

スフェノール化合物の応答性解析、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

5. 岡田浩幸、松島綾美、酒井大樹、劉 曉輝、磯野裕章、池田 伸、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) における500物質の結合スクリーニング、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

6. 錦織充広、野瀬 健、下東康幸、500化学物質のレチノイド関連オーファン受容体 β 型 (ROR β) への結合性、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

7. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α および ERR ファミリーの共発現細胞でのエストロゲンの効果、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

8. 永田祐介、野瀬 健、錦織充広、下東康幸、核内受容体 Rev-erbs に対するヘム結合性の分光学的測定、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

9. 下東美樹、山田隆弘、久間祥子、住吉美保、古賀啓太、松島綾美、中川裕之、下東康幸、株化細胞 BG2-c6 を実験モデルとした環境ホルモン・ビスフェノール A のリスク評価、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

10. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、核内受容体 PPAR γ における500物質のスクリーニング、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009.12.7-8。

11. Shimohigashi Miki, Itoh Q. Taichi, Honda Takeshi, Tuzuki Hitomi, Saito Midori, Koga Keita, Takahashi Kuniaki, Matsushima Ayami, Ueda Ryu, Tanimura Teiichi, Nakagawa Hiroyuki, Matsumoto Akira and Shimohigashi Yasuyuki: PAP Peptide Coded in pdf Gene is Necessary to Persist the Circadian Locomotor Rhythm in Insect. Third Asia-Pacific International 2009 Peptide Symposium, Shineville Luxury Resort, 濟州島, 2009.11.8-11。

15. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸、和文タイトル: 受容体活性化機構におけ

るエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) C端ヘリックス12ペプチドの寄与、第46回ペプチド討論会、2009.11.4-6。

16. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、エストロゲン受容体結合性化学物質のアゴニスト/アンタゴニスト差ドッキング計算法による探索、第46回ペプチド討論会、2009.11.4-6。

17. 下東美樹、松永裕美、住吉美保、岡田浩幸、古賀啓太、松島綾美、下東康幸: 内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールAのショウジョウバエ核内受容体に及ぼす影響。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

18. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸: マウス胎仔期に発現ピークを示す核内受容体遺伝子の解析。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

19. 岡田浩幸、松島綾美、巢山慶太郎、劉 曉輝、下東康幸: ビスフェノール化合物はエストロゲン受容体およびエストロゲン関連受容体を介して複合的に作用する、第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

20. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸: ビスフェノールA受容体ERR γ 前駆体mRNAの選択的スプライシングによる分子多様性。第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

21. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、核内受容体 PPAR γ における化学物質の応答性解析、第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

22. 錦織充広、野瀬 健、下東康幸、核内受容体 ROR β のリガンド結合特性の解析および新規リガンド発見へのアプローチ、第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。

23. 野瀬 健、下東康幸: ドッキング計算を用いたエストロゲン受容体 α 型に対する化学物質結合性評価法におけるリガンド結合ポケット構造の重要性。第82回日本生化学

- 会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。
24. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α およびERR α 共発現による相乗的活性増強作用の解析. 第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。
25. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸: エストロゲン関連受容体 γ 型のリガンド結合選択性および自発活性化の構造要因. 第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009.10.21-24。
26. 下東美樹、久間祥子、山田隆弘、住吉美保、古賀啓太、下東康幸、中川裕之: 株化細胞BG2-c6による環境ホルモンの影響評価. 第31回日本比較生理生化学会大会、千里ライフサイエンスセンター、2009.10.23-24。
27. 赤岩裕也: マウス胎仔期における核内受容体の発現解析と核内受容体遺伝子発現機構に対する考察. 第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
28. 池田 伸、核内受容体・エストロゲン受容体 α 型およびエストロゲン関連受容体 α 型の活性増強作用の解析、第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
29. 永田祐介、ヒト核内受容体 Rev-erb における化学物質結合性評価法の開発を目的としたへム結合性の解析、第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
30. 錦織充広、競合結合試験を用いた核内受容体 ROR 結合性化学物質のスクリーニング、第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
31. 西垣内 誠、ヒト前立腺がん細胞において ERR γ を転写制御因子とする核内受容体の探索、第9回泉屋コロキウム、2009.8.17-18。
32. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸: マウス胎仔期における自発活性化型核内受容体の発現解析. 第46回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2009.7.11。
33. 永田祐介、野瀬 健、錦織充広、松島綾美、下東康幸: 第12 α -ヘリックス欠損ヒト核内受容体 Rev-erb におけるへム結合性の解析. 第46回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2009.7.11。
34. Shin Ikeda, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi: Synergistic transactivation of estrogen receptor α and estrogen-related receptor α . 第19回日韓ジョイントセミナー、釜山展示場、釜山、2009.5.29-30。
35. Mitsuhiro Nishigori, Takeru Nose, Satoshi Murata, Yusuke Nagata, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi: Screening of Endocrine Disruptor for Retinoid-related Orphan Receptor β (ROR β) by the Competitive Receptor Binding Assay. 第19回日韓ジョイントセミナー、釜山展示場、釜山、2009.5.29-30。
36. Hiroki Sakai, Xiaohui Liu, Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada and Yasuyuki Shimohigashi: Binding-affinity screening of 500 structurally diverse chemicals for human PPAR γ receptor. 第19回日韓ジョイントセミナー、釜山展示場、釜山、2009.5.29-30。
37. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸: マウス胎仔期における自発型核内受容体 mRNA の日齢期特異的発現、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
38. 池田 伸、松島綾美、下東康幸: エストロゲン平成21年度日本生化学会九州支部例会受容体 α 型 (ER α) とエストロゲン関連受容体 α 型 (ERR α) の転写活性制御機構の解析、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
39. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸: PPAR γ への化学物質の結合親和性、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
40. 野瀬 健、下東康幸: アゴニスト/アンタゴニストの差ドッキング計算による女性ホルモン受容体に対する化学物質結合性のスクリーニング、平成21年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009.5.15-16。
41. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康

幸：エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) 誘導体のリガンド結合選択性および自発活性化要因の解析、平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2009. 5. 15-16。

平成 20 年度 (2008 年度)

1. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールおよびアルキルフェノールはエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に選択的に結合する、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008.5.17-18。
2. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 曉輝、角田佳充、木村 誠、下東康幸、ビスフェノールA類似化合物のERR γ 結合要因解析、平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5.17-18。
3. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型との共役ヘテロダイマーの新規発現系構築と応答解析、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。
4. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ビスフェノールA結合におけるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の構造要因解析、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。
5. 錦織充広、野瀬 健、劉 曉輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体 (ROR) のコンホメーション変化認識抗体、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。
6. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型とのヘテロダイマーの新規発現系構築とその活性評価、第 45 回化学関連支部合同九州大会、2008. 7. 5。
7. 村田 聡史、野瀬 健、劉 曉輝、錦織 充広、徳永 隆俊、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 を介した分子間相互作用の解析、第 45 回化学関連支部合同大会、2008. 7. 5。
8. 岡田浩幸、ビスフェノールA誘導体の核

内受容体・エストロゲン受容体 α 型およびエストロゲン関連受容体 γ 型に対する結合親和性と選択性、第 8 回泉屋コロキウム、2008.8.4-5。

9. 池田 伸、核内受容体・エストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型とのヘテロダイマー構築、第 8 回泉屋コロキウム、2008.8.4-5。
10. Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, Xiaohui Liu, Takatoshi Tokunaga, Takamasa Teramoto, Yoshimitsu Kakuta, and Yasuyuki Shimohigashi. Structural flexibility of human nuclear receptor ERR γ to adopt endocrine disruptor bisphenol A and its derivatives. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.
11. Yukimasa Takeda, Xiaohui, Liu, Miho Sumiyoshi, Ayami Matsushima, Miki Shimohigashi, and Yasuyuki Shimohigashi. Diversity of bisphenol A-specific nuclear receptor ERR γ due to the alternative pre-mRNA splicings. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.
12. 下東康幸、胎盤・胎児脳に高発現の自発活性化型核内受容体ERR γ に対する環境ホルモン・ビスフェノールAの結合とリスク、第101回日本繁殖生物学会、2008. 9.19。
13. 松島綾美、岡田浩幸、劉 曉輝、徳永隆俊、寺本岳大、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型第ヘリックスペプチドのLeu側鎖の自由回転による適合誘導型リガンド結合、第 45 回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。
14. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA特異的核内受容体ERR γ ：リガンド結合ドメインにペプチドフラグメントを欠失した2種類の新規アイソフォームの構造機能解析、第 45 回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。
15. 松島綾美、岡田浩幸、劉 曉輝、徳永隆俊、寺本岳太、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型第 7ヘリックスペプチドのLeu側鎖の自由回転による適合誘導型

- リガンド結合、第45回ペプチド討論会、2008.10.29-31。
16. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、FLAGペプチド架橋によるエストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型の共役ヘテロダイマー構築、第45回ペプチド討論会、2008.10.29-31。
17. Ayami Matsushima, Endocrine disruptor bisphenol A as an inverse antagonist of estrogen-related receptor γ , The 4th International Workshop on Future Molecular Systems 2008, 2008.12.8.
18. 岡田浩幸、松島綾美、劉 曉輝、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型に選択的に結合するビスフェノールA誘導体、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
19. 松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 曉輝、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型と内分泌攪乱物質ビスフェノールAおよびその誘導体4- α -クミルフェノールの誘導適合による結合様式、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
20. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ERR γ のリガンド結合ドメイン一部欠損型アイソフォームの詳細なヒト組織分布と新規分子機構、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
21. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ビスフェノールAのエストロゲン関連受容体 γ 型への強い結合を支える受容体 Leu345 および Val313 残基、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
22. 下東美樹、堤 俊博、劉 曉輝、松島綾美、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、エストロゲン関連受容体に結合するビスフェノールA食餌によるショウジョウバエ *in vivo* 継代試験、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
23. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、核内受容体・エストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型の共役ヘテロダイマー構築、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
24. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、ドッキング計算を用いた探索法により見いだされた4-(1-アダマンチル)フェノールのエストロゲン受容体 α 型への高親和性結合、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。
25. 松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 曉輝、角田佳充、下東康幸、ビスフェノールAおよびその類似体とエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とのX線結晶構造解析による結合要因解析、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.13-14。
26. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ERR γ のリガンド結合ドメイン欠如型の組織分布と新規分子機構、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.13-14。
27. 下東美樹、府本 優、伊藤太一、劉 曉輝、松島綾美、谷村禎一、Ian A. Meinertzhagen、中川裕之、松本 顕、下東康幸、環境ホルモン・ビスフェノールA暴露によるショウジョウバエの行動リズム変異、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.13-14。
28. 岡田浩幸、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型に選択的に結合する環境ホルモン・ビスフェノールAF、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.13-14。
29. 野瀬 健、錦織充広、下東康幸、複数の鋳型構造を用いるドッキング計算による化学物質の核内受容体結合性解析、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.13-14。
30. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、核内受容体・エストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型の共役ヘテロダイマー構築、第31回日本分子生物学会年会・第81回

日本生化学会大会合同大会、2008.12.9-12。

31. Takeru Nose, A novel sophisticated screening method to estimate the nuclear receptor activities of endocrine disrupting chemicals, The 4th Pukyong University-Kyushu University Joint Symposium on Sciences, 2009.3.7。

H. 知的財産権の出願・登録状況

当該年度に該当の出願・登録の実績はなかった。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告

エストロゲン関連受容体 γ に対する 500 化学物質の受容体応答解析

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 教授

分担研究協力者 酒井大樹 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

協同研究担当者 岡田浩幸 九州大学大学院理学府学術振興会特別研究員

研究要旨

ビスフェノールA (BPA) は、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して内分泌かく乱作用を示すとされてきた。しかし、BPA が低用量で脳神経や行動等に重大な影響を及ぼすという報告が相次ぐなか、我々は「真の受容体は何か？」という率直な疑問に行き当たった。これは、BPA の ER への結合能がエストロゲン・ 17β -エストラジオール (E2) に比べると非常に弱いためであり、「低用量問題」として議論されている、内分泌かく乱作用の分子メカニズムが不明であるからであった。こうしたなか我々は、前年度までのセンシング抗体を用いる研究、受容体結合試験、レポーター遺伝子アッセイ等の研究において、BPA が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。平成 19 年度には、ERR γ と BPA 類似化合物を用いての構造活性相関解析を行い、フェノール環が ERR γ への結合に必須な構造であることを明らかとした。この結果、膨大な化合物が ERR γ に対する結合候補分子となり、火急に ERR γ について大規模な化学物質スクリーニングを行う必要性・切要性がある。

