

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 γ は、内在性リガンドとして脂肪酸やそれらの代謝物、プロスタグランジンJ2などが報告されており、これらは $\sim\mu$ 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 γ と強力に結合して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、内分泌攪乱物質のひとつであり、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 γ に強く結合し、転写活性の増加を誘導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 γ 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(≈ 1500 Å³)、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 γ は多様な化学物質に応答することが考えられるが、そのような観点で応答する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 γ の受容体結合試験およびレポーター遺伝子アッセイを用いて応答性化学物質を探索することを目的とした。

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 482 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) 発現プラスミドの調製

Origene社から購入したPPAR γ cDNAより、PCRを用いてPPAR γ 全長及びリガンド結合ドメイン(LBD)領域をクローニングし、制限酵素処理後、PPAR γ 全長はpcDNA3.1(+), LBDはpGEX6p-1ベクターに挿入した。レポータープラスミドは、ラット *acyl-CoA oxidase (AOX)* 遺伝子上流プロモーター領域に存在するPPAR 応答配列 (PPRE) を3回タンデムにコピーしたものを合成し、pGL4.23ベクターに挿入した。作製したすべてのプラスミドは、塩基配列を解読して挿入の有無を確認した。

(3) 受容体 PPAR γ の調製

PPAR γ -LBD タンパク質の発現は、大腸菌 (BL21) を用いて行った。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。精製タンパク質は、SDS-PAGE および CBB 染色で純度を確認し、Bradford 法で濃度定量を行った。

(4) 飽和結合試験

発現・精製した GST 融合 PPAR γ -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 [³H]rosiglitazone を用いて飽和結合試験を行った。一定量の PPAR γ -LBD タンパク質を 0 ~ 40 nM の [³H]rosiglitazone と binding buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM KCl、0.5 mM EDTA、10 mM DTT、2 mg/ml γ -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°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 [³H]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 γ に対する ^3H rosiglitazone の K_D 、 B_{max} 値を求めた。

(5) 競合結合試験

482 種の化学物質における PPAR γ に対する結合能は、 ^3H 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 ^3H rosiglitazone、PPAR γ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、4°Cで一晩インキュベートした。遊離の ^3H rosiglitazone 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 rosiglitazone の受容体結合を 50%阻害する値) は、GraphPad Prism ver. 5.0 により算出した。

(5) レポーター遺伝子アッセイ

PPAR γ との結合性が明らかになった化学物質の中で、比較的強い結合を示した 13 種類について、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより PPAR γ の転写活性化能を評価した。至適条件のレポータープラスミド、PPAR γ 発現プラスミドを HeLa 細胞に一過性発現させ、評価する一連の化学物質を単独処理し、アゴニスト活性を解析した。また、PPAR γ のアンタゴニスト活性は、100 nM の rosiglitazone と対象化学物質を複合処理することにより評価した。

C. 研究結果

(1) PPAR γ 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

^3H rosiglitazone を用いた飽和結合試験により、発現・精製した PPAR γ -LBD タンパク質の機能性を評価した。図 1 に示したように、 ^3H 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_{max} 値はそれぞれ 16.2 ± 1.24 nM、 3.37 ± 0.40 nmol/mg protein と算出された。

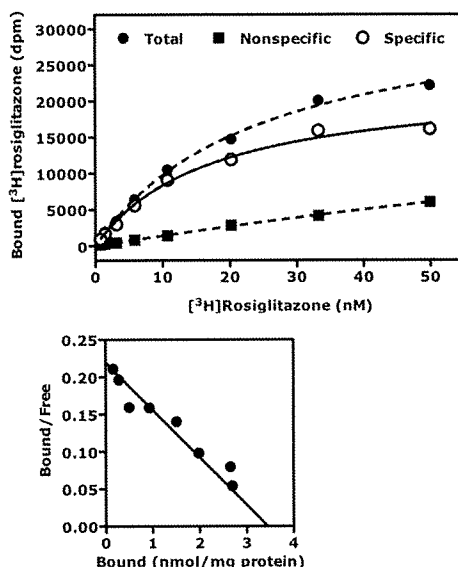


図 1. ^3H rosiglitazone をトレーサーとした PPAR γ の飽和結合試験

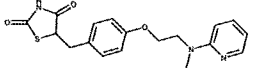
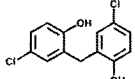
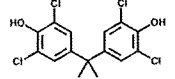
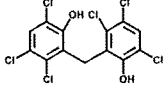
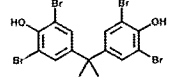
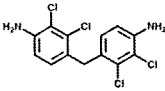
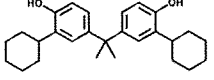
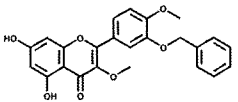
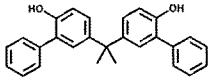
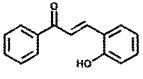
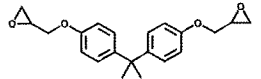
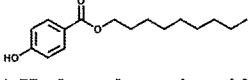
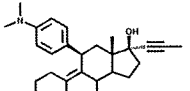
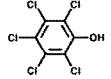
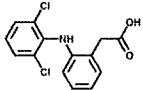
(2) PPAR γ に対する競合結合試験：結合性化学物質の探索

競争結合試験により、PPAR γ に結合する化学物質のスクリーニングを行った。供試した全 482 種の中で、68 種の化学物質が PPAR γ に結合することが判明した。しかしながら、本研究でスクリーニングした化学物質の中には、PPAR γ 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 は、PPAR γ と結合した化学物質について、 IC_{50} 値が算出されたものを rosiglitazone に対する相対結合能 (%) としてまとめたものである。今回のスクリーニングにおいて、PPAR γ 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、フラボノイド、内分泌攪乱物質等を含むいくつかの化学物質と比較的強く結合することが明らかになった。

(3) PPAR γ レポーター遺伝子アッセイ：結合性化学物質におけるアゴニスト/アンタゴニスト活性の評価

HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、PPAR γ に比較的強く結合することが判明した化学物質のアゴニス

表1. PPAR γ と結合した化学物質の構造とrosiglitazoneに対する相対結合能

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'-Benzoyloxy-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-glycidyoxyphenyl)propane	0.87	 4-Hydroxybenzoic acid <i>n</i>-nonyl ester	0.45
 RU486	1.2	 Pentachlorophenol	0.80
		 Diclofenac	0.95

ト/アンタゴニスト活性を解析した。まず、対象化学物質を単独処理し、PPAR γ のアゴニスト活性を解析した。その結果、rosiglitazone より強い活性を示す化学物質は見つからなかったが、試験した大部分の化学物質で弱いアゴニスト活性を示したが、hexachlorophene では活性の変化

は認められなかった(図2)。また、RU486は、最大活性は低かったものの比較的低濃度でPPAR γ の転写活性を誘導した。

次に、PPAR γ のアンタゴニスト活性を評価した。PPAR γ はリガンド活性化型の核内受容体であることから、アゴニストのrosiglitazone (100 nM) と対象化学物質

を複合処理することにより、アンタゴニスト活性を解析した。その結果、PPAR γ 選択的なアンタゴニストである T0070907 と比較し強いアンタゴニスト活性を示す

化学物質は見つからなかったが、hexachlorophene、2-hydroxycalcione、RU486 は比較的強いアンタゴニスト活性を示した。(図3)。一方で、2,2-bis(2-hydroxy-5-

