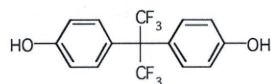


ビスフェノール A



ビスフェノール AF

ベンゾフェノン

ジフェニルメタン

17-ケトステロイド

フラボノイド

フタル酸エステル

ビフェニル

図 5. 核内受容体応答スクリーニングに供される代表的な化学物質群

表 2. 核内受容体 ER $\alpha$  に対する化学物質の活性 (17 $\beta$ -エストラジオールに対する比活性)

化合物名	比活性
17 $\beta$ -estradiol	100
bisphenol C	31.32
4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)bisphenol	15.30
4,4'-(2-hydroxybenzylidene)-bis(2,3,6-trimethylphenol)	7.15
4,4'-(2-ethylhexylidene)bisphenol	4.76
1,1-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane	2.28
bisphenol AF	1.65
bisphenol M	1.55
1,1-bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane (bisphenol Z)	1.55
$\alpha,\alpha,\alpha'$ -tris(4-hydroxyphenyl)-1-ethyl-4-isopropylbenzene	1.43
4-(1-adamantyl)phenol	0.96
bisphenol B	0.50
bisphenol AP	0.34
9,9-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)fluorine	0.27
2,2-bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane	0.26
spirobicromane	0.24
2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane	0.24
2,2-bis[4-(4-aminophenoxy)phenyl]hexafluoropropane	ND
$\alpha,\alpha'$ -bis(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-1,4-diisopropylbenzene	ND
tetramethyl bisphenol A	ND
9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorine	ND

表3. 核内受容体 ERR $\gamma$ に対する化学物質の活性：ビスフェノールAの結合親和性に対する比活性

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.

[ $^3$ H]ビスフェノールAをトレーサーにした結合試験の結果を、ビスフェノールAのIC<sub>50</sub>値(9.85 nM)を100にして計算した比活性を大きい順番に並べた結果を示した。

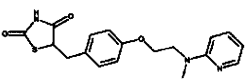
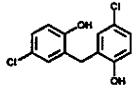
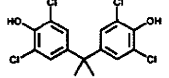
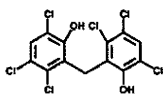
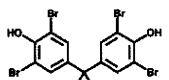
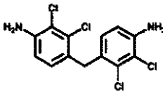
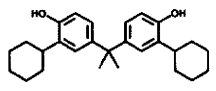
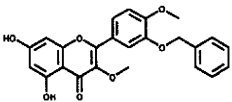
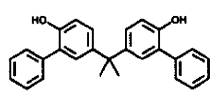
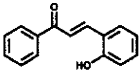
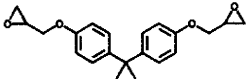
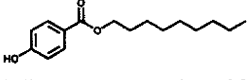
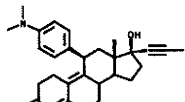
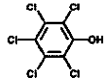
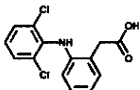
約30種もの活性な化学物質が存在することが明らかとなった。なかでもIC<sub>50</sub>値8~90 nMの化合物が13種も存在すること、また、ビスフェノール類、アルキルフェノール類に結合親和性の高いものが多いことが注目される。

#### ④ PPAR $\gamma$

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(peroxisome proliferator-activated receptors)  $\gamma$ 型 $\gamma$ ; 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[ $^3$ 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 $\gamma$ への結合性解析を実施したところ、rosiglitazone(ロシグリタゾン)より強く結合する化学物質は同定されなかった。しかしながら、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有意な結合性が認められた。表4には、それをロシグリタゾンへの比活性で示している。

PPAR $\gamma$ 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、これが様々な化学物質との結合を可能にしている。H20年度、有機スズ化合物・トリフェニルスズ、トリブチルスズがかなり強い結合親和性を示すことがはじめて明らかとなった。また、ジフェニルメタンに分類される5-4:2,2'-メチレンビス(4-クロロフェノール)がこれらと同程度の強さで結合することが判明した。この化合物はベンゼン環に塩素原子が結合した構造を持つが、こうした有機ハロゲン系の化合物、例えば、1-2:テトラクロロビスフェノールA、1-3:テトラブromoビスフェノールAのような化学物質が、PPAR $\gamma$ と強い結合性を示すことが分かった。ビスフェノールAは全く結合しないことから、塩素、臭素によるハロゲン結合を介した相互作用増強などが考えられた。

表 4. 核内受容体 PPAR $\gamma$  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 (%)
 <b>Rosiglitazone</b>	100	 <b>Dichlorophen</b>	6.4
 <b>Tetrachlorobisphenol A</b>	0.68	 <b>Hexachlorophene</b>	5.7
 <b>Tetrabromobisphenol A</b>	3.6	 <b>Bis(4-amino-2,3-dichlorophenyl)methane</b>	0.87
 <b>2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane</b>	3.3	 <b>3'-Benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone</b>	0.51
 <b>2,2-Bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane</b>	1.6	 <b>2-Hydroxychalcone</b>	1.3
 <b>2,2-Bis(4-glycidyloxyphenyl)propane</b>	0.87	 <b>4-Hydroxybenzoic acid n-nonyl ester</b>	0.45
 <b>RU486</b>	1.2	 <b>Pentachlorophenol</b>	0.80
		 <b>Diclofenac</b>	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 $\cdot$ 、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 $\beta$  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  $\text{IC}_{50}$  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 $\beta$  に対する 500 化学物質の活性

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

### ⑥ 構成的アンドロスタン受容体 (CAR)

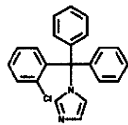
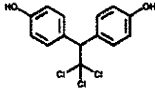
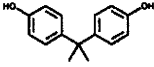
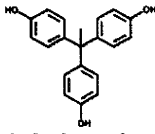
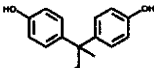
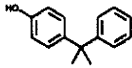
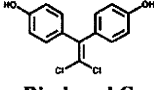
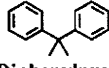
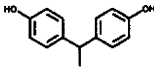
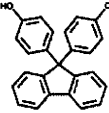
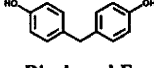
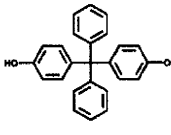
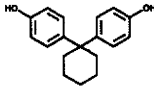
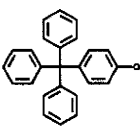
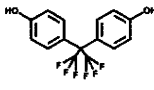
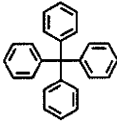
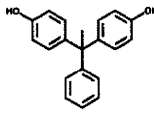
核内受容体の中でも異物代謝や糖新生等に重要な役割を担う構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor; CAR) に着目し、ヒト CAR に対するアンタゴニストである抗真菌薬剤の [<sup>3</sup>H]clotrimazole (クロトリマゾール) を用いた受容体結合試験系の構築に取り組んだ。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、ビスフェノール化合物 130 種類に対し CAR への結合性解析を実施したところ、ビスフェノール A (BPA) をはじめいくつかの類縁化合物がクロトリマゾール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

