

cm)および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e)、 $\phi = 25 \text{ cm} \times 250 \text{ mm}$ )により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析により行った。

#### ⑤ 架橋試薬のキャリアタンパク質 KLH への結合

担体タンパク質として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、架橋試薬として2価性の *m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた。

KLH の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) (16 mg/ $\mu\text{l}$ ) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12  $\mu\text{l}$ ) を 9.3  $\mu\text{l}$  添加し、室温で 30 分攪拌した。反応液を遠心分離後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

#### ⑥ エピトープペプチドの KLH への結合

上記で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500  $\mu\text{l}$  に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200  $\mu\text{l}$  加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、先に調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230  $\mu\text{l}$ ) および 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (115  $\mu\text{l}$ ) を加え、室温で 3 時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

#### ⑦ ウサギへの免疫

先に調製したペプチド-KLH 抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとした後、ウサギ (ニュージーランドホワイト) に対して免疫した。約 3 ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA 法により確認した。

#### ⑧ 抗体の精製

まず、採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分画し、血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除去し、次いで合成ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

#### ⑨ 免疫沈降

終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加えて、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体

複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してこなくなるまで繰り返し行った。

#### ⑩ アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel :Pierce 社) に Cys (SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

#### ⑪ ELISA 法による抗原ペプチド応答性の確認

調製した抗体の抗原ペプチドに対する応答を酵素免疫測定 (ELISA) により調べた。ELISA に用いるプラスチックプレートの調製は、次のように行った。1) ウシサイログロブリンに結合させたペプチドをプレートに吸着 (2.5 mg/ml, 50 ml/well)、2) 1.5 時間インキュベート、3) 洗浄、4) 非特異的な吸着を防ぐ為に 2%BSA によりブロッキング。その後、試験に用いる抗体溶液を 1 時間・室温でインキュベートした後、洗浄操作を行い、HRP 標識された 2 次抗体 (anti-rabbit IgG 抗体) によりペプチドに対する抗体応答を調べた。HRP の基質には過酸化水素を用い、酵素作用により生じた酸素原子が 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (ABTS) を発色させることにより 405 nm の吸光度をプレートリーダー検出した。

#### ⑫ 調製した抗体の Rev-erb 受容体に対する応答の解析

調製した抗体の Rev-erb に対する応答を競合 ELISA により調べた。Rev-erb (0.01~10  $\mu\text{g}$ ) を用いて、イムノプレートに固定した抗原ペプチド (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ) との ELISA を実施した。ELISA は⑪で記載したのと同様の方法を用いた。

#### ⑬ センシングアッセイ

Rev-erb (0.01~10  $\mu\text{g}$ , 90  $\mu\text{l}$ ) に対して、Rev-erb に対して結合性を有することが確認されている化学物質 2 種・ヘミンおよび GSK4112 (10  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{l}$ ) を室温で 1 時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製した。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイロ

グロブリン (bthG) に結合した抗原ペプチドをイムノプレートに吸着させ、室温インキュベート後、洗浄し、ブロッキングを行った。リガンド受容体複合体溶液を移した96穴イムノプレートにセンシング抗体溶液 (10  $\mu$ l/well) を加えて4°Cで終夜反応させた。溶液を一括除去により捨て、プレートを洗浄後、HRP 標識2次抗体溶液 (50  $\mu$ l) を加えて室温で1時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTSを基質とした酵素反応により溶液を発色させた。405 nmの吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

リガンドの濃度変化は、ヘミンおよびGSK4112の濃度を $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$  Mの間で変化させて調べた。

### (倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作成するに当たり、ウサギを実験動物として使用する。こうした実験動物はきちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられている。また、採血等に際しても麻酔をするなど痛みの無いように配慮するなど、倫理面の問題が生じない状況で行っている。所属部局・理学研究院においては「動物実験審査」システムが確立されており、本研究は審査を承認の上許可された。

## C. 研究結果

Rev-erbには2種類のサブタイプ $\alpha$ と $\beta$ が存在している。これまでの研究で、それぞれのLBDのC末端部分に対して抗体作製のためのエピトープを設定し、抗体を作製した(図4:  $\alpha$ 、 $\beta$ それぞれの#1に相当)。#1においては、第1ヘリックス全体を抗原部位として用いていたが、今回、よりコンホメーション変化を鋭敏に検知できるよう、LBDのC末端部分のみをエピトープとした#2および#3を抗原とした。特に、よりC端部に特化した、#3では、AsnAsnMet(アミノ酸3文字標記)のアミノ酸配列をグリシン(Gly)で置換し、よりC末端部分の認識性を高めた。

### Rev-erb $\alpha$

$\alpha$  #1 --KLPDLRLNNMHSEKLLSFRVDAQ--  
 $\alpha$  #2 -----GGGHSEKLLSFRVDAQ--  
 $\alpha$  #3 -----NNMHSEKLLSFRVDAQ--

### Rev-erb $\beta$

$\beta$  #1 --KLPDLRLNNMHSEELLAFAKVHP--  
 $\beta$  #2 -----GGGHSEELLAFAKVHP--  
 $\beta$  #3 -----NNMHSEELLAFAKVHP--

図4 Rev-erb $\alpha$ および $\beta$ に対するセンシング抗体作製のためのエピトープ

アミノ酸1文字標記。

下線部はヘリックス構造領域。

本研究では、図4に示す6種類のエピトープのうち#2および#3の4種類をエピトープとして調製後、それぞれをペプチド合成、ウサギに免疫することで抗体を作製した。その結果、すべての抗体を得ることができた。

Rev-erb $\alpha$ -#2を抗原とした抗体は、図5に示すように高い受容体認識能を示すことがELISAアッセイによって確認された。

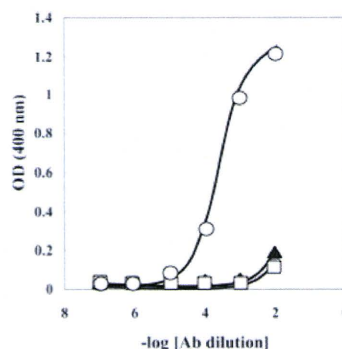


図5 Rev-erb $\alpha$ -#2の受容体認識

( $\blacktriangle$ ) K LH, ( $\square$ ) bthG, ( $\circ$ ) bthG-MB-Rev-erb $\alpha$ .

今回作製した抗体4種類はすべて受容体タンパク質に対して高い認識能を示した。これらについて、Rev-erbに対するリガンド結合を識別するセンシング能があるか検討を行った。その結果、Rev-erb $\alpha$ -#2抗体においては、顕著なセンシング能があることが確認された。リガンドフリーのアポ型受容体に比べ、Rev-erbのリガンド、ヘミンおよびGSK4112、それぞれと結合したホロ型受容体に対する抗体の認識能に大きな差が確認された(図6)。

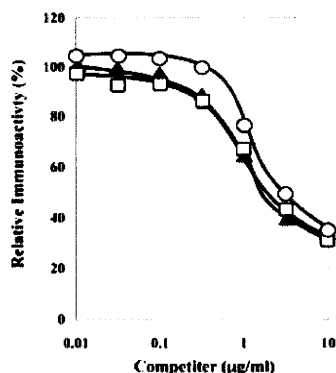


図6 Rev-erb $\alpha$ -#2抗体のセンシング能  
○ : APO、▲ : ヘミン結合、□ : GSK4112結合

この試験系においてリガンド濃度を変化させたところ、図7に示すように濃度依存的な抗体応答性が確認された。このようにRev-erbに対する化学物質の結合性を今回作製したセンシング抗体により解析することが可能となった。

