

CARは肝臓で特に高発現しているが、腎臓や小腸、脳、生殖腺などの臓器・組織も僅かに発現が確認されている。また、リガンド非存在下でも非常に高い自発活性化能を持つことが報告されている。しかしながら、リガンド非存在時のCARは、heat shock protein 90やcytoplasmic CAR retention protein等と複合体を形成し、不活性化状態で細胞質内に存在する。リガンド存在下ではこの複合体が解かれ、CARはリガンドの相互作用後に脱リン酸化過程を経て核内に移行する。また、一部のCARリガンドは、CARに直接結合しないにも関わらず、核内移行を誘発することが報告されており、CARではリガンド結合と共に核内移行がそのシグナル伝達に重要な意味を持つとされている。

CARはステロイドホルモン受容体などに比べ生物種間でアミノ酸相同性が相対的に低いため、化学物質の応答において生物種差が大きいことが知られている。例えば抗真菌薬のclotrimazoleは、ヒトCARに対してアンタゴニスト活性を示すが、マウスに対してはアゴニストとして作用する。また、マウスCARのアゴニストであるTCPOBOPは、ヒトに応答しない。しかしながら、一般にCARは構造や機能が類似したプレグナンX受容体(PXR)と共に、生体異物受容体として位置づけられており、様々な化学物質に対する応答性が解析されている。これまでの研究で、phenobarbital、clotrimazole、DDT、PCB、フタル酸エステル、アルキルフェノールなどの化学物質が、CARリガンドとして報告されている。こうしたことから、CAR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。

こうした背景から、本研究ではCAR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、応答性化学物質を探査することを目的とし、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、フラボイド類、XEON外因性リガンドなど約500種類の化合物に着目をして解析を行った。

B. 研究方法

(1) 対象化学物質の選定と調整

市販されているビスフェノール類、アルキルフェノール類、フラボイド類、XEON 外因性リガンド化合物(約 500 種類)を購入し、それぞれ 10^{-2} M になるように DMSO で溶解後、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 CAR cDNA より、PCR を用いて CAR 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、CAR 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、ヒト *cytochrome P450 2B6 (CYP2B6)* 遺伝子上流プロモーター領域に存在する CAR 応答配列を 5 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 CAR の調製

CAR-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 CAR-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 [3 H]clotrimazole を用いて飽和結合試験を行った。一定量の CAR-LBD タンパク質を 0 ~ 40 nM の [3 H]clotrimazole と binding buffer (50 mM

Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、1 mM CHAPS、10 mM DTT、0.1 mg/ml BSA) 中で混合したものを全結合、上記混合液中に未標識の clotrimazole 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°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]clotrimazole 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、CAR に対する [³H]clotrimazole の K_D 、 B_{max} 値を求めた。 [³H]BPA を用いた飽和結合試験についても同様の方法を用いた。

(5) 競合結合試験

500 種の化合物の CAR に対する結合能は、 [³H]clotrimazole 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 [³H]clotrimazole、CAR-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 [³H]clotrimazole を DCC により除去し、TopCount NXT™ マイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンターで放射活性を測定した。対象化学物質の IC₅₀ 値 ([³H]clotrimazole 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。

(6) レポーター遺伝子アッセイ

CAR との結合性が明らかになったビスフェノール化合物の中で、構造が類似したものについて、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより CAR 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、CAR 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、CAR は自発活性型であるため、アンタゴニストの clotrimazole と対象化学物質を複合処理することによりインバースアンタゴニスト活性を評価した。

C. 研究結果

(1) CAR 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

[³H]clotrimazole を用いた飽和結合試験により、発現・精製した CAR-LBD タンパク質の機能性を評価した。図 1 に示したように、 [³H]clotrimazole 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 9.22 ± 1.52 nM、 12.0 ± 0.51 nmol/mg protein と算出された。

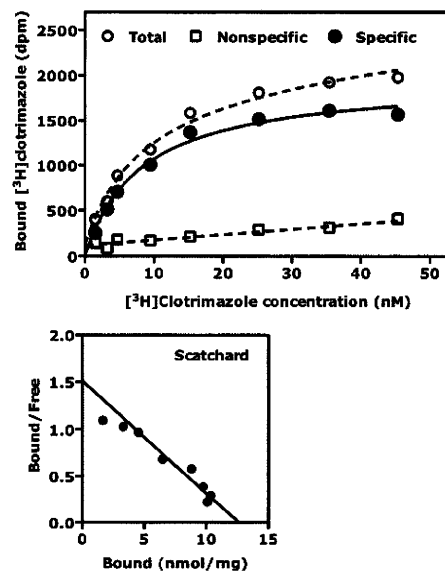
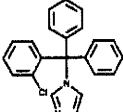
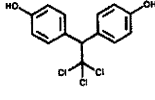
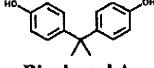
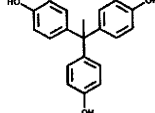
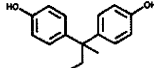
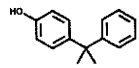
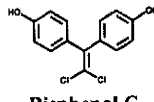
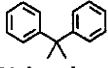
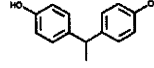
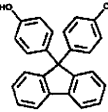
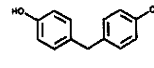
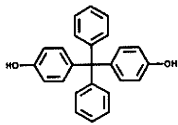
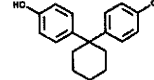
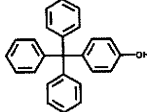
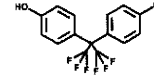
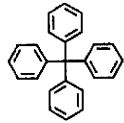
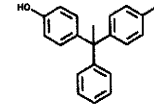


図 1. [³H]clotrimazole を用いた CAR 飽和結合試験

(2) CAR に対する競合結合試験：結合性化学物質の探索

競合結合試験により、CAR に結合する様々な構造を持つ化合物のスクリーニングを行った。供試した全 500 種の中で、64 種の化学物質が CAR に結合することが判明した。その中、ビスフェノール類化合物 130 種の中で、33 種の化学物質が CAR に結合することが判明した。その結果、BPA を含む多くのビスフェノール類化学物質、4-nonylphenol を含むアルキルフェノール類化学物質は、clotrimazole と同様、CAR に強く結合することが明らかになった。表 1 は、CAR と結合した主な

表1. CARと結合した化学物質の構造と clotrimazole 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 (%)
 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		

ビスフェノール類化学物質について、clotrimazole に対する相対結合能 (%) をまとめたものである。

(3) $[^3\text{H}]$ BPA を用いた飽和結合試験・競合結合試験

CAR が BPA に強く結合することが判

明

したため、 $[^3\text{H}]$ BPA を用いた飽和結合試験を行った。その結果、図 2 に示したように、 $[^3\text{H}]$ BPA 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 8.60 ± 0.66 nM、 9.91 ± 0.34 nmol/mg protein と算出され、CAR と

BPA が非常に強く結合することが確認された。

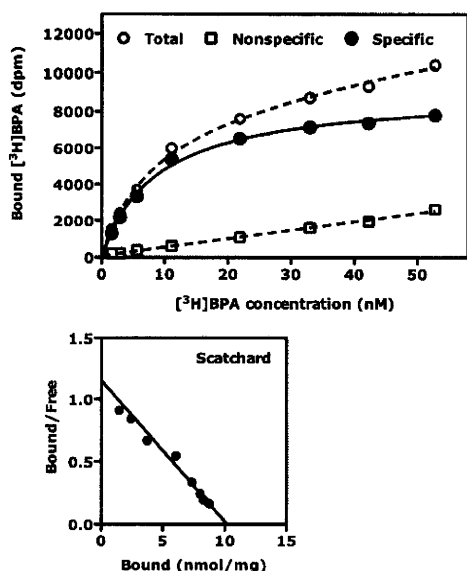


図 2. ^3H BPA を用いた CAR 飽和結合試験

(4) CAR 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系を構築し、まず CAR に強く結合することが判明したビスフェノール類化学物質のアゴニスト/アンタゴニスト活性を解析した。

