

ているビスフェノールAなどの一連の化合物については、TR に活性なものは無かった。

E. 結論

甲状腺ホルモン受容体 TR についてポリクローナル抗体よりも感度が良いモノクローナル抗体の調製に成功し、センシング抗体法の確立に成功した。ポリクローナル抗体を用いたセンシング抗体法での結果よりもはるかに優れ、受容体結合試験での結果に近い受容体応答性 (EC₅₀ 値) を示す試験系として構築することができた。

一方、他の多くの核内受容体については、抗原認識のクローンは得られるが、コンホメーション変化を識別するものは得られなかった。細胞融合法を用いたモノクローナル抗体の作製は時間と労力を必要とし、目的のものを直ちに得ることは非常に困難である。今後は、① アッセイの高精度を必要とする場合、② コンホメーション自体を認識する必要のある場合、③ ファージディスプレイ法で抗体が調製しがたい場合に細胞融合法によりモノクローナル抗体作製を進めるとしたい。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. Structural Characteristics of Drosophila Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Nonpeptide Ligands. X.H. Liu, A. Matsushima, N. Shirasu, Y. Tominaga, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi, and T. Nose: *Peptide Science* 2004, 303-304 (2005).

2. Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor. O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 333-334 (2005).

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

Letters, 176, 95-105 (2006).

4. 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. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2006, 176 (2006).

5. Receptor binding characteristics of the endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor- γ . Chief and corroborative hydrogen bonds of the bisphenol A phenol-hydroxyl group with Arg316 and Glu275 residues. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, and Y. Shimohigashi: *FEBS J.*, 274, 6340-51 (2007).

6. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor- γ . H. Okada, T. Tokunaga, X. Liu, S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Environmental Health Perspectives*, 116, 32-38 (2008).

7. The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family. M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 491-492 (2008).

学会発表

1. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、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 曉輝、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 曉輝、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 曉輝、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 曉輝、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 曉輝、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。
7. 岡田浩幸、徳永隆俊、高柳明香、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型と環境ホルモンビスフェノールAの構造活性相関研究、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007. 5. 19。
8. 高柳明香、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールAはエストロゲン受容体 (ER) よりエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に強く結合する、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007. 5. 19。
9. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法によるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) への化学物質の影響評価、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007. 5. 19。
10. 劉 曉輝、徳永隆俊、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、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のエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) 結合部位の同定、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007. 5. 19。
11. 徳永隆俊、自発活性化型エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) におけるコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法の開発、第7回泉屋コロキウム、2007。
12. 錦織充広、野瀬 健、劉 曉輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイン酸関連オーファン受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体、第44回ペプチド討論会、2007. 11. 7-9。
13. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、アルキルフェノール類とエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の結合における構造活性相関解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。
14. 下東美樹、堤 俊博、劉 曉輝、徳永隆俊、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、環

境ホルモン・ビスフェノールAのショウジョウバエ *in vivo* 継代試験、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。

15. 下東康幸、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、ビスフェノールAはステロイドホルモン核内受容体9種うちERR γ にのみ結合する、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。
16. 武田行正、劉 曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールAの低用量効果が疑われるヒト生殖組織および脳におけるエストロゲン関連受容体ERR γ の発現解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。
17. 徳永隆俊、野瀬 健、劉 曉輝、岡田浩幸、岩崎 茜、金森史花、磯野裕章、錦織充広、松島綾美、下東美樹、下東康幸、化学物質の内分泌かく乱作用評価のためのコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法：ヒト核内受容体全48種への展開、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。
18. 野瀬 健、徳永隆俊、錦織充広、下東康幸、女性ホルモン受容体 ER α に対するアルキルフェノール類の結合性の予測、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。
19. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、徳永隆俊、下東康幸、ERR γ へのビスフェノールA結合における Arg316 および Glu275 との水素結合機構、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。
20. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、高柳明日香、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型とBPA誘導体間の構造活性相関、第80回日本生化学会、2007. 12. 11-15。
21. 武田行正、劉 曉輝、徳永隆俊、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ERR γ とそのアイソフォームのヒト脳および生殖器官における発現分布、第80回日本生化学会、2007. 12. 11-15。
22. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ERR γ への環境ホルモン・ビスフェノールAの Arg316 および Glu275 との水素結合機構、第80回日本生化学会、2007. 12. 11-15。

H. 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

エストロゲン関連受容体 γ に対するセンシング抗体アッセイ解析

分担協力研究者 徳永隆俊 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

研究要旨

我々は2006年（平成17年）に内分泌かく乱物質・ビスフェノールA（BPA）が、エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に非常に強く結合することを発見した。ERR γ はリガンド無しでもほぼ100%フルに活性化されているため、「自発活性化核内受容体」と呼ばれる。4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）と結合すると不活性化され、したがって、4-OHTはインバースアゴニストと呼ばれる。一方、BPAは4-OHTを阻害するので、ERR γ のインバースアンタゴニストとして働く。本研究課題では、平成18年度にERR γ に対して結合する化合物を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「自発活性化核内受容体」に特異的なセンシング抗体法の確立に成功した。そして、平成19年度にはERR γ においてステロイドホルモンや植物エストロゲンをはじめ、BPAの誘導体など25の化学物質についてこのセンシング抗体法を用いた評価を実施した。その結果、インバースアゴニスト活性は4-OHTとDESしか示さなかったが、インバースアンタゴニスト活性はBPA以外にもBPA誘導体2種（ビスフェノールE、ビスフェノールF）について明瞭に観察された。センシング抗体法アッセイした他の化学物質は全てインバースアゴニスト活性およびインバースアンタゴニスト活性ともに示さず、不活性であった。これらの結果は受容体結合試験およびレポーター遺伝子アッセイの結果と良い相関を示した。このように、自発活性化型受容体について、そのインバース型の活性を測定可能な試験系を確立することができた。これはヒト核内受容体全48種のうち、13種類も存在する自発活性化型核内受容体の構造機能解析、化学物質リスク評価においてきわめて重要な意味を持つ。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質、いわゆる「環境ホルモン」としてノニルフェノール（NP）やビスフェノールA（BPA）に、内分泌かく乱作用が懸念されている。BPAはエストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）を介して作用を示すとされてきたが、BPAのERへの結合能、活性はエストロゲンに比べると1/1,000～1/10,000と非常に弱い。一方、最近になって、BPAが規制値（2.5～3.0 ppm）よりはるかに濃度が低い「低用量」で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このような低用量作用が実際にERを介してい

るのか？「低用量問題」として議論になってきた。こうしたなか我々は、2006年（平成17年度）に「BPAは、ERではなくて、エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に強く結合する」ことを発見し、報告した。

BPAは、1891年にロシアのDianinによって初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にドイツのZinkeによる合成法の改良で、アセトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。また、BPAは高分子ポリカーボネートプラスチックと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オーファン受容体である。

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報告されている。もしも、「BPAは、ERではなくてERR γ に強く結合する」という発見から、このような障害の起因となるBPAの作用が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の効果解明はきわめて緊急を要するものである。

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よりもはるかに大きい。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、リガンド、すなわ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。しかしながら、SA-NRではこのようなコンホメーション変化はない。

2001年になって、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、「インバーサアゴニスト」として同定されている。また、こうしたなか我々は、ERR γ に対してBPAが強い結合能を持ち、ERR γ に働くインバーサアゴニストを阻害する、ある