本研究においては、フェノール環を構造中に持ち、工業的にも多く使用されている化合物 (合計 545 物質) について、網羅的なスクリーニングを行った。また、ERR γ が ER α と同じくステロイドホルモングループに分類される核内受容体であることから、ステロイド構造を有する化合物についても優先的に試験を行った。まずは、化合物を構造ごとに 25 のカテゴリーに分類した。その後、ERR γ を組換えタンパク質として大量に発現・精製し、トリチウム標識した BPA ($[^3\text{H}]\text{BPA}$) による競合結合試験により、スクリーニングを行った。その結果、29 物質 (試験化合物の 5.3%) が ERR γ に結合することが判明した。また、化合物の構造によってリガンドとしての性質が異なる傾向が明らかとなり、特に、アルキルフェノール類は高い確率で ERR γ 結合分子となり、BPA アナログは ERR γ の強力な結合分子となる場合があることが判明した。その他にも、ビフェニルやアダマンタンの構造を有する化合物からも結合分子が同定され、こうした構造を有する化合物については、今後も試験化合物数を充実させる必要がある。

A. 研究目的

ビスフェノールA (BPA) は、1891年にロシアのDianinによって初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にはドイツのZinkeによる合成法の改良で、アセトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの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一方、代表的な内分泌かく乱物質としても知られている。BPAを原料としたプラスチ

ックには、高分子化されずに残留するBPA単量体が極微量ながら存在し、これを取り除くことが困難であり、その漏出が問題になっている。したがって、「この低用量のBPAが内分泌かく乱作用を示す」ことが事実であれば、その影響ははかり知れないほど重大である。一方で、BPAは、女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされてきたが、BPAのERへの結合能、活性は、正常なホルモンであるエストロゲンに比べると1/1,000

～1/10,000と非常に弱く、BPAは内分泌かく乱物質になり得ないとも議論されてきた。しかしながら、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BPAの低用量作用のメカニズムは不明であり、「低用量問題」として議論が続いている。こうしたなか、我々は、低用量問題の本質がERを介さない別の経路(別の受容体)にある可能性を考えて研究を展開し、「BPAは、ERではなく、エストロゲン関連受容体 γ 型(estrogen-related receptor γ ; ERR γ)に強く結合する」ことを発見した。さらに、平成19年度の本事業において実施した飽和結合試験では、BPAは $K_D = 5.5$ nM のきわめて高い親和性でERR γ に結合することが明らかとなり、構造活性相関解析の結果から、ERR γ への結合には1つのOH基を持つことが必要条件であることが明らかとなった。

ERに代表される核内受容体は、ステロイドやビタミン等の低分子量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。エストロゲン関連受容体(ER)は、ERと非常によく似たアミノ酸配列を持つことから発見され、ヒトではERR α 、ERR β 、そしてERR γ と、3つのサブタイプが存在する。これらERRは、ERの標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列(ERE)と結合し、逆に、ERもERRの応答配列(ERRE)を認識するため、互いに連関して機能していると考えられている。しかしながら、ERRの内在性リガンドや生理機能に関してはほとんど何も分かっておらず、ERRの生体内における正確な役割は未解明のままである。

我々の詳細な検討の結果、ERR γ はヒト成体の至る所に存在することが明らかとなった。一方、発生期に相応する母体、特に「胎盤」および「胎児の脳」において高レベルに発現することが確認された。この事実は、胎児、新生児、乳幼児に対するERR γ を介したBPAの影響を非常に強く懸念させる。また、妊娠ラットにBPAを投与すると仔ラットは行動障害になるとの報告があり、ERR γ が脳の成長・発達に関与し、BPAがこれに影響を与えている可能性が高い。もし、こうした脳神経系へのかく乱作用がERR γ を経由して起こるとすれば、ERR γ に対する化学物質の影響解明や、ERR γ に結合する化学物質の同定は火急に取り組む必要がある(図1)。

また、近年では、BPAを意識的に使用しない企業が増加し、BPA代替化合物が多く生産されるようになった。しかしながら、代表的なBPA代替化合物であるビスフェノールA F(BPAF)やビスフェノールE(BPE)などは、BPAときわめて類似した化学構造を有する化学物質であるが、その安全性(ERやERRへの結合性)は、調べられていない。平成19年度の我々の研究報告に示した通り、ERR γ への結合要因は少なくとも1つのOH基を持つことであり、BPA代替化合物をはじめとする一連の化学物質をERR γ についてスクリーニングすることは、リスク評価の観点からきわめて重要である。つまり、ER α への結合性が低いことから安全と唱われている化学物質群についても、ERR γ への結合性という観点から再度評価を行うべきである。

そこで、本研究では、基本構造ごとに26のカテゴリーに分類した合計530物質についてERR γ における結合試験によるスクリーニングを行った。結合試験に供する530物質のほとんどは市販品として購入可能なものであり、一般的な工業製品などに加工・使用されているものが中心である。また、受容体への結合に重要な役割を果たすフェノール環およびOH基を有する化学物質を優先的に選別した。さらに、ERR γ と同じく核内受容体のNR3グループに分類される2種のエストロゲン受容体(ER α およびER β)の生体内リガンドは、ステロイドであるため、ステロイド骨格を有する化合物についても優先的に試験する必要があると判断した。

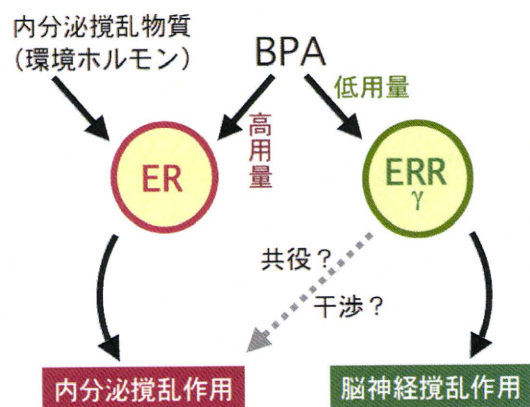


図1. ERとERR γ
ERとERRは相互に関連しており、BPAの内分泌かく乱作用はERR γ を経由して起こる可能性が高い。また、脳神経系への影響が危惧される。

