

に強く結合することが確認された。その他、約40種の化合物がRXRに有意に結合を示した。特に注目すべきことに、代表的な内分泌攪乱物質ビスフェノールA (BPA)と同様の骨格をもつ1,1-ビス(3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンが、RXRの三つのサブタイプとも結合性が見られた。特にRXR β に対して、9cRAと同程度の強さ(IC₅₀=約30 nM)で結合することが明らかとなった。また、ジフェニルメタンやアルキルフェノールなどにも、強い結合性を示す化合物がいくつか存在することが分かった。表1は、RXRと結合した主な化学物質について、9cRAに対する相対結合能(%)をまとめたものである。

(4) RXR 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

RXR はリガンドが結合によって、転写活性を示す「リガンド結合型核内受容体」である。RXRs は DR1 型の RXRs Response Elements (RXRE; AGGTCA) に結合して、homodimer を形成することが報告されている (Mangelsdorf *et al.*, *Cell* **66**, 555-561, 1991; Mader *et al.*, *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **12**, 5029-5041, 1993)。そこで、これまで発表されているラット *cellular retinol binding protein II* (rCBPII) 遺伝子上流プロモーター領域に存在する RXRE (-639 GCTGTCACAGGTCAAGGTCAAGGTCAAGGTCAAGTTCA -605) を3回コピーした応答配列を組み込んだレポータープラスミドの作製し、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。まず、IC₅₀ は1 μ M 以下に結合する化学物質について、RXR に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性を解析した。

9cRA 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、RXR α 、 β 、 γ の転写活性は9cRAにより5~10倍に増加した。しかし、TBTやTPTはRXRのアゴニストであることが報告されたが、HeLaに細胞毒性強く、10⁻⁷ Mで50%の転写活性化を示し、それ以上の濃度で、細胞が死んでいるため、最大活性が見られなかった。

その他に結合性が判明した化学物質ではほとんど変化しなかった。次に、9cRAのRXRに最大活性を示す濃度(10⁻⁶M)と対象化学物質を複合処理したところ、9cRAにより促進されたRXR転写活性は、1,1-ビス(3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンにより抑制した。対照化学物質としてLG100754にも強く抑制され、アンタゴニスト活性が見られた。その他の化学物質について、RXRに対する結合性が弱いため、有効なアンタゴニスト活性が見られなかった。

D. 考察

[³H]9cRAを用いたRXR α 、RXR β 、RXR 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ほぼ同じであった。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。その試験系を用いて500化合物の結合親和性を測定した結果、約40種の化合物が有意に結合を示した。特に注目すべきことに、代表的な内分泌攪乱物質ビスフェノールA (BPA)と同様の骨格をもつ1,1-ビス(3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンが、RXR β 、 γ に9cRAと同程度の強さで結合し、RXR α にも比較的強く結合することが明らかとなった。また、ジフェニルメタンやアルキルフェノールなどにも、強い結合性を示す化学物質がいくつか存在することが分かった。結合親和性を示した化学物質の構造の比較から、強く結合する化合物は、一つ以上の親水性官能基やかさ高い疎水性部位など、類似した構造的特徴を有することが判明した。また、有機スズ化合物はRXR α 、 β 、 γ に対して非常に強い結合を示すという結果が得られ、既存の報告の内容を裏付けた。

RXR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。本研究により、内分泌かく乱物質BPAの生理作用はRXRを介したものではないことが分かった。しかし、疎水性の高いBPAアナログの結合が観測されたことから、

「新世代ビスフェノール」が RXR を介した内分泌かく乱作用を持つ可能性が示唆された。

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

1. 巢山慶太郎、酒井大樹、西垣内 誠、下東康幸：核内受容体 RXR β への化学物質の結合親和性。平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22-23 日。

2. 巢山慶太郎：核内受容体 RXR β 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、2010 年 8 月 31 日~9 月 1 日。

3. 巢山慶太郎、劉 曉輝、酒井大樹、西垣内 誠、下東康幸：核内受容体 RXR β 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)、2010 年 12 月 7-10 日。

4. 巢山慶太郎、劉 曉輝、酒井大樹、西垣内 誠、錦織充広、縄司 奨、松島綾美、野

瀬 健、下東康幸：レチノイド受容体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、2010 年 12 月 16-17 日。

5. 劉 曉輝、酒井大樹、巢山慶太郎、西垣内 誠、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：レチノイド X 受容体 (1) : α 型 (RXR α) 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、2010 年 12 月 16-17 日。

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) : β 型 (RXR β) 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、2010 年 12 月 16-17 日。

7. 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) : γ 型 (RXR γ) 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、2010 年 12 月 16-17 日。

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 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 曉輝 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、脊椎動物の胚の器官形成、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 (9cRA) 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、脂肪酸類および精巣毒性関連物質など約 200 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が、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 種類を存在し、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関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) や9-*cis* retinoic acid (9cRA) 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、脊椎動物の胚の器官形成、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 (9cRA) および13-*cis* retinoic acid (13cRA) 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 型に共通なり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も多く報告されている。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。昨年度は、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代表的な化学物質合計43種を選定し、RAR α 、 β 、 γ に対する結合性を調べた。今年度は、これらによりさらに類似構造の化学物質や脂肪酸類などを加えて、約200種類の化学物質のRARへの結合性を評価した。

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、脂肪酸類、精巢毒性関連物質など約200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 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 [3 H]all-*trans* retinoic acid ([3 H]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 μ M 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 [3 H] 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 Plot 解析を用いて、RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する [3 H]ATRA の K_d 、 B_{max} 値を求めた。