いは抑制すること (インバーサアタゴニスト活性) を明らかとした。

こうした状況で、BPAが強い結合能を示すERR γ について化学物質をスクリーニングする試験系の確立が急務となった。本研究課題では、インバーサアゴニストおよびインバーサアタゴニスト両活性が測定可能なセンシング抗体法を確立すること、そして、このERR γ センシング抗体法を用いて、ERR γ に結合する化学物質を探索することを目的とする。なお、ERR γ についてのBPA誘導体などの化学物質に関する構造活性相関解析 (SAR)、X線結晶構造解析によるBPA・ERR γ 結合の構造要因のSAR、また、ERR γ のリガンド結合部位の結合構造の重要性を測るSARのそれぞれに関しては、学術論文として発表し、その内容については各分担報告書に取りまとめ、本総合報告書に掲載している。このため、これらの結果に関することは本報告では割愛した。

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) 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。

(3) 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。

(倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作製するに当たり、ウサギを実験動物として使用する。こうした実験動物はきちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられている。また、採血等に際しても麻酔をするなど痛みの無いように配慮するなど、倫理面の問題が生じない状況で行っている。所属部局・理学研究院においては「動物実験審査」システムが確立されており、本研究は審査を承認の上許可されたものである。

C. 研究結果

(1) ERR γ センシング抗体の調製

ERR γ の α -ヘリックス 12 を含むように 2 つの抗原ペプチドをデザインした (図 1)。それぞれの抗原に対して抗体を調製してその特異性を調べたところ、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、受容体認識能をもつ抗#2 ペプチド-抗体を用いて以後のアッセイを実施した。



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。

ERR γ は自発活性化型核内受容体であり、インバーサゴニストである 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 に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することにした。

まず、ERR γ 受容体に対する抗体応答がどのように変化するかを、化学物質の濃度依存的な応答として測定した。BPA では次のようになった。すなわち、BPA が結合した ERR γ は活性コンホメーションにあるため、いくら BPA を加えても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 (図 2)。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 20~70 nM だった。このように、インバーサゴニストの受容体応答は、センシング抗体の直接的な応答として観察できることが証明された。Diethylstilbestrol (DES) もセンシング抗体法による試験において、ERR γ の基盤構成活性を濃度依存的に阻害する活性、インバーサゴニスト活性を示した。

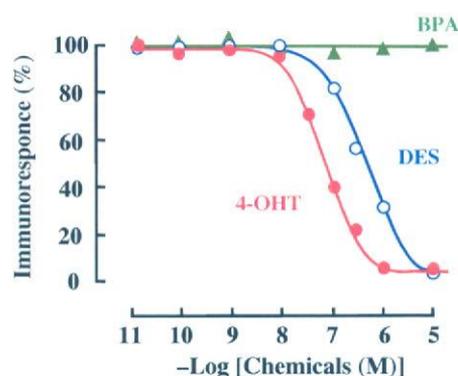


図 2. ERR γ センシング試験 (インバーサゴニスト活性)

(2) ERR γ に対するセンシング抗体アッセイ：インバーサゴニスト活性の評価

センシング抗体法により、ERR γ の基盤構成活性を濃度依存的に阻害する活性、インバーサゴニスト活性を測定することが可能となったので、25 の化学物質について調べた。内分泌かく乱化学物質として懸念されている BPA とその類縁化合物 BPE や BPF を始めとして、代表的なフェノール色素、真性環境ホルモン、そして、ステロイドホルモンや植物エストロゲン等を含む 25 物質を調べた。その結果、表 1 に示されるように ERR γ のインバーサゴニスト活性は 4-OHT と DES にしか認められず、他の化合物はすべて不活性であった。BPA とそのアナログ・BPE および BPF は ERR γ に対する結合性をもつものの、インバーサゴニスト活性は見られなかった。

(3) ERR γ センシングアッセイ (インバーサアンタゴニスト活性)

4-OHT による不活性化に対するインバーサアンタゴニスト活性を各化学物質について検討した。これは、センシング抗体アッセイ

表1 様々な物質のERR γ に対するセンシング抗体アッセイの結果(インバースアゴニスト活性)

化学物質名	センシング試験	レポーター遺伝子試験	結合試験
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	++	++	++
Diethylstilbestrol (DES)	+	+	+
Bisphenol A (BPA)	-	-	++
4,4'-Ethylidenebisphenol (BPE)	-	-	++
4,4'-Methylenediphenol (BPF)	-	-	+
17 β -estradiol (E2)	-	-	-
ethynylestradiol	-	-	-
dihydrotestosterone (DHT)	-	-	-
testosterone	-	-	-
progesterone	-	-	-
Dexamethasone (DEX)	-	-	-
cortisone	-	-	-
cortisol	-	-	-
deoxycorticosterone	-	-	-
corticosterone	-	-	-
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	-	-	-
biochanin A	-	-	-
genistein	-	-	-
diadzein	-	-	-
zearalanone	-	-	-
gossypol	-	-	-
phenol red	-	-	-
phenol phthalein	-	-	-
methyl orange	-	-	-
methylene blue	-	-	-

++ : 強い活性、+ : やや強い活性、- : 不活性

表2 様々な物質のERR γ に対するセンシング抗体アッセイの結果(インバースアゴニスト活性)

化学物質名	センシング試験	レポーター遺伝子試験	結合試験
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	-	-	++
Diethylstilbestrol (DES)	-	-	+
Bisphenol A (BPA)	++	++	++
4,4'-Ethylidenebisphenol (BPE)	++	++	++
4,4'-Methylenediphenol (BPF)	+	+	+
17 β -estradiol (E2)	-	-	-
ethynylestradiol	-	-	-
dihydrotestosterone (DHT)	-	-	-
testosterone	-	-	-
progesterone	-	-	-
Dexamethasone (DEX)	-	-	-
cortisone	-	-	-
cortisol	-	-	-
deoxycorticosterone	-	-	-
corticosterone	-	-	-
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	-	-	-
biochanin A	-	-	-
genistein	-	-	-
diadzein	-	-	-
zearalanone	-	-	-
gossypol	-	-	-
phenol red	-	-	-
phenol phthalein	-	-	-
methyl orange	-	-	-
methylene blue	-	-	-

++ : 強い、+ : やや強い、- : 不活性

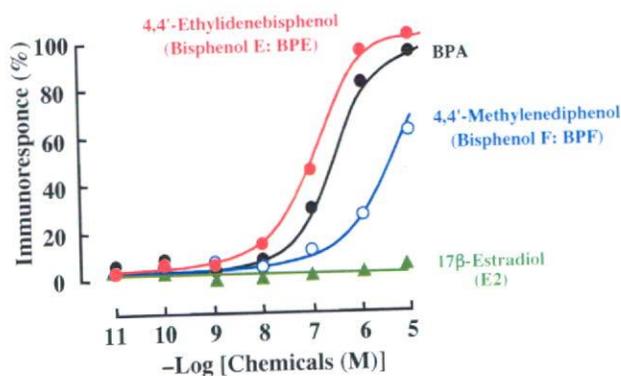


図3 ERR γ センシング試験(インバースアゴニスト活性)

においてまず、10 μ Mの4-OHTでERR γ を不活性化状態に置き、これに化合物の阻害活性を測定する。図3で示されるように、BPA、BPEおよびBPFにインバースアゴニスト活性が見られた。これらはERR γ 受容体に対して結合親和性を示すものの、インバースアゴニスト活性を持たなかったため、きわめて妥当な結果である。他の化合物は全てインバースアゴニスト活性を示さなかった。

インバースアゴニスト活性を示すBPA、BPEおよびBPF、また、インバースアゴニスト活性を示す4-OHTとDES。ERR γ 受容体に結合する化合物は非常に特異的である。

D. 考察

ERR γ センシング抗体アッセイによる試験において、ステロイドホルモンや植物エスト

ロゲン等を含む 25 化学物質を検討した。その結果、インバースアゴニスト活性、インバースアンタゴニスト活性を非常に明解に検出することができた。また、これらの結果は共に、レポーター遺伝子試験の結果と良い相関を示すことが判明した。