B. 研究方法

(1) 試験化合物の溶液調製

各種の試験化合物は、 10^{-2} M となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。競合結合試験を行う際には、DMSO 溶液を水系の Binding buffer で 100 倍に希釈して使用した。すなわち、結合試験に供する場合、受容体結合試験の反応溶液中における DMSO の最終濃度は 0.1% 以下となるようにした。DMSO に溶解しない試験化合物については、加熱処理による溶解を試み、なお不溶性の化合物については、エタノールによる溶液調製を行った。また、0.1% 以下の DMSO およびエタノールが、競合結合試験に影響を与えないことを確認した。

(2) 受容体 ERR γ の調製

ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて ERR γ 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 (pGEX6P-1) に組み換え、エレクトロポレーション法により、大腸菌 (BL21) にトランスフェクトした。得られた大腸菌を 10 ml の LB 培地 (含アンピシリン) で 37°C 終夜培養し、新たな 1 l の 2 \times TY 培地 (含アンピシリン) に全量を添加した。その後、37°C で震盪培養を行い、対数増殖期 ($OD_{600} = 0.6$) において最終濃度 1 mM のイソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導を行った。これ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 ERR γ -LBD の発現が誘導される。28°C で 16 時間培養を行い、遠心分離により菌体を回収した。回収された菌体を PBS で洗浄後、sonication buffer に再懸濁し、リゾチーム処理およびソニケーション処理によって破細した。遠心分離により可溶性画分 (上清) を回収し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズと混合し、4°C で 1 時間ロータリーインキュベートした。GST-ERR γ -LBD が結合したビーズを PBST および PBS で洗浄後、20 mM の還元型グルタチオン溶液 (pH 8.0) により GST-ERR γ -LBD を回収した。得られた溶液は、Sephadex G-25 によるサイズ排除クロマトグラフィーによる脱塩を行い、30% グリセロール溶液として 50 μ l ずつ分注し、-80°C にて保存した。なお、タンパク質の可溶化剤として非イオン性の界面活性剤である Triton X-100 を使用した。

(3) 飽和結合試験

発現した ERR γ -LBD が機能性タンパク質として発現・精製されているかを確認するために飽和結合試験による品質チェックを行った。トレーサーにはトリチウムで放射標識した BPA ($[^3\text{H}]$ BPA) を使用した。 $[^3\text{H}]$ BPA を任意の濃度に調製し、96 穴プレートに 40 μ l ずつ分注した。

次に、 $[^3\text{H}]$ BPA の非特異的な結合数を算出するウェルには、最終濃度 10 μ M になるように、100 μ M の BPA (放射標識なし) を 10 μ l 添加した。一方、非特異的な結合数と特異的な結合数を合わせた全結合数を算出するウェルには、BPA が入っていない溶液を 10 μ l 添加した。その後、受容体タンパク質 (50 μ l) を添加した。その際、受容体タンパク質の必要量を検討するために、 10^{-1} 、 $10^{-1.5}$ 、 10^{-2} μ g の受容体タンパク質 ERR γ -LBD を使用して行った。

化合物と受容体の結合反応は、受容体の失活を防ぐため、4°C、2 時間で行った。その後、遊離の $[^3\text{H}]$ BPA を取り除くために、1% のデキストラン被膜活性炭 (DCC) 溶液を反応溶液に 100 μ l 添加し、氷上で 10 分インキュベートした。96 穴マルチスクリーンシステム (Millipore) によって吸引ろ過を行い、得られた反応溶液を液体シンチレーションカウンター (Beckman, LS6500) により測定した。

(4) 競合結合試験

BPA 類似体など、ERR γ -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、 $[^3\text{H}]$ BPA の受容体結合を阻害する能力で ERR γ への結合性を評価した。まず、最終濃度 3 nM の $[^3\text{H}]$ BPA を 40 μ l ずつ 96 穴プレートに分注し、 10^{-1} の希釈系列で段階希釈した試験化合物を 10 μ l ずつ添加した。プレートを十分に氷上で冷やした後、最終濃度 0.32 μ g/ml の受容体タンパク質を添加し、4°C で 2 時間反応させた。

その後、氷上で 1% DCC を 100 μ l 添加し、10 分インキュベートした。96 穴マルチスクリーンシステム (Millipore) によって吸引ろ過を行い、得られた溶液 100 μ l を液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer, TopCount NXT) により測定した。化学物質の結合性を示す IC_{50} 値 ($[^3\text{H}]$ BPA 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) ERR γ の発現・精製・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 ERR γ -LBD を発現した。飽和結合試験では、トレーサーとして [3 H]BPA を使用し、反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件については、平成 19 年度の報告と同条件で行った。その結果、前回の飽和結合試験の結果が再現され、今回の受容体発現においても機能的な受容体タンパク質が得られたことが確認された。なお、今回の一連の化学物質スクリーニングについては、すべて同一の受容体 (同じロット) を使用しており、アッセイ間でのデータのばらつきが生じないように留意した。

(2) 競合結合試験の結果

カテゴリー別に競合結合試験を順次行い、545 物質のすべてについて競合結合試験を実施した。競合結合試験の結果をもとに ALLFIT による IC₅₀ 値の算出を行い、IC₅₀ 値が 10⁻⁶ M 以下となる化合物を ERR γ への結合性を示す化合物として評価した。

カテゴリーごとの結合物質の数、結合した化合物の割合を表 1 に示す。この結果、545 物質のうち、ERR γ に結合する化合物は 29 物質であり、約 5% の化合物が ERR γ に結合性を示した。カテゴリー別では、アルキルフェノール、アダマンタン、BPA アナログに多くの ERR γ 結合物質が存在することが明らかとなり、一方、ステロイド骨格を持つ化合物群では、結合する化合物が見られなかった。ERR γ への結合には化学物質の骨格構造がきわめて重要であることが示唆された。

ERR γ に結合した化合物の結合親和性は、BPA の ERR γ への結合性を 100% として、相対的な結合性を表す RBA (Relative Binding Ability) を算出することで比較・評価した (表 2)。その結果、BPA よりも強く結合する化合物としてビスフェノール E (BPE) が同定されたが、これは平成 19 年度の本研究において既に同定されているものであり、今回のスクリーニングによって BPA よりも強力に ERR γ に結合する化合物は発見されなかった。一方、BPA の結合性の 1/2~1/50 程度の結合性 (RBA = 2~50%) で ERR γ に結合する化合物が新たに数多く同定された。BPA の ERR γ に対する K_D 値が 5.5 nM であることから、これらの化合物の K_D 値は、20~300 nM に相当すると考えられ、環境化学物

