

して幅広く使用されており、身の回りに非常に多く存在する。このプラスチックから、高分子化されずに残留するBPA単量体が極微量ながら存在し、これが漏出することが問題になっている。したがって、「BPAが低用量で内分泌かく乱作用を示す」ことが事実であれば、その影響ははかり知れないほど重大と考えられているのである。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等の低分子量脂溶性生理活性物質をリガンドとする転写制御因子である。エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor; ERR) は、ERと非常によく似たアミノ酸配列をもつことから発見され、ヒトではERR α 、ERR β 、そしてERR γ と、3つのサブタイプが存在する。しかしながら、これらのいずれについても内在性リガンドや生理機能に関してはほとんど何も分かっていない。

ERRは、リガンドなしで活性化コンホメーションとなる、いわゆる「自発活性化型核内受容体」(self-activated nuclear receptors, SA-NR) である。その構成基盤活性 (Constitutive activity) はERよりも非常に大きい。このため、通常の「リガンド活性化型核内受容体」

(ligand-activated nuclear receptors, LA-NR) とは異なり、センシング抗体アッセイ法には大きな工夫が必要と思われた。LA-NRは、リガンド、即ちアゴニストの結合によってリガンド結合ドメイン (LBD) の第12ヘリックス (H12) がコンホメーション変化するが、SA-NRではこのような変化がない。

こうした状況で、ERR γ が4-ヒドロキシタモキシフェン (4-Hydroxytamoxifen, 4-OHT) と強く結合し、H12を活性化コンホメーションから不活性化型へ変化させるというX線結晶構造解析の報告があった。この4-OHTの作用は、「インバースアゴニスト」として同定されている。そこで、4-OHTのコンホメーション変化を感知・センシングできる抗体があれば、この変化を「活性化型へ戻す変化」として定量できるのでは? という着想に思い至った。

ERR γ に対してBPAが強い結合能を持つことが判明し、その結合がどのようにERR γ の機能に影響するかを調べるのが緊要の要件となった。そこで、BPAのERR γ に対する影響をレポーター遺伝子アッセイにより調べた結果、BPA自身は構成基盤活性に全く影響を与えないことが分かった。4-OHTは、ERR γ を用量依存的に不活性化する。しかし、4-OHTとともにBPAを細胞に曝露したところ、BPAの濃

度依存的にERR γ の活性が回復することが判明した。この事実は、上記の着想を支持する結果であり、BPAがERR γ に働くインバースアゴニストを阻害する、あるいは抑制することを示している。

ERR γ の体内における役割は未解明のままであるが、ERR γ はヒト成人の身体の至る所で存在し、胎児では脳において高レベルに発現することが知られている。また、妊娠中のラットにBPAを投与すると生まれてくるラットは行動障害になると考えられている。もしも、このような障害がERR γ を経由しているのであれば、ERR γ に対する化学物質の影響、特にBPAの効果解明は緊急を要するものと考えられる。

今回、BPAがERR γ に結合することを直接に証明し、また、BPAがERR γ 以外の他のステロイドホルモン受容体と結合する可能性について調べることにした。また、新しい着想を基に、ERR γ に対して多数の化学物質を効率的に調べるができるコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法を構築することにした。

B. 研究方法

(1) 受容体 ERR γ の調製

ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて ERR γ の LBD 領域のクローニングを行った。得られた PCR 産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いて ERR γ -LBD の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製した。

(2) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cで行った。GST-ERR γ -LBD と各濃度の放射標識された BPA を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の BPA を放射標識された BPA と併に加えることにより調べた。遊離の [3 H]BPA はデキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

(3) 競争結合試験

一連の環境ホルモン候補物質の ERR γ に対する結合能は、 [3 H]BPA の受容体結合を阻害

する能力で評価した。評価する一連の化学物質を ^3H BPAとERR γ と共にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。遊離の ^3H BPAはデキストラン被膜活性炭により取り除いた。化学物質のIC₅₀値(^3H BPA受容体結合を50%阻害する値)はプログラムALLFITにより算出した。

(4) 抗体調製

図1.に示されるように抗原を設定し、ウサギに免疫した。その後、免疫沈降反応とペプチドを用いたアフィニティ精製を行い、抗体を精製した。



図1. ERR γ 抗原配列

ER α の抗原配列を基にERR γ に対する抗原部位を2ヶ所(#1、#2)設定した。

(5) センシングアッセイ

ERR γ をBPAや4-OHTと4°Cで終夜反応させ、リガンド-受容体複合体を調製した。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコーティングした96穴イムノプレートに移した。4°C終夜反応後、洗浄し、ELISAキット(KPL社)付属のABTS Peroxidase基質とPeroxidase Solution Bを等量混合した溶液でペプチドに結合した抗体量を調べた。

C. 研究結果

(1) ERR γ 受容体の結合試験

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として大腸菌でERR γ を発現した。放射標識された4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)と同様に反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F分離の条件を詳細に検討した。その結果、 ^3H BPAの特異的結合を十分量与える要件の設定に成就した(図2)。

スキッチャードプロット解析を行った結果、K_d値は5.8 nMであり、B_{max}は18 nmol/mgであった。 ^3H 4-OHTに比べ、 ^3H BPAでは非特異的な結合が小さく、特異的結合は全結合の約90%あり、結合試験を行うに最適であ

ると判断された。また、 ^3H BPAを用いた競争結合試験でも ^3H 4-OHTと同様のIC₅₀値を示した。

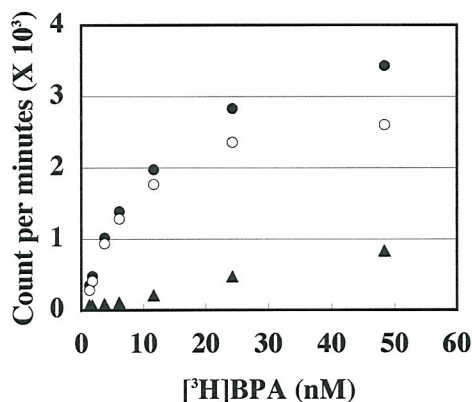


図2. ERR γ 飽和結合試験

ERR γ に対する ^3H BPAの全結合(●)と非特異的結合(▲)、特異的結合(○)を示す。

(2) 他のステロイド受容体に対するBPAの結合試験

ARやGR、PR、ER β をInvitrogen社より購入し、表1に示されるような放射標識されたリガンドを用いて受容体結合試験を行った。その結果4-OHTはER α やER β だけでなくERR γ にも強く結合した。一方、BPAはERR γ に最も強く結合し、IC₅₀値は13.1 nMを示した。ER α やER β は100倍弱く、ARやGR、PRは結合しなかった。また、ERに対する内在性リガンドである17 β -エストラジオール(E2)はER α やER β に対して強く結合し、ERR γ には全く結合しなかった。

表1. 様々なステロイドホルモン受容体に対するBPAの結合能

ステロイドホルモン受容体 (^3H -標識リガンド)	Receptor binding affinities shown by IC ₅₀ (nM)		
	E2	4-OHT	BPA
ERR γ (^3H 4-OHT)	NB ¹⁾	10.3 ± 0.80	13.1 ± 2.34
ER α (^3H E2)	0.98 ± 0.15	0.55 ± 0.11	1,040 ± 180
ER β (^3H E2)	1.27 ± 0.31	0.88 ± 0.14	1,320 ± 287
AR ³⁾ (^3H DHT)	248 ± 52	NB	NB
GR ³⁾ (^3H cortisol)	465 ± 125	1,130 ± 24	ND ²⁾
PR ³⁾ (^3H progesterone)	527 ± 128	ND	NB

ND: 10⁻⁵ Mにおいて弱い結合が見られる
NB: 10⁻⁵ Mにおいても全く結合が見られない

(3) ERR γ センシングアッセイ

図 1. に示されるように構造変化の中心であるヘリックス 12 に対して 2 ヶ所の抗原部位 (#1 と #2) を設定した。それぞれの抗原に対して抗体を調製した結果、図 3. に示されるように抗#1 ペプチド-抗体は抗原ペプチドを認識するものの、受容体を認識しなかった。一方、抗#2 ペプチド-抗体は抗原ペプチドのみならず受容体も認識した。したがって、以後の研究は受容体を認識した抗#2 ペプチド-抗体を用いて行った。

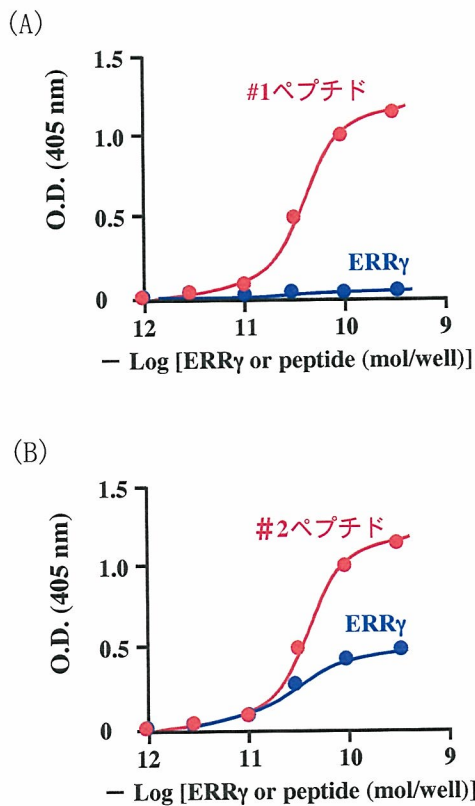


図 3. 各抗体の抗原ペプチド、ERR γ 認識
(A) 抗#1 ペプチド-抗体、(B) 抗#2 ペプチド-抗体

ERR γ は SA-NR であり、インバースアゴニストである 4-OHT が結合して始めてコンホメーション変化する。そこで、本研究では 4-OHT を基準化合物として用い、4-OHT が ERR γ が誘起するコンホメーション変化を抗体で感知・センシングする抗体アッセイ法として確立した。レポーター遺伝子試験から推測される通り、BPA が結合した ERR γ は活性コンホメーションにあるため、ERR γ 自身同様に抗体応

