

21-23 Vinclozolin metabolita M2 83792-61-4

(22) 一般有機化合物	化合物名	CAS番号
22-36	Raloxifene hydrochloride	82640-04-8
22-37	Flutamide	13311-84-7
22-38	Hydroxyflutamide	52806-53-8
22-39	1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta-(g)-2-benzopyran	1222-05-5
22-40	7-Acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-tetraalin	1506-02-1
22-41	4-Acetyl-1,1-dimethyl-6-tert-butylindan	13171-00-1
22-42	6-Acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethyl-indan	15323-35-0
22-43	6,7-Dihydro-1,1,2,3,3-pentamethyl-4-(5H)-indanone	33704-61-9
22-44	5-Acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylindan	68140-48-7
22-45	4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)-pent-1-ene (MBP)	1222-05-5
22-46	3-Methyl-1,3-bis(4-hydroxy phenyl) butane 1 one (MBBO)	1506-02-1
22-47	3-Ethylbenzothiazolium Bromide	32446-47-2
22-48	Methyl orange	547-58-0
22-49	Methylene blue 2~3hydrate	7220-79-3
22-50	N-ethylmaleimide	128-53-0
22-51	1-Pyreneacetic Acid,succinimidyl ester	
22-52	Menadione sodium bisulfite	130-37-0
22-53	Nitrobenzene	98-95-3

(26) 脂肪酸	化合物名	CAS番号
26-1	Stearic Acid	57-11-4
26-2	Palmitic Acid	57-10-3
26-3	Myristic Acid	544-63-8
26-4	Lauric Acid	143-07-7
26-5	Oleic Acid	112-80-1
26-6	Linoleic Acid	60-33-3
26-7	α -linolenic Acid	463-40-1
26-8	γ -linolenic Acid	506-26-3
26-9	Arachidonic Acid	506-32-1

(28) レチノイド	化合物名	CAS番号
28-1	all- <i>trans</i> Retinoic acid	302-79-4
28-2	9- <i>cis</i> Retinoic acid	5300-03-8
28-3	13- <i>cis</i> Retinoic acid	4759-48-2
28-4	Retinol	68-26-8
28-5	all- <i>trans</i> Retinal	116-31-4

(29) 特異的リガンド	化合物名	CAS番号
29-1	Clotrimazole	23593-75-1
29-2	CITCO	338404-52-7
29-3	Rosiglitazone	122320-73-4
29-4	T0070907	313516-66-4
29-5	GW0742	317318-84-6
29-6	GW7647	265129-71-3
29-7	GSK4716	101574-65-6
29-8	DY131	95167-41-2
29-9	Calcitriol, (1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3)	32222-06-3
29-10	XCT790	725247-18-7
29-11	T0901317	293754-55-9
29-12	LG100754	180713-37-5
29-13	GW4064	278779-30-9
29-14	L-Thyroxine	51-48-9
29-15	3,3',5-Triiodo-L-thyronine	6893-02-03

(30) リン脂質	化合物名	CAS番号
30-1	Phosphatidylinositol-1-(1,2-dihexadecanoyl)-3,4,5-Triphosphate, Sodium salt <PtdIns-(3,4,5)-P3 (1,2-Dipalmitoyl)>	
30-2	L- α -Phosphatidylcholine	8002-43-5
30-3	L- α -Phosphatidylethanolamine	39382-08-6

① エストロゲン受容体 α 型 (ER α)

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、最近生産量が増えている「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。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。そこで平成 21 年度には、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 (ER α) について、一連の BPA 類似化合物 (表 1) を含む 500 化学物質の結合スクリーニングを実施した。

スクリーニングの結果、17 種の BPA 類似化合物が、BPA より強い結合性を示すことが明らかとなった (表 2)。特に近年、生産および使用量が急激に増大しているとされる、いわゆる「新世代ビスフェノール」が、ER α に BPA よりも遥かに強く結合することは、驚くべきことである。これらのうち、特に結合力の強い 11 種の BPA 類似化合物について、レポーター遺伝子アッセイにより転写活性を評価したところ、少なくとも 2 種は ER α

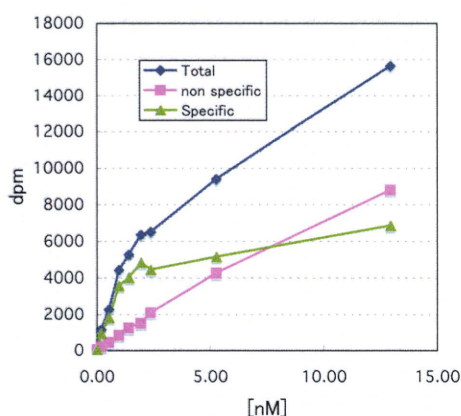


図 5. $[^3\text{H}]E2$ を用いた ER α に対する飽和結合試験結果

の新規なアンタゴニストであることが判明した。これらは ER β にはアゴニストであった。一方、後述のビスフェノール-HPTE および C は、ER α にはアゴニストで、ER β にはアンタゴニストである。

② エストロゲン受容体 β 型 (ER β)

エストロゲン受容体 β 型 (ER β) は、ER α のサブタイプである。この ER β に対する結合試験系を構築し、ER α に強く結合したビスフェノールA類似化合物の結合試験を行った。平成 21 年度には、ビスフェノール AF (BPAF) は ER α よりもむしろ ER β に強く結合すること、そして、『ER α のアゴニストであり、かつ ER β のアンタゴニストである』という新事実が明らかになった。BPAF は米国厚生省所轄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その健康リスク、危険性が注目されている。このように受容体サブタイプでその応答が真反対であることは、きわめて重要であり、両方の受容体が共存する細胞での解析には厳重な注意が必要である。

こうしたなか、平成 22 年度には、BPAF に加えて、ビスフェノール-HPTE および C も ER α よりも ER β に強く結合し、ER α のアゴニストであり、かつ ER β のアンタゴニストであることが判明した。が、同じく新世代ビスフェノールであるこれらハロゲン (フッ素、あるいは塩素) を含む化合物については、その ER 受容体応答について、十分に留意すべきである。

③ エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ)

エストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) については、ビスフェノールAの特異的な標的核内受容体であることから、詳細な解析を実施した。特に、ビスフェノール誘導体と考えることのできるカテゴリー番号 (1) ~ (5) の合計 125 化学物質については、高活性な化合物が予想された。また、ビスフェノールAの一方のフェニル-ヒドロキシル基を削除した化合物の 4- α -クミルフェノールが、ビスフェノールAとほぼ同じ強さの高い結合親和性を示したことから、フェノール類 (14) (17) 合計 34 化学物質についても詳細に試験した。その結果、表 2 に示すように、6 段階に分類した結合親和性の程度で、IC₅₀ 値 1 桁で最も高活性なグループ 2 種、2 桁で活性な化合物 11 種、3 桁でかなり強い化合物 16 種であり、

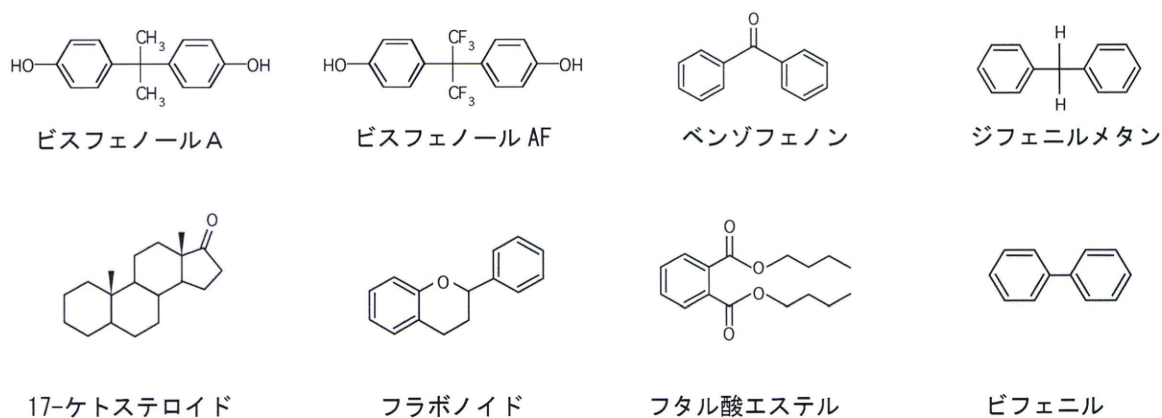


図 6. 核内受容体応答スクリーニングに供される代表的な化学物質群

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

化合物名	比活性
17 β -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
α,α,α' -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
spirobicomane	0.24
2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane	0.24
2,2-bis[4-(4-aminophenoxy)phenyl]hexafluoropropane	ND
α,α' -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 γ 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- α -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.

[^3H]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 IC₅₀ 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。

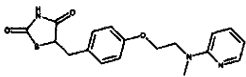
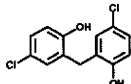
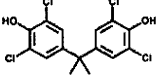
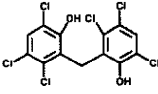
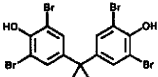
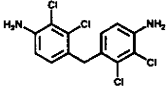
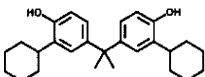
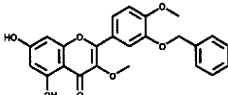
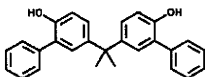
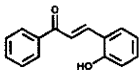
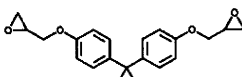
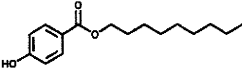
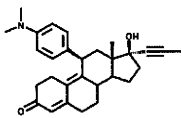

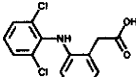
約 30 種もの活性な化学物質が存在することが明らかとなった。なかでも IC₅₀ 値 8~90 nM の化合物が 13 種も存在すること、また、ビスフェノール類、アルキルフェノール類に結合親和性の高いものが多いことが注目される。

④ PPAR γ

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) γ 型 γ ; PPAR γ) に着目し、特異的リガンドであるチアゾリジン系薬剤の [^3H]rosiglitazone を用いた受容体結合試験系の構築を試みた。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、482 種の化学物質に対し PPAR γ への結合性解析を実施したところ、rosiglitazone (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 γ は他の核内受容体に比べ大きなリガンド結合ポケットを持つことが知られており、こ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 γ 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 γ に対する化学物質の活性：ロシグリタゾンに対する比活性

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

⑤ レチノイン関連オーファン受容体 (ROR)

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

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

表5. 核内受容体 ROR β に対する 500 化学物質の活性

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

⑥ 構成的アンドロスタン受容体 (CAR)

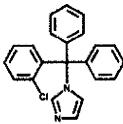
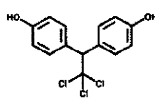
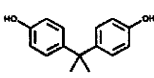
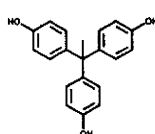
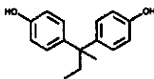
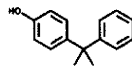
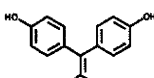
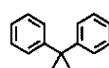
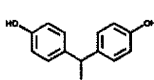
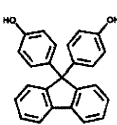
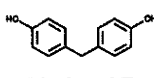
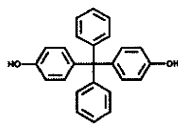
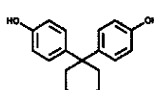
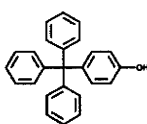
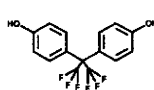
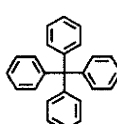
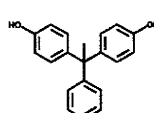
核内受容体の中でも異物代謝や糖新生等に重要な役割を担う構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor; CAR) に着目し、ヒト CAR に対するアンタゴニストである抗真菌薬剤の [³H] clotrimazole (クロトリマゾール) を用いた受容体結合試験系の構築に取り組んだ。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、ビスフェノール化合物 130 種類に対し CAR への結合性解析を実施したところ、ビスフェノール A (BPA) をはじめいくつもの類縁化合物がクロトリマゾールと同等の強さで CAR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

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

⑦ 肝臓 X 受容体 (LXR)

肝臓 X 受容体 (Liver X Receptor, LXR) には、 α 型と β 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。 α 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、 β 型は全身に発現するが、特に中枢神経系に発現が多い。本研究では両者について、 [³H] 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

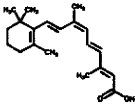
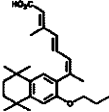
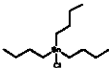

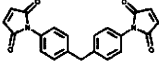
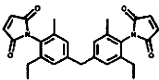
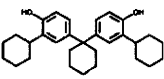

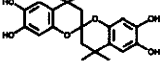
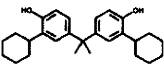
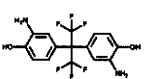
化学物質名/構造	相対結合能 (%)	化学物質名/構造	相対結合能 (%)
 Clotrimazole	100	 HPTE	61.7
 Bisphenol A	42.8	 1,1,1-Tris(p-hydroxyphenyl)ethane	12.3
 Bisphenol B	124.5	 4-α-Cumylphenol	8.1
 Bisphenol C	16.8	 2,2-Diphenylpropane	結合なし
 Bisphenol E	2.1	 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorene	36.4
 Bisphenol F	結合なし	 4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane	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 α にかなり強く結合したが (IC₅₀ = 約 130 nM)、LXR β には非常に弱い結合性しか示さず (IC₅₀ > 3 μ M)、きわめて強い α 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-5a, 6a-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、 α 、 β 、 γ の3つのサブタイプが存在し、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 α	RXR β	RXR γ
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',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9-シスレチノイン酸 9cRA、そして、既に報告されているトリブチルスズは RXR のいずれに対しても、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、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、平成 21 年度までに生細胞系での結合試験は通常の結合試験で強い親和性が観察され、細胞膜を通過すると思われる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 $\text{ERR}\gamma$ 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 $\text{ERR}\gamma$ 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。こうしたなか、平成 21 年度に $\text{ERR}\gamma$ 以外に、 $\text{ER}\alpha$ 、 $\text{ER}\beta$ 、 $\text{ERR}\alpha$ 、 $\text{ERR}\beta$ 、 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 $\text{ERR}\gamma$ 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。

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、 $\text{ERR}\gamma$ 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も、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 CAR が第二のビスフェノールA受容体として発見された。現在まで、その他の核内受容体、 $\text{PPAR}\gamma$ 、 $\text{ROR}\beta$ 、 $\text{Rev-er}\alpha$ 、 $\text{Rev-er}\beta$ 、 $\text{RXR}\alpha$ 、 $\text{RXR}\beta$ 、 $\text{RXR}\gamma$ 、 FSR 、 VDR などにはまったく結合しないことが分かっている。

(4) レポーター遺伝子試験

$\text{ERR}\gamma$ は、自発活性化型核内受容体である。リガンド無しではほぼ 100%フルに活性されている。これまでに、ビスフェノールA、EおよびAF、4- α -クミルフェノール、4-*tert*-ブチルフェノールは全て、 $\text{ERR}\gamma$ の基盤構成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 $\text{ERR}\gamma$ 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、 $\text{ERR}\gamma$ 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関連しており、ビスフェノールEが最大の活性を示した。

平成 22 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。 α 型のサブタイプ $\text{ER}\alpha$ 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 β -エストラジオールおよびビスフェノール AF とは異なり、10 μM でも 100%活性を示さず、60~70%の活性に留まった。

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

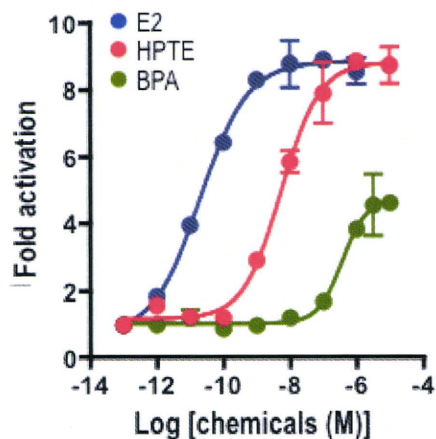


図 7. レポーター遺伝子アッセイによる $\text{ER}\alpha$ に対する転写活性可能試験

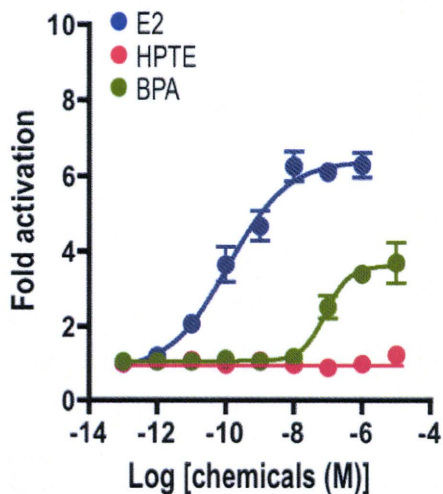


図 8. レポーター遺伝子アッセイによる $ER\beta$ に対する転写活性化能試験

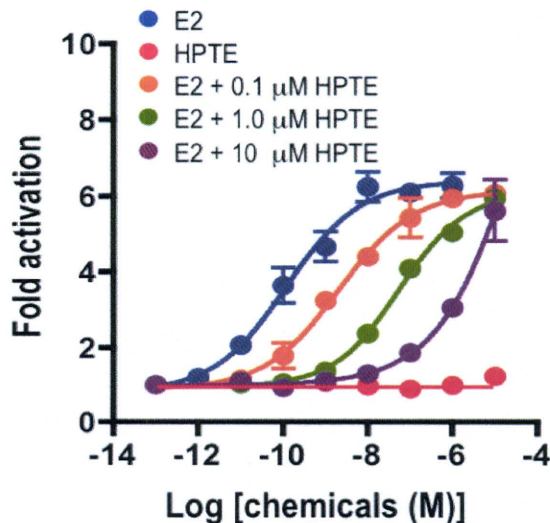


図 9. 一定濃度 BPAF 存在下における $ER\beta$ に対する E2 の転写活性化能試験

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 $ER\beta$ の活性を抑制することになる(図 9)。こうして、HPTE は $ER\beta$ 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

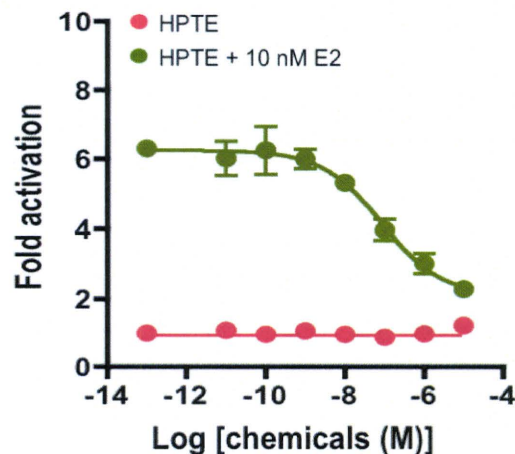


図 10. 10 nM の E2 存在下における $ER\beta$ に対する BPAF の転写活性化能試験

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 α 、ER β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ の5種類のエストロゲン関連の受容体が存在するが、dERRはショウジョウバエにおいて唯一存在するエストロゲン関連の受容体である。dERRはビスフェノールAを特異的に結合する。こうしたなか、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、

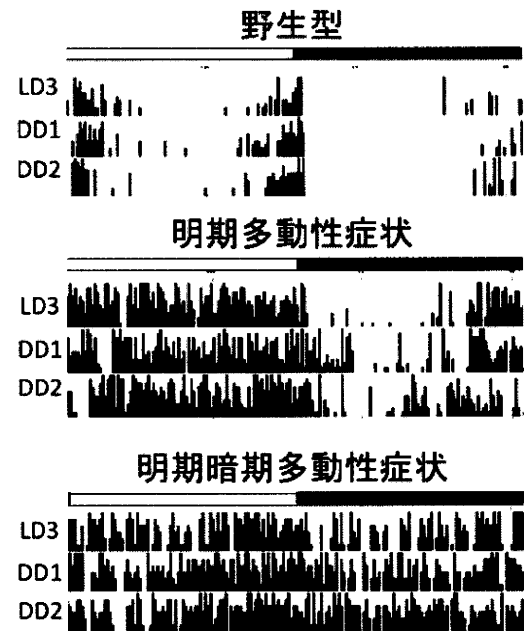


図11. ビスフェノールA食餌ショウジョウバエの行動リズム。

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。

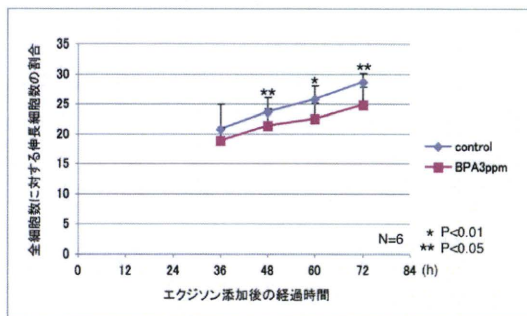


図 11. BG2-c6 細胞の伸長突起の長さの変化

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。

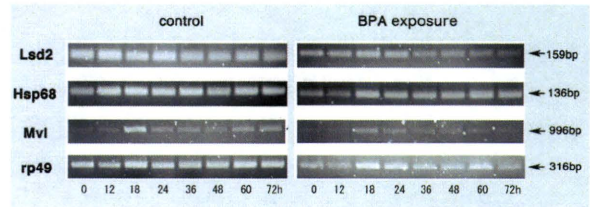


図 12. PCR 法による発現解析

Lsd2 および Hsp68 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。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

ヒト核内受容体 48 種をアッセイする必要性

有害化学物質が相互作用する標的は核内受容体であり、有害性の本質は受容体を介するシグナル毒性であると考えられている。核内受容体は転写因子として機能する。そして、ヒト核内受容体には 48 種類ある。化学物質の内分泌攪乱作用が問題になった当初は、主として、生殖毒性を中心とする悪影響であり、したがって、生殖腺で機能するエストロゲン受容体 ER やアンドロゲン受容体 AR が標的として考えられた。しかしながら、2006 年（平成 18 年）頃になって、内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A および有機スズであるトリブチルスズの標的受容体として、ERR γ 、RXR γ がそれぞれ同定され、それまで想定されていた受容体 ER や AR とは全く異なっていた。これが契機となって、「ヒト核内受容体 48 種すべてについて有害化学物質の受容体応答を試験する」ことの重要性、必要性が理解されるようになった。

ビスフェノール A 標的受容体として ERR γ を最初に発見した我々は、はじめから 48 種すべてを試験の対象として捉え、新規なアッセイ法として「コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法」の開発に取り組んだ。この取り組みの動機は、化学物質が摂取されたのち、これに曝露される核内受容体として ER と AR に限定すること、そして、内分泌攪乱作用をこれらの受容体を介するものに限定して試験することの不合理性を見抜いたことである。48 種の核内受容体は、なべて化学物質に曝露される可能性があり、結合親和性が高いものがある可能性があり、悪影響を及ぼす可能性がある。

平成 20 年度、この考え方が正しいと判断できる新事実の発見が三つあった。一つは、ERR γ に高い結合親和性を示す化合物が続々と同定されたこと。二つ目は、ER に高親和性を示すビスフェノール A 誘導体が発見されたこと。そして、三つ目は、有機スズ化合物が結合する核内受容体として PPAR γ が同定されたこと。さらに平成 21 年度には、新たにきわめて重要な新発見が二つあった。一つは、ビスフェノール A の特異的受容体として新たに CAR が同定されたこと。そして、

二つ目は、ビスフェノール AF がエストロゲン受容体 α 型 ER α にフルに活性なアゴニスト、ER β に不活性はアンタゴニストとして同定されたこと。最終年度である平成 22 年度には、ビスフェノール AF に加えて、ビスフェノール C、HPTE も同様な受容体応答を示すことが判明した。このように、各核内受容体について化学物質をスクリーニングすること、そして、結合性を示す化学物質について核内受容体をスクリーニングすること、双方向からのスクリーニングが重要であることが次々と証明されている。

リスク評価スキームの構築

『特定のヒト核内受容体に対して化学物質をスクリーニングする、あるいは特定の化学物質に対してヒト核内受容体をスクリーニングするスキームの構築』は、緊要な課題である。現状として、ヒト核内受容体 48 種について確立しているアッセイ系は一様ではなく、各核内受容体どのようなスキームを構築するかは確立しているアッセイ系によって選択する必要がある。以下に、現状で考えられるスキームの例をあげる。(2)(3)(4)(5)

(1) ERR γ のように、 $[^3\text{H}]$ ビスフェノール A や $[^3\text{H}]4\text{-OHT}$ など特定のトレーサーが使用できる場合、まず、受容体結合試験によって化学物質をスクリーニングする。この場合、発現 LBD タンパク質を用いて *in vitro* で試験する。この結合試験で結合親和性が同定された化学物質について、これがどのような受容体応答を示すかについては、端的にはレポーター遺伝子アッセイ、あるいは Two-hybrid 法でアゴニスト/アンタゴニスト活性、あるいはインバースアゴニスト/インバースアンタゴニスト活性の有無、程度を調べる。こうした HeLa 細胞を用いたアッセイの結果を評価するにあたり、HeLa 生細胞結合試験により発現 LBD タンパク質を用いた試験結果と比較し、化学物質の細胞膜通過性、受容体結合親和性を試験し、*in vivo* での活性の評価指標とする。

(2) PPAR γ や ROR β のように、弱いながら結合試験の可能なトレーサーが使用できる

場合、同じようなスキームで実施する。使用のトレーサーよりも結合性が高い化合物が同定され、その放射標識誘導体が入手可能な場合は、結合試験を更新してからスキームを進める。

(3) 結合試験に使用可能なトレーサーが無い場合、センシング抗体アッセイで化学物質をスクリーニングする。あるいは、表面プラズモン共鳴 SPR 法で解析、スクリーニングする。これらで応答する化合物があれば、レポーター遺伝子アッセイ、Two-hybrid 法で確認する。この過程でトレーサーになるものあれば結合試験を実施する。なお、核内受容体には、リガンド活性化型と自発活性化型が存在する。リガンド活性化型に対しては、アゴニスト/アンタゴニスト活性を調べ、自発活性化型に対してはインバースアゴニスト/インバースアンタゴニスト活性を調べる。

アッセイが困難なのは事例(3)の場合である。センシング抗体アッセイ法の確立は、各受容体について実施する必要があり、かなりの労力を必要とする。このため、SPR 法による直接的な分子間相互作用の測定を併用することも必要で、平成 22 年度より BiaCore を用いる方法で取り組んでいる。

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。ヒト核内受容体には 48 種ある。上述のように、「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」ことが必要となり、例えば、ビスフェノール A について 48 種すべてを試験することが肝要である。現時点では、約半数の受容体については試験が可能であり、こうしたなかで、ERR γ や CAR が見出されてきた。また、ビスフェノール AF がエストロゲン受容体 α 型 ER α にフルに活性化アゴニスト、ER β に不活性化アンタゴニストとして同定された。核内受容体をスクリーニングすることが非常に重要であることを示す事実である。

一方、ビスフェノール-HPTE や C がビスフェノール AF と同様に、ER α にアゴニスト、ER β にアンタゴニストとして同定されたことは、逆に、ある特定の核内受容体について、化学物質、あるいは化学物質群をスクリーニ

ングすることが大切であることを示している。同様のことは、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 の受容体選択性と特異性

我々は、胎児、乳幼児の脳神経系での悪影響、低用量作用が強く懸念されているビスフェノール A の特異的として核内受容体 ERR γ および CAR の同定に成功した。これら以外に結合するのか？ 核内受容体以外の受容体に結合するのか？ は、*in vivo* の効果、作用を検討する場合、特に重要である。これまでに、ビスフェノール A をステロイドホルモン受容体 9 種をはじめ、合計 20 種について調べたところ、ERR γ 、CAR 以外の核内受容体には結合しないことが判明した。他の約 25 種類の核内受容体に対してはどうか？ が、まず問題となる。これらについても正確にスクリーニングする予定である。

2008 年 9 月に公表されたビスフェノール A に関するアメリカ National Toxicology Program (NTP) の報告書「The potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A」では、ビスフェノール A の受容体として細胞膜に発現している 7 回膜貫通型構造の G タンパク質共役受容体の 1 種 GPR30 が紹介されている。しかしながら、この原報は GPR30 が ER の天然リガンド E2 (17 β -エストラジオール) の特異的な受容体とするものであり [Revankar CM *et al.*, A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**, 1625–1630 (2005); Filardo E *et al.*, Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* **148**, 3236–3245 (2007).]、原報を見る限りビスフェノール A への結合親和性は非常に弱い。しかしながら、最近 GPR30 が E2 の特異的な受容体とすることに反論する論文も報告されている [Otto C *et al.*, G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* **149**, 4846–4856 (2008).]。我々も、GPR30 を COS-7 細胞に一過性に発現させて調べたが、非常に厳しい条件のもとでかろうじて特異的な結合を

検出できた。しかしながら、 $[^3\text{H}]$ ビスフェノールAでは特異的結合を検出できなかった(未発表データ)。現在のところ、「ビスフェノールAの特異的受容体は $\text{ER}\gamma$ および CAR である」とするのが妥当である。

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 $\text{ER}\alpha$ に対してアゴニスト、 $\text{ER}\beta$ 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_3 が2つともトリフルオロメチル CF_3 に置換したものである。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、平成22年度、ビスフェノールCと 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 $\text{ER}\alpha$ に対してアゴニスト、 $\text{ER}\beta$ 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、 $\text{ER}\beta$ において自らは不活性であり、 E_2 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、 $\text{ER}\alpha$ と $\text{ER}\beta$ 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、 $\text{ER}\alpha$ と $\text{ER}\beta$ 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。 $\text{ER}\alpha$ と $\text{ER}\beta$ 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

機能ポリカービ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、こ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 $\text{ER}\alpha$ と $\text{ER}\beta$ 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 $\text{RXR}\alpha$ 、 β 、 γ 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。本研究においてはまず、 $[^3\text{H}]$ -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、 $[^3\text{H}]$ -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。

$\text{RXR}\alpha$ 、 β 、 γ 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、 $\text{RXR}\alpha$ 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 $\text{RXR}\alpha$ 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。 $\text{RXR}\beta$ および γ では、その効果は α 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。

$\text{RXR}\alpha$ 、 β 、 γ 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。

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 γ 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 γ 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 γ (ショウジョウバエの場合は、dERR) にあるとすると、ERR γ 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。ビスフェノールAが受容体に結合すること自体が何か分子的な意味合いがあるのだろうか？

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 20 年度から平成 22 年度までの 3 年間の本研究事業実施の間に、国際的に重要な懸案であったいくつかの問題を解決し、新たなステージの研究展開へと導いた。まず、既にビスフェノールAの特異的な受容体として ERR γ を発見したが、さらに CAR を見出し、この化学物質の毒性については、これらの受容体応答を勘案して解析すべきことが明らかとなった。次いで、米国 NTP により試験すべき化合物としてノミネートされたビスフェノール AF について、『ER α のアゴニスト、ER β のアンタゴニスト』という新事実を明らかとした。さらには類縁のビスフェノール-HPTE、ビスフェノールCについても同様に、「ER α のアゴニスト、ER β のアンタゴニスト」であることを証明した。

化学物質セット (ビスフェノール類 81、ベンゾフェノン類 25 種をはじめ、総計 651 種類から 500 種を選択) のスクリーニングを、アッセイ系が確立した核内受容体から順次に実施した結果、いくつかの重要な事実が明らかとなった。まず、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判明した。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 α にかなり強く結合するものの、LXR β には非常に弱い結合性しか示さず、きわめて強い LXR α 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。一方、RAR のように、内在性の脂肪酸であるレチノイン酸以外の化学物質はほとんど結合しない核内受容体も見られた。

遺伝学的に最適なヒト・実験モデルとして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を実施し、多動性症状のハエを同定した。これら「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20回繰返しと23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いという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 ERR γ 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 α , but a highly specific antagonist for ER β . 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 γ (ERR γ). 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).
12. 放射標識化合物を用いた受容体結合試験による特異的受容体の同定・解析：ビスフェノールAが結合する特異的受容体 ERR γ ：岡田浩幸, 下東康幸： *RADIOISOTOPES*, **58**, 43-46 (2009).
13. Exploration of endocrine disrupting chemicals on estrogen receptor α by the agonist/antagonist differential-docking screening method: T. Nose, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi, *Toxicology Letters*, **191(1)**, 33-39 (2009).
14. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR γ isoform. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, 146, 113-122 (2009).
15. ER α /ERR α nuclear receptor heterodimer directly linked by a flag peptide. S. Ikeda, A. Matsushima, Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2008, 511-512 (2009).
16. Bisphenol A-specific nuclear receptor ERR γ : Structure-function analysis of the two novel isoforms lacking vital peptide fragment in the ligand binding domain. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2008, 517-518 (2009).
17. Induced-fit type ligand binding guided by free-rotatory Leu residue present in the 7th α -helix peptide in the estrogen-related receptor γ (ERR γ). A. Matsushima, X. Liu, T. Tokunaga, T. Teramoto, Y. Kakuta, Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2008, 521-522 (2009).
18. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-related Receptor γ (ERR γ). H. Okada, T. Tokunaga, X. Lui, S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Environmental Health Perspectives*, **116**, 32-38 (2008).
19. A strategy to explore the target receptor of endocrine disruptors: Estrogen-related receptor g (ERRg) as a genuine acceptor of Bisphenol A. A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **14** (Special Issue), 495-497 (2008).
20. Relationship between the results of *in vitro* receptor binding assay to human estrogen receptor and *in vivo* uterotrophic assay: Comparative study with 65 selected chemicals. Y. Akahori, M. Naki, K. Yamasaki, M. Takatsuki, Y. Shimohigashi, and M. Ohtaki: *Toxicology in Vitro*, **22**, 225-231 (2008).
21. The conformation change-sensing antibodies for retinoid-related orphan receptor Family. M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 491-492 (2008).
22. A docking modeling rationally predicts strong binding of bisphenol A to estrogen-related receptor γ . T. Nose and Y. Shimohigashi: *Protein & Peptide Letters*, **15**, 290-296 (2008).
23. Direct measure of fluorescence intensity for Efficient Receptor-binding assay: Conjugates of ethinylcarboxyestradiol and 5(and 6)-carboxy-fluorescein via α,ω -diaminoalkanes as a tracer for estrogen receptor. D. Asai, T. Tokunaga, K. Kondo, T. Kawaguchi, S. Takayanagi, T. Shinmyozu, M. Nakai, Y. Yakabe, and Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, **143**, 781-792 (2008).
24. ERR γ tethers strongly bisphenol A and 4- α -cumylphenol in an induced-fit manner. A. Matsushima, T. Teramoto, H. Okada, X. Lui, T. Tokunaga, Y. Kakuta, and Y. Shimohigashi: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **373**, 408-413 (2008).

学会発表

平成 22 年度 (2010 年度)

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 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): 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、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 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。
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、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 α 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 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。
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 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。
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 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。
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 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)、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 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。
15. 野瀬 健、村田聡史、下東康幸、エストロゲン受容体 α 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 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。

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 α 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 α 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 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、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 β 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 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。

平成21年度(2009年度)

1. 下東康幸、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、下東美樹、ビスフェノールAFはER α には強いアゴニスト、ER β には強いアンタゴニストである、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

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

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

4. 酒井大樹、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、核内受容体CARにおけるピ