表 1. ERR γ に結合した化合物数

番号	カテゴリー	化合物数	結合物数	結合率 (%)
1	BPA アナログ	37	10	27
2	BPAF タイプ	11	1	9
3	Related Compound	25	2	8
4	ベンゾフェノン	25	0	0
5	ジフェニルメタン	27	1	4
6	ジフェニル 17-ケトステロイド	13	0	0
7	ステロイド(その他)	22	0	0
8	ステロイドグリコシド	5	0	0
9	ヒドロキシケトステロイド	60	0	0
10	ヒドロキシステリド	30	0	0
11	胆汁酸	19	0	0
12	フラボノイド	74	0	0
13	フタル酸エステル	16	0	0
14	アルキルフェノール	16	8	50
15	ビフェニル	14	2	14
16	アルカン	4	0	0
17	フェノールズ	18	3	17
18	安息香酸	13	0	0
19	アダマンタン	3	1	33
20	フルオレン	2	0	0
21	塩素化合物	20	1	5
22	その他の環境ホルモン	33	0	0
23	保護アミノ酸	3	0	0
24	有機フッ素化合物	18	0	0
25	有機スズ化合物	37	0	0
合計		545	29	5.3

質としてはきわめて高い結合親和性であり、生体への影響を十分に与える結合性であると考えられる。また、同定されたほとんどの化合物は、構造中に少なくとも 1 つの OH 基やフェノール環を持っており、こうした構造によって ERR γ への高い結合親和性が与えられると考えられる。しかしながら、こうした構造を持つ場合でもステロイド群などからは、ERR γ に対する結合分子は見られず化合物の全体の構造が重要であることが判明した。

表 2. ERR γ に結合した化合物一覧

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.

D. 考察

アルキルフェノール類を中心に多くの化合物が ERR γ に結合することが判明した。また、ERR γ に結合した化合物のうち、ほとんどが構造中にフェノール環が少なくとも 1 つ以上含まれていた。つまり、フェノール環は、ERR γ への結合に必要なリガンド側の構造要因であり、ERR γ がこれを特異的に受納する構造要因を持っていることになる。こうした結果は、平成 19 年度までに我々が行った構造活性相関解析による結果を強く裏付ける結果であり、化学物質の構造によって厳

密に ERR γ への結合が制御されていることが証明された。こうした結果は、計算化学による ERR γ 結合物質のスクリーニングが精度よく行うことが可能であること示唆するものであり、実際に本年度の研究(野瀬による分担研究の項参照)では、計算化学(*in silico*)での結合試験の有効性が証明された。

一方、ERR γ に結合するものの、構造中にフェノール環を持たない化合物として 2 種が同定されたが、いずれも BPA 骨格を持ち、フェノール環の OH 基が就職されただけの構造体であり、基本的な結合要因を保持していると考えられる(図 1)。

一連のスクリーニングの結果の中で、特筆すべき点は、BPE や BPA のように、きわめて高い結合親和性を示す化合物から、その 1/100 以下の低い結合親和性を示す化合物まで、ERR γ が様々な化学物質をリガンドとして許容することである。これは、環境ホルモンの標的受容体として考えられてきた ER α には見られない傾向であり、ERR γ 特有の性質であり、様々な物質によって ERR γ は、その機能が攪乱される危険性があることを示している。

最近では、BPA を使用しない機運が世界的に高まっており、BPA に修飾を施した BPA 代替化合物が多く開発されている。これら BPA 類似体は、BPA と同様に工業的に使用されており、我々の生活環境中に存在するものであり、ERR γ への結合が危惧される。本年度の研究で取り上げた 545 種の試験化合物の中には、こうした BPA 代替化合物も多く含まれており、特に、BPE、BPB、BPC、BPAP、BPF、BPP、BPAF など、ほとんどの BPA 誘導体(BPA 代替化合物や特殊ビスフェノールとして混合利用される化合物)が ERR γ に結合したこ

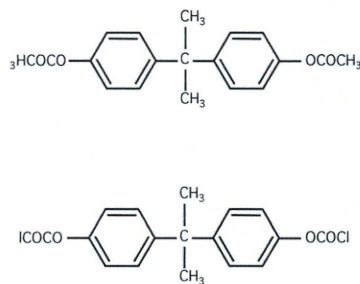


図 1. フェノール環を持たない結合分子
(上) Bisphenol A diacetate (下)
2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane

とは看過できない結果である。さらに、フェノール樹脂の原料、プラスチックの劣化を防ぐために添加される酸化防止剤、非イオン性の界面活性剤などに使用されて、塗料、プラスチック製品、洗剤といった形で我々の生活環境中に存在するアルキルフェノール群については、試験化合物の50%がERR γ への結合性を示すなど、その使用にはきわめて慎重を期す必要があると考えられる。

ERR γ に対する結合物質が多く同定される一方、ER α に結合性を示す17 β エストラジオールやエストロンに代表されるステロイド群に、ERR γ に結合する化合物は見られなかった。こうした結果から、ER α とERR γ は、異なる構造の化合物に親和性を示すことが明らかとなったことから、ER α に対する結合試験やレポーター遺伝子試験によって安全と判断されている化合物群についても、再度ERR γ への結合性を確認し、安全性を評価し直すことはきわめて重要である。ER α についての評価・スクリーニングだけでは不十分であり、ERR γ やその他の核内受容体についてもリスク評価を行うべきであり、大規模なスクリーニングを可能にする点において、本研究課題において構築されたセンシング抗体法は、きわめて重要なスクリーニング技術として位置づけられる。

E. 結論

化合物の基本構造に基づいて、25のカテゴリーに分類される545物質について、ERR γ との競合結合試験による網羅的なスクリーニングを行った。その結果、29物質がERR γ への結合性を示し、きわめて高い結合親和性を示す化合物から低親和性の化合物まで、幅広い領域でERR γ への結合分子が同定された。ERR γ への結合は、その化学物質の骨格構造と少なくとも1つのフェノール環を持つことが重要である。特に、アルキルフェノ

