

これは、細胞内でタンパク質があまりまだ発現していない状態で 4-OHT を暴露しなければ、レポーターであるルシフェラーゼの発現量が多すぎて活性の抑制が見えないためであると考えられた。すなわち、常にタンパク質が発現する安定発現系ではインバースアゴニストの検出はおそらく困難であり、一過性発現がインバースアゴニストの検出には必要であると考えられた。

次に、BPA のインバースアンタゴニスト活性を評価した。BPA 濃度を 0、1 μM 、10 μM 存在下で 4-OHT 濃度を変化させたところ、BPA 濃度依存的に活性の回復が検出された (図 5)。

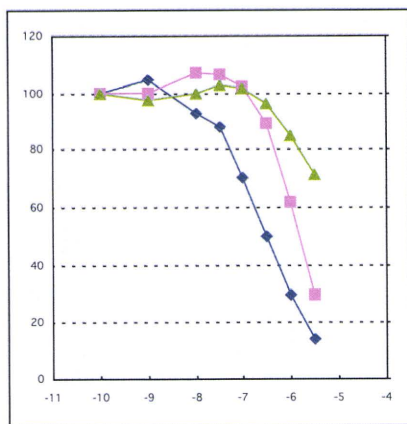


図 5. BPA の $\text{ERR}\gamma$ に対するインバースアンタゴニスト活性
青: BPA 0, マゼンタ: BPA 1 μM , 緑: BPA 10 μM 。

こうした two-hybrid 試験系による BPA のインバースアンタゴニスト活性の測定系の構築および最適化に成功した。さらに、コアクチベータとして SRC1 だけではなく、PGC1 α を用いた試験系も構築した。ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせ、および ERR γ -LBD と PGC1 α の組み合わせで、two-hybrid 試験を行ったところ、ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせのほうが 4-OHT の活性抑制をよりよく検出できることが判明した (図 6)。

D. 考察

BPA は、エポキシ樹脂などに代表されるプラスチック製品の原料として 50 年以上に渡って大量に使用されてきた化合物である。その用途は多岐に渡り、特に、缶詰類の内側のコーティング剤や歯科治療のための詰め物としても使用されるなど、我々の生活環境中に広く存在するだけでなく、少なからず経口接種している可能性が高い化合物である。実際に、約 6.6 $\mu\text{g}/\text{person-day}$ で BPA を体内

に接種しているという報告や、妊娠女性の血

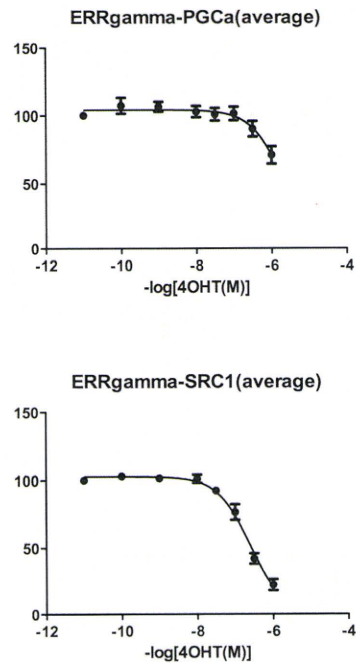


図 6. $\text{ERR}\gamma$ と SRC1 および $\text{ERR}\gamma$ と PGC1 α を用いた場合の 4OHT の活性抑制

清および羊水中から 1~10 ppb (約 4 nM に相当) の濃度で BPA が検出されたとの報告がある。したがって、BPA と $\text{ERR}\gamma$ が「 $K_D = 5.5$ nM」で結合するという実験結果は、看過できないものである。また、5.5 nM という数値は、生体内のホルモンとその受容体の親和性に相当するものである。こうした BPA の結合でさえ、いままで活性を指標とした試験系では見過ごされてきた。そのため、本研究によるインバースアンタゴニスト検出系の創出は、きわめて重要なものである。

Two-hybrid 試験には、培養の簡便さ、コストパフォーマンス、実験設備の観点から、酵母が一般的に用いられる。しかし、本研究により、酵母では活性を上げるアゴニスト活性は検出できても、活性を下げるインバースアゴニスト活性は検出できないというあらたな事実が判明した。インバースアゴニスト活性が評価できなければ、当然これを阻害するインバースアンタゴニスト活性も評価できない。これは、活性を指標とするスクリーニング系を用いる場合に留意すべき重要な課題である。すなわち、 $\text{ERR}\gamma$ をはじめとする自発活性化型核内受容体のスクリーニングには、酵母 two-hybrid 試験は不適切であることを意味する。

スクリーニングには、酵母 two-hybrid 試

験系ではなく、ホ乳類のしかも Hela 細胞を用いた two-hybrid 試験系を用いるべきであると考えられる。これは、導入遺伝子の発現量に起因する。酵母は、導入遺伝子の発現量がきわめて高いため、その抑制を検出するのは、厳密な条件が必要であり、化学物質のスクリーニングには使えない。しかし、ホ乳類培養細胞、特に Hela 細胞を用いた試験系では、インバースアゴニスト活性が可能であり、したがって、BPA のようなインバースアゴニストの評価も可能である。

また、相互作用ドメインとしてのコアクチベータの選択も重要である。核内受容体との相互作用の強さ、性状はコアクチベータに依存する。ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせ、および ERR γ -LBD と PGC1 α の組み合わせで、two-hybrid 試験を行ったところ、ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせのほうが 4-OHT の活性抑制をよりよく検出できた。これは、PGC1 α の方が、SRC1 より ERR α や ERR γ より強く相互作用して、4-OHT の阻害を受けにくいことを意味すると考えられる。これまでに行なわれたコアクチベータペプチドと ERRs の X 線結晶構造解析は、ERR α -PGC1 α の組み合わせと、ERR γ - SRC1 の組み合わせのみである。これを重ね合わせたところ、コアクチベータペプチドの LXXLL (LLXXL) の位置が異なるため、これが核内受容体との相互作用の差になる可能性が考えられた (図 7)。

PGC1 α	SRC1
Leu210	Leu690
Leu211	His691
Lys212	Arg692
Tyr213	Leu693
Leu214	Leu694

図 7. SRC1 と PGC1 α の結晶構造中の LXXLL モチーフの違い

E. 結論

自発活性化型核内受容体のスクリーニングには、Hela 細胞を用いた two-hybrid 試験系が適する。これにより、インバースアゴニストおよびインバースアゴニストの検出が可能である。さらに、標的とする核内受容体によって、two-hybrid 試験に用いる相互作用ドメインとなるコアクチベータあるいはコリプレッサの種類を検討する必要がある。ERR γ の場合には、ERR γ -LBD と SRC1 の

組み合わせが最適であることが判明した。

F. 研究発表

論文発表

1. 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).

2. ER α /ERR α Nuclear Receptor Heterodimer Directly Linked by A Flag Peptide. Ikeda, S., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: *Peptide Science* 2008, 511-512 (2009).

学会発表

1. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 暁輝¹、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。

2. 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、松島綾美、岡田浩幸、劉 暁輝、徳永隆俊、寺本岳大、角田佳充、下東康幸、第45回ペプチド討論会、2008.10.29-31。

3. 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、松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、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。

4. 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、岡田浩幸、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.14。

5. 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、松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、環境ホルモン学会 第11回研

究発表会、2008. 12. 14。

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

ショウジョウバエの生殖機能、行動、遺伝子発現における
多世代化学物質応答解析

研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部 講師

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体・エストロゲン関連受容体 (*Drosophila* estrogen-related receptor: dERR) が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズム(サーカディアンリズム)に関与する核内受容体様タンパク質・転写因子も、ヒトとショウジョウバエの両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。本研究は、ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「生殖機能」や「行動」、あるいは「遺伝子発現」を指標として用いた *in vivo* 多世代解析法として確立し、化学物質の生体へのリスク評価の解析に応用することを目指している。本研究では、これまでの多世代繁殖試験系を改良して、ビスフェノールA含有培地で継代飼育してきたショウジョウバエオス、メスへの生殖能と歩行活動へのビスフェノールAの影響について調べた。その結果、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、歩行活動リズムのピークが低く活動性が分散し、多動性様活動の個体、活動量が非常に低い低活動量の個体の出現頻度が高くなることが分かった。