答に変化がなかった。一方、4-OHT 結合 ERR γ では、リガンド濃度依存的な抗体応答が見られた。4-OHT 濃度依存的な抗体応答変化は、シグモイド曲線を描き、ALLFIT により解析した結果 EC₅₀ 値は 62 nM だった (図 4)。そこで、BPA 共存下で 4-OHT を反応させたところ、BPA 濃度依存的に 4-OHT による抗体応答が減少した (図 5)。

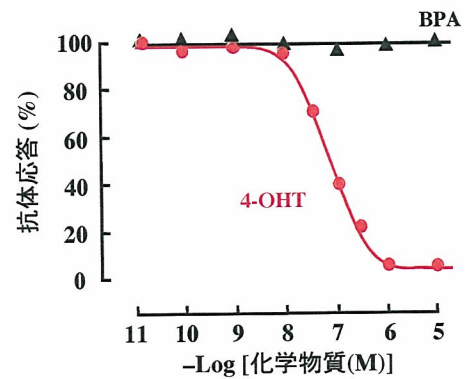


図 4. 4-OHT 濃度依存的な抗体応答
4-OHT のみ、BPA のみにおける濃度依存的な抗体応答

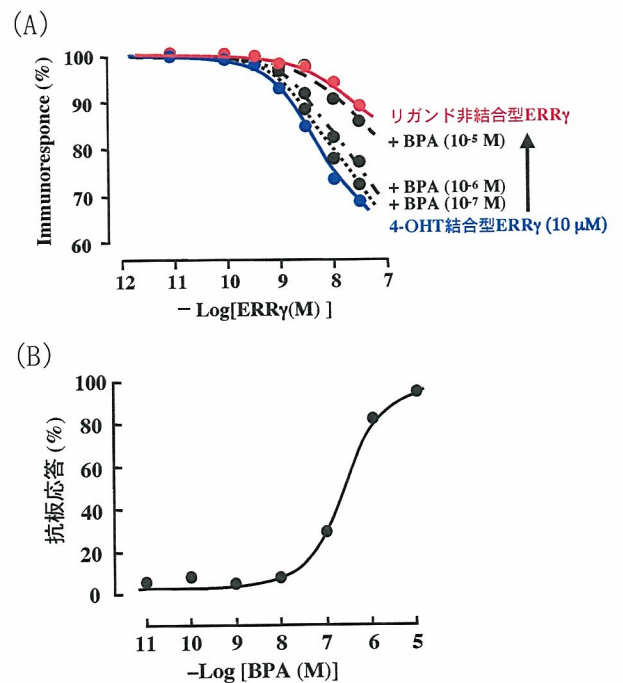


図 5. 4-OHT を基盤としたセンシングアッセイ
4-OHT と共存させることにより BPA 濃度依存的な抗体応答が検出できる。(A) 受容体濃度依存性の調査、(B) BPA 濃度依存性の調査

D. 考察

[³H]4-OHT を用いた ERR γ 競争結合試験だけでなく、[³H]BPA を用いた飽和結合試験でも大きな特異的結合が見られたことから、BPA が ERR γ に直接的に結合することが証明された。また、BPA はアミノ酸配列および立体構造が非常に良く似ている ER α や ER β には約 100 倍弱くしか結合しないことが明らかとなった。さらに、同じステロイドホルモン受容体 (第 3 核内受容体グループ) に属する AR や GR、PR には全く結合しないことが分かった。逆に、E2 は ER α および ER β に強く結合し、ERR γ には全く結合しないことが明らかとなった。

以上の結果は、BPA が特異的に ERR γ に結合することを明確に示した。したがって、BPA の低用量作用は、もしその暴露があるとき、ERR γ を介して起こる作用である可能性がある。しかしながら、ER と ERR は DNA 結合エレメントを共有することが知られ、しかも、両者はヘテロダイマーを形成しうることから、BPA が特異的に ERR γ に結合するものの、ERR γ から ER を介してアロステリックに影響している可能性もある。低用量作用の解析には、こうした可能性を直接に解析する必要があるかも知れない。

ところで、ERR γ 抗体を作製する際に抗原部位を 2ヶ所設定したが、ヘリックス 12 のみの抗原ペプチドに対する抗体は ERR γ 受容体タンパク質を全く認識しなかった。一方、ヘリックス 12 を中心にその周辺領域を含むペプチドを抗原にした抗体は、ERR γ を不完全ながら認識した (図 3)。ERR γ は自発活性化型受容体 SA-NR であり、リガンド未結合でもヘリックス 12 がリガンド結合ポケットにフタをするような構造になっている。このため、ヘリックス 12 の片面が受容体の内部に埋もれる形となる。この埋もれる片面を主として認識する抗体であると、当然ながら抗体の認識が届かない。結果からすると、こうした抗体であると考えられる。各核内受容体-ヘリックス 12 抗体がリガンド依存性受容体を認識し、構成的活性を示す受容体を認識しないと考えると、これを用いて構成的活性を持つ核内受容体を識別出来るようになる。今後、ヘリックス 12 抗体は SA-NR の識別に利用されるかも知れない。

BPA が直接的に、あるいは間接的に ERR γ を介して内分泌かく乱作用を示す可能性が強くなった。このため、様々な化学物質を ERR γ について効率的に調べるアッセイ系が

緊要となった。今回、レポーター遺伝子アッセイの結果と一致するように確立された ERR γ コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法は、4-OHT の存在、非存在下で間接的、あるいは直接的にその受容体応答を評価できる新規なアッセイ法である。レポーター遺伝子アッセイでは、4-OHT の EC₅₀ 値の算定は困難を伴うが、このセンシング抗体アッセイ法では 4-OHT の EC₅₀ 値は 62 nM と計算可能であり、しかも、はるかに高感度である。これは、特異的なモノクローナル抗体を用いることが可能となれば、さらに高感度なアッセイ法として供されるであろう。

また、このセンシング抗体アッセイ法では、結合試験では測定出来ないホルモン活性の指標も知ることが出来る。さらにインバースアゴニストのみならず、BPA のようなインバースアンタゴニストの効果も測定することが可能である。

今回、自発活性化型受容体 SA-NR である ERR γ についてセンシング抗体アッセイ法が確立できたことは重要な意味を持ち、48 種の核内受容体へ展開できる可能性を十分に示した。一方、4-OHT の有無による抗体応答の差は約 25%であり、100%になることはない (図 5A)。これは、今回調製した抗体がポリクローナル抗体であり、ERR γ ヘリックス 12 の様々な構造部位を認識する抗体成分が混合された状態であるためと考えられる。つまり、ヘリックス 12 で受容体内部に埋もれた片面を認識する抗体成分が約 75%含まれることを意味する。コンホメーション変化の認識においては、より高感度に変化を認識する抗体が必要である。

自発活性化型受容体 SA-NR では、インバースアゴニストを基準化合物とする必要がある。このため、インバースアゴニストが変化させる構造を特異的に認識する抗体が必要となる。このように、自発活性化型受容体 SA-NR で異なるリガンドによる変化を高い選択性で識別するためには、それぞれにより特異性の高いモノクローナル抗体が必要となる。今後はさらに高感度な試験系を確立するために、こうしたモノクローナル抗体の作製が切要である。実際、ファージディスプレイ法および細胞融合法でこうしたモノクローナル抗体の調製を実施中である (他の分担報告書を参照)。これらを用いて、多くの化学物質の ERR γ に対する評価が必要である。また、同じ自発活性化型受容体 SA-NR である ERR α および ERR β に対する試験系の開発も重

要であると思われる。

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

F. 研究発表

論文発表

1. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor (ERR γ) with high constitutive activity. S. Takayanagi, T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Toxicology Letters*, **176**, 95-105 (2006).

2. Conformation change of α -helix peptide for sensing of deactivation of nuclear receptor: Immunoassay using polyclonal antibody specific for the C-terminal α -helix 12 of estrogen-related receptor γ (ERR γ). T. Tokunaga¹, X. Liu, H. Okada, A. Mastushima, T. Nose, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2006, 176 (2006).