ール類は高い確率でERR γ の結合分子となり、BPAアナログは高い結合親和性を持つERR γ 結合分子となる可能性があることが判明した。アルキルフェノールやBPAアナログは、現在、工業的に多く使用されている化学物質であり、これらがERR γ を介して生体へどのような影響を与えるかについて、詳細なリスク評価が必要であり、まずは、ERR γ の機能解明がきわめて重要な課題である。

F. 研究発表 学会発表

- 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールおよびアルキルフェノールはエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に選択的に結合する、日本生化学会九州支部例会、2008. 5. 17-18。
- 岡田浩幸、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型に選択的に結合する環境ホルモン・ビスフェノールAF、日本内分泌攪乱化学物質学会第11回研究発表会、2008. 12. 13-14。
- 岡田浩幸、松島綾美、劉 暁輝、下東康幸、Bisphenol A Derivative that Binds Strongly and Selectively to Estrogen Receptor α 、第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 9-12。

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 PPAR γ に対する化学物質の受容体応答解析

分担協力研究者 酒井大樹 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

研究要旨

我々は内分泌かく乱物質・ビスフェノール A (BPA) が、インバースアンタゴニストとしてエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合することを発見し、化学物質のリスク評価には、48 種の核内受容体すべてを対象とし、共通のアッセイ系を用いた総合的な研究が緊要の課題であることを提言してきた。本研究課題では、核内受容体の中でも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 γ 型 (peroxisome proliferator-activated receptor 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 [3 H]rosiglitazone を用いた受容体結合試験系の構築を試みた。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、482 種の化学物質に対し PPAR γ への結合性解析を実施したところ、rosiglitazone より強力に結合する化学物質は同定されなかったが、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結合性が認められた。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、こうしたことが様々な化学物質との結合を可能にしているひとつの要因と考えられた。また、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、PPAR γ に比較的強く結合した化学物質の転写活性を解析したところ、大部分の化合物は弱いアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性を示したが、一部の化学物質はアゴニストの rosiglitazone と共処理することでさらに活性が増加し、ヘテロダイマーを構成する RXR との関係について詳解することが必要と考えられた。

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 は核内受容体のひとつである、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされてきたが、BPA の ER への結合能、活性はエストロゲンに比べると 1/1,000~1/10,000 と非常に弱い。一方、最近になって、BPA が規制値 (2.5~3.0 ppm) よりはるかに濃度が低い「低用量」で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このような低用量作用が実際に ER を介しているのか、「低用量問題」として議論になってきた。こうしたなか我々は、2006 年 (平成 17 年度) に「BPA は、ER ではなくエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に強く結合する」ことを発見し、報告した。このように、内分泌攪乱物質を含む化学物質のリスク研究は、従来お

こなわれてきた ER やアンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR) のみならず、核内受容体すべて (ヒトでは 48 種) を対象とし、共通のアッセイ系を用いて総合的に評価することが緊要の課題となってきた。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等を含む低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする転写制御因子である。ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) は、その名のとおり、細胞内のペルオキシゾームの増生を誘導する化学物質の受容体として発見され、ヒトでは PPAR α 、PPAR δ/β 、PPAR γ と 3 つのサブタイプが存在するリガンド活性化型核内受容体である。これら PPAR は、脂肪酸代謝を含むエネルギーホメオスタシス、脂肪細胞の分化等の生理機能に関与していることがわかっている。

特に PPAR γ は、脂肪組織、リンパ組織、大腸、肝臓、心臓などで発現しており、

インスリン感受性の亢進作用に関与していることから、糖尿病治療の重要な標的因子と考えられている他、免疫系への関与も指摘され、最も研究が行われている核内受容体のひとつである。PPAR γ は、内在性リガンドとして脂肪酸やそれらの代謝物、プロスタグランジンJ2などが報告されており、これらは $\sim\mu\text{M}$ のオーダーで受容体に応答する。合成リガンドとしては、チアゾリジン誘導体がPPAR γ と強力に結合してアゴニスト活性を示すことが報告されており、これら化学物質に関しては、構造活性相関研究も進展している。また、内分泌攪乱物質のひとつであり、船底塗料や漁網の防汚剤として過去に使用された有機スズ化合物がPPAR γ に強く結合し、転写活性の増加を誘導することが報告されている。さらに、X線結晶構造解析により、PPAR γ は他の核内受容体と比較して非常に大きなリガンド結合ポケットを持ち ($\approx 1500 \text{ \AA}^3$)、複数分子の化学物質が同時に結合することも示唆されている。こうしたことから、PPAR γ は多様な化学物質に応答することが考えられるが、そのような観点で応答する化学物質を網羅的に調査した研究はほとんど実施されていない。

現在、世界では10万種類以上の化学物質が流通し、日本においても毎年300種ともいわれる新規化学物質が市場に投入されていることから、ヒトに対する有害影響が社会的に懸念されている。こうした背景から、本研究ではPPAR γ の受容体結合試験およびレポーター遺伝子アッセイを用いて応答性化学物質を探索することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 対象化学物質の選定と調整

市販されている様々な構造の化学物質 (合計 482 種類) を購入した。化学物質は、それぞれ 10^{-2} M になるように DMSO あるいは滅菌水で溶解し、ガラスバイアルで保存した。なお、 10^{-2} M で難溶解性の化学物質に関しては、 10^{-3} M となるよう調整した。

(2) 発現プラスミドの調製

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

(3) 受容体 PPAR γ の調製

PPAR γ -LBD タンパク質の発現は、大腸菌 (BL21) を用いて行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製した。精製タンパク質は、SDS-PAGE および CBB 染色で純度を確認し、Bradford 法で濃度定量を行った。

(4) 飽和結合試験

発現・精製した GST 融合 PPAR γ -LBD タンパク質の機能性を確認するため、特異的リガンドである [^3H]rosiglitazone を用いて飽和結合試験を行った。一定量の PPAR γ -LBD タンパク質を 0 ~ 40 nM の [^3H]rosiglitazone と binding buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM DTT, 2 mg/ml γ -globulins) 中で混合したものを全結合、上記混合液中に未標識の rosiglitazone を過剰量添加したものを非特異的結合とした。これら混合液を 4 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベート後、デキストラン被膜活性炭 (dextran coated charcoal; DCC) により遊離の [^3H]rosiglitazone を除去し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。なお、「全結合」

から「非特異的結合」の数値を差し引くことにより「特異的結合」を算出した。また、Scatchard 解析を用いて、PPAR γ に対する $[^3\text{H}]$ rosiglitazone の K_D 、 B_{max} 値を求めた。