CAR は自発活性化型の核内受容体であるが、CITCO がアゴニストとして作用することが報告されているため、まず対象化学物質を単独処理することにより、アゴニスト/アンタゴニスト活性を評価した。その結果、CAR 転写活性は CITCO により僅かに増加したが、BPA や BPAF ではほとんど変化しなかった (表 2)。次に、CAR アンタゴニストの clotrimazole と対象化学物質を複合処理したところ、clotrimazole により抑制された CAR 転写活性は CITCO、BPA、BPAF により増加した。また、他のビスフェノール類化合物についても同様の解析を行ったところ、単独処理で強いアゴニスト活性を示す化合物は見つからなかったが、幾つかのビスフェ

ノール類化学物質は、clotrimazole と同様に強いアンタゴニスト活性を示した。

表 2. CAR に対する化学物質の転写活性化能

化学物質名	アゴニスト	アンタゴニスト	インバースアンタゴニスト
Clotrimazole	-	++	-
CITCO	+	-	++
Bisphenol A	-	-	++
Bisphenol B	-	-	++
Bisphenol C	-	-	+
Bisphenol E	-	+	-
Bisphenol F	-	-	-
Bisphenol Z	-	-	++
Bisphenol AF	-	-	++
Bisphenol AP	-	+	+
HPTE	+	-	++
1,1,1-Tris(<i>p</i> -hydroxyphenyl)ethane	-	++	
4 α -Cumylphenol	+	-	+
2,2'-Diphenylpropane	-	-	+
9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorene	-	++	-
4,4'-Dihydroxy tetraphenylmethane	-	++	-
4-Hydroxy tetraphenylmethane	-	++	-
Tetraphenylmethane	-	-	-

+, 弱い活性 ++, 強い活性 -, 活性なし

D. 考察

^3H clotrimazole を用いた競合結合試験の結果、多様なビスフェノール類、アルキルフェノール類化学物質が CAR に強く結合することが判明した。また、 ^3H BPA を用いた飽和結合試験により、CAR と BPA の強い結合を確認することができた。さらに、CAR に対するビスフェノール類化合物の強い結合要因について、構造活性相関解析を実施した。まず、ビスフェノール A の 2 つのメチル基に着目した結果、

メチル基をひとつだけ持つBPEではCARへの結合能が弱くなり、メチル基がないBPFではCARに結合しなかった。従って、CARとの結合には、ビスフェノールAにある2つのメチル基が重要であることが示唆された。一方、メチル基のひとつがエチル基になったBPBではCARへの結合性が増加し、ベンゼン環が付加した化学物質ではBPAとほぼ同等の結合能を示した。このベンゼン環が付加した4,4'-dihydroxytetraphenylmethaneは、clotrimazoleと類似した構造であり、このことがCARに対し強い結合能を持つ要因と推察された。次に、BPAにおける2つのヒドロキシル基に着目した。その結果、ヒドロキシル基がひとつの4 α -cumylphenolでは、BPAに比べCARへの結合能が一桁低下し、ヒドロキシル基がひとつもない2,2'-diphenylpropaneは、CARに全く結合しなかった。また、4,4'-dihydroxytetraphenylmethaneについても同様に、ヒドロキシル基の付加数が減少することによりCARへの結合性が低下した。これらのことから、CARに対する化学物質の結合には、BPAにある2つのメチル基、2つのヒドロキシル基が重要であることが考えられた。

CARに強く結合することが判明したビスフェノール類化学物質について、レポーター遺伝子アッセイによりCAR転写活性化能を解析したところ、BPAはCARに対しインバースアンタゴニスト様の活性を持つことが判明した。このような結果は、ERR γ に対するBPAの応答性と類似している。CARは自発活性化型の核内受容体であり、フタル酸エステルや有機塩素化合物等でも本研究と同様にインバースアンタゴニスト活性を示し、標的遺伝子の発現を誘導することが報告されている。従って、BPAやBPAFもこれら化合物のようにCAR標的遺伝子の発現に影響を与えている可能性が考えられる。

本研究より、BPAをはじめとする様々なビスフェノール化合物がCARに強く結

合することが判明し、BPAの影響を評価するためには、ERR γ に加えCARについても詳細な解析を行う必要性が考えられた。CARは異物代謝に重要な役割を担う核内受容体であることから、BPA代謝におけるCARの関与についても、明らかにする必要があるだろう。

E. 研究発表

論文発表・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

ヒト・エストロゲン受容体 α 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 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

我々は、ビスフェノールA (BPA) が、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) ではなくエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合することを世界で初めて発見した。その後、この ERR γ と BPA 類似の多種の化合物の構造-活性相関解析研究を精力的に展開し、高機能性プラスチックの原料として、最近生産量がふえている「新世代ビスフェノール」も、ERR γ とかなり強く結合することを明らかにした。すなわち、多くの BPA 類似構造をもつ化合物が、ERR γ と結合すること、そして、なかでもビスフェノール E は、BPA より ERR γ に強く結合する唯一の化合物であることを世界に先駆けて報告した。(平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク評価事業)。これは、BPA のみではなく、BPA 類似化合物の化学物質リスク評価の重要性を端的に示すものである。そこで今回、女性ホルモン受容体であり、最も内分泌攪乱作用の標的となりうると考えられる代表的核内受容体の一つである、エストロゲン受容体 α 型 (estrogen receptor α ; ER α) について、BPA 類似化合物を含む約 500 化合物の結合スクリーニングを実施した。その結果、22 種もの BPA 類似化合物が、BPA より強い結合性を示した。BPA 自身は ER α に弱く結合し、IC₅₀は 1040 nM である。近年、生産および使用量が増大している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、驚くべき新発見である。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 の新規なアンタゴニストであると考えられた。そこで、さらに ER β に対する結合試験系を構築し、ER α に強く結合した BPA 類似化合物の結合試験を行った。その結果、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 α よりもむしろ ER β に強く結合するという興味深い事実が明らかになった。さらに、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 α のアゴニストであり、且つ ER β 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。これらの事実は、ビスフェノール類似化合物は、内分泌攪乱物質としてのリスクが大きいことを直接に示す極めて重要な成果である。

A. 研究目的

BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの工業原料として幅広く使用されており、身の回りに非常に多く存在する。しかし、その安全性について、現在未だ明確な回答が得られておらず、特に近年では胎児や幼児における脳・神経系への影響が危惧される非常

に注目されている化学物質である。我々は、2006年にBPAはエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合する事を発見し、報告した。BPAのERR γ に対する解離定数は5.50 nMであり、これは天然ホルモン並に強い結合である。このBPAの核内受容体に対する非常に強い結

合は、BPAおよびBPA類似化合物には、潜在的な化学物質リスクがあることを示唆すると考えられる。

BPAの規制に関する国際動向は、次の通りである。1990年代後半より、マウスなど実験動物で、ビスフェノールAの「低用量効果」が指摘された。「低用量効果」とは、BPAが規制値(2.5~3.0 ppm)よりはるかに低い量で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすことである。これを受け、2000年には米国厚生省所轄National Toxicology Program(NTP)がEndocrine Disruptors Low-Dose Peer Reviewを行った。この調査では、低用量効果は一部では認定され、一部では否定されたため、統合的には認定されなかった。しかし、その後もBPAの低用量効果を指摘する実験が相次ぎ、2008年4月にカナダ政府は、乳幼児への危険性があるという理由で、世界に先駆けてBPAの工業利用に強い規制を発動した。同年4月、米国厚生省所轄・国家毒性プログラム(NTP)も、乳幼児等の神経や行動等に影響を及ぼす懸念の見解草案を、さらに9月に最終報告を発表した。欧州では、2009年に欧州食品安全期間(EFSA)に神経発達影響についての新たな実験動物に関する評価が諮問され、2010年5月に完了を目指して評価中である。このように、BPAの化学物質リスクは非常に注目されている。