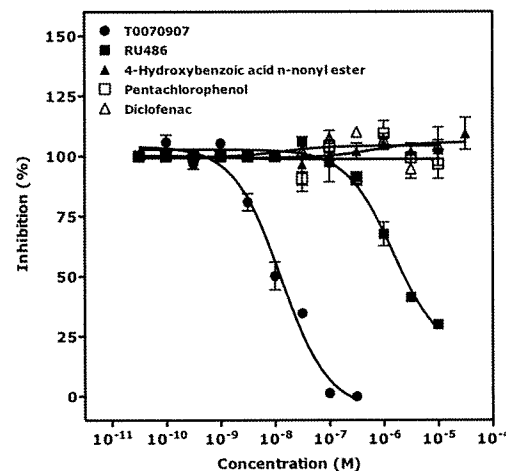
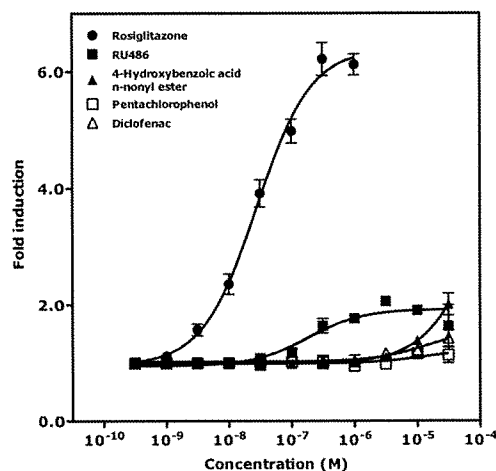
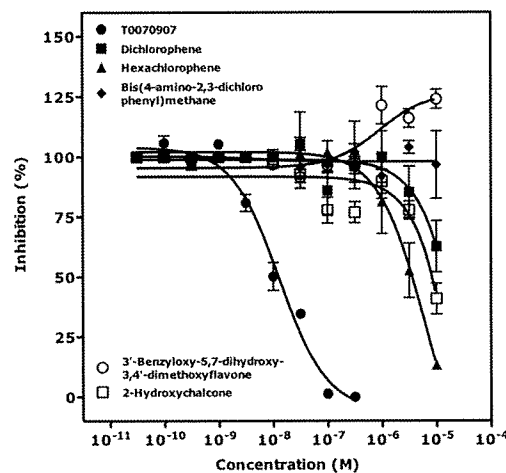
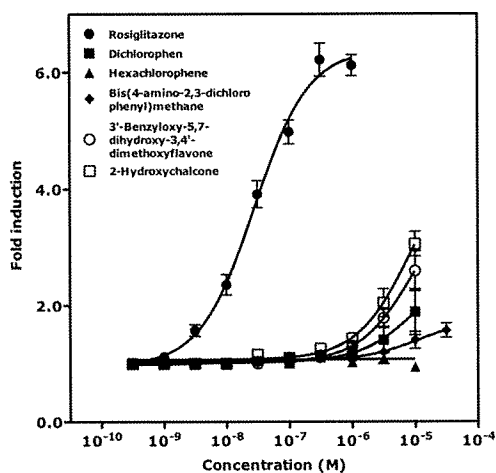
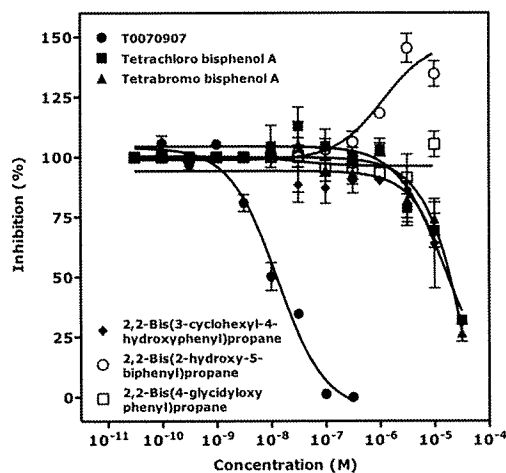
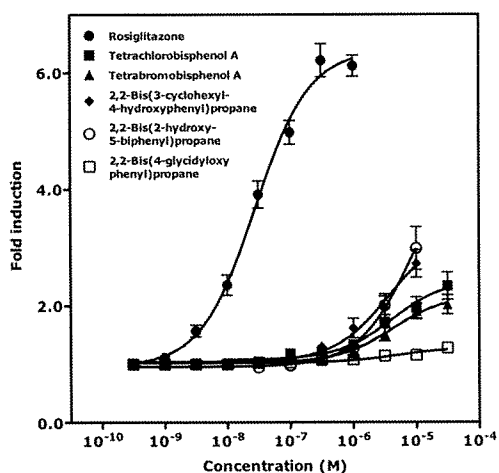


図2. PPAR γ のアゴニスト活性

図3. PPAR γ のアンタゴニスト活性

biphenyl)propane、3'-benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone では、逆に活性の増加が見られた。また、2,2-bis(4-glycidyloxyphenyl)propane、bis(4-amino-2,3-dichlorophenyl)methane、4-hydroxy benzoic acid *n*-nonyl ester、pentachlorophenol、diclofenac ではアンタゴニスト活性を示さなかった。

D. 考察

[³H]rosiglitazone をトレーサーとした PPAR γ 飽和結合試験の結果、本研究で得られた K_D 値は、これまで報告されている値と同様であった。また、競合結合試験の結果でも、rosiglitazone が PPAR γ に強く結合することが確認されたため、結合試験系は高い信頼性があると判断した。HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系では、rosiglitazone、T0070907 をそれぞれアゴニスト、アンタゴニスト活性解析の陽性対照として用い、良好な結果を得ることができ、本試験系が PPAR γ の転写活性を解析するための条件を満たしていると考えた。

PPAR γ は BPA と結合しなかったものの、その類縁化合物の幾つかと結合することが判明した。特に、BPA 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 tetrachlorobisphenol A や tetra bromobisphenol A のような化学物質が PPAR γ に比較的強く結合したことから、こうした構造が結合の強さに重要な要素である可能性が考えられた。このことは、ジフェニルメタン類においても同様であり、ヒドロキシル基やメチル基を持つものには殆ど結合しなかったのに対し、塩素に置換した dichlorophene や、hexachlorophene と強い結合性が認められた。

フラボノイド化合物についても一部で PPAR γ に対する結合性が確認され、特に 3'-benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone、2-hydroxychalcone は比較的強く結合した。内分泌攪乱物質では、既に PPAR γ に対する強い結合が報告されている有

機スズ化合物に加え、有機塩素系農薬として使用された pentachlorophenol や非ステロイド性抗炎症薬の diclofenac と比較的強く結合することが判明した。また、ステロイド骨格を有し、妊娠中絶薬として知られる RU486 も PPAR γ に比較的強く結合した。しかしながら、これら化学物質が PPAR γ に結合する要因については不明であり、今後構造活性相関解析を行う必要がある。