コンホメーション変化センシング抗体アッセイから算定される結合親和性は、結合試験の結果と良い相関を示した。また、インバースアンタゴニスト活性を示す BPA、BPE および BPF は、センシング抗体アッセイでは 100% までの抗体応答反応性を示しており、これはレポーター遺伝子アッセイの結果と良い相関を示している。

インバースアンタゴニスト活性を示す物質は BPA とその誘導体のみである (図 3)。BPA は内在性のホルモンではないが、ERR γ に対して強い結合性とインバースアンタゴニスト活性を示す構造要因があると考えられる。これについては、既に詳細な解析を実施したが、最も重要な構造要因は次の 2 つである。① ERR γ には BPA が結合するのに最適なリガンド結合部位が存在する。② ERR γ は BPA が結合しても活性型コンホメーションを保持する。

E. 結論

自発活性化型核内受容体である ERR γ のセンシング抗体法の確立に成功した。インバースアゴニストである 4-OHT や DES は直接的に抗体応答の阻害活性として評価できた。インバースアンタゴニストである BPA やその誘導体は、4-OHT の阻害を抑制する活性として評価することができた。こうした評価試験系によって、25 種の化学物質をインバースアンタゴニスト試験し、4-OHT および DES をインバースアゴニストとして同定し、BPA および BPE をインバースアンタゴニストとして同定した。自発活性化型核内受容体 ERR γ のセンシング抗体法に成功したことは、未だ活性評価系が無い自発活性化型核内受容体の活性を調べるうえで意義が大きい。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 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. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2006, 176 (2006).

3. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor- γ . H. Okada, T. Tokunaga, X. Liu, S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Environmental Health Perspectives*, **116**, 32-38 (2008).

4. Receptor binding characteristics of the endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor- γ . Chief and corroborative hydrogen bonds of the bisphenol A phenol-hydroxyl group with Arg316 and Glu275 residues. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, and Y. FEBS J., **274**, 6340-51 (2007).

5. The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family. M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 491-492 (2008).

学会発表

1. 徳永隆俊、劉 曉輝、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 曉輝、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 曉輝、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、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 曉輝、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(ER 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 曉輝、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(ER 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 曉輝、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(ER 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。

7. 岡田浩幸、徳永隆俊、高柳明香、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型と環境ホルモンビスフェノールAの構造活性相関研究、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007.5.19。

8. 高柳明香、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールAはエストロゲン受容体(ER)よりエストロゲン関連受容体 γ 型(ER γ)に強く結合する、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007.5.19。

9. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法によるエストロゲン関連受容体 γ 型(ER γ)への化学物質の影響評価、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007.5.19。

10. 劉 曉輝、徳永隆俊、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、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のエストロゲン関連受容体 γ 型(ER γ)結合部位の同定、平成18年度日本生化学九州支部例会、2007.5.19。

11. 徳永隆俊、自発活性化型エストロゲン関連受容体 γ 型(ER γ)におけるコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法の開発、第7回泉屋コロキウム、2007。

12. 錦織充広、野瀬 健、劉 曉輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイン酸関連オーファン受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体、第44回ペプチド討論会、2007.11.7-9。

13. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、アルキルフェノール類とエストロゲン関連受容体 γ 型(ER γ)の結合における構造活性相関解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

14. 下東美樹、堤 俊博、劉 曉輝、徳永隆俊、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、環境ホルモン・ビスフェノールAのショウジョウバエ*in vivo*継代試験、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

15. 下東康幸、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、ビスフェノールAはステロイドホルモン核内受容体9種うちER γ にのみ結合する、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

16. 武田行正、劉 曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールAの低用量効果が疑われるヒト生殖組織および脳におけるエストロゲン関連受容体ER γ の発現解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

17. 徳永隆俊、野瀬 健、劉 曉輝、岡田浩幸、岩崎 茜、金森史花、磯野裕章、錦織充広、松島綾美、下東美樹、下東康幸、化学物質の内分泌かく乱作用評価のためのコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法：ヒト核内受容体全48種への展開、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

18. 野瀬 健、徳永隆俊、錦織充広、下東康幸、女性ホルモン受容体ER α に対するアルキルフェノール類の結合性の予測、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

19. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、徳永隆俊、下東康幸、ER γ へのビスフェノールA結合におけるArg316およびGlu275との水素結合機構、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007.12.10-11。

20. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、高柳明日香、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型とBPA誘導体間の構造活性相関、第80回日本生化学会、2007.12.11-15。

21. 武田行正、劉 曉輝、徳永隆俊、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ER γ とそのアイソフォームのヒト脳および生殖器官における発現分布、第80回日本生化学会、2007.12.11-15。

22. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ER γ への環境ホルモンビスフェノールAのArg316およびGlu275との水素結合機構、第80回日本生化学会、2007.12.11-15。

H. 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。これまでのメスでの評価法確立と試験研究を引き継ぎ、環境化学物質の多世代にわたる影響をメスの産卵数により評価するとともに、さらにオス生体への環境化学物質の影響を産卵数と羽化数の変遷で評価出来る試験系、並びに多世代繁殖試験系を確立した。この試験系により、オスの生殖能に対するビスフェノール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期間で起こり、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食餌するため、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。そのために、それまでに確立したメス産卵能の評価方法を多世代繁殖毒性試験系として改良し、幼虫あるいは成虫になってからビスフェノール A の暴露を受けた場合と、多世代にわたって暴露を受けた場合の影響評価を行った。次世代の繁殖羽化数を指標とし、オス交尾能あるいは受精能に対する影響の評価法を確立し、多世代にわたる暴露の影響を調べた。

B. 研究方法

① ショウジョウバエの系統と飼育培地

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、産卵数の評価にはこれ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、*Canton S* を用いた。メスの生殖能を評価するためには、メス個体に対して過剰な数のオスを交配させ、図 1 に示すような飼育培地を入れたプレートに産卵させた。24 時間毎に新しいプレートにハエを移し、その日の内に卵の数を数えた。オスの生殖能を評価するためには、試験管型培地に、オス 1 匹に対して、オスの生殖能が反映される交配数のメス (本実験では、オス 1 匹、メス 10 匹の交配数を使用) を交配させ、産卵させた。24 時間、あるいは 48 時間産卵させたのち、ショウジョウバエを炭酸ガス麻酔で新しい試験管培

地に移動させた。産卵された飼育培地は乾燥しないように水管理を徹底し、24 時間周期の明暗条件下、25 度で維持した。それらの飼育ビンで生育し羽化した個体をメス、オス弁別し、カウントした。この数値を親世代のオスの次世代繁殖数とし、生殖能として評価した。

飼育培地はこれまでと同様に作製した。水 10 l 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。ビスフェノール A 含有の培地は、ビスフェノール A の最終濃度が 10-4 mol/l、10-5 mol/l、10-6 mol/l になるように調整した。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。

② 影響評価に用いた個体群

メス生殖能の検定

個体一代の影響：幼虫時に化学物質に暴露された影響を成虫時に暴露された影響を排除して評価するために、化学物質を含む飼育培地で生育したのち、羽化後の生殖期には通常培地上で通常の培地で生育したオスと交配させた。また、**成虫時にのみ**暴露された影響を評価するためには、幼虫時には通常培地で生育し、羽化後、化学物質を含む飼育培地で通常の培地で生育したオスと交配させた。



図 1 キイロショウジョウバエメスの化学物質食餌投与試験における卵計測プレート法

オス生殖能の検定

個体一代の影響：幼虫時に化学物質に暴露された影響を成虫時に暴露された影響を排除して評価するために、化学物質を含む飼育培地で生育したのち、羽化後の生殖期には通常培地上で通常の培地で生育したメスと交配させた。また、**成虫時にのみ暴露された影響**を評価するためには、幼虫時には通常培地で生育し、羽化後、化学物質を含む飼育培地で通常の培地で生育したメスと交配させた。