さらに、米国厚生省では、2008年のNTPの報告で指摘されたBPA類似化合物に対する内分泌攪乱物質としての懸念を受けて、BPAには及ばないが比較的プラスチック原料として多く使用されているビスフェノールAF(BPAF)を毒性試験の対象化合物として取り上げた。米国における、BPAFの1986年から2002年における生産量は、10,000~500,000ポンドであり、この量は'moderate production'に分類される。2008年9月の報告書によると、BPAFはポリマー原料として用いられており、フッ素含有高分子化合物(fluoroelastmer)として、食品加工・製造装置のホース等に用いられていることが報告されている。しかし、特定の用途や、ヒト暴露の可能性、世界生産量、さらには、環境放出量などについては、一切不明となっている。また、ラットにおける経口の半数致死量(LD50)は3,400mg/kgであり、これはBPAのLD50(3,250mg/kg)とほぼ同程度である。

ところで、BPA自身のER α 結合能は、IC₅₀で1040 nMであり、それほど強い結合物質ではない。また、全てのBPA類似化合物について、

ER α に対する直接の結合試験が行われているわけでもない。そこで今回、詳細な構造活性相関解析の実施、さらには新規なER α 結合化合物の探索を目的として、BPA類似化合物を含む約500化合物の結合スクリーニングを系統的に実施した。

B. 研究方法

(1) 受容体 ER α の調製

試験に用いる受容体は、大腸菌での発現タンパク質あるいは、市販品を購入して用いた。大腸菌で発現する場合には、まず、ヒト腎臓のcDNAより、PCRを用いてER α およびER β のLBD領域のクローニングを行った。得られたPCR産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌(BL21)を用いてER α -LBDおよびER β -LBDの大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド(IPTG)で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として発現し、GSTと特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いてアフィニティー精製後、Sephadex G-25によるサイズ排除クロマトグラフィーにて精製を行った。得られたER α -LBDおよびER β -LBDは-80°Cで保存し、実験に供出した。市販品は、それぞれインビトロジェン社より購入した。

(2) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cでゆっくりと受容体タンパク質を解凍して行った。ER α -LBDおよびER β -LBDと各濃度の放射標識された放射標識エストラジオール([³H]E2)をbinding buffer中で混合し、20°Cで2時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量のE2を[³H]E2と併に加えることにより調べた。その後、遊離の[³H]E2は0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で10分間インキュベートし、14,000rpmで10分遠心することにより取り除いた。

(3) 競争結合試験

BPA類化合物など、ER α -LBDおよびER β -LBDへの結合スクリーニングに供した化学物質については、[³H]E2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、評価すべき一連の化学物質を[³H]E2とERR γ と併にbinding buffer中で混合し、

インキュベートした。その後、遊離の ^3H E2は0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で10分間インキュベートし、96穴フィルタープレートで吸引ろ去することにより取り除いた。化学物質の IC_{50} 値(^3H E2の受容体結合を50%阻害する値)はプログラムALLFITにより算定した。

(4) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞であるHeLa細胞に、 $\text{ER}\alpha$ の発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、 $\text{ER}\alpha$ の活性を検出するために、ルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを導入した。24時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに24時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質による $\text{ER}\alpha$ の活性への影響を評価した。コントロールとなる化合物としては、アゴニストとしてE2、アンタゴニストとして4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)を用いた。

C. 研究結果

(1) $\text{ER}\alpha$ の飽和結合試験

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として大腸菌で $\text{ER}\alpha$ -LBDを発現した。結合試験では、 ^3H E2を用いて、反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F分離の条件を詳細に検討した。その結果、 ^3H E2の特異的結合を十分量与える条件の設定に成就した(図1)。

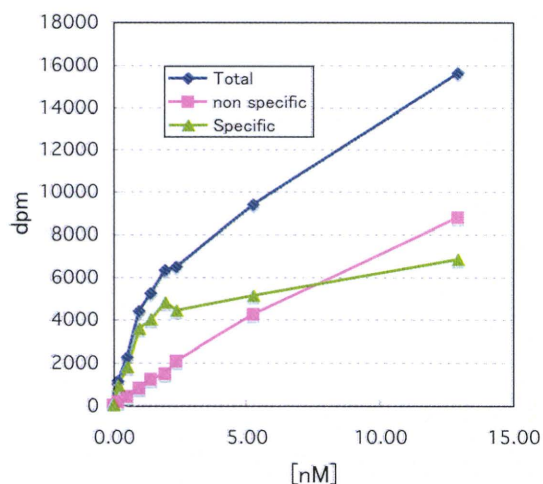


図1. ^3H E2を用いた $\text{ER}\alpha$ に対する飽和結合試験結果

スキッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は1.7 nMであり、 B_{max} は15.7 nmol/mgであった。この結果より、E2の $\text{ER}\alpha$ に対する結合能は、十分強く、発現した受容体が機能的であり実験に使用可能であることが確認された(図2)。

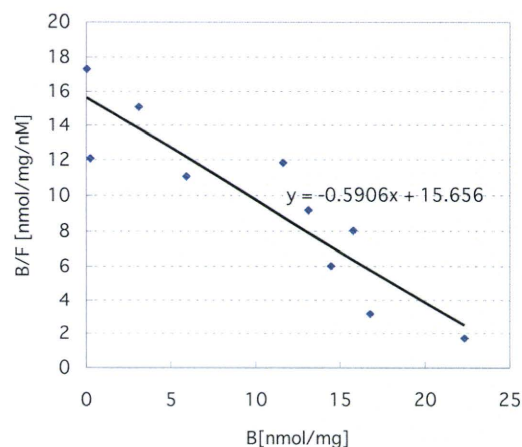


図2. ^3H E2を用いた $\text{ER}\alpha$ に対する飽和結合試験のスキッチャード解析

(2) $\text{ER}\alpha$ に対するBPA類似化合物の結合スクリーニング

BPA類似化合物を含む約500化合物について、 ^3H E2をトレーサーとして用いた競合結合試験を行った。その結果、22種ものBPA類似化合物が、BPAより強い結合性を示した。BPA自身は $\text{ER}\alpha$ に弱く結合し、 IC_{50} は1040 nMである。近年、生産および使用量が増大しているBPA類似化合物、すなわち「新世代ビスフェノール」が、 $\text{ER}\alpha$ にBPAよりも遥かに強く結合することは、驚くべき新発見であった。

(3) $\text{ER}\beta$ の飽和結合試験

上述の $\text{ER}\alpha$ に強く結合するBPA類似化合物のうち、特に結合が強い14種について、 $\text{ER}\beta$ に対する結合能を調べることにした。そこで、 $\text{ER}\alpha$ と同様に、 ^3H E2を用いて $\text{ER}\beta$ に対する飽和結合試験を行った。その結果、 $\text{ER}\alpha$ と同じ試験条件で、結合実験ができることが判明した。飽和結合試験の結果は、図3のとおりである。

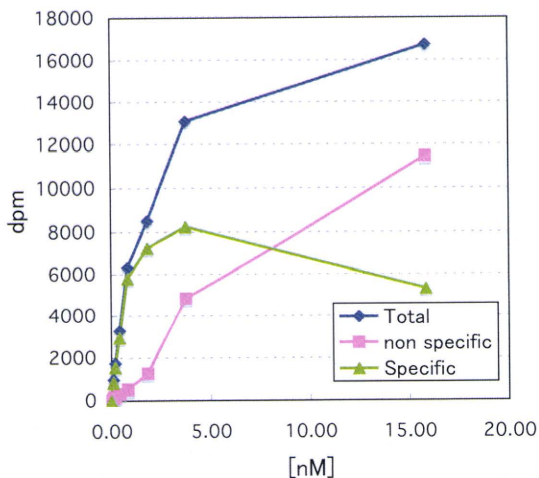


図 3. $[^3\text{H}]$ E2 を用いた ER β に対する飽和結合試験結果

スキャッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は 1.2 nM であり、 B_{max} は 233 nmol/mg であった。この結果より、E2 の ER β に対する結合能は、十分強く、ER α 発現した受容体が機能的であり実験に使用可能であることが確認された (図 4)。