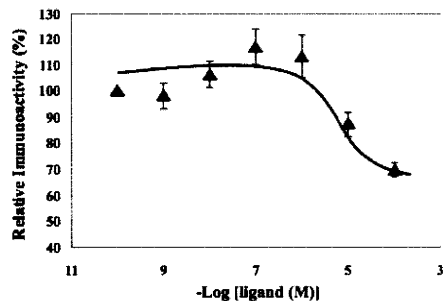


図7 Rev-erb $\alpha$ -#2抗体のセンシング能：リガンド濃度変化  
Ligand:ヘミン結合 (▲)

#### D. 考察

本分担研究では、核内受容体 Rev-erb に対するセンシング抗体アッセイ法に用いる抗体をポリクローナル抗体として新たに調製した。センシング抗体作製に使用するエピトープは、核内受容体の LBD に存在するヘリックス 11 の C 末端部分を含む合成ペプチドを用いた。構造変化する受容体の構造要因を認識するようにエピトープ部分の設定を改良した抗体により、センシング抗体の構造変化認識能が高まったことから、他の受容体系においてもセンシング抗体の改良、構造変化の認識能を向上させるためにこの方法が適用可能であると考えられた。

#### E. 結論

今年度の本分担研究により、ヘリックス 12 を持たない核内受容体・Rev-erb に対してもセンシング抗体法が適用可能であることが判明した。

#### F. 健康危険情報

該当する情報はない。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

現在のところ、特になし。

##### 学会発表

現在のところ、特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在検討中。

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

神経分化におけるビスフェノール A の内分泌攪乱作用の解析  
-ショウジョウバエ株化ニューロンを実験モデルとして-

研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部 講師  
分担協力研究者 中川裕之 福岡大学理学部 准教授

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体・エストロゲン関連受容体 (*Drosophila* estrogen-related receptor: dERR) が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズム(サーカディアンリズム)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。本研究は、ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「生殖機能」や「行動」、あるいは「遺伝子発現」を指標として用いた *in vivo* 多世代解析法として確立し、化学物質の生体へのリスク評価の解析に応用してきた。一方、ショウジョウバエ幼虫脳組織由来の株化神経細胞BG2-c6は、エクジソン処理により、神経突起をのばして神経ネットワークに似た構造を形成することから、神経系の発達分化の実験モデルとして有効である。昨年は、この細胞を実験モデルとして、ビスフェノールA (BPA) の含有量が2 ppm、3 ppm、4 ppmの細胞培養液中で神経突起の伸長が阻害されることを明らかにした(昨年の報告書で発表)。本研究では、BG2-c6細胞の突起伸長に対する影響を統計学的に評価するため、ビスフェノールAの濃度を3 ppmに絞ってサンプル数を増やし、全細胞数の変化、突起を伸長する細胞数、突起の長さ、突起の複雑さについて調べた。また、BPA暴露による遺伝子の発現への影響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。突起伸長が開始するエクジソン添加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個の遺伝子を特定する事ができた。それらは、脂質結合タンパク質、ヒートショックタンパク質のアンチセンス領域(グルタメートデヒドロゲナーゼと相同性が高いと報告されている)およびイオントランスポーターの遺伝子であった。それらについて、エクジソン添加後の経時サンプルにより、Real Time PCRによる詳しい解析を実施したところ、脂質結合タンパク質の遺伝子LSD-2の発現がBPA添加により阻害されることが明らかになった。

A. 研究目的

環境ホルモン、内分泌かく乱物質としての環境化学物質の危険性(リスク)は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ここ数年、ヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般(ヒトの場合は48種類)の問題として拡張して考えるようになった。また、脳

神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧されるようになってきたのを受け、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性の解析が緊要の課題と考えられるようになった。内分泌かく乱物質リスク評価においては、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。さらに、継代的な評価も不可欠な要素である。これらの観点から、継代が短期間で起こり、遺伝子研究が容易なショウジョウバエが実験動物

として有力であることから、ショウジョウバエを用いた試験系の構築への期待が大きくなった。

本研究課題は、特に *in vivo* 生体系での内分泌かく乱作用の影響を評価する実際的な試験系において、申請代表者らが確立した女性ホルモン・エストロゲン受容体等の核内受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体法におけるホルモン活性に対応する最大抗体応答性  $R_{max}$  (%) について、生物活性の指標算定を目的とするものである。

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としてはヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずかに 2 週間程度で進むことであるが、乾燥酵母などからなるエサの粉末を溶解凝固させたもので食餌するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常として観察することが容易であるという実験動物としての利便性も兼ね備えている。これまでに、雌の産卵数および成虫の羽化数を計数するのみで、生物体への直接的な生殖影響を雌雄独立に観察・評価できる貴重な実験系を構築している。こうした生体での試験には、並行して実施する試験管 (*in vitro*) での試験が必要である。したがって、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものであり、「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系としての緊急な課題に対応するものである。本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立し、これまでにない新規な手法を提供する。そして、本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

これまでに確立した多世代繁殖毒性試験系を用いた研究では、ビスフェノールAが脳の遺伝子発現に影響を与えること、また、多動性の現象に似た行動異常を引き起こす確立が増加することが明らかになった。また、ショウジョウバエの株化ニューロンの成長

を神経分化の実験モデルとして、ビスフェノールA (BPA) のリスク評価を行ったところ、BPAが突起伸長を阻害する事が明らかになった。本年度は、神経系発達のどの局面にBPAによる影響を受けるのかを統計学的に検討するため、例数を増やすとともに、遺伝子発現への影響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。

## B. 研究方法

### ① 培養細胞と培養液

研究室で継代培養しているショウジョウバエ幼虫脳組織から樹立した株化細胞BG2-c6を本研究に用いた。10%ウシ胎児血清を含むM3昆虫細胞培養液(以下、培養液)中に懸濁したBG2-c6細胞をシャーレに移し、25°Cのインキュベーターで培養した。ビスフェノールA暴露による影響評価の実験においては、細胞密度がシャーレの底面積に対して8万個/cm<sup>2</sup>となるように調整した。シャーレに移すと同時に10 ppmとなるように調整した昆虫の変態ホルモンエクジソン(20E)

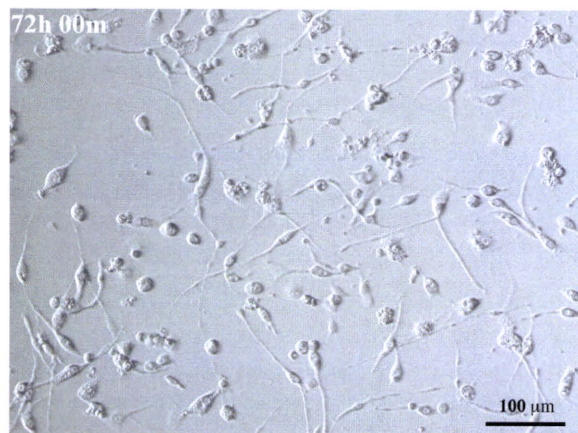


Fig. 1 神経突起を伸長させた培養細胞BG2-c6

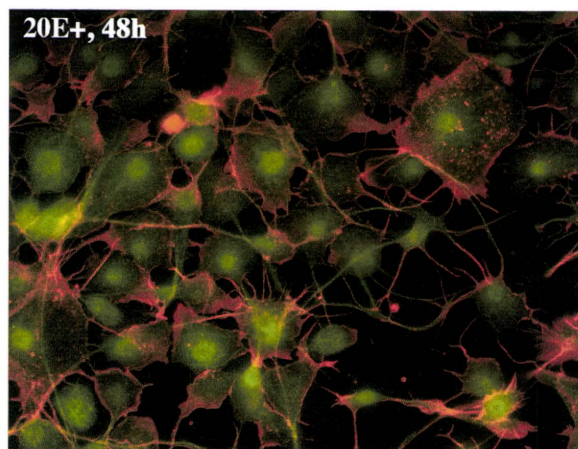


Fig. 2 BG2-c6細胞の神経突起のアクチン(赤シグナル)と微小管(緑シグナル)染色像

を加え、突起伸長の過程を画像解析した。Figure 1はBG2-c6細胞のエクジソン添加72時間後の顕微鏡画像である。画像は軸索状の突起が伸長し、互いにネットワーク状の構造を形成する様子をとらえている。この突起を構成する成分は、微小管とアクチンであることが分担者らの研究によりわかっており