肝臓 X 受容体 (Liver X Receptor, LXR) には、 $\alpha$  型と  $\beta$  型の 2 つのサブタイプがあり、いずれも 25-ヒドロキシコレステロールをリガンドとする。 $\alpha$  型は主に肝臓、マクロファージ、小腸に発現してコレステロールの輸送を司り、 $\beta$  型は全身に発現するが、特に中枢神経系に発現が多い。今回、両者について、 [<sup>3</sup>H]25-hydroxycholesterol をトレーサーとする競合結合試験系を確立し、ビスフェノール化合物およびステロイド化合物を中心とした一連の化学物質を試験した。その結果、40 種の化学物質がいずれにも結合性を示し、特に 1, 1-ビス (3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル) シクロヘキサンなど数種は 25-ヒドロキシコレステロールと同程度の強さで結合することが判明した。

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

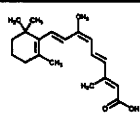
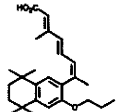
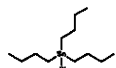

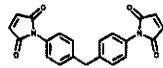
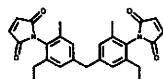
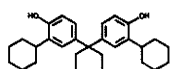
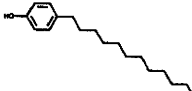
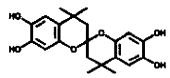
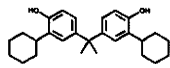
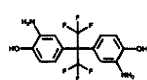
化学物質名/構造	相対結合能 (%)	化学物質名/構造	相対結合能 (%)
 Clotrimazole	100	 HPTE	61.7
 Bisphenol A	42.8	 1,1,1-Tris(p-hydroxyphenyl)ethane	12.3
 Bisphenol B	124.5	 4-α-Cumylphenol	8.1
 Bisphenol C	16.8	 2,2-Diphenylpropane	結合なし
 Bisphenol E	2.1	 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorene	36.4
 Bisphenol F	結合なし	 4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane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

ところで、ビスフェノール誘導体の1つである4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)は、LXR $\alpha$ にかなり強く結合したが (IC<sub>50</sub> = 約 130 nM)、LXR $\beta$ には非常に弱い結合性しか示さず (IC<sub>50</sub> > 3  $\mu$ M)、きわめて強い $\alpha$ 型選択性の化学物質であることが判明した。同様の結果は、Cholesterol-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxideでも見られた。

### ⑧ レチノイドX受容体 (RXR)

レチノイドX受容体 (RXR) には、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3つのサブタイプが存在し、9-*cis* retinoic acid (9cRA) はRXRs共通の内源性リガンドとして報告されており、その結合性は極めて高い。近年では、内分泌攪乱物質であるトリブチルスズが、RXRsと強力に結合し、生殖系および内分泌系に影響を及ぼす可能性が指摘されている。RXRsは、TRs、PPARs、

表7. 核内受容体 RXR に対する化学物質の活性：9-シス レチノイン酸に対する比活性

化学物質名/構造	相対結合能 (%)		
	RXR $\alpha$	RXR $\beta$	RXR $\gamma$
9- <i>cis</i> Retinoic acid (9cRA) 	100	100	100
LG100754 	74	119	279
Tributyltin chloride (TBT) 	45	709	383
Triphenyltin chloride (TPT) 	12	57	21.3
4,4'-Bismaleimidodiphenylmethane 	8.1	2.0	非常に弱く結合
Bis(3-ethyl-5-methyl-4-maleimidophenyl)methane 	6.5	3.5	非常に弱く結合
1,1-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)cyclohexane 	4.9	51	143
<i>p</i> -Dodecylphenol 	3.1	33	47.5
6,6',7,7'-Tetrahydroxy-4,4',4'-tetramethyl-2,2'-spirobichroman 	2.6	13.9	12.8
2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane 	1.2	7.9	6.4
2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane 	0.9	4.3	7.1

VDR など、主にサブファミリーI に属する核内受容体とヘテロ二量体を形成することにより、特異的な標的遺伝子の転写制御を介し、発達・分化・代謝等を含む様々な生理作用を調節している。

試験の結果、内在性リガンド 9cRA および、既に報告されているトリブチルスズは RXR に対して非常に強い結合が確認された。また、ビスフェノール誘導体やアルキルフェノール類など、RXR と比較的強く結合する化学物質がいくつか存在することが明らかとなった (表7)。

### ⑨ その他の受容体

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。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。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。一方、標準化合物さえない受容体に対しては、H22 年度より表面プラズモン共鳴 SPR を用いた化学物質スクリーニングを開始した。

## (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。

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ることが判明した。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 $\gamma$ 、ROR $\beta$ 、Rev-er $\alpha$ 、Rev-er $\beta$ 、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、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- $\alpha$ -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アンタゴニスト活性は、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。インバーサアンタゴニスト活性の強さは、各化合物の結合親和性の強さに相関しており、ビスフェノールEが最大の活性を示した。

本年度、ビスフェノールAFと同様な活性が示唆されているビスフェノール-HPTEおよびCについても詳細に調べた。 $\alpha$ 型のサブタイプER $\alpha$ に対してHPTE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 $\beta$ -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  $\mu\text{M}$ でも100%活性を示さず、60~70%の活性に留まった。

一方、 $\beta$ 型に対しては、HPTEは不活性であった（図7）。10  $\mu\text{M}$ でもER $\beta$ 受容体サブタイプは、ほとんど活性化されず、不活性