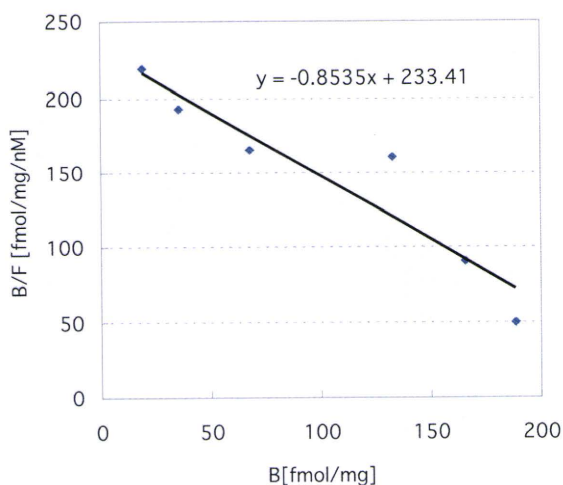


図 4. $[^3\text{H}]$ E2 を用いた ER β に対する飽和結合試験のスキャッチャード解析

(4) ER β に対する BPA 類似化合物の競合結合試験

ER α に特に強く結合する BPA 類似化合物 10 種について、 $[^3\text{H}]$ E2 を用いた ER β に対する競合結合試験を行った。その結果、米国厚生省により毒性試験の対象化合物として取り上げられた新世代ビスフェノールである BPAF が、ER α よりもむしろ ER β に強く結合するという興味深い事実が明らかになった (図 5&6)。

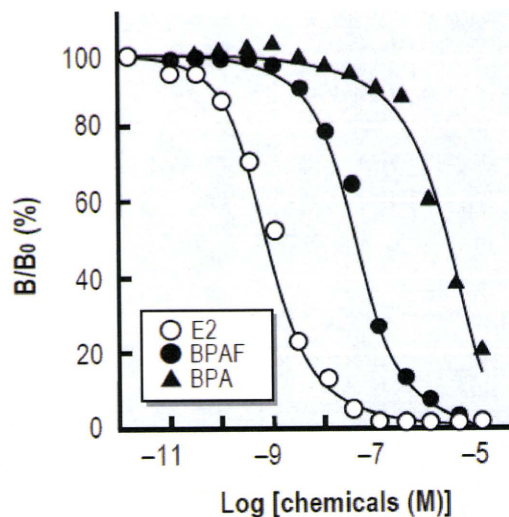


図 5. $[^3\text{H}]$ E2 を用いた ER α に対する結合試験

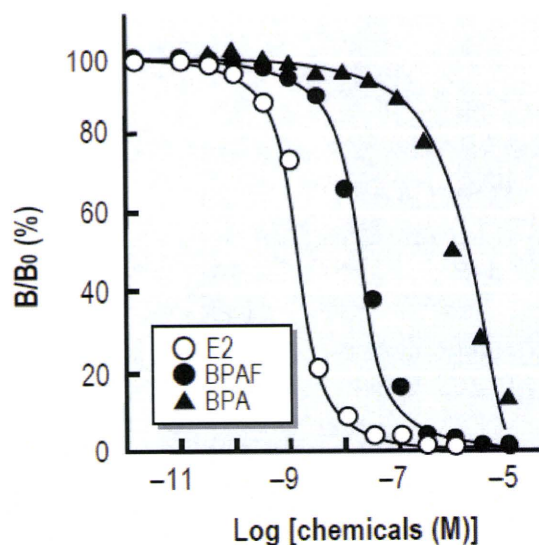


図 6. $[^3\text{H}]$ E2 を用いた ER β に対する結合試験

(5) レポーター遺伝子アッセイによる転写活性測定

BPAF は、BPA よりもはるかに ER α に強く結合し、しかも ER α よりむしろ ER β に強く結合することが判明した。そこで、BPAF の転写活性化能をレポーター遺伝子アッセイで試験した。その結果、BPAF は ER α に対しては、E2 や BPA と同様に ER α を転写活性化するアゴニストであった。しかし、ER β には、E2 や BPA は ER α と同様に転写活性化するアゴニストであるが、BPAF は ER β を活性化しないという興味深い結果が得られた (図 7&8)。

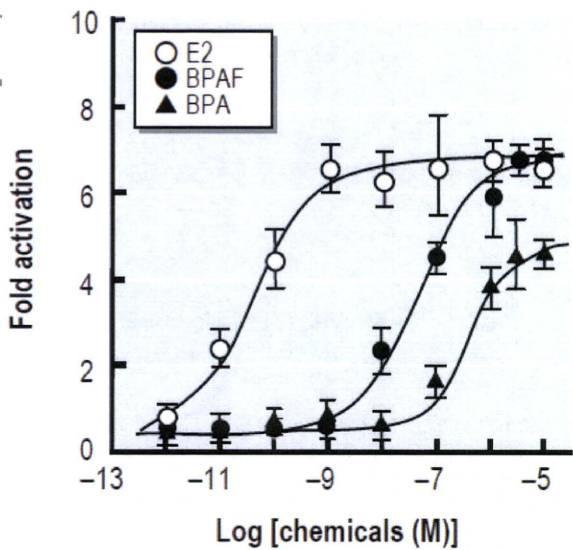


図 7. レポーター遺伝子アッセイによる ER α に対する転写活性可能試験

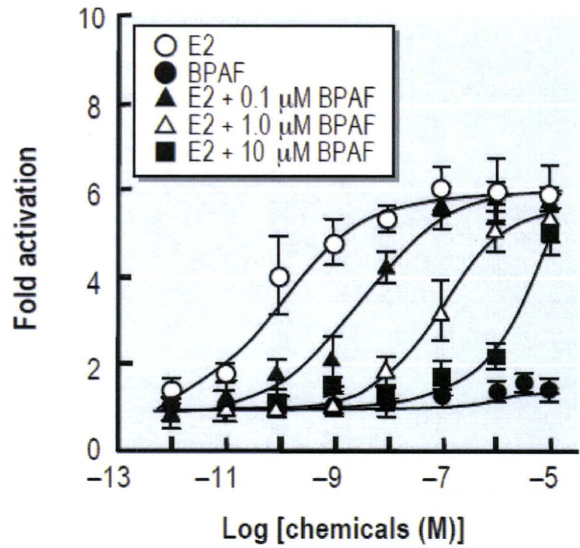


図 9. 一定濃度 BPAF 存在下における ER β に対する E2 の転写活性化能試験

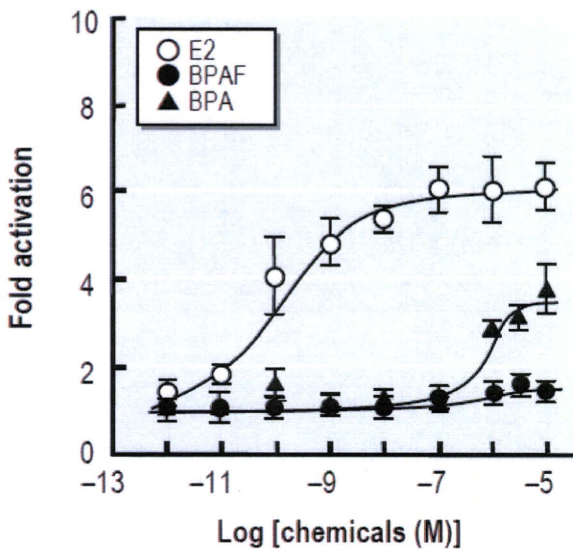


図 8. レポーター遺伝子アッセイによる ER β に対する転写活性化能試験

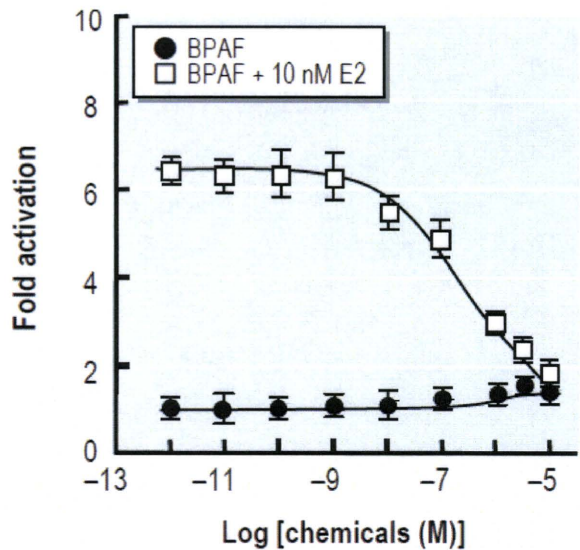


図 10. 10 nM の E2 存在下における ER β に対する BPAF の転写活性化能試験

そこで、アゴニストとして E2 を用いて、BPAF のアンタゴニスト活性を測定した。0.1、1、10 μ M の BPA の存在下では、E2 の濃度依存性曲線は高濃度側にシフトした (図 9)。また、10 nM E2 存在下では BPAF は濃度依存的に ER β の活性を抑制した (図 10)。こうして、BPAF は ER β のアンタゴニストであるという新事実が判明した。

