

ダイオキシン及びダイオキシン様 PCB のヒト及び哺乳動物における TEF の WHO 2005 再評価

"Human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxinlike compounds: The WHO 2005 re-evaluation." Martin Van den Berg, et. al., (2006) WHO-IPCS 専門家会議が 2005 年 6 月にスイスの Geneva で開催され、PCBs を含むダイオキシン様化合物の毒性換算係数 (TEFs) の再評価が行われた。この再評価の基礎となるのは Haws らによって近年公表された TEF データベースである。

既存 WHO-TEF 値の評価と新たな値の決定は、重み付けのない REP 分布、専門家の判断、そして、点推定値を組み合わせを行った。

2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PnCDF)、octachlorodibenzo-p-dioxin (OCDD)、octachlorodibenzofuran (OCDF) の TEF 値、そして、関連する全てのモノ-オルト置換 PCBs のための単一値の変更は専門家パネルによって決定された。新たな 2005 WHO-TEF 値に基づき、変更案は全 TEQ にほとんど影響しないことが結論付けられ、また、ヒトの摂取に関連している食品基質にとって TEQ の総体的な減少は 10-25%であった。

TEF の重要な必要条件は加算性であり、このことが近年の混合物の *in vivo* 試験でさらに確認されたことが WHO パネルにより認められた。これらの混合物の *in vivo* 試験は WHO の 1998 TEF 値を 2 倍以内の精度で予測したが、これらの TEFs はかなり不確実性を含む推定値であるので、この精度は意外であった。

専門家パネルは、非ダイオキシン様 AhR

アゴニスト/アンタゴニストが 2, 3, 7, 8-TCDD および関連化合物の総合的な毒性に影響する可能性があるという証拠が新たな試験により示されたことも認識した。この TEQs への起こりうる影響は、さらに調査される必要があるが、各同族体の試験から求められた個々の REPs や TEF 値の決定に影響しないことも結論づけられた。

将来的に TEF/TEQ 構想に含みうる数種 (グループ) の化合物が特定された。メカニズムから考えて、これらは 3, 4, 4'-PCB (PCB 37)、polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs)、polybrominated dibenzofurans (PBDFs)、polyhalogenated dibenzobenzo-p-dioxins と dibenzofurans の混合物、polyhalogenated naphthalenes、polybrominated biphenyls (PBBs) である。これらの化合物にはヒトへの曝露データの明らかな不足があり、食事からの摂取量の TEQ に関してヒトにとっての相当量を示すために TEQ の予備的な曝露評価が推奨された。Hexachlorobenzene も TEF/TEQ 構想に含みうるが、これは不純物が先のダイオキシン様影響の原因でないことが明らかな場合にのみである。Polybrominated diphenylethers (PBDEs) については TEF/TEQ 構想に含めないことが結論づけられた。

WHO パネルは、そもそも TEF/TEQ 値や関連した方法は食事からの摂取による曝露量の推定のために作られているので、土壌や沈殿物などのような非生物的環境マトリックスへの TEF/TEQ アプローチの応用については懸念を表明した。

代替案や付加的 TEFs を決定するための多くの将来的アプローチも確認された。こ

れらは確率論的手法で TEFs を決定し、不確実性や 'systemic' TEFs をより良く表現している。

飼料と食物中の非ダイオキシン様 PCB (NDL-PCB) に関する欧州食品安全局の見解

Opinion of the European Food Safety Authority on non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. Heppner C, Fürst P, Larsen JC, Schrenk D, van Leeuwen FXR

ポリ塩化ビフェニル (PCB) には理論的に 209 の PCB 同族体があり、それらは生化学的毒性学的特性に基づき、ダイオキシン様 PCB (DL-PCB) と非ダイオキシン様 PCB (NDL-PCB) の 2 種類に分けられる。PCB の製造や使用は多くの国で 1980 年代に中止されたが、電気設備やプラスチック製品、建築材料として大量に残存している。PCB は難分解性であり、過去に環境中に放出されてもいまだに残存する。ひとたび環境中に放出されると、NDL-PCB は脂肪組織に蓄えられ半減期も長いので、食物連鎖に従って蓄積する。DL-PCB 同様に NDL-PCB も食品や飼料中に見つかることがある。欧州食品安全局 (EFSA) の食物連鎖汚染物質パネル (CONTAM Panel) は食品や飼料中 NDL-PCB のリスク評価を行うことを欧州委員会 (EC) に依頼された。ダイオキシンと DL-PCB については、EFSA が設立される以前に EC 科学委員会がリスク評価を行っている。リスク評価における課題としては、塩素含有量と生産過程に応じて、工業的 PCB 混合物 (例えば、Arochlor、Clophen、Phenochlor、Kanechlor、Pyralene、Fenclor、Delor)

の構成は個々の PCB 同族体の数がかかなり異なることが挙げられる。さらに、工業的 PCB 混合物は不純物として、polychlorinated naphthalenes (PCN) や polychlorinated dibenzofurans (PCDF) のような他の塩素化合物を含むことがある。例えば、DL-PCB と PCDF の濃度について WHO-TEQ でみると、ロットの異なる 2 つの Arochlor 1254 において一桁以上の差異があった。異なる構成や毒性学的に関連のある不純物の存在が、工業的 PCB 混合物の毒性試験の結果にかなり影響を及ぼす可能性がある。従って、NDL-PCB の毒性評価のための動物試験の考察する際には、種々の工業的 PCB 混合物やバッチにおける DL-PCB と PCDF の存在を考慮しなければならない。

環境中に放出されると、個々の PCB 同族体は生分解や光分解を受け、元の工業的混合物とは異なる同族体パターンとなる。このような変化は PCB 混合物が動物 (ヒトを含むほ乳類) に摂取された場合により一層顕著である。数種の NDL-PCB 同族体は代謝されて hydroxy-PCB や methylsulfonyl-PCB になる。一般に、塩素の少ない同族体ほど早く代謝され、塩素の多い同族体ほど安定しており、食物連鎖によって蓄積される。一方曝露報告に関しては、食品や飼料中の NDL-PCB 量のデータは様々な文献で報告されており、それらは、例えば、3 種 PCB 同族体 (PCB 138、153、180) の合計、しばしば標識 PCB と見なされる 6 種 PCB 同族体 (PCB 28、52、101、138、153、180) の合計、7 種の合計 (6 種の標識 PCB と PCB 118) である。このように一貫性が欠けることにより、データの直接比較が妨げられている。EFSA パネルは、評価基準として 6 種標識 PCB

の合計を使用するよう決定した。これらの同族体は、様々な試料マトリックス・種々の PCB パターンにとって適切な標識であり、利用可能なデータに基づく NDL-PCB のリスク評価にとって最適であることが使用決定の理由である。パネルは 6 種標識 PCB の合計が食品中の全 NDL-PCB の約 50% に相当すると指摘している。

EC 推奨モニタリング・プログラムによるヨーロッパの 12 カ国以上のダイオキシンと PCB のデータを収集した結果では、膨大な数のデータが EC に提出されたが、選択基準（例えば、1997 年と 2004 年の分析、定量化の限界）がデータ内のばらつきに対処するために適用され、結果的に評価に考慮されたのは、飼料については 171 データ、食品については 4183 データのみであった。原則的には、NDL-PCB のデータは 6 種の PCB 28、52、101、138、153、180 の合計の値である。魚油は魚類・水産品と同様にカテゴリー平均値が高く、それぞれ、製品 1 g あたり 54.7 と 25.6 ng であった。動物由来の種々の食品群における同族体プロフィールはよく似ており、PCB 138 と 153 が主要な同族体である。サンプル数が限られていたが、植物由来の食品サンプルにおけるバックグラウンド汚染は低く、生重量 1 g あたり 0.1 ng 以下であった。動物由来の食品サンプルではかなり高い値が認められ、水産品を除き脂質 1 g あたり 2.6~12.7 ng であった。平均値の最高は魚油（脂質 1 g あたり 70.2 ng）および水産品（生重量 1 g あたり 12.7 ng）であり、一方、バルト海の魚類サンプルの NDL-PCB レベルは比較的高い程度であった。人乳の NDL-PCB の既存データは第 3 回 WHO

人乳実地調査から得られた。これらのデータはヨーロッパ 18 カ国の 58 サンプルを含む。PCB 153、138、180 が人乳中の主要同族体であり、全 PCB 同族体の平均 65% になる。全 NDL-PCB の平均値は脂質 1 g あたり 335 ng であり、ヨーロッパ各国のデータより計算した。初期段階で測定を実施したヨーロッパ各国の多くでは、PCB レベルのおよそ 30-70% の減少が 1998 年~2001 年の人乳サンプルにおいて認められた。