学会発表

1. 徳永隆俊、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸、核内受容体の不活性化における α ヘリックスペプチドの構造変化: エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) C 末端 α ヘリックスに特異的なポリクローナル抗体法、第 43 回ペプチド討論会、2006. 11. 5-8。

2. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) への高親和性結

合: ビスフェノール A の必須構造要因、日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

3. 下東美樹、海部匡慶、西絵利香、澤田隆行、徳永隆俊、劉 暁輝、松島綾美、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体 (dERR) と環境ホルモンリスク評価のためのショウジョウバエ *in vivo* 継代試験の確立、日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

4. 下東康幸、徳永隆俊、劉 暁輝、岡田浩幸、高柳明香、ビスフェノール A の標的受容体は脳内に高発現の核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) である、日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

5. 徳永隆俊、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) のコンホメーション変化センシング抗体アッセイ: ビスフェノール A の受容体応答活性、日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

6. 劉 暁輝、徳永隆俊、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の部位特異的アミノ酸変異による内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A の受容体結合部位の同定、日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

ショウジョウバエの脳神経および卵産生における継代的な化学物質応答解析

研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部講師

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体・エストロゲン関連受容体 (*Drosophila* estrogen-related receptor: dERR) が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズム(サーカディアンリズム)の関与する核内受容体様タンパク質・転写因子も、ヒトとショウジョウバエの両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。本研究は、ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「生殖機能」を指標として用いた継代的分析法として発展させ、有効な内分泌かく乱作用 *in vivo* 解析法として確立することを目指している。昨年度までに確立した、雌および雄の生殖機能評価法および多世代繁殖試験系を改良して、ビスフェノールAの影響について調べた。

A. 研究目的

環境ホルモン、内分泌かく乱物質としての環境化学物質の危険性(リスク)は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ここ数年、ヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般(ヒトの場合は48種類)の問題に拡張して考えられている。さらには、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧されるようになってきた。特に、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性の解析が緊要の課題と考えられるようになった。こうしたなか、最適な実験動物として継代が短時間で起こり、遺伝子研究が容易なショウジョウバエが有力であることが判明し、ショウジョウバエを用いた試験系の構築への期待が大きくなった。

本研究課題は、特に *in vivo* 生体系での内分泌かく乱作用の影響を評価する実際的な試験系の開発をめざすものである。これは女性ホルモン・エストロゲン受容体等の核内受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体法におけるホルモン活性に対応する最大抗体応答性 R_{max} (%) について、生物活

性の指標算定を目的とするものである。内分泌かく乱物質リスク評価において、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。しかも、継代的な評価が可能であることは重要な要素である。化学物質リスク研究における主任研究者の研究課題はホルモン作用を誘起するコンホメーション変化をセンシングする評価法であるが、レポーター遺伝子解析よりもより直接的な *in vivo* 解析が可能と考えられる本法は非常に有効な検証法になり得るため、是非に必要な試験法と思われる。

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としてはヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずか2週間程度で進むことであり、また、乾燥酵母などからなるエサの粉末を溶解凝固させたもので飼育するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常

として観察することが容易であることである。実地には、雌の産卵数および成虫の羽化数を計数するのみで、雌雄の生物体への直接的な生殖影響を観察・監修できる貴重な実験系である。こうした生体での試験には、並行して実施する試験管 (*in vitro*) での試験が必要である。したがって、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものである。「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系の開発は緊急な課題であり、本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立しようとするものであり、これまでにない新規な手法を提供するものである。本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

本年度は、これまでに確立したショウジョウバエ雌あるいは雄生体への影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系を改変し、ビスフェノール A の影響を、それぞれの交配数で雌の産卵数と羽化数で検討した。特に、今回は、この化学物質に孵化直後から幼虫時に暴露され食餌する場合と、成虫になってからはじめて開始する場合で影響がどのように異なるかを検討するため、幼虫時に暴露される系では、成虫以降の暴露による影響を排除する方法で実行した。

B. 研究方法

① ショウジョウバエの系統

通常研究に用いられているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の野生型には Oregon R と Canton S があるが、産卵数の評価には昨年までの実験結果から Canton S が適切であることが分かっていたので、本年度は Canton S を用いた。産卵数の計数・カウントにあたっては、プレート培地に産卵させ、ショウジョウバエを炭酸ガス麻酔で新しい培地に移動させたのちに、1 cm マス目のカウント用網目を被せて、実体顕微鏡下でカウンターを用いて実数を算定した (図 1)。産卵場所は均一でなく、ばらつきがあるために全産卵数を求めた。雄への影響を評価するためには、さらにそこから羽化してくるハエの数をカウントした。

飼育培地はこれまでと同様に作製した。水 10 に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火



図 1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雄の化学物質食餌投与試験における実験

で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 9.2 mm のシャーレに 24 ml 入れて冷蔵保存したのち、使用した。

② 幼虫時に化学物質に暴露される個体

各実験系に使用する個体は、産卵された日が一定であることが望ましいので、同じ日に羽化した個体を飼育瓶の通常培地とビスフェノール入り培地のそれぞれに産卵させ、培養し、その瓶から同日に羽化した個体を実験に使用した。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数

雌の産卵能を反映するためには、雄の個体数を過剰に与える必要がある。これまでの研究で、雌雄の個体数が同じ場合に雌の産卵能を反映させることがわかっていたが、本年度は、さらに、シャーレの限られたスペースでも過剰にならず、再現性のある交配数を求めた。昨年までに、雌雄を 10 匹として雌の産卵能を反映させることに成功していたが、ピーク時の産卵数がシャーレ中で過剰でなく、再現性がよい交配数を検討し、雌雄を各 5 匹、あるいは、4 匹で実験を行った。雄の生殖能力を反映する交配数としては、20:2 の組み合わせで、羽化数が雄の生殖能を反映することがこれまでの研究でわかっているので、幼虫時の影響評価については、通常培地で飼育された処女メスとビスフェノール入り培地で飼育された未交尾の成虫雄を 20:2 の交

配数で交配させ、産卵数をカウントした後、25°Cで飼育、羽化した成虫の数をカウントした。また成虫での影響評価については、通常培地で飼育した処女雌と未交尾の雄を20:2の交配数で、ビスフェノール入りシャーレ培地で産卵数に引き続き羽化数をカウントした。

④ ショウジョウバエ雌の産卵数への影響評価に用いる個体群

キイロショウジョウバエ Canton S の飼育試験において、食餌培地にビスフェノール A を加えてその影響を評価した。用いた培地で、ビスフェノール A の最終濃度が 10^{-5} mol/l、 10^{-6} mol/l、 10^{-7} mol/l になるように調整し、飼育培地を作製した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

成虫になってからの影響評価では、通常の培地で生育したものを、羽化後これらの化学物質の入ったシャーレ培地で交配させ、産卵数の経過を観察した。幼虫時に、ビスフェノール A を摂取したり、体表に暴露されたりした影響を評価する場合には、ビスフェノール A が最終濃度 10^{-5} mol/l になるように調整した培地にうみつけられた卵から孵化、成長し、羽化した処女雌を実験に使用した。

C. 研究結果

ビスフェノール A の雌成虫時の暴露による産卵能力への影響

雌の数に対して同数の雄を交配させるとその産卵数は雌の産卵能力を反映することがわかっている。ビスフェノール A の最終濃度が 10^{-5} mol/l、 10^{-6} mol/l、 10^{-7} mol/l になるように調整したシャーレ培地に雌:雄

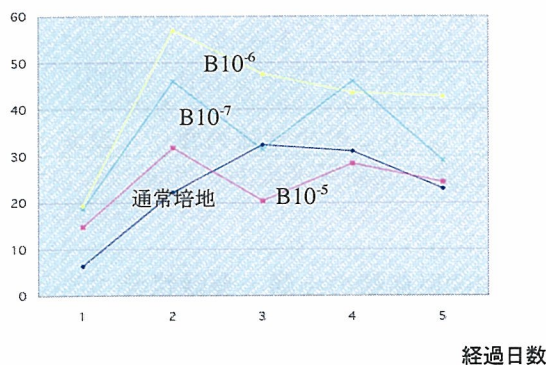


図2 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S ビスフェノール A 含有培

地における雌の産卵数変異

5:5で交配させ、産卵数をカウントした(図2)。ビスフェノール A を成虫になってから摂取すると産卵数の増加とともにピークが前進する傾向がみられた。その影響は最終濃度 10^{-6} mol/l で最大であった。

ビスフェノール A の雌幼虫時の暴露による産卵能力への影響

ビスフェノール A の幼虫時における暴露の影響を調べるため、3組の交配実験による比較を行った。交配に用いた個体群と使用培地の組み合わせは表に示す通りである。実験に用いた個体は、同じ個体群から同日に羽化した成虫をあらかじめ通常培地とビスフェノール A 10^{-5} mol/l 含有培地に産卵させ、孵化した幼虫を飼育し、同じ日に羽化した個体群から処女雌と未交尾の雄を選別し、雌:雄同数(各4匹/プレート)で交配させた。産卵数の経過は図3に示す通りであった。

	雌個体	雄個体	使用培地
A:control	通常雌	通常雄	通常培地
B:幼虫時暴露	幼虫時暴露雌	通常雄	通常培地
C:成虫時暴露	通常雌	通常雄	Bisphenol A 含有培地

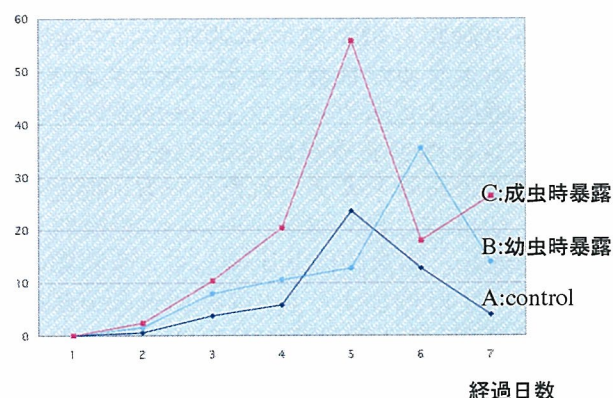


図3 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S の産卵数におよぼすビスフェノール A の影響

幼虫時あるいは成虫になってからビスフェノール A に暴露されたショウジョウバエ雌の産卵数は、いずれも産卵数の増加傾向が観察された。しかし、興味深いことに幼虫時に摂取暴露された雌では、産卵数のピークが遅れる傾向があった。

D. 考察

ショウジョウバエのゲノムプロジェクト

が完了して、その中でヒト・エストロゲン受容体と相同な遺伝子が確認され、*Drosophila* ERR (ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体) と呼ばれている。ショウジョウバエ ERR はヒト・エストロゲン受容体と非常に類似しており、ショウジョウバエにもエストロゲン受容体があると強く示唆される。現在は、この受容体のリガンドは明らかになっていないが、*in vivo* での内分泌かく乱作用の評価法を確立する意義は高い。ショウジョウバエは、約 10 日で卵から成虫になる。したがって、高等動物に比べると短い期間で何代もの経過を見ることが可能である。例えば、我々ヒトで 10 代の経過を見るのに約 200 年かかるのに比べ、ショウジョウバエは約 100 日で経過を見ることができる。このため、ショウジョウバエによる評価法を確立することは重要な意味があると考えられる。