D. 考察

BPAF は [3 H]E2 を用いた競合結合試験において、ER α に対して IC₅₀ 値で 53 nM、ER β に対して 19 nM の結合能を示すことが判明した。BPAF の ER α に対する結合能は、BPA の約 20 倍であり、BPAF の ER β に対する結合能は、それよりもさらに強い。ところで、BPA と BPAF の構造の違いは、CH₃ 基が CF₃ 基に置換されるだけである (図 11)。これより、フッ素 (F) が、受容体との強い相互作用を誘起しているに違いないと期待される。F は水素とほぼ同じファンデルワールス半径を持ちながら、電気陰性度や電子親和力が水素と大きく異な

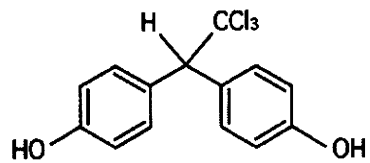
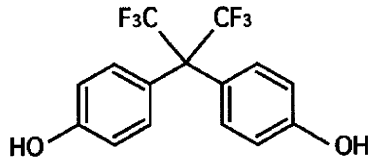
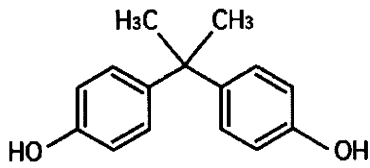


図 11. 上から順に BPA、BPAF、HPTE の構造

る。F のこうした物性が受容体との強い相互作用に大きく寄与していると考えられる。F をはじめとしたハロゲン原子に起因する相互作用は、「ハロゲン結合」として近年大きな注目を集めている。BPA 類似化合物のなかでも、こうしたハロゲン含有化合物には特に注意が必要である。

では、なぜ BPAF は ER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストとなるのか？ 文献調査により、同様の性質を示す化合物が存在することが明らかとなった。2,2-bis(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE) は、BPAF と同様に、ER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストである。両化合物を比較すると、CF $_3$ および CCl $_3$ にその要因がありそうである。共にハロゲン原子を含有しており、これらがハロゲン結合を形成することにより、ER α と ER β において、全く別の結合部位に強く結合し、ER β では転写活性化に必要なヘリックス 12 の位置取り阻害する可能性がある。あるいは、ヘリックス 12 の位置取りは ER α と同様であるが、このヘリックス 12 にコアクチベータが結合するのを阻害する可能性、すなわち、ヘリックス 12 の上にさらに結合する可能性もある。ヘリックス 12 とコアクチベータの相互作用には、ヘリックス 12 に存在するグルタミン酸 (E) が寄与することが知られているが、

その 3 アミノ酸残基後が ER α ではアスパラギン酸 (D)、ER β ではアスパラギン (N) である (図 12)。BPAF の F がアスパラギンのアミド基と相互作用して結合し、コアクチベータの受容体結合を阻害している可能性が考えられる。

ER α	KNVVPLYDLLLEMLD A HRL
ER β	KNVVPVYDLLLEML N AHVL

図 12. ヘリックス 12 付近のアミノ酸配列

E. 結論

ER α および ER β に強く結合する BPA 類似化合物として、BPAF を新規に見出した。これは BPA よりもはるかに強く結合し、特に ER α よりも ER β に強く結合した。しかも、BPAF は ER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストであることがレポーター遺伝子アッセイより確かに示された。この興味深い結果の構造要因の解明が、今後、必須であると考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

78. Bisphenol AF is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α , but a Highly Specific Antagonist for ER β . Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: *Environ. Health Perspect.* in press.

2. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: predominant expression of type-1 ERR γ isoform. Takeda, Y., Liu, X., Sumiyoshi, M., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: *J. Biochem.*, **146**, 113-122 (2009).

3. 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).

Matsushima, A., Okada, H., Liu, X., Tokunaga, T., Teramoto, T., Kakuta, Y., Shimohigashi, Y.: *Peptide Science* 2008, 521-522 (2009).

学会発表

1. 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、九州大学、2009. 5. 15-16。

2. 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。

3. 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。

4. 岡田浩幸、松島綾美、巢山慶太郎、劉 暁輝、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。

5. 武田行正、劉 暁輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸 1、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。

6. 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。

7. 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、平成 21 年(2009 年)12 月 7-8 日、東京大学山上会館、東京

8. 岡田浩幸、松島綾美、酒井大樹、劉 暁輝、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、東京大学山上会館、2009. 12. 7-8。

9. 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、東京大学山上会館、2009. 12. 7-8。

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

ヒト・エストロゲン受容体 β に対するビスフェノールA関連物質の
結合スクリーニングと活性測定

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

プラスチックの工業原料であるビスフェノールAは、これが示す低用量作用により、ヒト健康への悪影響の危惧が非常に高まっている。我々は、ビスフェノールA（BPA）が、エストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）ではなくエストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に非常に強く結合することを世界で初めて発見した。その後、このERR γ とBPA類似の多種の化合物の構造-活性相関解析研究を精力的に展開し、高機能性プラスチックの原料として、最近生産量がふえている「新世代ビスフェノール」も、ERR γ とかなり強く結合することを明らかにした。すなわち、多くのBPA類似構造をもつ化合物が、ERR γ と結合すること、そして、なかでもビスフェノールEは、BPAよりERR γ に強く結合する唯一の化合物であることを世界に先駆けて報告した。（平成20年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク評価事業）。これは、BPAのみではなく、BPA類似化合物の化学物質リスク評価の重要性を端的に示すものである。そこで昨年度は、女性ホルモン受容体であり、最も内分泌攪乱作用の標的となりうると考えられる代表的核内受容体の一つである、エストロゲン受容体 α 型（estrogen receptor α ; ER α ）について、BPA類似化合物を含む約500化合物の結合スクリーニングを実施した。しかし、女性ホルモン受容体には、 α 型のみではなく、 β 型も存在する。そこで、今年度は、エストロゲン受容体 β 型（estrogen receptor β ; ER β ）について、同様に結合スクリーニングを実施した。その結果、エストロゲン受容体 α 型に結合するBPA類似化合物は、 β 型にも結合するということが判明した。すなわち、BPAより強い結合性を示した。BPA自身はER α およびER β に弱くしか結合しない。近年、生産および使用量が増大している新世代ビスフェノールが、ER α のみならず、ER β にもBPAよりも遥かに強く結合することは、これらの安全性に関する試験が不可欠であることを示す。これらのうち、特に結合力の強い13種のBPA類似化合物について、レポーター遺伝子アッセイにより転写活性を評価したところ、驚くべきことに、これらのほとんどが、ER β の活性化を阻害する遮断薬、すなわちアンタゴニストであると考えられた。これは、BPA類似化合物のほとんどがER α に対する活性化薬、すなわちアゴニストであるのとは対照的である。これらの事実は、ビスフェノール類似化合物は、ビスフェノールAとはまた違ったメカニズムで、ヒト健康への悪影響を及ぼすリスクが大きいことを直接に示す極めて重要な成果である。