多世代にわたる影響：化学物質を含む飼育培地で多世代にわたり飼育されたオスを、通常培地で飼育されたメスと交配した。成虫時に受ける影響を排除するために通常培地でテストを行い次世代繁殖数をカウントした。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数

メス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。

オスの生殖能を反映するためには、メスの個体数を過剰に与え、さらにメスが未受精卵を産卵する可能性が高いため、羽化個体をカウントする必要がある。これまでの研究で、オスの約10倍の数のメスを交配させるとオスの生殖能を反映した個体数の次世代が生育することがわかっている (図2)。

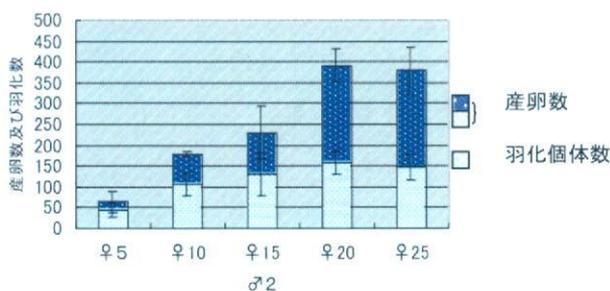


図2 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雌雄比による羽化個体数の変異

本年度は、さらに、試験管の限られたスペースでも次世代の個体が過剰にならず、再現性のある結果を得るために、また、オス個体の特性を評価するために、オス1匹に対してメス10匹を試験管培地で交配させ、48時間毎に新しい試験管培地に移して、オス個体の交配能の成熟および生殖能の評価を試みた。

C. 研究結果

メスの影響評価

ビスフェノール A のメス成虫時の暴露による産卵能力への影響

メスの数に対して同数のオスを交配させるとその産卵数はメス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メス:オス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 (図3)。

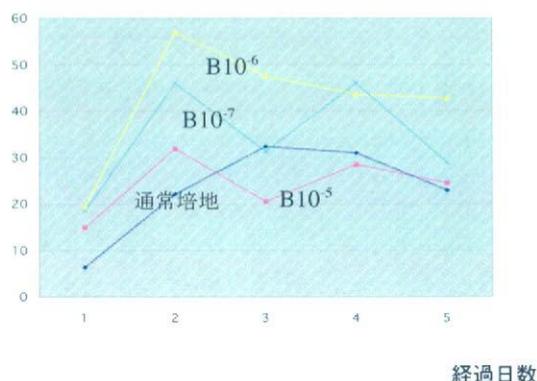


図3 キイロショウジョウバエのビスフェノール A 成虫時暴露によるメスの産卵数変異

ビスフェノール A のメス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1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4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	通常雌	通常雄	通常培地
C:成虫時暴露	通常雌	通常雄	BisphenolA 含培地

表 1. メスのビスフェノール A 暴露試験の組み合わせ

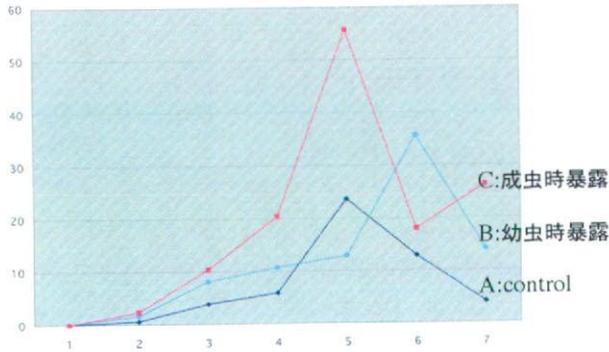


図 4 キイロショウジョウバエのビスフェノール A 暴露によるメスの産卵数の変異

オスの影響評価

ビスフェノール A の成虫時、あるいは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 2 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 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、メス：オス 10 匹：1 匹/本で交配させた。

	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	通常雌	BisphenolA 含有培地で生育雄	通常培地
C:成虫時暴露	通常雌	通常雄	BisphenolA 含培地

表 2. オスのビスフェノール A 暴露試験の組み合わせ

オス成虫時におけるビスフェノール A の暴露による生殖能力への影響

オスの数に対して約 10 倍の数のメスを交配させると次世代の羽化数はオスの生殖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^{-4} mol/l、 10^{-5} mol/l、 10^{-6} mol/l になるように調整した試験管培地にメス：オス 10:1 で交配させ、次世代

の羽化数をカウントした (図 5)。幼虫時に通常培地で生育したオス個体が成虫になってからビスフェノール A を摂取した場合、通常培地のコントロール群と比較して、次世代繁殖数には大きな変化はなかった。しかし、ビスフェノール A 含有培地で交配を行うと、羽化後 8-10 日に産卵された個体群の羽化数は、通常培地での個体群に比較して、やや数が減少する傾向がみられた。その割合は、ビスフェノール A 含有濃度がもっとも低い 10^{-6} mol/l でもっとも大きく、約 20% の減少であった。この傾向が、親個体がビスフェノール A を摂取開始後、約 8 日経過したために受精能あるいは繁殖能が低下したためであると考えられた。今後、再精査する必要がある。

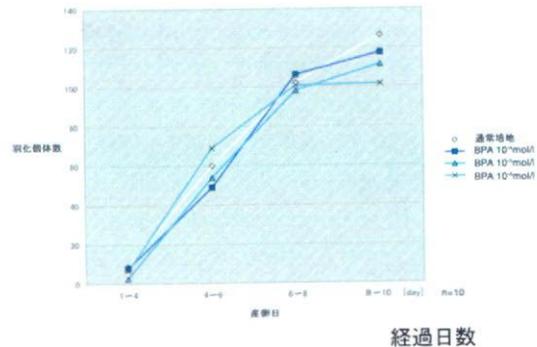


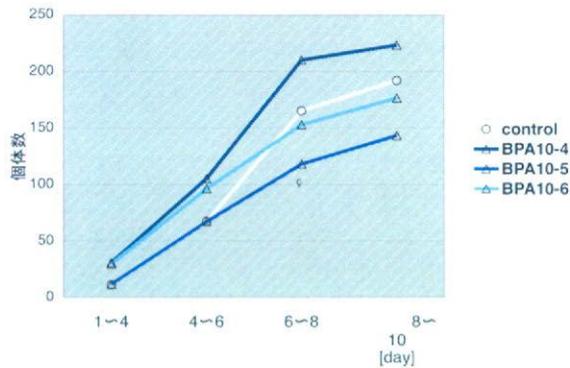
図 5 キイロショウジョウバエのビスフェノール A 含有培地におけるオスの次世代繁殖数

オス幼虫時におけるビスフェノール A 暴露による生殖能力への影響

ビスフェノール A の幼虫時における暴露の影響を多世代繁殖実験法により評価した。まず、個体一代の幼虫時における暴露実験では、ビスフェノール A 含有培地で生育したオスと通常培地で生育したメスを通常培地上で交配させた。これらの交配から繁殖した次世代の個体数は図 6 に示した。幼虫時にビスフェノール A 10^{-4} mol/l に暴露された場合、コントロール群と比較して羽化直後から 10 日目まで通して、受精能が高かった。一方、ビスフェノール A 10^{-5} mol/l に暴露された個体群では、羽化後 6 日目までは、コントロール群と差がなかったのに対して、6 日目から 10 日目にかけて、約 25% の低下が見られた。ビスフェノール A 10^{-6} mol/l に暴露された個体群では、コントロール群に対して羽化後 1 日目から 6 日目までは、受精能が高かったのに対して、それ以降では、コントロール群と