レポーター遺伝子アッセイによる PPAR γ 結合性化学物質の転写活性解析では、アゴニスト・アンタゴニスト活性共に、陽性対照として用いた rosiglitazone、T0070907 より強い活性を示す化学物質は見つからなかった。PPAR γ に対し比較的強い結合を示した BPA 類縁化学物質は、弱いアンタゴニスト活性を示すものの、一般的にアゴニスト活性の方が強い傾向にあった。ジフェニルメタン類において、dichlorophene は PPAR γ に対する結合性が強かったものの、弱いアゴニスト・アンタゴニスト活性を示した。hexachlorophene では、アゴニスト活性は検出されなかったが比較的強いアンタゴニスト活性を示し、塩素の置換部位が異なることによりアゴニストからアンタゴニストに変化する可能性があり、詳細な構造活性相関解析が必要と考えられる。また、2-hydroxychalcone と RU486 はアゴニスト・アンタゴニスト共に比較的強いことが明らかになった。特に RU486 は、プロゲステロン受容体 (PR) や糖質コルチコイド受容体 (GR) のアンタゴニストとして作用することが報告されており、これらに加え PPAR γ も標的受容体として同定されたことは興味深い。一方、2,2-bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane、3'-benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone は、比較的強いアゴニスト活性に加え、アンタゴニスト活性解析時に rosiglitazone (100 nM) による PPAR γ の活性化をさらに増加させた。rosiglitazone は、PPAR γ のフルアゴニストであり、複合処理により 2 つの化学物質が同時に PPAR γ に結合し活性の増加を誘導する

表 2. PPAR γ に対する化学物質の結合性と転写活性化能のまとめ

化学物質名	結合性 (%)	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性
Rosiglitazone	100	+++	++
T0070907	未解析	未解析	+++
Bisphenol A	-	未解析	未解析
Tetrachlorobisphenol A	0.68	++	+
Tetrabromobisphenol A	3.60	++	+
2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane	3.30	++	+
2,2-Bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane	1.60	++	*
2,2-Bis(4-glycidylphenoxyphenyl)propane	0.87	+	-
Dichlorophene	6.40	+	+
Hexachlorophene	5.70	-	++
Bis(4-amino-2,3-dichlorophenyl)methane	0.87	+	-
3'-Benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxy flavone	0.51	++	*
2-Hydroxychalcone	1.30	++	++
RU486	1.20	++	++
4-Hydroxybenzoic acid n-nonyl ester	0.45	++	-
Pentachlorophenol	0.80	+	-
Diclofenac	0.95	+	-

+, 弱い活性 ++; 比較的強い活性 +++; 強い活性

*: 活性の増加 -: 活性なし

ことは考えにくい。また、アゴニスト活性の解析において、これら 2 種の化学物質の活性誘導は rosiglitazone に比べて低いことから、100 nM の rosiglitazone 処理で未反応の PPAR γ が活性化された可能性も低い。これまでの研究で、PPAR γ は RXR α とヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の転写を調節しているが、rosiglitazone と RXR α リガンド 9-*cis* retinoic acid の複合処理により、転写活性が相乗的に増加することが報告されている。従って、本研究で見られた活性の増加は、RXR α の活性化によるものなのかもしれない。このことについては、RXR α の結合試験や転写活性の結果から総合的に

に解析する必要があるだろう。

PPAR γ 結合試験とレポーター遺伝子アッセイの結果を表 2 にまとめた。転写活性については、定量的な結果が得られていないことから明確な議論はできないが、PPAR γ に対する化学物質の結合性と転写活性の強度は、必ずしも一致しているわけではなかった。このことは、本研究で供試した化学物質の PPAR γ に対する結合性がそれほど強くなかったことが一因として考えられる。また、転写活性化能は使用する細胞により得られる結果が異なることも原因のひとつかもしれない。少なくとも、本研究で PPAR γ に結合することが明らかになった化学物質は、パーシャルアゴニストやパーシャルアンタゴニストとして生体内で作用する可能性があり、これらが PPAR γ を介してもたらす影響については今後さらに解析を継続する必要があるだろう。また、ヘテロ二量体パートナーである RXR α の関与についても詳細なメカニズムを解明することが課題として挙げられる。

E. 研究発表

国際学会発表

1. H. Sakai, X. Liu, A. Matsushima, H. Okada and Y. Shimohigashi. Binding-affinity screening of 500 structurally diverse chemicals for human PPAR γ receptor. 19th Joint Seminar of Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan, Busan, Korea, May, 2009.

国内学会発表

1. 酒井大樹. 核内受容体 PPAR の特性と γ 型への結合性化学物質のスクリーニング. 第 4 回分子生物時計研究集会. 福岡市. 2009 年 3 月.

2. 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. 福岡市. 2009 年 5 月.

3. 酒井大樹、劉 暁輝、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. 神戸市. 2009 年 10 月.

4. 酒井大樹、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸. 核内受容体 PPAR γ における 500 化合物のスクリーニング. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会. 東京都. 2009 年 12 月.

5. 酒井大樹、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸. 核内受容体 CAR に対するビスフェノール化合物の応答性解析. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会. 東京都. 2009 年 12 月.

F. 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・構成的アンドロスタン受容体 CAR 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

我々は内分泌攪乱物質・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異物代謝や糖新生等に重要な役割を担うことがしられる、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 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、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、BPA をはじめ幾つかの類縁化合物が clotrimazole と同等の強度で CAR に結合することが判明した。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 で得られているものと同等であり、CAR が BPA の新規受容体であることが明らかになった。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。さらに、様々な細胞を用いてレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、ビスフェノール化合物の CAR 転写活性を解析したところ、BPA は CAR に対しインバースアンタゴニスト活性を示した。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た。

A. 研究目的

ポリカーボネート製品やエポキシ樹脂等を含む様々な生活用品に使用されているビスフェノール A (BPA) は、内分泌攪乱作用を有することから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 への結合能や活性化能は、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。構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor; CAR) は、多様な構造の生体異物に応答し、シトクロム P450 を含む異物代謝酵素などの発現誘導を制御する核内受容体として知られている。CAR は肝臓で特に高発現しているが、腎臓や小腸、脳、生殖腺などの臓器・組織も僅かに発現が確認されている。また、リガンド非存在下でも非常に高い自発活性化能を持つことが報告されている。しかしながら、リガンド非存在時の CAR は、

heat shock protein 90やcytoplasmic CAR retention protein等と複合体を形成し、不活性化状態で細胞質内に存在する。リガンド存在下ではこの複合体が解かれ、CARはリガンドの相互作用後に脱リン酸化過程を経て核内に移行する。また、一部のCARリガンドは、CARに直接結合しないにも関わらず、核内移行を誘発することが報告されており、CARではリガンド結合と共に核内移行がそのシグナル伝達に重要な意味を持つとされている。

CARはステロイドホルモン受容体などに比べ生物種間でアミノ酸相同性が相対的に低いと、化学物質の応答において生物種差が大きいことが知られている。例えば抗真菌薬のclotrimazoleは、ヒトCARに対してアンタゴニスト活性を示すが、マウスに対してはアゴニストとして作用する。また、マウスCARのアゴニストであるTCPOBOPは、ヒトに応答しない。しかしながら、一般にCARは構造や機能が類似したプレグナンX受容体(PXR)と共に、生体異物受容体として位置づけられており、様々な化学物質に対する応答性が解析されている。これまでの研究で、phenobarbital、clotrimazole、DDT、PCB、フタル酸エステル、アルキルフェノールなどの化学物質が、CARリガンドとして報告されている。こうしたことから、CARは多様な化学物質に応答することが考えられるが、そのような観点で応答する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。

