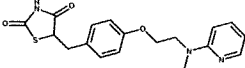
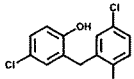
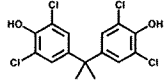
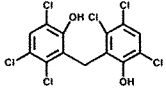
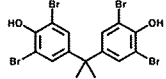
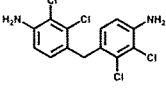
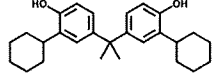
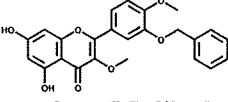
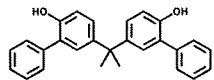
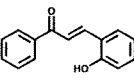
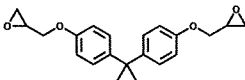
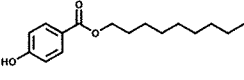
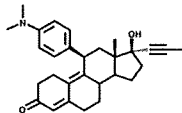
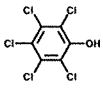
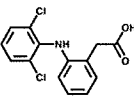


表 4. 核内受容体 PPAR γ に対する化学物質の活性 : ロシグリタゾンに対する比活性

化学物質名/構造	相対結合能 (%)	化学物質名/構造	相対結合能 (%)
 Rosiglitazone	100	 Dichlorophen	6.4
 Tetrachlorobisphenol A	0.68	 Hexachlorophene	5.7
 Tetrabromobisphenol A	3.6	 Bis(4-amino-2,3-dichlorophenyl)methane	0.87
 2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane	3.3	 3'-Benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone	0.51
 2,2-Bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane	1.6	 2-Hydroxychalcone	1.3
 2,2-Bis(4-glycidyloxyphenyl)propane	0.87	 4-Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -nonyl ester	0.45
 RU486	1.2	 Pentachlorophenol	0.80
		 Diclofenac	0.95

⑤ レチノイン関連オーファン受容体 (ROR)
レチノイン関連オーファン受容体・、トレーサーが確定していない核内受容体である。しかしながら、名前から分かるように、RORにはレチノインが結合する。そこで、 $[^3\text{H}]$ all-*trans*-retinoic acid (ATRA) を標準化合物に用いて ROR β に対して調べたところ、解離定数 K_d 値は 65.5 nM であり、かなり

弱い結合親和性しか示さないことが判明した。 $[^3\text{H}]$ ATRA をトレーサーにした競合結合試験では事実、ATRA は 441 nM の IC_{50} 値しか示さず、とても特異的、強いとは言えない程度の結合親和性であった。しかし、競合結合試験としては一応成立していることから、現在まで化学物質 455 種類を試験し、その結合性の強弱で分類した (表 5)。

表5. 核内受容体 ROR β に対する 500 化学物質の活性

結合性 (IC ₅₀ 領域)	化合物
強い (1~100 nM)	該当なし
かなり強い (100~1000 nM) (5 種類)	<ul style="list-style-type: none"> • all-<i>trans</i> retinoic acid • 2,2-bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane • 2,2-bis(3-<i>sec</i>-butyl-4-hydroxyphenyl)propane • 4,4'-dihydroxytetraphenylmethane • 17α-hydroxyprogesterone caproate
弱い (1~10 μ M) (10 種類)	<ul style="list-style-type: none"> • tetrabromobisphenol A bis(2-hydroxyethyl) ether • 9,9-bis(4-hydroxyphenyl)fluorene • 2,2'-dihydroxydiphenyl methane • 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol • nonylphenol • 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)-diphenol • 1,1-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane • ergosterol • <i>p</i>-dodecylphenol • bis(4-hydroxyphenyl)sulfide
非常に弱い (>10 μ M) (74 種類)	<ul style="list-style-type: none"> • BPA アナログ(12 種) • ベンゾフェノン(2 種) • アルキルフェノール(5 種) • ヒドロキシステロイド(6 種) • 一般ステロイド(1 種) • ジフェニルメタン(2 種) • ビフェニル(4 種) • フタル酸エステル(8 種) • 塩素化合物(7 種) など
結合しない (412 種類)	<ul style="list-style-type: none"> • BPA アナログ(27 種) • ベンゾフェノン(23 種) • ヒドロキシステロイド(21 種) • 一般ステロイド(18 種) • 胆汁酸(18 種) • ジフェニルメタン(23 種) • フラボノイド(10 種) • アルキルフェノール(5 種) • ビフェニル(8 種) など

⑥ 構成的アンドロスタン受容体 (CAR)

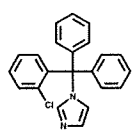
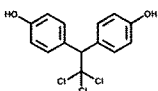
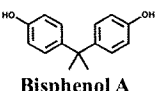
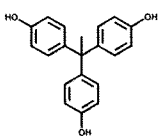
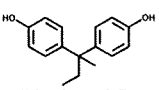
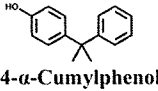
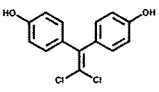
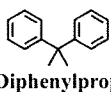
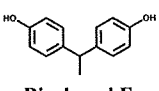
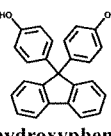
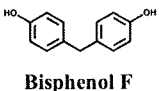
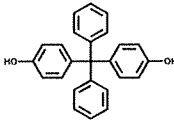
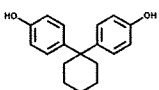
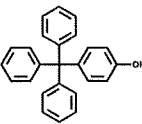
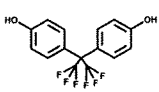
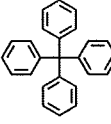
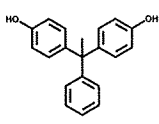
核内受容体の中でも異物代謝や糖新生等に重要な役割を担う構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor; CAR) に着目し、ヒト CAR に対するアンタゴニストである抗真菌薬剤の [³H]clotrimazole (クロトリマゾール) を用いた受容体結合試験系の構築に取り組んだ。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、ビスフェノール化合物 130 種類に対し CAR への結合性解析を実施したところ、ビスフェノール A (BPA) をはじめいくつもの類縁化合物がクロトリマゾールと同等の強さで CAR に結合することが判明した (表6)。また、 [³H]BPA を用いた受容体飽和結合試験及び競合結合試験により、BPA の CAR に対する結合能は、ERR γ に対する結合能と同等であり、CAR が第2のビスフェノール受容体であることが明らかになった。

こうした結果から、BPA の低用量効果については、ERR γ のみではなく CAR についてもその関与を解析する必要があると考えられる。また、結合に関わるビスフェノール化合物の構造要因を解析した結果、ビスフェノール A にある 2 つのメチル基とフェノール環が、強い結合の分子基盤になっていることが示唆された。