ヒトにおける NDL-PCB 曝露の主要経路（90% 以上）は食物である。全 NDL-PCB の平均 1 日食事摂取量は 1 日あたり体重 1 kg あたり 10-45 ng の範囲と推測される。6 歳までの幼児の曝露データから、全 NDL-PCB の平均摂取量（母乳を除く）は 1 日あたり体重 1 kg あたり約 27-50 ng であった。しかしながら、ある集団における成人と子どものデータでは、子どもの曝露量は成人の 2.5 倍であった。バルト海の漁師のような高 PCB 食事曝露の部分母集団において、6 種 NDL-PCB の合計における魚からの 1 日摂取量は体重 1 kg あたり約 40 ng であり、その他の食事を考慮する前の全 NDL-PCB の摂取量は 1 日あたり体重 1 kg あたり約 80 ng に相当する。母乳栄養の乳児は高 NDL-PCB 摂取群であり、成人の曝露量より 2 桁多いこともある。

外気や室内空気、ダスト、土といった他の曝露経路は一般集団の体内蓄積量に通常あまり影響を及ぼさない。しかしながら、汚染された室内空気からの寄与を考慮すべき状況もある。

NDL-PCB と他の DL 化合物との関係に関しては、様々な汚染源や食事・食品の起源のため、特定の明確な汚染ケースや地理的

に定義されるサンプリングエリアの場合を除き、NDL-PCB と DL-PCB の毒性等量 (TEQ)、または、全 TEQ (polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD)、PCDF、DL-PCB) の濃度の間に相関関係はない。しかしながら、高レベルの NDL-PCB を標準的に含むサンプルは DL-PCB、PCDD および PCDF のレベルも高い可能性がある。これらの状況では、DL-PCB TEQ と全 TEQ のレベルを減らすリスク管理対策が消費者を高 NDL-PCB 曝露から守ることにもなるかもしれない。塩素の少ない工業的 PCB 混合物による汚染といった特定の状況では、NDL-PCB レベルは高いが、TEQ レベルが低い可能性があり、全 TEQ を減らす対策は高 NDL-PCB レベルの製品に対して住民を保護するとはかぎらない。

毒性試験で用いられた工業的 PCB 混合物は、NDL-PCB および DL-PCB のようなダイオキシン様化合物の両者を含む。これらの混合物は様々な毒性影響を示し、例えば、発がん性と同様に、肝臓、甲状腺、免疫機能、生殖、行動に影響を与える。個々の NDL-PCB に曝露された実験動物において報告された毒性影響は、甲状腺、肝臓および脳、さらに、免疫毒性、エストロゲン様作用、生殖毒性、神経発達毒性でも認められた。後者の影響は、特に子宮内で曝露されたげっ歯類の児において認められた。しかしながら、数種の PCDD、PCDF および PCB 126 は、試験された NDL-PCB より肝臓や甲状腺への毒性影響が 3 桁程度大きいので、ダイオキシン様汚染物質の 0.1% 以下の NDL-PCB への混入は観察された毒性影響を十分に説明する。

In vitro および in vivo の遺伝毒性試験の結果、PCB には遺伝子や染色体レベルの

変異原性がないことが示された。いくつかの NDL-PCB、特に塩素の少ない同族体は DNA 損傷を引き起こすが、これは活性酸素種の形成による結果と考えられる。ヒトでの発がん性の限定された証拠があり、かつ実験動物での発がん性の十分な証拠があることに基づき、IARC は PCB を Group 2A に分類した。ラットを用いた工業的 PCB 混合物の発がん性試験の評価と TCDD のデータ比較により、工業的 PCB 混合物におけるダイオキシン様の要素がこれらの混合物の発がん反応に関与する可能性があることが示された。個々の NDL-PCB の発がん性に関するピアレビューされたデータはない。

PCB の職業曝露は、消化器官等の発がんリスク増加と関連があると報告されている。おそらく特定の脆弱なサブグループについてのみではあるが、PCB の環境曝露が乳がん発生に関係している可能性を示す試験もある。環境 PCB 曝露と関連すると報告されている非発がん影響のうち、生殖毒性、神経発達遅延、そして、発達段階における免疫力低下が最も重要と考えられている。しかしながら、疫学的研究では NDL-PCB の影響を明らかな根拠とする毒性の推定は可能ではない。

家畜に対するリスクリスクキャラクターゼーションとして、汚染物質パネルは、実験飼料中の影響濃度を動物飼料中の NDL-PCB 濃度と比較した。保守的手法に従い、合成飼料中の 6 種 NDL-PCB の合計の 90 パーセント値である、飼料 1 kg あたり 0.02 mg が比較ポイントとされた。この数字は全 NDL-PCB ではおよそ 0.04 mg に相当し、試験された大抵の家畜に影響を及ぼす濃度より 2 桁以上低い。魚・魚加工品中の

6 種 NDL-PCB の合計の 90 パーセンタイル値は 1 kg あたり 0.067 mg であり、全 NDL-PCB では 0.13 mg に相当する。この値はミンクの生殖に影響を与える飼料中 PCB 濃度の 5 倍程度にしか低くない。従って、CONTAM パネルは、動物飼料中の NDL-PCB における現在のバックグラウンドレベルはミンクを除く大抵の家畜に健康影響を及ぼさないと結論付けた。

ヒト健康に対するリスクキャラクターゼーションとしては、変異原性の無いことから閾値法が毒性評価には適しているが、毒性データベースは限定されすぎていて NDL-PCB の基準値に基づく健康評価を行うことは、困難であると考えられた。それゆえ、汚染物質パネルは MOE (margin of exposure) アプローチをに基づいて健康リスク評価を行うことにした。個々の NDL-PCB 同族体に関する動物試験でみられた最も感受性の高い影響は肝毒性と甲状腺毒性である。個々の NDL-PCB 同族体 (PCB 28、128、153) について、ラットを用いた 90 日間試験におけるこれらの影響の NOAEL は 30-40 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ であった。汚染物質パネルは、動物における様々な影響での NOAEL または LOAEL における推定体内負荷量を、人乳の最新分析から導かれた推定平均ヒト体内負荷量と比較した。NOAEL または LOAEL での体内負荷量の MOE (margin of body burdens : MoBB) は推定動物体内負荷量を推定平均ヒト体内負荷量で割ることで算出された。ラットでの最も感受性の高い影響 (例えば、肝臓や甲状腺への影響) に基づき、汚染物質パネルは、全ての個々の NDL-PCB の、そして、ヒト組織における NDL-PCB 合計の代表的・保守的 NOAEL BB

(NOAEL での体内負荷量) として、総体内負荷量を体重 1 kg あたり 500 μg とした。NDL-PCB の推定平均ヒト体内負荷量が体重 1 kg あたり約 50 μg であることとの比較により、NOAEL での MoBB は約 10 であった。汚染物質パネルは、ラットの甲状腺と肝臓における毒性は PCDD、PCDF、DL-PCB の投与でも観察されることをつけ加えた。従って、NDL 同族体が同様の効果を示す可能性のある PCDF や DL-PCB に汚染されているという不確実性により、NDL-PCB の NOAEL の推定が妨げられる。それゆえ、NDL-PCB のための真の NOAEL MoBB はより大きい可能性がある。一方、MoBB は人乳中の平均 NDL-PCB 濃度に基づいて計算され、ヨーロッパのある地域では体内負荷量がかかり多い可能性がある。

授乳期間中、母乳栄養児は体重に基づいて平均成人摂取量の 2 桁程度多くの NDL-PCB を日常的に摂取している可能性がある。この乳児による高摂取は、その母親が食事で NDL-PCB を長期間摂取したことに関係している。しかしながら、弱い神経発生毒性がヒト乳児における研究で報告され、それは混合物 (NDL-PCB、DL-PCB、PCDD/PCDF) への曝露と主に関連していたが、NDL-PCB の因果的役割は明らかではない。CO 汚染物質パネルは、乳児における他の多くの研究では人乳中に含まれる汚染物質にもかかわらず授乳が有益な効果と関連があるということに言及した。

結論として、NDL-PCB とダイオキシン様化合物への同時曝露が毒性試験や疫学調査の結果の解釈を妨げるので、NDL-PCB についてヒトの健康影響基準値は設定できなかった。また、個々の NDL-PCB 同族体の影響

に関するデータベースはかなり限定的である。しかしながら、母親の体内蓄積量がヨーロッパ各国での平均 1 日摂取量から推定される体内蓄積量よりわずかに多いだけで NDL-PCB や DL-PCB に起因する、あるいは PCDD/PCDF の単体または組合せに起因する弱い発達影響が生じる可能性がある、という兆候がある。個人やヨーロッパの特定地域の住民において平均的摂取量がかかなり多い場合があるので、食物中の NDL-PCB レベルを低減させる継続的な取り組みが必要である。

TCDD の SD ラット 2 年間慢性実験結果の比較

"Comparison of chronic toxicity and carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin (TCDD) in 2-year bioassays in female Sprague-Dawley rats." Walker NJ, Wyde ME, et al. (2006)

70 年代半ばにダウ化工（株）によって行われた TCDD (2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラジオキシン) の発がん性試験が TCDD へのヒト曝露のがんの量的リスクアセスメントを行うために広く利用されている。近年では、NTP (米国家毒性プログラム) がダイオキシン毒性換算係数の評価の一環として同様のデザインの発がん性試験を行っている。

本報告では、これら 2 種類の発がん性試験におけるデザインと結果を比較している。この比較により、Sprague-Dawley ラットで TCDD によって誘発された発がん性と毒性の投与量、時間的経過、器官選択性、腫瘍タイプ、および maximum intensity に関