A. 研究目的

環境ホルモン、内分泌かく乱物質としての環境化学物質の危険性(リスク)は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ここ数年、ヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般(ヒトの場合は48種類)の問題として拡張して考えるようになった。また、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧されるようになってきたのを受け、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性の解析が緊要の課題と考えられるようになった。内分泌かく乱物質リスク評価においては、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。さらに、継代的な評価も不可欠な要素である。これらの観点から、継代が短期間で起こり、遺伝子研究が容易なショウジョウバエが実験動物として有力であることから、ショウジョウバエを用いた試験系の構築への期待が大きくな

なった。

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

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としてはヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずか2週間程度で進むことであるが、乾燥酵母などからなるエサの粉末を

溶解凝固させたもので食餌するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常として観察することが容易であるという実験動物としての利便性も兼ね備えている。これまでに、雌の産卵数および成虫の羽化数を計数するのみで、生物体への直接的な生殖影響を雌雄独立に観察・評価できる貴重な実験系を構築している。こうした生体での試験には、並行して実施する試験管 (*in vitro*) での試験が必要である。したがって、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものであり、「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系としての緊急な課題に対応するものである。本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立し、これまでにない新規な手法を提供する。そして、本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

本年度は、これまでに確立したショウジョウバエ雌あるいは雄生体への影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系をさらに改良し、ビスフェノール A 含有培地で継代飼育したショウジョウバエを用いて、生殖機能および行動へのビスフェノール A の影響を調べた。

B. 研究方法

① ショウジョウバエの系統と飼育培地

これまでの研究で、産卵数が安定していることがわかっている *Canton S* を研究材料として用いた。飼育培地はこれまでと同様に作製した。水 10 l に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 3 cm の管瓶あるいは 9.2 cm のシャーレに入れて冷蔵保存したのち、使用した。ビスフェノール A 含有の培地は、ビスフェノール A の最終濃度が 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mol/l になるように調整した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

② 生殖能への多世代暴露の影響

化学物質を含む飼育培地で多世代にわたり飼育されたオス、あるいはメスを、通常培地で飼育されたメスあるいはオスと交配して、オスの場合は次世代の個体数、メスの場合は産卵数を調べた。成虫時に受ける影響を排除するために実際のテストには通常培地を使用した。

オスの生殖能を反映するためには、メスの個体数を過剰に与え、さらにメスが未受精卵を産卵する可能性が高いため、羽化個体をカウントする必要がある。これまでの研究で、オスの約 10 倍の数のメスを交配させるとオスの生殖能を反映した個体数の次世代が生育することがわかっている (図 1)。試験管の限られたスペースでも次世代の個体が過剰にならず、再現性のある結果を得るために、また、オス個体の特性を評価するために、ビスフェノール A 含有培地で飼育された 13 代目のオス 1 匹に対して通常培地で飼育されたメス 10 匹 (いずれも羽化直後のもの) を試験管培地で交配させ、24 時間毎に新しい試験管培地に移して、その培地から羽化する個体数をオスの次世代繁殖数とした。次世代繁殖数がピークになる羽化後の経過日数をオス個体の交配能の成熟期間、羽化後 8 日目までの次世代繁殖数の合計を生殖能として評価した。

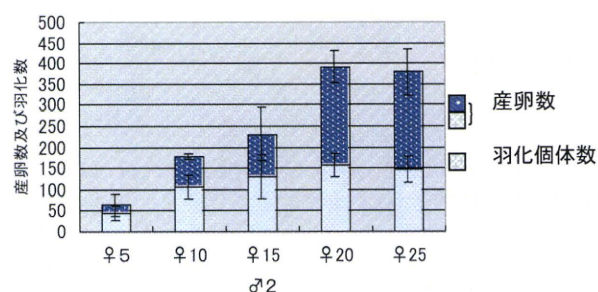


Fig. 1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster Canton S* 雌雄比による羽化個体数の変異

メスの生殖能を反映するためには、メス個体数と同数のオス個体を交配すれば良い事がすでにわかっている。ビスフェノール A 含有培地で飼育された 8 代目のメス 5 匹 (羽化直後のもの) と通常培地で飼育されたオス 5 匹をシャーレ培地に入れ、24 時間ごとに新しいシャーレ培地に移し、産卵した卵を数え、メスの産卵能とした。

③歩行活動の記録

羽化後 1~3 日目のオスのハエを LD12:12 で 3 日間歩行活動を記録した後、光周期に同調できるかを見るため、LD の時刻を 6 時間前進させた。その後、恒常暗黒中で 8 日間以上記録し、恒常暗黒中で自由継続させた活動の周期を計算した。

④時計タンパク質の発現量の解析

LD 条件下で飼育すると時計タンパク質 PERIOD は light on の 1 時間前に発現量のピークを迎えることがわかっているため、この時刻に羽化後 5 日目のショウジョウバエを液体窒素で瞬間冷凍固定し、100 匹分の頭部を採取した。吸光度測定によりタンパク質量を概算し、等量のタンパク質を含む容量を計算した。ショウジョウバエ PERIOD の N 端側の 19 アミノ酸残基のペプチドに対するポリクローナル抗体 (Santa Cruz Bio) を使ってウエスタンブロッティング法により時計タンパク質 PERIOD を検出した。

C. 研究結果

①多世代暴露によるオス個体とメス個体の生殖能発達に及ぼす影響

BPA 10^{-5} mol 含有培地で継代飼育された 13 代目のオスの次世代繁殖数は羽化後 2 日目にピークが訪れることが判明した。通常のアエと比較すると、ピークに到達するのが 1 日早く、したがって、交尾能の成熟が早くなったと考えられた (Fig. 2)。

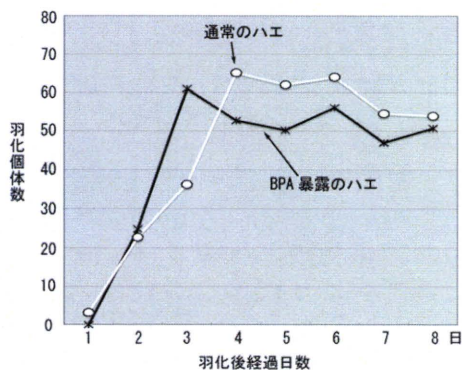


Fig. 2 BPA 暴露 13 代目オスの次世代繁殖数 (n=10)

メスの 24 時間毎の産卵数を見ると、通常のアエでは産卵数のピークが羽化後 2 日目であるのに対して、BPA 含有培地で継代飼育された 8 代目のアエでは、1 日遅い 3 日目にピークが訪れた。BPA に多世代にわたって暴露されることにより、メスでは卵発達がおくれ

る事が考えられた (Fig. 3)。

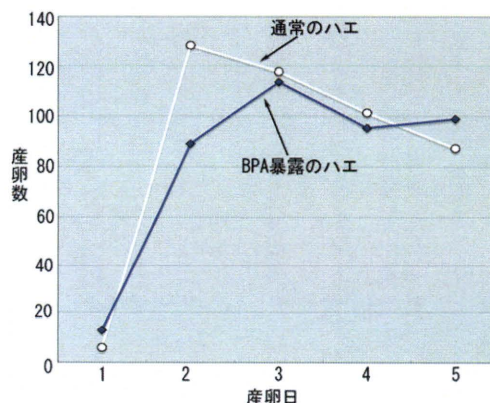


Fig. 3 BPA 暴露 8 代目メスの産卵数 (n=10)