差が見られなかった。

1日目から10日目までの総個体数を見ると、ビスフェノールA 10^{-4} mol/l 暴露では、コントロール群と比較して高かったのに対して、ビスフェノールA 10^{-5} mol/l 暴露では低い結果となった。ビスフェノールA 10^{-6} mol/l 暴露では変わらなかった。また、ビスフェノールAの幼虫時暴露によるオス交配能の成熟度を



n=10

図6 キイロショウジョウバエオスのビスフェノールAの幼虫時暴露におよぼす影響-次世代繁殖数

見るために、ビスフェノールA 10^{-4} mol/l 含有培地で生育したオスと通常培地で生育したメスとを通常培地上で交配させ、24時間毎に試験管培地を交換し、次世代繁殖数の推移を観察した。通常培地で生育したオスの次世代繁殖数は8日目までは増加し続けるのに対して、幼虫時にビスフェノールAに暴露されたオス個体の次世代繁殖数は、6日目にピークが訪れ、その後は減少することがわかった。したがって、幼虫時に高濃度のビスフェノールAに暴露されると羽化後の交尾能(受精能)成熟が早まると考えられた。

多世代にわたって暴露された個体群の影響
個体一代の暴露にとどまらず多世代に

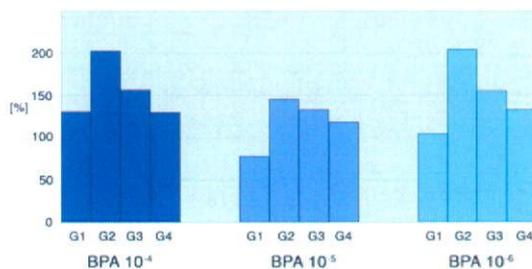
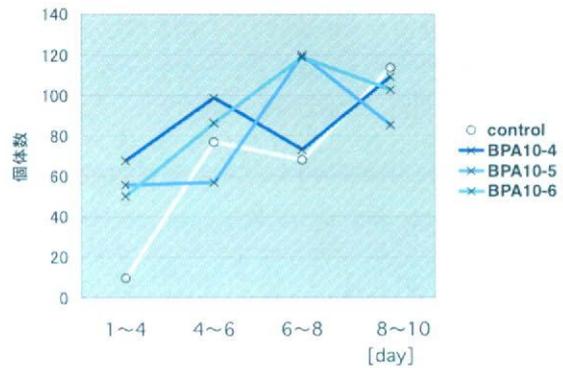


図7 キイロショウジョウバエオスにおよぼすビスフェノールAの影響-継代効果(次世代繁殖数相対値)

わたって暴露された場合の影響を見るために、ショウジョウバエをビスフェノールA含有の培地で飼育し、1代目から4代目までの影響をオスの羽化後10日目までの総次世代繁殖数として評価した。その結果は図7に示す通りである。3段階の濃度のいずれにおいても、2世代目で次世代の繁殖数が増加した。しかし、その後は世代を追う毎に、徐々に次世代の繁殖数が減少した。

4代にわたって暴露された個体群の影響

継代でビスフェノールA含有の培地で飼育された4代目の個体群では、羽化後10日目までの次世代繁殖数は図4で見られるように、3代目のものより少なかった。しかし、通常は羽化直後の2日目までは殆ど受精能はないのに対して、いずれの濃度においてもコントロール群より高い受精能があることが判明した。交尾能の成熟が早くなったためと考えられた(図8)。



n=10

図8 キイロショウジョウバエオスにおよぼすビスフェノールAの多世代暴露の影響-4世代目の交配能変異(次世代繁殖数)

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。成虫なっち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。

オスにおいても、ビスフェノールAがショウジョウバエオスの受精能、あるいは交尾能に及ぼす影響を、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。成虫なっちはじめてビスフェノールAを摂取した場合には、受精能はコントロール群と比較して殆ど変わらなかった。しかし、通常のショウジョウバエオスは羽化後10日過ぎても受精能の増加が継続するのに対して、ビスフェノールAを摂取すると8日目頃から受精能が減少す

ることがわかった。このことから、ビスフェノールAの摂取の影響が8日目頃から現れるものと考えられた。一方、孵化直後から幼虫時にビスフェノールAを摂取し続けたオスは、羽化後に受精能が発現するのが早まる傾向にあった。また、多世代にわたって、暴露し続けると、受世代総繁殖数が徐々に減少すること、4代目になると、羽化後の受精能の発現が早くなることから、生殖腺における精原細胞の通常の細胞分裂に負の影響をおよぼすこと、精原細胞から精子への減数分裂の速度が速くなる、あるいは減数分裂の開始が早くおこることが考えられる。

これらの結果から、ビスフェノールAに対する一代限りの影響と何代にもわたって暴露を受けた場合では、影響が現れる側面が異なること、さらに、何代にもわたって暴露を受けた場合ではその影響が次第に強く現れることが明らかになった。

E. 結論

本研究により、ショウジョウバエオスの受精能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。オスに対して約10倍の数のメスでの交配は、オスの受精能力を反映する。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、通常より受精能のピークが早まり、成虫で初めて摂取すると、摂取後約7日目までは受精能には影響が見られないが、8日目からの受精能が減少する傾向があった。生殖腺における精原細胞の細胞分裂および精原細胞から精子への減数分裂など、多面的に影響を及ぼすことが結論づけられた。

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回および第10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。

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。

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

エストロゲン関連受容体 γ に対するビスフェノールA誘導体の結合特性の解析

研究分担者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院 教授
分担協力研究者 岡田浩幸 九州大学大学院理学府学術振興会特別研究員

研究要旨

ビスフェノールA (BPA) は、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して内分泌かく乱作用を示すとされてきた。しかし、BPA が低用量で脳神経や行動等に重大な影響を及ぼすという報告が相次ぐなか、我々は「真の受容体は何か？」という率直な疑問に行き当たった。これは、BPA の ER への結合能がエストロゲン・17 β -エストラジオール (E2) に比べると非常に弱いためであり、「低用量問題」として議論されている、内分泌かく乱作用の分子メカニズムが不明であるからであった。こうしたなか我々は、センシング抗体を用いる研究、受容体結合試験、レポーター遺伝子アッセイ等の研究において、BPA がエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合することを、世界で初めて発見した。ERR γ は ER の標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列 (ERE) と結合し、逆に、ER も ERR γ の応答配列 (ERRE) を認識する。このことから、低用量問題の本質は、ERR γ が ER の機能を干渉することである可能性もある。このため、BPA の ERR γ に対する結合特性 (結合定数、結合構造要因) を明らかにすることと、ERR γ に結合する他の化学物質の有無を明らかにすることが緊要な課題となった。そこで、本研究においては、まず、ERR γ とトリチウム標識した BPA ($[^3\text{H}]$ BPA) による飽和結合試験を行った。その結果、結合定数 K_D 値は 5.5 nM であり、これは天然のホルモンとその受容体の結合親和性に匹敵するほどの結合力であることが判明した。さらに、 $[^3\text{H}]$ BPA をトレーサーとして、BPA 類似体の競争結合試験を行った結果、ERR γ への結合は、BPA を構成する2つのフェノール性 OH 基のうち、一方のみが主要な結合要因であることが明らかとなった。これにより、「ビス (2つを意味する)」フェノールだけでなく、フェノール基を1つしか持たないフェノール化合物が ERR γ に結合する可能性が強く示唆された。そこで、実際に、内分泌かく乱物質として疑われているアルキルフェノール類について精査したところ、4-*tert*-ブチルフェノールなど、ER への結合性が低い複数の化学物質が、ERR γ に強く結合することが明らかとなった。さらには、これらの化学物質は BPA と同じくインバースアンタゴニスト活性を示すことも判明した。