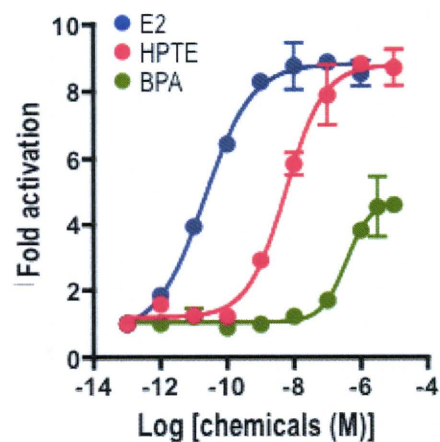


図6. レポーター遺伝子アッセイによるER $\alpha$ に対する転写活性可能試験



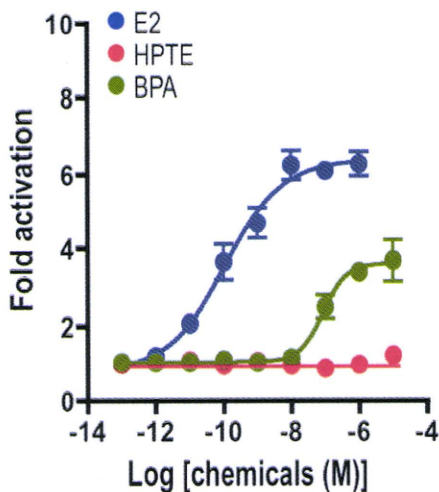


図7. レポーター遺伝子アッセイによるERβに対する転写活性化能試験

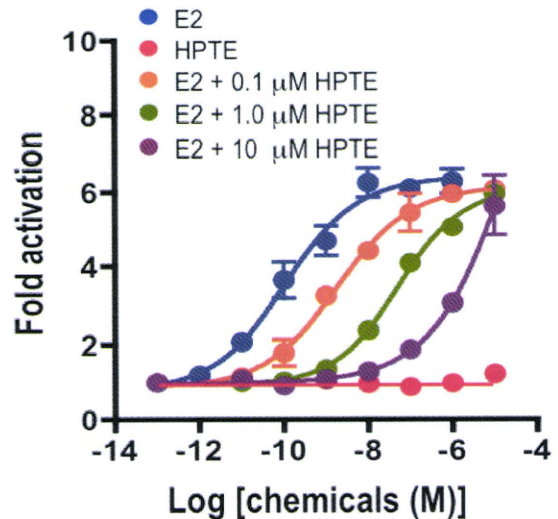


図8. 一定濃度BPAF存在下におけるERβに対するE2の転写活性化能試験

と判定された。アンタゴニスト活性を調べたところ、非常に明解な濃度依存的な阻害活性を示すことが明らかとなった。

まず、0.1、1、10 μMのHPTE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、HPTE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HPTE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。HPTE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ERβの活性を抑制することになる（図9）。こうして、HPTEはERβのアンタゴニストであることが証明された。まったく同様なことがビスフェノールCでも証明された。

ビスフェノールAF、HPTE、Cはいずれもハロゲン（フッ素、あるいは塩素）を含むという共通な構造要因があり、この点でビスフェノールAと異なる。これらがどのような相互作用の違いを生むのかは、重要な検討課題である。

#### (5) 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

センシングアッセイ法は、特に内在性のリ

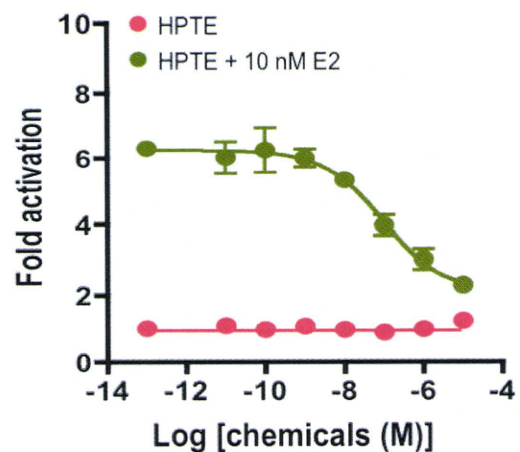


図9. 10 nMのE2存在下におけるERβに対するBPAFの転写活性化能試験

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。平成22年度には、H12が欠損している核内受容体Rev-erbについて、この方法を検討した。この受容体では、H11の一部がH12の代役をしていると考えられており、この部分をエクソ線結晶構造に基づいて推定して、抗体の抗原部位を毛呈した。その結果、特異的に認識する抗体の作製に成就した。そして、認識度はさほど大きくないものの、一応、センシング能を検知できるアッセイ系の構築に成功した。



なお、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ている。

#### (6) ビスフェノールA食餌によるショウジョウバエ行動多動性症状行動リズムの解析

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、平成21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功した。

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。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。平成22年度までに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、主として、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。ごく少ないが、暗期多動性障害のショウジョウバエもいた。

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(図10)。朝方ピークから夕方ピークまでの「明期」活動休止期と、夕方ピークから翌日の朝方ピークまでの「暗期」活動休止期が存在するが、前者が休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、

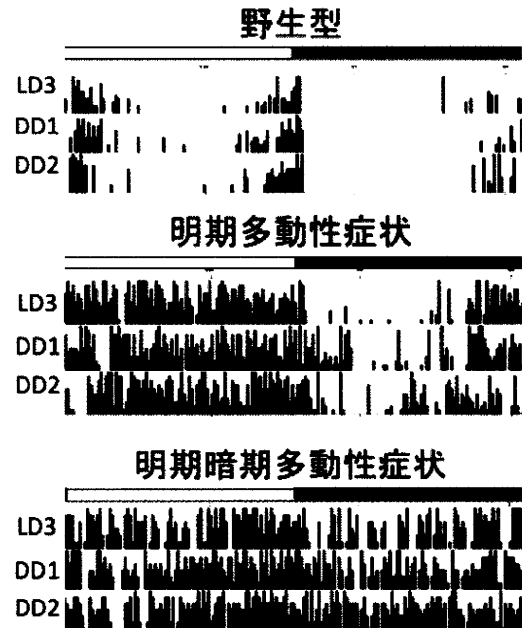


図10. ビスフェノールA食餌ショウジョウバエの行動リズム。

A) 野生型の正常なショウジョウバエの概日性活動リズム。太陽が昇る朝方と陽が沈む夕方に活動が盛んになる二峰性を示す。このため、昼間と夜間は活動休止期となる。(B) 二峰性に加え、昼間の活動休止期に活動が盛んとなる異常性を示すショウジョウバエ群の活動パターン。明期多動性症状と呼ぶ。(C) 昼間の活動休止期に加え、夜間の活動休止期も多動性症状を示す。明期暗期多動性症状と呼ぶ。

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(図10)。後者のみ活動期になったのが「暗期多動性障害」である。

#### (7) 神経分化におけるビスフェノールAの内分分泌攪乱作用の解析

平成21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は、ヒトのERおよびERRの共通の祖先型であるが、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明を目指し、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。