②継代飼育による BPA 暴露オス個体の次世代繁殖数の変遷と次世代個体の性比

図 4 に BPA 10^{-5} mol 含有培地で継代飼育されたオス個体の次世代繁殖数の変遷を示した。

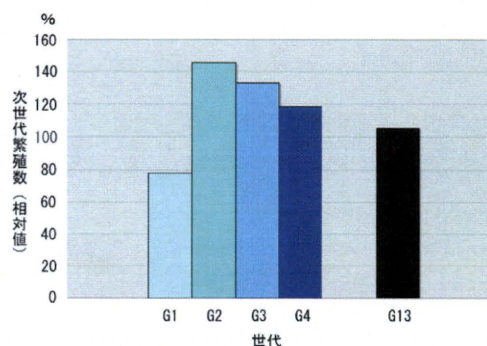


Fig. 4 BPA 多世代暴露によるオスの次世代繁殖数変遷

昨年までの研究で、BPA 含有培地で継代飼育されたオス個体の次世代繁殖数は、1 代目で減少するものの、2 世代目で急激な上昇が見られ、その後は、世代を追う毎に次第に減少する傾向にあった。本年度、さらに継代を進めた 13 代目では、通常のアエに近い値まで減少した。さらに継代がすすむと、通常のアエより低い値になるのか、あるいは、有意の差がない値で安定するのか今のところ不明である。

継代飼育されたオス個体の次世代個体の性比 (図 5) を見ると、次世代個体数が減少した 1 代目ではメスの割合が多く、4 代目までは、通常のアエと差がない値で推移した。しかし、13 代目では、オスの割合が約 5% 減少

した。この減少が有意であるのかを現在検討中である。

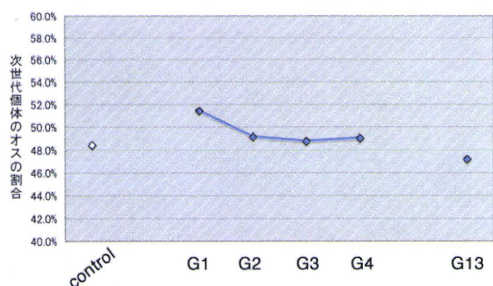


Fig. 5 BPA 多世代暴露による次世代個体の性比

③多世代暴露による歩行活動パターンの変化

BPA 10^{-5} mol 含有の飼育培地で継代飼育された個体では、自由継続歩行活動に異常が見られる個体の割合が増加した。通常ハエでは、恒常暗黒中の歩行活動の活動頻度に明確な二峰性のピークが見られ、その後低活動期が続く。しかし、図6に示したように、活動周期 (Fig. 6B) は計算できるもののピーク時の活動性が低く、低活動期には活動性が高い活動分散型の個体が通常の約 4 倍の割合で現れた。

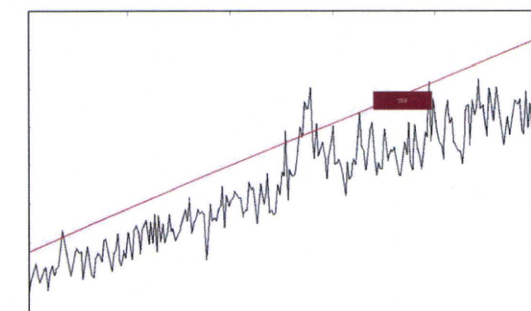
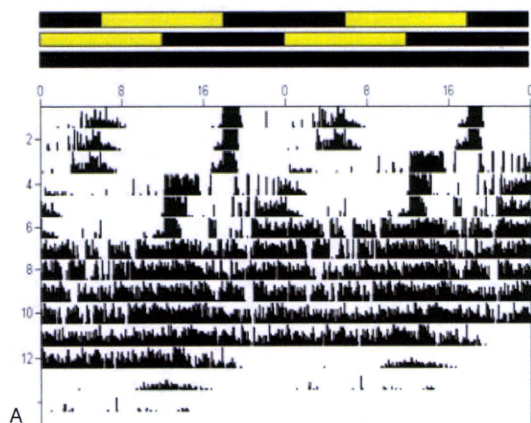


Fig. 6 BPA 多世代暴露による行動変異 (A) とピリオドグラム (B)

一方、BPA 10^{-4} mol 含有の飼育培地で継代飼育された個体群では、活動分散型の個体は少ないものの、活動レベルが非常に少ない個体の割合が約 15%に増加した。これは通常ハエの個体群と比較すると約 30 倍の高頻度であった。

④多世代暴露による時計タンパク質発現に及ぼす影響

図6で示したように、BPA 含有培地で継代飼育された個体群で、歩行活動パターンに変異が見られたので、これらの原因を探るために、時計タンパク質 PERIOD の発現を調べ、通常ハエと比較した。

ショウジョウバエ PERIOD の N 端側ペプチドに対する抗体でのウェスタンブロットング解析により、約 20KDa の通常型 PERIOD (A および B 型) と約 13KDa のスプライシングアイソフォーム C 型が検出された。多世代暴露のハエの脳通常型および C 型 PERIOD の発現量は図7に示す通りである。

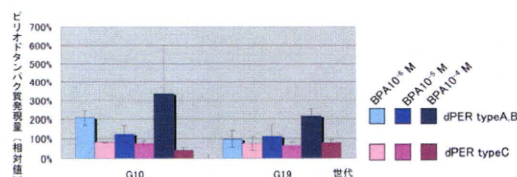


Fig. 7 BPA 多世代暴露によるピリオドタンパク質の発現変動

多世代暴露 10 代目と 13 代目のオスの脳では、通常型 PERIOD (A および B 型) は増加し、アイソフォーム C 型は減少する傾向であった。ビスフェノール A の含有濃度が高いほど、変動が大きかった。このことから、BPA 暴露によりスプライシング機構に影響を与えることが推測された。

D. 考察

これまでに確立した評価法を駆使して、ビスフェノール A がショウジョウバエオスの交尾能の発達、および生殖能に及ぼす影響を、さらに世代を進めて観察することができた。また、メスの産卵能の発達、および産卵能及ぼす影響も世代をすすめて観察することができた。BPA 暴露が世代を越えて続くと、オスの交尾能の発達は早く、メスの産卵能の発達はおそくなることが判明した。また、多世代にわたって、暴露し続ける事で、次世代総繁殖数が次第に減少すること、また、羽化後の交尾能の発達が早くなることから、生殖腺における精原細胞の通常細胞分裂に負の影響をおよぼすこと、精原細胞から精子への

減数分裂の速度が速くなる、あるいは減数分裂の開始が早くおこることが考えられた。次世代個体の性比にはおおきな変動は見られなかった。メスでは、産卵数のピークが後退したことから、BPA 暴露により卵成熟が抑制されることが推測された。

これらの結果から、ビスフェノール A に何代にもわたって暴露を受けた場合では、影響が現れる側面が性により異なること、また複数の側面で影響を受けること、さらに、何代にもわたって暴露を受けた場合ではその影響が次第に強く現れることが明らかになった。

E. 結論

本研究により、BPA 含有培地で継代飼育されたショウジョウバエの交尾能、あるいは産卵能の発達に変異が見られた。多世代にわたってビスフェノール A を摂取あるいは体表に暴露されると、次世代個体数の減少がさらにすすむ傾向があった。また、歩行活動にも変異が観察され、時計タンパク質発現に関与するスプライシング機構、また、内因性生物時計に制御される活動レベル調節機構にも影響を及ぼす可能性が推測された。

F. 研究発表

論文発表

1. 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).

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. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, in press (2009).

学会発表

1. 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.

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録する内容の成果は、現在のところ特に得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

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

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

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体・エストロゲン関連受容体 (*Drosophila estrogen-related receptor*: dERR) が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズム(サーカディアンリズム)に関与する核内受容体様タンパク質・転写因子も、ヒトとショウジョウバエの両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。本研究は、ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「生殖機能」や「行動」、あるいは「遺伝子発現」を指標として用いた*in vivo* 多世代解析法として確立し、化学物質の生体へのリスク評価の解析に応用してきた。一方、ショウジョウバエ幼虫脳組織由来の株化神経細胞BG2-c6は、エクジソン処理により、神経突起をのばして神経ネットワークに似た構造を形成することから、神経系の発達分化の実験モデルとして有効である。昨年は、この細胞を実験モデルとして、ビスフェノールA (BPA) の含有量が2 ppm、3 ppm、4 ppmの細胞培養液中で神経突起の伸長が阻害されることを明らかにした(昨年の報告書で発表)。本研究では、BG2-c6細胞の突起伸長に対する影響を統計学的に評価するため、ビスフェノールAの濃度を3 ppmに絞ってサンプル数を増やし、全細胞数の変化、突起を伸長する細胞数、突起の長さ、突起の複雑さについて調べた。また、BPA暴露による遺伝子の発現への影響を網羅的に解析するため、HiCEP法による転写産物プロファイリング解析を行った。突起伸長が開始するエクジソン添加12時間後のBPA暴露の細胞群と、コントロール群を比較した結果、15個のRNA断片に変動が見られた。それらから、3個の遺伝子を特定する事ができた。それらは、脂質結合タンパク質、ヒートショックタンパク質のアンチセンス領域(グルタメートデヒドロゲナーゼと相同性が高いと報告されている)およびイオントランスポーターの遺伝子であった。それらについて、エクジソン添加後の経時サンプルにより、Real Time PCRによる詳しい解析を実施したところ、脂質結合タンパク質の遺伝子LSD-2の発現がBPA添加により阻害されることが明らかになった。

