養したものをを用いた (表 1)。AIB1-LxxLL 融合タンパク質に対して、NP に依存して、結合性が増強するものを探索したところ、クローン T-28 が得られた (表 1 ; 網掛け部分)。T-28 がコードするタンパク質は、既知の機能ドメインを有さないタンパク質であり、NPR1 (Nonylphenol Receptor 1) と命名した。NCBI データベースを用いて、DNA の塩基配列をもとに、NPR1 種間での保存性を解析したところ、NPR1 は、酵母からヒトに至る真核生物で保存されており (図 6)、真核生物全般に対して NP が作用する可能性が考えられた。

大腸菌を用いて発現・精製した GST 融合 NPR1 を用い、バイオレイヤー干渉法 (BLI) による分子間相互作用解析を行った結果、NPR1 は、cis-androsterone 及び NP 前駆体化合物、さらにはビスフェノール A 等の他の環境ホルモンには結合性を示さず、NP を高い特異性 ($K_D = 176 \mu$ M) で受容した (図 7)。さらに、ヒト前立腺癌由来細胞株 LNCap.FGC 細胞内で、NPR1 は小胞体に主に局在するが、NP に応答すると、一部の分子が核内に移行して AIB1 との共局在性を示した。

分子間相互作用解析の結果から、NPR1 は NP の構造中で、アルキル鎖と水酸基を共に認識して結合するものと推測された。また、NPR1 は NP 非存在下では小胞体に主に局在す

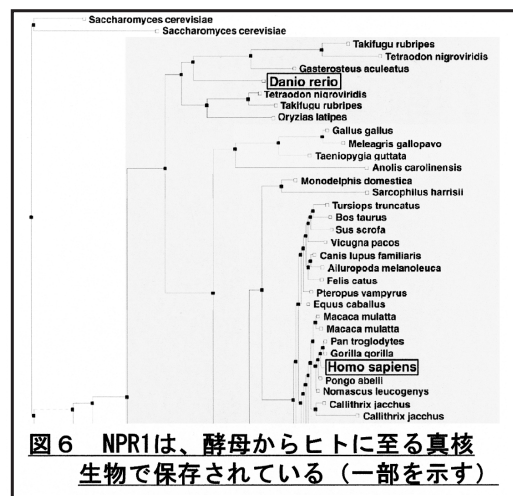


図 6 NPR1は、酵母からヒトに至る真核生物で保存されている (一部を示す)

るが、小胞体は、脂質代謝の場として機能することも知られている。従って、脂肪酸及びその誘導体が、NPR1の本来のリガンドとして機能しているのではないかと予測された。

研究の方法

(1) 大腸菌を用いたタンパク質の精製と電気泳動

本研究に用いたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST ; 26kDa) 融合タンパク質発現・精製システム (図 8) は、GST をキャリアータンパク質とし、大腸菌内で目的タンパク質を高い発現量で得ることができ、GST の基質であるグルタチオンとの親和性を用いて簡単に精製できる特徴をもつ。

本研究では GST 融合タンパク質発現プラスミド DNA を大腸菌 DH5 α 株に導入し、対数増殖期において 1 mM IPTG で発現誘導した。誘導したタンパク質は凍結融解により全タンパク質の中からグルタチオンビーズによって精製した。そして、このビーズに 40mM グルタチオンを添加することで、目的タンパク質を溶出した (図 8)¹²⁾。さらに、溶出したタンパク質を透析後、Sulfo-NHS-LC-LC-biotin 溶液を加えビオチン化し、再度透析した。精製したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用い分子量の違いにより分離した。