A. 研究目的

2011年1月には、カナダに引き続き、EUでもホ乳瓶にBPAの使用を禁じるなど、世界的にBPAの悪影響に対するが高まっている。BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチッ

クの工業原料として幅広く使用されており、身の回りに非常に多く存在する。しかし、その安全性について、現在未だ明確な回答が得られておらず、特に近年では胎児や幼児における脳・神経系への影響が危惧される非常に

注目されている化学物質である。我々は、2006年にBPAはエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合する事を発見し、報告した。BPAのERR γ に対する解離定数は5.50 nMであり、これは天然ホルモン並に強い結合である。このBPAの核内受容体に対する非常に強い結合は、BPAおよびBPA類似化合物には、潜在的な化学物質リスクがあることを示唆すると考えられる。

BPAの規制に関する国際動向は、次の通りである。1990年代後半より、マウスなど実験動物で、ビスフェノールAの「低用量効果」が指摘された。「低用量効果」とは、BPAが規制値 (2.5~3.0 ppm) よりはるかに低い量で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすことである。これを受け、2000年には米国厚生省所轄National Toxicology Program (NTP) が Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review を行った。この調査では、低用量効果は一部では認定され、一部では否定されたため、統合的には認定されなかった。しかし、その後もBPAの低用量効果を指摘する実験が相次ぎ、2008年4月にカナダ政府は、乳幼児への危険性があるという理由で、世界に先駆けてBPAの工業利用に強い規制を発動した。同年4月、米国厚生省所轄・国家毒性プログラム (NTP) も、乳幼児等の神経や行動等に影響を及ぼす懸念の見解草案を、さらに9月に最終報告を発表した。欧州では、2009年に欧州食品安全期間 (EFSA) に神経発達影響についての新たな実験動物に関する評価が諮問され、2010年5月に完了を目指して評価中である。このように、BPAの化学物質リスクは非常に注目されている。

さらに、米国厚生省では、2008年のNTPの報告で指摘されたBPA類似化合物に対する内分泌攪乱物質としての懸念を受けて、BPAには及ばないが比較的プラスチック原料として多く使用されているビスフェノールAF (BPAF) を毒性試験の対象化合物として取り上げた。米国における、BPAFの1986年から2002年における生産量は、10,000~500,000ポンドであり、この量は 'moderate production' に分類される。2008年9月の報告書によると、BPAFはポリマー原料として用いられており、フッ素含有高分子化合物 (fluoroelastmer) として、食品加工・製造装置のホース等に用いられていることが報告されている。しかし、特定の用途や、ヒト

暴露の可能性、世界生産量、さらには、環境放出量などについては、一切不明となっている。また、ラットにおける経口の半数致死量 (LD50) は3,400mg/kgであり、これはBPAのLD50 (3,250mg/kg) とほぼ同程度である。

ところで、BPA自身のER α 結合能は、IC₅₀で1040 nMであり、それほど強い結合物質ではない。我々は、第二年度で平成21年度に、新規なER α 結合化合物の探索を目的として、BPA類似化合物を含む約500化合物の結合スクリーニングを系統的に実施した。そこで、本年度は、ER β においても同様に試験し、新世代ビスフェノールの女性ホルモンの受容体・エストロゲン受容体に対する結合性および活性を総合的に解析した。

B. 研究方法

(1) 受容体 ER β の調製

試験に用いる受容体は、大腸菌での発現タンパク質あるいは、市販品を購入して用いた。大腸菌で発現する場合には、まず、ヒト腎臓のcDNAより、PCRを用いてER β のLBD領域のクローニングを行った。得られたPCR産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いてER β -LBDの大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、GSTと特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いてアフィニティー精製後、Sephadex G-25によるサイズ排除クロマトグラフィーにて精製を行った。得られたER β -LBDは-80°Cで保存し、実験に供出した。市販品は、それぞれインビトロジェン社より購入した。

(2) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cでゆっくりと受容体タンパク質を解凍して行った。ER β -LBDと各濃度の放射標識された放射標識エストラジオール ([³H]E2) を binding buffer 中で混合し、20°Cで2時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量のE2を[³H]E2と併に加えることにより調べた。その後、遊離の[³H]E2は0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で10分間インキュベートし、14,000rpmで10分遠心することにより取り除いた。

(3) 競争結合試験

BPA 類化合物など、ER β -LBD への結合スクリーニングに供した化学物質については、 ^3H E2 の受容体結合を阻害する能力で ER β への結合性を評価した。まず、評価すべき一連の化学物質を ^3H E2 と ERR γ と共に binding buffer 中で混合し、インキュベートした。その後、遊離の ^3H E2 は 0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で 10 分間インキュベートし、96 穴フィルタープレートで吸引ろ去することにより取り除いた。化学物質の IC₅₀ 値 (^3H E2 の受容体結合を 50%阻害する値) はプログラム ALLFIT により算定した。

(4) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞である HeLa 細胞に、ER β の発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、ER β の活性を検出するために、ルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを導入した。24 時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに 24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質による ER β の活性への影響を評価した。コントロールとなる化合物としては、アゴニストとして E2、アンタゴニストとして 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を用いた。

C. 研究結果

(1) ER β の飽和結合試験

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として大腸菌で ER α -LBD を発現した。結合試験では、 ^3H E2 を用いて、反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件を詳細に検討した。その結果、 ^3H E2 の特異的結合を十分量与える条件の設定に成就した。しかし、ER β の発現量は低かった。そこで、大腸菌ではなく、昆虫細胞培養系で生合成された市販品も用いて実験を行うことにした。

¥

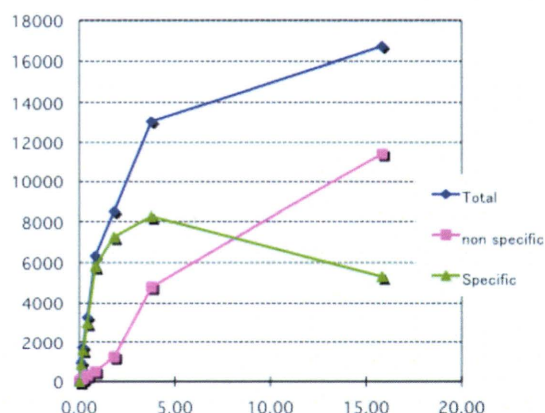


図 1. ^3H E2 を用いた ER β に対する飽和結合試験結果

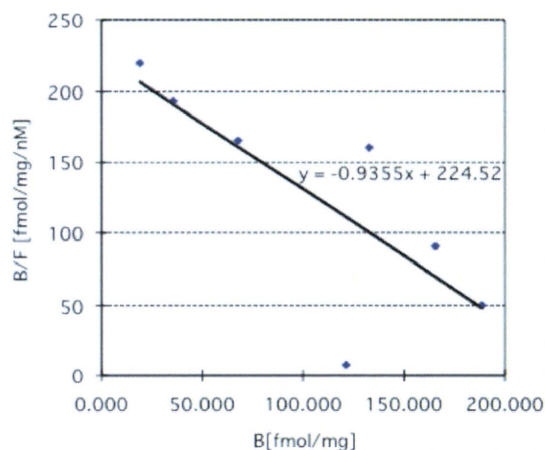


図 2. ^3H E2 を用いた ER α に対する飽和結合試験のスカッチャード解析

スカッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は 1.17 nM であり、 B_{max} は 233 nmol/mg であった。この結果より、E2 の ER α に対する結合能は、十分強く、発現した受容体が機能的であり実験に使用可能であることが確認された (図 2)。

(2) ER β に対する BPA 類似化合物の結合スクリーニング

BPA 類似化合物を含む約 500 化合物について、 ^3H E2 をトレーサーとして用いた競争結合試験を行った。その結果、ER α の場合と同様に、多くの新世代ビスフェノールが、BPA より強い結合性を示した。BPA 自身は ER α に弱く結合し、IC₅₀ は 1040 nM である。近年、生産および使用量が増大している BPA 類似