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

① 培養細胞と培養液

研究室で継代培養しているショウジョウバエ幼虫脳組織から樹立した株化細胞BG2-c6を本研究に用いた。10%ウシ胎児血清を含むM3昆虫細胞培養液(以下、培養液)中に懸濁したBG2-c6細胞をシャーレに移し、25°Cのインキュベーターで培養した。ビスフェノールA暴露による影響評価の実験においては、細胞密度がシャーレの底面積に対して8万個/cm²となるように調整した。シャーレに移すと同時に10 ppmとなるように調整した昆虫の変態ホルモンエクジソン(20E)

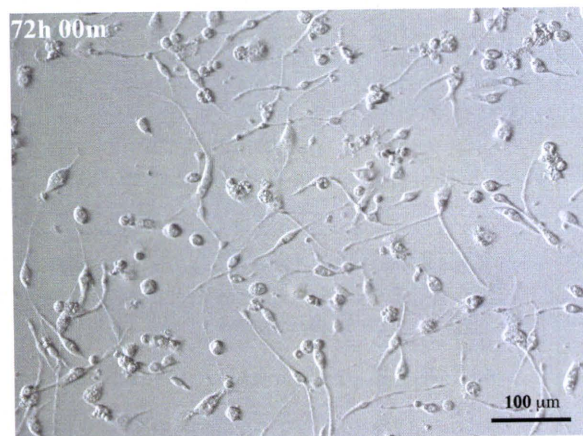


Fig. 1 神経突起を伸長させた培養細胞BG2-c6

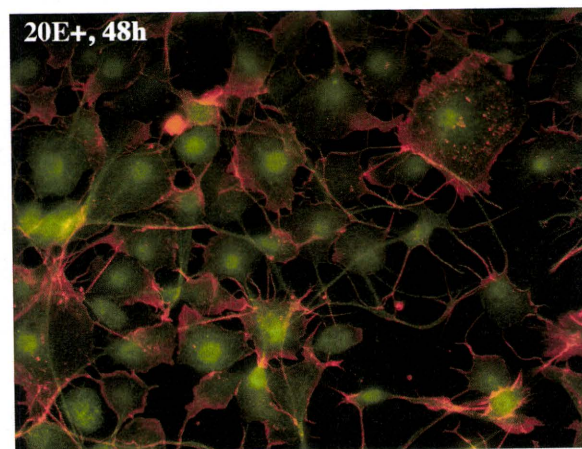


Fig. 2 BG2-c6細胞の神経突起のアクチン(赤シグナル)と微小管(緑シグナル)染色像

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

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

②BG2-c6細胞のBPA暴露によるリスク評価
シャーレの底面積に対して8万個/cm²となるように細胞数を調整した懸濁液に10ppmとなるように調整した昆虫の変態ホルモンエクジソンと内分泌攪乱物質ビスフェノールA(以下BPA)を2、3、4ppmとなるように加えた。コントロールには、BPAの溶解に使用したエチルアルコールを等量加えた。エクジソン添加後、12時間毎に、一枚のシャーレを4分割し4枚の顕微鏡画像を取得した。顕微鏡画像から、生存している全細胞の数、突起を伸長した細胞数、突起の長さ、他の細胞と突起を接触した場合の接点数をアプリケーションImage-Jを用いてカウントし、4枚の画像から得られたそれらの数値の平均値を1例とした。6例のデータから、統計学的に有意の差があると言えるのかを評価した。

C. 研究結果

①BG2-c6細胞に対するBPA暴露による影響

2009年度の研究では、BG2-c6細胞はエクジソン添加後に起こる突起伸長の現象が、BPA暴露により阻害される事が判明した。培養液中のBPA濃度が、日本の溶出基準前後の値である2、3、4ppmで実験したところ、突起を伸ばす細胞の割合と突起の長さが濃度依存的に抑制された(Figure 3, 4)。しかしながら、サンプル数が3例であったため、この抑制現象が統計学的に有意の差であることを証明するには至らなかった。

そこで2010年度には、BPA暴露による影響が、統計学的に有意差であると言えるのかどうかを調べるため、BPAの含有濃度を3ppmに絞って、例数を増やして実験を行った。

BG2-c6細胞はエクジソン添加後、一定の割合でアポトーシスが起り、生存細胞は減少する。しかし、生存率はBPA暴露の細胞群とコントロールとの間に有意な差はなかった。(Fig 5)。一方、16時間後には、細胞は