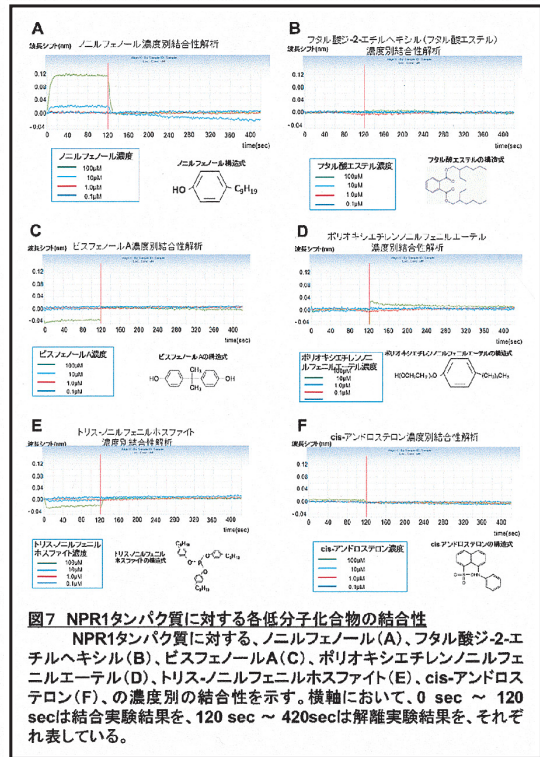


図7 NPR1タンパク質に対する各低分子化合物の結合性
NPR1タンパク質に対する、ノニルフェノール(A)、脂肪酸ジ-2-エチルヘキシル(B)、ビスフェノールA(C)、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル(D)、トリスノニルフェニルホスファイト(E)、cis-アンドロステロン(F)、の濃度別の結合性を示す。横軸において、0 sec ~ 120 secは結合実験結果を、120 sec ~ 420secは解離実験結果を、それぞれ表している。

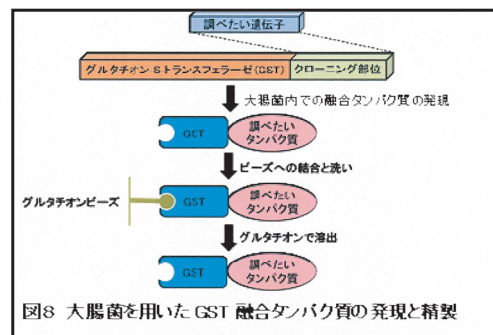


図8 大腸菌を用いた GST 融合タンパク質の発現と精製

(2) Octetシステムによる分子間相互作用解析

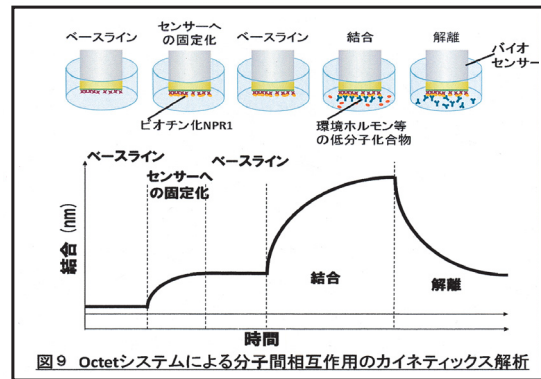
本研究で用いる Octet RED システムは、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を基盤とし、バイオセンサーの上側から白色光を照射し先端からの反射光の干渉波を解析する。そして、バイオセンサー先端に低分子化合物が結合した場合、先端の厚みが増加することで反射光がシフトして元の波長との相違が発生し、これを $\Delta\lambda$ (波長シフト) として計測する¹³⁾。本研究で NPR1 との結合性を解析した化合物は、飽和脂肪酸として、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、不飽和脂肪酸として、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸の 6 種類である。また、飽和又は不飽和の脂肪酸から構成されるホスファチジルコリン (DSPC 又は DOPC) をもとに作成したリポソームも結合解析に用いた。バイオセンサーを各化合物溶液に浸して、ビオチン化タンパク質と各化合物との結合性を解析し (図 9)、

解離平衡定数 (K_D) を算出した。

(3) アフリカミドリザル腎細胞由来 COS7 細胞株の培養

これまでに、ヒト前立腺癌由来細胞株 LNCap.FGC 細胞株を用いた細胞内局在性解析から、NPR1 は小胞体に局在することが分かっている。従って本研究での細胞内局在性解析には、小胞体の詳細な解析が可能なアフリカミドリザル腎細胞由来 COS7