する、以前に公表されて広く用いられた発がん性反応特性が、ほぼ確認された。特に、肝臓、肺、および口腔粘膜での新生物の発生の増加が、両方の試験においてみられた。最も著しい差異は、NTP の試験で見られた肝臓の胆管がんの発生増加であり、ダウの試験ではそのような増加は認められなかった。

2 つの試験の実験デザインは同様であったが、溶媒や投与スケジュール、飼料、使用されたラットの亜種といった、いくつかのプロトコルの要素が異なっていた。数種の催腫瘍性の用量反応曲線の傾きの差異が試験間に認められ、NTP の試験ではすべての催腫瘍性で非線形性を示した。この差異は、用いられた Sprague-Dawley ラットの種の生物学的挙動が異なるのと同様、試験プロトコルの違いから生じた可能性がある。

ダイオキシン用化合物 (PCB 126 および 2,3,4,7,8-PeCDF) の REP 加重分布に基づいた TEF 設定のための代替法

An alternative method for establishing TEFs for dioxin-like compounds, Part 3. Development of weighted distributions of REPs for PCB 126 and 2,3,4,7,8-PeCDF. Staskal DF, Unice KM, et al., (2006)

現在、規制機関では PCDDs、PCDFs、およびダイオキシン様 PCB 類への曝露に関する潜在的な健康リスクを評価するにあたり、毒性換算係数 (TEF) 手法を利用している。しかし、現在の TEF は暫定的であり、新たな情報が利用可能になったときには、再検討する必要がある。また、WHO の TEFs に基づくリスク評価に内在する変動や不確実性の特性が明らかにされていない。これま

でかなりの期間、REP (underlying relative estimates of potency) 値は異種データセットを代表すると考えられているが、TEF 値は単一点での推定値として与えられている。この制限に対応して、数名の研究者が確率論的リスク評価で使用するために REP 値の分布を提案している。これらの分布は、内在する分布の共有点に基づいて TEFs の点推定値を定めるために用いられることが潜在的に可能であり、従って、TEF 値においてより均一な保守性を保証する。

近年、Haws らはアップデート版 REP データベースとして REP₂₀₀₄ database を公表した。このデータベースは定量分析を容易に実施することが可能な方法で構造化された。REP₂₀₀₄ database を開発する際には個々の REP 値は多種多様な試験から導き出されている。この問題に対応して、われわれは 1997 年のレビューで WHO 専門家パネルによって使用されたオリジナルの基準に基づいて再現性のある定量的重み付けスキームの開発に努めている。定量的重み付けスキームについては Haws らによる関連論文で概説されている。予備的重み付けスキームは複数の異なる試験の質や妥当性についての対策を必要とする。本報で、われわれは PCB 126 と 2,3,4,7,8-PeCDF に提案した重み付けスキームを適用した。

結論として、この予備的評価により、全体的 REP_s 分布に対する重み付けの影響は小さいことが示された。また、本研究の結果は初期バージョンのデータベースに種々の重み付けスキームを適用させた結果と一致していた。この全体的 REP_s 分布に対する影響の少なさの説明として、REP 値の変動が重み付けスキームで説明される変動より

ずっと大きいことが考えられる。

欧州における PCDD/F, PCB, PBDE and HBCDD の現在の曝露量に対するリスク評価の試み

An attempt to evaluate the risk of the present human exposure to PCDD/F, PCB, PBDE and HBCDD in Europe. Weiss J and Bergman Å

本報の目的は、ヨーロッパで報告された 2~3 の POPs について現在のヒト曝露量の概要を報告し、これらの値をリスクアセスメントの展望に加えることである。

MOS_{reference} の値 (300) は MOS_{TEQ} の値 (2 および 7) を明らかに超えており、乳児におけるミルク経由の現在のヒト PCDD/F-TEQ が精子形成に関して懸念があることを示した。PCBs の寄与は、種々のマトリックス (例えば、ヒトの脂肪組織や乳製品) における全 TEQ のおよそ 50% である。大抵の食品中のダイオキシン量は基準値以下であるが、魚加工品の多くは EU 市場で購入されるための基準値を超えた TEQ を含んでいる。2006 年 2 月に改訂された基準値は、PCBs の寄与を含む PCDD/Fs および TEQ を定めた。TEQ への PCB の寄与により、概して、新たな値はもとの 2 倍である。

MOS_{PBDE} の値 (660-2.4 x 10⁶) と MOS_{HBCDD} の値 (5100-200 x 10³) は MOS_{reference} の値 (それぞれ 175 および 525) を明らかに超えており、ヨーロッパ人において報告された PBDEs と HBCDD の現在の濃度は心配がない。しかしながら、ヨーロッパからの人乳の報告における PBDE の最大曝露量によって、MOS 値は 2-10 倍しかない。現在の MOS は、多くの物質にとっては曝露状況が増しているため、低い可能性がある。人乳経由

の PBDE の推定一日摂取量への追加量は、乳児の臍帯血の曝露量の約 2 ng/g fat である。

US における胎児へのリスクの同様の推定は、PBDE のミルク摂取濃度 1600-9600 ng/day に基づき、 MOS_{PBDE} : 150-1600 ($MOS_{reference}=175$) となり、このことは US の乳児は懸念されるレベルで PBDE に曝露される可能性があることを示す。臍帯血清には平均 40 ng PBDE/g fat、最大 460 PBDE/g fat を含まれることが報告されている。さらに US 人口の 5% の PBDE の組織内濃度は 300 ng/g fat 以上である。

結論として、現在のヨーロッパにおけるヒト TEQ 値（つまり、PCDD/Fs の曝露量）には懸念があることが示された。毒性影響の閾値と PCDD/F TEQ 曝露量との間の比率は欧州委員会が要求する MOS より小さい。ヨーロッパ人口における PBDE/HBCDD の平均値には今のところ懸念がないと推定されるが、95 パーセンタイル摂取量の人にとっては現在の MOS では小さい。US 人口の多くは PBDEs の MOS を超えている。HBCDD データは脆弱すぎて US における評価はできない。

この予備的リスク評価は、共同および拮抗の特性をもつ種々の POPs のいわゆるカクテル効果を考慮していないが、この複合効果により MOS がかなり下がる可能性がある。

D. 考察

WHO-IPCS 専門家会議 (2005) が PCBs を含むダイオキシン様化合物の毒性換算係数 (TEFs) の再評価が、Haws らの TEF データベースに基づき、重み付けのない REP 分布と専門家の判断、及び点推定値の組み合

せ手法を用いることによって、より科学的に透明性の高い手法によって行われた。改訂した TEF を用いることによって、ヒトの摂取に関連している食品を例にとると、総 TEQ がおおよそ 10-25% の範囲で減少することが試算された。また、非ダイオキシン様 AhR アゴニスト/アンタゴニストが 2, 3, 7, 8-TCDD および関連化合物の総合的な毒性に影響する可能性も認識されたが、予備的な曝露評価が推奨された。一方、Polybrominated diphenylethers (PBDEs) については TEF/TEQ アプローチに含めないことが結論づけられた。さらに、TEF/TEQ 値や関連した方法は食事からの摂取による曝露量の推定のために作られているので、土壌や沈殿物などに対する TEF/TEQ アプローチの応用については、代替案や付加的 TEFs を決定するための将来的アプローチの必要性が示された。欧州の評価では、NL-PCB や PBDE、HBCD などについての曝露評価を通じて、平均的な曝露では懸念は小さいとされていると考えられるが、高用量曝露のケースによっては MOS 少ないとされているが、データの不足も指摘されている。曝露データの充実も必要であるが、これらの物質に対する生体影響のクライテリアを設定する意味においても、生物学的影響をより正確に説明できる受容体原性等に基づく生体影響評価手法の開発がますます求められていることが感じられた。

E. 参考文献

EC, Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) 2000. Available at (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out55_en.pdf).

EC, Scientific Committee on Food (SCF) 2000. Available at (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out78_en.pdf.)

EC, Scientific Committee on Food (SCF) 2001. Available at (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out90_en.pdf).

Kodavanit PRS, Kannan N, Yamashita N, Derr-Yellin, EC, Ward TR, Burgin DE, Tilson HA, Birnbaum LS, Environmental Health Perspectives 2001; 109:1153-1161.

Heppner C, Fürst P, Larsen JC, Schrenk D, van Leeuwen FXR., (2006) Organohalogen Compounds; 56:830-833

Martin Van den Berg, et. al., (2006) Toxicological Sciences 93:223-241

Staskal DF, Unice KM, et al., (2006) *Organohalogen Compounds* 68: 836-839.

Van Leuween FXR and Malisch R (2002) Organohalogen Compounds; 56:311-316

Walker NJ, Wyde ME, et al. (2006) Mol. Nutr. Food Res. 50: 934 - 944

Weiss J and Bergman Å., (2006) *Organohalogen Compounds* 68: 822-825.

F. 研究発表

1. 論文発表

Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice. Environ Toxicol, 22, 44-52, 2007.

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A,

Kamata E. Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. Reprod Toxicol, 22, 672-678, 2006.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. Reprod Toxicol, 23, 12-19, 2007.