今回、これまでに確立した評価法を駆使して、ビスフェノール A がショウジョウバエ雌の産卵数に及ぼす影響を、幼虫時と成虫時での影響にわけて観察することができた。成虫になってはじめてビスフェノール A を摂取した場合には、産卵数の増加とともに、ピークが前進する傾向が観察された。通常、ショウジョウバエは、成虫羽化後、3 から 5 日で産卵数のピークを迎える。こらは、卵細胞から最後の減数分裂を経て成熟卵として産卵するために必要な日数であると考えられるが、成虫時にはじめてビスフェノール A を摂取したショウジョウバエはこの速度が早まった結果であると考えられた。一方、孵化直後から幼虫時にビスフェノール A を摂取し続けた雌は、通常個体と比較して、産卵数の総数としては増加するものの、ピークが遅れる傾向にあった。卵母細胞から成熟卵への分化の速度が遅くなったのではないかと考えられた。本年度の研究では、総産卵数と卵の成熟にかかる日数に与えるビスフェノール A の影響を見ることができた。しかし、幼虫時に摂取する場合の影響については、最終濃度が 10^{-5} mol/l の場合についてのみ行うことができた。この濃度は、成虫での摂取の影響を調べた 3 段階の濃度のなかでは、もっとも影響が弱い条件であったので、今後はこれら各濃度についても検討する必要があると思われる。また、本研究の昨年までの結果から、何代にもわたって化学物質の暴露を受けた

場合、その影響が次第に強く現れることが観察されているので、ビスフェノール A の場合も、継代試験を実施する必要がある。

一方、雄への影響については、現在、幼虫時と成虫時での摂取の評価実験を実施中であるが、羽化数に関して、明確な解析ができていない。今後、例数を増やして、影響の有無について検討する予定である。

E. 結論

本研究により、ショウジョウバエ雌の産卵能力に及ぼすビスフェノール A の影響について検討した。野生型 Canton S は、産卵数羽化数にばらつきが少ないため、継代飼育による評価法に適している。雌：雄同数での交配は、雌の産卵能力を反映する。幼虫時にビスフェノール A を摂取あるいは体表に暴露されると、通常より産卵ピークが遅れ、成虫で初めて摂取すると、産卵ピークが早まる傾向があった。成虫での摂取には、ビスフェノールの濃度による違いが顕著であり、最終濃度が 10^{-6} mol/l でもっとも影響が強かった。いずれの場合も総産卵数は増加傾向にあった。今後の課題として、幼虫時に摂取暴露を受ける個体群について濃度の違いによる検討を行い、化学物質の濃度差による影響の違いを、個体群の総生殖能力で評価する方法の検討が必要である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報は無い。

G. 研究発表

第 9 回環境ホルモン学会研究発表会にて、研究成果の発表を行った。

下東美樹、海部匡慶、西絵利香、澤田隆行、徳永隆俊、劉曉輝、松島綾美、I. A. Meinertzhagen、下東康幸、ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体 (dERR) と環境ホルモンのリスク評価のためのショウジョウバエ *in vivo* 継代試験の確立、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., Shimohigashi, Y.	Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity	<i>Toxicol. Lett.</i>	195	95-105	2006
Okada, H., Tokunaga, T., Shirasu, N., Matsushima, M., Nose, T., Shimohigashi, Y.	α -helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change nuclear receptors	<i>Peptide Science</i> 2005	2005	291-294	2006
Tokunaga, T., Okada, H., Nose, T., Shimohigashi, Y.	Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor	<i>Peptide Science</i> 2005	2005	475-478	2006
Honda, T., Matsushima, A., Sumida, K., Chuman, Y., Sakaguchi, K., Onoue, H., Meinertzhagen, I.A., Shimohigashi, Y., Shimohigashi, M.	Structural isoforms of the circadian neuropeptide PDF expressed in the optic lobes of the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> : Immunocytochemical evidence from specific monoclonal antibodies	<i>J. Comp. Neurol.</i>	499	404-421	2006
Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., Nose, T., Shimohigashi, M., Shimohigashi, Y.	Conformation Change of α -Helix Peptide for Sensing of Deactivation of Nuclear Receptor: Immunoassay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -Helix 12 of Estrogen-related Receptor γ (ERR γ)	<i>Peptide Science</i> 2006	2006	176	2006
Okada, H., Shirasu, N., Shimohigashi, Y.	Functional analysis of F-domain peptides important for the basal constitutive activity of human nuclear receptor	<i>Peptide Science</i> 2006	2006	177	2006

研究成果の刊行物・別刷り



Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity

Sayaka Takayanagi, Takatoshi Tokunaga, Xiaohui Liu, Hiroyuki Okada, Ayami Matsushima, Yasuyuki Shimohigashi*

Laboratory of Structure–Function Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty and Graduate School of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 25 July 2006; received in revised form 25 August 2006; accepted 25 August 2006

Available online 3 September 2006

Abstract

Bisphenol A (BPA) has been acknowledged as an estrogenic chemical able to interact with human estrogen receptors (ER). Many lines of evidence reveal that BPA has an impact as an endocrine disruptor even at low doses. However, its binding to ER and hormonal activity is extremely weak, making the intrinsic significance of low dose effects obscure. We thus supposed that BPA might interact with nuclear receptor(s) other than ER. Here we show that BPA strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ), an orphan receptor and one of 48 human nuclear receptors. In a binding assay using [³H]4-hydroxytamoxifen (4-OHT) as a tracer, BPA exhibited a definite dose-dependent receptor binding curve with the IC₅₀ value of 13.1 nM. 4-Nonylphenol and diethylstilbestrol were considerably weaker (5–50-fold less than BPA). When examined in the reporter gene assay for ERR γ using HeLa cells, BPA completely preserved ERR γ 's high constitutive activity. Notably, BPA exhibited a distinct antagonist action to reverse the inverse agonist activity of 4-OHT, retaining high basal activity. ERR γ is expressed in a tissue-restricted manner, for example very strongly in the mammalian brain during development, and in the adult in the brain, lung and other tissues. It will now be important to evaluate whether BPA's hitherto reported low dose effects may be mediated through ERR γ .

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bisphenol A; Endocrine disruptor; Estrogen-related receptor γ ; Low dose effects; Nuclear receptors; Receptor binding

1. Introduction

Bisphenol A (BPA¹), 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, has a symmetrical chemical structure of HO-C₆H₄-C(CH₃)₂-C₆H₄-OH. BPA, with a worldwide production of approximately 3.2 million t per year, is used mainly in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. It has been long acknowledged to be an estrogenic chemical able to interact with human estrogen receptors (ER) (Dodds and Lawson, 1938; Krishnan et al., 1993; Olea et al., 1996), and recently to act as an antagonist for a human androgen receptor (AR) (Sohoni

Abbreviations: AR, androgen receptor; BPA, bisphenol A; DBD, DNA-binding domain; DCC, dextran-coated charcoal; DES, diethylstilbestrol; E1, estrone; E2, 17 β -estradiol; E3, estriol; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; ERR, estrogen-related receptor; ERRE, ERR-response element; ERR γ , estrogen-related receptor γ ; GR, glucocorticoid receptor; LBD, ligand-binding domain; NR, nuclear receptor; 4-OHT, 4-hydroxytamoxifen; PR, progesterone receptor

* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 2584; fax: +81 92 642 2584.

E-mail address: shimoscc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp (Y. Shimohigashi).

and Sumpster, 1998; Xu et al., 2005). Both ER and AR belong to the group III steroid hormone receptors, a subfamily of 48 human nuclear receptors (NRs) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Robinson-Rechavi et al., 2001).

Various so-called “low dose effects” of BPA have recently been reported *in vivo* for reproductive organ tissues and systems in mice and rats. For instance, very low dose levels of BPA were shown to have an increase in size and weight of the fetal mouse prostate (Nagel et al., 1997; Gupta, 2000), and a decrease in daily sperm production and fertility in male mice (Gupta, 2000; vom Saal et al., 1998). All of these low dose effects of BPA have been explained as the output effects of steroid hormone receptors (Welshons et al., 2003). It should be noted, however, that BPA’s binding to ER and AR and hormonal activity is extremely weak, 1000–10,000 times lower than for natural hormones, making the intrinsic significance of low dose effects intangible and obscure (National Toxicology Program, 2001; Safe et al., 2002; Gray et al., 2004; vom Saal and Hughes, 2005). This discrepancy on low dose effects prompted us to enquire whether BPA may interact with NRs other than ER and AR.

The estrogen-related receptors (ERRs) are a subfamily of orphan NRs closely related to ERs, ER α and ER β (Giguère, 2002; Horard and Vanacker, 2003). There are three ERR family members, ERR α , ERR β and ERR γ , with ERR γ the most recently identified third member (Eudy et al., 1998; Hong et al., 1999). ERRs and ERs show a considerable level of amino acid sequence similarity and identity in both their DNA-binding (DBD) and ligand-binding (LBD) domains. Although 17 β -estradiol (E2), a natural ligand of ERs, does not bind to any of the ERR family, ERRs can bind to functional estrogen response elements (EREs) in ER target genes, suggesting a possible overlap between ERR and ER action (Huppunen and Aarnisalo, 2004). ERRs also bind to ERR-response element (ERRE), but as monomers.