化合物、すなわち「新世代ビスフェノール」が、ER α 同様に、ER β にBPAよりも遥かに強く結合することは、驚くべき新発見であった。しかし、前年度であるH21年度に見出した、ER α に強く結合するものと共通であり、新たな化合物は見付からなかった。スクリーニングにより、ビスフェノールAFと同程度強く結合するものは、13種であった(図3)。

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

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

(3) レポーター遺伝子アッセイによる転写活性測定

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

D. 考察

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

E. 結論

ER β に強く結合する新世代ビスフェノールを新規に見出した。これらはBPAよりもはるかに強く結合する。しかも、これらはER α のアゴニストで、且つ、ER β のアンタゴニストであることがレポーター遺伝子アッセイより確かに示された。これらのヒト健康への詳細解析が、必須であると考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報は無い。

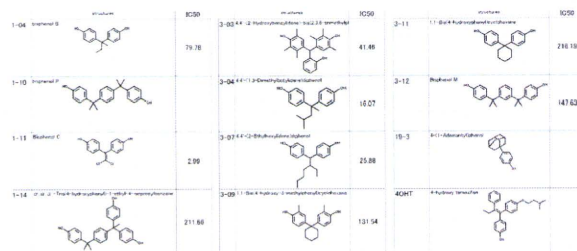


図4. 新世代ビスフェノール

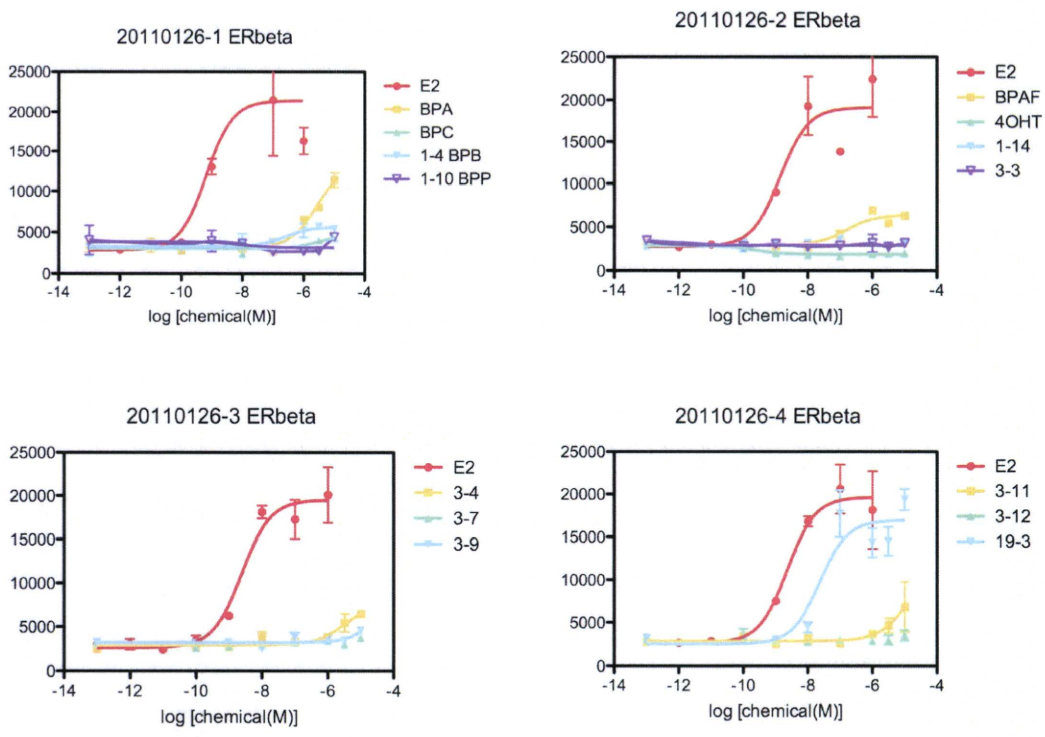


図5. 新世代ビスフェノールの ERβ 活性化試験

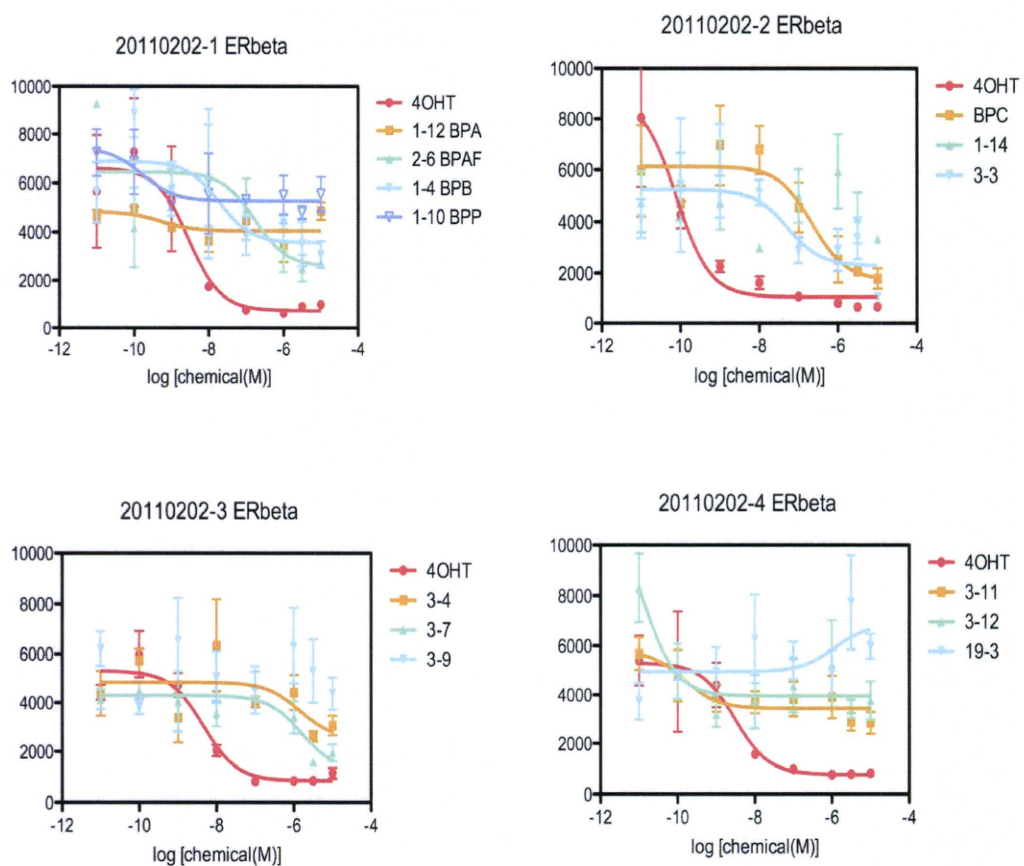


図6. 新世代ビスフェノールの ERβ アンタゴニスト活性試験

G. 研究発表

論文発表

1. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. S., Arase, K., Ishii, K., Igarashi, K., Aisaki, Y., Yoshio, A., Matsushima, Y., Shimohigashi, K., Arima, J., Kanno, Y., Sugimura: *Bio. Reprod.*, **84**, 734-742 (2011).
2. Functional role of the C-terminal Helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor γ (ERR γ). X., Liu, A., Matsushima, H., Okada, and Y., Shimohigashi: *Peptide Science 2009*, 435-436 (2010).
3. Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR γ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. X., Liu, A., Matsushima, H., Okada, and Y., Shimohigashi: *J. Biochem.*, **148**, 247-254 (2010).