こうした背景から、本研究ではCARの受容体結合試験およびレポーター遺伝子アッセイを用い、応答性化学物質を探査することを目的とし、まずビスフェノール化合物に着目して解析を行った。

B. 研究方法

(1) 対象化学物質の選定と調整

市販されているビスフェノール化合物(130種類)を購入し、それぞれ 10^{-2} MになるようにDMSOで溶解後、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) 発現プラスミドの調製

Origene社から購入したCAR cDNAより、PCRを用いてCAR全長及びリガンド結合ドメイン(LBD)領域をクローニングし、制限酵素処理後、CAR全長はpcDNA3.1(+), LBDはpGEX6p-1ベクターに挿入した。レポータープラスミドは、ヒト*cytochrome P450 2B6 (CYP2B6)* 遺伝子上流プロモーター領域に存在するCAR応答配列を5回タンデムにコピーしたものを合成し、pGL4.23ベクターに挿入した。作製したすべてのプラスミドは、塩基配列を解読して挿入の有無を確認した。

(3) 受容体CARの調製

CAR-LBDタンパク質の発現は、大腸菌(BL21)を用いて行った。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。精製タンパク質は、SDS-PAGEおよびCBB染色で純度を確認し、Bradford法で濃度定量を行った。

(4) 飽和結合試験

発現・精製したGST融合CAR-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 $[^3\text{H}]$ clotrimazoleを用いて飽和結合試験を行った。一定量のCAR-LBDタンパク質を0~40 nMの $[^3\text{H}]$ clotrimazoleとbinding buffer(50 mM Tris-HCl(pH 8.0)、50 mM KCl、1 mM CHAPS、10 mM DTT、0.1 mg/ml BSA)中で混合したものを全結合、上記混合液中に未標識のclotrimazole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°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 $[^3\text{H}]$ clotrimazole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、CAR に対する ^3H]clotrimazole の K_D 、 B_{\max} 値を求めた。 ^3H]BPA を用いた飽和結合試験についても同様の方法を用いた。

(5) 競合結合試験

130 種のビスフェノール化合物の CAR に対する結合能は、 ^3H]clotrimazole 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]clotrimazole、CAR-LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、 4°C で一晩インキュベートした。遊離の ^3H]clotrimazole 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]clotrimazole の受容体結合を 50%阻害する値)は、GraphPad Prism ver. 5.0 により算出した。

(6) レポーター遺伝子アッセイ

CAR との結合性が明らかになったビスフェノール化合物の中で、構造が類似したものについて、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより CAR の転写活性化能を評価した。至適条件のレポータープラスミド、CAR 発現プラスミドを HeLa 細胞に一過性発現させ、評価する一連の化学物質を単独処理し、アゴニスト活性を解析した。また、CAR は自発活性型であるため、アンタゴニストの clotrimazole と対象化学物質を複合処理することによりインバースアンタゴニスト活性を評価した。

C. 研究結果

(1) CAR 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

^3H]clotrimazole を用いた飽和結合試験により、発現・精製した CAR-LBD タンパク質の機能性を評価した。図 1 に示したように、 ^3H]clotrimazole 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_{\max} 値はそれぞれ 9.22 ± 1.52

nM、 12.0 ± 0.51 nmol/mg protein と算出された。

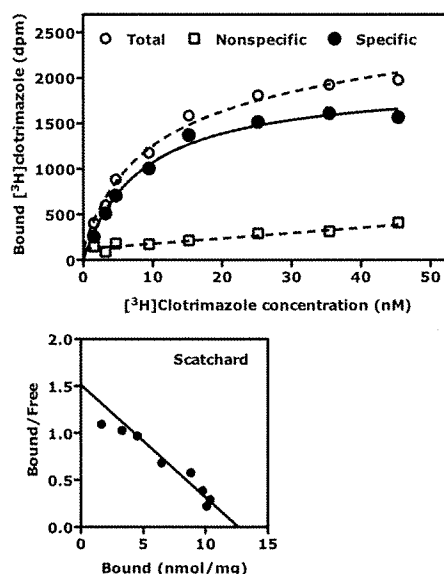


図 1. ^3H]clotrimazole を用いた CAR 飽和結合試験

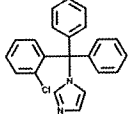
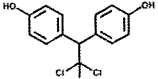
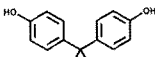
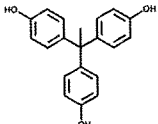
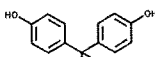
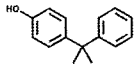
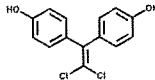
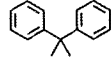
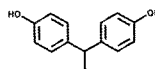
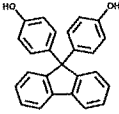
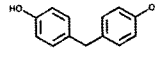
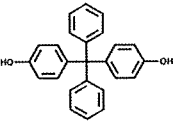
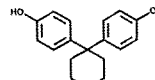
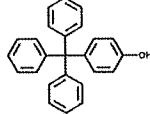
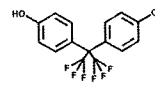
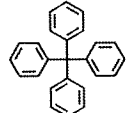
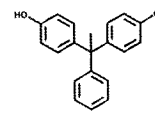
(2) CAR に対する競合結合試験：結合性化学物質の探索

競合結合試験により、CAR に結合するビスフェノール化合物のスクリーニングを行った。供試した全 130 種の中で、39 種の化学物質が CAR に結合することが判明した。表 1 は、CAR と結合した主な化学物質について、clotrimazole に対する相対結合能 (%) をまとめたものである。その結果、BPA を含む多くのビスフェノール化合物は、clotrimazole と同様、CAR に強く結合することが明らかになった。

(3) ^3H]BPA を用いた飽和結合試験・競合結合試験

CAR が BPA に強く結合することが判明したため、 ^3H]BPA を用いた飽和結合試験を行った。その結果、図 2 に示したように、 ^3H]BPA 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_{\max} 値はそれぞれ 8.60 ± 0.66 nM、 9.91 ± 0.34 nmol/mg protein と算出され、CAR と BPA が非常に強く結合することが確認された。

表1. CARと結合した化学物質の構造と clotrimazole に対する相対結合能

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		

(4) CAR レポーター遺伝子アッセイ：結合性化学物質におけるアゴニスト/アンタゴニスト活性の評価

HeLa細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、CARに強く結合することが判明したビスフェノール化合物のアゴニスト/アンタゴニスト活性を解析し

た。CARは自発活性化型の核内受容体であるが、CITCOがアゴニストとして作用することが報告されているため、まず対象化学物質を単独処理することにより、アゴニスト/アンタゴニスト活性を評価した。その結果、CAR転写活性はCITCOにより僅かに増加したが、BPAやBPAF