### ① BG2-c6 細胞に対する BPA 暴露による影響

BG2-c6 細胞はエクジソン添加後、一定の割合でアポトーシスが起り、生存細胞は減少する。しかし、生存率は BPA 暴露の細胞群とコントロールとの間に有意な差はなかった。一方、16 時間後には、細胞は突起を伸ばし始めるが、どのタイムポイントにおいても、突起を伸ばす細胞の割合には有意の差が見られた。突起の長さは 48 時間後から有意の差が観察された。

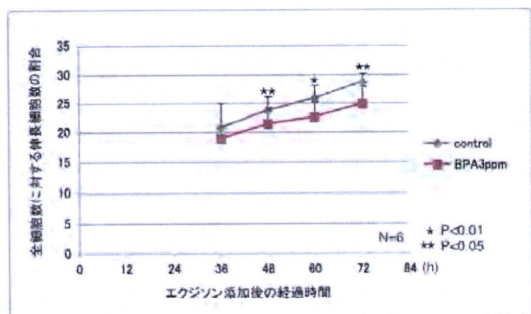


図 11. BG2-c6 細胞の伸長突起の長さの変化

### ② HiCEP 解析法による転写産物プロファイリング

BPA 暴露により、遺伝子の発現にどのような影響を受けるのかを網羅的に解析するため、HiCEP 法による転写産物プロファイリング解析を行った。突起伸長の開始が始まるエクジソン添加 12 時間後の BPA 暴露の細胞群と、コントロール群を比較した結果、15 個の RNA 断片に変動が見られた。

それらから、3 個の遺伝子、すなわち、LSD-2、Hsp68 および Mv1 を同定する事ができた。分取ピーク 7 (変動比 0.51) よりの LSD-2 は「脂質結合製タンパク質遺伝子」、分取ピーク 13 (変動比 0.59) よりの Hsp68 は「heat shock protein 68 のアンチセンス

として報告されている遺伝子」。そして、分取ピーク 15 (変動比 0.63) よりの Mv1 は「銅イオンのトランスポーター-MV1 イントロン領域として報告されている遺伝子」であった。

### ③ PCR および定量的 RT-PCR 解析

BPA 暴露により発現に変動が観察された 3 つの遺伝子が、BG2-c6 細胞系の経時サンプルでどのように発現するかを PCR 法により確認した。

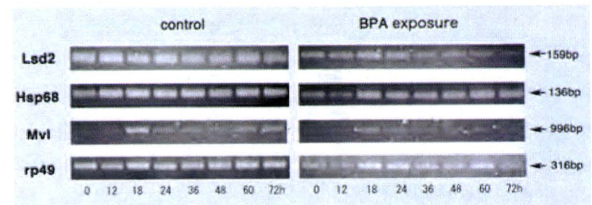


図 12. PCR 法による発現解析

Lsd2 および Hsp48 はエクジソン処理後 72 時間経過までの間、緩やかな量的変動をしめした。Mv1 は 18 時間後に一過性の発現を示し、その後は低い状態で推移する。18 時間後の発現ピークは、BPA 暴露サンプルでは発現が抑制されている。

### (8) BPA 暴露による時計遺伝子への影響

ショウジョウバエを BPA 暴露の状態で飼育・継代すると、「明期多動性症状」および「明期暗期多動性症状」のハエが増加することを明らかとした。これらの多動性症状には、BPA が時計遺伝子にエピジェネティックな影響を及ぼす可能性が強く示唆されたため、これらのハエの頭部から抽出した mRNA を用いて時計遺伝子の cDNA クローニング解析を行い、それぞれの塩基配列を比較した。今回、平成 22 年度、*period* 遺伝子について解析したところ、PERIOD タンパク質の Thr-Gly リピートをコードする領域において、野生型では 20 回と 23 回リピートの両方が存在するが、多動性症状のハエでは 20 回リピートのみをコードしている明らかな差異がみられた。このことから、野生型には Thr-Gly の 20 回リピートの集団と 23 回リピートの集団が存在し、20 回リピート集団が BPA に対して特に強く影響を受け、多動性症状を示すようになったことが示唆された。

## D. 考察

### ハロゲン含有ビスフェノールの核内受容体応答

平成21年度、ビスフェノールAFはER $\alpha$ に対してアゴニスト、ER $\beta$ に対してアンタゴニストとして働くという驚くべき事実が判明した。ビスフェノールAFは、ビスフェノールAのメチルCH<sub>3</sub>が2つともトリフルオロメチルCF<sub>3</sub>に置換したものである。このため、こうした受容体応答の原因にハロゲンが含まれることが考えられ、今年度、ビスフェノールCおよびHPTEについて試験したところ、予想に違わず、これらも『ビスフェノールAFはER $\alpha$ に対してアゴニスト、ER $\beta$ に対してアンタゴニストとして働く』ことが確認された。HPTEについては、文献的に同様の結果を示唆する報告もあったが、実際に試験するとビスフェノールAFと全く同じ受容体応答を示した。ハロゲン、すなわち、フッ素や塩素を含むとどうしてこのように、ER $\beta$ において自らは不活性であり、E2に対して阻害活性を示すのか？ 詳細な原因は現在のところ不明である。さらに、ハロゲン化合物だけに見られる応答なのか？ ハロゲンを含むと必ず示される応答なのか？ についても現時点では不明である。

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たのであるが、その理由は、「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」という矛盾した応答性に端を発している。現在、はっきりしていることは、ER $\alpha$ とER $\beta$ を介してこうした応答が現れることである。そして、この事実に基づいて二つの重要なポイントを指摘することができる。一つは、エストロゲン剤、あるいは抗エストロゲン剤として薬剤開発が盛んであるが、ER $\alpha$ とER $\beta$ を介して真逆の応答を示す薬剤が存在しうることについて十分に留意すべきことである。ER $\alpha$ とER $\beta$ の両方の受容体に対して正しく応答を評価すべきである。もう一つは、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」が高機能ポリカーボ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

の使用量が年々著しく増大しているため、それらの環境への拡散、生体への影響について絶対に無視できないことである。

ドラッグデザインにおいて、ハロゲンを導入して化合物の受容体結合親和性を向上させようとする考え方が顕著である。しかし、本研究結果はこれに警鐘をならすものである。ハロゲン結合による親和性増強は、ある場合、強い反発を生むこともあり、受容体応答をきちんと評価すべきである。「乳がん」細胞においてはER $\alpha$ とER $\beta$ の両方が存在しており、特に留意すべきである。