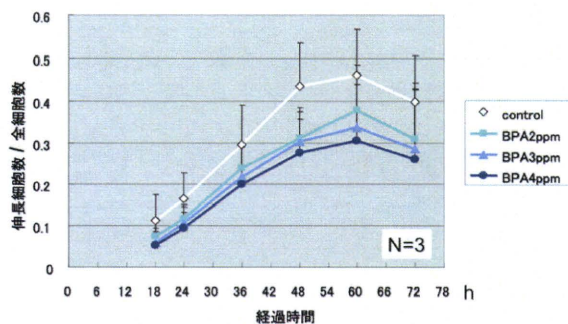


Fig. 3 BPA 暴露による B2-c6 細胞の突起伸長細胞の割合

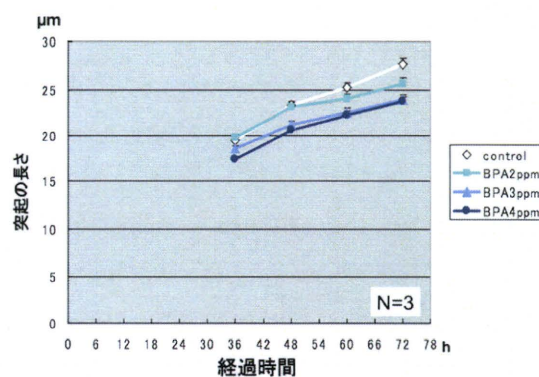


Fig. 4 BPA 暴露による伸長突起の長さの変化

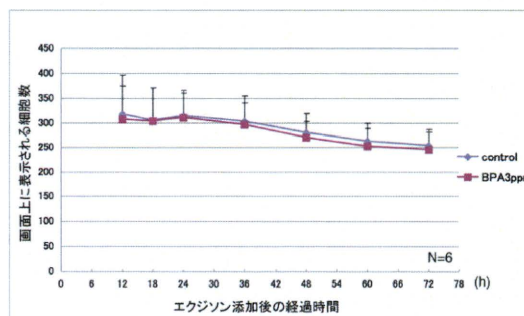


Fig. 5 3ppm BPA 暴露による B2-c6 細胞の生存率

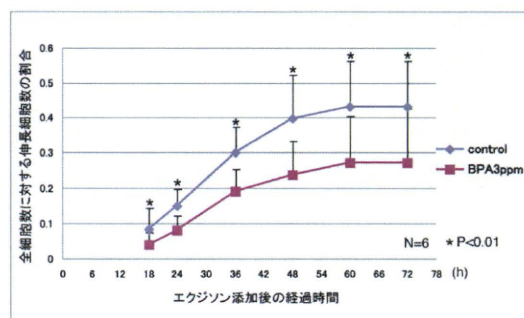


Fig. 6 3 ppm BPA 暴露における突起伸長細胞の割合

突起をのばし始めるが、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

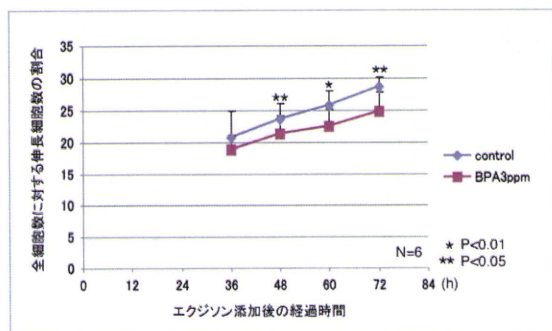


Fig. 7 伸長突起の長さの変化

有意の差が見られた (Fig 6)。突起の長さは 48 時間後から有意の差が観察された (Fig 7)。

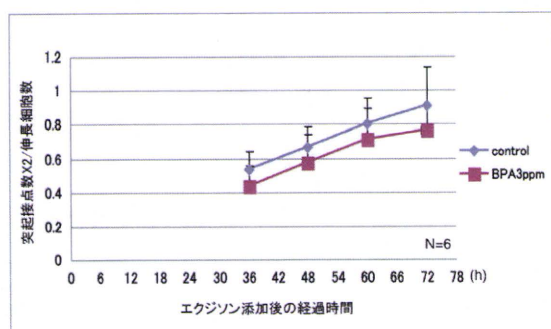


Fig. 8 1細胞あたりの突起接点数

神経突起のネットワークの複雑さを表す指標として、突起同士の接点数をカウントした結果、BPA 暴露の細胞群でその値は現象傾向にあった。しかし、統計学的有意の差は見られなかった (Figure 8)。

②HiCEP 解析法による転写産物プロファイリング

BPA 暴露により、遺伝子の発現にどのような影響を受けるのかを網羅的に解析するため、HiCEP 法による転写産物プロファイリング解析を行った。突起伸長の開始が始まるエクジソン添加 12 時間後の BPA 暴露の細胞群と、コントロール群を比較した結果、15 個の RNA 断片に変動が見られた (Fig. 9 表)。

それらから、3 個の遺伝子、LSD-2、Hsp68 および Mv1 を特定する事ができた。

変化が見られた 3 つの遺伝子 LSD-2、Hsp68 および Mv1 についての変動比などは以下の通りである。

LSD-2 : 分取りピーク 7

変動比 0.51

脂質結合性タンパク質

Hsp68 : 分取りピーク 13

変動比 0.59

heat shock protein 68 のアンチセンスとして報告されている

Mv1 : 分取りピーク 15

変動比 0.63

銅イオンのトランスポーターMV1 イントロン領域として報告されている

③PCR および定量的 RT-PCR 解析

PCR 解析

BPA 暴露により発現に変動が観察された 3 つの遺伝子が、BG2-c6 細胞系の経時サンプルでどのように発現するかを PCR 法により確認した。

Lsd2 および Hsp48 はエクジソン処理後 72 時間経過までの間、緩やかな量的変動を示す。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。

定量的 RT-PCR による解析

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

一方、内分泌攪乱物質が直接結合すると考えられる核内受容体について、当研究グループが BPA との結合性を明らかにした dERR (エストロゲン関連受容体)、2009 年度の研究において、BPA 暴露の条件下で継代飼育されたショウジョウバエ脳で発現異常が観察された DHR39、培養ニューロン実験系において軸索伸長を促すホルモンエクジソンの受容体 dEcR についても、発現を調べた。その結果、により発現の変異が観察された結合それらのうち、dERR、DHR39 は、コントロール群と変化が見られなかったが、dEcR は、エクジソン添加 12 時間から 14 時間後にコント

分取ピーク番号	実塩基配列	N ₅₀	関係	分取シーケンス配列*	分取シーケンス長さ	BlastでHitした配列	Subject Length	ACCESSION	UniGene or コラント	方法**	E-value
1	AG-cc	2	54.00	切り出し配列	-	-	0	0	TAクローニングの変換も悪い	D	1.84
2	GC-cc	28	92.78	切り出し配列	-	-	0	0	TAクローニングの変換も悪い	D	1.34
3	CG-cc	68	335.16	CGGGGACGGAATAGCCATTNFGTGN	303	CGGGGAGTCGGAATAGCCAACTTGGTTGG	304	AF014283.4	Drosophila melanogaster chromosome X complete sequence	D	1.60
5	CG-cc	71	288.82	CGGGCCGCACTATAAGGTCAAATGGAAA	259	CGGGCCGCACTATAAGGTCAAATGGAAA	260	NM_165830.2	JASD 2187566 UniGene Dm.31780 Drosophila melanogaster (fruit fly) CG80302	D	1.33
6	GC-cc	50	142.74	切り出し配列	-	-	0	0	TAクローニングの変換も悪い	D	0.42
7	GA-cc	55	260.80	CGGGAGCAGAGAGAGCGTTTTTTTGGT	232	CGGGAGCAGAGAGAGCGTTTTTTTGGT	234	HM_001046212.1	UGD 85565 UniGene Dm.4578 Drosophila melanogaster (fruit fly) Lsc-2	D	0.51
8	GA-cc	15	82.74	CGGGATTATGAGTTAGAGAGCGTTGTGC	57	CGGGATTATGAGTTAGAGAGCGTTGTGC	57	BT088791.1	UGD 1316869 UniGene Dm.23830 Drosophila melanogaster (fruit fly) CSI4225	D	0.52
11	AG-cc	72	389.01	CGGACTGGCAGTAGCGCGTGGATGTTTCA	339	CGGACTGGCAGTAGCGCGTGGATGTTTCA	340	AF014283.4	Drosophila melanogaster chromosome X complete sequence	D	0.55
12	GT-cc	18	132.72	CGGGCTGGTATCGCTGGAGAGTGTATCGC	102	CGGGCTGGTATCGCTGGAGAGTGTATCGC	108	AF014134.5	Drosophila melanogaster chromosome 2L complete sequence	D	0.59
13	CA-cc	41	209.85	CGGCACTGTGATGACAGGTCCTTCCNCTG	191	CGGCACTGTGATGACAGGTCCTTCCNCTG	191	EF364856.1	Drosophila melanogaster strain tuccusa heat shock protein 88 (Hsp88) gene, partial sequence	D	0.26
14	AT-cc	38	151.38	切り出し配列	-	-	0	0	TAクローニングする場合は、数を拾わないと無理	D	0.81
15	AC-cc	35	157.34	DGGA-ATAAAAATACCAATATCGATGTTGT	127	DGGA-ATAAAAATACCAATATCGATGTTGT	135	AF014283.2	D. melanogaster chromosome 2R, complete sequence dM1 NM_079701.50 Transcript variant	D	0.61
16	GC-cc	33	110.79	切り出し配列	-	-	0	0	TAクローニングの変換も悪い	controlのみ	-