細胞株を用いた。COS7 用の培地には DMEM+10%FCS を用い、CO₂ 培養器中で CO₂-H₂CO₃ 平衡を利用し pH を中性の状態に保って培養した。



(4) ゲル濾過法を用いた NPR1 の分子構成の解析

マウス肝臓をホモジェナイズし、900×g, 10分, 4°Cで遠心して、核分画を得た。これから、Dignam法に基づいて、核抽出を行った。核抽出液を Superdex 200カラムを装備した Akta Explorer 10S により、ゲル濾過した。非変性タンパク質を含むマーカーについても、ゲル濾過することにより、各画分に含まれるタンパク質（複合体）の分子量を推定した。核抽出液の分画について、SDS-PAGE を行った後、ラビット抗 NPR1 抗体でウェスタンブロットした。

(5) 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡観察

(a) NPR1 と AIB1 の共局在性の解析では、COS7 細胞を MAS コートされたスライドガラス上で培養し、2 μg/mL の Tunicamycin により24時間刺激を行った。培地を除き、1%ホルムアルデヒドで細胞をスライドガラスに固定した。界面活性剤 TritonX-100 (0.01%) で膜透過処理を行った後、1%BSA でブロッキングを行った。ラビット抗 NPR1 抗体、及びマウス抗 AIB1 抗体を、それぞれコスモバイオ製「Immunoshot MILD 溶液」で50倍に希釈した一次抗体を作製し37°C、1時間反応させた。

(b) Tunicamycin 非処理条件下での NPR1 の各オルガネラにおける局在性解析では、COS7 細胞を MAS コートされたスライドガラス上で培養した後培地を除き、1%ホルムアルデヒドで細胞をスライドガラスに固定した。界面活性剤 TritonX-100 (0.01%) で膜透過処理を行った後、1%BSA でブロッキングを行った。ラビット抗 NPR1 抗体、及びマウス抗 Calnexin (小胞体マーカー)、抗 GM130 (ゴルジ体マーカー)、抗 HSP60 (ミトコンドリアマーカー) のいずれかの抗体を、それぞれコスモバイオ製「Immunoshot MILD 溶液」で50倍に希釈した一次抗体を作製し37°C、1時間反応させた。

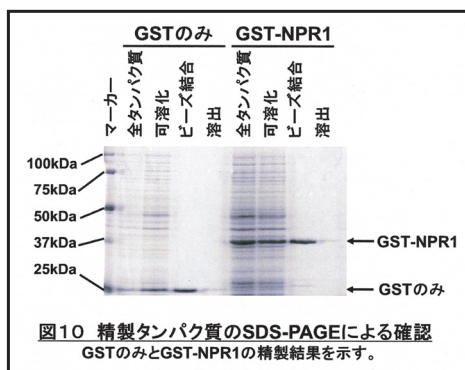
それぞれの抗体に対して、一次抗体の場合と同様の溶液で2000倍に希釈した Alexa488 標識二次抗体、及び Alexa568 標識二次抗体で25°C、1時間反応させた。これを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM510 (カールツァイス製)) により観察した。これはそれぞれの蛍光色素に対応する励起光をサンプルに当て、それによって発生する蛍光を、焦点を変えることで特定の断面の蛍光のみを検出できるものである。微分干渉像の観察後、蛍光色素

に対応する励起光を照射してタンパク質の局在性を観察した。Alexa488は488nmの青色レーザー照射により、NPR1を緑色に染色し、Alexa568は543 nmの緑色レーザー照射により、AIB1、又は小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアを赤色に染色するものである。

研究の結果

(1) タンパク質の精製と電気泳動による確認

大腸菌で発現誘導された NPR1 タンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、全タンパク質と可溶化タンパク質のバンドの濃さが同じであり、ほぼ100%の可溶化率であることがわかった。ビーズに結合したタンパク質及び溶出したタンパク質では、いずれも単一のバンドが検出されていることから、高い純度で精製できたと考えられる (図10)。