### RXRへのトリブチルスズの結合は共有結合

平成22年度、レチノイドX受容体RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ について精度の高い受容体結合試験系を構築することに成功した。これまでは、異なる研究者が異なるサブタイプについて報告し、しかも、標準化合物9-シスレチノイン酸の活性値もまちまちであった。今回、まず、<sup>3</sup>H]-9-シスレチノイン酸の飽和結合試験を実施した。いずれのサブタイプにおいても、一つの結合部位において、非常に強い結合を示すことが証明された。次いで、<sup>3</sup>H]-9-シスレチノイン酸をトレーサーとした競合結合試験系を確立し、それぞれ約500種類の化合物について結合親和性を測定した。その結果、ビスフェノールAの関連化合物や有機スズなどが9-*cis*レチノイン酸と同様に強く結合することが判明した。

RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ のリガンド結合ポケットに、システインが存在する。このシステインは遊離のチオール基をもち、そこで、チオール試薬N-メチルマレイミドについて結合試験を実施した。その結果、RXR $\alpha$ に特異的に結合し、そして、濃度依存的に9-*cis*レチノイン酸の結合を阻害することが明らかとなった。これは、N-メチルマレイミドのRXR $\alpha$ への結合がアフィニティーラベリングであることを示唆した。RXR $\beta$ および $\gamma$ では、その効果は $\alpha$ 型よりも小さいものの、同様にアフィニティーラベリングが起こることを示す結果が得られた。

RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ に対して、9-シスレチノイン酸は強く結合する。この結合を一定量のN-メチルマレイミドは阻害すること、また、一定量の9-シスレチノイン酸に対してN-メ



チルマレイミドは濃度依存的に結合を阻害する。これらの結果は、システインが9-シスレチノイン酸の結合部位を共有していること、また、9-シスレチノイン酸の結合部位にシステイン残基が存在することを示す。全く同様のことがトリブチルスズでも観察された。このことは、トリブチルスズがシステイン残基の遊離チオール基と共有結合することを強く示唆した。

### 核内受容体と化学物質。双方向からのスクリーニングの重要性

化学物質の内分泌攪乱作用の本質は、核内受容体を介するシグナル毒性である。当初、試験が必要と考えられていたのは、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。また、甲状腺ホルモン受容体TRが対象であった。しかし、2006年（平成18年）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。これが契機に、

「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」ことが必須となった。このため、我々は、すべてに対して試験系を構築、確立すべく取り組んできた。そして、そのほとんどが確立され、実際の試験も多くの核内受容体でまず、500化学物質を目標に開始された。繰返しになるが、その基本的な考え方は、「48種すべての核内受容体は、なべて化学物質に曝露される可能性がある」という考え方である。

この考え方が正しいと判断できる新事実の発見が、昨年度までに五項目あった。①ERR $\gamma$ 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。②ER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。③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。④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。さらに、⑤ビスフェノールAFがエストロゲン受容体 $\alpha$ 型ER $\alpha$ にフルに活性なアゴニスト、ER $\beta$ に不活性はアンタゴニストとして同定されたこと。そして、

今年度、ビスフェノール-HPTEやCがビスフェノールAFと同様に、ER $\alpha$ にアゴニスト、ER $\beta$ にアンタゴニストとして同定されたこと、を始めとして、LXR、RXRなどについて続々と新しい事実の解明があった。

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。

### ビスフェノールAの低用量作用の本質は？

「ビスフェノールAの内分泌攪乱作用の本質は、核内受容体ERR $\gamma$ を介するシグナル毒性である」とすると、ビスフェノールAを結合したERR $\gamma$ が何らかの悪影響を及ぼすと考える必要がある。ショウジョウバエを用いた試験で興味深い結果が得られた。ビスフェノールA食餌のショウジョウバエの活動リズムを計測すると、明らかに「多動性症状」のハエが多くなる。明期多動性症状、明期暗期多動性症状のハエについて、時計タンパク質PERIODの遺伝子を解析したところ、分子のほぼ中央に位置する領域にThr-Glyの配列が多重に繰返す配列があり、野生型に23回繰返しと20回繰返しの両方があるのに対して、多動性症状のハエには20回繰返しのものしかなかった。この事実は、ビスフェノールA食餌がX染色体に存在するPERIOD遺伝子の選別に働いた可能性を示唆する。

ビスフェノールA食餌の影響が他にもあるかは現在解析中であるが、エピジェネティックに影響する効果がビスフェノールAを結合したERR $\gamma$ （ショウジョウバエの場合は、dERR）にあるとすると、ERR $\gamma$ が転写制御する遺伝子について十分に調べる必要がある。そして、その影響の本質を解明する必要がある。

ショウジョウバエの遺伝子群はほ乳類ときわめて近似しており、したがって、遺伝子解析において非常に有利である。しかも、概日リズムの体内時計のしくみは、ショウジョウバエとヒトで良く似ており、ペースメーカーホルモンペプチドをはじめとして、リズム発振、伝達の分子機構において保存されている。こうした分子機構への影響についてまず調べることが望まれる。

## E. 結論

本研究課題「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」の目的は、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を構築し、化学物質をスクリーニングすることである。そして、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。平成22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、さらには類縁のビスフェノール-HPTE、ビスフェノールCについて、『これらのビスフェノールは、ER $\alpha$ のアゴニスト、ER $\beta$ のアンタゴニスト』という新事実を明らかとした。特に、ビスフェノールAFについては国際学術誌 *Environmental Health Perspectives* に受理・掲載され、大きな反響を得たが、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の誘導体が、いろいろな核内受容体に結合することが明らかとなった。例えば、ヒト肝臓X受容体・Liver X Receptors (LXR) は、コレステロールや脂質の恒常性維持に関与する核内受容体であるが、ビスフェノールAの誘導体4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)は、LXR $\alpha$ にかなり強く結合するものの、LXR $\beta$ には非常に弱い結合性しか示さず、きわめて強いLXR $\alpha$ 型選択性化合物であることが判明した。これと同様にかさ高いビスフェノール誘導体がRXRなどに結合することが判明した。平成22年度よりは、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、これにさらに化学物質を追加しながら、さまざまな核内受容体について試験した。

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、多動性症状のハエを同定した。「明期多動性症状」と「明

期暗期多動性症状」のハエについて、時計遺伝子 *period* を解析したところ、Thr-Gly 繰返し配列について、野生型で23回繰返しと20回繰返しの両方があるのに対して、多動性症状のハエには20回繰返しのものしかなかった新事実が明らかとなった。この時計タンパク質における異常性の生理的な意義の解明が期待される。

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ない。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. A Circadian Neuropeptide PDF in the Honeybee, *Apis mellifera*: cDNA Cloning and Expression of mRNA. M. Sumiyoshi, S. Sato, Y. Takeda, K. Sumida, K. Koga, T. Itoh, H. Nakagawa, Y. Shimohigashi, and M. Shimohigashi: *Zoological Science*, in press.
2. Endocrine disrupter bisphenol A increases *in situ* estrogen production in the mouse urogenital sinus. S. Arase, K. Ishii, K. Igarashi, K. Aisaki, Y. Yoshio, A. Matsushima, Y. Shimohigashi, K. Arima, J. Kanno, Y. Sugimura: *Biology of Reproduction*, **84**(4), 734-742 (2011).
3. Pigment-dispersing factor affects nocturnal activity rhythms, photic entrainment and the free-running period of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. E. Hassaneen, A. El-Din Sallam, A. Abo-Ghalia, Y. Moriyama, S.G. Karpova, S. Abdelsalam, A. Matsushima, Y. Shimohigashi, and K. Tomioka: *Journal of Biological Rhythms*, **26**(1), 3-13 (2011).