A. 研究目的

BPAは、1891年にロシアのDianinによって初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にはドイツのZinkeによる合成法の改良で、アセトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの原料と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一方、代表的な内分泌かく乱物質としても知られている。BPAを原料としたプラスチックには、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、これを取り除くことが困難であり、その漏出が問題になっている。したがって、「この低用量のBPAが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である。一方で、BPAは、女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされてきたが、BPAのERへの結合能、活性は、正常なホルモンであるエストロゲンに比べると1/1,000-1/10,000と非常に弱く、そ

のため、BPAは内分泌かく乱物質になり得ないとも議論されてきた。しかしながら、最近になって、BPAが規制値 (2.5–3.0 ppm) よりはるかに濃度が低い「低用量」で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このようなBPAの低用量作用のメカニズムは不明であり、「低用量問題」として議論が続いている。こうしたなか、我々は、低用量問題の本質がERを介さない別の経路 (別の受容体) にある可能性を考えて研究を展開し、「BPAは、ERではなく、エストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に強く結合する」ことを発見した。

ERに代表される核内受容体は、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 (ERR) は、ERと非常によく似たアミノ酸配列を持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。これらERRは、ERの標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列 (ERE) と結合し、逆に、ERもERRの応答配列 (ERRE) を認識するため、互いに連関して機能していると考えられている。しかしながら、ERRの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おらず、ERRの生体内における正確な役割は未解明のままである。

我々の詳細な検討の結果、ERR γ はヒト成人の身体の至る所で存在することが明らかとなった。一方、発生期に相応する母体、特に「胎盤」および「胎児の脳」において高レベルに発現することが確認された。この事実は、胎児、新生児、乳幼児に対するERR γ を介したBPAの影響を非常に強く懸念させる。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の報告があり、ERR γ が脳の成長・発達に関与し、BPAがこれに影響を与えている可能性が高い。もし、こうした脳神経系へのかく乱作用がERR γ を経由して起こるとすれば、ERR γ に対する化学物質の影響、特にBPAの影響解明は緊急を要するものと考えられる (図1)。

そこで、本研究では、どの程度の低用量でBPAがERR γ に結合するのかを明らかにするために、 ^3H BPAを用いての飽和結合試験を行い、結合定数の算出を行った。さらに、ERR γ に結合するBPA以外の化学物質をスクリーニングする (見つける) ために、BPAと構造が類似した化学物質群に対して競争結

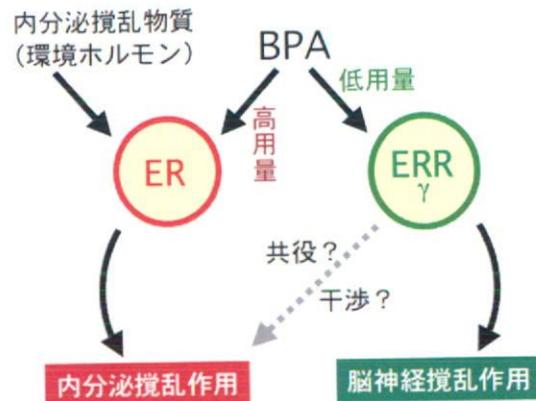


図1. ERとERR γ

ERとERRは相互に関連しており、BPAの内分泌かく乱作用はERR γ を経由して起こる可能性が高い。また、脳神経系への影響が危惧される。

合試験を行った。 ^3H BPAをトレーサーとすることで、ERR γ に結合するために必要な構造要因を同定した。この結果をもとに、ERR γ に結合する可能性が高いと判断された化学物質 (約60種) については、実際に結合試験によるスクリーニングを実施した。また、ERR γ への結合が確認された化学物質についてはレポーター遺伝子アッセイによる活性測定を行った。

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後、Sephadex G-25によるサイズ排除クロマトグラフィーにて精製を行った。

(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 ^3H BPAと併に加えることに

より調べた。その後、遊離の ^3H 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

BPA 類似体など、 $\text{ERR}\gamma$ への結合スクリーニングに供した化学物質については、 ^3H BPA の受容体結合を阻害する能力で $\text{ERR}\gamma$ への結合性を評価した。まず、評価すべき一連の化学物質を ^3H BPA と $\text{ERR}\gamma$ と共に binding buffer 中で混合し、インキュベートした。その後、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 IC_{50} 値 (^3H BPA の受容体結合を 50% 阻害する値) はプログラム ALLFIT により算定した。

(4) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞である HeLa 細胞に、 $\text{ERR}\gamma$ の発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、 $\text{ERR}\gamma$ の活性を検出するために、ルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを導入した。24 時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに 24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質による $\text{ERR}\gamma$ の活性への影響を評価した。

C. 研究結果

(1) $\text{ERR}\gamma$ 受容体の飽和結合試験

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 $\text{ERR}\gamma$ -LBD を発現した。結合試験では、 ^3H BPA を用いて、反応温度、時間、緩衝溶液の組成、

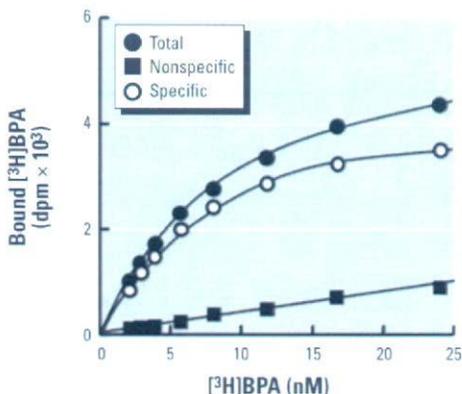


図2. $\text{ERR}\gamma$ 飽和結合試験
 $\text{ERR}\gamma$ に対する ^3H BPA の全結合 (●) と非特異的結合 (■)、特異的結合 (○) を示す。

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条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 5.5 nM であり、 B_{max} は 18 nmol/mg であった。この結果より、BPA の $\text{ERR}\gamma$ に対する結合は、生体内で機能するホルモンとその受容体の結合親和性に匹敵するほど強いものであることが明らかとなった。つまり、低用量問題 (低用量の BPA による内分泌かく乱作用) で議論されているような「極微量」の BPA が、 $\text{ERR}\gamma$ に結合可能であることが判明した。

(2) $\text{ERR}\gamma$ に結合するための BPA 構造要因の同定

BPA と類似した構造を持つ化学物質 (BPA 類似体) を用いて、「構造活性相関解析」を行った。つまり、BPA の構造のうち、どの部位が $\text{ERR}\gamma$ との結合に重要であるかを同定す

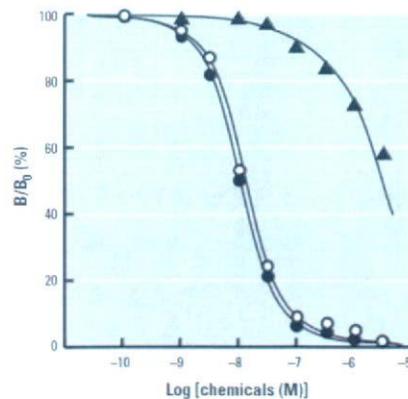
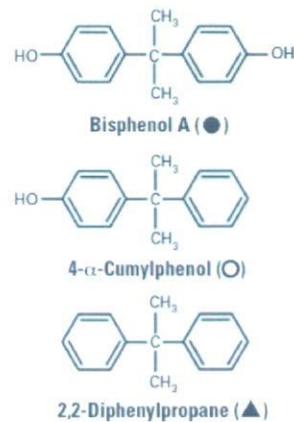


図3. フェノール性 OH 基の効果
OH 基を 1 つ欠失した化合物 (○) は、BPA (●) と同等の結合性を維持した。両方を欠失した化合物 (▲) では結合性が著しく低下した。