⑦ その他の核内受容体

48 種の核内受容体の中で特異的な内在性リガンドが分かっているものは半数にも満たない。平成 21 年度は、こうした核内受容体の中でトリチウム標識の標準化合物が判明している受容体を優先的に試験、スクリーニングしてきた。AR、GR、RXR α 、RXR β 、RXR γ 、Rev-er α 、Rev-er β 、FSR、VDR などである。しかしながら、現時点までにその受容体結合性が見られる化学物質は見つかっておらず、内分泌攪乱作用が疑われる事例は発見されていない。流通している化合物すべての試験は可能ではないが、少しでも結合が観察されるものがあれば、同類の構造ホモログの試験よりある程度強く結合するものが期待されるが、該当する核内受容体は現在まで見つかっていない。

表6. 核内受容体 CAR に対する化学物質の活性：クロトリマゾールに対する比活性

化学物質名/構造	相対結合能 (%)	化学物質名/構造	相対結合能 (%)
 Clotrimazole	100	 HPTE	61.7
 Bisphenol A	42.8	 1,1,1-Tris(p-hydroxyphenyl)ethane	12.3
 Bisphenol B	124.5	 4-α-Cumylphenol	8.1
 Bisphenol C	16.8	 2,2-Diphenylpropane	結合なし
 Bisphenol E	2.1	 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorene	36.4
 Bisphenol F	結合なし	 4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane	59.8
 Bisphenol Z	42.0	 4-Hydroxytetraphenylmethane	17.8
 Bisphenol AF	63.7	 Tetraphenylmethane	結合なし
 Bisphenol AP	33.6		

(2) 生細胞受容体結合試験

本試験では、HeLa 細胞に核内受容体を一過的に強制発現させ、これにより発現した核内受容体について、 $[^3\text{H}]$ 標識されたリガンドを用いて結合試験を実施する。今回、核内受容体として、ER α 、ER β 、GR、CAR、RXR α 、RXR β 、RXR γ 、PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ について試験系の構築を試みた。ER α およびER β に対しては17 β -エストラジ

オール、GR に対してはデキサメタゾンのトリチウム標識体、その他については4-OHTを用いて実施した。受容体結合のため、25°C、1時間インキュベートし、その後に細胞の洗いの操作を実施した。その細胞洗浄によってB/F分離が実施できる。

結合試験で最も重要な操作の一つはB/F分離である。細胞洗浄によって実施する場合、丁寧に洗いを繰り返す実施することが非特異

的結合を少なくし、特異的結合から競合結合試験の実施に結びつける最も重要な要件である。さらに、洗浄の後、Triton X で細胞を溶解させるが、この操作も重要な成因の一つである。

この測定では化学物質の通過性を反映した上で評価されることになる。したがって、細胞膜に吸着性の高いもの、細胞膜リン脂質に捕捉・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、昨年度 (H21 年度) までに生細胞系での結合試験は、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について試験するにした。

(3) ビスフェノール A の核内受容体結合試験スクリーニング

ビスフェノール A が $ERR\gamma$ に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。昨年度は、 $ERR\gamma$ 以外に、 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $ERR\alpha$ 、 $ERR\beta$ 、AR、PR、GR、MR の 8 種の核内受容体、ステロイドホルモン受容体について試験した。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。

今回、ビスフェノール A が強く結合する核内受容体を探索するために、 $ERR\gamma$ 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以外について、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。そして、上述のように今回、CAR が第二のビスフェノール A 受容体として発見された。その他の核内受容体、PPAR γ 、ROR β 、Rev-er α 、Rev-er β 、RXR α 、RXR β 、FSR、VDR などにはまったく結合しなかった。

(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。昨年度までに、ビスフェノール A、E および AF、4- α -クミルフェノール、4-*tert*-ブチルフェノールは全て、 $ERR\gamma$ の基盤活性を変化させないことが判明した。一方、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は $ERR\gamma$ の基盤活性を下げ、不活性化するインバーサ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こうしたインバーサゴニスト活性は、 $ERR\gamma$ に結合する他の化合物にも見られることが明らかとなった。インバーサ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。

本年度、 $ERR\gamma$ よりも ER に高い受容体結合親和性を示すビスフェノール AF について詳細に調べた。 α 型のサブタイプ $ER\alpha$ に対してビスフェノール AF はアゴニストで、100%フルな活性を示した (図 6)。ビスフェノール A は、17 β -エストラジオールおよびビスフェノール AF とは異なり、10 μ M でも 100%活性を示さず、60~70%の活性に留まった。

一方、 β 型に対しては、ビスフェノール AF は不活性であった (図 7)。10 μ M でも $ER\beta$ 受容体サブタイプは、ほとんど活性化

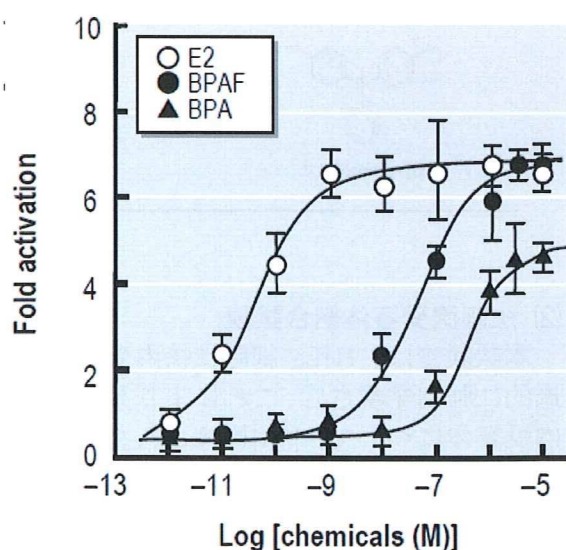


図 6. レポーター遺伝子アッセイによる $ER\alpha$ に対する転写活性可能試験

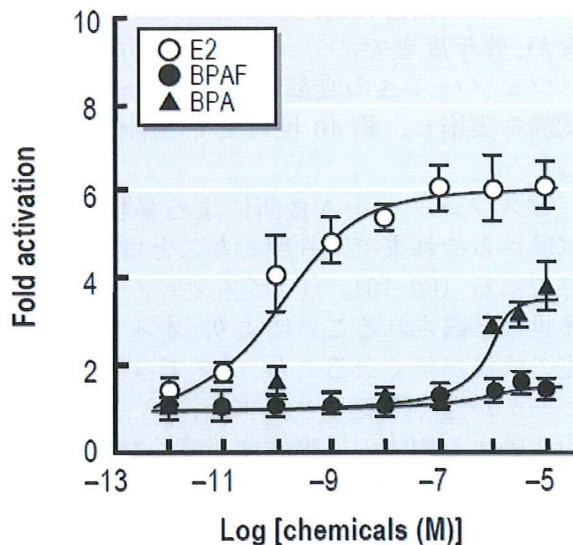


図 7. レポーター遺伝子アッセイによる $ER\beta$ に対する転写活性化能試験

されず、不活性と判定された。ところで、ビスフェノール AF は、 $ER\beta$ に強く結合するので ($IC_{50} = ca. 19 \text{ nM}$)、この不活性はビスフェノール AF がアンタゴニストである可能性を示唆した。そこで、天然リガンドである E2 に対して阻害活性があるかを 2 つの方法で調べた。