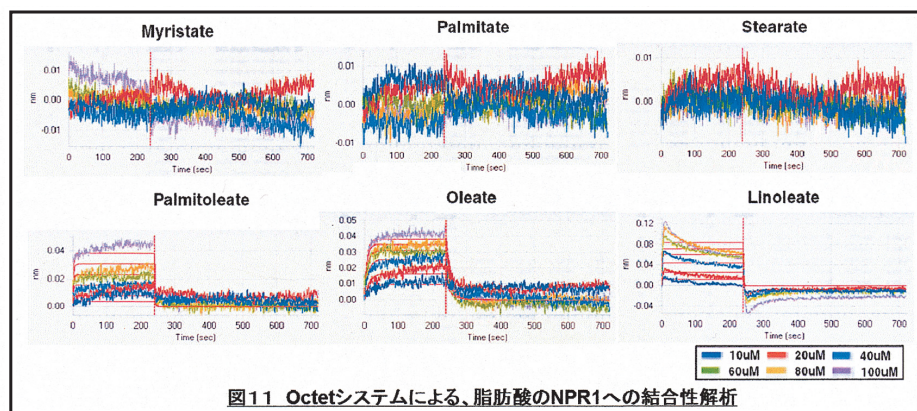


(2) Octet システムによる分子間相互作用解析

大腸菌で発現・精製した NPR1 をビオチン化してストレプトアビジンセンサーに固相化した。この NPR1 バイオセンサーを各脂肪酸溶液に浸して、NPR1 と各脂肪酸との結合性を解析した。解析したデータから解離平衡定数 (K_D) を算出した。

その結果、不飽和脂肪酸のみが全て NPR1 と結合し、飽和脂肪酸では、NPR1 との結合性は検出されなかった (図11)。パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸の K_D はそれぞれ、10mM、50 μ M、100 μ Mであった。従って、NP の受容体として、元々単離した NPR1 は、不飽和脂肪酸に対する受容体として機能すると考えられた。

次に、DSPC (飽和脂肪酸であるステアリン酸の誘導体) 又は DOPC (不飽和脂肪酸であるオレイン酸の誘導体) を用いてリポソームを作製し、NPR1 との結合性を調べた。その結果、DOPC リポソームは NPR1 との結合性を示すが、DSPC リポソームは結合性を示さないことが明らかになった (図12)。従って、NPR1 は遊離脂肪酸のみならず、膜構造を形成するホスファチジルコリンのうち、不飽和脂肪酸から成るものに特異的に結合すると考えられた。



(3) ゲル濾過法を用いた NPR1 の分子構成の解析

コントロール及び Tunicamycin 処理のマウスの肝細胞では、いずれも NPR1 が発現しており、Tun 処理により核内の NPR1 量が増加することが分かった (図 13)。また、Tunicamycin 非処理では、核内の NPR1 は主に約 15kDa の単量体で存在しているのに対して、Tunicamycin 処理により三量体と考えられる約 45kDa のサイズで存在していることが分かった (図 13)。