る解析である。BPA 類似体の結合性評価は、 $[^3\text{H}]$ BPA をトレーサーとした競争結合試験によって行い、 IC_{50} 値を算出することで行った。 IC_{50} 値は、「BPA 類似体が $[^3\text{H}]$ BPA の結合を 50% 阻害するときの BPA 類似体の濃度」であり、値が小さいほど、より強く ERR γ と結合することを意味する。各化合物の IC_{50} 値は、章末の表 1 にまとめた。

まず、BPA からフェノール性 OH 基を 1 つ、もしくは 2 つ欠失させた化合物について試験を行ったところ、2 つの OH 基のうち一方のみが結合に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (図 3)。そこで、OH 基だけでなく、さらに分子構造を小さくした化合物について結合試験を行った。その結果、フェノール環を同程度の大きさのアルキル基にした場合、結合性が著しく低下した。さらに分子サイズを 4-*tert*-ブチルフェノールまで小さくしたところ、結合性が部分的に回

復したが、やはり BPA ほど強くは結合しないことが判明した。このことから、BPA のフェノール環は、結合に大きく貢献していることが明らかとなった (図 4)。一方、4-*tert*-ブチルフェノールよりさらに小さな構造にしても、ERR γ への結合性は上昇せず、逆に低下した (図 5)。

次に、2 つのフェノール環をつなぐアルキル基部分の寄与について検討した。中央のアルキル基部分を構成するメチル基 (-CH₃) をエチル基 (-CH₂-CH₃) やフェニル基 (-C₆H₅) に置換したところ、結合性が低下した (図 6)。したがって、ERR γ のリガンド結合ポケットに収納されるためには、あまり大きな構造ではない方が有利であることが考えられる。そこで、メチル基を 1 つ、もしくは 2 つ削除して、分子サイズを小さくした化合物について試験を行ったところ、メチル基を 1 つ削除した化合物 (ビスフェノール E: BPE) におい

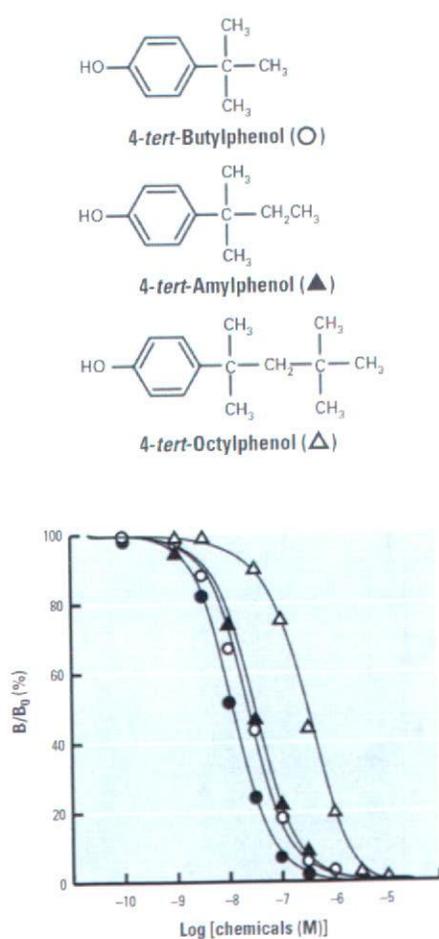


図 4. フェノール環の効果①

フェノール環を削除すると結合性が大きく低下するが、さらに小さな分子になると結合性が部分的に回復する。グラフ中の (●) は BPA。

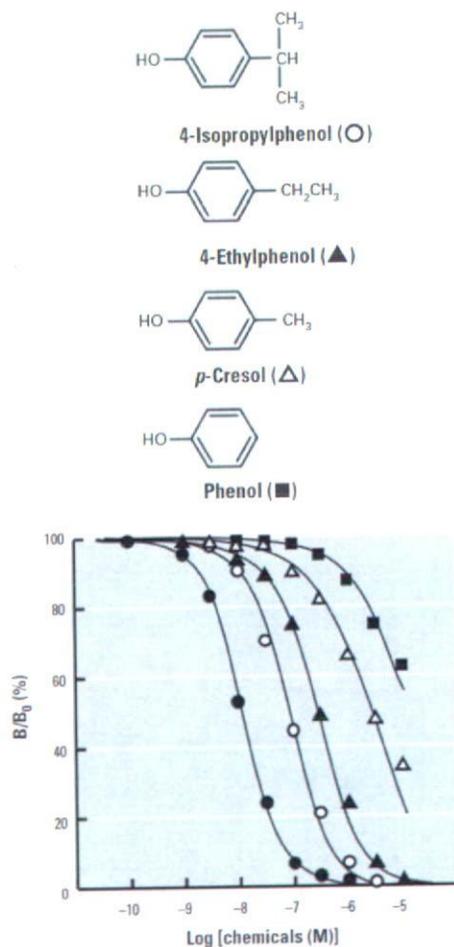


図 5. フェノール環の効果②

4-*tert*-butylphenol より小さくした場合、結合性が段階的に減少する。グラフ中の (●) は BPA。

てBPAを超える最大結合活性が確認された。一方、2つ削除した化合物では結合性が減少した。また、メチル基とほぼ同じ大きさであるトリフルオロ基(-CF₃)に置換した場合でも結合性が大きく低下した(図7)。これらの結果、少なくとも1つのメチル基が結合に関与していることと、静電的な性質が強いトリフルオロ基は、結合に不利に働くことが明らかとなった。

(3) ERR γ に対する活性への影響評価

ERR γ への結合が確認された化合物の中から、BPA、BPE、ビスフェノールAF(BPAF)、4- α -クミルフェノール、4-*tert*-ブチルフェノールについて、レポーター遺伝子アッセイによる活性の評価を行った。既に報告の通り、BPAはERR γ の基盤活性に影響を与えず、レポーター遺伝子の変化量は見られなかった。また、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)

は基盤活性を下げるインバースアゴニスト活性を示した。試験に使用した化合物は全て、ERR γ の基盤活性を変化させず、BPAと同じ性質であることが判明した(図8A,B)。また、1 μ Mの4-OHT存在化で試験化合物によるリガンド応答を測定したところ、4-OHTで不活性化された基盤活性が、リガンド濃度依存的に回復した。つまり、これらの化合物もBPAと同様に、インバースアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。インバースアンタゴニスト活性の強さは、各化合物の結合親和性の強さに相関しており、BPEで最大の活性を示した。

(4) アルキルフェノール類に対するスクリーニング

環境ホルモンとして疑われるアルキルフェノール類が、ERR γ に結合する可能性が高いため、競争結合試験によるスクリーニング

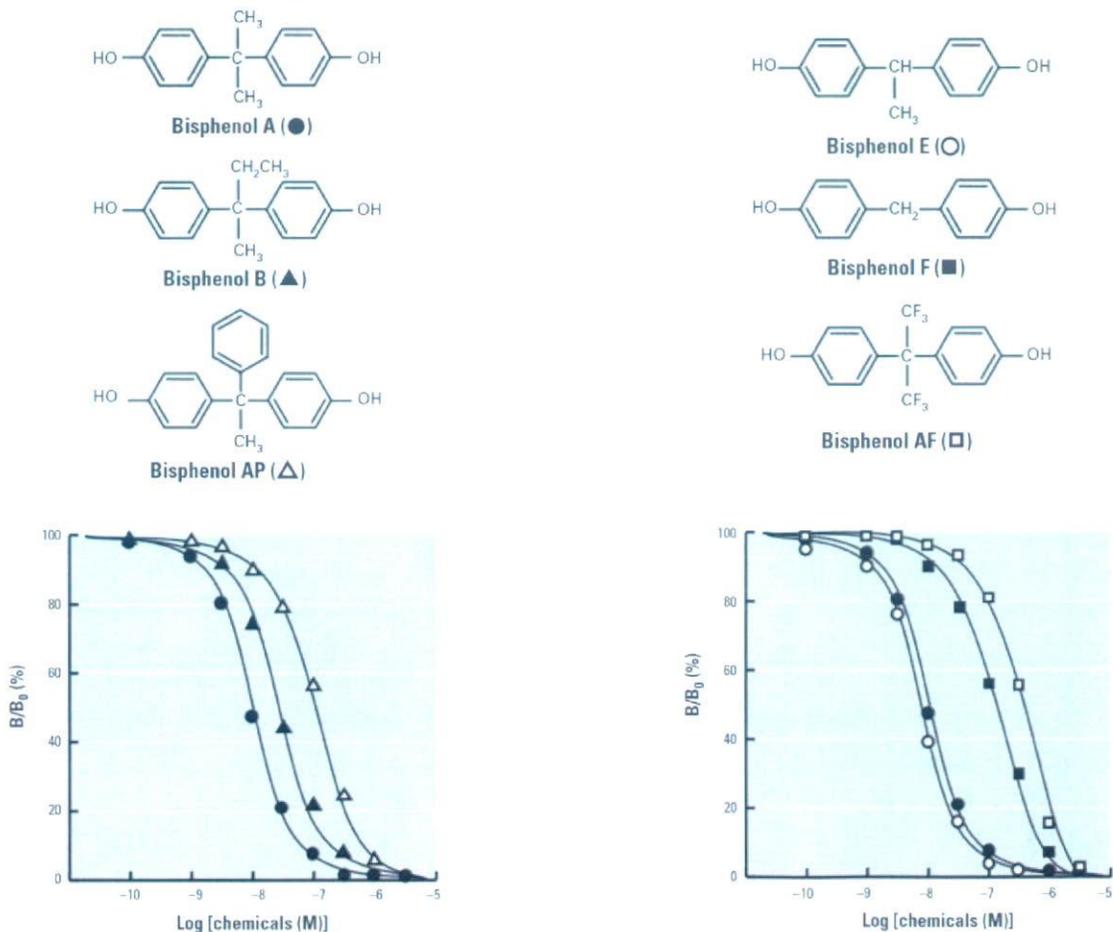


図6. 中央メチル基の効果①

中央のメチル基部分が大きくなると結合性が低下する。BPA (●)、エチル基に置換した化合物 (▲)、フェニル基に置換した化合物 (Δ)。

図7. 中央メチル基の効果②

BPA (●)、メチル基を1つ削除した化合物 (○)、メチル基を2つ削除した化合物 (■) トリフルオロ基に置換した化合物 (□)。

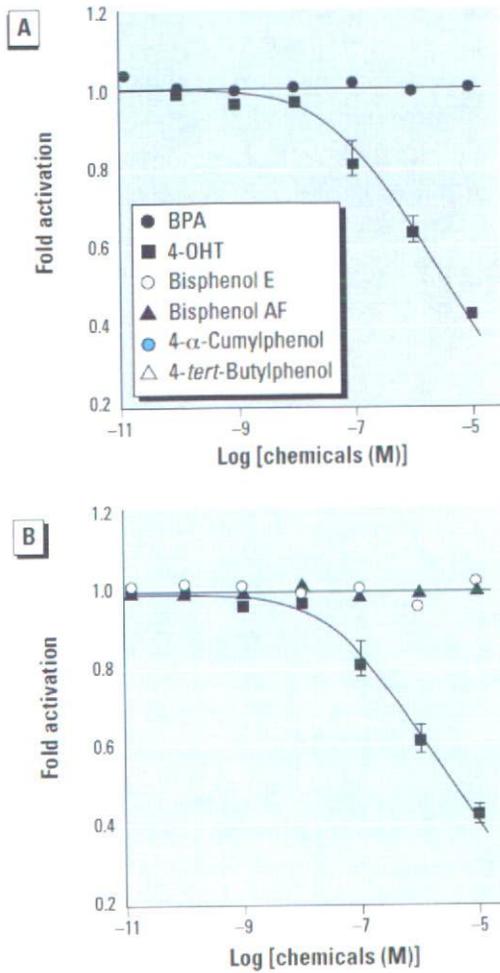


図 8 (A, B). レポーター遺伝子試験①

BPA は $ERR\gamma$ に結合しても基盤活性に影響を与えない。4-OHT はインバーサゴニストとして機能する。試験化合物はすべて基盤活性に影響を与えなかった。

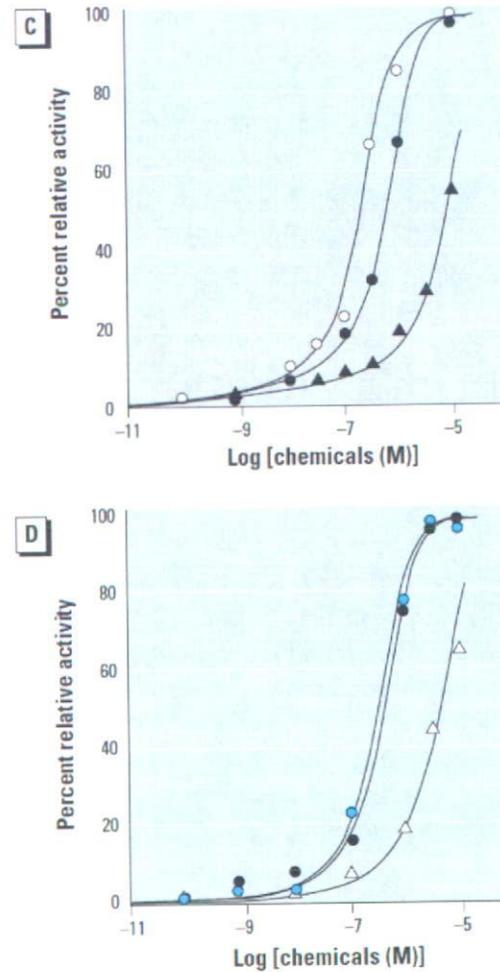


図 8 (C, D). レポーター遺伝子試験②

4-OHT 存在下 (活性を下げた状態) で、試験化合物による活性の変化を測定した場合、インバーサアンタゴニスト活性が観測された。

を行った。フェノール環のパラ位に直鎖アルキル基 (炭素数 $n=1-12$) が付加されたアルキルフェノール類について実施した。その結果、メチル基 ($n=1$) を持つ *p*-クレゾールから、ドデシル基 ($n=12$) を持つ 4-*n*-ドデシルフェノールまで、すべての試験化合物が $ERR\gamma$ への結合性を示した (図 9)。最も高い結合性を示したブチルフェノール ($n=4$) について精査したところ、4-*n*-ブチルフェノール < 4-*sec*-ブチルフェノール < 4-*tert*-ブチルフェノールの順で結合性がさらに高くなる事が判明した (図 10)。

(5) 受容体選択性の解析

一連の化学物質の受容体選択性を調べる

ために、 $ER\alpha$ についての結合試験を実施した。その結果、ほとんどのアルキルフェノールは、 $ER\alpha$ に結合せず、 $ERR\gamma$ に選択的に結合することが判明した。また、BPA や BPE を含む多くの BPA 類似体も、 $ER\alpha$ に対する結合性が極めて弱く、主として $ERR\gamma$ 選択的に結合することが確認された。

D. 考察

BPA は、エポキシ樹脂などに代表されるプラスチック製品の原料として 50 年以上に渡って大量に使用されてきた化合物である。その用途は多岐に渡り、特に、缶詰類の内側のコーティング剤や歯科治療のための詰め物としても使用されるなど、我々の生活環境中