高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞. OECD 化学物質対策の動向 (第9報) - 第17回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2003年アローナ), 化学生物総合管理学会誌, 2, 163-175, 2006.

高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞. OECD 化学物質対策の動向 (第10報) - 第18回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2004年パリ), 化学生物総合管理学会雑誌, 2, 286-301, 2006.

高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞. OECD 化学物質対策の動向 (第11報) - 第19回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2004年ベルリン), 国立医薬品食品衛生研究所報告, 124, 62-68, 2006.

2. 学会発表

Ema M, Arima A, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. Prenatal

developmental toxicity of dibutyltin in cynomolgus monkeys given on consecutive three days during organogenesis. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/22, 2006.

Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Pre- and post implantation embryonic loss induced by dibutyltin given to mice during early pregnancy. The 26th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25, 8/24), 2006.

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Teratogenic effects of rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG), in rats. 27th Annual meeting of American College of Toxicology (10/5-8, Palm Springs), 2006.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Arima A, Ihara T. Teratology study of dibutyltin in cynomolgus monkeys given during organogenesis. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego, 2006.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. International Conference on Food Contamination and Neurodevelopmental Disorders (12/3-5, 2006, Valencia), 2006.

Ema M, Matsuyama T, Matsumoto M, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Kamata, E. Toxicity study of ultraviolet light absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) in rats during the pre-weaning period. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2007.

Fukunishi K, Hirose A, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kamata E, Ema M. Combined repeated dose toxicity with the reproductive/developmental toxicity screening test of ultraviolet absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotriazole (DBHCB) in rats. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2007.

Hirose A, Aisaki H, Oh K, Matsumoto M, Kamata E, Igarashi K, Kanno J, Ema M. Gene Expression analysis in uterus and ovary of mice treated dibutyltin dichloride during implantation. The 26th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/24), 2006.

Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M. Development in silico genotoxicity predictory system on chromosomal aberration for existing chemicals. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/21, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を

含む)

1. 特許取得

(該当なし)

2. 実用新案登録

(該当なし)

3. その他

(該当なし)

別添 5.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, <u>Fujii-Kuriyama Y</u> and Kato S,	Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.	Nature	446	562-66	2007
<u>Emm M</u> , Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T.	Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys.	Reprod Toxicol	23	12-19	2007
<u>Emm M</u> , Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, <u>Hirose A</u> , Kamata E	Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice.	Environ Toxicol	22	44-52	2007
<u>江馬真</u>	生殖発生毒性試験の役割	産科と婦人科	74	309-15	2007
Goryo K, Suzuki A, Carpio CA, Siizaki K, Kuriyama E, Mikami Y, Kinoshita K, Yasumoto K, Rannug A, Miyamoto A, <u>Fujii-Kuriyama Y</u> , Sogawa K.	Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding.	Biochem Biophys Res Commun	354	396-402	2007
Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Itoh M, Miyagi T, Takakura H, Hoshi K, Kato C, Arakawa T, Shibata K, Fukui K, Masui R, Kuramitsu S, Kiyotani K, Chalk A, Tsunekawa K, Murakami M, <u>Kamataki T</u> , Oka T, Shimada H, Cizdziel PE, Hayashizaki Y. :	Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology.	Nat Methods	4	257-62	2007
Uno Y, Kumano T, Kito G, Nagata R, <u>Kamataki T</u> , Fujino H	CYP2C76-mediated species difference in drug metabolism: A comparison of pitavastatin metabolism between monkeys and humans.	Xenobiotica	37	30-43	2007
Hiroshi Yamazaki, Haruka Fujita, Takaaki Gunji, Jun Zhang, <u>Tetsuya Kamataki</u> , John R. Cashman, Makiko Shimizu	Stop codon mutations in the flavin-containing monooxygenase3 (FM03) gene responsible for trimethylaminuria in Japanese population.	Mol.Genet.Metab.	90	58-63	2007

Akashi T, Nishimura Y, Wakatabe R, Shiwa M, Yamori T.	Proteomics-based identification of biomarkers for predicting sensitivity to a PI3-kinase inhibitor in cancer.	Biochem Biophys Res Commun	352	514-21	2007
菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、	Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み	細胞工学	26	71-77	2007
Hasegawa R., Koizumi Hirata M., Dourson M., Parker A., Hirose A., Nakai S., Kamata E. Ema M.	Pediatric susceptibility to 18 industrial chemicals: A comparative analysis of newborn with young animals	Regul Toxicol Pharmacol	47	296-307	2007
Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat.	Drug Chem Toxicol	29	215-225	2006
Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di- <i>o</i> -tolylguanidine, in rats.	Reprod Toxicol	22	672-78	2006
Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di- <i>o</i> -tolylguanidine, in rats.	Reprod Toxicol	22	30-36	2006
Tokuda N, Arudchelvan Y, Sawada T, Adachi Y, Fukumoto T, Yasuda M, Sumida H, Shioda S, Fukuda T, Arima A, Kubota S:	PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey thymus.	The Annals of the New York Academy of Sciences,	1070	581-85	2006
Kanno, J., Aisaki, K., Igarashi, K., Nakatsu, N., Ono, A., Kodama, Y. and Nagao, T.	"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.	BMC Genomics	7	64-77	2006
Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.	Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice.	Proc Natl Acad Sci U S A	103	224-229	2006
Yaguchi S, Fukui Y, Koshimizu I, Yoshimi H, Matsuno T, Gouda H, Hirono S, Yamazaki K, Yamori T.	Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor.	J Natl Cancer Inst	26	91-7	2006
Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, Yamori T, Aoki J, Fujimaki T, Arai H.	Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid.	J Biol Chem	281	17492-500	2006

Sekine H, Mimura J, Yamamoto M, <u>Fujii-Kuriyama Y.</u>	Unique and overlapping transcriptional roles of Arnt (Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses.	<i>J Biol Chem.</i>	281	37507-16	2006
Kuribayashi S, Ueda N, Naito S, Yamazaki H, <u>Kamataki T.</u>	Species differences in hydrolase activities toward OT-7100 responsible for different bioavailability in rats, dogs, monkeys and humans.	Xenobiotica	36	301-14	2006
Uno Y, Fujino H, Kito G, <u>Kamataki T.</u> , Nagata R.	CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C in liver, metabolizing tolbutamide and testosterone.	Mol. Pharmacol.	70	477-86	2006
Takasuna K, Hagiwara T, Watanabe K, Onose S, Yoshida S, Kumazawa E, Nagai E, <u>Kamataki T.</u>	Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea.	Cancer Chemother. Pharmacol	58	494-503	2006
Sarikaya D, Bilgen C, <u>Kamataki T.</u> , Topcu Z. :	Comparative cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 expressions in human larynx tissue analysed at mRNA level.	Biopharm. Drug Dispos.,	27	353-59	2006
Saruwatari J, Matsunaga M, Ikeda K, Nakao M, Oniki K, Seo T, Mihara S, Marubayashi T, <u>Kamataki T.</u> , Nakagawa K. :	Impact of CYP2D6*10 on H1-antihistamine-induced hypersomnia.	Eur. J. Clin. Pharmacol.,	62	995-1001	2006
Peamkrasatam S, Sriwatanakul K, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, <u>Kamataki T.</u> , Yoovathaworn K.	In vivo evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais.	Drug Metab. Pharmacokinetic	21	475-84	2006
Iwano S, Shibahara N, Saito T, <u>Kamataki T</u>	Activation of p53 as a causal step for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons.	<i>FEBS Lett</i>	580	890-93	2006
Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Miyazaki M, Fujieda M, Kamataki T, Imaida K	Dose dependent on inhibitory effects of dietary 8-methoxypsoralen on NNK-induced lung tumorigenesis in female A/J mice	<i>Cancer Lett.</i>	234	232-38	2006
Kuwahara, S., Ikei, A., Taguchi, Y., Tabuchi, Y., <u>Fujimoto, N.</u> , Obinata, M., Uesugi, S., Kurihara, Y.	PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription.	Biol Reprod.	75	352-59	2006

Fujimoto, N., Akimoto, Y., Suzuki, T., Kitamura, S., Ohta, S.	Identification of prostatic- secreted proteins in mice by mass spectrometric analysis and evaluation of lobe-specific and androgen-dependent mRNA expression.	J. Endo	190	793-803	2006
<u>Yoshihisa Kato</u> , Shin-ichi Ikushiro, Rie Takiguchi, Sekihiro Tamaki, Koichi Haraguchi, Toshiyuki Sakaki, Shizuo Yamada and <u>Jun Kanno</u> and Masakuni Degawa	A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats.	Organohalogen Compounds	68	1442-45	2006
Shin-ichi Ikushiro, Yoshikazu Emi, <u>Yoshihisa Kato</u> , Shizuo Yamada and Toshiyuki Sakaki	Monospecific antipeptide antibodies against human hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily (UGT1A) isoforms.	Drug Metab. Pharmacokinetics	21	70-74	2006
Yoshida, K., Hirabayashi, Y., Watanabe, F., Sado, T., and <u>Inoue, T.</u>	Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells.	Exp Hematol	34	274-83	2006
Nishikawa, A., Sai, K., Okazaki, K., Son, H. Y., Kanki, K., Nakajima, M., Kinae, N., Nohmi, T., Trosko, J. E., <u>Inoue, T.</u> , and Hirose, M.	MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in gpt delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells.	Environ Mol Mutagen	47	48-55	2006
Corvi, R., Ahr, H. J., Albertini, S., Blakey, D. H., Clerici, L., Coecke, S., Douglas, G. R., Gribaldo, L., Groten, J. P., Haase, B., Hamernik, K., Hartung, T., <u>Inoue</u> , <u>T.</u> , Indans, I., Maurici, D., Orphanides, G., Rembges, D., Sansone, S. A., Snape, J. R., Toda, E., Tong, W., van Delft, J. H., Weis, B., and Schechtman, L. M.	Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use.	Environ Health Perspect	114	420-9	2006