4. Structure-activity studies on nociceptin and its receptor ORL1. Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2010*, 26 (2011).
5. *Drosophila* neuropeptide hugy present in the clock cells important for circadian rhythm oscillation. K. Koga, M. Nakamura, M. Sumiyoshi, A. Mastumoto, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2010*, 68 (2011).
6. *Apis pdf* gene expresses in circadian manner. M. Sumiyoshi, Y. Takeda, S. Sato, K. Koga, I. Tsunao, H. Nakagawa, Y. Shimohigashi, and M. Shimohigashi: *Peptide Science 2010*, 69 (2011).
7. Exploration of the binding site of ORL1 nociceptin receptor antagonist. S. Inamine, J. Li, H. Nishimura, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2010*, 167 (2011).
8. Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ER $\gamma$  between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, and Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, **148**(2), 247-254 (2010).
9. Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ER $\alpha$ , but a highly specific antagonist for ER $\beta$ . A. Matsushima, X. Liu, H. Okada, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Environmental Health Perspectives*, **118**, 1267-1272 (2010).
10. Functional role of the C-terminal helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ). X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2009*, 435-436 (2010).
11. The agonist/antagonist differential-docking screening (AADS) method for exploration of the estrogen receptor-binding chemicals. T. Nose, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2009*, 463-464 (2010).
- 暴露による株化ニューロン BG2-c6 の遺伝子発現への影響、環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
2. 中村将行、松尾文香、住吉美保、古賀啓太、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA食餌による多世代継代ショウジョウバエ活動リズムの特異的変異、環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
3. 錦織充広、野瀬 健、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体 RORs に特異的に結合するジ-sec-ブチルビスフェノールA、環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
4. 西垣内 誠、劉 曉輝、酒井大樹、巢山慶太郎、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、レチノイドX受容体(3):  $\gamma$ 型(RXR $\gamma$ )に結合する化学物質の構造要因、環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
5. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールA/ER $\alpha$ のERRを介した活性増強メカニズム、環境ホルモン学会 第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
6. 巢山慶太郎、劉 曉輝、酒井大樹、西垣内 誠、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、レチノイドX受容体(2):  $\beta$ 型(RXR $\beta$ )に結合する化学物質の構造要因、環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
7. 野瀬 健、村田聡史、下東康幸、ER $\alpha$ における結合性リガンドの芳香環認識構造要因・Leu-387側鎖の重要性、環境ホルモン学会 第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。
8. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールAFが特異的アンタゴニストとなるエストロゲン受容体 $\beta$ の構造要因解析、環境ホルモン学会第 13 回研究発表会、東京大学山上会館、2010. 12. 16-17。

#### 学会発表

1. 下東美樹、古川あや、住吉美保、松島綾美、下東康幸、中川裕之、ビスフェノールA
9. 松島綾美・Kerrienne Ryan・Ian A. Meinertzhagen・下東康幸、カタユウレイボ



ヤのビスフェノールA暴露による孵化率低下と遊泳行動異常、環境ホルモン学会第13回研究発表会、東京大学山上会館、2010.12.16-17。

10. 下東康幸、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、ER $\alpha$ アゴニストおよびER $\beta$ アンタゴニストとして働く化学物質の構造要因、環境ホルモン学会第13回研究発表会、東京大学山上会館、2010.12.16-17。

11. 中村将行、松尾文香、住吉美保、古賀啓太、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエのビスフェノールA食餌による概日リズムの変異、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9。

12. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER $\alpha$ におけるビスフェノールAの活性増強メカニズム、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9。

13. 巢山慶太郎、劉 曉輝、西垣内 誠、酒井大樹、下東康幸、核内受容体RXR $\beta$ に結合親和性を示す化学物質の構造要因、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9。

14. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、変異エストロゲン受容体 $\alpha$ 型および $\beta$ 型を用いたビスフェノールAFが示す $\beta$ 型特異的アンタゴニスト活性の構造要因解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9。

15. 野瀬 健、村田聡史、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残基の構造要因、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9。

16. 松島綾美、劉 曉輝、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ハロゲン化ビスフェノールのエストロゲン受容体 $\alpha$ および $\beta$ 型の結合親

和性および活性、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9。

17. 松島綾美:ビスフェノールA:赤ちゃんの脳に害をなす化学物質。福岡女子大学かすみ祭実行委員会・人間環境学部環境理学科・女性生涯学習研究センター共催特別講演会、福岡女子大学、2010.7.17-19。

18. 縄司 奨:レチノイン酸受容体RAR $\alpha$ 型に対する化学物質の結合試験系の構築、第10回泉屋コロキウム、九州地区国立大学九重共同研修所、2010.8.31-9.1。

19. 中村将行、ビスフェノールA食餌によるショウジョウバエ概日リズムの明期および暗期における多動性変異、第10回泉屋コロキウム、九州地区国立大学九重共同研修所、2010.8.31-9.1。

20. 池田 伸、ビスフェノールAのエストロゲン受容体 $\alpha$ 型における活性増強作用の解析、第10回泉屋コロキウム、九州地区国立大学九重共同研修所、2010.8.31-9.1。

21. 巢山 慶太郎:核内受容体RXR $\beta$ に結合する化学物質の親和性の構造要因、第10回泉屋コロキウム、九州地区国立大学九重共同研修所、2010.8.31-9.1。

22. 錦織充広、核内受容体・RORに対する化学物質結合性の評価、第10回泉屋コロキウム、九州地区国立大学九重共同研修所、2010.8.31-9.1。

23. 中村将行、古賀啓太、住吉美保、安藤 悟、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA食餌によるショウジョウバエ活動リズムへの影響、第32回日本比較生理生化学会大会、九州産業大学、2010.7.17-19。