(4) 競争結合試験

200 種の化学物質における RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する結合能は、[3 H]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濃度依存的 (10^{-5} ~ 10^{-10} M) に [3 H]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 [3 H]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 IC₅₀ 値 ([3 H] ATRA 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) ともに [3 H]ATRA の特異的結合を確認することができた。Scatchard Plot 解析により、RAR α では $K_d = 7.58$ nM、 $B_{max} = 5.74$ nmol/mg、RAR β では $K_d = 7.35$ nM、 $B_{max} = 2.52$ nmol/mg、RAR γ では $K_d = 11.6$ nM、 $B_{max} = 3.23$ nmol/mg と算出された。

文献によると、内在性リガンド 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、スキヤ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。

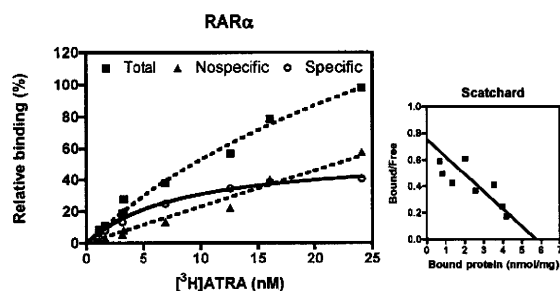


図 1. RAR α 飽和結合試験

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

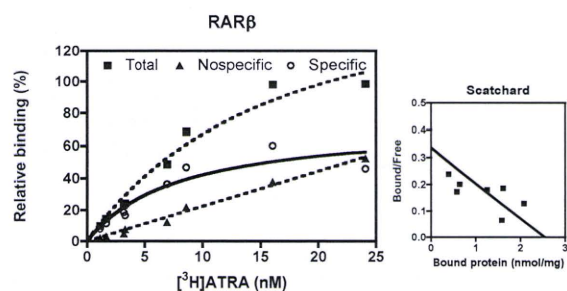


図 2. RAR β 飽和結合試験

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。

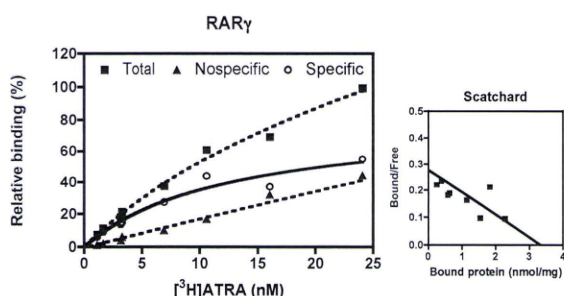


図 3. RAR γ 飽和結合試験

RAR γ に対する ^3H 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、脂肪酸類および

表 1 スクリーニングに用いた化学物質リスト

ビスフェノール A アナログ	(43 種)
ビスフェノール AF タイプ	(10 種)
ビスフェノール A 関連化合物	(24 種)
ベンゾフェノン	(24 種)
ジフェニルメタン	(25 種)
ジフェニル 17-ケトステロイド	(1 種)
ステロイド類	(12 種)
フラボノイド	(4 種)
アルキルフェノール	(18 種)
塩素化合物	(2 種)
XENO 外因性リガンド	(6 種)
脂肪酸類	(9 種)
レチノイド類	(5 種)
その他	(8 種)

精巢毒性関連物質など約 200 種の代表的な化学物質を選定した (表 1)。

3 nM ^3H ATRA を用いてそれぞれ受容体の競合結合試験を行った。その結果、対照として用いた内在性リガンドである ATRA は RAR α 、RAR β 、RAR γ に IC₅₀ 値は、それぞれ 12.9 nM、14.6 nM、22.5 nM で、非常に強く結合することが確認された。また、RARs のリガンドである 9cRA は ATRA と同程度の結合性を示し、13 cRA においても、ATRA の 2 倍ほど弱くなって、RAR に強く結合することが判明した。ヒドロキシ基を持つレチノールは RAR に ATRA の 30~50 倍弱く結合し、アルデヒド基を持つレチナルは RAR にほとんど結合しなかった (図 4)。今回実験に対象としたその他の化学物質について、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。

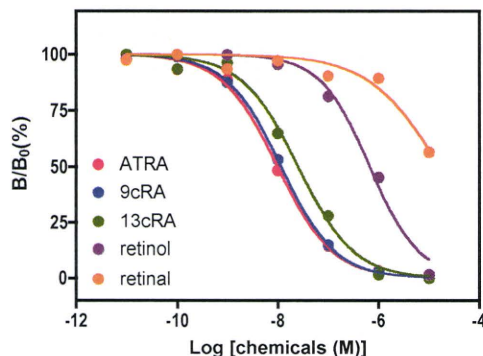


図 4. RAR α 競争結合試験

3 nM の ^3H ATRA を用いたレチノイド類化学物質の RAR α に対する結合性を示す。(RAR β 、RAR γ の結果はほぼ同様のため、省略)

D. 考察

^3H 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ほぼ同じであった。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、12~22 nM 程度であり、K_d 値 7~12 nM に比べて約 2 倍小さくなるため、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、約 200 種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 9cRA、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。しかし、今回、カルボキシル基を持つ一連の脂肪酸類化学物質の RAR に対する結合性を調べるところ、いずれも結合性が示さなかった。これらの結果より、RAR に強く結合するのは、カルボキシル基が塩基性アミノ酸と結合するために必須であり、その他の構造、トリメチルヘキセン、二重結合鎖も重要な構造要因である。今後、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

特になし。

学会発表

1. 縄司 奨、野瀬 健、酒井大樹、錦織充広、下東康幸：核内受容体・レチノイン酸受容体 α 型に対する化学物質の結合試験系の構築、第 47 回化学関連支部合同九州大会、2010. 7. 10。
2. 縄司 奨：レチノイン酸受容体 RAR α 型に対する化学物質の結合試験系の構築、第 10 回目泉屋コロキウム、2010. 08. 31-09. 01。

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

プロゲステロンX受容体（PXR）に対する結合試験系の構築と
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

近年、ポリカーボネート・プラスチックや、エポキシ樹脂の工業原料であるビスフェノールAのヒト健康への悪影響が危惧されている。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。さらに、試験対象の核内受容体は、女性ホルモン・エストロゲン受容体や、男性ホルモン・アンドロゲン受容体のみではなく、ヒト核内受容体全てを視野に入れる必要性を示すものである。そこで今回、まだあまり試験研究が進んでいない、プロゲステロンX受容体（progesterone X receptor: PXR）について、放射リガンドを用いた競合結合試験系の構築を行った。この受容体は、大腸菌で発現すると構造が不安定らしく、失活しやすかったため、アッセイ系の構築は困難をきわめた。しかし、最終的にはトリチウム標識の clotrimazole を用いた放射リガンド競合結合試験系の構築に成就した。さらに、BPAFをはじめとするBPA類似化合物など約30種の結合試験を行った。その結果、4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）が、既知のリガンドである clotrimazol よりやや弱く結合することが判明した。また、BPZが4-OHTと同程度結合した。さらに、弱いながらBPAFも結合することが明らかになった。

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月に最終報告を公表した。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。こうした世界情勢をうけて、EUでも、2011年1月に、ビスフェノールAのホ乳瓶に対する使用を禁じた。

ところで、ヒトにはエストロゲン受容体のような核内受容体が、合計48種も存在する。これらの核内受容体全てが、BPA類似化合物の標的となりうる。そこで、今回、ERR γ と同様に、はじめから活性型構造をとる、すなわち、リガンド結合ポケットが小さく、ERR γ 同様に、リガンドとしては比較的小さな

BPA類似化合物の結合が危惧される、プロゲステロン X 受容体 (progesterone X receptor: PXR) について、発現系の構築および結合試験系の構築を行った。さらには新規なPXR結合化合物の探索を目的として、BPA類似化合物約30化合物の結合スクリーニングを実施した。

B. 研究方法

(1) 受容 PXR 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を用いた。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 PXR 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 PXR-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) 0.2 mM 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 PXR-LBD は-80°C で保存し、実験に供出した。

(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 PXR-LBD と各濃度の放射標識された放射標識 Clotrimazole (^3H Clotrimazole) を binding buffer 中で混合し、4°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 Clotrimazole を ^3H Clotrimazole と併に加えることにより調べた。最終的な B/F 分離の条件としては、遊離の ^3H Clotrimazole 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。同様に、 ^3H 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) および ^3H ビスフェノール A (BPA) についても試験を実施した。

(3) 競争結合試験

BPA 類似化合物など、PXR-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 Clotrimazole の受容体結合を阻害する

能力で PXR 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 Clotrimazole と PXR 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 Clotrimazole 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 IC_{50} 値 (^3H Clotrimazole の受容体結合を 50% 阻害する値) はプログラム ALLFIT により算定した。

C. 研究結果

(1) 結合試験の条件検討

これまでに、我々が行った発現、結合試験では、PXR の結合が検出できていなかった。文献の詳細調査によると、既報の論文では、コアクチベータとともに共発現することにより、可溶性画分にタンパク質を得ていた。これは、このタンパク質が不安定であり、大腸菌で折りたたみが正常に行きにくい可能性を示唆すると考えられた。そこで、まず、リガンドとして知られる Clotrimazol 存在下でタンパク質を発現し、Clotrimazol と結合する構造を持つ PXR の発現を試みた。このタンパク質を用いて、結合試験の反応時間、温度、B/F 分離条件の検討を行った。その結果、やはり、このタンパク質は失活しやすく、凍結融解に耐えないことが判明した。しかも、室温の反応でも容易に失活することが明らかになった。つまり、 4°C で反応しなければならないことが判明した。B/F 分離の時間は、長くなるにつれ total も non-specific も下がることから、少なくとも 10 min 以上インキュベートすべきではない。毎回条件を同じにできるなら 3 min が最適と思われた (図 1)。

4°C for 1.5h

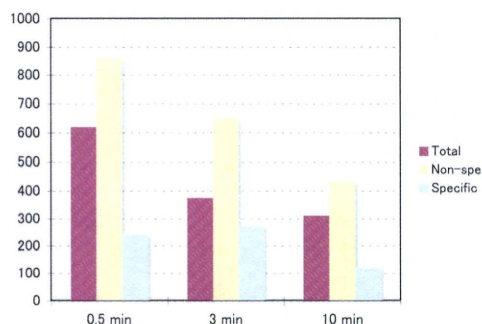
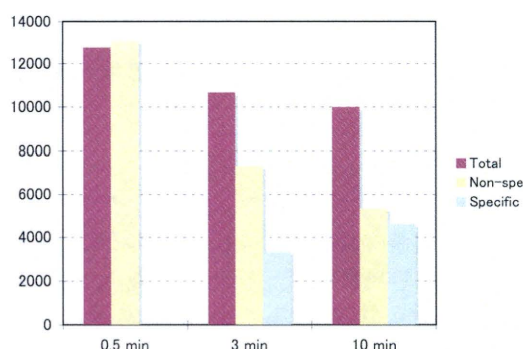


図 1. 10 nM ^3H Clotrimazol を用いた反応条件および B/F 分離検討

次に、トレーサーとして ^3H 4OHT が使えるのか、同様に検討を行った。その結果、 ^3H 4OHT も PXR に対する特異的結合が確かにあることが判明した。 ^3H 4OHT をトレーサーとする場合は、必ず 10 min インキュベートしなければ B/F 分離できないが、 ^3H Clotrimazol は短時間で B/F 分離できることが良くわかった。PXR はあまり安定なタンパク質ではないようなので、やはり B/F 分離時間は短い方が望ましいと思われる。他の受容体同様、非特異的結合が ^3H 4OHT は高いので、まずは ^3H Clotrimazol で結合試験系を構築することに決定した (図 2)。

4°C for 15 h by ^3H 4OHT



4°C for 15 h by ^3H Clotrimazol

25°C for 1h

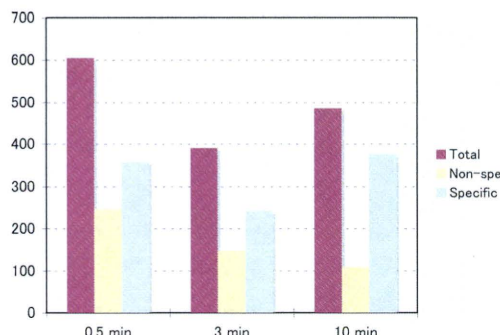
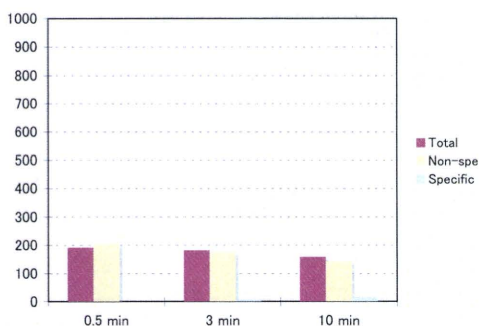


図 2. ^3H 4OHT と ^3H Clotrimazol の反応条件および B/F 分離検討

(2) PXR の飽和結合試験

(1) で決定した条件で、飽和結合試験を行った (図 3)。

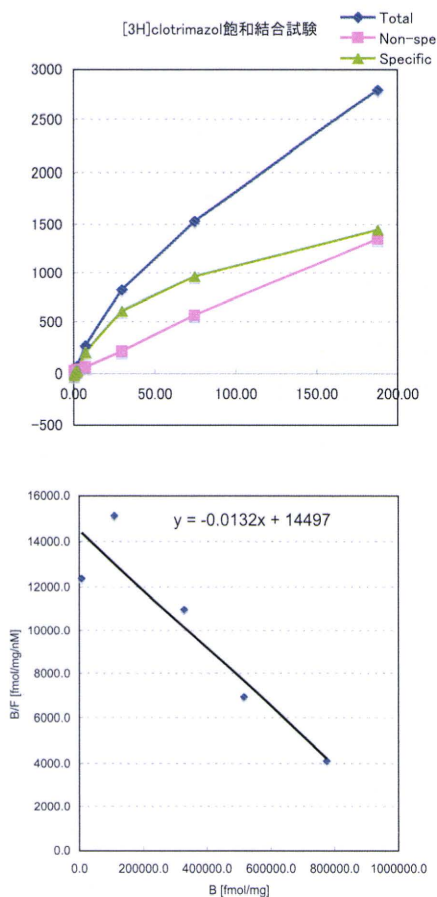


図 3. $[^3\text{H}]$ Clotrimazol の飽和結合試験

スキャッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は 75 nM であった。この結果より、Clotrimazole の PXR 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 3)。

これらの特異的結合が、反応溶液等の組成成分に由来するのではなく、PXR と Clotrimazole の結合に由来することを押さえる為に、競合結合試験を行った。その結果、確かに競合するので、PXR と Clotrimazol の結合を検出していることが判明した。また、40HT が少し弱いながら同等に結合すること等が判明した (図 4)。

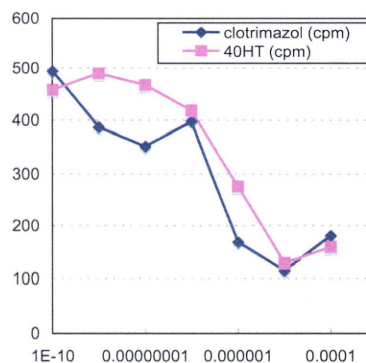


図 4. 20 nM $[^3\text{H}]$ Clotrimazol を用いた競合結合試験

また、20 nM の $[^3\text{H}]$ Clotrimazol で競合結合試験を行ったところ、Clotrimazol 自身の IC_{50} = 数百 nM であった。現時点では、 $[^3\text{H}]$ BPA は結合せず、 $[^3\text{H}]$ 40HT が Clotrimazol と同等か、少し弱い程度で結合した。BPAF は Clotrimazol より 2 オーダー程度弱い IC_{50} のようであった (10^{-5} M でやっと完全に 0 におちた)。

(3) PXR に対する BPA 類似化合物の結合スクリーニング

こうして確定した結合試験系を用いて、ビスフェノール類似化合物約 30 種の $[^3\text{H}]$ Clotrimazol による競合結合試験を行った。その結果、そのなかでは、BPZ が少なくとも 40HT と同程度に、PXR に強く結合することが判明した。図 5 に結果の一例を示す。

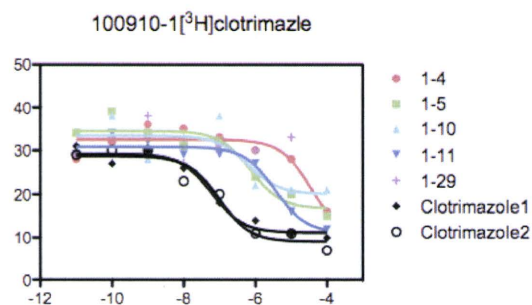


図 5. $[^3\text{H}]$ Clotrimazol を用いた PXR に対する BPA 類似化合物の結合スクリーニングの例

D. 考察

Clotrimazole は^[3H] Clotrimazole を用いた競合結合試験において、PXR に対して IC₅₀ 値で 70 nM 程度の結合能を示すことが判明した。さらに、これを用いた放射リガンド競合結合試験により、4-OHT がそれより若干弱いことが、同様に結合することが判明した。BPAF はさらに 100 倍以上弱くではあったが、PXR に結合できた。新世代ビスフェノールとしては、BPZ が 4-OHT と同程度強く結合した。これらの結果は、PXR にも、ビスフェノール類似化合物が結合することを直接示している。

E. 結論

PXR に強く結合する BPA 類似化合物として、BPZ を新規に見出した。これは BPAF よりもはるかに強く結合した。今後、レポーター遺

伝子アッセイが必要であり、また、全ての新世代ビスフェノールに対する試験が不可欠である。

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

本件に関連する論文発表はまだ無い。

学会発表

本件に関連する学会発表はまだ無い。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

ヒト・エストロゲン受容体 β 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と活性測定

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

プラスチックの工業原料であるビスフェノールAは、これが示す低用量作用により、ヒト健康への悪影響の危惧が非常に高まっている。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。そこで昨年度は、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。しかし、女性ホルモン受容体には、 α 型のみではなく、 β 型も存在する。そこで、今年度は、エストロゲン受容体 β 型（estrogen receptor β ; ER β ）について、同様に結合スクリーニングを実施した。その結果、エストロゲン受容体 α 型に結合するBPA類似化合物は、 β 型にも結合するということが判明した。すなわち、BPAより強い結合性を示した。BPA自身はER α およびER β に弱くしか結合しない。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 のみならず、ER β にもBPAよりも遥かに強く結合することは、これらの安全性に関する試験が不可欠であることを示す。これらのうち、特に結合力の強い13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、驚くべきことに、これらのほとんどが、ER β の活性化を阻害する遮断薬、すなわちアンタゴニストであると考えられた。これは、BPA類似化合物のほとんどがER α に対する活性化薬、すなわちアゴニストであるのとは対照的である。これらの事実は、ビスフェノール類似化合物は、ビスフェノールAとはまた違ったメカニズムで、ヒト健康への悪影響を及ぼす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

2011年1月には、カナダに引き続き、EUでもホ乳瓶にBPAの使用を禁じるなど、世界的にBPAの悪影響に対するが高まっている。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。我々は、第二年度で平成21年度に、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。そこで、本年度は、ER β においても同様に試験し、新世代ビスフェノールの女性ホルモンの受容体・エストロゲン受容体に対する結合性および活性を総合的に解析した。

B. 研究方法

(1) 受容体 ER β 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 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 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 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 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 類化合物など、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、 $[^3\text{H}]E2$ の受容体結合を阻害する能力で ER β 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 $[^3\text{H}]E2$ 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 $[^3\text{H}]E2$ 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 ($[^3\text{H}]E2$ 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 β 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 β 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 β 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 β 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、 $[^3\text{H}]E2$ 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、 $[^3\text{H}]E2$ の特異的結合を十分量与える条件の設定に成就した。しかし、ER β の発現量は低かった。そこで、大腸菌ではなく、昆虫細胞培養系で生合成された市販品も用いて実験を行うことにした。

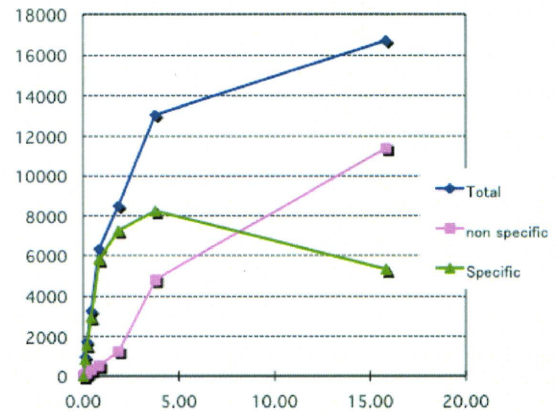


図 1. $[^3\text{H}]E2$ を用いた ER β に対する飽和結合試験結果

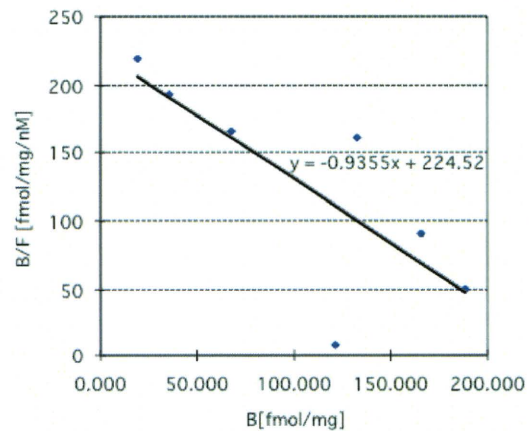


図 2. $[^3\text{H}]E2$ を用いた ER α に対する飽和結合試験のスカッチャード解析

スカッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は 1.17 nM であり、 B_{max} は 233 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)。

(2) ER β 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、 $[^3\text{H}]E2$ 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、ER α の場合と同様に、多くの新世代ビスフェノールが、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 同様に、ER β 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。しかし、前年度であるH21年度に見出した、ER α に強く結合するものと共通であり、新たな化合物は見付からなかった。スクリーニングにより、ビスフェノールAFと同程度強く結合するものは、13種であった(図3)。

1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9	1-10
1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	1-16	1-17	1-18	1-19	1-20
1-21	1-22	1-23	1-24	1-25	1-26	1-27	1-28	1-29	1-30
1-31	1-32	1-33	1-34	1-35	1-36				
2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10
2-11									
3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9	3-10
3-11	3-12	3-13	3-14	3-15	3-16	3-17	3-18	3-19	3-20
3-21	3-22	3-23	3-24	3-25					
4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	4-6	4-7	4-8	4-9	4-10
4-11	4-12	4-13	4-14	4-15	4-16	4-17	4-18	4-19	4-20
4-21	4-22	4-23	4-24	4-25					
5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	5-6	5-7	5-8	5-9	5-10
5-11	5-12	5-13	5-14	5-15	5-16	5-17	5-18	5-19	5-20
5-21	5-22	5-23	5-24	5-25	5-26	5-27			
6-1	6-2	6-3	6-4	6-5	6-6	6-7	6-8	6-9	6-10
6-11	6-12	6-13							

図3. [3H]E2を用いたER β に対する飽和結合試験結果。オレンジ色が、BPAFより強く結合した化合物。レモン色と山吹色がそれより弱い化合物。黒は該当なし(空欄)。

(3) レポーター遺伝子アッセイによる転写活性測定

ER β と強く結合する化合物について、これら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、ER α の場合とことなり、ほとんどの新世代ビスフェノールがER β に対するアンタゴニスト活性が見られた。具体的には、BPA、1-4、3-4、3-11は弱い、パーシャルアゴニストであり、E2に対するアンタゴニストであった。1-14と3-3も非常に弱いパーシャルアゴニストであり、E2に対するアンタゴニストであった。BPC、1-10、3-7、3-9、3-12は完全に不活性でE2に対するアンタゴニストであった。(化合物名と番号の対応は、図4参照。活性試験は図5および6。)

D. 考察

1-10と3-12は芳香環が3つあり大きいので、H12を押し上げることは自明と思われる。3-7や3-9は、ポケットにすっぽり入るには少し大きすぎるらしい。アダマンチルフェノールはER α 同様にER β でもアゴニストであった。

E. 結論

ER β に強く結合する新世代ビスフェノールを新規に見出した。これらはBPAよりもはるかに強く結合する。しかも、これらは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。これらのヒト健康への詳細解析が、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。

番号	化合物名	IC50	番号	化合物名	IC50	番号	化合物名	IC50
1-04	Bisphenol B	79.78	3-02	4,4'-[2-Hydroxybutylidene]-bis[2,2,6,6-tetramethyl-5-oxo-1,3-dioxane]	41.48	3-11	1,1'-[9,9'-hydroxyphenyl]cyclohexane	216.19
1-10	Bisphenol P		3-04	4,4'-[1,3-Dimethylbutylidene]bisphenol	18.07	3-12	Bisphenol M	147.83
1-11	Bisphenol C	2.99	3-07	4,4'-[2-Ethylhexylidene]bisphenol	25.88	19-3	4-(1-Adamantyl)phenol	
1-14	4,4'-[2,2'-Tetakis(4-hydroxyphenyl)-1,1'-bis(4-oxocyclohexane)]	211.86	3-09	1,1'-[bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)]cyclohexane	131.54	40HT	4-Hydroxy tamoxifen	

図4. 新世代ビスフェノール

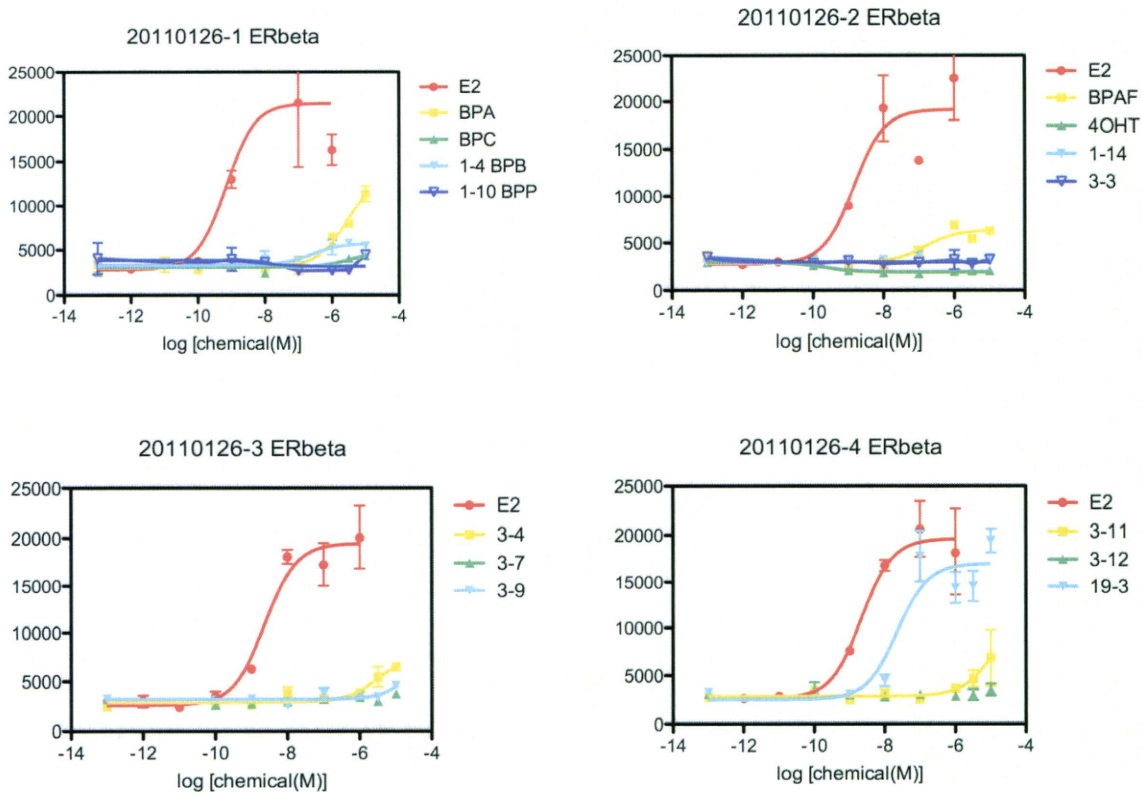


図5. 新世代ビスフェノールの ERβ 活性化試験

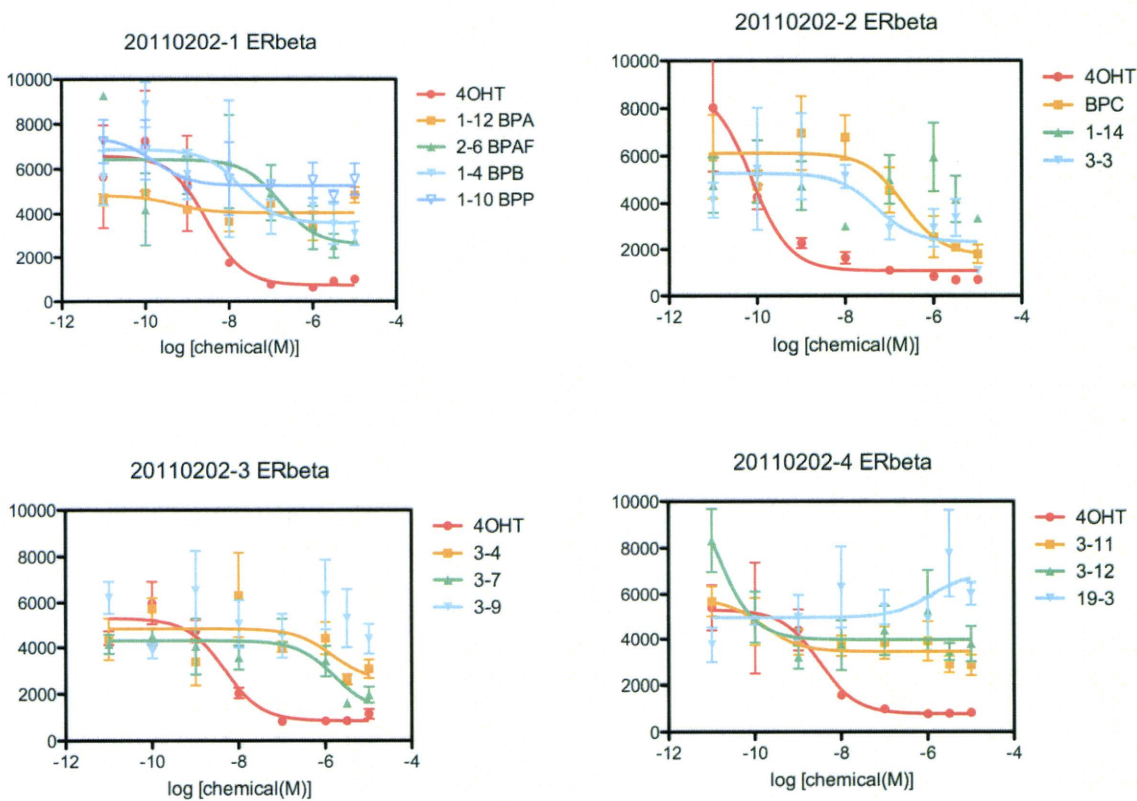


図6. 新世代ビスフェノールの ERβ アンタゴニスト活性試験

G. 研究発表

論文発表

1. 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: *Bio. Reprod.*, **84**, 734-742 (2011).

2. Functional role of the C-terminal Helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor γ (ERR γ). X., Liu, A., Matsushima, H., Okada, and Y., Shimohigashi: *Peptide Science 2009*, 435-436 (2010).

3. Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR γ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. X., Liu, A., Matsushima, H., Okada, and Y., Shimohigashi: *J. Biochem.*, **148**, 247-254 (2010).

学会発表

1. 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 α と β 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。

2. 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。

3. 松島綾美、Kerrienne Ryan、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、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。

4. 松島綾美、劉 暁輝、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 α および β 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。

5. 劉 暁輝、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 α 型および β 型を用いたビスフェノールAFが示す β 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。

6. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α 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。

7. 下東康幸、劉 暁輝、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、ER α アゴニストおよびER β 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。

8. 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。

9. 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が特異的アンタゴニストとなるエストロゲン受容体 β 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。

10. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールA/ER α 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。

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、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

核内受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ

分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院准教授

研究要旨

これまでに我々は、ヒトの持つ核内受容体48種類すべてに対する新規なリスク評価法を確立することを目指して、核内受容体のリガンド結合に伴う構造変化を検知する抗体を用いたセンシング抗体法の開発を行ってきた。その中で、その構造変化の中心的な構造要因である、第12ヘリックスを持たない核内受容体・Rev-erb に対しても、センシング抗体を調製しセンシング抗体法の適用に取り組んできた。しかしながら、これまでに作製した Rev-erb に対するセンシング抗体、すなわち受容体のC端部分を認識する抗体は、鋭敏に構造変化を感知する能力に乏しかった。そこで、再度、抗体認識部位を変更し、抗原の再調製して抗体作製を実施したところ、十分なセンシング能を有する抗体を得ることに成功した。

A. 研究目的

核内受容体は、生体内で生理活性を有するホルモンや化学物質など様々なリガンドと特異的に結合することで多様な生理作用を引き起こし、活性の調節を受ける転写因子の一つのグループである。ヒトゲノム解析研究が終了した結果、ヒトには少なくともステロイドホルモン受容体などと構造や機能に類似性を示す48種類の核内受容体が存在することが判明した。現在のところ、それらの核内受容体すべてに対する特異的リガンドは判明しておらず、いわゆるリガンド未知の受容体も存在しているが、それらの立体構造およびアミノ酸配列解析の結果から、それらほぼすべての核内受容体において、性ホルモンをリガンドとする性ホルモン受容体に代表されるステロイドホルモン受容体の活性化機構と似た活性化機構が存在することを示唆されている。このようなリガンド結合に引き続く受容体活性化機構の存在は、従来化学物質による攪乱が懸念されてきた性ホルモン受容体に加え、すべての核内受容体に対する環境化学物質の影響を検討する必要性が生じさせた。このため、本研究では、ヒトに存在するすべての核内受容体を研究対象としている。

一般に、核内受容体タンパク質のアミノ

酸配列は、この受容体ファミリーに属する受容体タンパク質同士において高い配列相同性を示す。アミノ酸配列相同性とこれまでに解析が終了した、いくつかの核内受容体のドメイン構造から、核内受容体は共通構造として5つのドメイン構造からなることが判明した（図1）。それらのドメイン構造は大きくA~E領域に分けて考えられている。F領域は、これを有する受容体と有しない受容体が存在する。一般には、内分泌かく乱作用は、リガンド・ホルモンとの特異的な結合に関与するEの領域・リガンド結合ドメイン（Ligand Binding Domain: LBD）で主に生じると考えられている。（図1）

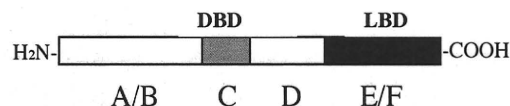


図1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

LBDは、前述のようにリガンドが結合することにより立体構造を変化させ、遺伝子転写の制御を行っている（図2）。その構造変化の主体は、第12ヘリックスである。

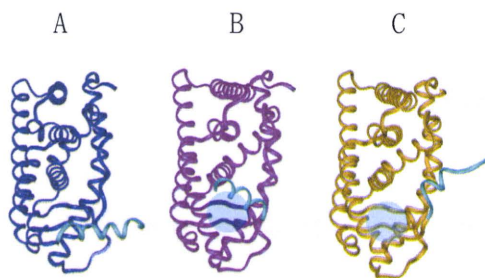


図2. リガンド結合に伴う核内受容体の構造変化

A: リガンド未結合、B: アゴニスト結合、C: アンタゴニスト結合、第1 2ヘリックスは水色で示す。

活性化にリガンドを必要とする核内受容体のLBDにおいては、次のような立体構造の変化が推定されている。リガンドがLBDに結合する→第1 2ヘリックス部分構造を大きく変化させる。すなわち、図2において、リガンド未結合のAの状態から、結合したリガンドがアゴニストの場合はBの状態に、アンタゴニストの場合にはCの状態へと、水色で示す第1 2ヘリックスの構造と位置を大きく変化させる。それゆえ、このLBDにリガンドではない化学物質が結合し受容体の構造を変化させることが、誤った転写制御を引き起こすことが内分泌かく乱作用の本質であると考えられている。そこで、この第1 2ヘリックス部分を特異的に認識する抗体を作製したところ、化学物質の受容体結合を評価することが可能となり、我々はこれまでに幾つかの核内受容体系での成功例を既に報告した。

しかしながら、核内受容体 Rev-erb は第1 2ヘリックスを欠くという、構造的な特徴を有している。Rev-erb では、通常の核内受容体のLBDのC端部分に存在する第1 2ヘリックスの代りを、第1 1ヘリックスのC末端部分が果たしていると考えられている(図3)。

そこで、本研究では、この第1 1ヘリックスを特異的に認識し、かつその構造変化を検知可能な抗体、センシング抗体を作製して新規な Rev-erb における結合性化学物質のスクリーニング法を構築することとした。なお、これまでにも Rev-erb に対するセンシング抗体の作製は試みられており、本研究では、それらの構造変化識別能をより高めることを目指した。

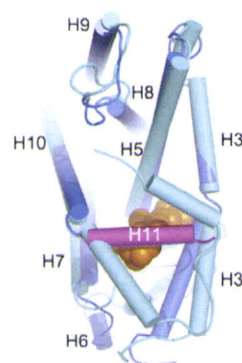


図3. 第12 α ヘリックスを欠損した Rev-erb β -LBDの立体構造

第11ヘリックス(H11)が折れ曲がり、第12ヘリックスの代用をしている。

J. Mol. Biol. (2007) 373, 735. より。

B. 研究方法

① 立体構造データの検索と入手

核内ホルモン受容体LBDのリガンド結合状態(アゴニストもしくはアンタゴニストが結合したもの)の立体構造は、PDB(Protein Data Bank)に登録されている。これらのX結晶構造解析データを、インターネットを通じて直接に入手した。

② 受容体構造の解析

PDBより入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム Discovery Studio (Accelrys社製)で解析した。

③ アミノ酸配列データの検索と入手

核内受容体のアミノ酸配列は、NCBI(National Center for Biotechnology Information)の遺伝子・タンパク質配列データベース Entrez から、それぞれ最新の配列取得した。また、配列相同性解析・およびドメイン構造の同定には解析プログラム・ClustalXを使用した。

④ 抗原ペプチドの合成

構造解析により同定した受容体の第11ヘリックスのC端部分に相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、このペプチドを Fmoc 固相法による自動固相合成機・ABI433Aによって合成した。タンパク質担体との結合のために、抗原配列中にシステインを持たないペプチドのN末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過(Sephadex G-25, $\phi = 1.8$ cm, $l = 75$