まず、0.1、1、10 μM のビスフェノール AF 存在下で、E2 の活性を調べた。その結果、図 8 に示すように、E2 の濃度依存活性曲線は高濃度側にシフトした。これは、ビスフェノール AF が受容体を部分的に占有し、その分 E2 の結合できる受容体が少なくなり、活性が弱くなったことを意味する。一方、10 nM E2 は 100%フルな活性を示すが、これにビスフェノール AF を共存させると、同様に E2 の結合できる受容体が少なくなり、活性が減衰することになる。ビスフェノール AF の濃度が高くなるほど減衰巾が大きくなり、濃度依存的に $ER\beta$ の活性を抑制することになる (図 9)。こうして、ビスフェノール AF は $ER\beta$ のアンタゴニストであるという新事実が判明した。

(5) ホ乳類培養細胞 Two-hybrid 法

昨年度に $ERR\gamma$ -LBD と SRC1 を用いた酵母 Two-hybrid 法を検討した結果、酵母では β -ガラクトシダーゼのタンパク発現が非常に

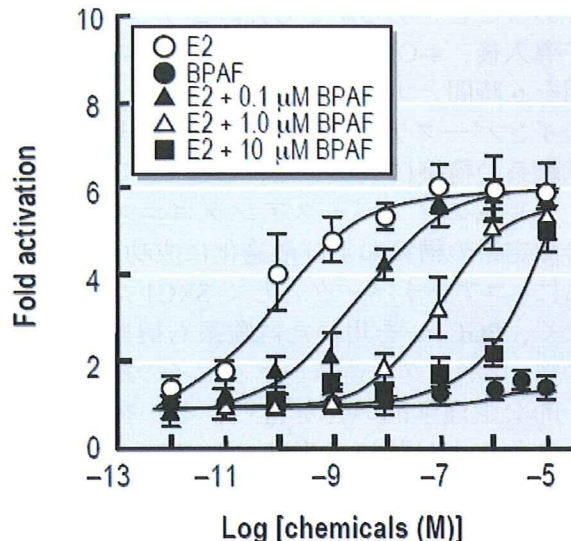


図 8. 一定濃度 BPAF 存在下における $ER\beta$ に対する E2 の転写活性化能試験

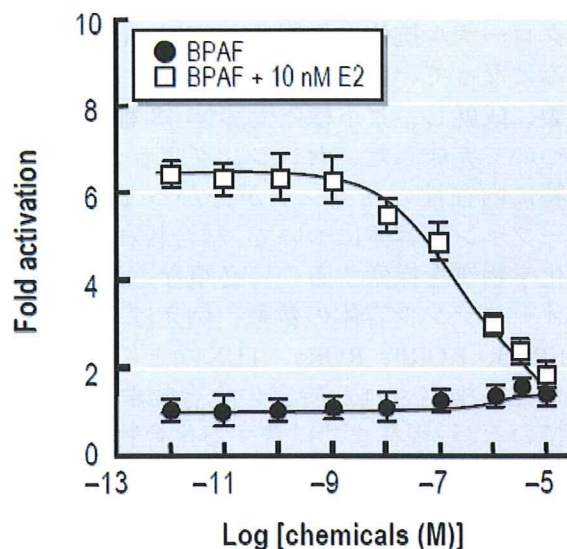


図 9. 10 nM の E2 存在下における $ER\beta$ に対する BPAF の転写活性化能試験

高く、不活性化するインバースアンタゴニスト活性は観察することはできないことが判明した。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スアンタゴ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。 $ERR\gamma$ -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のインバースアゴニスト活性が検出できる試験系の構築に成功した。そして、ビスフェノールAのインバースアンタゴ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 α を用いた試験系も構築した。今後、レポーター遺伝子アッセイの結果と統一的な生理学的応答が得られるかを検証することを主目的に、現在、ビスフェノールAFのER受容体との反応性について検討している。

(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、GCNF-1を残すのみになっていたが、平成21年度、これの調製に成就し、ヒト核内受容体48種すべてについて完成した。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 α 、ERR β 、ROR β 、ROR γ 、TLX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までに至っていない。

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 α 、ER β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ 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、昨年度までに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。

ビスフェノールA食餌による多世代繁殖試験からこれまでに判明したことは、次の3点である(図10)。①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。また、②多動性様の活動する個体の出現頻度が高くなること。さらには、③活動量が非常に低い個体の出現頻度が高くなること。

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。今年度、こうした解析のため、特定の活動異常のショウジョウバエのオスとメスを交配し、活動リズムを測定した。この測定により、多動性障害には、明期多動性障害と明期暗期多動性障害の二通りの症状があることが新たに判明した。

野生型のショウジョウバエの活動リズムは、朝方と夕方に合計2つのピークがある。これを「二峰性」と呼び、ホ乳類まで同様である。朝方ピークから夕方ピークまでの「明期」活動静止期と、夕方ピークから翌日の朝方ピークまでの「暗期」活動静止期が存在す

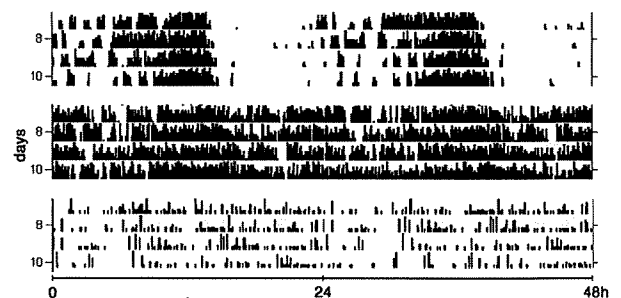


図10. ビスフェノールA食餌ショウジョウバエの行動リズム。

(A) 正常な概日性行動リズム。(B) 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。(C) 概日性行動リズムが消え、活動量が非常に低い。ビスフェノールA食餌で多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)。

るが、前者が静止期ではなく活動期になったのが「明期多動性障害」であり、前者に加えて後者も活動期になったのが「明期暗期多動性障害」である。

(8) 神経分化におけるビスフェノールAの内分泌攪乱作用の解析

本年度より新たに、ショウジョウバエ株化ニューロンを実験モデルとしてビスフェノールAの神経分化における影響解析を開始した。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。