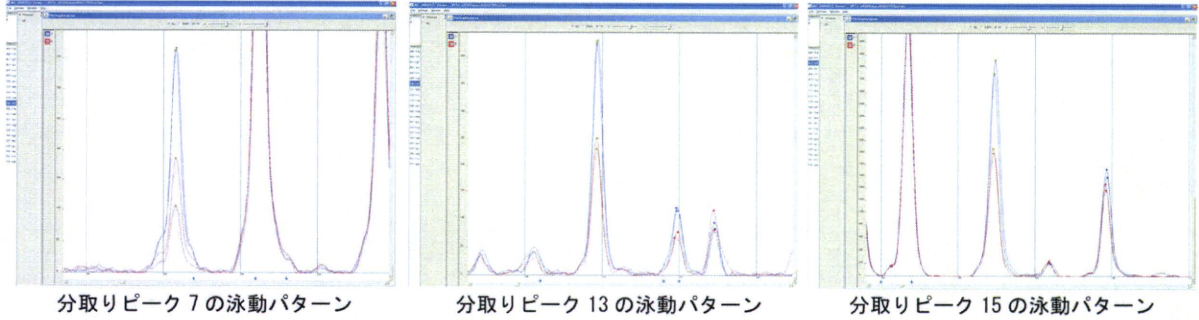


Fig. 9 HiCEP 法により発現変動が観察された RNA 産物の泳動パターン

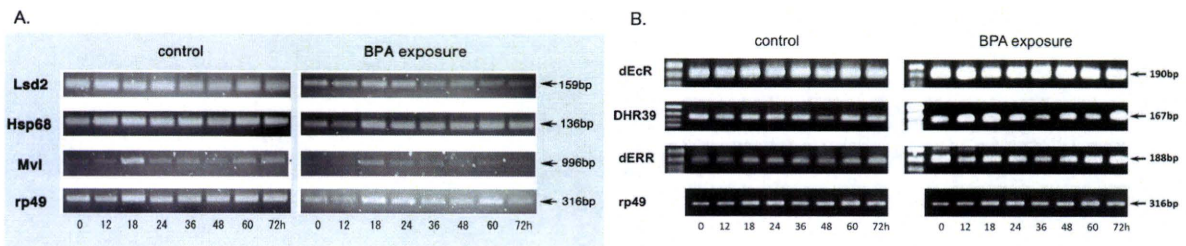


Fig. 10 PCR 法による発現解析

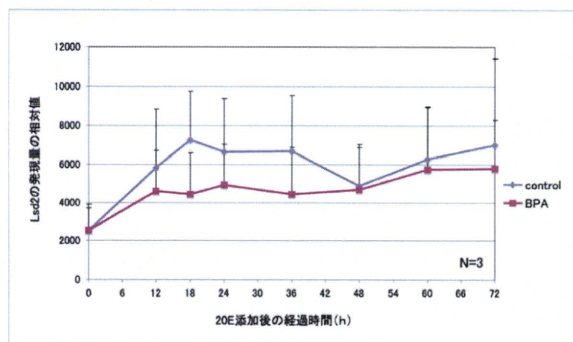


Fig. 11 LSD-2 遺伝子の定量的 PCR 法による発現解析

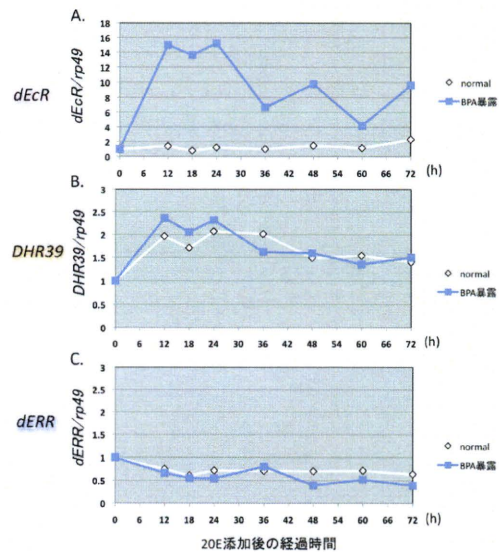


Fig. 12 核内受容体遺伝子の定量的 PCR 法による発現解析

ロール群と比較して約 14 倍に昂進した。

D. 考察

BPA が神経分化に及ぼす影響について、シヨウジョウバエの株化ニューロンを実験モデルとして用いて、培養液中の濃度を溶出基準濃度に近い 2、3、4 ppm に設定し、細胞の生存率、突起を伸ばす細胞の割合、突起の長さ、互いの突起との接点について検討した。その結果、BPA 暴露の細胞では、細胞の生存率を除く総ての項目で突起の伸長が濃度依存的に抑制される傾向が見られた。そこで、この現象が、統計学的に有意の差であるのかを検討するため、3 ppm について、サンプルサイズを増やして調べた。その結果、やはり、細胞の生存率については、影響はないと判定されたが、突起をのばす現象については、突起伸長細胞の割合が、コントロール群と比較すると約 63% に減少し、この差は有意の差であると判定された。また、突起の長さについても、有意に短くなると判定された。突起の複雑さを示す指標として用いた互いの突起との接点数については、減少傾向にあるものの有意の差であるとは断定できなかった。このように、神経分化の過程において、BPA が影響を及ぼす事が明らかとなった。

遺伝子発現において、BPA 暴露により変動がおこるものを HiCEP 法により探索した。その結果、3 つの遺伝子の発現が約 50~60% に抑制される事がわかった。これらは、脂質結合性タンパク質、heat shock protein、銅イオンのトランスポーターであった。現段階では、BPA の直接のターゲット因子や、これらの遺伝子が抑制されるメカニズムは不明であるが、BPA の作用メカニズムを明らかにしていくためには、今後、転写調節因子の探索など、これらの遺伝子を手がかりにすれば道が開かれるものと考えられた。

ビスフェノール A が神経発達に影響を及ぼす可能性が強く示唆されたので、遺伝子の発現プロファイルと、BPA 暴露による影響を経時サンプルで明らかにするため、PCR 解析と定量的 PCR を実行した。その結果、エクジソン添加後 18 時間前後に遺伝子発現に強く影響が出る事が判明した。この時間帯は、細胞が突起を伸ばし始める時間帯である。したがって、神経分化において BPA は神経細胞の突起伸長、すなわち神経系構築の初段階に影響を及ぼすものと推測された。

E. 結論

本研究により、BPA 含有培地で培養された

シヨウジョウバエの株化ニューロンは神経分化の出発点である突起の伸長が阻害されることが明らかになった。

F. 研究発表

論文発表

1. The Role of the Peptide PAP Coded in pdf Gene. M. Shimohigashi, T. Q Itoh, T. Honda, M. Saito, K. Koga, K. Takahashi, A. Matsushima, R. Ueda, T. Tanimura, Y. Shimohigashi, A. Matumoto *Peptide Science* 2009, 217-218 (2010).
2. Identification of Circadian Neuropeptide PDF mRNA Isoforms in the Housefly *Musca domestica*. C. Kawanaka, A. Matsushima Y. Takeda M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2009, 145-146 (2010).
3. 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).
4. 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(1):113-122 (2009).
5. Drosophila Neuropeptide hugy Presentin the Clock Cells Important for Circadian Rhythm Oscillation K. Koga M. Nakamura, M. Sumiyoshi, A. Mastumoto, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi *Peptide Science* 2010, 68 (2011)
6. Apis pdf gene expresses in circadian manner M. Sumiyoshi, Y. Takeda, S. Sato, K. Koga, T. Itoh, H. Nakagawa, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi *Peptide Science* 2010, 69 (2011)
7. A Circadian Neuropeptide PDF in the Honeybee, *Apis mellifera*: cDNA Cloning and Expression of mRNA Zool. Sci. (2011) (in press)

学会発表

1. M. Shimohigashi, T. Q Itoh, T. Honda, M. Saito, K. Koga, K. Takahashi, A. Matsushima, R. Ueda, T. Tanimura, H. Nakagawa, A. Matsumoto, Y. Shimohigashi, PAP Peptide Coded in pdf Gene is Necessary to persist the Circadian Locomotor Rhythm in Insect. *3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium*, Nov.8-11, 2009
2. M. Sumiyoshi, Y. Takeda, K. Koga, S. Seiji, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi, Daily Change of pdf Gene Expression Levels in Brains of the Honeybee *Apis mellifera*. *3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium*, Nov.8-11, 2009.
3. 武田行正、劉 暁輝、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合同大会、2009. 10. 21-24。
4. 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 34 回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会、2009. 10. 22-24。
5. 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、内分泌攪乱物質・ビスフェノールAのショウジョウバエ核内受容体発現に及ぼす影響、第 82 回日本生化学会大会合同大会、2009. 10. 21-24。
6. 下東康幸、劉 暁輝、岡田裕幸、松島綾美、下東美樹、ビスフェノール AF は受容体 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。
7. 下東美樹、山田隆弘、久間祥子、住吉美保、古賀啓太、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。
8. M. Shimohigashi, A. Furukawa M Sumiyoshi, A Matsushima Y Shimohigashi and H Nakagawa Effects of Bisphenol A-exposure on the gene expression of culture neuron BG2-c6 The 13th annualmeeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research
9. M. Sumiyoshi, Y. Takeda, K. Koga, S. Seiji, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi, Circadian Expression of pdf Gene in Honeybee, *Apis mellifera*. 日本動物学会第81回大会 東京大学
10. 古賀啓太、中村将行、住吉美保、下東美樹、下東康幸：ショウジョウバエ神経ペプチド PK 2 と hug γ は概日時計因子である、日本比較生理生化学会第 32 回大会、平成 22 年（2010 年）7 月 17-19 日、九州産業大学（福岡市）
11. 中村将行、古賀啓太、住吉美保、安藤 悟、下東美樹、下東康幸：ビスフェノールA食餌のショウジョウバエ活動リズムへの影響、日本比較生理生化学会第32回大会、平成22年（2010年）7月17-19日、九州産業大学（福岡市）。
12. 住吉美保、武田行正、佐藤聖児、古賀啓太、中川裕之、下東康幸、下東美樹：セイヨウミツバチpdf遺伝子の発現リズム、日本比較生理生化学会第32回大会、平成22年（2010年）7月17-19日、九州産業大学（福岡市）。