(Fig. 2)、この細胞系は神経伝達物質アセチルコリンを生産することがUiら(1994)により報告されている。

②BG2-c6細胞のBPA暴露によるリスク評価  
シャーレの底面積に対して8万個/cm<sup>2</sup>となるように細胞数を調整した懸濁液に10ppmとなるように調整した昆虫の変態ホルモンエクジソンと内分泌攪乱物質ビスフェノールA(以下BPA)を3ppmとなるように加えた。コントロールには、BPAの溶解に使用したエチルアルコールを等量加えた。エクジソン添加後、12時間毎に、一枚のシャーレを4分割し4枚の顕微鏡画像を取得した。顕微鏡画像から、生存している全細胞の数、突起を伸長した細胞数、突起の長さ、他の細胞と突起を接触した場合の接点数をアプリケーションImage-Jを用いてカウントし、4枚の画像から得られたそれらの数値の平均値を1例とした。6例のデータから、統計学的に差があると言えるのかを評価した。

### C. 研究結果

#### ①BG2-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。(Fig 3)。一方、16時間後には、細胞は突起をのびし始めるが、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(Fig 4)。突起の長さは48時間後から有意の差が観察された(Fig 5)。

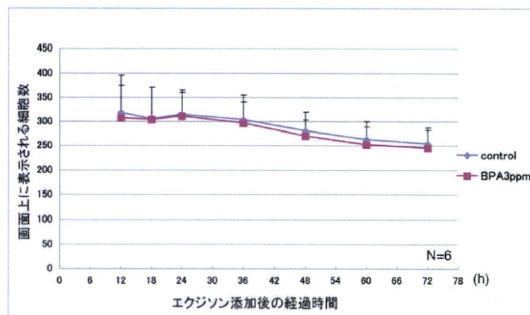


Fig. 3 3ppm BPA 暴露による B2-c6 細胞の生存率

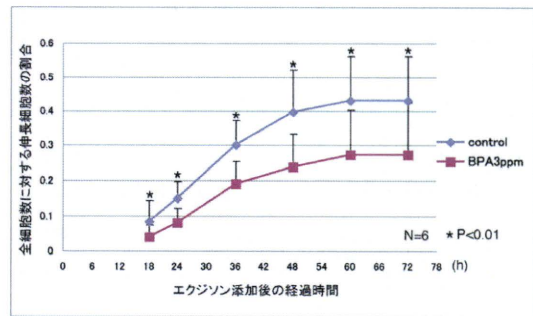


Fig. 4 突起を伸ばす細胞の割合

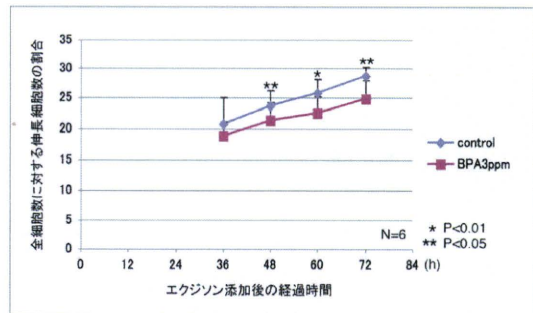


Fig. 5 伸長突起の長さの変化

神経突起のネットワークの複雑さを表す指標として、突起同士の接点数をカウントした結果、BPA 暴露の細胞群でその値は現象傾向にあった。しかし、統計学的有意の差は見られなかった(Figure 6)。

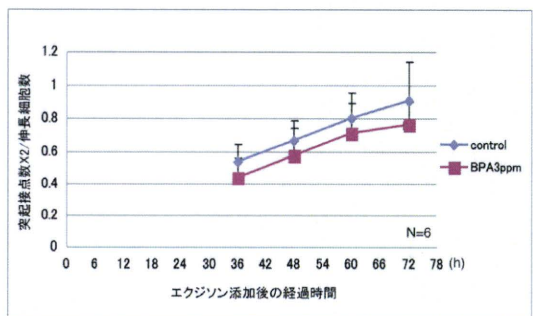


Fig. 6 1細胞あたりの突起接点数

#### ②HiCEP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(Fig. 6表)。

それらから、3個の遺伝子、LSD-2、Hsp68およびMvlを特定する事ができた。

分取りピーク番号	末端配列	No.	長さ	分取シーケンス配列*	分取りピーク Length	BlotでHPLした配列	Subject Length	ACCESSION	UniGene or コメント	方法**	検出率
1	AG-cc	2	54.00	切り出しLNG	-	-	0		TAPO-ニングの変更も無い		1.84
2	GG-cc	26	92.78	切り出しLNG	-	-	0		TAPO-ニングの変更も無い		1.74
3	CG-cc	26	335.16	CGGGGAGCGGAAATAGCCATTGTTG	303	CGGGGAGTGGGAAATAGCCAAATTGGTGG	304	AF014261.4	Drosophila melanogaster chromosome X, complete sequence	D	1.56
5	CG-ct	71	289.82	CGGGCGGAGTATAAAGGTCAATGGAAA	279	CGGGCGGAGTATAAAGGTCAATGGAAA	280	FM169350.2	LOC21216768 UniGene Dm33709 Drosophila melanogaster (fruit fly) CG38002	D	1.37
6	CG-cc	50	149.74	切り出しLNG	-	-	0		TAPO-ニングの変更も無い		0.42
7	GA-ct	38	260.80	CGGGAATGAGAGAGAGCGTTTTTTTGGT	232	CGGGAATGAGAGAGAGCGTTTTTTTGGT	234	NM_01024212.1	LOC209395 UniGene Dm4570 Drosophila melanogaster (fruit fly) Lsd2	D	0.91
8	GA-ct	15	89.74	CGGGAATGAGTATGAGAGATGTTGTGC	57	CGGGAATGAGTATGAGAGATGTTGTGC	57	BT08781.1	LOC1115689 UniGene Dm23830 Drosophila melanogaster (fruit fly) CG14423	D	0.52
11	AG-cc	72	369.01	CGGAGTGGCCATGGGCGTGGATGTTTCA	359	CGGAGTGGCCATGGGCGTGGATGTTTCA	362	AE014298.4	Drosophila melanogaster chromosome X, complete sequence	D	0.52
12	CT-cc	18	132.72	CGGCGTGTATGCTGGAGGATGATGTCGC	193	CGGCGTGTATGCTGGAGGATGATGTCGC	196	AE014134.3	Drosophila melanogaster chromosome 2L, complete sequence	D	0.59
13	CA-cc	41	309.83	CGGAGTGTGTGATGAGAGGCTGCTTGGTGTG	191	CGGAGTGTGTGATGAGAGGCTGCTTGGTGTG	193	U739426.1	Drosophila melanogaster strain mmea heat shock protein 68 (Hsp68) gene, partial sequence	D	0.58
14	AT-cc	34	191.26	切り出しLNG	-	-	0		TAPO-ニングする場合は、数を数えないは無理		0.81
15	AC-ct	38	151.34	CGGAAATAAAATAGCAATATGGATGTTGT	127	CGGAAATAAAATAGCAATATGGATGTTGT	125	ME14587.2	D. melanogaster chromosome 3R, complete sequenceMVL NM_079701 3rd Transcript variant	D	0.63
16	CC-cc	33	119.79	切り出しLNG	-	-	0		TAPO-ニングの変更も無い		controlのみ