LETTERS

Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase

Fumiaki Ohtake^{1,2}, Atsushi Baba², Ichiro Takada², Maiko Okada², Kei Iwasaki¹, Hiromi Miki², Sayuri Takahashi^{2,3}, Alexander Kouzmenko^{1,2}, Keiko Nohara⁴, Tomoki Chiba⁵, Yoshiaki Fujii-Kuriyama^{6,7} & Shigeaki Kato^{1,2}

Fat-soluble ligands, including sex steroid hormones and environmental toxins, activate ligand-dependent DNA-sequence-specific transcriptional factors that transduce signals through target-gene-selective transcriptional regulation¹. However, the mechanisms of cellular perception of fat-soluble ligand signals through other target-selective systems remain unclear. The ubiquitin–proteasome system regulates selective protein degradation, in which the E3 ubiquitin ligases determine target specificity^{2–4}. Here we characterize a fat-soluble ligand-dependent ubiquitin ligase complex in human cell lines, in which dioxin receptor (AhR)^{5–9} is integrated as a component of a novel cullin 4B ubiquitin ligase complex, CUL4B^{AhR}. Complex assembly and ubiquitin ligase activity of CUL4B^{AhR} *in vitro* and *in vivo* are dependent on the AhR ligand. In the CUL4B^{AhR} complex, ligand-activated AhR acts as a substrate-specific adaptor component that targets sex steroid receptors for degradation. Thus, our findings uncover a function for AhR as an atypical component of the ubiquitin ligase complex and demonstrate a non-genomic signalling pathway in which fat-soluble ligands regulate target-protein-selective degradation through a ubiquitin ligase complex.

The transcriptional regulatory system and the ubiquitin–proteasome system are two major target-selective systems that control intracellular protein levels. This target selectivity depends on the recognition of specific DNA elements by sequence-specific transcription factors¹ and the recognition of degradation substrates by E3 ubiquitin ligases^{2–4}. These transcription factors and ligases serve primarily as specific adaptors that subsequently recruit transcriptional co-regulators and E2 ubiquitin-conjugating enzymes, respectively, to appropriate targets. The selective biological effects of fat-soluble ligands have been reported to be mediated by two classes of sequence-specific transcription factors, nuclear receptors¹ and arylhydrocarbon receptor (AhR) belonging to the basic helix–loop–helix (bHLH)/Per-Arnt-Sim (PAS) family^{5–9}.

AhR ligands modulate oestrogen and sex hormone, signalling both positively and negatively^{8,10–13}. Functional impairments of male and female reproductive organs in AhR-deficient mice indicate the possible importance of AhR in sex hormone signalling^{10,14}. Different AhR agonists⁹, including 3-methylcholanthrene (3MC) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), modulate oestrogen-dependent oestrogen receptor (ER)- α transactivation through the association of activated AhR/Arnt with ER- α ¹⁵. Similarly, the transcriptional activity of nuclear androgen receptor (AR) was modulated by association with activated AhR (Supplementary Fig. S2a). However, ligand-bound AhR did not block oestrogen-induced co-activator recruitment on the oestrogen-responsive promoter (Supplementary Fig. S2b). This implies another mode of function for ligand-activated AhR beyond transcriptional regulation.

On activation of AhR by 3MC, we observed that protein levels of endogenous ER- α (in mammary tumour MCF-7 cells), ER- β (in ovarian tumour KGN cells) and AR (in prostate cancer LNCaP cells) were drastically decreased (Fig. 1a–c, and Supplementary Fig. 3a) without a change in messenger RNA levels (data not shown), irrespective of the presence of their cognate hormones. Other AhR agonists⁹ (namely β -naphthoflavone (β -NF), environmental toxins such as TCDD and benzo[a]pyrene, and the endogenous metabolite indirubin) were similarly effective in protein degradation for ER- α (Fig. 1b) and ER- β /AR (data not shown), in agreement with a previous report on downregulated levels of uterine ER- α protein in rats treated with TCDD¹⁶. An AhR partial agonist/antagonist α -naphthoflavone (α -NF) was unable to accelerate the degradation of either AhR or ER- α (Fig. 1b, and Supplementary Fig. S3b).

AhR ligand-induced degradation (Fig. 1a–c) and functional repression (Supplementary Fig. S2c, d) of sex steroid receptors were abrogated in the presence of a proteasome inhibitor MG132. Consistently, poly-ubiquitination of ER- α was promoted by the activated AhR regardless of the presence of oestrogen (Fig. 1d, and Supplementary Fig. S3c). Pulse-chase kinetic analysis indicated that 3MC-induced degradation of ER- α was coupled to that of AhR^{8,17,18} (Supplementary Fig. S3d). Moreover, the self-ubiquitination activity of the ligand-bound AhR immunocomplex was detected in an E1/E2-dependent manner (Supplementary Fig. S3e). Together with 3MC-dependent recognition of sex steroid receptors by AhR^{8,12,13,15}, these properties of AhR resemble those of classical adaptor components of the E3 ubiquitin ligase complexes, such as F-box proteins⁹ or von Hippel–Lindau protein¹⁹. We therefore reasoned that activated AhR might act as an E3 ubiquitin ligase complex component.

To address this idea, AhR-containing complexes were purified from HeLa cells expressing Flag–AhR treated with 3MC or α -NF^{15,20}. AhR formed large complexes in the presence of 3MC (Supplementary Fig. S4a–c). Further purification revealed five major 3MC-dependent complexes containing AhR (Fig. 1e). Complexes A and C contained well-known co-activators TRAP220/DRIP205/Med220 and p300 (ref. 1) (Supplementary Fig. S4d, e). Endogenous ER- α was detected in complexes B and C; however, ubiquitinated components were seen only in complex B (Fig. 1f, g).

Complex B was composed of the ubiquitin ligase core components cullin 4B (CUL4B)^{5,21,22}, damaged-DNA-binding protein 1 (DDB1)^{23–27} and Rbx1 (Roc1)³, together with subunits of the proteasomal 19S regulatory particle (19S RP), Arnt and transducin- β -like 3 (TBL3) (Fig. 1h). These components eluted with AhR in the presence of 3MC but not in the presence of α -NF (Fig. 1i, and Supplementary Fig. S4f). Neither CUL4A nor known substrate-specific adaptor components of CUL4A, such as DDB2, CSA and DET1^{23,24}, were present

¹ERATO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan. ²Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan. ³Department of Urology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, 113-8655, Japan. ⁴National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan. ⁵Graduate School of Life and Environmental Sciences, and ⁶TARA Center, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai Tsukuba, 305-8577, Japan. ⁷SORST, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan.

in the AhR-CUL4B complex. As the cullin amino terminus binds adaptor components and the carboxy terminus interacts with an E2 enzyme-binding subunit Rbx1 (ref. 3), we performed tandem purification of the AhR-CUL4B complex with glutathione *S*-transferase (GST)-tagged CUL4B-N (N-terminal domain of CUL4B) and Flag-AhR. This led to the identification of a core complex consisting of five components: DDB1, AhR, Arnt, TBL3 and CUL4B (Fig. 1j). Together with Rbx1, this complex is denoted by CUL4B^{AhR}.