学会発表

1. 松島綾美、劉 暁輝、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールAFのエストロゲン受容体 α と β に対する結合特性、平成22年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2010.5.22-23.
2. 劉 暁輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールAFのエストロゲン受容体(ER)応答における分子機構解析、平成22年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2010.5.22-23.
3. 松島綾美、Kerrienne Ryan、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、ビスフェノールA：赤ちゃんの脳に害をなす化学物質、福岡女子大学かすみ祭実行委員会・人間環境学部環境理学科・女性生涯学習研究センター共催特別講演会、福岡女子大学、2010.7.17-19.
4. 松島綾美、劉 暁輝、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ハロゲン化ビスフェノールのエストロゲン受容体 α および β 型の結合親

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

5. 劉 暁輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、変異エストロゲン受容体 α 型および β 型を用いたビスフェノールAFが示す β 型特異的アンタゴニスト活性の構造要因解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9.
 6. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α におけるビスフェノールAの活性増強メカニズム、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、神戸ポートアイランド、2010.12.7-9.
 7. 下東康幸、劉 暁輝、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、ER α アゴニストおよびER β アンタゴニストとして働く化学物質の構造要因、環境ホルモン学会 第13回研究発表会、東京大学山上会館、2010.12.16-17.
 8. 松島綾美・Kerrienne Ryan・Ian A. Meinertzhagen・下東康幸、カタユウレイボヤのビスフェノールA暴露による孵化率低下と遊泳行動異常、環境ホルモン学会 第13回研究発表会、東京大学山上会館、2010.12.16-17.
 9. 劉 暁輝、松島綾美、岡田浩幸、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールAFが特異的アンタゴニストとなるエストロゲン受容体 β の構造要因解析、環境ホルモン学会 第13回研究発表会、東京大学山上会館、2010.12.16-17.
 10. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールA/ER α のERRを介した活性増強メカニズム、環境ホルモン学会 第13回研究発表会、東京大学山上会館、2010.12.16-17.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ、特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

核内受容体 RAR α 、 β 、 γ 型に対する化学物質の受容体応答解析

研究分担者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院 教授
研究実施者 劉 曉輝 九州大学大学院理学研究院 学術研究員

研究要旨

内分泌攪乱物質としてビスフェノールA（BPA）の生体内悪影響が懸念されている。我々は最近、BPA がインバースアンタゴニストとしてエストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に非常に強く結合することを発見した。現在では、ヒト核内受容体 48 種類すべてに内分泌攪乱化学物質問題が存在すると考えられる。本研究では、脊椎動物の胚の器官形成、組織のホメオスタシス、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関わる遺伝子の発現を制御している核内受容体であるレチノイン酸受容体（Retinoic acid receptors ; RARs）に着目し、特異的リガンドであるの³H]all-trans retinoic acid (³H]ATRA) を用いた受容体結合試験系の構築を試みた。 α 、 β 、 γ のいずれのサブタイプについても、飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。この試験系において、ATRA および 9-cis retinoic acid (9cRA) は RARs 受容体に強く結合することが分かった。そして、ビスフェノールAアナログ、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、合成エストロゲン、脂肪酸類および精巣毒性関連物質など約 200 種化学物質に対し RAR α 、 β 、 γ への結合応答解析を実施したが、今回実験した化学物質はいずれも RARs 受容体と結合しないことが分かった。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質としてノニルフェノール（NP）やビスフェノールA（BPA）の生体内影響が懸念されている。BPAは女性ホルモン作用を示し、その作用は女性ホルモン受容体であるエストロゲン受容体（estrogen receptor ; ER）を介するとされてきた。しかし、BPAのERへの結合能、活性は天然ホルモンであるエストロゲン（E2）に比べると1/1,000～1/10,000と非常に弱く、このER説には疑問が呈されていた。一方、最近になって、BPAが規制値（2.5～3.0 ppm）よりはるかに濃度が低い「低用量」で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このような「低用量問題」についても、低用量作用が実際にERを介しているのか、議論に

なっていた。こうしたなか我々は最近、BPAがERではなくて、エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）と非常に強く結合することを発見した。

これまで、「内分泌攪乱物質」問題は、女性ホルモン受容体（estrogen receptor ; ER）、男性ホルモン受容体（androgen receptor ; AR）、甲状腺ホルモン受容体（thyroid receptor ; TR）の3種類の核内受容体に限って調べられている。ヒト・ゲノム解読が完了した現在では、ヒト核内受容体には合計 48 種類を存在し、これらすべてに内分泌攪乱物質の問題が存在すると考えられる。我々は、化学物質のリスクを正確に評価するためには、「可能な限り多くの、あるいは全ての核内受容体について影響を解析すべき」と考えられた。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等を含む低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする転写制御因子である。レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor ; RARs) は、レチノイドX受容体 (RXRs) と共にレチノイン酸シグナル伝達に関与する核内受容体であり、3種類のサブタイプ α 、 β 、 γ が知られている。all-*trans* retinoic acid (ATRA) や9-*cis* retinoic acid (9cRA) はRARs共通の内在性リガンドとして報告されており、その結合性はきわめて高いとされている。RARsはステロイドホルモン受容体などと共通構造を持ち、核内受容体のグループIに属する。ビタミンA、レチノイン酸と結合すると遺伝子プロモーター領域の結合配列エレメントに結合し、遺伝子の発現調節を行い、脊椎動物の胚の器官形成、組織のホメオスタシス、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関わる遺伝子の発現を制御している。また、RARsは、リガンドが結合していない状態でRXRsとヘテロダイマーを形成し、エレメントに結合した状態で存在すると考えられている。RAR α 、 γ のノックアウトマウスは成長障害や骨形成異常が見られるが、急性前骨髄性白血病との関連も報告されている。

RARsは、内在性リガンドとしてall-*trans* retinoic acid (ATRA) や9-*cis* retinoic acid (9cRA) および13-*cis* retinoic acid (13cRA) が報告されており、これらはRAR α 、 β 、 γ とも高い結合親和性で受容体に結合する。合成リガンドとしては、TTNPB、BMS204493、AGN193103などが α 、 β 、 γ 型に共通なりガンドとして報告されている。TTNPBはRARs共通的なアゴニストであり、BMS204493およびAGN193109はRARsのアンタゴニストである。また、RAR α 、 β 、 γ それぞれについて選択的アゴニストやアンタゴニストも多く報告されている。いくつかの化学物質に関しては、構造活性相関研究も実施されている。しかしながらこれまで、RARsを内分泌攪乱物質の標的の一つとして網羅的に調査した研究はほとんど実施されていない。

現在、世界では10万種類以上の化学物質が流通し、日本においても毎年約300種化学物質が新規市場に投入されている。これらの化学物質は、ヒトに対する有害影響が懸念され

ているが、系統的な調査は実施されていない。本研究ではRAR α 、 β 、 γ の受容体結合試験系を確立し、それを用いて応答性化学物質を探索し、それら構造的特性の解明を目的として取り込んだ。昨年度は、まずビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類など代表的な化学物質合計43種を選定し、RAR α 、 β 、 γ に対する結合性を調べた。今年度は、これらによりさらに類似構造の化学物質や脂肪酸類などを加えて、約200種類の化学物質のRARへの結合性を評価した。

B. 研究方法

(1) 対象化学物質の選定と調整

ビスフェノールAアナログ、ビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、脂肪酸類、精巢毒性関連物質など約200種化学物質を選定した。化学物質の溶液調製は、それぞれ 1.0×10^{-2} Mになるようにした。当初、DMSOで溶解して調製した。また、原液はガラスバイアルに保存した。

(2) 受容体RAR α 、 β 、 γ タンパク質の調製

Origene社から購入したRAR α 、 β 、 γ 全長cDNAより、PCRを用いてそれぞれの受容体リガンド結合ドメイン (RAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBD) 領域のクローニングを行った。得られたPCR産物をタンパク質発現ベクターpGEX-6p-1に組み換え、塩基配列を解読した。配列を確認後、大腸菌 (BL21) を用いてRAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBDタンパク質の大量発現を行った。この際、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現されることになる。37°Cで大腸菌はO.D.₆₀₀値が0.6~1.0に達した後、イソプロピル1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) を0.3 mMになるよう添加し、16°Cで約20時間振盪培養を行った。その後、細胞を通常の方法で処理し、タンパク質画分を得た。精製は、GSTと特異的に結合するグルタチオンセファロース4Bビーズ次いで、ゲルろ過によって行った。精製タンパク質は、SDS-PAGEで純度を確認し、Bradford法で濃度定量を行った。