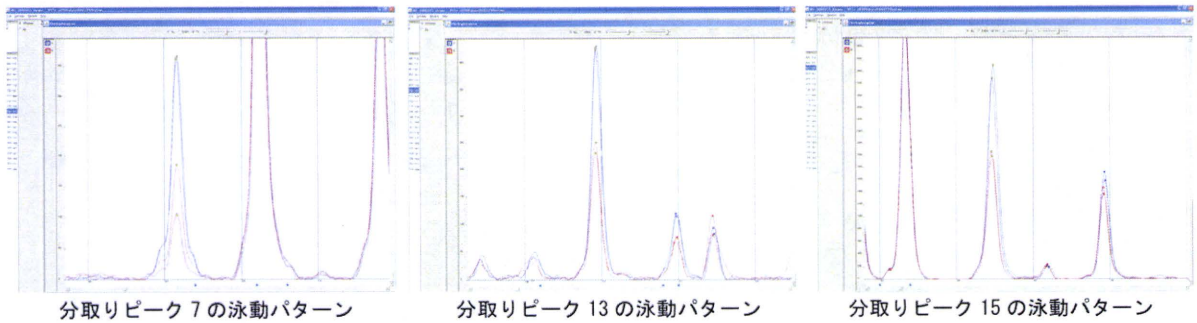


Fig. 7 HiCEP 法により発現変動が観察された RNA 産物の存率

変化が見られた 3 つの遺伝子 LSD-2、Hsp68 および Mvl についての変動比などは以下の通りである。

- LSD-2 : 分取りピーク 7  
変動比 0.51  
脂質結合製タンパク質
- Hsp68 : 分取りピーク 13  
変動比 0.59  
heat shock protein 68 のアンチセンスとして報告されている
- Mvl : 分取りピーク 15  
変動比 0.63  
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

### ③PCR および定量的 RT-PCR 解析

#### 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。

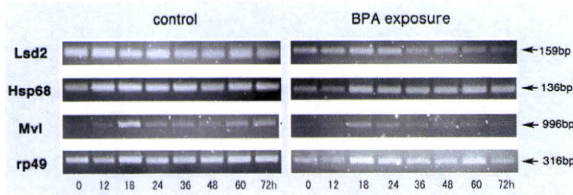


Fig. 8 PCR 法による発現解析

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示す。Mvl 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。

#### 定量的 RT-PCR による解析

エクジソン添加 12 時間後サンプルにおいて変動が確認された 3 遺伝子のうち、脂質結合タンパク質 LSD-2 について、経時サンプルで定量的 PCR を行った。コントロールの細胞ではエクジソン添加約 36 時間後までの間、mRNA 分子の相対値として rp49 の約 7% の値で推移する。しかし、BPA 暴露の細胞群では、発現量がコントロールの約 60% に抑制される事が判明した。36 時間後以降はコントロール群と同様な相対値で推移した。

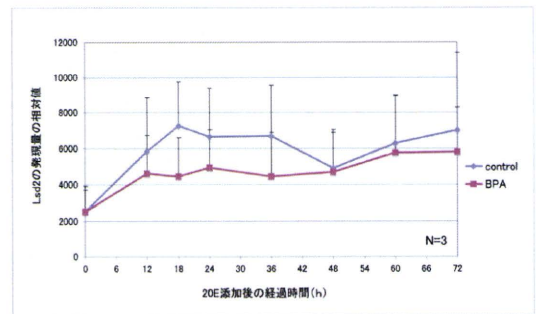


Fig. 9 LSD-2 遺伝子の定量的 PCR 法による発現解析

## D. 考察

ショウジョウバエの株化ニューロンを実験モデルとして用いて、BPAが神経分化に及ぼす影響について培養液中の濃度が溶解基準濃度に近い3 ppm BPAについて統計学的検討が可能なサンプルサイズでリスク評価を行った。その結果、細胞の生存率については、影響は見られなかったが、突起をのぼす現象について、突起伸長細胞の割合が、コントロール群と比較すると約63%に減少した。伸長した突起の長さについても、有意の差が見られた。

遺伝子発現において変動が見られるものをHiCEP法により探索した。その結果、3つの遺伝子の発現が約50~60%に抑制されることが判明した。

これらの結果から、ビスフェノールAが神経発達に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。BPAの内分泌かく乱作用における直接的作用はこれらの遺伝子の発現上流にあると考えられるので、今後は転写調節因子の探索など、ターゲット因子の探索を行う必要がある。

## E. 結論

本研究により、BPA含有培地で培養されたショウジョウバエの株化ニューロンは神経分化の出発点である突起の伸長が阻害されることが明らかになった。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Drosophila Neuropeptide hugy Presentin 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)

2. Apis pdf gene expresses in circadian manner M. Sumiyoshi, Y. Takeda, S. Sato, K. Koga, T. Itoh, H. Nakagawa, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi *Peptide Science* 2010, 69 (2011)

3. A Circadian Neuropeptide PDF in the Honeybee, *Apis mellifera*: cDNA Cloning and Expression of mRNA Zool. Sci. (2011) (in print)

### 学会発表

1. M. Shimohigashi, A. Furukawa M Sumiyoshi, A Matsushima Y Shimohigashi and H Nakagawa Effects of Bisphenol A-exposure on the gene expression of culture neuron BG2-c6 The 13<sup>th</sup> annualmeeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research

2. M. Sumiyoshi, Y. Takeda, K. Koga, S. Seiji, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi, Circadian Expression of pdf Gene in Honeybee, *Apis mellifera*. 日本動物学会第81回大会 東京大学

3. 古賀啓太、中村将行、住吉美保、下東美樹、下東康幸：ショウジョウバエ神経ペプチドPK2とhug $\gamma$ は概日時計因子である、日本比較生理生化学会第32回大会、平成22年(2010年)7月17-19日、九州産業大学(福岡市)

4. 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食餌のショウジョウバエ活動リズムへの影響、日本比較生理生化学会第32回大会、平成22年(2010年)7月17-19日、九州産業大学(福岡市)。

5. 住吉美保、武田行正、佐藤聖児、古賀啓太、中川裕之、下東康幸、下東美樹：セイヨウミツバチpdf遺伝子の発現リズム、日本比較生理生化学会第32回大会、平成22年(2010年)7月17-19日、九州産業大学(福岡市)。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録する内容の成果は、現在のところ特に得られていない。



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告

エストロゲン受容体 $\alpha$ のビスフェノールA誘導体のX線結晶構造解析

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、プラスチックの熱耐性などの機能を向上させた、様々な機能性ビスフェノール（BPA）が工業原料として用いられている。そこで、これら「新世代ビスフェノール」について、各種の核内受容体に対する結合スクリーニングを実施した。その結果、新世代ビスフェノールは様々な核内受容体に結合することが明らかとなった。中でも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期待さ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 $\alpha$ 型（estrogen receptor  $\alpha$ ; ER $\alpha$ ）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すという驚くべき事実が明らかとなった。さらにER $\beta$ に対する結合試験系を構築し、ER $\alpha$ に強く結合したBPA類似化合物の結合試験を行ったところ、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 $\alpha$ よりもむしろER $\beta$ に強く結合するという興味深い事実が明らかになった。そこで、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 $\alpha$ のアゴニストであり、且つER $\beta$ 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。この構造要因を明らかにするためには、BPAFとER $\alpha$ の結合体のX線結晶構造解析が非常に有用である。そこで今回、ER $\alpha$ -LBDとBPAFとの複合体のX線結晶構造解析を試みた。文献調査により、ER $\alpha$ に存在する3つのシステイン残基は、システインの側鎖のSH基が持つ高い反応性のために、結晶化を阻害すると考えられたため、これら全てをセリンに置換した。さらに、フレキシブルなFドメインも、結晶化の邪魔になると考えられたためを削除した。こうして作製したER $\alpha$ （C381S, C417S, C530S）-LBDを用いてBPAF結合体の結晶化を行ったところ、微細な針状結晶が多数得られた。しかし、今まで構造解析に十分な大きさを持つ結晶は得られていない。そこで、結晶作製法をハンギングドロップ法から、シッティングドロップ法に変え、BPAF以外の新世代ビスフェノールについてもスクリーニングを行った。その結果、構造解析可能な大きさの結晶を得ることに成就した。

A. 研究目的

ビスフェノールA（BPA）は、分子量228.29の比較的小さな化学物質である。これは、HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OHの対称な構造をしており、エストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）を介して作用を示す内分泌かく乱物質、いわゆる「環境ホルモン」と考えられている。しかし、BPAのERへの結合能、活性はエストロゲンに比べると1/1000～1/10,000と非常

に弱い。一方で、最近になって、BPA類似化合物に対する安全性の懸念が高まっている。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 (LD<sub>50</sub>) は3,400mg/kgであり、これはBPAのLD<sub>50</sub> (3,250mg/kg) とほぼ同程度である。

我々は、このBPAFが、ER $\alpha$ よりもむしろER $\beta$ に強く結合するという興味深い事実を明らかにしたそこで、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 $\alpha$ のアゴニストであり、且つER $\beta$ 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 (H20年度報告書 ヒト・エストロゲン受容体 $\alpha$ 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 参照)。この構造要因を明らかにするためには、BPAFとER $\alpha$ の結合体のX線結晶構造解析が非常に有用である。そこで今回、BPAFとER $\alpha$ の結合体のX線結晶構造解析に取り組んだ。

## B. 研究方法

### (1) 受容体 ER $\alpha$ -LBD 発現プラスミドの構築

ER $\alpha$ の結晶構造に関しては、既に多くの報

表 1. ER $\alpha$ の結晶構造解析文献

文献	LBD発現領域 (全長595aa)	変異	精製法の特徴
nature 389, 753, 1997	301-553		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
Protein Expr. Purif. 22, 165, 2001	301-553		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
PNAS, 95, 5998, 1998	297-554		5M urea, E2存在下巻き戻し
JBC, 276, 15059, 2001	302-552	C381S, C417S, C530S	estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
PNAS, 100, 11273, 2003	304-550	C381S, C417S, C530S	PenVera社が発現, 精製
Cell, 1998 Dec 23;95(7):927-37	297-554		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
J Med Chem. 2003 Jul 3;46(14):2945-57	301-553	C381S, C417S, C530S	estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 変異体でない結晶が出なかった
J Am Chem Soc. 2004 Nov 24;126(46):15106-19			estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
Structure. 2004 Dec;12(12):2197-207	301-554		4M urea存在下estradiol-Sepharose
J Med Chem. 2005 Jan 27;48(2):364-79	301-553		
J Biol Chem. 2006 Jun 30;281(26):17909-19			magic strain E Coliスクリーニングに特化した方法
Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Mar 8;102(10):3593-8.	Fドメイン無し		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, アセチル化
EMBO Rep. 2007 Jun;8(6):563-8	298-554	Y537S	6xHis and TEVprotease
Chem Biol. 2007 Jun;14(6):659-69	298-554	Y537S	6xHis and TEVprotease

告がなされている。そこで、まず文献調査を行った (表 1)。その結果、381 位、417 位、530 位の 3 カ所のシステイン残基 (C) をセリン (S) に置換しするか、カルボキシメチル化によりシステイン残基を化学修飾した場合のみに、結晶化に成功していることが明らかとなった。そこで今回は、381 位、417 位、530 位の 3 カ所のシステイン残基 (C) をセリン (S) に置換した ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S) を発現することにした。さらに、全ての報告において、フレキシブルな F ドメインは削除されていたのでこれに従った。

### (2) ER $\alpha$ (C381S, C417S, C530S)-LBD の発現

大腸菌 (BL21) を用いて ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製した。さらにグルタチオンセファロース 4B 樹脂に ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD が結合した状態のまま、プレジンプロテアーゼによる酵素消化を行い、GST を ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD から切り離して ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD を回収した。これを限外濾過により濃縮して -80°C で保存した。

### (3) イオン交換クロマトグラフィー

アフィニティー精製の後、さらに TOYOPEARL SuperQ-650S (TOSOH) を用いてさらに精製を進めた。溶離液としては、10 mM NaCl 溶液から 2M NaCl 溶液までのグラジエントにより、塩濃度をあげることで溶出させた。

### (4) 結晶作製

ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD と BPAF の結合体結晶作製のために、Hampton Research 社製のスクリーニングキット Crystal Screen, Crystal Screen II、および Ion/PEG Screen で結晶化条件のスクリーニングを行った。ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD の物理量の 3 倍量になる BPAF を ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD 溶液に添加して試料溶液とした。2  $\mu$ l の試料溶液と 2  $\mu$ l の結晶化リザーバー溶液を混合し、ハンギングドロップ法で結晶作製を行った。こうして、試料をセットしたプレートを 20°C に静置して結晶を

作製した。約 400 種の結晶化条件をスクリーニングしたところ、3 種類の条件で結晶が形成され、これを最適化して最終的な結晶化条件を決定した。

#### (5) X 線回折データ収集およびプロセッシング

結晶の X 線による回折データは、兵庫県佐用郡にある SPring-8 の構造生物学 III ビームライン BL38B1 で収集した。回折データの解析には、HKL2000 パッケージを用いた。

#### (6) 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で行った。ER $\alpha$  (C381S, C417S, C530S)-LBD と各濃度の放射標識された BPAF を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の BPA を放射標識された BPA と併に加えることにより調べた。遊離の [<sup>3</sup>H]BPAF はデキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

### C. 研究結果

#### (1) BPAF と ER $\alpha$ の結合体の結晶作製

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌で ERR $\gamma$  を発現した。GST はプレシジョンプロテアーゼにより酵素消化して切り離した。結晶化条件のスクリーニングを行い、PEG3350 液中で塩化ナトリウムを晶出剤として結晶を得ることに成就した (図 1)。

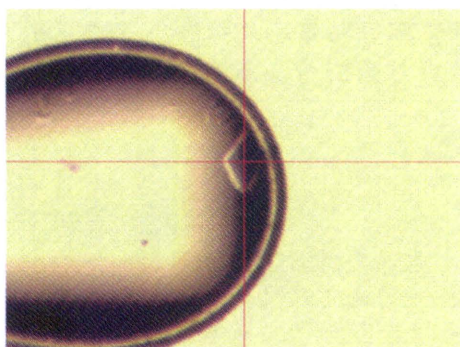


図 1. BPAF と ER $\alpha$ の結合体の結晶  
中心付近の赤線が交差するとこと  
に結晶がある。

#### (2) X 線回折データ収集および構造解析

得られた結晶を 24%グリセロール溶液に段階的に移すことにより、不凍条件にした。SPring-8 の構造生物学ビームライン BL38B1 で放射光回折データを収集した。これを基に、構造解析を行ったところ、分解能が全く足りず、構造解析ができなかった (図 2)。

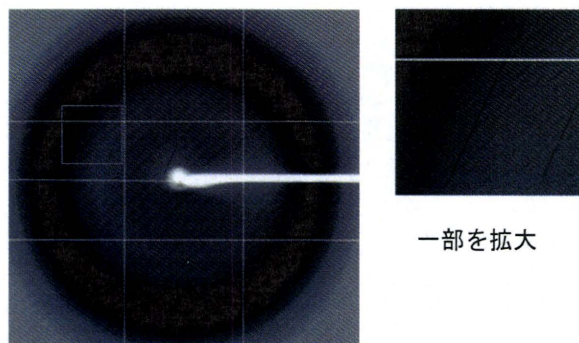


図 2. 結晶の回折結果  
回折点に分離しておらず、  
構造解析できなかった。

#### (3) タンパク質精製法の検討

沈殿剤濃度を様々に検討したが、細い針状結晶しか得られなかった。そこで、タンパク質の純度をさらにも上げるために、アフィニティ精製後に、さらにイオン交換クロマトグラフィーを行った。樹脂として、TOYOPEARL SuperQ-650S (TOSOH) を用いた。これは、親水性ビニルポリマーを基材としたゲル濾過クロマトグラフィー用充填剤にイオン交換基として第 4 級アンモニウム基を導入したものであり、非常に高吸着量の担体である。また、精製の際に用いている界面活性剤が、結晶化を妨げる可能性も考えられたため、これを用いないで精製を行った。最終精製物のタンパク質濃度は、界面活性剤を除いたことで若干低下したが、不純物は、それまでより取り除けたと考えられた。

#### (4) 結晶作製法の検討

タンパク質精製法を様々に検討したが、十分な回折を得る結晶作製には至らなかった。そこで、結晶作製法をハンギングドロップ法に加え、ナノリッター分注システムを用いたシッティングドロップ法でも行い、再度スクリーニングをやり直した。その結果、それまでの結晶化条件とはことなる沈殿剤組成である、0.2 M Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、20% PEG3350 で結晶が

出現した。さらに、針状結晶から柱状結晶に結晶の形が変化した。これにより、大幅に結晶の分解能が改善した。また、BPAF 以外の新世代ビスフェノールと ER $\alpha$  との結晶化を行い、いくつかの化合物で同様に結晶が得られた。

#### D. 考察

結晶はできるが質が悪い、すなわち、X線が上手く回折しない場合の対処は厄介である。結晶化を阻害する可能性がある化合物を取り除き、収量が減るのを覚悟で界面活性剤を使わずに精製を行い、さらに、カラムクロマトグラフィーを一段追加した。報告されている ER $\alpha$  の結晶構造には、それほど分解能が高くないものが多く、本質的に ER $\alpha$  の高分解能の結晶は得られにくい可能性が高い。しかし、スクリーニングの数を増やしたことで、異なる条件で結晶が出現し、結晶の分解能を向上できた。

#### E. 結論

大腸菌で 3 箇所のシステイン残基をセリ

ン残基に置換した ER $\alpha$  を発現した。これと BPAF の結合体の結晶作製を行い、結晶は得られたものの X 線が回折しなかった。そこで、精製方法の改善、結晶作成方法の変更、BPAF 以外の新世代ビスフェノールの結晶化などを行った。その結果、大きく結晶の質を改善することが出来た。

#### F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

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

ヒト核内受容体における化学物質の結合競争試験：ROR $\alpha$ およびROR $\gamma$

研究分担者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院准教授

**研究要旨**

ホルモン受容体などの化学物質が結合することにより受容体の活性が制御される核内受容体に結合性を持つ化学物質の同定作業が近年進展している。我々も、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ に対するビスフェノールAの強い結合性を同定するなど、従来研究が中心に行われてきた性ホルモン受容体以外の受容体が関わる未知の内分泌攪乱作用に対する注目が高まっている。そのような現状を踏まえ、我々はヒトに存在するすべての核内受容体に対する化学物質リスク評価法の確立に取り組んでいる。本研究では、レチノイド関連オーファン受容体（ROR） $\alpha$ および、レチノイド関連オーファン受容体（ROR） $\gamma$ に関する化学物質の結合性評価のための試験系の構築を実施した。受容体タンパク質を発現し、放射標識リガンドを用いた結合競争試験を行った。これらの試験系により、それぞれの受容体に対して200種類の化学物質の結合性の評価を行ったところ、複数の受容体結合性活性を示す化合物が同定された。

**A. 研究目的**

従来、環境ホルモン問題においては女性ホルモン（エストロゲン）受容体（ER）が注目を集めてきた。これは、ERは主に生殖に関与すること、また、野性生物において多くの生殖異常が発見された事実から、人類においてもERのかく乱作用は子孫、特に個体数の減少を引き起こすと考えられているためである。そのような中で、女性ホルモン関連受容体 $\gamma$ 型（ERR $\gamma$ ）にポリカーボネートプラスチックの原料であるビスフェノールA（BPA）が結合することが明らかとなり、ER以外の核内受容体を介した化学物質の攪乱作用が危惧される様になった。そこで我々は、ヒトの48種類の受容体すべてを対象に研究を展開している。

本研究においては、近年、脂質代謝や生物時計など身体の恒常性や中枢の発達に関わる事から注目されている核内受容体・レチノイド関連オーファン受容体 $\alpha$ 型（ROR $\alpha$ ）および $\gamma$ 型（ROR $\gamma$ ）に対する化学物質の結合性を調べることにした。

RORの3つのサブタイプにおいては、 $\alpha$ 型にはコレステロールが、 $\beta$ 型および $\gamma$ 型にはall-*trans*-レチノイン酸が結合する事が知られている。今回、ROR $\alpha$ およびROR $\gamma$ に対して25-ヒドロキシコレステロールを用いた結合競争試験系の確立に取り組んだ。

**B. 研究方法**

**(1) 受容体LBDの調製**

ヒトcDNAライブラリーより、PCRを用いてROR $\alpha$ および $\gamma$ のLBD領域のクローニングを行った。得られたPCR産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌（BL21）を用いてタンパク質の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシド（IPTG）で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現し、GSTと特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製した。

## (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で行った。GST-ROR $\alpha$ -LBD および-ROR $\gamma$ -LBDを各濃度の $^3\text{H}$ 標識された25-hydroxy-cholesterolをbinding buffer中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の非標識試薬を放射標識試薬と併に加えることにより調べた。遊離の放射標識試薬はデキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

## (3) 競争結合試験

一連の環境ホルモン候補物質のROR $\alpha$ および $\gamma$ に対する結合能は、 $^3\text{H}$ 25-hydroxy-cholesterolの受容体結合を阻害する能力で評価した。評価する一連の化学物質を $^3\text{H}$ 25-hydroxycholesterolとRORと併にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。遊離の放射標識リガンドはデキストラン被膜活性炭により取り除いた。化学物質のIC<sub>50</sub>値(放射標識化合物の受容体結合を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) ROR $\alpha$ 受容体の発現と飽和結合試験

ヒトのcDNAライブラリーからクローニングよりROR $\alpha$ のクローンを得て、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発現し、アッセイに必要な発現タンパク質を得ることができた(図1)。次に、結合試験系を構築するためにROR $\alpha$ と結合が報告されている25-hydroxy-cholesterolの $^3\text{H}$ -標識体をトレーサーとして反応温度、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、 $^3\text{H}$ 25-hydroxycholesterolの特異的結合を十分量与える要件の設定に成功した。スキッチャードプロット解析を行った結果、 $K_d$ 値は15 nMであり、特異的結合は全結合の60~70%あり、結合試験を行うに十分と判断された。

### (2) ROR $\gamma$ 受容体の発現と飽和結合試験

ROR $\alpha$ と同様にヒトのcDNAライブラリーからクローニングよりROR $\gamma$ のクローンを得て、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発現し、アッセイに必要な発現タンパク質を得ることができた(図2)。

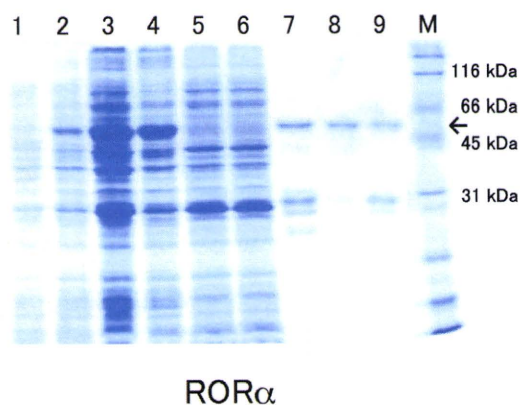


図1. ROR $\alpha$ の発現-SDS-PAGE解析-GST-ROR $\alpha$ -LBDの分子量は約54 kDa。レーン1: IPTG発現誘導前、レーン2: IPTG発現誘導後、レーン3: ソニケーション後、レーン4: ペレット、レーン5: 上清、レーン6: 素通り、レーン7: 溶出、レーン8: ゲル残り、レーン9: 脱塩後、レーンM: 分子量マーカー

次に、結合試験系を構築を25-hydroxycholesterolの $^3\text{H}$ -標識体をトレーサーとして反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F分離の条件を詳細に検討することで行った。その結果、 $^3\text{H}$ 25-hydroxy-cholesterolの特異的結合を十分量与える要件の設定に成功した。

スキッチャードプロット解析を行った結果、 $K_d$ 値は16 nMであり、特異的結合は全結合の70~80%あり、結合試験を行うに十分と判断された。

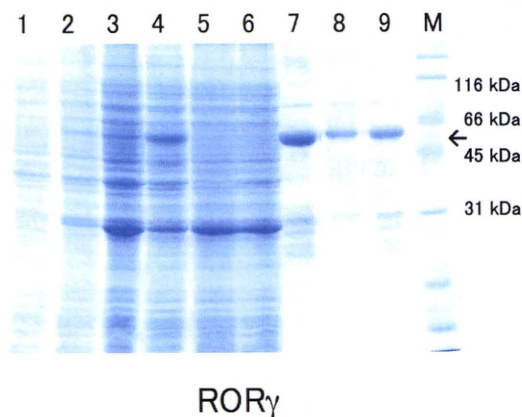
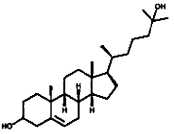
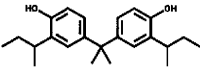
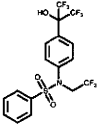
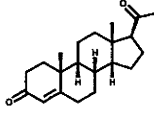
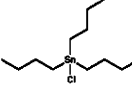
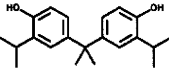
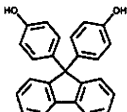
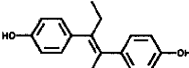
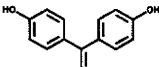


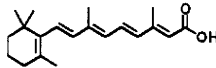
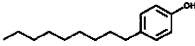
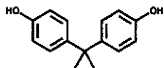
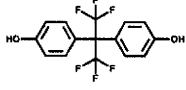
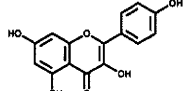
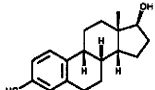
図2. ROR $\gamma$ の発現-SDS-PAGE解析-GST-ROR $\gamma$ -LBDの分子量は約54 kDa。各レーンは図と同じ。

### (3) ROR $\alpha$ および $\gamma$ 受容体に結合性を示す化学物質のスクリーニング

結合試験に必要な GST-ROR $\alpha$ -LBD および GST-ROR $\gamma$ -LBD が十分量確保できたことにより、<sup>3</sup>H] 25-hydroxycholesterol を用いて様々な化学物質、コレステロールおよびその誘導体、生体の内因性ホルモンや合成エストロゲンなど、種々の化学物質について受容体競争結合試験によるスクリーニングを行った (表 1)。

表 1. ROR $\alpha$ ,  $\gamma$  の結合競争試験

chemical	structure	IC <sub>50</sub> (nM)	
		ROR $\alpha$	ROR $\gamma$
25-hydroxycholesterol		~100	~100
2,2-bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane		~100	~150
T0901317		~1000	14
progesterone		~100	N.D.
tributyltin chloride		N.D.	>1000
2,2-bis(4-hydroxy-3-isopropylphenyl)propane		N.D.	N.D.
9,9-bis(4-hydroxyphenyl)fluorene		N.D.	N.D.
diethylstilbestrol		N.D.	N.D.
bisphenol C		N.D.	N.B.

all-trans retinoic acid		N.D.	N.B.
4-nonylphenol		N.B.	N.B.
bisphenol A		N.B.	N.B.
bisphenol AF		N.B.	N.B.
kaempferol		N.B.	N.B.
17 $\beta$ -estradiol		N.B.	N.B.

その結果、既知の 25-hydroxycholesterol は ROR $\alpha$  および ROR $\gamma$  に高い結合能を持つことが分った。一方、ビスフェノール A に類似の構造を有する 2,2-bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane も 25-hydroxycholesterol より若干弱いながら ROR $\alpha$  および ROR $\gamma$  の両方に結合性を示した。また、既報の合成リガンド・T0901317 は ROR $\gamma$  に強く結合することが確認された。黄体ホルモン・プロゲステロンは ROR $\alpha$  にのみ結合性を示した。トリブチルスズは ROR $\gamma$  にのみ非常に弱く結合した。しかしながら、他の化学物質で ROR $\alpha$  および  $\gamma$  に顕著な結合性を示すものは見いだされなかった。特に、ROR $\gamma$  への結合性が報告されていた all-trans-レチノイン酸については、明確な結合性は確認されなかった。

### D. 考察

本研究において、ROR $\alpha$  および ROR $\gamma$  に対する結合競争試験系の確立に成功したため、化学物質のスクリーニング試験が可能となった。今回、試験した化合物群からは極めて強力な結合性を示す化合物は見つからなかったが、ビスフェノール類・2,2-bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane が結合性を示したことは興味深い。

今後は、結合性を示した化学物質の生物活性を同定することが必要であり、また、本研究で確立した試験法を用いスクリーニングに供する化学物質の数をさらに増やし、未知

の結合性を有する化学物質を同定する予定である。

## E. 結論

ROR $\alpha$ およびROR $\gamma$ に対する結合競争試験系の確立に成功した。現状においては、極めて強く結合する化学物質は発見されなかったが、ビスフェノール類で結合性を示すものが見いだされたため、今後、さらなる内分泌攪乱作用を精査する必要性が確認された。

## F. 研究発表

### 論文発表

現在のところ、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・レチノイン受容体 $\alpha$ 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. 巢山慶太郎、劉 暁輝、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, 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 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。



## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Arase, K. Ishii, K. Igarashi, K. Aisaki, Y. Yoshio, A. Matsushima, Y. Shimohigashi, K. Arima, J. Kanno, Y. Sugimura	Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus	<i>Biology of Reproduction</i>	84(4)	734-742	2011
E. Hassaneen, A. El-Din Sallam, A. Abo-Ghali, Y. Moriyama, S.G. Karpova, S. Abdelsalam, A. Matsushima, Y. Shimohigashi, K. Tomioka	Pigment-dispersing factor affects nocturnal activity rhythms, photic entrainment and the free-running period of the circadian clock in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .	<i>Journal of Biological Rhythms</i>	26(1)	3-13	2011
Y. Shimohigashi	Structure-activity studies on nociceptin and its receptor ORL1	<i>Peptide Science 2010</i>	2010	26	2011
K. Koga, M. Nakamura, M. Sumiyoshi, A. Mastumoto, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi	<i>Drosophila</i> neuropeptide hury present in the clock cells important for circadian rhythm oscillation	<i>Peptide Science 2010</i>	2010	68	2011
A. Matsushima, X. Liu, H. Okada M. Shimohigashi Y. Shimohigashi	Bisphenol AF is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER $\alpha$ , but a Highly Specific Antagonist for ER $\beta$	<i>Environmental Health Perspectives</i>	118	1267-1272	2010
X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, Y. Shimohigashi	Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR $\gamma$ between bisphenol A and 4-hydroxy-tamoxifen	<i>Journal of Biochemistry</i>	148(2)	247-254	2010

<p>X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, Y. Shimohigashi</p>	<p>Functional Role of the C-terminal Helix 12 Peptide in the Receptor Activation Mechanism of Estrogen-related Receptor <math>\gamma</math> (ERR<math>\gamma</math>)</p>	<p><i>Peptide Science</i> 2009</p>	<p>2009</p>	<p>435-436</p>	<p>2010</p>
<p>T. Nose, T. Tokunaga, Y. Shimohigashi</p>	<p>The Agonist/Antagonist Differential-docking Screening (AADS) Method for Exploration of the Estrogen Receptor-binding Chemicals</p>	<p><i>Peptide Science</i> 2009</p>	<p>2009</p>	<p>463-464</p>	<p>2010</p>

## 研究成果の刊行物・別刷

## Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus<sup>1</sup>

Shigeki Arase,<sup>3,5</sup> Kenichiro Ishii,<sup>3,4,5</sup> Katsuhide Igarashi,<sup>6</sup> Kenichi Aisaki,<sup>6</sup> Yuko Yoshio,<sup>5</sup> Ayami Matsushima,<sup>7</sup> Yasuyuki Shimohigashi,<sup>7</sup> Kiminobu Arima,<sup>5</sup> Jun Kanno,<sup>6</sup> and Yoshiki Sugimura<sup>2,5</sup>

Department of Nephro-Urologic Surgery and Andrology,<sup>5</sup> Mie University Graduate School of Medicine, Mie, Japan  
Division of Cellular & Molecular Toxicology,<sup>6</sup> National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan  
Laboratory of Structure-Function Biochemistry,<sup>7</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

### ABSTRACT

The balance between androgens and estrogens is very important in the development of the prostate, and even small changes in estrogen levels, including those of estrogen-mimicking chemicals, can lead to serious changes. Bisphenol A (BPA), an endocrine-disrupting chemical, is a well-known, ubiquitous, estrogenic chemical. To investigate the effects of fetal exposure to low-dose BPA on the development of the prostate, we examined alterations of the in situ sex steroid hormonal environment in the mouse urogenital sinus (UGS). In the BPA-treated UGS, estradiol (E<sub>2</sub>) levels and CYP19A1 (cytochrome P450 aromatase) activity were significantly increased compared with those of the untreated and diethylstilbestrol (DES)-treated UGS. The mRNAs of steroidogenic enzymes, *Cyp19a1* and *Cyp11a1*, and the sex-determining gene, *Nr5a1*, were up-regulated specifically in the BPA-treated group. The up-regulation of mRNAs was observed in the mesenchymal component of the UGS as well as in the cerebellum, heart, kidney, and ovary but not in the testis. The number of aromatase-expressing mesenchymal cells in the BPA-treated UGS was approximately twice that in the untreated and DES-treated UGS. The up-regulation of *Esrrg* mRNA was observed in organs for which mRNAs of steroidogenic enzymes were also up-regulated. We demonstrate here that fetal exposure to low-dose BPA has the unique action of increasing in situ E<sub>2</sub> levels and CYP19A1 (aromatase) activity in the mouse UGS. Our data suggest that BPA might interact with in situ steroidogenesis by altering tissue components, such as the accumulation of aromatase-expressing mesenchymal cells, in particular organs.

*aromatase, bisphenol A, developmental biology, embryo, estradiol/estrogen receptor, in situ estrogen production, male reproductive tract, prostate, steroidogenic enzyme, urogenital sinus*

<sup>1</sup>Supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. GEO accession no. GSE24928.

<sup>2</sup>Correspondence: Yoshiki Sugimura, Department of Nephro-Urologic Surgery and Andrology, Mie University Graduate School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan. FAX: 81 59 231 5203; e-mail: sugimura@clin.medic.mie-u.ac.jp

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>4</sup>Current address: Mie University Graduate School of Regional Innovation Studies, 1577 kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan.

Received: 27 July 2010.

First decision: 19 August 2010.

Accepted: 15 November 2010.

© 2011 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

### INTRODUCTION

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) have been implicated in the alteration of fetal development of urogenital organs as well as the reproductive and endocrine systems in humans and other species [1]. The fetal development of urogenital organs is induced by endogenous hormonal messages that originate in fetal and maternal hormone systems. Fetal exposure to EDCs disrupts the interactions between endogenous hormones and their receptors, causing adverse effects later in life [2]. In the prostate, both androgens and estrogens play a significant role in development and differentiation as well as in the maintenance of adult homeostasis [3]. Therefore, even small changes in estrogen levels, including those of estrogen-mimicking chemicals, can lead to changes in prostate development and differentiation.

Bisphenol A (BPA), one of the EDCs, is a well-known, ubiquitous, estrogenic chemical used in the manufacture of polycarbonate plastics, as a lining in metal food and drink cans, and in dental sealants [4]. The concern with BPA originates from its detection in maternal and fetal plasma as well as the placenta [5, 6]. Thus, fetal exposure to BPA is implicated in fetal toxicity as well as in subsequent growth of the infant. Histopathologically, fetal exposure to low-dose BPA (10 µg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) has been shown to increase cell proliferation of urogenital sinus epithelium (UGE) in the primary prostatic ducts of CD1 mice [7]. Recently, our group reported that fetal exposure to low-dose BPA (20 µg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) specifically increased the number of basal epithelial cells in the adult prostate of BALB/c mice and also induced permanent cytokeratin 10 expression in such cells similar to the effects of synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES; 0.2 µg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) [8]. Epigenetically, neonatal exposure of male rats to low-dose BPA (10 µg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) elicited critical molecular changes during prostate development and also increased prostatic gland susceptibility to precancerous neoplastic lesions and hormonal carcinogenesis [9]. Toxicological studies of BPA at less than 50 µg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> in rodent fetuses and offspring have demonstrated alterations of mammary gland development, open-field behavior, and reproductive functioning [10–12].

Some EDCs are reported to alter the in situ sex steroid hormonal environment in the reproductive system. The triazine herbicide atrazine binds directly to adrenal-4-binding protein/steroidogenic factor-1 (official symbol NR5A1) and increases CYP19A1 (cytochrome P450 aromatase) expression and, ultimately, estradiol (E<sub>2</sub>) production in human genital cancer cell lines [13]. The aryl hydrocarbon (dioxin) also increases CYP19A1 (aromatase) expression mediated by its receptor in mouse ovaries [14]. In contrast, the phosphorothioate insecticide profenofos increases the expression of steroidogenic genes