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録する内容の成果は、現在のところ特に得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

エストロゲン関連受容体 γ のビスフェノールA誘導体のX線結晶構造解析

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

我々は、2006年に内分泌かく乱物質と考えられているビスフェノールA（BPA）がエストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に、解離定数 $K_D = 5.5$ nM と天然ホルモン並みに強く結合することを明らかにした。これまで、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いた。しかしながら、BPAのERへの結合能はエストロゲン・17 β -エストラジオール（E2）に比べると非常に弱い。一方でBPAが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なされている。また、ERRはERの標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列（ERE）と結合する。逆に、ERもERRの応答配列（ERRE）を認識する。こうしたことから、ERRとERは相互に関連した機能制御系を形成している可能性がある。したがって、BPAがERR γ と結合することによってERをも含めた系で内分泌かく乱作用を示す可能性も考えられ、現在、ERR γ の機能解析や効率的な試験系の確立が早急に求められている。一方で、工業原料として用いられる化学物質には、BPA類似物質が複数ある。そこで、本研究では、BPA類似物質とERR γ の結合の分子メカニズムに焦点をあて、BPA類似物質とERR γ のリガンド結合ドメイン（ERR γ -LBD）の結合体の構造を、X線結晶構造解析により解析した。今年度は、ビスフェノールZ（BPZ）とERR γ -LBDの結合体の結晶化を行った。その結果、自発活性化型核内受容体であるERR γ の活性型構造を保持したまま、BPA類似物質はリガンド認識部位に取り込まれていることが判明した。BPAと同様に、BPZには2つのフェノール骨格が存在する。一方のフェノール性OH基が275位グルタミン酸および316位アルギニンと、もう一方のフェノール性OH基が346位アスパラギンとそれぞれ水素結合を形成し、BPZと強固に結合していた。さらに、リガンド結合ポケットを形成するアミノ酸側鎖と、BPZのシクロヘキシル環が反発し、BPAの場合と比較して、ERR γ -LBDのリガンド結合部位のLeuが回転していることが判明した。このように、BPZとERR γ の結合体のX線結晶構造解析により、BPZとERR γ の間には複数の相互作用があり、BPZのERR γ に対する強い結合が形成されることなどの証明に成功した。

A. 研究目的

ビスフェノールA（BPA）は、分子量228.29の比較的小さな化学物質である。これは、HO-C₆H₄-C(CH₃)₂-C₆H₄-OHの対称な構造をしており、エストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）を介して作用を示す内分泌かく乱物質、いわゆる「環境ホルモン」と考えられている。しかし、BPAのERへの結合能、活性はエストロゲンに比べると1/1000～

1/10,000と非常に弱い。一方、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はどのような分子メカニズムで発現するのか？ 実際にERを介しているのか？ これが「低用量問題」として議論になっている。こうしたなか、我々は「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。さらにごく最近、BPA様の骨格構造を持つかなり多くの化学物質が、ERR γ に結合することを明らかにした。これらの成果はイギリスの王立化学会誌chemistry Worldに取り上げられる等、世界中で大きな反響を呼んでいる。

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年にドイツのZincke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。また、BPAは、主にポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の生産に用いられる工業原料であり、世界中で年間約300万トンとかなり大量に用いられている。こうした樹脂はいわゆる「プラスチック製品」として身の回りに数多く存在する。このプラスチックには、合成過程で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、これが漏出することが問題になっている。哺乳瓶を加熱すると、BPAが溶出すること危惧する声もある。したがって、「BPAが低用量で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と考えられているのである。

国際的には、カナダ政府が世界に先駆けてBPAの規制に乗り出しており、2008年10月17日付の発表で、「the Government of Canada announced it will immediately proceed with drafting regulations to prohibit the importation, sale and advertising of polycarbonate baby bottles that contain bisphenol A (BPA). The Government will also take action to limit the amount of bisphenol A that is being released into the environment. (カナダ政府は、BPAを含有するホ乳瓶の輸入や販売、広告の規制案を速やかに進める予定である。政府はまた、環境中に放出されるBPAの量を規制するための行動を起こすだろう。)」と紹介されている。

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 (estrogen-related receptor; ERR) は、ERと非常によく似たアミノ酸配列をも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。しかしながら、これらのいずれについても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いなかった。

ERRは、リガンドなしで活性化コンホメー

ションとなる、いわゆる「自発活性化型核内受容体」(self-activated nuclear receptors, SA-NR) である。その構成基盤活性 (Constitutive activity) はERよりも非常に大きい。このため、通常の「リガンド活性化型核内受容体」(ligand-activated nuclear receptors, LA-NR) とは異なる活性制御機構の存在が想定された。

一般的に、受容体のリガンド認識部位にリガンドが結合すると、アゴニストとして受容体を活性化するか、アンタゴニストとして活性化を阻害すると考えられている。しかし、我々の研究成果により、BPAはERR γ のリガンド認識部位に非常に強く結合するにも関わらず、活性を全く変化させないことが判明した。すなわち、自発活性化型の構造を変化させずにリガンド認識部位に結合するというユニークなリガンドであると考えられた。さらに、BPAは、ERR γ の活性化構造を不活性化型構造に変化させる4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) の効果を阻害して、活性を回復させる「インバースアンタゴニスト」であることを見出した。

さらに、BPAとERR γ -LBDのX線結晶構造解析により、このインバースアンタゴニストの分子メカニズムは、BPAがリガンド認識部位に結合して4-OHTと競合するものであることを直接的に示し、BPAのERR γ に対する非常に強い結合能の構造要因を明らかにした。

BPA類似体も「特殊ビスフェノール」として工業的に利用されている。日本の公開特許公報には、こうした特殊ビスフェノールの用途が様々に述べられており、ビスフェノールZ、ビスフェノールC (BPC)、ビスフェノールE、ビスフェノールMなどが用いられている。従って、将来的に、こうしたビスフェノール類の利用が増大する可能性がある。そこで今回、特殊ビスフェノールの一つであるビスフェノールZとERR γ の結合体のX線結晶構造解析を行い、BPA同様に結合するののかについて検討した。

B. 研究方法

(1) 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に組み換え、大腸菌 (BL21) を用いてERR γ -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 ビーズを用いて精製した。さらにグルタチオンセファロース 4B 樹脂に ERR γ -LBD が結合した状態のまま、プレジジョンプロテアーゼによる酵素消化を行い、GST を ERR γ -LBD から切り離して ERR γ -LBD を回収した。これを限外濾過により濃縮して-80°Cで保存した。

(2) 結晶作製

ERR γ -LBD と BPC の結合体結晶作製のために、Hampton Research 社製のスクリーニングキット Crystal Screen、Crystal Screen II、および Ion/PEG Screen で結晶化条件のスクリーニングを行った。ERR γ -LBD の物理量の3倍量になる BPA を ERR γ -LBD 溶液に添加して試料溶液とした。2 μ l の試料溶液と 2 μ l の結晶化リザーバー溶液を混合し、ハンギングドロップ法で結晶作製を行った。こうして、試料をセットしたプレートを 20°C に静置して結晶を作製した。約 400 種の結晶化条件をスクリーニングしたところ、1 種類の条件で結晶が形成され、これを最適化して最終的な結晶化条件を決定した。