ところで、体内にある生物時計が刻む概日リズムに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。そこで、化学物質の神経分化へ及ぼす影響の作用機序解析を目指し、ショウジョウバエ幼虫の神経系から樹立された株化ニューロンを実験モデルとして用いて、神経分化の過程における核内受容体を介した内分泌攪乱作用を解析することを目指した。その結果、培養液中のビスフェノールA (BPA) の濃度が溶出基準の2.5 ppmで成長中のニューロンの突起伸長を阻害すること、また、エクジソン遺伝子の発現が昂進される事が明らかとなった。

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

ビスフェノールAとERR γ 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 γ 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重要である。ところで、ERR γ に結合するとき、ERR γ 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 γ 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との相互作用は無く、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 γ 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 γ 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。すなわち、ERR γ のビスフェノールA結合および自発活性化には、H12が必須な構造要因であることが証明された。

```

          420           430           440           450           458
WT: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLEHLEAKV*
A458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLEHLEAK*
A457-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLEHLEA*
A456-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLEHLE*
A455-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLEHLE*
A454-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLEH*
A453-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL458FLE*
A450-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP450MHKL*
A447-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GKVP*
A444-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKLE440GK*
A441-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN430IKL*
A438-458: ----TLPLLRTSTKAVQH420YFN*
A435-458: ----TLPLLRTSTKAVQH*
A432-458: ----TLPLLRTSTKA*

```

(“ ”: H11 相当する部位; “ ”: H12 相当する部位)
(C末端側458の1アミノ酸残基削除をA458で表記、以下表記方法同じ)

図11. ERR γ 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

(10) ビスフェノールAのERR γ への誘導適合結合

ビスフェノールAがERR γ 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 γ 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 γ 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 γ 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。

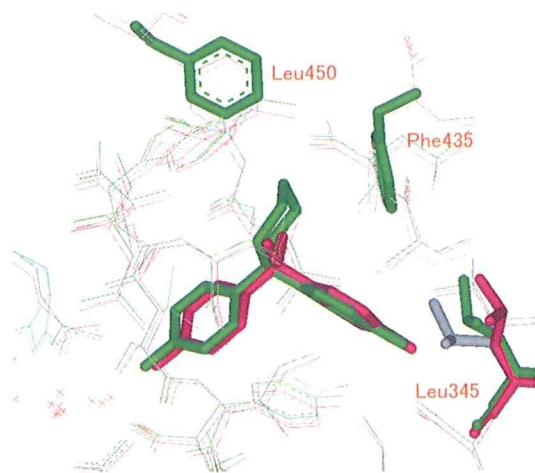


図 12. ビスフェノール Z と $ERR\gamma$ の複合体、ビスフェノール A と $ERR\gamma$ の複合体、さらにリガンド無しのアポ型 $ERR\gamma$ の重ね合わせ
灰色がリガンド無しの $ERR\gamma$ 活性型構造、緑が BPZ と $ERR\gamma$ の複合体構造、マゼンタが BPA と $ERR\gamma$ の複合体構造である。

(11) 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

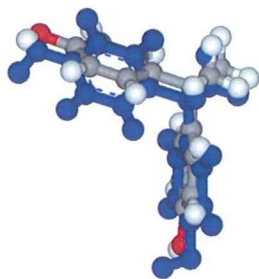


図 13 ドッキング計算により予測された $ERR\gamma$ LBD と結合したビスフェノール A の構造 (青) と実際に X 線結晶構造解析された結合体中のビスフェノール A の構造 (グレー) との重ね合わせ比較

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。

エストロゲン受容体受容体 α 型は、これまでに最も研究が進んだ核内受容体として注目されている。この受容体においては、複数の異なる活性を持つリガンドが結合した立体構造が同定されている。そこで本研究では、このエストロゲン受容体受容体 α 型のリガンド結合部位構造を複数用いたドッキング計算を用いて、化学物質の受容体結合性が予測可能かの検討を行った。その結果、アルキルフェノール類、特に、1-アダマンチルフェノールの高親和性結合を予測可能であるなど、ドッキング計算の有用性が示された。

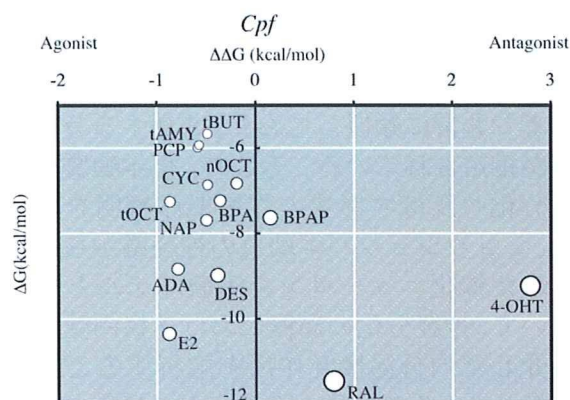


図 14 4つの鑄型を用いたドッキング計算により予測された種々の化学物質の $ER\alpha$ -LBD との結合性と生物活性

縦軸 (ΔG): ドッキング計算により算出された平均の結合性パラメータ (単位 kcal/mol)

横軸 ($\Delta\Delta G$): ドッキング計算により算出された、アゴニスト結合型およびアンタゴニスト結合型への結合性パラメータの差。○印は、分子の大きさを示す。

この方法では、既知のアゴニスト (17 β -エストラジオール (E2)、DES) およびアンタゴニスト (ラロキシフェン (RAL)、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT)) を用いて、それぞれの活性コンホメーションを検討した。その結果、アゴニストは、 $ER\alpha$ の活性化型コンホメーションと、アンタゴニストはアンタゴニスト結合型コンホメーションとより高い結合親和性を持つことが判明した。

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 γ 、RXR γ 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 γ 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。

昨年度、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 γ 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 γ が同定されたこと。さらに今年度（平成 21 年度）には新たにきわめて重要な新発見が二つあった。一つは、ビスフェノール A の特異的受容体として CAR が同定されたこと。そして二

つ目は、ビスフェノール AF がエストロゲン受容体 α 型 ER α にフルに活性なアゴニスト、ER β に不活性はアンタゴニストとして同定されたこと。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ことが次々と証明されている。

リスク評価スキームの構築

『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。(2)(3)(4)(5)

(1) ERR γ 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、受容体結合試験によって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。

(2) PPAR γ や ROR β 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。

(3) 結合試験に使用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。

アッセイが困難なのは事例(3)の場合である。センシング抗体アッセイ法の確立は、各受容体について実施する必要がある、かなりの労力を必要とする。これは、リガンドと受容体との特異的な分子間相互作用に加えて、受容体とセンシング抗体との特異的な分子間相互作用によって保証される応答を検出することをその原理としているためである。これにより、非常に特異性の高い解析法となる。現在、ROR や Rev-erb など逐次に進めているが、有効なセンシング能の設定に困難が伴っているのが現状である。このため、SPR 法による直接的な分子間相互作用の測定を併用することも必要かも知れない。