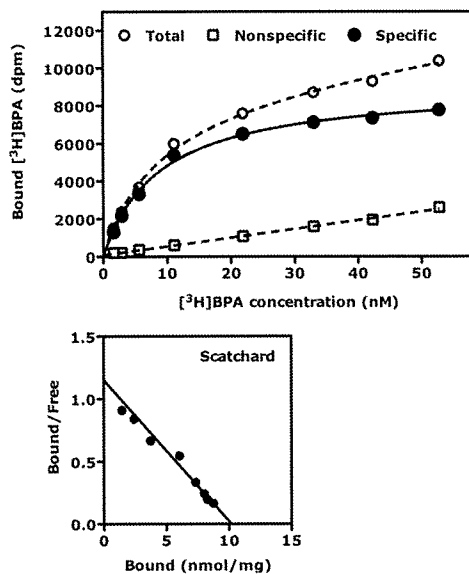


図 2. [³H]BPA を用いた CAR 飽和結合試験

ではほとんど変化しなかった (表 2)。次に、CAR アンタゴニストの clotrimazole と対象化学物質を複合処理したところ、clotrimazole により抑制された CAR 転写活性は CITCO、BPA、BPAF により増加した。また、他のビスフェノール化合物についても同様の解析を行ったところ、単独処理で強いアゴニスト活性を示す化合物は見つからなかったが、幾つかのビスフェノール化合物は、clotrimazole と同様に強いアンタゴニスト活性を示した。

D. 考察

[³H]clotrimazole を用いた競合結合試験の結果、多様なビスフェノール化合物が CAR に強く結合することが判明した。また、[³H]BPA を用いた飽和結合試験により、CAR と BPA の強い結合を確認することができた。さらに、CAR に対するビスフェノール化合物の強い結合要因について、構造活性相関解析を実施した。まず、ビスフェノール A の 2 つのメチル基に着目した結果、メチル基をひとつだけ持つ BPE では CAR への結合能が弱くなり、メチル基がない BPF では CAR に結合しなかった。従って、CAR との結合には、ビスフェノール A にある 2 つのメチル基が重要であることが示唆された。一方、メチ

表 2. CAR に対する化学物質の転写活性化能

化学物質名	アゴニスト	アンタゴニスト	インバー スアンタ ゴニスト
Clotrimazole	-	++	-
CITCO	+	-	++
Bisphenol A	-	-	++
Bisphenol B	-	-	++
Bisphenol C	-	-	+
Bisphenol E	-	+	-
Bisphenol F	-	-	-
Bisphenol Z	-	-	++
Bisphenol AF	-	-	++
Bisphenol AP	-	+	+
HPTE	+	-	++
1,1,1-Tris(<i>p</i> -hydroxy phenyl)ethane	-	++	
4 α -Cumylphenol	+	-	+
2,2'-Diphenylpropane	-	-	+
9,9-Bis(4-hydroxy phenyl)fluorene	-	++	-
4,4'-Dihydroxy tetraphenylmethane	-	++	-
4-Hydroxy tetraphenylmethane	-	++	-
Tetraphenylmethane	-	-	-

+; 弱い活性 ++; 強い活性 -; 活性なし

ル基のひとつがエチル基になった BPB では CAR への結合性が増加し、ベンゼン環が付加した化学物質では BPA とほぼ同等の結合能を示した。このベンゼン環が付加した 4,4'-dihydroxytetraphenylmethane は、clotrimazole と類似した構造であり、このことが CAR に対し強い結合能を持つ要因と推察された。次に、BPA における 2 つのヒドロキシル基に着目した。その結果、ヒドロキシル基がひとつの 4 α -cumylphenol では、BPA に比べ CAR への結合能が一桁低下し、ヒドロキシル基がひとつもない 2,2'-diphenylpropane は、CAR に全く結合しなかった。また、4,4'-dihydroxytetraphenylmethane について

も同様に、ヒドロキシル基の付加数が減少することにより CAR への結合性が低下した。これらのことから、CAR に対する化学物質の結合には、BPA にある 2 つのメチル基、2 つのヒドロキシル基が重要であることが考えられた。

CAR に強く結合することが判明したビスフェノール化合物について、レポーター遺伝子アッセイにより CAR 転写活性化能を解析したところ、BPA は CAR に対しインバースアンタゴニスト様の活性を持つことが判明した。このような結果は、ERR γ に対する BPA の応答性と類似している。CAR は自発活性化型の核内受容体であり、フタル酸エステルや有機塩素化合物等でも本研究と同様にインバースアンタゴニスト活性を示し、標的遺伝子の発現を誘導することが報告されている。従って、BPA や BPAF もこれら化合物のように CAR 標的遺伝子の発現に影響を与えている可能性が考えられる。

本研究より、BPA をはじめとする様々なビスフェノール化合物が CAR に強く結合することが判明し、BPA の影響を評価するためには、ERR γ に加え CAR についても詳細な解析を行う必要性が考えられた。CAR は異物代謝に重要な役割を担う核内受容体であることから、BPA 代謝における CAR の関与についても、明らかにする必要があるだろう。

E. 研究発表

論文発表・学会発表

1. 酒井大樹. 核内受容体 PPAR の特性と γ 型への結合性化学物質のスクリーニング. 第 4 回分子生物時計研究集会. 福岡市. 2009 年 3 月.
2. 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. 福岡市. 2009 年 5 月.
3. 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. 神戸市. 2009 年 10 月.
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 PPAR γ における 500 化合物のスクリーニング. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会. 東京都. 2009 年 12 月.
5. 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 に対するビスフェノール化合物の応答性解析. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会. 東京都. 2009 年 12 月.

F. 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

ヒト・エストロゲン受容体 α に対するビスフェノールA関連物質の
結合スクリーニング

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

我々は、ビスフェノールA（BPA）が、エストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）ではなくエストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に非常に強く結合することを世界で初めて発見した。その後、このERR γ とBPA類似の多種の化合物の構造-活性相関解析研究を精力的に展開し、高機能性プラスチックの原料として、最近生産量がふえている「新世代ビスフェノール」も、ERR γ とかなり強く結合することを明らかにした。すなわち、多くのBPA類似構造をもつ化合物が、ERR γ と結合すること、そして、なかでもビスフェノールEは、BPAよりERR γ に強く結合する唯一の化合物であることを世界に先駆けて報告した。（平成20年度 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク評価事業）。これは、BPAのみではなく、BPA類似化合物の化学物質リスク評価の重要性を端的に示すものである。そこで今回、女性ホルモン受容体であり、最も内分泌攪乱作用の標的となりうると考えられる代表的核内受容体の一つである、エストロゲン受容体 α 型（estrogen receptor α ; ER α ）について、BPA類似化合物を含む約500化合物の結合スクリーニングを実施した。その結果、22種類のBPA類似化合物が、BPAより強い結合性を示した。BPA自身はER α に弱く結合し、IC₅₀は1040 nMである。近年、生産および使用量が増大している新世代ビスフェノールが、ER α にBPAよりも遥かに強く結合することは、驚くべき新発見である。これらのうち、特に結合力の強い11種のBPA類似化合物について、レポーター遺伝子アッセイにより転写活性を評価したところ、少なくとも2種はER α の新規なアンタゴニストであると考えられた。そこで、さらにER β に対する結合試験系を構築し、ER α に強く結合したBPA類似化合物の結合試験を行った。その結果、米国衛生局の国家毒性プログラム（NTP）において、BPA類似化合物の中でも特に注目されているビスフェノールAF（BPAF）が、ER α よりもむしろER β に強く結合するという興味深い事実が明らかになった。さらに、レポーター遺伝子アッセイ系を構築して転写活性を測定した。これより、BPAFはER α のアゴニストであり、且つER β のアンタゴニストであるという非常に面白い結果が得られた。これらの事実は、ビスフェノール類似化合物は、内分泌攪乱物質としてのリスクが大きいことを直接に示す極めて重要な成果である。