(5) 競合結合試験

482 種の化学物質における PPAR γ に対する結合能は、 $[^3\text{H}]$ rosiglitazone と受容体結合を阻害する能力で評価した。評価する一連の化学物質を $[^3\text{H}]$ rosiglitazone、PPAR γ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、4°C で一晩インキュベートした。遊離の $[^3\text{H}]$ rosiglitazone を DCC により除去し、TopCount NXTTM マイクロプレートシンチレーション・ルミネ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 IC_{50} 値 ($[^3\text{H}]$ rosiglitazone の受容体結合を 50% 阻害する値) は、GraphPad Prism ver. 5.0 により算出した。

(5) レポーター遺伝子アッセイ

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

C. 研究結果

(1) PPAR γ に対する飽和結合試験：発現・精製タンパク質の機能性評価

$[^3\text{H}]$ rosiglitazone を用いた飽和結合試験により、発現・精製した PPAR γ -LBD タンパク質の機能性を評価した。図 1 に示したように、 $[^3\text{H}]$ rosiglitazone 濃度依存的な放射活性の増加が確認され、Scatchard 解析により K_D 、 B_{max} 値はそれぞれ 16.2 ± 1.24 nM、 3.37 ± 0.40 nmol/mg protein と算出された。

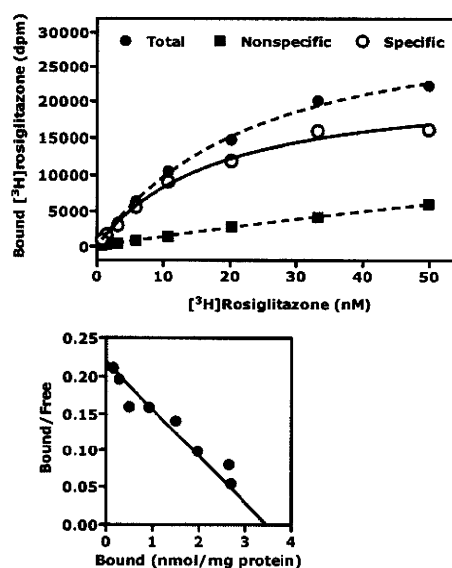


図 1. $[^3\text{H}]$ rosiglitazone をトレーサーとした PPAR γ の飽和結合試験

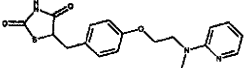
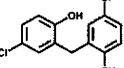
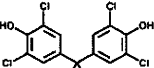
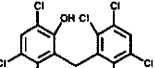
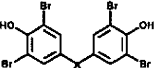
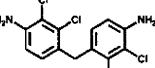
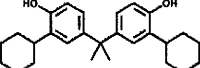
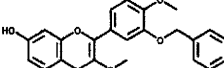
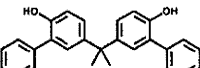
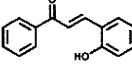
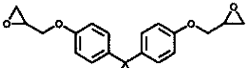
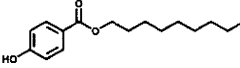
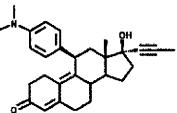
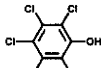
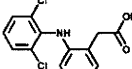
(2) PPAR γ に対する競合結合試験：結合性化学物質の探索

競争結合試験により、PPAR γ に結合する化学物質のスクリーニングを行った。供試した全 482 種の中で、68 種の化学物質が PPAR γ に結合することが判明した。しかしながら、本研究でスクリーニングした化学物質の中には、PPAR γ に対して rosiglitazone より強力に結合するものは見つからなかった。表 1 は、PPAR γ と結合した化学物質について、 IC_{50} 値が算出されたものを rosiglitazone に対する相対結合能 (%) としてまとめたものである。今回のスクリーニングにおいて、PPAR γ はビスフェノール A アナログ、ジフェニルメタン、アルキルフェノール、フラボノイド、内分泌攪乱物質等を含むいくつかの化学物質と比較的強く結合することが明らかになった。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