ビスフェノール AF の核内受容体応答

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。既に、ERR γ には弱くしか結合せず、その代わり、ER α にかかなり強く結合することは報告済みであった。ところが、今年度新たに、ER β にはさらに強く結合することが判明した。この ER β においてビスフェノール AF は、さらに予想外の受容体応答を見せた。すなわち、自らは不活性であり、E2 に対して阻害活性を示したことである。

ビスフェノール AF については、米国の国家毒性プログラム・NTP がその毒性を詳細に調べるべき化学物質としてノミネートしている。2008 年 9 月のことである。同年の

11 月には、ビスフェノール AF に関する「NTP Research Concept」が発表され、ビスフェノール AF について判明している疑問点等が整理され、課題が提示された。それによると、ビスフェノール AF にはビスフェノール A よりも強いエストロゲン様活性がある一方、エストロゲンを阻害する活性があることが特徴として強調してある。エストロゲンを阻害した実例としては、次のように記述してある。In a vitellogenin production assay in male carp hepatocytes, while bisphenol AF alone demonstrated estrogenic activity, bisphenol AF inhibited vitellogenin production by 17 β -estradiol, demonstrating anti-estrogenic activity; a similar pattern was observed in the uterotrophic assay (bisphenol AF \pm ethinyl estradiol). まさにこれは、我々が今年度発見した「ビスフェノール AF は ER α ではアゴニスト、ER β ではアンタゴニストとして機能する」ことで説明される。

今回のビスフェノール AF に関する研究成果は、Environmental Health Perspective 誌に受理された。現時点でも掲載予定の状態であるが、アメリカの Science News 誌 (2010 年 6 月 5 日号、14 頁: Web 掲載は 5 月 14 日) がこの論文について、Another plastics ingredient raises safety concerns —Bisphenol A's 'twin' may have more potent hormone effects — という題目で紹介し、これが多くの Web ソース、あるいは雑誌等で引用されて、現在大きな話題になっている。これは、化学物質リスク研究事業での本研究課題の推進がなくては実現しなかった研究成果であると、深く感謝している。

ここでさらに大切なことは、ビスフェノール AF を含む、いわゆる「新世代ビスフェノール」、あるいは「特殊ビスフェノール」の数々が、高機能ポリカーベネートプラスチックや高性能エポキシ樹脂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絶対に無視できないと考えられる。

E. 結論

「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」と題した本研究課題では、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の構築をめざしている。このスキームにより、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、提供することを目的とする。本年度、米国 NTP によりテスト化合物にノミネートされたビスフェノール AF について、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ)、エストロゲン受容体 α 型 (ER α) およびエストロゲン受容体 β 型 (ER β) について受容体結合試験、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを実施し、『ビスフェノール AF は ER α のアゴニスト、ER β のアンタゴニスト』という新事実を国際学術誌に発表したが、これは正にこうした研究目的を実地に達成したものである。

ビスフェノール A の特異的受容体として構成的アンドロスタン受容体 (CAR) を新たに発見した。ERR γ に次ぐ第二の受容体である。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実施し、ROR や RAR などさまざまな核内受容体について試験した。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新世代ビスフェノールについて、CAR 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 を多世代にわたって食餌し、活動リズムを計測する継代試験において、「低活動量」症状、「多動性様」症状のハエを同定した。今回さらに、多動性症状において「明期多動性症状」と「明期暗期多動性症状」の区別があることを発見し、これらをそれぞれ交配して、それらの出現率を 40~50% までに上げることに成功した。こうした多動性症状は明らかに時計遺伝子、時計タンパク質に異常がありためと思われる。

このように、本研究課題の実施に際しては、詳細なリスク評価を必要とする化学物質をスクリーニングし、同定することに成就し、また、リスク評価すべきとしてノミネートされた化学物質について核内受容体スクリーニングし、受容体応答性の特徴を同定することに成就した。こうした本研究展開は、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. Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR γ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., and Shimohigashi, Y.: *Journal of Biochemistry*, in press.
2. Bisphenol AF is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α , but a Highly Specific Antagonist for ER β . Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: *Environmental Health Perspectives*, in press (doi:10.1289/ehp.0901819).
3. Functional role of the C-terminal Helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor γ (ERR γ). Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., and Shimohigashi, Y.: *Peptide Science* 2009, 435-436 (2010).
4. The agonist/antagonist differential-docking screening (AADS) method for exploration of the estrogen receptor-binding chemicals. T. Nose and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2009, 463-464 (2010).
5. 放射標識化合物を用いた受容体結合試験による特異的受容体の同定・解析: ビスフェノール A が結合する特異的受容体 ERR γ : 岡田浩幸, 下東康幸: *RADIOISOTOPES*, **58**,

43-46 (2009).

6. Exploration of endocrine disrupting chemicals on estrogen receptor α by the agonist/antagonist differential-docking screening method: T. Nose, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi, *Toxicology Letter*, **191(1)**, 33-39 (2009).

7. Bisphenol A-specific nuclear receptor ERR γ : 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).

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

9. Bisphenol A-specific Nuclear Receptor ERR γ : 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, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi, *Peptide Science 2008*, 517-518 (2009).

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

11. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR γ isoform. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, **146**, 113-122 (2009).

学会発表

1. 下東康幸、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東美樹、ビスフェノール AF は ER α には強いアゴニスト、ER β には強いアンタゴニストである、環境ホルモン学会 第 12 回

研究発表会、2009.12.7-8。

2. 野瀬 健、下東康幸、女性ホルモン受容体の化学物質結合性予測計算における受容体構造の役割、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

3. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ヒト核内受容体 ERR γ ・C 端ヘリックス 12 のリガンド結合性および受容体活性化機構、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

4. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、核内受容体 CAR におけるビスフェノール化合物の応答性解析、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

5. 岡田浩幸、松島綾美、酒井大樹、劉 曉輝、磯野裕章、池田 伸、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) における 500 物質の結合スクリーニング、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

6. 錦織充広、野瀬 健、下東康幸、500 化学物質のレチノイド関連オーファン受容体 β 型 (ROR β) への結合性、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

7. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α および ERR ファミリーの共発現細胞でのエストロゲンの効果、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

8. 永田祐介、野瀬 健、錦織充広、下東康幸、核内受容体 Rev-erbs に対するヘム結合性の分光学的測定、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

9. 下東美樹、山田隆弘、久間祥子、住吉美保、古賀啓太、松島綾美、中川裕之、下東康幸、株化細胞 BG2-c6 を実験モデルとした環境ホルモン・ビスフェノール A のリスク評価、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

10. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、核内受容体 PPAR γ における 500 物質のスクリーニング、環境ホルモン学会