A. 研究目的

BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの工業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。しかし、その安全性について、現在未だ明確な回答が得られておらず、特に近年では胎児や幼児における脳・神経系への影響が危惧される非常

に注目されている化学物質である。我々は、2006年にBPAは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事を発見し、報告した。BPAのERR γ に対する解離定数は5.50 nMであり、これは天然ホルモン並に強い結合である。このBPAの核内受容体に対する非常に強い結

合は、BPAおよびBPA類似化合物には、潜在的な化学物質リスクがあることを示唆すると考えられる。

BPAの規制に関する国際動向は、次の通りである。1990年代後半より、マウスなど実験動物で、ビスフェノールAの「低用量効果」が指摘された。「低用量効果」とは、BPAが規制値(2.5~3.0 ppm)よりはるかに低い量で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすことである。これを受け、2000年には米国厚生省所轄National Toxicology Program(NTP)がEndocrine Disruptors Low-Dose Peer Reviewを行った。この調査では、低用量効果は一部では認定され、一部では否定されたため、統合的には認定されなかった。しかし、その後もBPAの低用量効果を指摘する実験が相次ぎ、2008年4月にカナダ政府は、乳幼児への危険性があるという理由で、世界に先駆けてBPAの工業利用に強い規制を発動した。同年4月、米国厚生省所轄・国家毒性プログラム(NTP)も、乳幼児等の神経や行動等に影響を及ぼす懸念の見解草案を、さらに9月に最終報告を発表した。欧州では、2009年に欧州食品安全期間(EFSA)に神経発達影響についての新たな実験動物に関する評価が諮問され、2010年5月に完了を目指して評価中である。このように、BPAの化学物質リスクは非常に注目されている。

さらに、米国厚生省では、2008年のNTPの報告で指摘されたBPA類似化合物に対する内分泌攪乱物質としての懸念を受けて、BPAには及ばないが比較的プラスチック原料として多く使用されているビスフェノールAF(BPAF)を毒性試験の対象化合物として取り上げた。米国における、BPAFの1986年から2002年における生産量は、10,000~500,000ポンドであり、この量は'moderate production'に分類される。2008年9月の報告書によると、BPAFはポリマー原料として用いられており、フッ素含有高分子化合物(fluoroelastmer)として、食品加工・製造装置のホース等に用いられていることが報告されている。しかし、特定の用途や、ヒト暴露の可能性、世界生産量、さらには、環境放出量などについては、一切不明となっている。また、ラットにおける経口の半数致死量(LD50)は3,400mg/kgであり、これはBPAのLD50(3,250mg/kg)とほぼ同程度である。

ところで、BPA自身のER α 結合能は、IC₅₀で1040 nMであり、それほど強い結合物質では

ない。また、全てのBPA類似化合物について、ER α に対する直接の結合試験が行われているわけでもない。そこで今回、詳細な構造活性相関解析の実施、さらには新規なER α 結合化合物の探索を目的として、BPA類似化合物を含む約500化合物の結合スクリーニングを系統的に実施した。

B. 研究方法

(1) 受容体 ER α の調製

試験に用いる受容体は、大腸菌での発現タンパク質あるいは、市販品を購入して用いた。大腸菌で発現する場合には、まず、ヒト腎臓のcDNAより、PCRを用いてER α およびER β 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ER α -LBDおよびER β -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 ビーズを用いてアフィニティー精製後、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。得られたER α -LBDおよびER β -LBDは-80°Cで保存し、実験に供出した。市販品は、それぞれインビトロジェン社より購入した。

(2) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cでゆっくりと受容体タンパク質を解凍して行った。ER α -LBDおよびER β -LBDと各濃度の放射標識された放射標識エストラジオール([³H]E2)をbinding buffer中で混合し、20°Cで2時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量のE2を[³H]E2と併に加えることにより調べた。その後、遊離の[³H]E2は0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で10分間インキュベートし、14,000rpmで10分遠心することにより取り除いた。

(3) 競争結合試験

BPA類似化合物など、ER α -LBDおよびER β -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、[³H]E2の受容体結合を阻害する能力でERR γ 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 E2とERR γ 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 E2は0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で10分間インキュベートし、96穴フィルタープレートで吸引ろ去することにより取り除いた。化学物質のIC₅₀値(^3H E2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、ER α 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、ER α 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ER α の活性への影響を評価した。コントロールとなる化合物としては、アゴニストとしてE2、アンタゴニストとして4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)を用いた。

C. 研究結果

(1) ER α 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ER α -LBDを発現した。結合試験では、 ^3H E2を用いて、反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F分離の条件を詳細に検討した。その結果、 ^3H E2の特異的結合を十分量与える条件の設定に成就した(図1)。

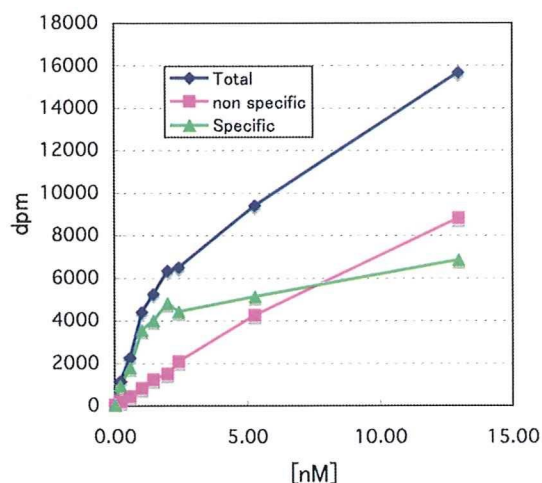


図1. ^3H E2を用いたER α に対する飽和結合試験結果

スキッチャードプロット解析を行った結果、K_D値は1.7 nMであり、B_{max}は15.7 nmol/mgであった。この結果より、E2のER α に対する結合能は、十分強く、発現した受容体が機能的であり実験に使用可能であることが確認された(図2)。

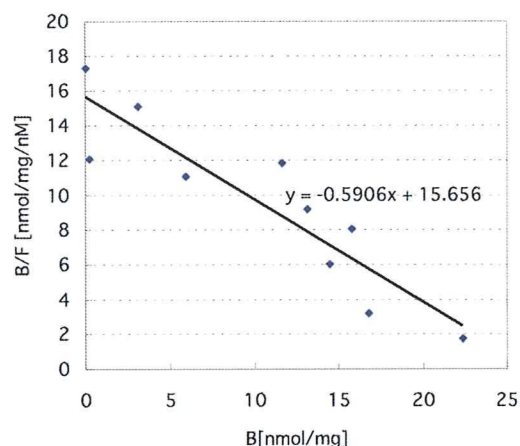


図2. ^3H E2を用いたER α に対する飽和結合試験のスキッチャード解析

(2) ER α に対するBPA類似化合物の結合スクリーニング

BPA類似化合物を含む約500化合物について、 ^3H E2をトレーサーとして用いた競合結合試験を行った。その結果、22種ものBPA類似化合物が、BPAより強い結合性を示した。BPA自身はER α に弱く結合し、IC₅₀は1040 nMである。近年、生産および使用量が増大しているBPA類似化合物、すなわち「新世代ビスフェノール」が、ER α にBPAよりも遥かに強く結合することは、驚くべき新発見であった。