ERRs are all orphan receptors, while efforts to discover synthetic compounds that might modify the activities of the ERRs have identified only a few chemicals that suppress ERRs’ spontaneous transcriptional activities. For instance, diethylstilbestrol (DES) was found to repress the molecular activities of ERRs (Tremblay et al., 2001; Coward et al., 2001), although DES is considerably weaker in inhibiting ERR activities compared with its action as an ER-activator. 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) has also been identified as an inverse agonist of ERR γ , deactivating the receptor by decreasing the very high level of spontaneous constitutive activity (Coward et al., 2001). From evidence in a receptor binding assay in which [3 H]4-OHT was used as a tritium-labeled recep-

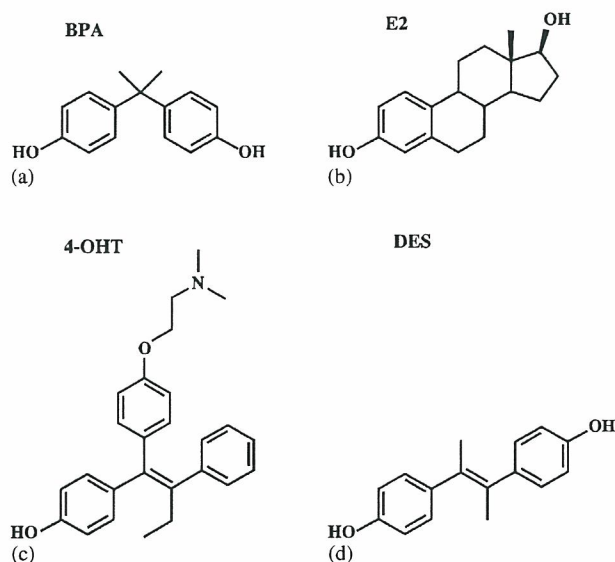


Fig. 1. Chemical structures of (a) bisphenol A (BPA), (b) 17 β -estradiol (E2), (c) 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), and (d) diethylstilbestrol (DES).

tor tracer (Coward et al., 2001), 4-OHT binds strongly to ERR γ . Collectively, these results reveal that E2, DES and 4-OHT all bind to ERs very strongly, but that their binding abilities to ERR γ vary.

When we compared the chemical structures of these ligands, it became clear that they share only the phenol group usually acknowledged as a key structural element for receptor recognition (Fig. 1). Since BPA in a compact minimum-energy conformation also shares this phenol group, we assumed that BPA is a potent binder to ERR γ . In the present study, we first established the competitive receptor-binding assay using [3 H]4-OHT as a tracer. The reported binding assay (Coward et al., 2001) utilized glutathione-coated beads to cargo GST-ERR γ -LBD, namely ERR γ -LBD fused to glutathione S-transferase (GST), for B/F separation of the tracer [3 H]4-OHT. Instead of expensive glutathione-coated beads, we used 1% dextran-coated charcoal (DCC) to absorb and remove receptor-free [3 H]4-OHT. This worked successfully, and we eventually could demonstrate that BPA binds strongly to ERR γ . This initial result has led us further to detailed examination of BPA in the reporter gene assay for ERR γ , and here we report that BPA retains extremely high ERR γ 's constitutive activity.

2. Materials and methods

2.1. Test compounds

Bisphenol A (BPA), CAS no. 80-05-7, purity 99%, Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan. 4-Hydroxytamoxifen

(4-OHT), CAS no. 68047-06-3, purity 98%, Sigma–Aldrich Inc., St. Louis, MO. Diethylstilbestrol (DES), CAS no. 56-53-1, purity 97%, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan. Nonylphenol, CAS no. 84852-15-3, Technical grade, Sigma–Aldrich. Estrone (E1), CAS no. 53-16-7, 98%, Wako. 17 β -estradiol (E2), CAS no. 50-28-2, 98.9%, Research Biochemicals International, Natick, MA. Estriol (E3), CAS no. 50-27-1, 98%, Wako. Dihydrotestosterone (DHT), CAS no. 58-22-0, 97%, Wako. Testosterone, CAS no. 521-18-6, 95%, Wako. Cortisone, CAS no. 53-06-5, \geq 98%, Sigma–Aldrich. Progesterone, CAS no. 57-83-0, \geq 99%, Sigma–Aldrich.

2.2. Preparation of receptor protein GST-fused ERR γ -LBD

ERR γ -LBD was amplified from a human kidney cDNA library (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) by PCR using gene-specific primers and cloned into pGEX6P-1 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). GST-fused receptor protein expressed in *E. coli* BL21 α was purified on an affinity column of Glutathione-Sepharose 4B to obtain GST-ERR γ -LBD.

2.3. Radio-ligand binding assays for saturation binding

Saturation binding assay was conducted essentially as reported (Nakai et al., 1999) at 4°C using [³H]4-OHT (3.15 TBq/mmol as methiodide, America Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO) and GST-ERR γ -LBD (1 μ g) with or without 4-OHT (10 μ M final concentration). Free radio-ligand was removed by centrifugation or filtration after incubation with 1% dextran-coated charcoal (Sigma). Specific binding of [³H]4-OHT was calculated by subtracting the non-specific binding from the total binding.

2.4. Radio-ligand binding assays for competitive binding

BPA and other chemicals were dissolved in 0.3% DMSO in 0.2% γ -globulins (a blocker of non-specific adsorption to the reaction vessels). These chemicals were examined for their ability to inhibit the binding of [³H]4-OHT (5 nM in final) to GST-ERR γ -LBD (26 ng). Reaction mixtures were incubated overnight at 4°C and free radio-ligand was removed with 1% dextran-coated charcoal by either centrifugation or filtration. The IC₅₀ values were calculated from the dose–response curves assessed by the non-linear analysis program ALLFIT (De Lean et al., 1978). Each assay was performed in duplicate and repeated at least five times. For other nuclear receptors, the binding assays were carried out essentially as outlined above by using a combination of specific radio-ligands and receptor preparations: [³H]E2 (5.74 TBq/mmol, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) for ER α (prepared by us as GST-fused ER α -LBD protein) and ER β (Invitrogen, Carlsbad, CA), [³H]DHT (4.48 TBq/mmol, Amersham Biosciences) for AR (Invitro-

gen), [³H]cortisol (2.90 TBq/mmol, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Wellesley, MA) for GR (Invitrogen), and [³H]progesterone (3.48 TBq/mmol, Amersham Biosciences) for PR (Invitrogen).

2.5. Luciferase reporter gene assay

Full-length ERR γ cDNA was amplified by nested PCR using gene-specific primers and cloned into pcDNA3 (Invitrogen) at the *Eco*RI and *Xho*I sites. To generate the ERR response element (ERRE)-luciferase construct, oligonucleotides (5'-CCGGACCTCAAGGTCACGTTCCGGACCTCAAGGTCACGTTCCGGACCTCAAGGTCAGGATCCA-3'), and (5'-GATCTGGATCCCTGACCTTGAGGTCCGAACGTGACCTTGAGAACGTGACCTTGAGGTCCGGGTAC-3') were annealed and ligated into (*Bgl*II, *Kpn*I)-digested pGL3-Luc (Promega, Madison, WI) to generate three copies of ERRE. Both the ERR expression (pcDNA3/ERR, 1 μ g) and luciferase reporter (pGL3/3 \times ERRE, 3 μ g) plasmid were transiently transfected in HeLa cells with 10 μ l/ml of Plus Reagent (Invitrogen) and 15 μ l/ml of Lipofectamine (Invitrogen), which was exposed to various concentrations of test chemicals to detect agonist/antagonist activity. Luciferase assay reagent (Promega) with the cell culture lysis reagent and the substrate solution was used to measure the luciferase enzyme activity on a microplate reader (Wallac 1420 ARVosx, Perkin-Elmer, Turku, Finland). Each assay was performed in triplicate and repeated at least five times.

3. Results

3.1. Saturation binding [³H]4-OHT to ERR γ

For the present study, we first attempted to establish a routine radio-labeled receptor binding assay. As mentioned earlier, instead of expensive glutathione-coated beads carrying GST-ERR γ -LBD (Coward et al., 2001), we utilized 1% dextran-coated charcoal (DCC) to absorb and remove receptor-free [³H]4-OHT. We used this B/F separation method successfully for [³H]E2 and the estrogen receptor (Nakai et al., 1999). In the present study, B/F separation of the tracer [³H]4-OHT also worked successfully and effectively with 1% DCC. As shown in Fig. 2a, specific binding of [³H]4-OHT to ERR γ was estimated to be approximately 75%, which is about twice larger than reported value (Coward et al., 2001). It should be noted that non-specific binding of [³H]4-OHT is significantly low as compared with the procedure to use glutathione-coated beads.

A Scatchard plot analysis (Fig. 2b) showed a single binding mode with a binding affinity constant (K_d) of 10.0 nM and a receptor density (B_{max}) of 6.32 nmol/mg. These data are almost compatible with those reported for the glutathione-coated bead assay.