第12回研究発表会、2009.12.7-8。

11. Shimohigashi Miki, Itoh Q. Taichi, Honda Takeshi, Tuzuki Hitomi, Saito Midori, Koga Keita, Takahashi Kuniaki, Matsushima Ayami, Ueda Ryu, Tanimura Teiichi, Nakagawa Hiroyuki, Matsumoto Akira and Shimohigashi Yasuyuki: PAP Peptide Coded in pdf Gene is Necessary to Persist the Circadian Locomotor Rhythm in Insect. Third Asia-Pacific International 2009 Peptide Symposium, Shineville Luxury Resort, 済州島, 2009.11.8-11。

15. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸、和文タイトル：受容体活性化機構におけるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) C 端ヘリクックス 12 ペプチドの寄与、第 46 回ペプチド討論会、2009.11.4-6。

16. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、エストロゲン受容体結合性化学物質のアゴニスト/アンタゴニスト差ドッキング計算法による探索、第 46 回ペプチド討論会、2009.11.4-6。

17. 下東美樹、松永裕美、住吉美保、岡田浩幸、古賀啓太、松島綾美、下東康幸：内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールAのショウジョウバエ核内受容体に及ぼす影響。第 82 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

18. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸：マウス胎仔期に発現ピークを示す核内受容体遺伝子の解析。第 82 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

19. 岡田浩幸、松島綾美、巢山慶太郎、劉 曉輝、下東康幸：ビスフェノール化合物はエストロゲン受容体およびエストロゲン関連受容体を介して複合的に作用する、第 82 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

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 γ 前駆体mRNAの選択的スプライシングによる分子多様性。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

21. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、核内受容体PPAR γ における化学物質の応答性解析、第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

22. 錦織充広、野瀬 健、下東康幸、核内受容体ROR β のリガンド結合特性の解析および新規リガンド発見へのアプローチ、第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

23. 野瀬 健、下東康幸：ドッキング計算を用いたエストロゲン受容体 α 型に対する化学物質結合性評価法におけるリガンド結合ポケット構造の重要性。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

24. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α およびERR α 共発現による相乗的活性増強作用の解析。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

25. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸：エストロゲン関連受容体 γ 型のリガンド結合選択性および自発活性化の構造要因。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

26. 下東美樹、久間祥子、山田隆弘、住吉美保、古賀啓太、下東康幸、中川裕之：株化細胞BG2-c6による環境ホルモンの影響評価。第31回日本比較生理生化学会大会、千里ライフサイエンスセンター、2009.10.23-24。

27. 赤岩裕也：マウス胎仔期における核内受容体の発現解析と核内受容体遺伝子発現機構に対する考察。第 9 回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。

28. 池田 伸、核内受容体・エストロゲン受容体 α 型およびエストロゲン関連受容体 α 型の活性増強作用の解析、第 9 回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。

29. 永田祐介、ヒト核内受容体 Rev-erb に おける化学物質結合性評価法の開発を目的としたヘム結合性の解析、第 9 回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。

30. 錦織充広、競合結合試験を用いた核内受容体 ROR 結合性化学物質のスクリーニング、第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
31. 西垣内 誠、ヒト前立腺がん細胞において ERR γ を転写制御因子とする核内受容体の探索、第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
32. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸：マウス胎仔期における自発活性化型核内受容体の発現解析. 第46回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2009.7.11。
33. 永田祐介、野瀬 健、錦織充広、松島綾美、下東康幸：第12 α -ヘリックス欠損ヒト核内受容体 Rev-erb におけるヘム結合性の解析. 第46回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2009.7.11。
34. Shin Ikeda, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi : Synergistic transactivation of estrogen receptor α and estrogen-related receptor α . 第19回日韓ジョイントセミナー、釜山展示場、釜山、2009.5.29-30。
35. Mitsuhiro Nishigori, Takeru Nose, Satoshi Murata, Yusuke Nagata, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi : Screening of Endocrine Disruptor for Retinoid-related Orphan Receptor β (ROR β) by the Competitive Receptor Binding Assay. 第19回日韓ジョイントセミナー、釜山展示場、釜山、2009.5.29-30。
36. Hiroki Sakai, Xiaohui Liu, Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada and Yasuyuki Shimohigashi : Binding-affinity screening of 500 structurally diverse chemicals for human PPAR γ receptor. 第19回日韓ジョイントセミナー、釜山展示場、釜山、2009.5.29-30。
37. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸：マウス胎仔期における自発型核内受容体 mRNA の日齢期特異的発現、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
38. 池田 伸、松島綾美、下東康幸：エストロゲン平成21年度日本生化学会九州支部例会受容体 α 型 (ER α) とエストロゲン関連受容体 α 型 (ERR α) の転写活性制御機構の解析、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
39. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸：PPAR γ への化学物質の結合親和性、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
40. 野瀬 健、下東康幸：アゴニスト/アンタゴニストの差ドッキング計算による女性ホルモン受容体に対する化学物質結合性のスクリーニング、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
41. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸：エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) 誘導体のリガンド結合選択性および自発活性化要因の解析、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。

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

核内受容体 RAR α 、 β 、 γ 型に対する化学物質の受容体応答解析

研究分担者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院 教授
研究実施者 劉 暁輝 九州大学大学院理学研究院 学術研究員

研究要旨

内分泌攪乱物質としてビスフェノールA（BPA）の生体内悪影響が懸念されている。我々は最近、BPA がインバースアンタゴニストとして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。現在では、ヒト核内受容体 48 種類すべてに内分泌攪乱化学物質問題が存在すると考えられる。本研究では、胚や器官の形成、組織のホメオスタシス、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関わる遺伝子の発現を制御している核内受容体であるレチノイン酸受容体（Retinoic acid receptors ; RARs）に着目し、特異的リガンドであるの³H]all-trans retinoic acid（³H]ATRA）を用いた受容体結合試験系の構築を試みた。 α 、 β 、 γ のいずれのサブタイプについても、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。この試験系において、ATRA および 9-cis retinoic acid (9-cis RA) は RARs 受容体に強く結合することが分かった。そして、ビスフェノールAアナログ、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、合成エストロゲンおよび精巣毒性関連物質など合計 43 種化学物質に対し RAR α 、 β 、 γ への結合応答解析を実施したところ、今回実験した化学物質はいずれも RARs 受容体と結合しないことが分かった。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質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は女性ホルモン作用を示し、その作用は女性ホルモン受容体であるエストロゲン受容体（estrogen receptor ; ER）を介するとされてきた。しかし、BPAのERへの結合能、活性は天然ホルモンであるエストロゲン（E2）に比べると1/1,000～1/10,000と非常に弱く、このER説には疑問が呈されていた。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「低用量問題」についても、低用量作用が実際にERを介しているのか、議論になっていた。こうしたなか我々は最近、BPA