24. 倉原遥平、赤岩裕也、西垣内 誠、松島綾美、下東康幸、マウス胎仔期における時計遺伝子発現レベルのプロファイリング、第47回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2010.7.10。

25. 中村将行、古賀啓太、住吉美保、安藤 悟、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA食餌

による活動異常のショウジョウバエの概日リズム、平成22年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2010.5.22-23。

26. 巢山慶太郎、酒井大樹、西垣内 誠、下東康幸、核内受容体RXR  $\beta$  に対する化学物質の親和性、平成22年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2010.5.22-23。

27. 劉 暁輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール AF のエストロゲン受容体 (ER) 応答における分子機構解析、平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、

鹿児島大学郡元キャンパス、2010.5.22-23。

28. 松島綾美、劉 暁輝、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール AF のエストロゲン受容体  $\alpha$  と  $\beta$  に対する結合特性、平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2010.5.22-23。

#### 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・レチノイドX受容体（RXR） $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 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 曉輝 九州大学大学院理学研究院 学術研究員

研究要旨

化学物質の内分泌かく乱作用が、核内受容体を介したシグナル毒性であり、ビスフェノールA（BPA）がエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型（estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ）に特異的に非常に強く結合することを発見されて以来、核内受容体全48種類の結合、生理活性を調査することが必須の状況となった。こうしたなか、レチノイドシグナルの伝達を介して恒常性維持、免疫応答、細胞増殖などの重要な機能を制御しているレチノイド受容体（レチノイン酸受容体、RAR；レチノイドX受容体、RXR；レチノイド関連オーファン受容体、ROR）に対する化学物質の結合親和性に関する研究も進められてきた。本研究では、RXRに着目し、内在性リガンドである $[^3\text{H}]9\text{-cis retinoic acid}$  ( $[^3\text{H}]9\text{cRA}$ )を用いた受容体結合試験系を構築し、それを用いた競合結合試験でビスフェノール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、フタル酸エステル類、XEON 外因性リガンドなど22に分類した合計500種化学物質に対しRXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ への結合応答解析を実施した。その結果、内在性リガンド9cRAおよび、既に報告されているトリブチルスズ (tributyltin; TBT) はRXRに対して非常に強い結合が確認された。また、ビスフェノール誘導体やアルキルフェノール類など、RXRと比較的に強く結合する化学物質が幾つか存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用はこれまで、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かく乱物質の問題が存在すると考えられる。我々は最近、ビスフェノールA（BPA）がエストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型（estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ）に特異的に非常に強く結合することを発見された。これまで、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、BPAがERではなく、ERR $\gamma$ と非常に強く結合することから、化学物質のリスクを正確に評価することが必須である。

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。こうしたな



か、レチノイドシグナルの伝達を介して恒常性維持、免疫応答、細胞増殖などの重要な機能を制御しているレチノイド受容体(レチノイン酸受容体、RAR; レチノイドX受容体、RXR; レチノイド関連オーファン受容体、ROR)に対する化学物質の結合親和性に関する研究も進められてきた。本研究では、レチノイドX受容体 (retinoid X receptor; RXRs) に着目した。

RXR はレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor; RARs) と共にレチノイン酸シグナル伝達に関与する核内受容体であり、3種類のサブタイプ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ が知られている。9-*cis* retinoic acid (9cRA) はRXRs共通の内在性リガンドとして報告されており、その結合性は極めて高い。近年では、内分泌かく乱物質であるトリブチルスズが、RXRsと強力に結合し、生殖系および内分泌系に影響を及ぼす可能性が指摘されている。RXRsは、TRs、PPARs、VDR、RARs、PXR、CAR、LXR、FXRのような、主にサブファミリーIに属する核内受容体とヘテロ二量体を形成することにより、特異的な標的遺伝子の転写制御を介し、発達・分化・代謝等を含む様々な生理作用を調節している。

RXR $\alpha$ は、肝臓、腎臓、表皮、小腸に多く発現しており、皮膚において主要なRXRである。RXR $\alpha$ 欠損マウスは胎仔期において致死性であり、心筋と目の奇形が見られることが報告されている。また、マウス精巣では2種類のRXR $\alpha$ アイソフォームの存在が確認されているが、それらの機能的役割についてはよくわかっていない。RXR $\beta$ は生体内の様々な組織で偏在的に発現している。RXR $\beta$ 欠損マウスも、RXR $\alpha$ 欠損マウスと同様に50%程度は胚性致死性である。また、生存したRXR $\beta$ 欠損マウスは無精子症や生殖細胞の変異などの症状をきたす。このことは、RXR $\beta$ が精細胞の支持等に関わるセルトリ細胞中で必要不可欠な機能を担っていることを反映したものであるという報告がなされている。RXR $\gamma$ は主として筋肉中に存在するが、部分的に脳や脂肪細胞中にも発現している。他の2つのアイソフォームの場合と異なり、RXR $\gamma$ 欠損マウスは外見的には正常であるが、空腹時の血漿中におけるトリグリセリド量の減少、骨格筋中のリポタンパクリ

ーゼ活性の増強、体重の減少などを引き起こすことが報告されている。

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。これまで、RXRに対する生理機能に関する知見が増えつつあるものの、RXR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。本研究ではRXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 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。

## 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、フタル酸エステル類、XEON 外因性リガンドなど22に分類した合計500種化学物質を選定した。化学物質の溶液調製は、それぞれ $1.0 \times 10^{-2}$  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RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ タンパク質の調製

Origene社から購入したRXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 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(RXR $\alpha$ -LBD、RXR $\beta$ -LBD、RXR $\gamma$ -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RXR $\alpha$ -LBD、RXR $\beta$ -LBD、RXR $\gamma$ -LBDタンパク質の大量発現を行った。RXR $\alpha$ -LBDタンパク質の発現は、大腸菌のO.D.<sub>600</sub>値が0.2~0.4の間で0.2 mMのIPTGを添加し、16°Cで18時間振盪培養することにより行った。RXR $\beta$ 及びRXR $\gamma$ は、大腸菌のOD<sub>600</sub>値が0.5~1.0の間で1 mMのIPTGにより37°Cで3時間振盪培養し、タンパク質を発現した。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。その後、細胞を遠心分離により回収し、超音波処理で破碎した。タンパク質の精製は、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 RXR  $\alpha$ -LBD、RXR  $\beta$ -LBD、RXR  $\gamma$ -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 [ $^3$ H]9cRA 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 0~40 nM の [ $^3$ H]9-*cis* retinoic acid ([ $^3$ H]9cRA) と binding buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 8% glycerol, 1 mg/ml ovalbumin, 0.5% CHAPS (pH 7.4)) 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  $\mu$ M 9cRA を添加して測定し、これを非特異的結合とした。反応は 4°C で 1 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、1%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 [ $^3$ H]9cRA 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、RXR  $\alpha$ 、RXR  $\beta$ 、RXR  $\gamma$  に対する [ $^3$ H]9cRA の  $K_d$ 、 $B_{max}$  値を求めた。