Immunoprecipitation of AhR together with endogenous CUL4B from MCF-7 and LNCaP cells was observed only in the presence of 3MC (Fig. 2a, b). Consistently, ligand-dependent co-localization of AhR with CUL4B was seen in MCF-7 cells (Fig. 2c). Whereas CUL4B seemed to act as a scaffold mediating DDB1-TBL3 and AhR-DDB1

interactions in CUL4B^{AhR} (Fig. 2d, lane 4), ligand-activated AhR induced the assembly of complex components (Fig. 2d, lanes 1-3). DDB1 did not bridge CUL4B association with TBL3 or AhR, apparently because of the absence of the signature WDXR/DWD box^{22,25-27} of either TBL3 or AhR, which is essential for DDB1 binding (Fig. 2d, lane 5, and Supplementary Fig. S5a). Consistently, specific and 3MC-dependent interaction of the conserved C-terminal acidic domain of AhR with the N-terminal region of CUL4B, but not with DDB1, was observed in a GST pulldown assay (Supplementary Figs S5b and S6). Because a constitutively active AhR mutant (AhR Δ PASB)⁹ interacted with CUL4B in the absence of ligand (Supplementary Fig. S5b), ligand-dependent structural alteration presumably induces AhR-CUL4B interaction. An AhR mutant lacking the CUL4B-binding

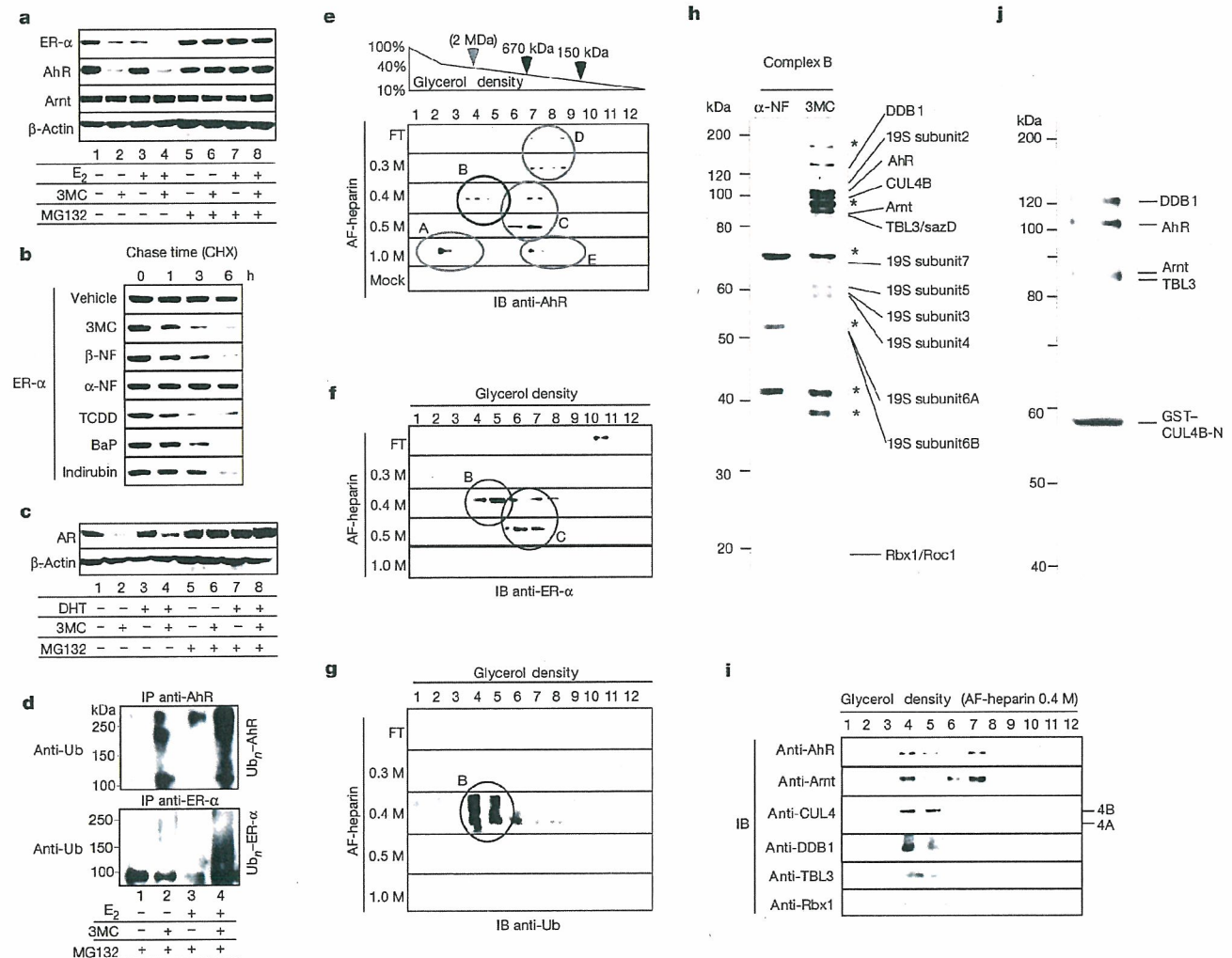


Figure 1 | Activated AhR acts as an E3 ubiquitin ligase. **a-c**, AhR-ligand-induced proteasomal degradation of ER- α (**a**, **b**) and AR (**c**). MCF-7 cells (**a**, **b**) and LNCaP cells (**c**) were incubated as indicated with E_2 (10 nM), DHT (10 nM) and/or 3MC (1 μ M), β -NF (1 μ M), benzo[a]pyrene (BaP; 100 nM), TCDD (10 nM), indirubin (10 nM) and α -NF (1 μ M) in the presence or absence of MG132 (10 μ M) and cycloheximide (CHX; 5 μ M) for 3 h (**a**, **c**) or the indicated durations (**b**). Cell lysates were subjected to western blotting with specified antibodies. **d**, AhR-ligand-induced ubiquitination of ER- α . MCF-7 cells were incubated with the indicated ligands for 6 h. Western blots were subjected to dark exposure to detect poly-ubiquitinated forms of the receptors. IP, immunoprecipitation; Ub, ubiquitin. **e**, **f**, Biochemical separation and identification of AhR-associated complexes. Flag-AhR-associated proteins in the presence of 3MC or α -NF from HeLa cells stably expressing Flag-AhR were first fractionated by glycerol-density-gradient centrifugation (top, fractions 1-12), and then separated by Toyopearl AF-

heparin column chromatography with the indicated KCl concentrations (FT, 1.0 M KCl). Samples from the 3MC-treated cells were resolved into five distinct complexes. IB, immunoblotting. **g**, Components of an AhR-associated complex are highly ubiquitinated. Western blots with anti-ubiquitin antibody. **h**, Identification of AhR-associated CUL4B ubiquitin ligase complex components. Components from complex B in **e** (fractions 4 and 5 from the glycerol-density-gradient centrifugation, eluted from an AF-heparin column at 0.4 M KCl) were resolved by SDS-PAGE, silver-stained and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight MS analysis. **i**, Co-elution of the complex B components as a large complex. **j**, Association of activated AhR with the CUL4B complex. The CUL4B^{AhR} complex from Flag-AhR-expressing HeLa cells treated with 3MC was affinity purified with GST-tagged N-terminal domain of CUL4B followed by anti-Flag antibody column fractionation.

acidic domain (AhR Δ acid; Supplementary Fig. S6a) was indeed unable to promote ER- α ubiquitination *in vivo*, although the mutant retained 3MC-dependent transactivation function (Supplementary Fig. S5c). This indicates that the ubiquitin ligase function of AhR is independent of its transactivation function.

With two separately prepared components of recombinant AhR and CUL4B/DDB1/Rbx1 purified from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells (Supplementary Fig. S7a), complex assembly *in vitro* was also

dependent on 3MC (Fig. 2e). Furthermore, by *in vitro* ubiquitination assay (Supplementary Fig. S7b), the E3 ubiquitin ligase activity of CUL4B^{AhR} for ER- α was dependent on 3MC but not on 17 β -oestradiol (E₂) (Fig. 2f). These data indicate that both the complex assembly and the ubiquitin ligase activity of CUL4B^{AhR} may be dependent on AhR agonists.

We then examined whether the recognition of sex steroid receptors for 3MC-dependent ubiquitination is indeed mediated by AhR. Co-immunoprecipitation analyses indicated that ligand-activated AhR was required for the recruitment of ER- α (Fig. 2a, d) or AR (Fig. 2b, and data not shown) to CUL4B^{AhR}. TBL3 and DDB1 did not seem essential for ER- α recruitment but stabilized the association of ER- α with CUL4B^{AhR} (Fig. 2d). Moreover, knockdown of CUL4B^{AhR} components (Supplementary Fig. S8) impaired the 3MC-induced ubiquitination and degradation of ER- α (Fig. 3a–d, and Supplementary Fig. S9a, b) and AR (Fig. 3e, Supplementary Fig. S9c and data not shown), and abolished the AhR-ligand-induced repression of ER- α transactivation (Supplementary Fig. S10a). Recognition of ER- α by activated AhR was retained, but ubiquitination of AhR-bound ER- α was abrogated, by knockdown of the other CUL4B^{AhR} components (Fig. 3d). An ER- α Δ A/B mutant¹⁵ that lacks interaction with AhR, and an ER- α K7R mutant in which seven lysine residues had been replaced with arginine (Supplementary Fig. S6b), were resistant to AhR-dependent ubiquitination and transrepression (Fig. 3f, and Supplementary Fig. S10b). Taken together, these data suggest that ligand-activated AhR functions as a substrate-specific adaptor component of CUL4B^{AhR}. AhR is therefore a unique and atypical substrate-specific component of a cullin-based E3 complex, because AhR bears no known interaction motif with cullin complexes yet associates directly with CUL4B. Ubiquitination of ER- α -associated AhR was similarly abolished by the knockdown, and the overall ubiquitination and degradation of AhR^{8,17,18} were partly affected (Supplementary Fig. S11a, b). This implies the existence of CUL4B^{AhR}-dependent (self-ubiquitination³) and CUL4B^{AhR}-independent pathways for AhR degradation.