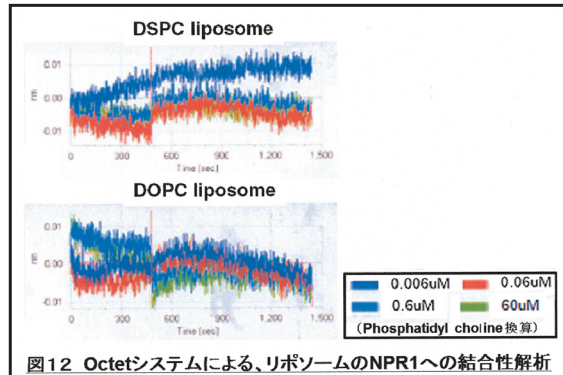


図 12 Octetシステムによる、リポソームのNPR1への結合性解析

(4) 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡観察

AIB1 は Tunicamycin 非存在下及び存在下のいずれの条件下でも、主に核に存在した。一方、NPR1 は Tunicamycin 非存在下では細胞質に存在した (図 14)。そして、オルガネラマーカーとの共局在性解析から、NPR1 は Tunicamycin 非存在下の通常条件では、主に小胞体に局在し、一部がゴルジ体にも存在していることが分かった (図 15)。従って、Tunicamycin 非存在下では、NPR1 と AIB1 は共局在しない。Tunicamycin 存在下では、NPR1 の大部分が核に移行した。そして、核に移行した NPR1 は AIB1 との共局在性を示した (図 14)。

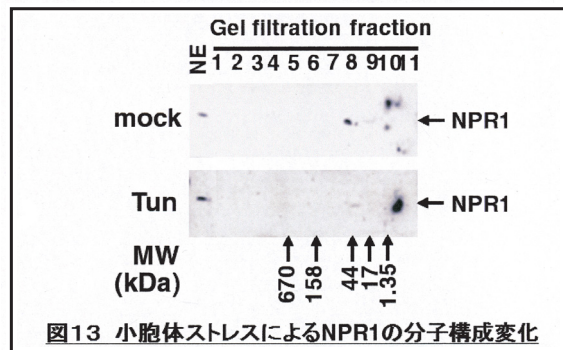
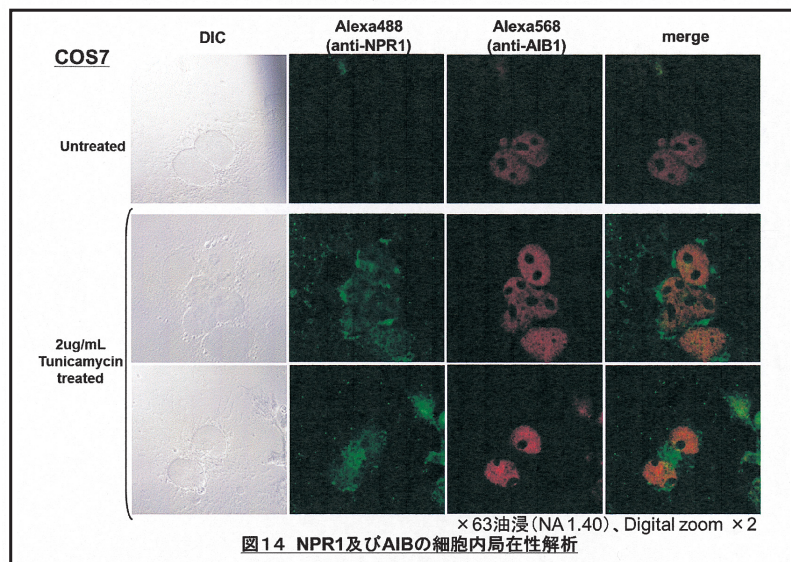


図 13 小胞体ストレスによるNPR1の分子構成変化



×63油浸 (NA1.40)、Digital zoom ×2
図 14 NPR1及びAIB1の細胞内局在性解析

考察と展望

本研究から、本来 NPR1 は小胞体に主に局在して、不飽和脂肪酸受容体として脂肪酸代謝及び小胞体ストレス応答の抑制に機能する一面を持ちつつも、tunicamycin 存在下では三量体として、「小胞体ストレス情報」を核内の AIB1 に伝達するトランスデューサーと

して機能する多機能なタンパク質であろうと考えられる。これまでに、tunicamycin 投与による小胞体ストレスが、脂肪細胞の分化を促進することもわかってきていることから、NPR1 が不飽和脂肪酸を特異的に受容する生理的意義を含め、脂肪細胞分化における NPR1 の小胞体ストレス応答センサー、そして、エピジェネティクス制御機構へのトランス