### (4) 競争結合試験

500 種の化学物質における RXR  $\alpha$ 、RXR  $\beta$ 、RXR  $\gamma$  に対する結合能は、[ $^3$ H]9cRA 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 [ $^3$ H]9cRA、RXR  $\alpha$ -LBD、RXR  $\beta$ -LBD、RXR  $\gamma$ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、4°C で 1 時間をインキュベートした。遊離の [ $^3$ H]9cRA を DCC により除去し、TopCount NXT™ 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<sub>50</sub> 値 ([ $^3$ H]9cRA 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) RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ に対する飽和結合

### 試験

飽和結合試験を行ったところ、RXR  $\alpha$  (図 1)、RXR  $\beta$  (図 2)、RXR  $\gamma$  (図 3) ともに [ $^3$ H]9cRA の特異的結合を確認することができた。Scatchard 解析により、

RXR  $\alpha$  では  $K_d = 19.6 \pm 1.58$  nM、

$B_{max} = 12.6 \pm 1.02$  nmol/mg、

RXR  $\beta$  では  $K_d = 21.5 \pm 0.39$  nM、

$B_{max} = 8.07 \pm 1.16$  nmol/mg、

RXR  $\gamma$  では  $K_d = 16.3 \pm 0.74$  nM、

$B_{max} = 3.71 \pm 0.06$  nmol/mg

と算出された。

本研究で得られた RXRs と 9cRA の結合性は報告値と同等であり、この試験系を用いることにより RXRs に対する 9cRA の強い特異的結合が再現性よく観測されることが明らかとなった。

飽和結合曲線から特異的結合は全結合の 40~50% あり、スキッチャ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。

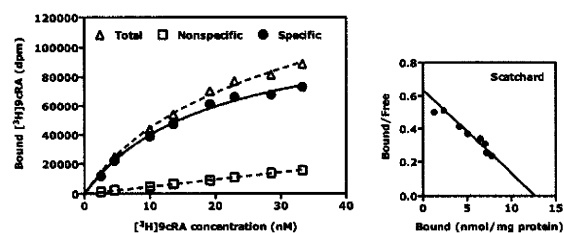


図 1. RXR  $\alpha$  飽和結合試験とスキッチャードプロット解析の結果

RXR  $\alpha$  に対する [ $^3$ H]9cRA の全結合( $\Delta$ )、特異的結合( $\bullet$ )、非特異的結合( $\square$ )を示す。

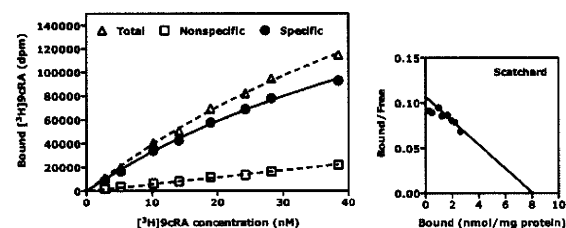


図 2. RXR  $\beta$  飽和結合試験とスキッチャードプロット解析の結果

RXR  $\beta$  に対する [ $^3$ H]9cRA の全結合( $\Delta$ )、特異的結合( $\bullet$ )、非特異的結合( $\square$ )を示す。

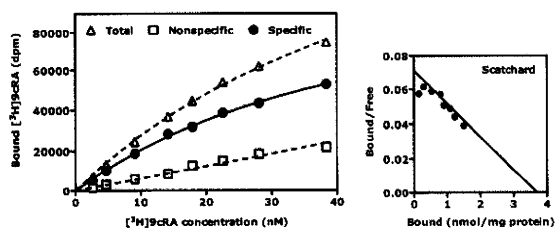


図3. RXR $\gamma$  飽和結合試験とスキャッチャードプロット解析の結果

RXR $\gamma$  に対する $[^3\text{H}]9\text{cRA}$ の全結合( $\Delta$ )、特異的結合( $\bullet$ )、非特異的結合( $\square$ )を示す。

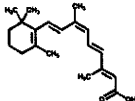
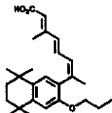
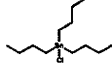

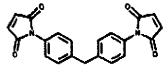
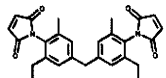
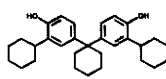

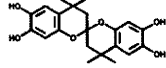
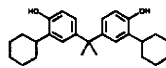
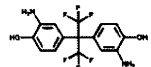
(2) RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ に対する競争結合試験：応答性化学物質の探索

競争結合試験により、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ およびRXR $\gamma$ 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、フタル酸エステル類、XEON 外因性リガンドなど22に分類した合計500種化学物質に対しを選定した。

1 nM  $[^3\text{H}]9\text{cRA}$ を用いて競争結合試験を行った。陽性対照として用いた9cRAのIC<sub>50</sub>値は、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ でそれぞれ21.3 nM、18.5 nM、48.7 nMであった。

供試した全500種の中で、既に報告されたTBT、Ttiphenyltin chlorid (TPT)、LG100754 (RXRのアンタゴニスト)がRXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$

表1. RXRと結合した化学物質の構造と9cRAに対する結合結合能

化学物質名/構造	相対結合能 (%)		
	RXR $\alpha$	RXR $\beta$	RXR $\gamma$
9-cis Retinoic acid (9cRA) 	100	100	100
LG100754 	74	119	279
Tributyltin chloride (TBT) 	45	709	383
Triphenyltin chloride (TPT) 	12	57	21.3
4,4'-Bismaleimidodiphenylmethane 	8.1	2.0	非常に弱く結合
Bis(3-ethyl-5-methyl-4-maleimidophenyl)methane 	6.5	3.5	非常に弱く結合
1,1-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)cyclohexane 	4.9	51	143
p-Dodecylphenol 	3.1	33	47.5
6,6',7,7'-Tetrahydroxy-4,4',4'-tetramethyl-2,2'-spirobichroman 	2.6	13.9	12.8
2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane 	1.2	7.9	6.4
2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane 	0.9	4.3	7.1