Human ER- α (hER- α) degradation is reportedly accelerated by the binding of E₂ (ref. 1) or the phosphorylation of Ser 118 (ref. 28), whereas a partial antagonist, tamoxifen, has been shown to stabilize ER- α . Nevertheless, 3MC-activated AhR efficiently induced the ubiquitination and subsequent degradation of tamoxifen-bound ER- α and ER- α -S118A mutant (Fig. 3f). Reciprocally, AhR was dispensable for E₂-dependent ER- α degradation (Supplementary Fig. S11c). These results indicate that the CUL4B^{AhR} system may act independently of innate protein degradation system(s) for ER- α . XAP2/ARA9/AIP^{7,8,17}, a chaperone that modulates the stability of unliganded AhR, seemed unlikely to mediate the accelerated degradation of ER- α by activated AhR (Supplementary Fig. S11d).

Last, we addressed the physiological significance of CUL4B^{AhR} for sex hormone signalling in intact animals. Injection with either 3MC (Fig. 4a) or β -NF (Fig. 4c) did not affect the expression of ER- α or AR mRNA (data not shown) but caused a decrease in protein levels of uterine ER- α in ovariectomized female wild-type mice and of prostate AR in castrated male wild-type mice (Fig. 4b) regardless of their treatment with cognate sex hormones. However, AhR deficiency (AhR^{-/-} mice)^{9,14} abolished such effects of AhR ligands but did not affect the modulation of stability of sex steroid receptors by their respective hormones (Fig. 4a, b). As a result of reduced sex steroid receptor levels after pretreatment with 3MC, E₂-dependent induction of *c-fos* in the uterus¹⁵ and dihydrotestosterone (DHT)-dependent induction of *Probasin* in the prostate¹⁰ were severely impaired (Fig. 4a, b). Cellular proliferation and gene induction in response to sex hormones in primary cultured epithelial cells from normal mouse uterus and prostate were consistently suppressed by 3MC (Supplementary Fig. S12a, b) and β -NF (Supplementary Fig. S12c), but no effect was detected in AhR^{-/-} cells (Supplementary Fig. S12a, b). The significance of CUL4B^{AhR} complex components in the AhR-mediated suppression of sex hormone effects

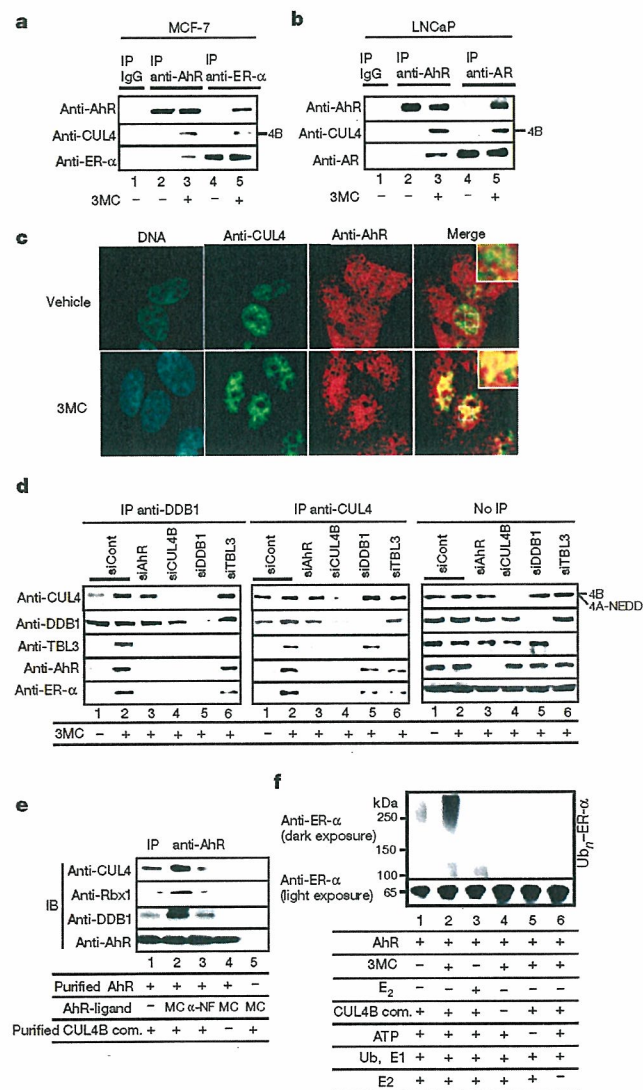


Figure 2 | AhR ligand-dependent assembly and ubiquitin ligase activity of CUL4B^{AhR}. **a, b**, 3MC-dependent association of endogenous CUL4B and AhR with ER- α and AR. Co-immunoprecipitation analyses from MCF-7 (**a**) and LNCaP (**b**) cells incubated with ligand and MG132 for 2 h. IP, immunoprecipitation. **c**, 3MC-dependent co-localization of AhR with CUL4. MCF-7 cells incubated with 3MC and MG132 for 2 h were immunostained with the indicated antibodies. **d**, Formation of the CUL4B^{AhR} complex. MCF-7 cells were transfected with specified short interfering RNAs (siRNAs) for 48 h, treated with 3MC and MG132 for 2 h, and immunoprecipitated with the indicated antibodies. **e**, Assembly of the CUL4B complex components with AhR is dependent on 3MC *in vitro*. Immunoprecipitation with anti-AhR antibodies of the indicated recombinant CUL4B complex components (CUL4B com.) was observed only in the presence of 3MC. IB, immunoblotting. **f**, CUL4B^{AhR} ubiquitinates ER- α *in vitro*. ER- α protein was incubated with and without recombinant CUL4B^{AhR} E3 complex components, ubiquitin (Ub), ATP, E1 and E2 enzymes as indicated, then subjected to western blotting.

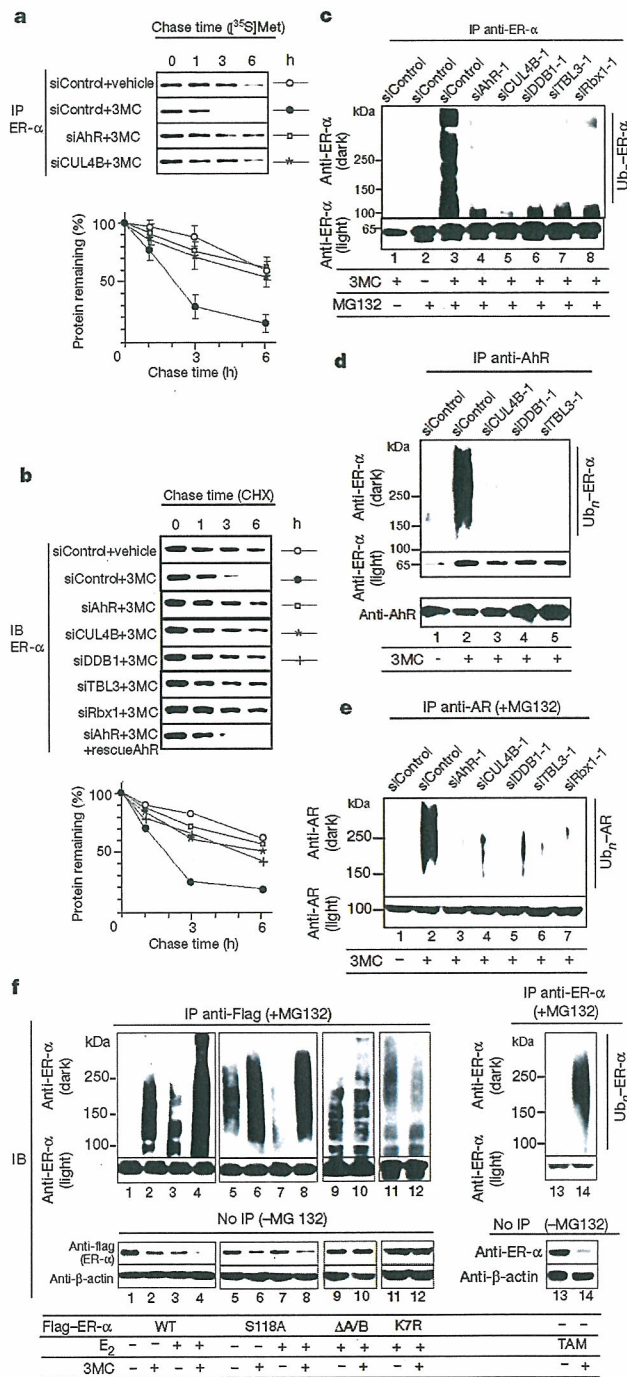


Figure 3 | Activated AhR is a substrate-specific adaptor component of the CUL4B^{AhR} complex. a–c, Components of CUL4B^{AhR} are required for 3MC-dependent ubiquitination and degradation of ER-α. MCF-7 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h, then used in pulse-chase analysis as in Supplementary Fig. S3d (a), in cycloheximide (CHX) chasing (b) and in the *in vivo* ubiquitination assay with ligand incubation for 6 h (c). All values are shown as means ± s.d. (n = 3) (a) or as means (n = 3) (b). The knockdown efficiency in the same lysates was confirmed in Supplementary Fig. S9a. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation. d, AhR is the substrate-specific adaptor in the targeting of ER-α by CUL4B^{AhR}. MCF-7 cells transfected with the indicated siRNAs were lysed in TNE buffer and immunoprecipitated with anti-AhR antibody in the presence of MG132. Ubiquitination of the ER-α co-immunoprecipitated with AhR was detected by western blotting. e, LNCaP cells were subjected to the same analysis as in a–c. f, AhR-ligand-induced ER-α ubiquitination requires intact lysine