が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 ）と非常に強く結合することを発見した。

これまで、「内分泌攪乱物質」問題は、女性ホルモン受容体（estrogen receptor ; ER）、男性ホルモン受容体（androgen receptor ; AR）、甲状腺ホルモン受容体（thyroid receptor ; TR）の3種類の核内受容体に限って調べられている。ヒト・ゲノム解読が完了した現在では、ヒト核内受容体には合計 48 種類が存在し、これらすべてに内分泌攪乱物質の問題が存在すると考えられる。我々は、化学物質のリスクを正確に評価するためには、「可能な限り多くの、あるいは全ての核内受容体について影響を解析すべき」と考えられた。

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。レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor ; RARs) は、レチノイドX受容体 (RXRs) と共にレチノイン酸シグナル伝達に關与する核内受容体であり、3種類のサブタイプ α 、 β 、 γ が知られている。all-*trans* retinoic acid (ATRA) はRARs共通の内在性リガンドとして報告されており、その結合性はきわめて高いとされている。RARsはステロイドホルモン受容体などと共通構造を持ち、核内受容体のグループIに属する。ビタミンA、レチノイン酸と結合すると遺伝子プロモーター領域の結合配列エレメントに結合し、遺伝子の発現調節を行い、脊椎動物の胚や器官の形成、組織のホメオスタシス、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関わる遺伝子の発現を制御している。また、RARsは、リガンドが結合していない状態でRXRsとヘテロダイマーを形成し、エレメントに結合した状態で存在すると考えられている。RAR α 、 γ のノックアウトマウスは成長障害や骨形成異常が見られるが、急性前骨髄性白血病との関連も報告されている。

RARsは、内在性リガンドとしてall-*trans* retinoic acid (ATRA) や9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA) および13-*cis* retinoic acid (13-*cis* RA) が報告されており、これらはRAR α 、 β 、 γ とも高い結合親和性で受容体に結合する。合成リガンドとしては、TTNPB、BMS204493、AGN193103などが α 、 β 、 γ 型に共通なリガンドとして報告されている。TTNPBはRARs共通的なアゴニストであり、BMS204493およびAGN193109はRARsのアンタゴニストである。また、RAR α 、 β 、 γ それぞれについて選択的アゴニストやアンタゴニストが報告されている。いくつかの化学物質に関しては、構造活性相関研究も実施されている。しかしながらこれまで、RARsを内分泌攪乱物質の標的の一つとして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約300種化学物質が新規市場に投入されている。これらの化学物質は、ヒトに対する有害影響が懸念されているが、系統的な調査は実施されていない。本研究ではRAR α 、 β 、 γ の受容体結合試験

系を確立し、それ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て取り込んだ。今年度は、まずビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類など合計43種化学物質を選定し、RAR α 、 β 、 γ に対する結合性を調べた。

B. 研究方法

(1) 対象化学物質の選定と調整

ビスフェノールAアナログ、ビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、精巢毒性関連物質など合計43種化学物質を選定した。化学物質の溶液調製は、それぞれ 1.0×10^{-2} Mになるようにした。当初、DMSOで溶解して調製した。また、原液はガラスバイアルに保存した。

(2) 受容体 RAR α 、 β 、 γ タンパク質の調製

Origene社から購入したRAR α 、 β 、 γ 全長cDNAより、PCRを用いてそれぞれの受容体リガンド結合ドメイン (RAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -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pGEX-6p-1に組み換え、塩基配列を解読した。配列を確認後、大腸菌 (BL21) を用いてRAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBDタンパク質の大量発現を行った。この際、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されることになる。37°Cで大腸菌はO.D.₆₀₀値が0.6~1.0に達した後、イソプロピル1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) を0.3 mMになるよう添加し、16°Cで約20時間振盪培養を行った。その後、細胞を通常の方法で処理し、タンパク質画分を得た。精製は、GSTと特異的に結合するグルタチオンセファロース4Bビーズ次いで、ゲルろ過によって行った。精製タンパク質は、SDS-PAGEで純度を確認し、Bradford法で濃度定量を行った。

(3) 飽和結合試験

発現・精製したRAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBDそれぞれのGST融合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 $[^3\text{H}]$ ATRAを用いて飽和結合試験を行った。それぞれ一定量のタンパク質を0~30

nM の ^3H all-*trans* retinoic acid (^3H ATRA) と binding buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 10% glycerol, 1 mg/ml ovalbumin, 0.3 mg/ml γ -globulins (pH 7.5)) 中で混合したものを全結合として測定した。次いで、この混合液中に未標識の 10 μM ATRA を添加して測定し、これを非特異的結合とした。反応は 20°C で 2 時間静置した。その後、リガンド未結合の放射リガンドを除去するために、0.4% のデキストラン被膜活性炭 (dextran coated charcoal; DCC) を反応溶液に添加し、氷上で 10 分間静置後、遠心分離もしくはフィルタープレートを用いて遊離の ^3H ATRA 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、RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する ^3H ATRA の K_d 、 B_{max} 値を求めた。

(4) 競争結合試験

43 種の化学物質における RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する結合能は、 ^3H ATRA 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 ^3H ATRA、RAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、20°C で 2 時間をインキュベートした。遊離の ^3H ATRA を DCC により除去し、TopCount NXTTM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 IC_{50} 値 (^3H all-*trans* retinoic acid 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) RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する飽和結合試験

飽和結合試験を行ったところ、RAR α (図 1)、RAR β (図 2)、RAR γ (図 3) とともに ^3H ATRA の特異的結合を確認することができた。Scatchard 解析により、RAR α では $K_d = 7.58$ nM、 $B_{\text{max}} = 5.74$ nmol/mg、RAR β では $K_d = 7.35$ nM、 $B_{\text{max}} = 2.52$ nmol/mg、RAR γ では $K_d = 11.6$ nM、 $B_{\text{max}} = 3.23$ nmol/mg

と算出された。

文献によると、リガンド all *trans*-retinoic acid (ATRA) は、シリコナイズしてもガラス、プラスチックに非常に吸着されるため、非特異的な結合が多いとされている (Sablonnière S, *et al.* Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement. *Analytical Biochem.*, **217**, 110-118 (1994))。本研究グループでは当初よりこうした「化学物質の吸着性」については、対策を取っており、ここでは「1 mg/ml ovalbumin、0.3 mg/ml γ -globulins」による保護法を用いて吸着を防いだ。

飽和結合曲線から特異的結合は全結合の 40~50% あり、スキッチードプロット解析の結果より、 K_d および B_{max} について算定したところ、上記のように、良好な解析値が得られた。この結合試験を行うに十分と判断された。また、受容体の発現量も結合試験を行うに十分な量が確保できた。