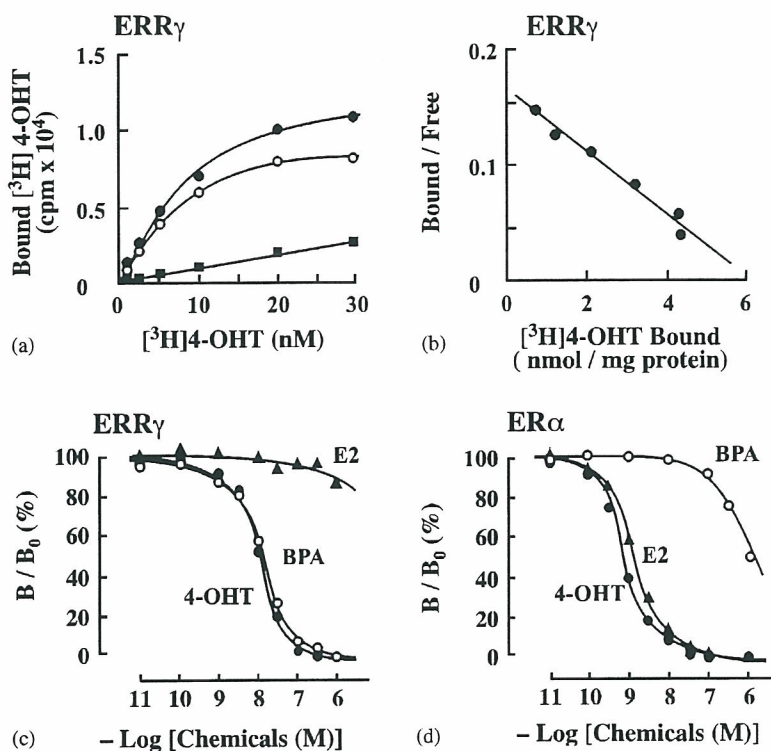


Fig. 2. Radio-ligand receptor binding assays of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), bisphenol A (BPA) and 17 β -estradiol (E2) for ERR γ and ER α . (a) Saturation binding curve of [3 H]4-OHT for the recombinant human ERR γ . The graph shows total (\bullet), specific (\circ) and non-specific (\blacksquare) bindings. Determination of non-specific binding was carried out by excess unlabeled 4-OHT (10 μ M). (b) Scatchard plot analysis showing a single binding mode with a binding affinity constant (K_d) of 10.0 nM and receptor density (B_{max}) of 6.32 nmol/mg. (c) Concentration-dependent curves of BPA (\circ), 4-OHT (\bullet) and E2 (\blacktriangle) in the receptor competitive binding assay to measure the ability of the compounds to displace [3 H]4-OHT in ERR γ , and (d) [3 H]E2 in the recombinant human estrogen receptor ER α . The graphs show representative dose-dependent binding curves, which give the IC $_{50}$ value closest to the mean IC $_{50}$ from at least five independent assays. IC $_{50}$ values showed a between-experiment coefficient of variation of 5–12%.

3.2. Binding ability of BPA and other chemicals to ERR γ

In the competitive receptor binding assay for ERR γ (10 μ g/ml), 4-OHT displaced [3 H]4-OHT (2.5 nM in final) in a clear dose-dependent manner (Fig. 2c). The ability of 4-OHT was calculated with an IC $_{50}$ value of 10.3 nM, while DES exhibited IC $_{50}$ = 54.3 nM (Table 1). Surprisingly, in the assay to screen a series of candidate compounds of endocrine disruptors, BPA was found to displace [3 H]4-OHT very strongly with an IC $_{50}$ value of 13.1 nM. As shown in Fig. 2c, BPA exhibited a distinct dose-dependent sigmoidal binding curve. BPA and 4-OHT bind to ERR γ equally strongly.

This unexpected result was confirmed repeatedly and substantiated by two independent assay systems. In the first, each competition reaction of a dilution series was carried out in a micro-tube, and the following B/F separation with 1% DCC was performed by centrifugation for all micro-tubes. Alternatively, in a second assay system, dilutions were delivered into the wells of a

96-well polypropylene plate. In this method DCC mixtures were transferred to the 96-well plate with a PVDF membrane filter (0.45 μ m pore size) for direct vacuum filtration using a specific system (Millipore). In both

Table 1

The receptor binding affinity of natural hormones and chemicals for the estrogen-related receptor γ , ERR γ

Natural hormones and chemicals	Binding affinity (IC $_{50}$, nM)
Bisphenol A (BPA)	13.1 \pm 2.34
4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	10.3 \pm 0.80
Diethylstilbestrol (DES)	54.3 \pm 3.14
4-Nonylphenol	194 \pm 30.0
Estrone (E1)	549 \pm 0.81
17 β -Estradiol (E2)	NB ^a
Estriol (E3)	NB
Dihydrotestosterone (DHT)	NB
Testosterone	NB
Cortisone	NB
Progesterone	NB

^a NB means "not bound", indicating no significant receptor binding at its 10 μ M concentration.

assay systems it was eventually demonstrated that BPA is highly potent binder to ERR γ . Two more individuals further validated these results in a carefully followed protocol.

Another representative endocrine disrupter candidate 4-nonylphenol was also examined for its specific binding to ERR γ . It was moderately active, with IC₅₀ = 194 nM (Table 1), about 15 times less potent than BPA. The natural estrogens, E2 and estriol (E3) were by contrast inactive, showing no binding affinity up to a concentration of 10 μ M (Fig. 2c). Only estrone (E1) was weakly active (549 nM). All other natural ligands of steroid hormone receptors were inactive (Table 1). These included dihydrotestosterone and testosterone for AR, cortisone for the glucocorticoid receptor (GR), and progesterone for the progesterone receptor (PR). Almost no binding was detected up to a concentration of 10 μ M.

3.3. Receptor binding specificity and selectivity of BPA and other chemicals

We next examined BPA for its ability to bind to other group III nuclear receptors, particularly the steroid hormone receptors ER α , ER β , AR, GR, and PR. Table 2 summarizes the binding affinities of E2, 4-OHT and BPA to illustrate their receptor specificity and selectivity. When compared with BPA and 4-OHT, which are almost equally potent binders to ERR γ , these additional candidates were almost completely inactive for AR, GR, and PR. For ER α and ER β , 4-OHT is highly potent as reported previously by others, with an IC₅₀ value of approximately 1 nM (Kuiper et al., 1998; Fang et al., 2001). In contrast, BPA is very weak for ER α (IC₅₀ = 1040 nM) and ER β (1320 nM). Collectively, BPA is as potent as 4-OHT for ERR γ , but much less potent than 4-OHT for both estrogen receptors ER α and ER β (Table 2, Fig. 3).

The reason for this discrepancy in receptor selectivity between BPA and 4-OHT probably results from differences in their three-dimensional structures. The lowest-energy conformations of the two compounds differ considerably from each other. Thus, although BPA and 4-OHT are almost equally potent as ERR γ ligands, these data strongly suggest that they occupy different ligand binding subsites of the ERR γ .

3.4. Different effects of BPA and 4-OHT on ERR γ constitutive activity in the reporter gene assay

We next examined the reporter gene activity of BPA in HeLa cells transiently co-transfected with an ERR γ expression plasmid and an ERRE-luciferase reporter plasmid. ERR γ exhibited significantly elevated constitutive activity to yield a reporter enzyme luciferase. Detailed assay results are shown in Fig. 3. Comparing ERR γ with ER α , the constitutive activity levels were considerably different, the basal activity of ERR γ being about 25 times larger than that of ER α (Fig. 3a and b). 4-OHT is definitely an antagonist of ER α as shown Fig. 3a; 10 μ M 4-OHT completely suppressed the full agonist activity of 10 nM E2. By contrast, 4-OHT deactivated ERR γ , as reported (Coward et al., 2001), diminishing the basal activity of ERR γ up to 70% at a concentration of 10 μ M (Fig. 3b). This suppression effect of 4-OHT on the constitutive activity of ERR γ has been acknowledged as an inverse agonist activity.

BPA, on the other hand, showed no effect on the basal constitutive activity of ERR γ even at its concentration of 10 μ M (Fig. 3b), completely preserving ERR γ 's high constitutive activity. This BPA action was clearly confirmed in the assay in which 4-OHT exhibited a distinct dose-dependent activity as an inverse agonist (Fig. 3c). It seemed that BPA has no effect on ERR γ , exhibiting neither enhanced agonist activity nor inverse agonist

Table 2
The receptor binding affinities of 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, and bisphenol A to various steroid hormone receptors

Steroid hormone receptors (³ H-labeled ligand used)	Receptor binding affinities shown by IC ₅₀ (nM)		
	E2	4-OHT	BPA
ERR γ ([³ H]4-OHT)	NB ^a	10.3 \pm 0.80	13.1 \pm 2.34
ER α ([³ H]E2)	0.98 \pm 0.15	0.55 \pm 0.11	1040 \pm 180
ER β ([³ H]E2)	1.27 \pm 0.31	0.88 \pm 0.14	1320 \pm 287
AR ([³ H]DHT)	248 \pm 52	NB	NB
GR ^b ([³ H]cortisol)	465 \pm 125	1130 \pm 24	ND ^c
PR ^b ([³ H]progesterone)	527 \pm 128	ND	NB

^a NB means "not bound", indicating no significant binding up to a concentration of 10 μ M.

^b Standard compounds for these receptors were also evaluated, and those include: dihydrotestosterone for AR, 1.76 \pm 0.03 nM; dexamthazone for GR, 0.80 \pm 0.11 nM; and progesterone for PR, 2.26 \pm 0.33 nM. For abbreviations, see the text.

^c ND means "not determined", indicating that the inhibitory constant IC₅₀ cannot be calculated up to a concentration of 10 μ M owing to its extremely weak binding activity.