(3) ER β の飽和結合試験

上述のER α に強く結合するBPA類似化合物のうち、特に結合が強い14種について、ER β に対する結合能を調べることにした。そこで、ER α と同様に、 ^3H E2を用いてER β に対する飽和結合試験を行った。その結果、ER α と同じ試験条件で、結合実験ができることが判明した。飽和結合試験の結果は、図3のとおりである。

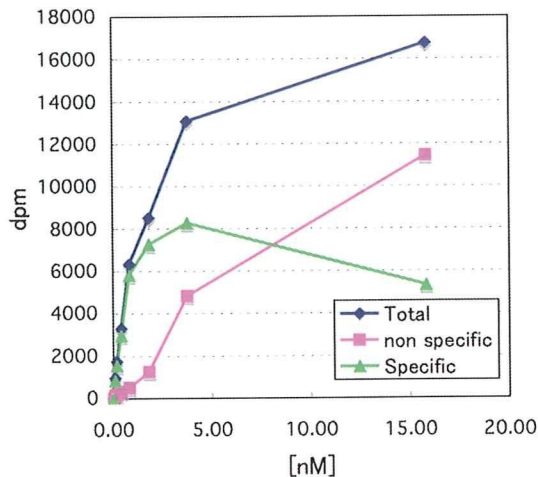


図3. $[^3\text{H}]$ E2を用いたER β に対する飽和結合試験結果

スキャッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は1.2 nMであり、 B_{max} は233 nmol/mgであった。この結果より、E2のER β に対する結合能は、十分強く、ER α 発現した受容体が機能的であり実験に使用可能であることが確認された(図4)。

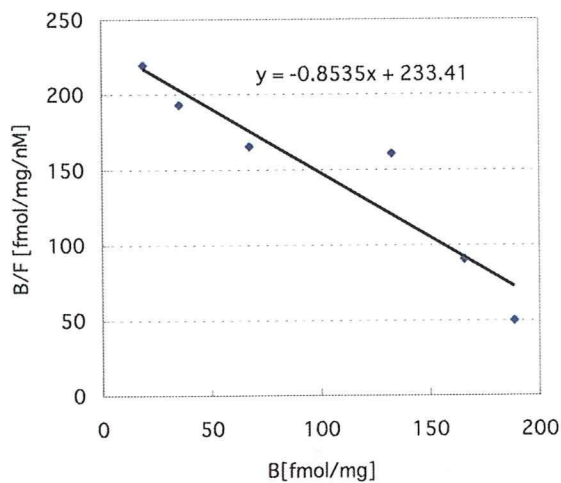


図4. $[^3\text{H}]$ E2を用いたER β に対する飽和結合試験のスキャッチャード解析

(4) ER β に対するBPA類似化合物の競合結合試験

ER α に特に強く結合するBPA類似化合物10種について、 $[^3\text{H}]$ E2を用いたER β に対する競合結合試験を行った。その結果、米国厚生省により毒性試験の対象化合物として取り上げられた新世代ビスフェノールであるBPAFが、ER α よりもむしろER β に強く結合するという興味深い事実が明らかになった(図5&6)。

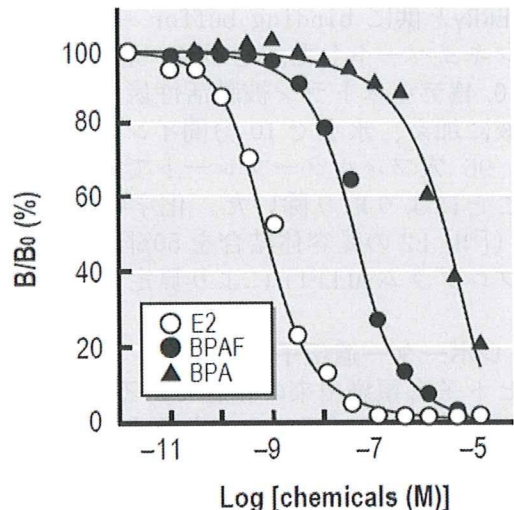


図5. $[^3\text{H}]$ E2を用いたER α に対する結合試験

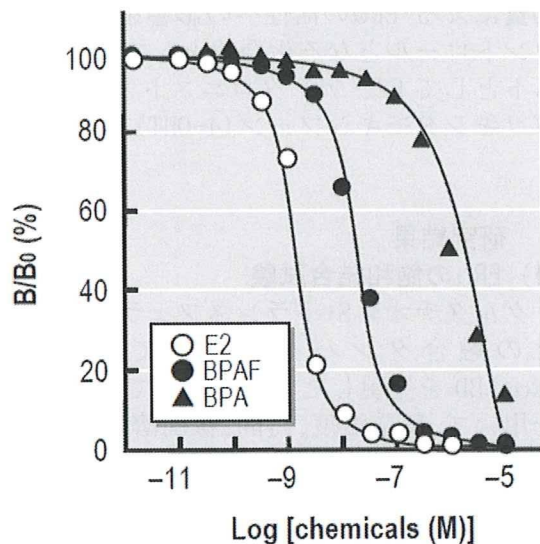


図6. $[^3\text{H}]$ E2を用いたER β に対する結合試験

(5) レポーター遺伝子アッセイによる転写活性測定

BPAFは、BPAよりもはるかにER α に強く結合し、しかもER α よりもむしろER β に強く結合することが判明した。そこで、BPAFの転写活性化能をレポーター遺伝子アッセイで試験した。その結果、BPAFはER α に対しては、E2やBPAと同様にER α を転写活性化するアゴニストであった。しかし、ER β には、E2やBPAはER α と同様に転写活性化するアゴニストであるが、BPAFはER β を活性化しないという興味深い結果が得られた(図7&8)。