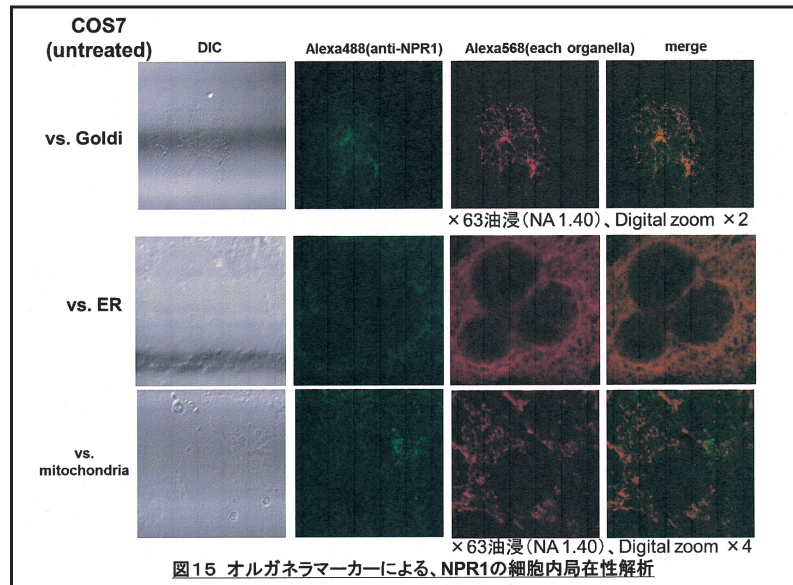


図15 オルガネラマーカーによる、NPR1の細胞内局在性解析

スデューサーとしての機能を解明して、この機構が深く関与すると考えられる脂質異常症の発症機構の解明に結びつけたい。

参考資料・引用文献

- 1) Nakai K, Satoh H (2002) Developmental neurotoxicity following prenatal exposures to methylmercury and PCBs in humans from epidemiological studies. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 196:89-98.
- 2) Biles J E, McNeal T P and Begley T H (1997) Determination of bisphenol A migrating from epoxy can coatings to infant formula liquid concentrates. *J Agr Food Chem* 45: 4697-4700.
- 3) 磯部 友彦、中田典秀、間藤ゆき枝、西山肇、熊田英峰、高田秀重 (2002) プラスチック製食器等からのノニルフェノールの溶出. *環境化学* 12: 621-5.
- 4) Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D, Boubelik M (2003) Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod Biol Endocrinol* 1:30-9.
- 5) Kahn CR (1976) Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J Cell Biol* 70:261-286.
- 6) Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-95.
- 7) Li Y, Luh CJ, Burns KA, Arao Y, Jiang Z, Teng CT, Tice RR, Korach KS (2013) Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs): In Vitro Mechanism of Estrogenic Activation and Differential Effects on ER Target Genes. *Environ Health Perspect* 121: 459-66.
- 8) Zhou XE, Suino-Powell KM, Li J, He Y, Mackeigan JP, Melcher K, Yong EL, Xu HE (2010) Identification of SRC3/AIB1 as a preferred coactivator for hormone-activated

- androgen receptor. *J Biol Chem* 285: 9161-71.
- 9) Zou JX, Zhong Z, Shi XB, Tepper CG, deVere White RW, Kung HJ, Chen H (2006) ACTR/AIB1/SRC-3 and androgen receptor control prostate cancer cell proliferation and tumor growth through direct control of cell cycle genes. *Prostate* 66: 1474-86.
 - 10) Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 1997 90: 569-80.
 - 11) 伊藤 太二、山崎 俊介、太田 一樹、大村 正史、親泊 政一 (2014) 内分泌攪乱化学物質ノニルフェノールと結合する新たなタンパク質の同定. *日本栄養・食糧学会誌*、第68巻、第2号、p.63-68、日本栄養・食糧学会
 - 12) Ito T, Yamauchi M, Nishina M, Yamamichi N, Mizutani T, Ui M, Murakami M, Iba H (2001) Identification of SWI.SNF complex subunit BAF60a as a determinant of the transactivation potential of Fos/Jun dimers. *J Biol Chem* 276: 2852-7.
 - 13) Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L (2008) A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expr Purif* 60: 147-50.