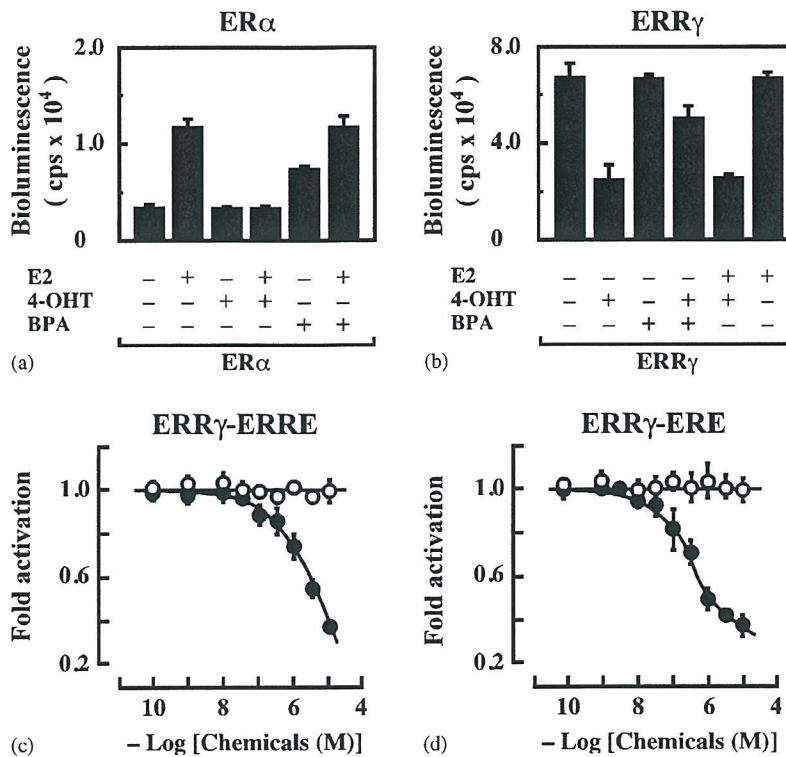


Fig. 3. Luciferase-reporter gene assays of 17 β -estradiol (E2), 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) and bisphenol A (BPA) for ER α and ERR γ . Comparison of constitutive activities of ER α and ERR γ in the same cell preparations (1.0×10^5 HeLa cells/well) with the luciferase-reporter plasmid (pGL3/3 \times ERRE or ERE). (a) For ER α , activities by a single or combination exposure to compounds, for which 10 nM E2, 10 μ M 4-OHT and 10 μ M BPA are shown. These include the control basal constitutive activity (E2, 4-OHT, BPA; ---), agonist activity of 10 nM E2 (+---) and its inhibitory action on 10 μ M 4-OHT (++++). No reaction is elicited by 4-OHT alone (---), while very weak agonist activity is elicited by 10 μ M BPA (---+). At the saturated condition with 10 nM E2, 10 μ M BPA showed no effect (++++). (b) For ERR γ , the compounds used are 10 μ M E2, 10 μ M 4-OHT and 10 μ M BPA. Control basal constitutive activity (---) of ERR γ is 20–30 times larger than that of ER α (in Fig. 3a). This high constitutive activity is sharply reversed by 10 μ M 4-OHT (---), while 10 μ M BPA (---+) shows no effect on basal constitutive activity. On the other hand, 10 μ M BPA reversed almost 80% of the inverse agonist activity of 10 μ M 4-OHT (---). No such suppression activity was shown by 10 μ M E2 (++++). E2 itself (---) exhibited no reaction on ERR γ . (c and d) Concentration-dependent responses of BPA (○) and 4-OHT (●) in the luciferase-reporter gene assay measure the ability of these two compounds to either activate or deactivate the constitutive activity of ERR γ . Reporter plasmids used were pGL3 ERRE for (c) and ERE for (d).

activity, whereas at ER α , it showed extremely weak agonist activity (Fig. 3a).

When an ERE-luciferase reporter plasmid was used in place of a plasmid with ERRE element, BPA exhibited exactly the same activity profile as shown in Fig. 3c, totally retaining ERR γ 's high basal activity (Fig. 3d). In contrast, 4-OHT exhibited definitely enhanced inverse agonist activity in this assay (IC_{50} = ca. 0.5 μ M, about 20 times enhanced as compared to that in the assay with ERR γ -ERRE) (Fig. 3c and d). However, it is very puzzling why 4-OHT has such a strong binding affinity for ERR γ *in vitro* (10 nM IC_{50}) but has such a low potency in the transient transfection assays (IC_{50} in the range of around micromolar concentration). This problem has been extensively discussed by Coward et al. (2001). The activity change observed by the replacement of receptor response elements strongly suggests

that the cell-based assays are not still optimized for ERR γ .

3.5. Inhibitory effect of BPA on the inverse agonist activity of 4-OHT

Since BPA strongly binds to the ERR γ receptor (Fig. 2c), our results from the reporter gene assay suggest that BPA simply occupies the ligand binding site of ERR γ , causing it to retain its basal constitutive activity. We thus assumed that BPA would inhibit the binding of 4-OHT. To examine this possibility, we first examined the inhibitory activity of BPA against the deactivating activity of 4-OHT. As shown in Fig. 4a, 4-OHT's inverse activity was clearly suppressed in the presence of either 1 μ M or 10 μ M BPA. Thus, 10 μ M BPA strongly inhibited the 4-OHT activities, reversing them by about 85% at

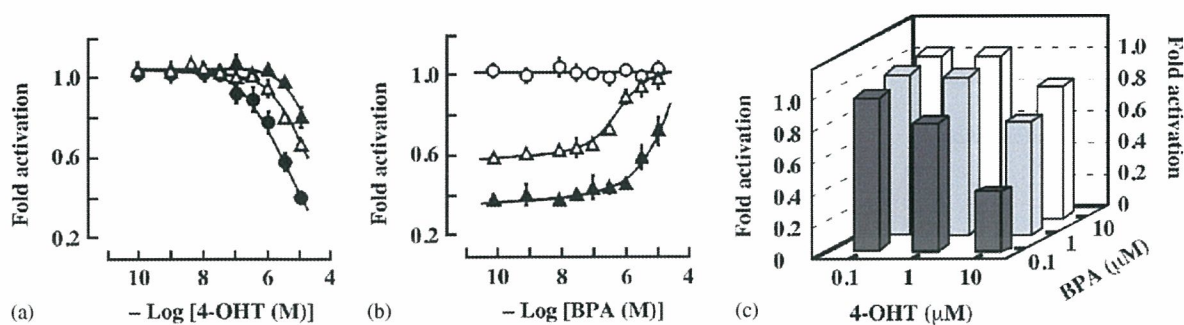


Fig. 4. Effect of bisphenol A (BPA) on the inverse agonist activity of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) in luciferase-reporter gene assays for $ERR\gamma$. The basal constitutive activity of $ERR\gamma$ was evaluated in a cell preparation (1.0×10^5 HeLa cells/well) with the luciferase-reporter plasmid (pGL3/3 \times ERRE). (a) Concentration-dependent luciferase-reporter activities of 4-OHT are shown by fold activation in the absence and presence of BPA. 1 μ M (Δ) and 10 μ M (\blacktriangle) BPA clearly reverse the inverse activity of solo 4-OHT (\bullet) against the constitutive activity of $ERR\gamma$. (b) Concentration-dependent effect of BPA on the inverse agonist activity of 4-OHT. The inverse agonist activities of 1 μ M (Δ) and 10 μ M (\blacktriangle) 4-OHT were clearly reversed by BPA in a dose-dependent manner. BPA itself (\circ) sustained high constitutive activity of $ERR\gamma$ at the concentration range tested. (c) Three-dimensional illustration of the interrelationships between 4-OHT's inverse agonist activity and its suppression activity by BPA in the luciferase-reporter gene assay for $ERR\gamma$. The opposing actions of BPA and 4-OHT are dependent upon their concentrations.

each test concentration of 4-OHT. 1 μ M BPA was found to reverse by about 65% (Fig. 4a).

As shown in Fig. 4b, BPA completely reversed the inverse activity (about 40% to $ERR\gamma$'s constitutive activity) of 1 μ M 4-OHT in a dose-dependent manner up to a concentration of 10 μ M. Against 10 μ M 4-OHT, BPA also exhibited a clear ability to reverse its inverse activity. These relationships are shown as a three-dimensional plot, expressing the opposing effectiveness of BPA and 4-OHT on the basal constitutive activity of $ERR\gamma$ (Fig. 4c): 4-OHT is an inverse agonist, whereas BPA is its antagonist. All these results clearly demonstrate that BPA binds to $ERR\gamma$ to preserve its native constitutive activity. When the ERE-luciferase reporter plasmid was used instead of the ERRE-luciferase reporter plasmid, similar results were also obtained for a series of reporter gene assays.

4. Discussion

$ERR\gamma$, unlike $ER\alpha$, shows extremely high constitutive activity in the reporter gene assay (Fig. 3b). At present, neither the target gene of $ERR\gamma$'s constitutive transcriptional activity, nor its natural ligand are known. If $ERR\gamma$ were to possess an agonistic natural ligand, 4-OHT could act as an antagonist of that natural ligand, and BPA as an antagonist. If the endogenous ligand were to function as a natural inverse agonist, 4-OHT would be interpretable as an analogue of such an agonist. In that case, BPA might also act as an antagonist of such a putative natural inverse agonist ligand. However, as suggested by its very high constitutive activity, if $ERR\gamma$ were an orphan receptor lacking an identified natural ligand, what then is the significance of BPA's action on this

orphan receptor? 4-OHT is simply an inverse agonist that deactivates $ERR\gamma$'s high transcriptional activity.

The ligand-binding domain (LBD) of $ERR\gamma$ contains a conserved coactivator-binding surface that interacts with coactivators (Darimont et al., 1998), but only when the bound-agonist form positions the activation function (AF)-2 helix, namely helix 12 of the receptor, to bind the coactivator. The LBD structure of $ERR\gamma$ has now been solved (Greschik et al., 2002), and as expected from its very high constitutive activity, helix 12 is folded in this active conformation. Most recently, Greschik et al. (2004) reported the three-dimensional structure of the 4-OHT/ $ERR\gamma$ -LBD complex, in which helix 12 is widely separated from the position in the active conformation. This repositioning of helix 12 by 4-OHT deactivates $ERR\gamma$ because the receptor becomes unable to recruit coactivator proteins at the appropriate position.