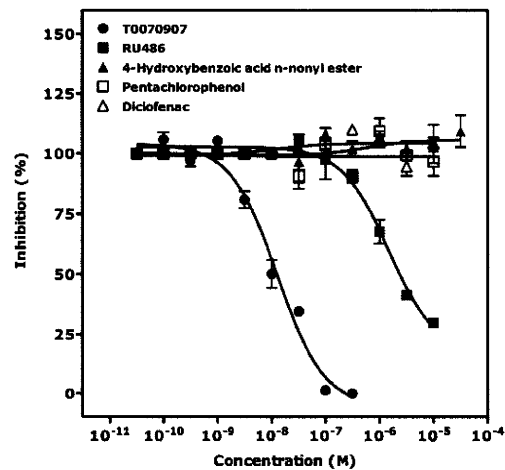
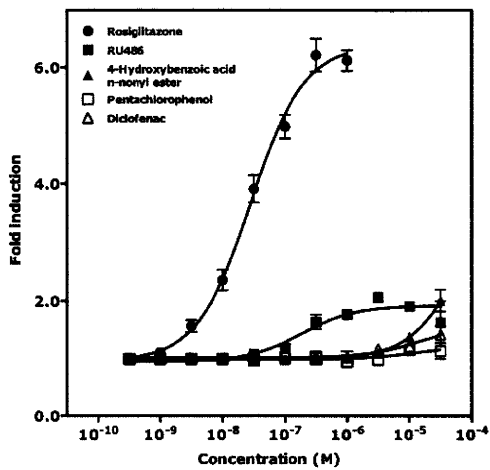
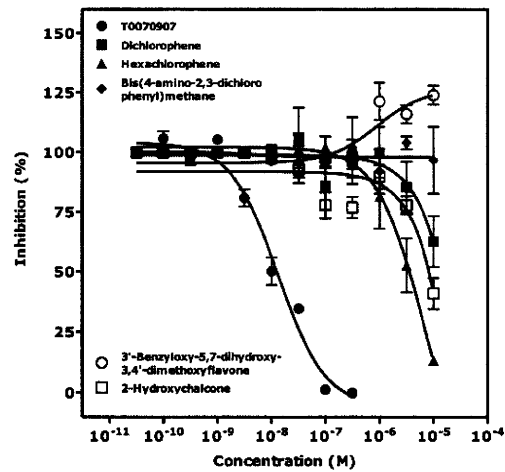
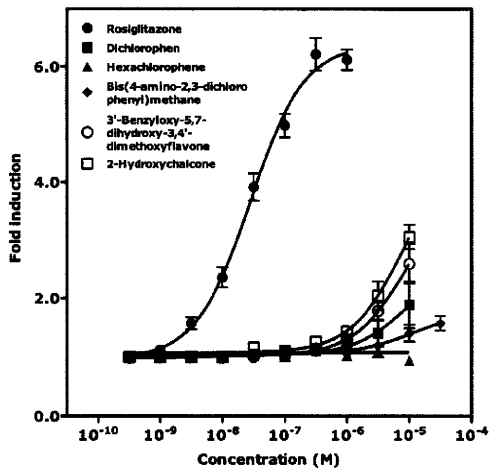
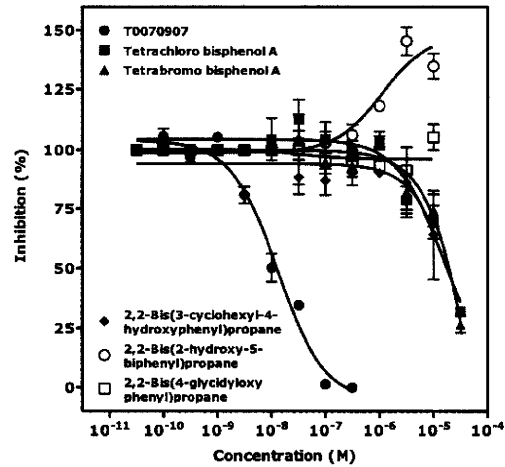
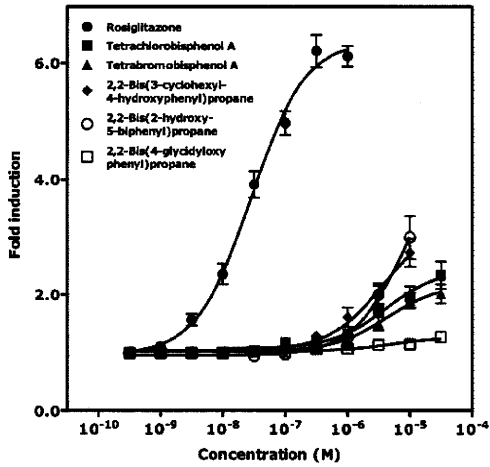


図2. PPAR γ のアゴニスト活性

図3. PPAR γ のアンタゴニスト活性

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

D. 考察

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

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

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

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

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

表 2. PPAR γ に対する化学物質の結合性と転写活性化能のまとめ

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

+: 弱い活性 ++; 比較的強い活性 +++; 強い活性

*; 活性の増加 -; 活性なし

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

に解析する必要があるだろう。

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

E. 研究発表

国際学会発表

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

国内学会発表

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

2. 酒井大樹, 劉 曉輝, 岡田浩幸, 松島綾美, 下東康幸. PPAR γ への化学物質の結合親和性. 平成 21 年度日本生化学会九州支部例会. 福岡市. 2009 年 5 月.

3. 酒井大樹、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸. 核内受容体 PPAR γ における化学物質の応答性解析. 第 82 回日本生化学会. 神戸市. 2009 年 10 月.

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

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

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告

核内受容体・構成的アンドロスタン受容体 CAR に対する化学物質の受容体応答解析

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 暁輝 九州大学大学院理学研究院 学術研究員
酒井大樹 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

研究要旨

我々は内分泌攪乱物質・ビスフェノール A (BPA) が、インバースアンタゴニストとしてエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合することを発見し、化学物質のリスク評価には、48種の核内受容体すべてを対象とし、共通のアッセイ系を用いた総合的な研究が緊要の課題であることを提言してきた。本研究課題では、核内受容体の中でも異物代謝や糖新生等に重要な役割を担うことがしられる、構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor; CAR) に着目し、ヒト CAR に対するアンタゴニストである抗真菌薬剤の $[^3\text{H}]$ clotrimazole を用いた受容体結合試験系の構築を試みた。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、ビスフェノール類、アルキルフェノール類など様々な構造を持つ約 500 種類化合物に対し CAR への結合性解析を実施したところ、内分泌攪乱物質として BPA や 4-nonylphenol をはじめ幾つかの化合物が clotrimazole と同等の強度で CAR に結合することが判明した。また、 $[^3\text{H}]$ BPA を用いた受容体飽和結合試験及び競合結合試験により、BPA の CAR に対する結合能は、ERR γ で得られているものと同等であり、CAR が BPA の新規受容体であることが明らかになった。また、結合に関わるビスフェノール化合物の構造要因を解析した結果、ビスフェノール A にある 2 つのメチル基とフェノール環が、強い結合の分子基盤になっていることが示唆された。さらに、様々な細胞を用いてレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、ビスフェノール化合物の CAR 転写活性を解析したところ、BPA は CAR に対しインバースアンタゴニスト活性を示した。こうした結果から、BPA の低用量効果については、ERR γ のみではなく CAR についてもその関与を解析する必要があると考えられた。

A. 研究目的

ポリカーボネート製品やエポキシ樹脂等を含む様々な生活用品に使用されているビスフェノール A (BPA) は、内分泌攪乱作用を有することから生体内影響が懸念されている。BPA は核内受容体のひとつである、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされてきたが、BPA の ER への結合能や活性化能は、エストロゲンに比べると 1/1,000 ~ 1/10,000 と非常に弱い。一方、最近になって、BPA が規制値 (2.5~3.0 ppm) よりはるかに濃度が低い「低用量」で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このような低用量作用が実際に ER を介しているのか、「低用量問題」として議論になってきた。こうしたなか我々は、2006年 (平成17年度) に「BPA

は、ERではなく、エストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に強く結合する」ことを発見し、報告した。このように、内分泌攪乱物質を含む化学物質のリスク研究は、従来おこなわれてきた ER やアンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR) のみならず、核内受容体すべて (ヒトでは48種) を対象とし、共通のアッセイ系を用いて総合的に評価することが緊要の課題となってきた。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等を含む低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする転写制御因子である。構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor; CAR) は、多様な構造の生体異物に応答し、シトクロムP450を含む異物代謝酵素などの発現誘導を制御する核内受容体として知られている。