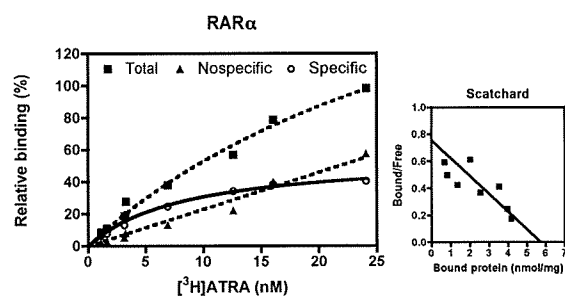


図 1. RAR α 飽和結合試験

RAR α に対する ^3H ATRA の全結合(■)、特異的結合(O)、非特異的結合(▲)を示す。

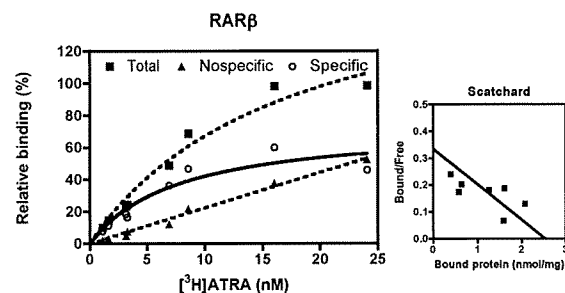


図 2. RAR β 飽和結合試験

RAR β に対する ^3H ATRA の全結合(■)、特異的結合(O)、非特異的結合(▲)を示す。

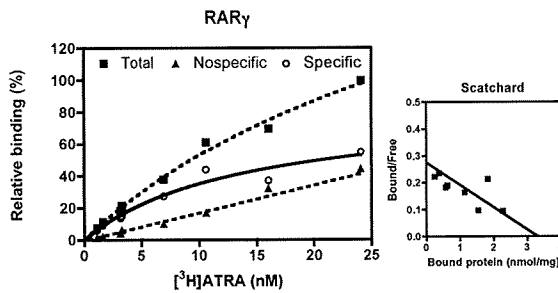


図 3. RAR γ 飽和結合試験

RAR γ に対する $[^3\text{H}]$ ATRA の全結合(■)、特異的結合(O)、非特異的結合(▲)を示す。

(2) RAR α 、RAR β 、RAR γ 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、RAR α 、RAR β および RAR γ に結合応答する化学物質を探索するため、本試験では、ビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、合成エストロゲンおよび精巣毒性関連物質など合計 43 種の代表的な化学物質を選定した。これらを表 1 に示す。

3 nM $[^3\text{H}]$ ATRA を用いて競争結合試験を行った。対照として用いた ATRA の IC₅₀ 値は、それぞれ 14.6 nM (RAR α)、32.4 nM (RAR β)、37.5 nM (RAR γ) であった。また、RARs のリガンドである 9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA) も結合が見られたが、今回実験に対象とした化学物質 43 種いずれも、どのサブタイプにも結合性を示さないことが判明した。

D. 考察

$[^3\text{H}]$ ATRA を用いた RAR α 、RAR β 、RAR γ 飽和結合試験の構築を試みた。本研究で得られた K_d 値は、これまで報告されているものと同様であった。飽和結合試験の結果を基に、競争結合試験を実施したところ、標準化学物質はいずれも妥当な IC₅₀ 値を示し、強い結合性が証明された。ただし、15~38 nM 程度であり、K_d 値 7~12 nM に比べてかなり小さく、ATRA の構造安定性純度について課題が残った。この競争結合系を用いて、一連の化学物質を試験した結果、いずれの RARs 受容体とも結合しないことが分かった。

RARs の X 線結晶構造解析により、リガンドである ATRA は、そのカルボキシル基が

表 1 競争結合試験に用いた化学物質リスト

化学物質名
<u>BPA アナログ (7 種)</u>
bisphenol B
bisphenol C
bisphenol A
bisphenol E
bisphenol AF
2,2-bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane
2,2-bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane
<u>ステロイド類 (13 種)</u>
17 β -estradiol (E2)
estriol (E3)
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol
17 α -estradiol
equilin
progesterone
dexamethasone (DEX)
cortisone
5 α -dihydrotestosterone (DHT)
testosterone
aldosterone
trenbolone
hydrocortisone
<u>フラボイド類 (4 種)</u>
coumestrol
biochanin A
genistein
diadzein
<u>アルキルフェノール類 (2 種)</u>
4-tert-butylphenol
4-nonylphenol
<u>その他環境ホルモン (4 種)</u>
gossypol
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)
diethylstilbestrol (DES)
tamoxifen (TAM)
<u>精巣毒性関連物質 (13 種)</u>
flutamide
1,4-dichloro-2-nitrobenzene
cyproterone acetate
vinclozolin
butyl benzyl phthalate
nitrobenzene
hydroxyflutamide
vinclozolin metabolite M2
mono-n-butyl phthalate
mono-benzyl phthalate
di (2-ethylhexyl) phthalate
di-n-pentyl phthalate
mono (2-ethylhexyl) phthalate

受容体の K236 (H3) および R278 (H5) との静電結合、S289 (β ターン) との水素結合により受容体に強く結合している。これまで報告された RARs と結合する内在性リガンドである ATRA や 9-*cis* RA、合成リガンドである TTNPB や BMS204493 など、すべてカルボキシル基を持つ化学物質であることから、カルボキシル基は RARs に結合する重要

な構造要因でと思われる。今後、カルボキシル基を持つ化学物質、例えば、一群の高級脂肪酸を中心して、RARs 結合する化学物質を探索する必要がある。また、カルボキシル基以外の構造的特性を解明することも大切である。RARs は生命活動の根源に関わる遺伝子、タンパク質の発現調節に関与していることから、外因性化学物質は重大な攪乱作用をもたらす可能性が強く適正な結合性評価が急務である。

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・学会発表

特になし。

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 γ 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、インバースアンタゴニストとして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、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 γ 型 (peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PPAR γ) に着目し、特異のリガンドであるチアゾリジン系薬剤の [3 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、482 種の化学物質に対し PPAR γ への結合性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、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、フラボノイド、内分泌攪乱物質など構造的に多岐にわたる 68 種の化学物質において結合性が認められた。PPAR γ は他の核内受容体に比べ大きなリガンド結合ポケットを持つことが知られており、こうしたこと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。また、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、PPAR γ に比較的強く結合した化学物質の転写活性を解析したところ、大部分の化合物は弱いアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性を示したが、一部の化学物質はアゴニストの rosiglitazone と共処理することでさらに活性が増加し、ヘテロダイマーを構成する RXR との関係について詳解することが必要と考えられた。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質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 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。このように、内分泌攪乱物質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化学物質の受容体として発見され、ヒトでは PPAR α 、PPAR δ/β 、PPAR γ 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 γ 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、