It is important that $ERR\gamma$ -LBD comprises a well-formed pocket (Greschik et al., 2002). Unlike 4-OHT, BPA is apparently allowed to bind to this pocket without changing the positioning of helix 12. Maintaining helix 12 in an active conformation would then result in preservation of high receptor constitutive activity. Thus, BPA acts just as a space filler with no detectable influence on the $ERR\gamma$ receptor conformation, and preventing 4-OHT from inserting into the pocket. This BPA binding might influence, for example, the rate of turnover or metabolism of $ERR\gamma$, perhaps resulting in prolonged transcriptional activities. As described above, BPA would be its antagonist if an endogenous ligand were to act as a natural inverse agonist. Since it is unlikely that $ERR\gamma$ has an endogenous agonist ligand (Greschik et al., 2002), BPA might act as an "agonist"

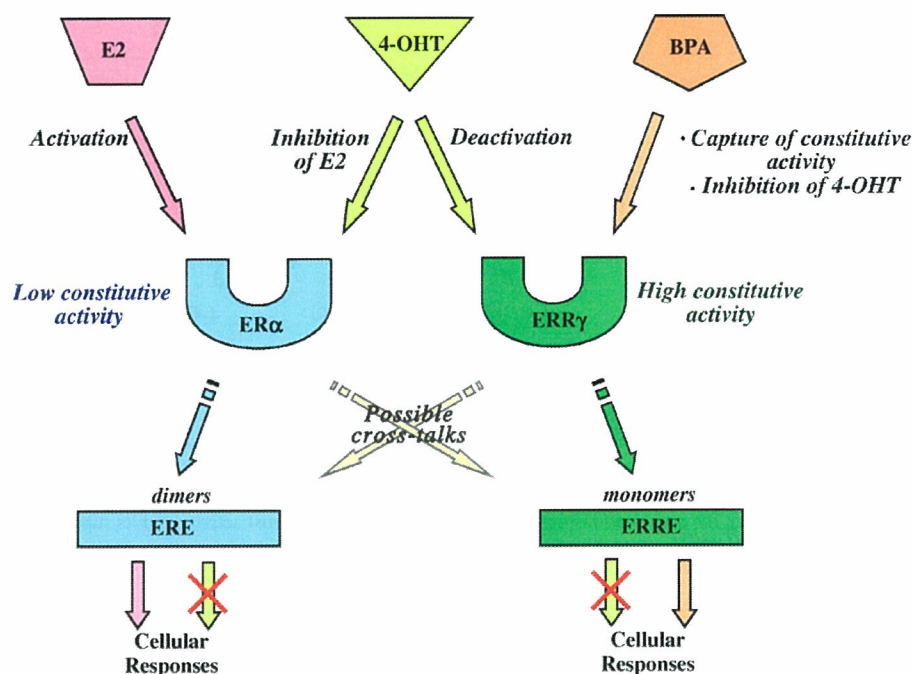


Fig. 5. Schematic flow diagram of cell-specific responses originated by binding of chemicals to nuclear receptors followed by their specific activities against the target genes. ER α 's natural ligand E2 and synthetic chemical 4-OHT both bind to ER α , and the resulting ER α dimer binds the ERE-containing target genes to activate it with a coactivator. BPA and 4-OHT both bind to the ERR γ monomer, which in turn binds the ERRE-containing target genes. The ER α dimer may interact with ERRE-containing genes, and the ERR γ monomer would bind to ERE-containing genes as either a homodimer or heterodimer, for example with ER α .

that works to retain or lock the ERR γ 's high transcriptional activity, keeping hold of the helix 12 in an active conformation.

Based on these consequences and including the present results, Fig. 5 depicts putative interrelationships between these exogenous chemical ligands and their receptors together with the corresponding target genes. Both E2 and 4-OHT bind to ER α , inducing different interactions with the ERE-containing genes. Both 4-OHT and BPA also bind to ERR γ , eliciting a different set of interactions with the ERRE-containing genes. As a result, 4-OHT may bind to both ER α and ERR γ , although the corresponding 4-OHT-ERR γ and 4-OHT-ER α complexes do not stimulate the transcription of genes. In contrast to this non-selective action of 4-OHT, BPA interacts mainly with ERR γ , and the resulting BPA-ERR γ complex interacts with the ERRE DNA binding element and activates the transcription of genes. This activation is not stimulated more than ERR γ 's basal constitutive activity. The BPA-ERR γ complex can also interact with the ERE DNA binding element as a dimer. Given that BPA-ERR γ binds DNA together with E2-ER α via ERE, the resulting heterodimers would interfere or cooperate with each other to regulate the overall estrogenic response in a given cell type. Such potential functional

cross-talk between the ERR γ and ER α systems might explain some of BPA's "estrogenic" activities.

Receptor selectivity and specificity of the compounds are both strongly related to the structure of the compounds, especially to their three-dimensional structure. It is clear that the structures of BPA, E2 and 4-OHT share simply the phenol group that is generally known as a key structure for receptor recognition (Fig. 1). When we compared structural features other than the phenol group, it became clear that these compounds possess subtle structural differences in phenol benzene-hydrogen (H) substitutions. In each of the structures, both the *ortho* positions and at least one *meta* position of the phenolic-hydroxy group are unhindered, beyond the minimal substitution of benzene-H atoms. The *para* positions, on the other hand, are blocked or crowded with bulky substitutions that do not share shape, lipophilicity or hydrogen bonding positioning. E2 would be planar, while BPA is not in a planar configuration because of the presence of the sp³ carbon atom at the *para* position. These features suggest that the receptor fit is likely to arise primarily from the phenolic function, with minimal interference from substitutions at the *ortho* and at least one *meta* position. Thus, substitutes at the *meta* and *para* positions appear to affect the receptor selectivity between

ER α and ERR γ . More detailed structural consideration will need to be made, perhaps with exploration of the 3D-structure of the BPA–ERR γ complex, and such a structural analysis is under way in our laboratory.

The pattern of human ERR γ expression is significant. For example, it expresses during the development and differentiation of the fetal brain at very high levels in a tissue-restricted manner (Hong et al., 1999; Heard et al., 2000; Lorke et al., 2000). Although the function of ERR γ is not yet clarified, various low dose effects of BPA have recently been reported *in vivo* for reproductive organ tissues and systems in mice and rats as mentioned earlier (Nagel et al., 1997; vom Saal et al., 1998; Gupta, 2000; Welshons et al., 2003). In addition, Markey et al. (2001) have shown that *in utero* exposure to low doses of BPA alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. There is also evidence for low dose effects of BPA on sexual differentiation of the brain and behavior in rats (Kubo et al., 2003). Kawai et al. (2003) have recently reported that male mice exposed to BPA during fetal development show a high aggression score at 8 weeks of age. This change in aggressive behavior was seen in male offspring of pregnant females fed BPA at 2 ng/g or 20 ng/g weight, both within the range of current human exposure. Palanza et al. (2002) also noted alterations in maternal behavior in mice exposed to a low dose of BPA during fetal life or in adulthood. Many other low dose effects of BPA have been reported extensively in recent years, including the advanced onset of female puberty (Howdeshell et al., 1999) and insulin resistance (Alonso-Magdalena et al., 2006) (see review article (vom Saal and Hughes, 2005) for others).

By contrast, studies that deny such lowdose effects of BPA have also been repeatedly reported (Ashby et al., 1999; Cagen et al., 1999), and thus the issue of low dose effects has become controversial (Kaiser, 2000). There is also a hypothesis that some estrogenic compounds can be stored in lipid-rich body tissues so that the toxins accumulate over time and eventually reach concentrations that can activate ER. These are to be reviewed also for ERR γ and/or other nuclear receptors, but in case such a bioaccumulation may facilitate greatly the specific interaction of chemicals, for example, of BPA with ERR γ .

It is noteworthy that the IC₅₀ value (13.1 nM) of BPA in the receptor binding assay for ERR γ corresponds to about 3.0 ppb, 1/1000 the concentration (3 mg/kg, or 3 ppm) specifically established as the limit for food. In this climate of uncertainty, it seems essential to evaluate what is a physiological significance of BPA's binding to ERR γ and whether ERR γ may be involved in the low dose effects of BPA.

Among a series of steroid hormone receptors including ERs (ER α and ER β), AR, GR and PR, BPA was found to be highly selective and specific for ERR γ (Table 2). Its receptor selectivity for ERR γ versus ERs is estimated to be approximately 80–100-fold. Although we initially assumed that BPA might interact with nuclear receptor(s) other than ER, BPA's high receptor selectivity together with its high specificity was quite unexpected. In the present study, we succeeded in establishing a receptor binding assay system for ERR γ . However, to attain specific binding against ERR γ was extremely difficult even with [³H]4-OHT, probably because 4-OHT is not a natural ligand of ERR γ . This is also true for ERR α and ERR β , and in particular no binding of [³H]4-OHT was reported for ERR α (Coward et al., 2001). It should be also noted that BPA elicits a unique combination of reactions in the reporter gene assay, an unchanged high transcriptional activity and suppression of 4-OHT's inverse agonist activity, as we show in the present study.

Notwithstanding the difficulties in our assay, it is now crucial to expand the risk assessment of endocrine disruptor candidate compounds to all nuclear receptors, and more importantly to evaluate whether BPA's previously reported low dose effects are mediated through ERR γ and its specific target genes. Also, what is a physiological significance of BPA's binding to ERR γ is critically important issue. Although we could not provide any evidences for this query in the present study, the binding of BPA to ERR γ has potential and intrinsic importance. To evaluate its physiological relevance may require the examinations to test the abnormality and/or disorder of ERR γ 's ordinary but unknown functions by means of sophisticated and well-designed assays. We are going to perform such examination and corroboration due to their fundamental importance on human and animal health.

Acknowledgements

We thank Prof. Ian A. Meinertzhagen, Dalhousie University, Canada, for reading the manuscript. This study was supported by Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Risk of Chemical Substances from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan to YS. This work was also supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture in Japan to YS.

References

- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A., 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic