

に捕捉・トラップされるもの、等々は、受容体結合親和性が高くても、受容体までに到達できずに、あるいは到達する化合物の低く、発現タンパク質を用いた結合試験の結果大きく食い違う場合がありうる。このため、通常の結合試験である程度の親和性が観察された化学物質はすべて生細胞系で試験されるべきである。

### (3) ビスフェノールAのステロイドホルモン受容体結合試験

ERR $\gamma$ にビスフェノールAが特異的に非常に強く結合する事実は、この核内受容体の生理的な役割の重要性を明らかとした。一方、ビスフェノールAのERR $\gamma$ への結合が選択的であるか、すなわち、他に結合する核内受容体、受容体がないか？ は同様に重要な問題である。今回、ERR $\gamma$ が属するグループIII核内受容体であるステロイドホルモン受容体について、通常の結合試験を実施した。ある特定の化学物質について、こうした核内受容体のスクリーニングを実施することは、受容体応答のマッピングに重要な実施事項の一つである。

ERR $\gamma$ 以外に、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERR $\alpha$ 、ERR $\beta$ 、AR、PR、GR、MRの8種の核内受容体について試験した。トレーサーはそれぞれの受容体に特異的な化合物のトリチウム標識したものを用いた。その結果、ビスフェノールAはERR $\gamma$ 以外のステロイドホルモン受容体には全く結合しないことが判明した。ビスフェノールAは特異的に、選択的にステロイドホルモン受容体ERR $\gamma$ に結合する。

### (4) レポーター遺伝子試験

ERR $\gamma$ は、自発活性化型核内受容体である。リガンド無しでほぼ100%フルに活性されている。ビスフェノールAがこのERR $\gamma$ に結合しても、これ以上には活性化は起こらない。ERR $\gamma$ への結合が確認された化合物の中から、ビスフェノールA以外に、ビスフェノールE、ビスフェノールAF、4- $\alpha$ -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。試験に用いたこれらの化合物は全て、ERR $\gamma$ の基盤活性を変化させず、ビスフェノール

Aと同じ性質であることが判明した(図7)。

ERR $\gamma$ に対して、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)は基盤活性を下げ、不活性化するインバースアゴニスト活性を示す。ビスフェノールAは、この不活性化を阻害する。1  $\mu$ Mの4-OHT存在化で試験化合物による応答を測定したところ、4-OHTで不活性化・減少した基盤活性が、リガンド濃度依存的に回復した(図8)。そして、こうしたインバースアゴニスト活性が、ERR $\gamma$ に結合した他の化合物にも見られることが明らかとなった。インバースア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、ビスフェノールEが最大の活性を示した(図8)。

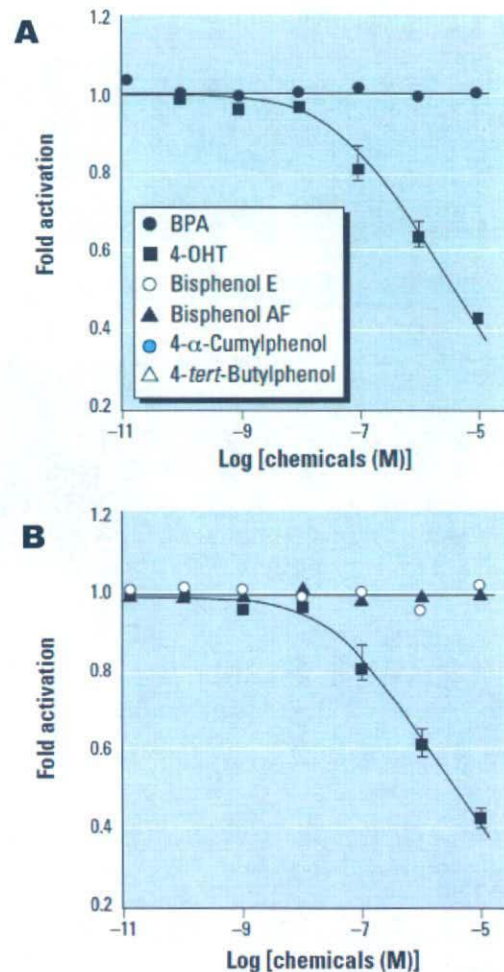


図7. レポーター遺伝子試験

BPAはERR $\gamma$ に結合しても基盤活性に影響を与えない。4-OHTはインバースア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。



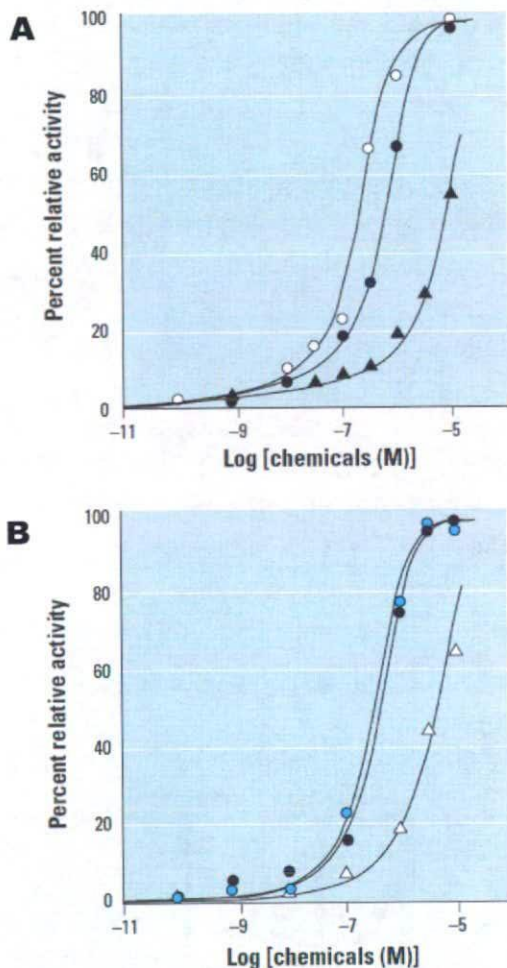


図8. レポーター遺伝子試験  
4-OHT 存在下 (活性を下げた状態) で、試験化合物による活性の変化を測定した場合、インバーサントグニスト活性が観測された。記号は図7に同じ。

#### (5) ホ乳類培養細胞 Two-hybrid 法

当初、ERR $\gamma$ -LBD と SRC1 を用いた酵母 Two-hybrid 法を検討した。その結果、リガンドのなしで非常に高い $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性が見られた。これは、ERR $\gamma$ -LBD と SRC1 が相互作用した結果考えられた。ビスフェノールAを加えても変化は見られなかった。

この状態にインバーサントグニストである4-OHTを加えた。しかしながら、不活性化するインバーサントグニスト活性は観察することはできなかった。菌体量、培養時間、培養条件等の検討を行ったが、活性低下が見られなかった。これは、酵母では $\beta$ -ガ

ラクトシダーゼのタンパク発現が非常に高いために、4-OHT による抑制は小さすぎるのではと考えられた。

Two-hybrid アッセイ系における相互作用タンパク質の発現が少なければ、化学物質による応答が観察可能な試験系が作製できると思われた。そこで、酵母ほどタンパク質発現能が高くない、ホ乳類培養細胞ならインバーサントグニスト活性の測定が適切に出来ると考え、その構築を行った。

まず、ERR $\gamma$ -LBD と SRC1 を用いて、ヒト培養細胞として HeLa 細胞と HEK293 細胞を比較・検討した。その結果、HeLa 細胞の方が Two-hybrid 試験には適していることが判明した。また、プラスミド導入についても検討し、一過性発現が最適であることを明らかとした。こうして、遺伝子導入後、4-OHT を暴露するまでの培養時間を 6 時間とすることで、ビスフェノールAのインバーサントグニスト活性が検出できる試験系の構築に成功した。

ビスフェノールAのインバーサントグニスト活性は、ビスフェノールAの濃度を変化させて4-OHTの不活性化の減衰を観察して評価した。ビスフェノールA濃度の0, 1  $\mu$ M、10  $\mu$ Mとして、4-OHTの効果を調べたところ、ビスフェノールA濃度依存的に ERR $\gamma$ の活性の回復が検出された(図9)。

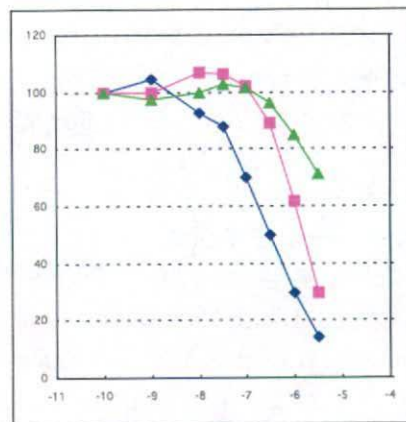


図9. ビスフェノールAのERR $\gamma$ に対するインバーサントグニスト活性  
青: BPA 0, マゼンタ: BPA 1  $\mu$ M, 緑: BPA 10  $\mu$ M。

こうして、Two-hybrid 試験系によるビスフェノールAのインバーサントグニスト活



性の測定系の構築および最適化に成功した。さらに、コアクチベータとして SRC1 だけではなく、PGC1 $\alpha$ を用いた試験系も構築した。ERR $\gamma$ -LBDと SRC1の組み合わせ、およびERR $\gamma$ -LBDと PGC1 $\alpha$ の組み合わせで、Two-hybrid試験を行ったところ、ERR $\gamma$ -LBDと SRC1の組み合わせのほうが 4-OHTの活性抑制をより良く検出できることが判明した。

#### (6) センシング抗体アッセイ法による化学物質スクリーニング

センシング抗体アッセイ法に用いるポリクローナル抗体の作製は、ヒト核内受容体 48 種について 1 種の除き、完成した。センシングアッセイ法は、特に内在性のリガンドが分かっていないオーファン受容体について、結合親和性を示す化学物質を探索するのに必須な方法である。オーファン受容体の数種、例えば、ERR $\alpha$ 、ERR $\beta$ 、ROR $\beta$ 、ROR $\gamma$ などについて結合性が推定される特定の化合物群を試験しているが、現在まで結合する化合物を発見するに至っていない。

モノクローナル抗体の作製については、ファージディスプレイ法および細胞融合法で実施するが、方法論の難易および効率より、前者を主として進めることとした。このファージディスプレイ法については、これまでにファージ抗体から目的 IgG 抗体の選別を最終段階とすることによって高効率で調製することに成就した。

#### (7) ビスフェノール A 食餌によるショウジョウバエ行動リズムの異常性

ヒト核内受容体 48 種中には ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERR $\alpha$ 、ERR $\beta$ 、ERR $\gamma$ の 5 種類のエストロゲン関連の受容体が存在するが、dERR はショウジョウバエにおいて唯一存在するエストロゲン関連の受容体である。dERR はビスフェノール A を特異的に結合する。こうしたなか、ショウジョウバエへのビスフェノール A の食餌による *in vivo* 継代試験を実施し、約 40 世代までの継代に成就した。

本研究では、これまでの多世代繁殖試験系を改良して、ビスフェノール A 含有培地で継代飼育してきたショウジョウバエオス、メス

への生殖能と歩行活動へのビスフェノール A の影響について調べた。その結果、まず、ビスフェノール A に多世代暴露されることにより、オスでは交尾能の成熟が早くなること、メスでは卵産生のピークが遅くなることが明らかとなった。また、歩行活動リズムのピークが低く活動性が分散し、多動性様の活動する個体、活動量が非常に低い個体の出現頻度が高くなることが分かった (図 10)。

ショウジョウバエでの多世代継代試験ではビスフェノール A の食餌に悪影響を遺伝子変異として定着する、あるいはそれらを継代できる可能性があり、特に、「多動性障害」症状は分子レベルでの解析への展開のため、非常に貴重な発見と思われる。

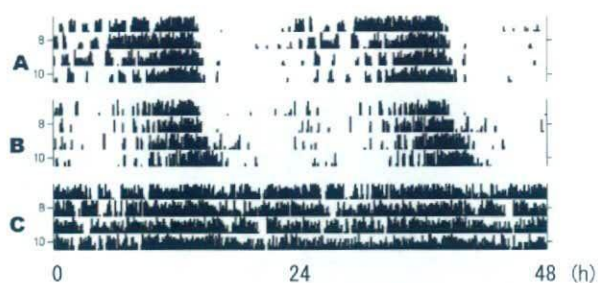


図 10. ビスフェノール A 食餌ショウジョウバエの行動リズム。

(A) 正常な概日性行動リズム、(B) リズム周期が延長した概日性行動リズム、(C) 多動性障害のため概日性行動リズムが消え、恒常的に活動。ビスフェノール A 食餌 19 世代継代したショウジョウバエでの観察 (7~10 日目の行動リズムを示す。分かり易くするため、48 時間分を表示している)。

#### (8) ビスフェノール A の自発活性化型核内受容体 ERR $\gamma$ へ結合可能な構造要因

ビスフェノール A と ERR $\gamma$  が直接に結合する構造要因は、結合体の X 線結晶構造解析によって明らかとされた。ERR $\gamma$  は自発活性化型核内受容体であり、このこととビスフェノール A の結合にどのように関連するかの分子情報は非常に貴重である。ところで、ERR $\gamma$  に結合するとき、ERR $\gamma$  ヘリックス 12 (H12) の Phe450 および Leu454 の結合ポケット充填が必須であると示唆された。一方、ERR $\gamma$  を不活性化にする 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は、H12 との相互作用はなく、むしろ、他の受容体構造が必要では



ないと推定された。そこで、H12 の受容体自発活性化およびリガンド結合の選択性における構造要因の解明を目指して、H12 を段階的に削除してリガンド結合性への影響を解析した。

C 末端よりアミノ酸 3 残基ずつ削除する方法で変異受容体を作製した (図 11)。その結果、ビスフェノール A は最初の 3 残基を除去しただけで結合できなくなることが判明した。しかし、4-OHT は H12 の削除に関係なく ERR $\gamma$  に結合し、H12 欠損体のいずれにも同様に結合することが判明した。以上の結果は、ERR $\gamma$  が H12 を活性化状態にもつときにしか、ビスフェノール A を結合しないことを証明した。

```

          430          440          450          458
WT:  ----KAVQHFFYNIKLEGGKVPMHKLFLEMLEAKV*
 $\Delta$  456-458: ----KAVQHFFYNIKLEGGKVPMHKLFLEMLE*
 $\Delta$  453-458: ----KAVQHFFYNIKLEGGKVPMHKLFLE*
 $\Delta$  450-458: ----KAVQHFFYNIKLEGGKVPMHKL*
 $\Delta$  447-458: ----KAVQHFFYNIKLEGGKVP*
 $\Delta$  444-458: ----KAVQHFFYNIKLEGGK*
 $\Delta$  441-458: ----KAVQHFFYNIK*
  
```

(下線部の432-441はH11相当、451-455はH12相当)  
 (表記法: C末端456-458の3アミノ酸残基を削除したものを $\Delta$ 456-458で表記。以下同じ。)  
 ( \* XはLBDタンパク質のC末端アミノ酸であることを示す。 )

図 11. ERR $\gamma$  に対するビスフェノール A 結合要因解析のための C 末端欠損変異体の調製

### (9) ビスフェノール A の ERR $\gamma$ への誘導適合結合

ビスフェノール A が ERR $\gamma$  に結合する構造要因は、結合体の X 線結晶構造解析によって明らかとされた。この構造と、ビスフェノール A が結合していないアポ型 ERR $\gamma$  の結晶構造と比較・検討したところ、ビスフェノール A の二つあるフェノール環の一つの受容に ERR $\gamma$  の誘導適合コンホメーション変化が起こっていることが判明した。ビスフェノール A のフェノール B 環が対峙する ERR $\gamma$  の第 11 ヘリックス (H11) に存在する Leu345 の側鎖イソブチル基が 180° 回転する。このことは、アポ型 ERR $\gamma$  と比較することで初めて明らかとなった (図 12)。さらに、この側鎖イソブチル基は相手構造によって前後に動くことが分かった。

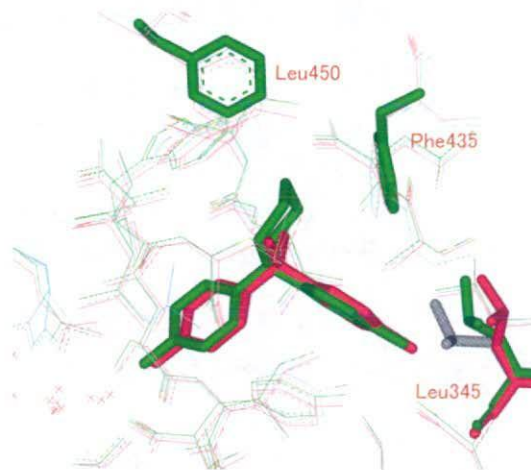


図 12. ビスフェノール Z と ERR $\gamma$  の複合体、ビスフェノール A と ERR $\gamma$  の複合体、さらにリガンド無しのアポ型 ERR $\gamma$  の重ね合わせ。灰色がリガンド無しの ERR $\gamma$  活性化型構造、緑が BPZ と ERR $\gamma$  の複合体構造、マゼンタが BPA と ERR $\gamma$  の複合体構造である。

### (10) 計算化学によるビスフェノール A の ERR $\gamma$ への結合予測

計算化学・ドッキング計算に基づいて、リガンドの受容体結合性をスクリーニングする手法は、結合親和性の予測に有用である。そこで、ERR $\gamma$  へのビスフェノール A の結合について、複合体構造が正確に予想されるかの観点からドッキング計算法を精査した。その結果、X 線結晶構造解析の結果に高く一致を示す複合体が得られ (図 13)、ドッキング計算を予測法として用いることの有用性が示された。

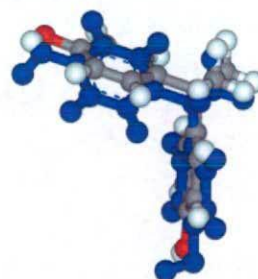


図 13 ドッキング計算により予測された ERR $\gamma$  LBD と結合したビスフェノール A の構造 (青) と実際に X 線結晶構造解析された結合体中のビスフェノール A の構造 (グレー) との重ね合わせ比較



## D. 考察

### ヒト核内受容体 48 種をアッセイする必要性

有害化学物質が相互作用する標的は核内受容体であり、有害性の本質は受容体を介するシグナル毒性であると考えられている。核内受容体は転写因子として機能する。そして、ヒト核内受容体には 48 種類ある。化学物質の内分泌攪乱作用が問題になった当初は、主として、生殖毒性を中心とする悪影響であり、したがって、生殖腺で機能するエストロゲン受容体 ER やアンドロゲン受容体 AR が標的として考えられた。しかしながら、2006 年（平成 18 年）頃になって、内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A および有機スズであるトリブチルスズの標的受容体として、ERR $\gamma$ 、RXR $\gamma$  がそれぞれ同定され、それまで想定されていた受容体 ER や AR とは全く異なっていた。これが契機となって、「ヒト核内受容体 48 種すべてについて有害化学物質の受容体応答を試験する」ことの重要性、必要性が理解されるようになった。

ビスフェノール A 標的受容体として ERR $\gamma$  を最初に発見した我々は、はじめから 48 種すべてを試験の対象として捉え、新規なアッセイ法として「コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法」の開発に取り組んだ。この取組みの動機は、化学物質が摂取されたのち、これに曝露される核内受容体として ER と AR に限定すること、そして、内分泌攪乱作用をこれらの受容体を介するものに限定して試験することの不合理性を見抜いたことである。48 種の核内受容体は、すべて化学物質に曝露される可能性があり、結合親和性が高いものがある可能性があり、悪影響を及ぼす可能性がある。

本年度、この考え方が正しいと判断できる新事実の発見が三つあった。一つは、ERR $\gamma$  に高い結合親和性を示す化合物が続々と同定されたこと。二つ目は、ER に高親和性を示すビスフェノール A 誘導体が発見されたこと。そして、三つ目は、有機スズ化合物が結合する核内受容体として PPAR $\gamma$  が同定されたこと。このように、各核内受容体について化学物質をスクリーニングすること、そして、結合性を示す化学物質について核内受容体をスクリーニングすること、双方向からのスク

リーニングが重要である。

### リスク評価スキームの構築

繰り返しになるが、特定のヒト核内受容体に対して化学物質をスクリーニングする、あるいは特定の化学物質に対してヒト核内受容体をスクリーニングするスキームの構築は緊要な課題である。現状として、ヒト核内受容体 48 種について確立しているアッセイ系は一様ではなく、各核内受容体どのようなスキームを構築するかは確立しているアッセイ系によって選択する必要がある。以下に、現状で考えられるスキームの例をあげる。

ERR $\gamma$  のように、 $[^3\text{H}]$ ビスフェノール A や  $[^3\text{H}]4\text{-OHT}$  など特定のトレーサーが使用できる場合、まず、化学物質をスクリーニングする。この場合、発現 LBD タンパク質を用いて *in vitro* で試験する。この結合試験で結合親和性が同定された化学物質について、これがどのような受容体応答を示すかについてレポーター遺伝子アッセイおよび Two-hybrid 法でアゴニスト/アンタゴニスト活性、あるいはインバースアゴニスト/インバースアンタゴニスト活性の有無、程度を調べる。こうした HeLa 細胞を用いたアッセイの結果を評価するにあたり、HeLa 生細胞結合試験により発現 LBD タンパク質を用いた試験結果と比較し、化学物質の細胞膜通過性、受容体結合親和性を試験し、*in vivo* での活性の評価指標とする。

PPAR $\gamma$  や ROR $\beta$  のように、弱いながら結合試験の可能なトレーサーが使用できる場合、同じようなスキームで実施する。使用のトレーサーよりも結合性が高い化合物が同定され、その放射標識誘導体が入手可能な場合は、結合試験を更新してからスキームを進める。

結合試験の可能なトレーサーが無い場合、センシング抗体アッセイで化学物質をスクリーニングする。これで応答する化合物があれば、レポーター遺伝子アッセイ、Two-hybrid 法で確認する。この過程でトレーサーになるものあれば結合試験を実施する。なお、核内受容体には、リガンド活性化型と自発活性化型が存在する。リガンド活性化型に対しては、アゴニスト/アンタゴニスト活性を調



べ、自発活性化型に対してはインバースアゴニスト/インバースアンタゴニスト活性を調べる。

#### ビスフェノールAの受容体選択性と特異性

我々は、胎児、乳幼児の脳神経系での悪影響、低用量作用が強く懸念されているビスフェノールAの特異的として核内受容体 ERR $\gamma$ の同定に成功した。ERR $\gamma$ 以外に結合するのか？ 核内受容体以外の受容体に結合するのか？ は、*in vivo*の効果、作用を検討する場合、特に重要である。今回、ビスフェノールAをステロイドホルモン受容体9種について調べたところ、ERR $\gamma$ 以外の核内受容体には結合しないことが判明した(論文投稿中)。他の39種類の核内受容体に対してはどうか？ が、まず問題となる。これらについても正確にスクリーニングされて行くべきである。

2008年9月に公表されたビスフェノールAに関するアメリカ National Toxicology Program (NTP) の報告書「The potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A」では、ビスフェノールAの受容体として細胞膜に発現している7回膜貫通型構造のGタンパク質共役受容体の1種GPR30が紹介されている。しかしながら、この原報はGPR30がERの天然リガンドE2(17 $\beta$ -エストラジオール)の特異的な受容体とするものであり[Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**, 1625-1630 (2005); Filardo E, Quinn YP, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* **148**, 3236-3245 (2007).]、原報を見る限りビスフェノールAへの結合親和性は非常に弱い。しかしながら、最近GPR30がE2の特異的な受容体とすることに反論する論文も報告されている[Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzemeier, K-H. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* **149**, 4846-4856 (2008).]。我々も、GPR30をCOS-7細胞

に一過性に発現させて調べたが特異的な結合を検出できなかった。また、 $^3\text{H}$ ビスフェノールAでも特異的結合を検出できなかった(未発表データ)。現在のところ、「ビスフェノールAの特異的受容体はERR $\gamma$ である」とするのが妥当である。

#### ビスフェノールAの特異的受容体ERR $\gamma$ mRNA遺伝子の組織特異的発現

ビスフェノールAの特異的核内受容体ERR $\gamma$ の発現部位について、各組織から抽出したトータルRNA(市販品: Clontech, Stratagene社, BioChain社)を用いてリアルタイムPCRで調べたところ、最も大量に発現していたのは胎盤であった[*Journal Biochemistry* 印刷中。文献11を参照]。生殖腺では、このほか前立腺(胎盤の約1/3)、精巣(約1/9)で多く、卵巣(約1/30)と子宮(約1/27)では少ない。

ERR $\gamma$ の発現は脳でも多く、胎盤の約20%の発現量であった。これに比して胎児の脳での発現量は約16%であり、胎児の脳が成人の脳の1/4の大きさしかないと考えるかなり量的に発現していることになる。この他に発現量が高いのは、腎臓、脾臓であった。

#### ビスフェノールA誘導体の核内受容体応答

先述のように、ERに高親和性を示すビスフェノールA誘導体が発見された。ビスフェノールAFは、ビスフェノールAのメチルCH $_3$ が2つともトリフルオロメチルCF $_3$ に置換したものであるが、ERR $\gamma$ には弱くしか結合せず、その代わりに、ER $\alpha$ にかなり強く結合することが判明した。一方、2つのメチル基がシクロヘキシル基に置換されたビスフェノールZは、ERR $\gamma$ とER $\alpha$ の両方にかなり強く結合することが判明した。

ここで大切なことは、これらビスフェノールAF、ビスフェノールZとともに、現在ポリカーボネートプラスチックの原材料として用いられ、その使用量がDVDやCDなどの生産のために、年々著しく増大していることである。ビスフェノールAの陰に隠れてほとんど着目されていないが、ビスフェノールA同様に環境への拡散があるとすると、その生体への影響について無視できないのではと考えられる。



## E. 結論

本研究課題では、「受容体アッセイ 4 種からなるヒト核内受容体 48 種すべてに対する化学物質リスク評価スキームの構築」として、受容体結合試験、センシング抗体法、レポーター遺伝子試験、Two-hybrid 試験のアッセイ 4 種を適用する統合的な化学物質評価スキームを構築することを目的とする。これにより、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 試験に供すべき化学物質のリストアップ、順位付け、対象核内受容体の同定など、国際的な化学物質管理の取組に資するデータを収集し、提供する。それぞれのヒト核内受容体について構築すべきスキームは、(1) 受容体結合試験⇒レポーター遺伝子試験・Two-hybrid 試験、(2) センシング抗体法⇒受容体結合試験⇒レポーター遺伝子試験・Two-hybrid 試験などと確立しているアッセイ系によって選択する必要がある。本年、平成 20 年度はまず、核内受容体アッセイ 4 種を可能にする受容体遺伝子、タンパク質の準備、試験法の確立に取組み、タンパク質全長の cDNA クローニングを完成させ、受容体結合試験に必要な受容体結合ドメイン LBD のタンパク質発現に向けたクローニングをほぼ完成させた。特に、発現タンパク質の精製法を確立し、新規に ROR や PPAR など数種について LBD 受容体タンパク質調製し、飽和結合試験より試験系を完成させた。センシング抗体については、48 種のうち 47 種について抗体の作製・精製に成就し、受容体タンパク質が入手可能な 29 種についてセンシング抗体法を確立した。

化学物質セット(ビスフェノール類 70、ベンゾフェノン類 24 種をはじめ、総計 500 種類)のスクリーニングを開始し、ERR $\gamma$  や PPAR $\gamma$  について試験した。こうしたなか、高性能プラスチック創製のため、ここ数年、生産が急上昇している代替ビスフェノール、すなわち、ビスフェノール AF やビスフェノール Z について、ER $\alpha$  や ERR $\gamma$  に高選択性や高親和性のものが発見された。一方、遺伝学的にヒト・モデルとして最適な実験動物・ショウジョウバエにビスフェノール A を多世代(30 世代)にわたって食餌し、行動リズムを計測する継代試験に成功し、その結果、高い割合で、「低活動量」、「多動性様」の症状が現れ

ることを発見した。こうした研究展開は、特に、胎児や乳幼児をはじめとする化学物質に対して脆弱な集団を保護するために、化学物質の総合的で迅速なリスク評価することを緊要の課題とする厚生労働研究事業における化学物質リスク研究事業に直接に資するものである。

## 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

### 論文発表

1. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-related Receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ). H. Okada., T. Tokunaga., Lui, X., S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Environmental Health Perspectives*, **116**, 32-38 (2008).
2. A strategy to explore the target receptor of endocrine disruptors: Estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) as a genuine acceptor of Bisphenol A. A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **14** (Special Issue), 495-497 (2008).
3. Relationship between the results of *in vitro* receptor binding assay to human estrogen receptor and *in vivo* uterotrophic assay: Comparative study with 65 selected chemicals. Y. Akahori, M. Naki, K. Yamasaki, M. Takatsuki, Y. Shimohigashi, and M. Ohtaki: *Toxicology in Vitro*, **22**, 225-231 (2008).
4. 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).
5. A docking modeling rationally predicts strong binding of bisphenol A to estrogen-related receptor  $\gamma$ . T. Nose and Y. Shimohigashi: *Protein & Peptide Letters*, **15**, 290-296 (2008).



6. Direct measure of fluorescence intensity for Efficient Receptor-binding assay: Conjugates of ethinylcarboxyestradiol and 5(and 6)-carboxy-fluorescein via  $\alpha,\omega$ -diaminoalkanes as a tracer for estrogen receptor. D. Asai, T. Tokunaga, K. Kondo, T. Kawaguchi, S. Takayanagi, T. Shinmyozu, M. Nakai, Y. Yakabe, and Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, **143**, 781-792 (2008).

7. ERR $\gamma$  tethers strongly bisphenol A and 4- $\alpha$ -cumylphenol in an induced-fit manner. A. Matsushima, T. Teramoto, H. Okada, X. Lui, T. Tokunaga, Y. Kakuta, and Y. Shimohigashi: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **373**, 408-413 (2008).

8. Bisphenol A-specific nuclear receptor ERR $\gamma$ : Structure-function analysis of the two novel isoforms lacking vital peptide fragment in the ligand binding domain. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2008*, 517-518 (2009).

9. Induced-fit type ligand binding guided by free-rotatory Leu residue present in the 7th  $\alpha$ -helix peptide in the estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ). A. Matsushima, X. Liu, T. Tokunaga, T. Teramoto, Y. Kakuta, Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2008*, 521-522 (2009).

10. ER $\alpha$ /ERR $\alpha$  nuclear receptor heterodimer directly linked by a flag peptide. S. Ikeda, A. Matsushima, Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2008*, 511-512 (2009).

11. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR $\gamma$  among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR $\gamma$  isoform. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, in press (2009).

#### 学会発表

1. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールおよびアルキルフェノールはエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) に選択的に結合する、平成 20

年度日本生化学会九州支部例会、2008.5.17-18。

2. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 曉輝、角田佳充、木村 誠、下東康幸、ビスフェノールA類似化合物のERR $\gamma$ 結合要因解析、平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008.5.17-18。

3. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型とエストロゲン関連受容体 $\alpha$ 型との共役ヘテロダイマーの新規発現系構築と応答解析、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。

4. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ビスフェノールA結合におけるエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) の構造要因解析、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。

5. 錦織充広、野瀬 健、劉 曉輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体 (ROR) のコンホメーション変化認識抗体、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。

6. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型とエストロゲン関連受容体 $\alpha$ 型とのヘテロダイマーの新規発現系構築とその活性評価、第 45 回化学関連支部合同九州大会、2008. 7. 5。

7. 村田 聡史、野瀬 健、劉 曉輝、錦織 充広、徳永 隆俊、下東 康幸、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型のリガンド認識における Leu387 を介した分子間相互作用の解析、第 45 回化学関連支部合同大会、2008. 7. 5。

8. 岡田浩幸、ビスフェノールA誘導体の核内受容体・エストロゲン受容体 $\alpha$ 型およびエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型に対する結合親和性と選択性、第 8 回泉屋コロキウム、2008.8.4-5。

9. 池田 伸、核内受容体・エストロゲン受容体 $\alpha$ 型とエストロゲン関連受容体 $\alpha$ 型とのヘテロダイマー構築、第 8 回泉屋コロキウム、2008.8.4-5。



10. Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, Xiaohui Liu, Takatoshi Tokunaga, Takamasa Teramoto, Yoshimitsu Kakuta, and Yasuyuki Shimohigashi. Structural flexibility of human nuclear receptor ERR $\gamma$  to adopt endocrine disruptor bisphenol A and its derivatives. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.
11. Yukimasa Takeda, Xiaohui, Liu, Miho Sumiyoshi, Ayami Matsushima, Miki Shimohigashi, and Yasuyuki Shimohigashi. Diversity of bisphenol A-specific nuclear receptor ERR $\gamma$  due to the alternative pre-mRNA splittings. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.
12. 下東康幸、胎盤・胎児脳に高発現の自発活性化型核内受容体ERR $\gamma$ に対する環境ホルモン・ビスフェノールAの結合とリスク、第101回日本繁殖生物学会、2008. 9.19。
13. 松島綾美、岡田浩幸、劉 曉輝、徳永隆俊、寺本岳大、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型第1ヘリックスペプチドのLeu側鎖の自由回転による適合誘導型リガンド結合、第45回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。
14. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA特異的核内受容体ERR $\gamma$ ：リガンド結合ドメインにペプチドフラグメントを欠失した2種類の新規アイソフォームの構造機能解析、第45回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。
15. 松島綾美、岡田浩幸、劉 曉輝、徳永隆俊、寺本岳太、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型第7ヘリックスペプチドのLeu側鎖の自由回転による適合誘導型リガンド結合、第45回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。
16. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、FLAGペプチド架橋によるエストロゲン受容体 $\alpha$ 型とエストロゲン関連受容体 $\alpha$ 型の共役ヘテロダイマー構築、第45回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。
17. Ayami Matsushima, Endocrine disruptor bisphenol A as an inverse antagonist of estrogen-related receptor  $\gamma$ , The 4th International Workshop on Future Molecular Systems 2008, 2008.12.8.
18. 岡田浩幸、松島綾美、劉 曉輝、下東康幸、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型に選択的に結合するビスフェノールA誘導体、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。
19. 松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 曉輝、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型と内分泌攪乱物質ビスフェノールAおよびその誘導体4- $\alpha$ -クミルフェノールの誘導適合による結合様式、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。
20. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ERR $\gamma$ のリガンド結合ドメイン一部欠損型アイソフォームの詳細なヒト組織分布と新規分子機構、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。
21. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ビスフェノールAのエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型への強い結合を支える受容体 Leu345 および Val313 残基、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。
22. 下東美樹、堤 俊博、劉 曉輝、松島綾美、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、エストロゲン関連受容体に結合するビスフェノールA食餌によるショウジョウバエ *in vivo* 継代試験、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。
23. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、核内受容体・エストロゲン受容体 $\alpha$ 型とエストロゲン関連受容体 $\alpha$ 型の共役ヘテロダイマー構築、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。
24. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、ドッキング計算を用いた探索法により見い出され



た 4-(1-アダマンチル)フェノールのエストロゲン受容体 $\alpha$ 型への高親和性結合、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。

25. 松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 曉輝、角田佳充、下東康幸、ビスフェノールA およびその類似体とエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) との X 線結晶構造解析による結合要因解析、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

26. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA 受容体ERR $\gamma$ のリガンド結合ドメイン欠如型の組織分布と新規分子機構、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

27. 下東美樹、府本 優、伊藤太一、劉 曉輝、松島綾美、谷村禎一、Ian A. Meinertzhagen、中川裕之、松本 顕、下東康幸、環境ホルモン・ビスフェノールA 暴露によるショウジョウバエの行動リズム変異、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

28. 岡田浩幸、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型に選択的に結合

する環境ホルモン・ビスフェノールAF、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

29. 野瀬 健、錦織充広、下東康幸、複数の鋳型構造を用いるドッキング計算による化学物質の核内受容体結合性解析、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

30. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、核内受容体・エストロゲン受容体 $\alpha$ 型とエストロゲン関連受容体 $\alpha$ 型の共役ヘテロダイマー構築、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12。

31. Takeru Nose, A novel sophisticated screening method to estimate the nuclear receptor activities of endocrine disrupting chemicals, The 4th Pukyong University-Kyushu University Joint Symposium on Sciences, 2009.3.7。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

当該年度に該当の出願・登録の実績はなかった。



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 $\gamma$ に対する500化学物質の受容体応答解析

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 教授  
分担研究協力者 酒井大樹 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント  
協同研究担当者 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・ $17\beta$ -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、前年度までの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 $\gamma$ 型（estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ）に非常に強く結合することを、世界で初めて発見した。平成19年度には、ERR $\gamma$ とBPA類似化合物を用いての構造活性相関解析を行い、フェノール環がERR $\gamma$ への結合に必須な構造であることを明らかとした。この結果、膨大な化合物がERR $\gamma$ に対する結合候補分子となり、火急にERR $\gamma$ について大規模な化学物質スクリーニングを行う必要性・切実性がある。

本研究においては、フェノール環を構造中に持ち、工業的にも多く使用されている化合物（合計545物質）について、網羅的なスクリーニングを行った。また、ERR $\gamma$ がER $\alpha$ と同じくステロイドホルモングループに分類される核内受容体であることから、ステロイド構造を有する化合物についても優先的に試験を行った。まずは、化合物を構造ごとに25のカテゴリーに分類した。その後、ERR $\gamma$ を組換えタンパク質として大量に発現・精製し、トリチウム標識したBPA（ $[^3\text{H}]\text{BPA}$ ）による競合結合試験により、スクリーニングを行った。その結果、29物質（試験化合物の5.3%）がERR $\gamma$ に結合することが判明した。また、化合物の構造によってリガンドとしての性質が異なる傾向が明らかとなり、特に、アルキルフェノール類は高い確率でERR $\gamma$ 結合分子となり、BPAアナログはERR $\gamma$ の強力な結合分子となる場合があることが判明した。その他にも、ビフェニルやアダマンタンの構造を有する化合物からも結合分子が同定され、こうした構造を有する化合物については、今後も試験化合物数を充実させる必要がある。

A. 研究目的

ビスフェノールA（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、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 $\gamma$ 型(estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ )に強く結合する」ことを発見した。さらに、平成19年度の本事業において実施した飽和結合試験では、BPAは  $K_D = 5.5$  nM のきわめて高い親和性でERR $\gamma$ に結合することが明らかとなり、構造活性相関解析の結果から、ERR $\gamma$ への結合には1つのOH基を持つことが必要条件であることが明らかとなった。

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(ER)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 $\alpha$ 、ERR $\beta$ 、そしてERR $\gamma$ 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 $\gamma$ はヒト成体の至る所に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 $\gamma$ を介したBPAの影響を非常に強く懸念させる。また、妊娠ラットにBPAを投与すると仔ラットは行動障害になるとの報告があり、ERR $\gamma$ 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 $\gamma$ を経由して起こるとすれば、ERR $\gamma$ に対する化学物質の影響解明や、ERR $\gamma$ に結合する化学物質の同定は火急に取り組む必要がある(図1)。

また、近年では、BPAを意識的に使用しない企業が増加し、BPA代替化合物が多く生産されるようになった。しかしながら、代表的なBPA代替化合物であるビスフェノールA F(BPAF)やビスフェノールE(BPE)などは、BPAときわめて類似した化学構造を有する化学物質であるが、その安全性(ERやERRへの結合性)は、調べられていない。平成19年度の我々の研究報告に示した通り、ERR $\gamma$ への結合要因は少なくとも1つのOH基を持つことであり、BPA代替化合物をはじめとする一連の化学物質をERR $\gamma$ についてスクリーニングすることは、リスク評価の観点からきわめて重要である。つまり、ER $\alpha$ への結合性が低いことから安全と唱われている化学物質群についても、ERR $\gamma$ への結合性という観点から再度評価を行うべきである。

そこで、本研究では、基本構造ごとに26のカテゴリーに分類した合計530物質についてERR $\gamma$ における結合試験によるスクリーニングを行った。結合試験に供する530物質のほとんどは市販品として購入可能なものであり、一般的な工業製品などに加工・使用されているものが中心である。また、受容体への結合に重要な役割を果たすフェノール環およびOH基を有する化学物質を優先的に選別した。さらに、ERR $\gamma$ と同じく核内受容体のNR3グループに分類される2種のエストロゲン受容体(ER $\alpha$ およびER $\beta$ )の生体内リガンドは、ステロイドであるため、ステロイド骨格を有する化合物についても優先的に試験する必要があると判断した。

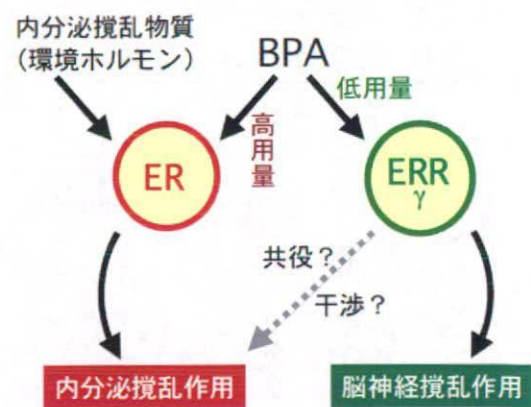


図1. ERとERR $\gamma$

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 $\gamma$ 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。



## B. 研究方法

### (1) 試験化合物の溶液調製

各種の試験化合物は、 $10^{-2}$  M となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。競合結合試験を行う際には、DMSO 溶液を水系の Binding buffer で 100 倍に希釈して使用した。すなわち、結合試験に供する場合、受容体結合試験の反応溶液中における DMSO の最終濃度は 0.1% 以下となるようにした。DMSO に溶解しない試験化合物については、加熱処理による溶解を試み、なお不溶性の化合物については、エタノールによる溶液調製を行った。また、0.1% 以下の DMSO およびエタノールが、競合結合試験に影響を与えないことを確認した。

### (2) 受容体 ERR $\gamma$ の調製

ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて ERR $\gamma$  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 (pGEX6P-1) に組み換え、エレクトロポレーション法により、大腸菌 (BL21) にトランスフェクトした。得られた大腸菌を 10 ml の LB 培地 (含アンピシリン) で 37°C 終夜培養し、新たな 1 l の 2 $\times$ TY 培地 (含アンピシリン) に全量を添加した。その後、37°C で震盪培養を行い、対数増殖期 ( $OD_{600} = 0.6$ ) において最終濃度 1 mM のイソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導を行った。これ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 ERR $\gamma$ -LBD の発現が誘導される。28°C で 16 時間培養を行い、遠心分離により菌体を回収した。回収された菌体を PBS で洗浄後、sonication buffer に再懸濁し、リゾチーム処理およびソニケーション処理によって破細した。遠心分離により可溶性画分 (上清) を回収し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズと混合し、4°C で 1 時間ロータリーインキュベートした。GST-ERR $\gamma$ -LBD が結合したビーズを PBST および PBS で洗浄後、20 mM の還元型グルタチオン溶液 (pH 8.0) により GST-ERR $\gamma$ -LBD を回収した。得られた溶液は、Sephadex G-25 によるサイズ排除クロマトグラフィーによる脱塩を行い、30%グリセロール溶液として 50  $\mu$ l ずつ分注し、-80°C にて保存した。なお、タンパク質の可溶化剤として非イオン性の界面活性剤である Triton X-100 を使用した。

### (3) 飽和結合試験

発現した ERR $\gamma$ -LBD が機能性タンパク質として発現・精製されているかを確認するために飽和結合試験による品質チェックを行った。トレーサーにはトリチウムで放射標識した BPA ( $[^3\text{H}]$ BPA) を使用した。 $[^3\text{H}]$ BPA を任意の濃度に調製し、96 穴プレートに 40  $\mu$ l ずつ分注した。

次に、 $[^3\text{H}]$ BPA の非特異的な結合数を算出するウェルには、最終濃度 10  $\mu$ M になるように、100  $\mu$ M の BPA (放射標識なし) を 10  $\mu$ l 添加した。一方、非特異的な結合数と特異的な結合数を合わせた全結合数を算出するウェルには、BPA が入っていない溶液を 10  $\mu$ l 添加した。その後、受容体タンパク質 (50  $\mu$ l) を添加した。その際、受容体タンパク質の必要量を検討するために、 $10^{-1}$ 、 $10^{-1.5}$ 、 $10^{-2}$   $\mu$ g の受容体タンパク質 ERR $\gamma$ -LBD を使用して行った。

化合物と受容体の結合反応は、受容体の失活を防ぐため、4°C、2 時間で行った。その後、遊離の  $[^3\text{H}]$ BPA を取り除くために、1% のデキストラン被膜活性炭 (DCC) 溶液を反応溶液に 100  $\mu$ l 添加し、氷上で 10 分インキュベートした。96 穴マルチスクリーンシステム (Millipore) によって吸引ろ過を行い、得られた反応溶液を液体シンチレーションカウンター (Beckman、LS6500) により測定した。

### (4) 競合結合試験

BPA 類似体など、ERR $\gamma$ -LBD への結合スクリーニングに供した化学物質については、 $[^3\text{H}]$ BPA の受容体結合を阻害する能力で ERR $\gamma$  への結合性を評価した。まず、最終濃度 3 nM の  $[^3\text{H}]$ BPA を 40  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートに分注し、 $10^{-1}$  の希釈系列で段階希釈した試験化合物を 10  $\mu$ l ずつ添加した。プレートを十分に氷上で冷やした後、最終濃度 0.32  $\mu$ g/ml の受容体タンパク質を添加し、4°C で 2 時間反応させた。

その後、氷上で 1% DCC を 100  $\mu$ l 添加し、10 分インキュベートした。96 穴マルチスクリーンシステム (Millipore) によって吸引ろ過を行い、得られた溶液 100  $\mu$ l を液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer、TopCount NXT) により測定した。化学物質の結合性を示す  $IC_{50}$  値 ( $[^3\text{H}]$ 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。



## C. 研究結果

### (1) ERR $\gamma$ の発現・精製・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 ERR $\gamma$ -LBD を発現した。飽和結合試験では、トレーサーとして [ $^3$ H]BPA を使用し、反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件については、平成 19 年度の報告と同条件で行った。その結果、前回の飽和結合試験の結果が再現され、今回の受容体発現においても機能的な受容体タンパク質が得られたことが確認された。なお、今回の一連の化学物質スクリーニングについては、すべて同一の受容体 (同じロット) を使用しており、アッセイ間でのデータのばらつきが生じないように留意した。

### (2) 競合結合試験の結果

カテゴリー別に競合結合試験を順次行い、545 物質のすべてについて競合結合試験を実施した。競合結合試験の結果をもとに ALLFIT による IC<sub>50</sub> 値の算出を行い、IC<sub>50</sub> 値が 10<sup>-6</sup> M 以下となる化合物を ERR $\gamma$  への結合性を示す化合物として評価した。

カテゴリーごとの結合物質の数、結合した化合物の割合を表 1 に示す。この結果、545 物質のうち、ERR $\gamma$  に結合する化合物は 29 物質であり、約 5% の化合物が ERR $\gamma$  に結合性を示した。カテゴリー別では、アルキルフェノール、アダマンタン、BPA アナログに多くの ERR $\gamma$  結合物質が存在することが明らかとなり、一方、ステロイド骨格を持つ化合物群では、結合する化合物が見られなかった。ERR $\gamma$  への結合には化学物質の骨格構造がきわめて重要であることが示唆された。

ERR $\gamma$  に結合した化合物の結合親和性は、BPA の ERR $\gamma$  への結合性を 100% として、相対的な結合性を表す RBA (Relative Binding Ability) を算出することで比較・評価した (表 2)。その結果、BPA よりも強く結合する化合物としてビスフェノール E (BPE) が同定されたが、これは平成 19 年度の本研究において既に同定されているものであり、今回のスクリーニングによって BPA よりも強力に ERR $\gamma$  に結合する化合物は発見されなかった。一方、BPA の結合性の 1/2~1/50 程度の結合性 (RBA=2~50%) で ERR $\gamma$  に結合する化合物が新たに数多く同定された。BPA の ERR $\gamma$  に対する K<sub>D</sub> 値が 5.5 nM であることから、これらの化合物の K<sub>D</sub> 値は、20~300 nM に相当すると考えられ、環境化学物

表 1. ERR $\gamma$  に結合した化合物数

番号	カテゴリー	化合物数	結合物数	結合率 (%)
1	BPA アナログ	37	10	27
2	BPAF タイプ	11	1	9
3	Related Compound	25	2	8
4	ベンゾフェノン	25	0	0
5	ジフェニルメタン	27	1	4
6	ジフェニル 17-ケトステロイド	13	0	0
7	ステロイド(その他)	22	0	0
8	ステロイドグリコシド	5	0	0
9	ヒドロキシケトステロイド	60	0	0
10	ヒドロキシステリド	30	0	0
11	胆汁酸	19	0	0
12	フラボノイド	74	0	0
13	フタル酸エステル	16	0	0
14	アルキルフェノール	16	8	50
15	ビフェニル	14	2	14
16	アルカン	4	0	0
17	フェノールズ	18	3	17
18	安息香酸	13	0	0
19	アダマンタン	3	1	33
20	フルオレン	2	0	0
21	塩素化合物	20	1	5
22	その他の環境ホルモン	33	0	0
23	保護アミノ酸	3	0	0
24	有機フッ素化合物	18	0	0
25	有機スズ化合物	37	0	0
合計		545	29	5.3

質としてはきわめて高い結合親和性であり、生体への影響を十分に与えうる結合性であると考えられる。また、同定されたほとんどの化合物は、構造中に少なくとも 1 つの OH 基やフェノール環を持っており、こうした構造によって ERR $\gamma$  への高い結合親和性が与えられると考えられる。しかしながら、こうした構造を持つ場合でもステロイド群などからは、ERR $\gamma$  に対する結合分子は見られず化合物の全体の構造が重要であることが判明した。



表 2. ERR $\gamma$ に結合した化合物一覧

化合物名	RBA*
Bisphenol E	121
Bisphenol A	100
4- $\alpha$ -cumylphenol	92.9
1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane	39.2
4- <i>tert</i> -butylphenol	37.7
Bisphenol B	37.5
4- <i>sec</i> -Butylphenol	30.5
4- <i>tert</i> -amylphenol	29.7
Bisphenol C	29.5
Bis(4-hydroxyphenyl) sulfide	26.0
4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenol	20.7
4-isopropylphenol	13.9
2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane	10.8
4-Benzylphenol	8.87
Bisphenol AP	8.01
Bisphenol F	7.46
Bisphenol A diacetate	6.40
2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane	6.31
4-Propylphenol	6.04
4-Phenylphenol	5.35
4- <i>tert</i> -octylphenol	4.14
4-ethylphenol	3.41
Bisphenol P	3.08
4- <i>n</i> -amylphenol	3.03
4- <i>n</i> -Hexylphenol	2.95
Bisphenol AF	2.74
4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)bisphenol	2.27
4-(1-Adamantyl)phenol	1.56
1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane	1.12
Many other chemicals	N.D.

#### D. 考察

アルキルフェノール類を中心に多くの化合物が ERR $\gamma$  に結合することが判明した。また、ERR $\gamma$  に結合した化合物のうち、ほとんどが構造中にフェノール環が少なくとも 1 つ以上含まれていた。つまり、フェノール環は、ERR $\gamma$  への結合に必要なリガンド側の構造要因であり、ERR $\gamma$  がこれを特異的に受納する構造要因を持っていることになる。こうした結果は、平成 19 年度までに我々が行った構造活性相関解析による結果を強く裏付ける結果であり、化学物質の構造によって厳

密に ERR $\gamma$  への結合が制御されていることが証明された。こうした結果は、計算化学による ERR $\gamma$  結合物質のスクリーニングが精度よく行うことが可能であること示唆するものであり、実際に本年度の研究(野瀬による分担研究の項参照)では、計算化学(*in silico*)での結合試験の有効性が証明された。

一方、ERR $\gamma$  に結合するものの、構造中にフェノール環を持たない化合物として 2 種が同定されたが、いずれも BPA 骨格を持ち、フェノール環の OH 基が就職されただけの構造体であり、基本的な結合要因を保持していると考えられる(図 1)。

一連のスクリーニングの結果の中で、特筆すべき点は、BPE や BPA のように、きわめて高い結合親和性を示す化合物から、その 1/100 以下の低い結合親和性を示す化合物まで、ERR $\gamma$  が様々な化学物質をリガンドとして許容することである。これは、環境ホルモンの標的受容体として考えられてきた ER $\alpha$  には見られない傾向であり、ERR $\gamma$  特有の性質であり、様々な物質によって ERR $\gamma$  は、その機能が攪乱される危険性があることを示している。

最近では、BPA を使用しない機運が世界的に高まっており、BPA に修飾を施した BPA 代替化合物が多く開発されている。これら BPA 類似体は、BPA と同様に工業的に使用されており、我々の生活環境中に存在するものであり、ERR $\gamma$  への結合が危惧される。本年度の研究で取り上げた 545 種の試験化合物の中には、こうした BPA 代替化合物も多く含まれており、特に、BPE、BPB、BPC、BPAP、BPF、BPP、BPAF など、ほとんどの BPA 誘導体(BPA 代替化合物や特殊ビスフェノールとして混合利用される化合物)が ERR $\gamma$  に結合したこ

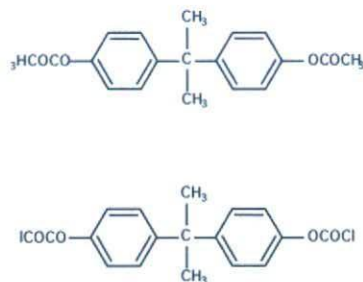


図 1. フェノール環を持たない結合分子  
(上) Bisphenol A diacetate (下)  
2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane



とは看過できない結果である。さらに、フェノール樹脂の原料、プラスチックの劣化を防ぐために添加される酸化防止剤、非イオン性の界面活性剤などに使用されて、塗料、プラスチック製品、洗剤といった形で我々の生活環境中に存在するアルキルフェノール群については、試験化合物の50%がERR $\gamma$ への結合性を示すなど、その使用にはきわめて慎重を期す必要があると考えられる。

ERR $\gamma$ に対する結合物質が多く同定される一方、ER $\alpha$ に結合性を示す17 $\beta$ エストラジオールやエストロンに代表されるステロイド群に、ERR $\gamma$ に結合する化合物は見られなかった。こうした結果から、ER $\alpha$ とERR $\gamma$ は、異なる構造の化合物に親和性を示すことが明らかとなったことから、ER $\alpha$ に対する結合試験やレポーター遺伝子試験によって安全と判断されている化合物群についても、再度ERR $\gamma$ への結合性を確認し、安全性を評価し直すことはきわめて重要である。ER $\alpha$ についての評価・スクリーニングだけでは不十分であり、ERR $\gamma$ やその他の核内受容体についてもリスク評価を行うべきであり、大規模なスクリーニングを可能にする点において、本研究課題において構築されたセンシング抗体法は、きわめて重要なスクリーニング技術として位置づけられる。

## E. 結論

化合物の基本構造に基づいて、25のカテゴリに分類される545物質について、ERR $\gamma$ との競合結合試験による網羅的なスクリーニングを行った。その結果、29物質がERR $\gamma$ への結合性を示し、きわめて高い結合親和性を示す化合物から低親和性の化合物まで、幅広い領域でERR $\gamma$ への結合分子が同定された。ERR $\gamma$ への結合は、その化学物質の骨格構造と少なくとも1つのフェノール環を持つことが重要である。特に、アルキルフェノ

ール類は高い確率でERR $\gamma$ の結合分子となり、BPAアナログは高い結合親和性を持つERR $\gamma$ 結合分子となる可能性があることが判明した。アルキルフェノールやBPAアナログは、現在、工業的に多く使用されている化学物質であり、これらがERR $\gamma$ を介して生体へどのような影響を与えるかについて、詳細なリスク評価が必要であり、まずは、ERR $\gamma$ の機能解明がきわめて重要な課題である。

## F. 研究発表 学会発表

1. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールおよびアルキルフェノールはエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) に選択的に結合する、日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。
2. 岡田浩幸、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型に選択的に結合する環境ホルモン・ビスフェノールAF、日本内分泌攪乱化学物質学会第11回研究発表会、2008. 12. 13-14。
8. 岡田浩幸、松島綾美、劉 暁輝、下東康幸、Bisphenol A Derivative that Binds Strongly and Selectively to Estrogen Receptor  $\alpha$ 、第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 9-12。

## 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

核内受容体 PPAR  $\gamma$  型に対する化学物質の受容体応答解析

分担協力研究者 酒井大樹 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

我々は内分泌かく乱物質・ビスフェノールA（BPA）が、インパースアンタゴニストとしてエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型（estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ）に非常に強く結合することを発見し、化学物質のリスク評価には、48種の核内受容体すべてを対象とし、共通のアッセイ系を用いた総合的な研究が緊要の課題であることを提言してきた。本研究課題では、核内受容体の中でも脂質代謝系や免疫系に重要な役割を担うことが知られる、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$ 型（peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PPAR $\gamma$ ）に着目し、特異的リガンドであるチアゾリジン系薬剤の $[^3\text{H}]$ rosiglitazoneを用いた受容体結合試験系の構築を試みた。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、405種の化学物質に対し PPAR $\gamma$ への結合応答解析を実施したところ、rosiglitazoneより強力に結合する化学物質は同定されなかったが、44種の化学物質において結合性が認められた。また、結合性を示した化学物質は、ビスフェノールAアナログ、ジフェニルメタン、アルキルフェノール、有機スズ化合物など構造的に多岐にわたっており、他の核内受容体に比べ大きな PPAR $\gamma$ のリガンド結合ポケットが、様々な化学物質との結合を可能にしているひとつの要因と考えられた。一方で、受容体結合試験系のみではアゴニストやアンタゴニストの区別はできず、レポーター遺伝子アッセイ系による転写活性や、我々が以前構築したセンシング抗体法を用いた化学物質の総合的な評価が今後の課題と考えられた。

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）の生体内影響が懸念されている。BPAは核内受容体のひとつである、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、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型（estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ）に強く結合する」ことを発見し、報告した。このように、環境ホルモンを含む化学物質のリスク研究は、従来おこなわれてきたERやアンドロゲン受容体

（androgen receptor; AR）のみならず、核内受容体すべて（ヒトでは48種）を対象とし、共通のアッセイ系を用いて総合的に評価することが緊要の課題となってきた。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等を含む低分子量の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。ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体（peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR）は、その名のとおり、細胞内のペルオキシゾームの増生を誘導する受容体として発見され、ヒトではPPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ と3つのサブタイプが存在するリガンド活性化型核内受容体である。これらPPARは、脂肪酸代謝を含むエネルギーホメオスタシス、脂肪細胞の分化等の生理機能に関与していることがわかっている。

特にPPAR $\gamma$ は、脂肪組織、リンパ組織、大腸、肝臓、心臓などで発現しており、インスリン感受性の亢進作用に関与していることから、糖尿病治療の重要な標的因子と考えられている他、免疫系への関



与も指摘され、最も研究が行われている核内受容体のひとつである。PPAR $\gamma$ は、内在性リガンドとして酸化脂肪酸やプロスタグランジンJ2などが報告されており、これらは $\mu$ Mのオーダーで受容体に応答する。合成リガンドとしては、チアゾリジン誘導体がPPAR $\gamma$ と強力に結合し、アゴニスト活性を示すことが報告されており、これら化学物質に関しては、構造活性相関研究も進展している。また、環境ホルモンのひとつであり、船底塗料や漁網の防汚剤として過去に使用された有機スズ化合物がPPAR $\gamma$ の転写活性を促進することが報告されている。さらに、X線結晶構造解析によりPPAR $\gamma$ は他の核内受容体と比較して非常に大きなリガンド結合ポケットを持ち( $\approx 1500 \text{ \AA}^3$ )、複数分子の化学物質が同時に結合することも示唆されている。こうしたことから、PPAR $\gamma$ は多様な化学物質に応答することが考えられる。しかしながら、そのような観点で応答化学物質を網羅的に調査した研究はほとんど実施されていない。

現在、世界では10万種類以上の化学物質が流通し、日本においても毎年300種ともいわれる新規化学物質が市場に投入されていることから、ヒトに対する有害影響が社会的に懸念されている。こうした背景から、本研究ではPPAR $\gamma$ の受容体結合試験系を用いて応答性化学物質を探索し、それら構造的特性の解明を目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 対象化学物質の選定と調整

市販されている様々な構造の化学物質(合計 405 種類)を購入した。化学物質は、それぞれ $10^{-2}$  MになるようにDMSOあるいは滅菌水で溶解し、ガラスバイアルで保存した。なお、 $10^{-2}$  Mで難溶解性の化学物質に関しては、 $10^{-3}$  Mとなるよう調整した。

### (2) 受容体 PPAR $\gamma$ の調製

Origene 社から購入した PPAR $\gamma$  全長 cDNA より、PCR を用いて PPAR $\gamma$  リガ

ンド結合ドメイン (PPAR $\gamma$ -LBD) 領域のクローニングを行った。得られた PCR 産物をタンパク質発現ベクターに組み換え、塩基配列を解読した。確認後、大腸菌 (BL21) を用いて PPAR $\gamma$ -LBD タンパク質の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -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。精製タンパク質は、SDS-PAGE および CBB 染色で純度を確認し、Bradford 法で濃度定量をおこなった。

### (3) 飽和結合試験

発現・精製した GST 融合 PPAR $\gamma$ -LBD タンパク質の機能性を確認するため、特異的リガンドである $^3\text{H}$ rosiglitazone を用いて飽和結合試験をおこなった。一定量の PPAR $\gamma$ -LBD タンパク質を 0~40 nM の $^3\text{H}$ rosiglitazone と binding buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM KCl、0.5 mM EDTA、10 mM DTT、2 mg/ml  $\gamma$ -globulins) 中で混合したものを全結合、上記混合液中に未標識の rosiglitazone を過剰量添加したものを非特異的結合とした。これら混合液を 4 $^{\circ}$ C でインキュベート後、デキストラン被膜活性炭 (dextran coated charcoal; DCC) により遊離の $^3\text{H}$ rosiglitazone を除去し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。なお、「全結合」から「非特異的結合」の数値を差し引くことにより「特異的結合」を算出した。また、Scatchard 解析を用いて、PPAR $\gamma$  に対する $^3\text{H}$ rosiglitazone の  $K_D$ 、 $B_{\max}$  値を求めた。

### (4) 競争結合試験

405 種の化学物質における PPAR $\gamma$  に対する結合能は、 $^3\text{H}$ rosiglitazone と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 $^3\text{H}$ rosiglitazone、PPAR $\gamma$ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、4 $^{\circ}$ C でインキュベート



した。遊離の $[^3\text{H}]$ rosiglitazone を DCC により除去し、TopCount NXT<sup>TM</sup>マイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンターで放射活性を測定した。対象化学物質の  $\text{IC}_{50}$  値 ( $[^3\text{H}]$ rosiglitazone の受容体結合を 50% 阻害する値) は、プログラム ALLFIT により算出した。

### C. 研究結果

#### (1) PPAR $\gamma$ に対する飽和結合試験：発現・精製タンパク質の機能性評価

$[^3\text{H}]$ rosiglitazone を用いた飽和結合試験により、発現・精製した PPAR $\gamma$ -LBD タンパク質の機能性を評価した。図 1 に示したように、 $[^3\text{H}]$ rosiglitazone 濃度依存的な放射活性の増加が確認され、Scatchard 解析により  $K_D$ 、 $B_{\text{max}}$  値はそれぞれ 15.3 nM、4.45 nmol/mg と算出された。

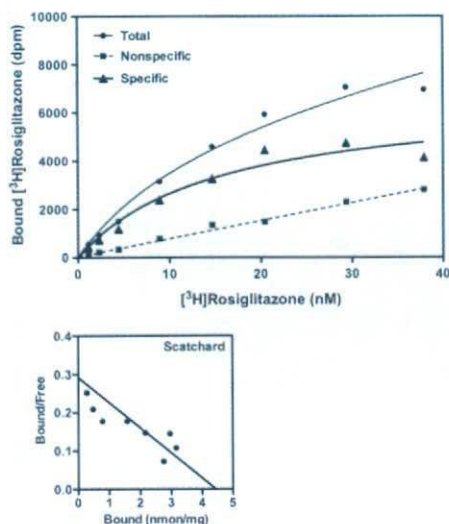


図1.  $[^3\text{H}]$ rosiglitazone を用いた PPAR $\gamma$  飽和結合試験

#### (2) PPAR $\gamma$ に対する競争結合試験：応答性化学物質の探索

競争結合試験により、PPAR $\gamma$  に結合応答する化学物質のスクリーニングをおこなった。供試した全 405 種の中で、44 種の化学物質が PPAR $\gamma$  に結合することが判明した。一方、本研究でスクリーニングした化学物質の中には、PPAR $\gamma$  に対して rosiglitazone より強力に結合するもの

は見つからなかった。表 1~4 は、PPAR $\gamma$  と結合した化学物質を、その化学構造の類似性、あるいは化学物質の種類によりまとめたものである。今回のスクリーニングにおいて、PPAR $\gamma$  はビスフェノール A アナログ (表 1)、ジフェニルメタン

表1. PPAR $\gamma$  と結合したビスフェノール A アナログの構造と  $\text{IC}_{50}$  値

化学物質番号	構造	$\text{IC}_{50}$ 値 ( $\mu\text{M}$ )
Rosiglitazone		0.0324
1-16		0.565
1-17		0.955
1-21		4.20
1-26		NC
1-3		0.532
1-2		2.27
1-18		1.33
1-20		NC
1-24		NC
3-12		NC
1-5		NC

NC: 算出できず



(表2)、アルキルフェノール(表3)、環境ホルモン(表4)を含むいくつかの化学物質と弱いながらも結合性を示すことが明らかになった。

表2. PPAR $\gamma$ と結合したジフェニルメタンの構造とIC<sub>50</sub>値

化学物質番号	構造	IC <sub>50</sub> 値 ( $\mu$ M)
5-25		NC
5-18		NC
5-4		0.320
1-13		0.402
1-33		NC
5-2		1.23
5-13		3.05
5-17		1.71
5-12		5.48
5-6		NC

NC: 算出できず

#### D. 考察

[<sup>3</sup>H]rosiglitazone を用いた PPAR $\gamma$  飽和結合試験の構築を試みた。本研究で得られた K<sub>D</sub> 値は、これまで報告されているものよりやや低かったが (43 nM)、良好な結果といえる。

飽和結合試験の結果を元に、競争結合試験を実施したところ、PPAR $\gamma$  は、ビス

フェノールAとは結合しなかったものの、その類縁化学物質と結合することが明らかになった(表1)。化学物質の構造的特徴をみると、PPAR $\gamma$  はビスフェノールAのフェニル環メタ位に、何らかの元素が付加した構造を有する化学物質と比較的強く結合した。また、同部位については、ハロゲン分子が付加した1-2や1-3のような化学物質が、PPAR $\gamma$  と強い結合性を示したことから、結合に強さに重要な要素である可能性が考えられた。さらに、結合性は低いものの、パラ位のヒドロキシル基がさらに修飾されたものや、1-5に代表されるように2つのフェニル環の接続部位が、メチル基からさらに複雑な構造になった化学物質に対しても応答することが明らかになった。

ジフェニルメタン類においても同様に、ヒドロキシル基やメチル基を持つものにはそれほど結合性を示さなかったが、塩素に置換した5-4、1-13等で強い結合性が認められ(表2)、ハロゲン分子の重要性が示唆された。

表3で示したアルキルフェノール類については、ノニル、あるいはオクチルフェノールと弱い結合性を示し、アルキル基の長さが結合の強弱に関わっていることが推察された。

表3. PPAR $\gamma$ と結合したアルキルフェノール類の構造とIC<sub>50</sub>値

化学物質番号	構造	IC <sub>50</sub> 値 ( $\mu$ M)
18-7		3.64
18-13		NC
18-9		NC
22-21		NC
14-12		NC

NC: 算出できず