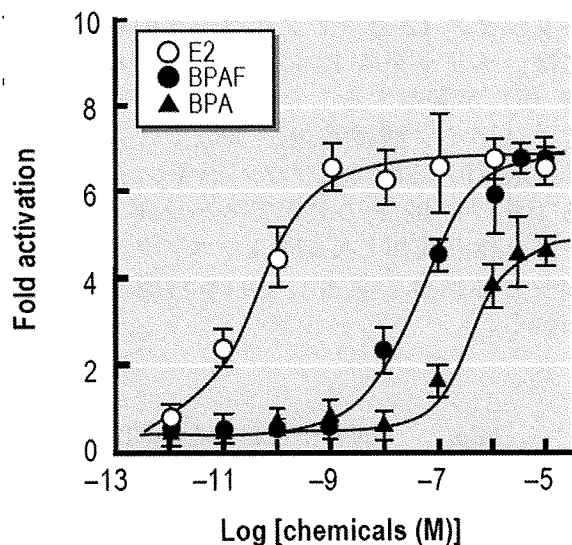


図7. レポーター遺伝子アッセイによるER α に対する転写活性化可能試験

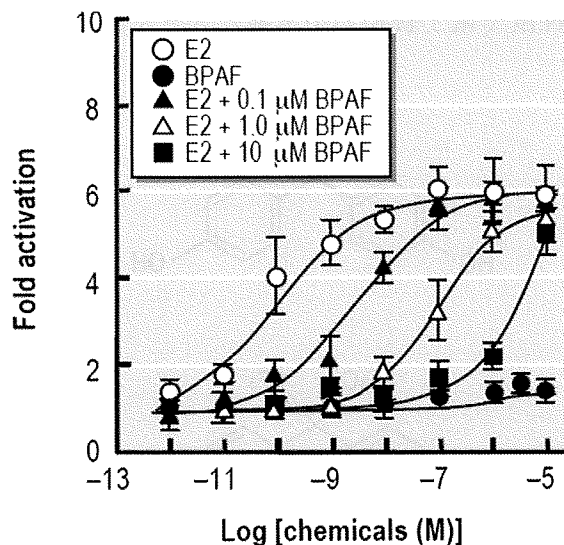


図9. 一定濃度BPAF存在下におけるER β に対するE2の転写活性化可能試験

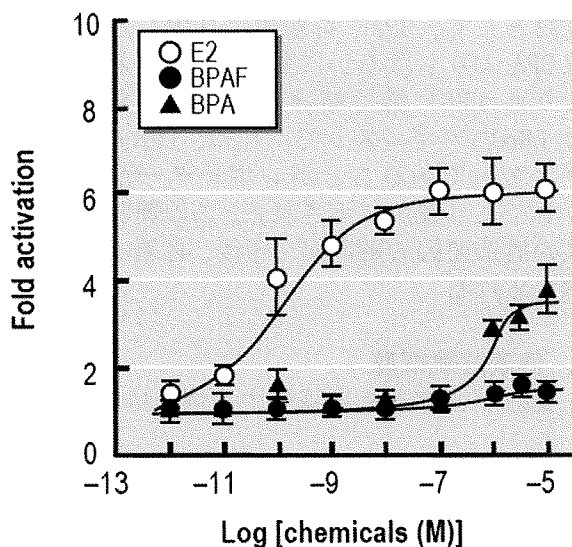


図8. レポーター遺伝子アッセイによるER β に対する転写活性化可能試験

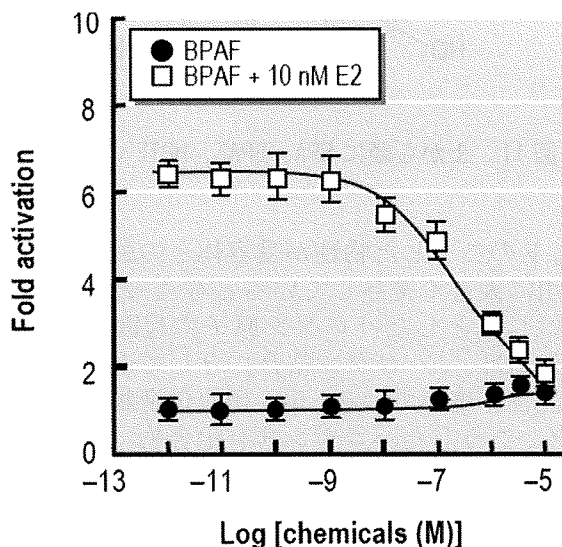


図10. 10 nMのE2存在下におけるER β に対するBPAFの転写活性化可能試験

そこで、アゴニストとしてE2を用いて、BPAFのアンタゴニスト活性を測定した。0.1、1、10 μ MのBPAFの存在下では、E2の濃度依存活性曲線は高濃度側にシフトした(図9)。また、10 nM E2存在下ではBPAFは濃度依存的にER β の活性を抑制した(図10)。こうして、BPAFはER β のアンタゴニストであるという新事実が判明した。

D. 考察

BPAFは $[^3\text{H}]$ E2を用いた競合結合試験において、ER α に対してIC₅₀値で53 nM、ER β に対して19 nMの結合能を示すことが判明した。BPAFのER α に対する結合能は、BPAの約20倍であり、BPAFのER β に対する結合能は、それよりもさらに強い。ところで、BPAとBPAFの構造の違いは、CH₃基がCF₃基に置換されるだけである(図11)。これより、フッ素(F)が、受容体との強い相互作用を誘起しているに違いないと期待される。Fは水素とほぼ同じファンデルワールス半径を持ちながら、電

気陰性度や電子親和力が水素と大きく異なる。

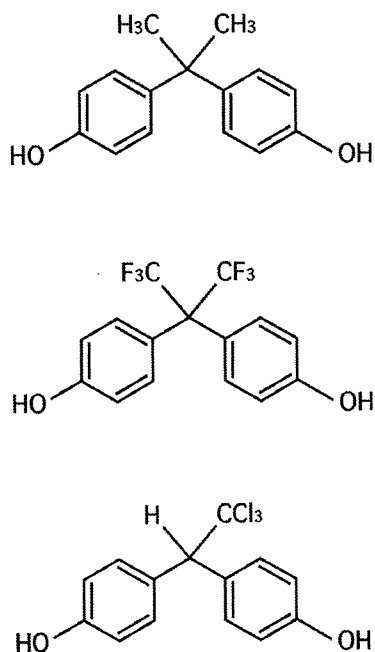


図 11. 上から順に BPA、BPAF、HPTE の構造

る。F のこうした物性が受容体との強い相互作用に大きく寄与していると考えられる。F をはじめとしたハロゲン原子に起因する相互作用は、「ハロゲン結合」として近年大きな注目を集めている。BPA 類似化合物のなかでも、こうしたハロゲン含有化合物には特に注意が必要である。

では、なぜ BPAF は ER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストとなるのか？文献調査により、同様の性質を示す化合物が存在することが明らかとなった。2,2-bis(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE) は、BPAF と同様に、ER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストである。両化合物を比較すると、CF $_3$ および CCl $_3$ にその要因がありそうである。共にハロゲン原子を含有しており、これらがハロゲン結合を形成することにより、ER α と ER β において、全く別の結合部位に強く結合し、ER β では転写活性化に必要なヘリックス 12 の位置取り阻害する可能性がある。あるいは、ヘリックス 12 の位置取りは ER α と同様であるが、このヘリックス 12 にコアクチベータが結合するのを阻害する可能性、すなわち、ヘリックス 12 の上にさらに結合する可能性もある。

ヘリックス 12 とコアクチベータの相互作用には、ヘリックス 12 に存在するグルタミン酸 (E) が寄与することが知られているが、その 3 アミノ酸残基後が ER α ではアスパラギン酸 (D)、ER β ではアスパラギン (N) である (図 12)。BPAF の F がアスパラギンのアミド基と相互作用して結合し、コアクチベータの受容体結合を阻害している可能性が考えられる。

ER α	KNVVPLYDLLLEMLD	DAHRL
ER β	KNVVPVYDLLLEMLN	NAHVL

図 12. ヘリックス 12 付近のアミノ酸配列

E. 結論

ER α および ER β に強く結合する BPA 類似化合物として、BPAF を新規に見出した。これは BPA よりもはるかに強く結合し、特に ER α よりも ER β に強く結合した。しかも、BPAF は ER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストであることがレポーター遺伝子アッセイより確かに示された。この興味深い結果の構造要因の解明が、今後、必須であると考えられる。

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

78. 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.: *Environ. Health Perspect.* in press.

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

3. 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). Matsushima, A., Okada, H., Liu, X., Tokunaga, T., Teramoto, T., Kakuta, Y., Shimohigashi, Y.: *Peptide Science* 2008, 521-522 (2009).

学会発表

1. 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、九州大学、2009. 5. 15-16。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸 1、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。

6. 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。
 7. 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、平成 21 年(2009 年)12 月 7-8 日、東京大学山上会館、東京
 8. 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、東京大学山上会館、2009. 12. 7-8。
 9. 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、東京大学山上会館、2009. 12. 7-8。
- G. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ、特になし。