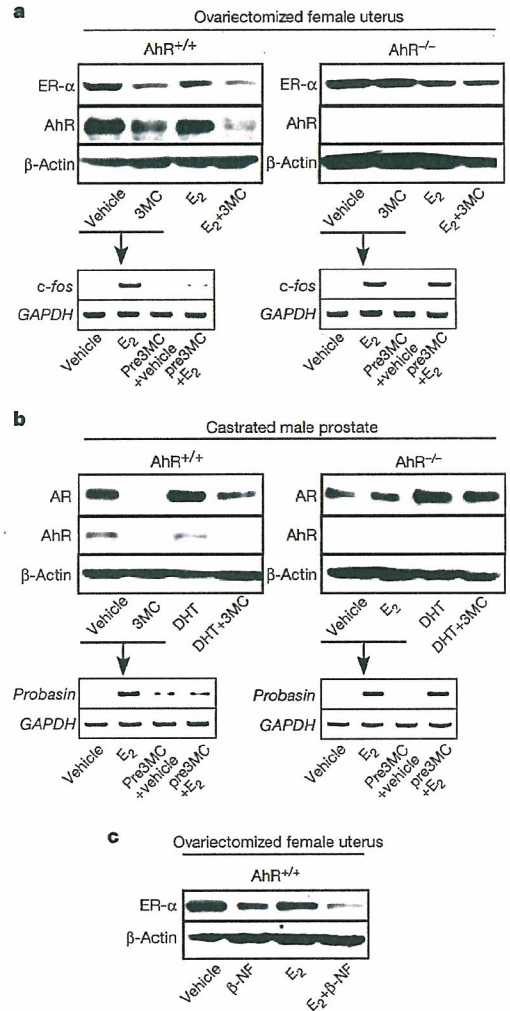


Figure 4 | Ligand-dependent ubiquitin ligase function of AhR *in vivo*. a, b, AhR activation enhances the degradation of ER-α and AR *in vivo*. Top: nine-week-old ovariectomized female mice (a) or castrated male mice (b) of the indicated genotypes were injected with vehicle or indicated ligands. After 4 h, uterus (a) or ventral prostate (b) was isolated and subjected to western blotting. Bottom: mice pretreated with vehicle or 3MC for 8 h were injected with either vehicle or E₂ (a), or DHT (b). After 4 h, the uterus or prostate was isolated for reverse transcriptase PCR. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. c, Other AhR agonists produce a similar effect on oestrogen signalling to that of 3MC.

(Supplementary Fig. S12a, b) and the promotion of ER-α degradation in uterine cells (Supplementary Fig. S12d) was verified by knock-down of the components.

Here we have shown that a known sequence-specific transcription factor AhR acts as a ligand-dependent CUL4B-based E3 ubiquitin ligase for selectively targeting sex steroid receptors to bring about accelerated protein degradation. The transcription and ubiquitination functions of AhR seem to be responsible for a distinct set of biological events caused by endogenous and exogenous AhR ligands. In ubiquitin ligase complexes, substrate recognition by known

residues and is independent of oestrogen binding or S118 phosphorylation of hER-α. Intact MCF-7 cells (right) or cells transfected with Flag-hER-α, AhR and their derivatives (left) were treated with the indicated ligands in the presence (top) or absence (bottom) of MG132 for 6 h, then subjected to western blotting. TAM, tamoxifen; WT, wild type.

substrate-specific components is generally evoked by substrate modifications²⁻⁴. However, the recognition and subsequent ubiquitination of sex steroid receptors by AhR requires dioxin-type compounds as ligands but does not require the phosphorylation or ligand binding of sex steroid receptors. We have therefore shown that fat-soluble ligands directly control the function of a ubiquitin ligase complex for targeted protein destruction in animals (see Supplementary Fig. S1). In plants, auxin was recently found to control protein destruction through the auxin receptor SCF^{TIR1} (refs 29, 30). However, whereas SCF^{TIR1} is regulated by ligand-dependent substrate recognition by TIR1, CUL4B^{AhR} is primarily regulated by the assembly of a ligand-dependent complex as well as substrate recognition. Considered together, ubiquitin-ligase-based perception mechanisms of fat-soluble ligands may be diverse in different species. It is possible that other nuclear receptors and binding proteins for fat-soluble ligands also serve as key components of ubiquitin ligases to mediate a non-genomic pathway of fat-soluble ligands to regulate target-protein-selective destruction.

METHODS

More detailed descriptions of all materials and methods are supplied in the Supplementary Information.

Biochemical purification and separation of AhR-associated complexes. The nuclear extracts preparation, anti-Flag affinity purification and mass spectrometry were performed as described previously^{15,20}. For purification of the core CUL4B^{AhR} complex, the nuclear extracts were first bound to the GST-CUL4B-N (amino acid residues 1-318) columns before being loaded on anti-Flag columns²⁰.

In vitro ubiquitination assay. The *in vitro* ubiquitination assay was performed as described previously²³. Purified Flag-AhR (0.2 µg) was incubated either with 3MC (10 µM) or vehicle (dimethylsulphoxide) for 30 min at 25 °C, then mixed with Flag-CUL4B/DDB1/Rbx1 complex (0.2 µg), and after further incubation for 30 min at 25 °C the substrate, ER-α (Calbiochem), was added.

Plasmids, antibodies, immunoprecipitation, in vivo ubiquitination, pulse-chasing, ligand responses in mice, and RNA-mediated interference experiments. Detailed methods used in this study can be found in the Supplementary Information.

Received 13 December 2006; accepted 16 February 2007.

- McKenna, N. J. & O'Malley, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-474 (2002).
- Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479 (1998).
- Deshaies, R. J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 435-467 (1999).
- Harper, J. W. A phosphorylation-driven ubiquitination switch for cell-cycle control. *Trends Cell Biol.* 12, 104-107 (2002).
- Poellinger, L. Mechanistic aspects—the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Food Addit. Contam.* 17, 261-266 (2000).
- Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 307-340 (1995).
- Swanson, H. I. & Bradfield, C. A. The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* 3, 213-230 (1993).
- Carlson, D. B. & Perdew, G. H. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 317-325 (2002).
- Mimura, J. & Fujii-Kuriyama, Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 263-268 (2003).
- Lin, T. M. *et al.* Effects of aryl hydrocarbon receptor null mutation and in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 68, 479-487 (2002).
- Brunnberg, S. *et al.* The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6517-6522 (2003).
- Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J. & Gustafsson, J. A. Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor α to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5317-5328 (2005).
- Beischlag, T. V. & Perdew, G. H. ER α-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280, 21607-21611 (2005).
- Baba, T. *et al.* Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10040-10051 (2005).
- Ohtake, F. *et al.* Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550 (2003).
- Romkes, M., Piskorska-Pliszczynska, J. & Safe, S. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor levels in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87, 306-314 (1987).
- Davarinos, N. A. & Pollenz, R. S. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* 274, 28708-28715 (1999).
- Roberts, B. J. & Whitelaw, M. L. Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 36351-36356 (1999).
- Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275 (1999).
- Kitagawa, H. *et al.* The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor for promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917 (2003).
- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F. E. & Kipreos, E. T. CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature* 423, 885-889 (2003).
- Higa, L. A. *et al.* CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nature Cell Biol.* 8, 1277-1283 (2006).
- Groisman, R. *et al.* The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113, 357-367 (2003).
- Wertz, I. E. *et al.* Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science* 303, 1371-1374 (2004).
- Jin, J., Arias, E. E., Chen, J., Harper, J. W. & Walter, J. C. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol. Cell* 23, 709-721 (2006).
- Angers, S. *et al.* Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 443, 590-593 (2006).
- He, Y. J., McCall, C. M., Hu, J., Zeng, Y. & Xiong, Y. DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* 20, 2949-2954 (2006).
- Valley, C. C. *et al.* Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5417-5428 (2005).
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. & Estelle, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445 (2005).
- Kepinski, S. & Leyser, O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446-451 (2005).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank K. Tanaka, C. K. Glass, J. Yanagisawa, Y. Gotoh and J. Mimura for comments; S. Murata, T. Matsuda, T. Suzuki and Y. Tateishi for providing materials; T. Matsumoto, M. Igarashi and S. Fujiyama for technical assistance; and H. Higuchi for manuscript preparation. This work was supported in part by the Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences (PROBRAIN) and priority areas from the Ministry of Education, Culture, Sports and Technology (to Y.F.-K. and S.K.).

Author Contributions F.O., T.C., Y.F.-K. and S.K. designed the experiments. F.O., A. B., M.O., K.I., H.M., S.T. and I. T. performed the experiments. F.O., A.K. and S.K. wrote the paper.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.K. (uskato@mail.eucc.u-tokyo.ac.jp).