(3) X 線回折データ収集およびプロセッシング

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

(4) 構造決定および構造精密化

ERR γ -LBD と BPC の結合体構造は、CCP4 パッケージの MOLREP を用いて、ERR γ -LBD と 4-OHT の結合体 (PDB id: 1S9Q) を元にした分子置換法で行った。構造精密化は CCP4 パッケージの Refmac を用いて 1.6Å の分解能で行った。プログラム Coot を用いて、手動で構造最適化と水分子の付加を行なった。最終構造は、ERR γ -LBD のアミノ酸 232 位-458 位に相当し、1 分子の BPA と 387 個の水分子を含んでいた。

(6) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cで行った。GST-ERR γ -LBD と各濃度の放射標識された BPA を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の BPA を放射標識された BPA と併に加えることにより調べた。遊離の [3 H]BPA は

デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

C. 研究結果

(1) BPC と ERR γ の結合体の結晶作製

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌で ERR γ を発現した。GST はプレジジョンプロテアーゼにより酵素消化して切り離した。結晶化条件のスクリーニングを行い、HEPES 緩衝液中でクエン酸ナトリウムを晶出剤として良質な結晶を得ることに成就した。

(2) X 線回折データ収集および構造解析

得られた結晶を 24%グリセロール溶液に段階的に移すことにより、不凍条件にした。SPring-8 の構造生物学ビームライン BL38B1 で放射光回折データを収集した。これを基に、構造解析を行ったところ、最終的に分解能 1.7Å の良好な構造が得られた (表 1. 図 1.)。

Table 1. Data collection and refinement statistics for X-ray crystal analysis of the estrogen-related receptor γ (ERR γ) ligand binding domain (LBD) and complex with bisphenol Z.

Data set	
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell parameters	a = 63.84 Å b = 63.84 Å c = 135.89 Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Data collection	SPring-8 BL38B1
Beam line	
Wavelength (Å)	1.0
Resolution Range (Å)	31.93-1.70
Number of reflections	
Observed	446410
Unique	31815
R_{sym}	0.071 (0.487)
$I/\sigma(I)^*$	64.72 (4.8)
Completeness (%)	99.8
Refinement statistics	
Resolution Range (Å)	31.93-1.70
Number of reflections	
Working set	30224
Test set	1591
Completeness (%)	99.8
R_{cryst} (%)	19.9
R_{free} (%)	23.3
Average B-factor (Å ²)	
Protein	25.7
BPZ	27.7
Glycerol	54.6
Water	35.2
Number of atoms	2153
Protein	1965
BPA	20
Glycerol	12
Water	156

*Values in parentheses are for the highest resolution shell. $R_{\text{sym}} = \sum(I - \langle I \rangle) / \sum I$, where I is the intensity measurement for a given reflection and $\langle I \rangle$ is the average intensity for multiple measurements of this reflection. $R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{calc} are observed and calculated structure factor amplitudes. R_{free} value was calculated for R_{cryst} , using only an undefined subset of reflection data (5%).

表 1. 結晶構造データ

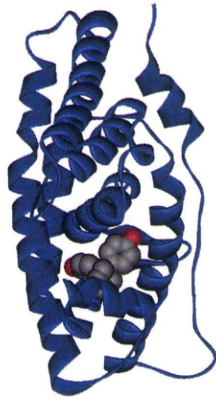


図1. BPZとERR γ の複合体構造

これらの構造を、これまでに報告されていたリガンド無しのERR γ -LBDの活性型構造および我々が既に報告しているBPA/ERR γ -LBD複合体の構造とスーパーインポーズすることにより、BPZはERR γ -LBDの活性型構造を維持したまま、リガンド認識部位に結合していることがはっきりと示された。また、BPZがERR γ -LBDに非常に強く結合する要因は、BPAの場合と同様に、BPZの一方のフェノール性OH基が275位グルタミン酸および316位アルギニンと、もう一方のフェノール性OH基が346位アスパラギンとそれぞれ水素結合を形成し、BPZと強固に結合していることが判明した。

BPA/ERR γ -LBD複合体の構造では、リガンド無しのアポ体と比較すると、Leu345が回転してBPAと誘導適合する。これまでに報告されているERR γ の構造、全15種類のなかで、BPA/ERR γ -LBD複合体と同じLeu345の配向を取るものは、BPAと結合しているものも含め

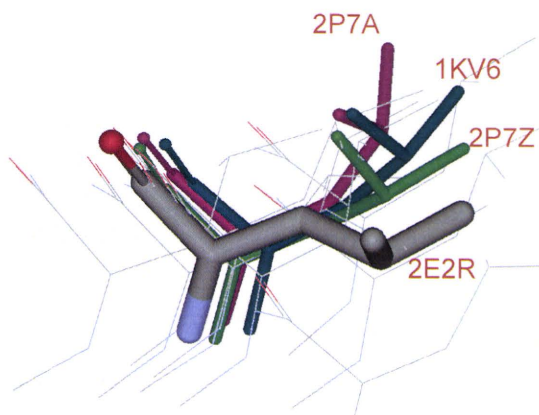


図2. BPAとの複合体を同じLeu345の配向をとる結晶構造

て4種のみであり、BPAとの複合体を除くとわずか2種である。これらのうち、一つはリ

ガンドなしのアポ体、もう一つはBPAと非常に構造が類似した4-chloro-3-methyl phenolである(図2.)。なお、リガンド無しのアポ体は、これまでに4種の構造が報告されており、1種がBPA/ERR γ -LBD複合体と同じ配向をとる。つまり、Leu345は、配向の自由度が高いアミノ酸残基であり、これがリガンドを適切に受容している。したがって、BPA類似の化合物を受容する場合には、Leu345がBPAの場合と同様の配向をとると期待された。しかし、BPZはBPAときわめて類似した構造を持つにも関わらず、Leu345の配向がBPA複合体の場合と異なる。これは、BPZに存在するシクロヘキシル基が、近隣に存在するPhe435とPhe450と反発するために、BPZが押される形となる。そのためLeu345がアポ体のまま、すなわち、リガンド結合部位の方向を向いたままBPZを安定に受容できると考えられる。

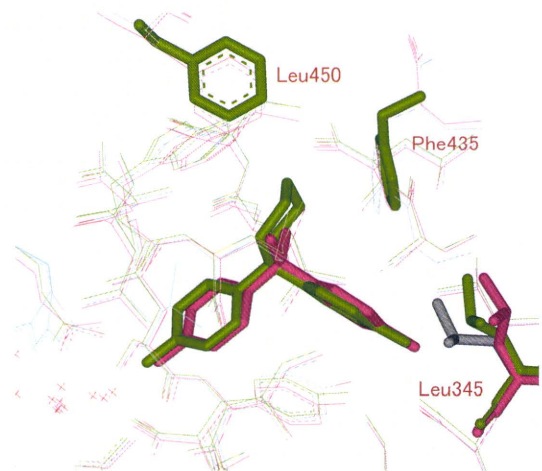


図3. BPZとERR γ の複合体、BPAとERR γ の複合体、さらにリガンド無しのERR γ の活性型構造の重ね合わせ
灰色がリガンド無しのERR γ 活性型構造、緑がBPZとERR γ の複合体構造、マゼンタがBPAとERR γ の複合体構造である。

D. 考察

BPAのERR γ -LBD結合体のX線結晶構造解析により、ERR γ -LBDが自発的に取る活性型構造を保持したまま、BPAはERR γ -LBDのリガンド認識部位と目されるポケットに結合することが明確に示された。さらに、BPAのERR γ -LBDに対する天然ホルモンに匹敵するほどの強い結合能は、BPAに存在する2つのフェニル基のフェノール性OH基による合計3つの水素結合と、さらにフェニル基やメチ

ル基による受容体アミノ酸側鎖との複合的な π 相互作用に由来することが判明した。BPZの周辺にはLeu309、Tyr326、Phe435、Met306といった芳香族アミノ酸やアルキル側鎖をもつアミノ酸が複数存在する。こうしたアミノ酸側鎖に由来するBPAとの弱い相互作用も、複数存在することによりBPZとERR γ -LBDの強い結合を支える要因となる。特にLeu309とTyr236はBPAの芳香環の上下からサンドイッチするようにBPZをしっかりと保持している。また、BPAとBPZの違いは、2つのフェノール骨格を結ぶ炭素原子に、2つのメチル基がつくか、その部分がシクロヘキシル基かである。このように、この炭素原子近傍のわずかな空間に適合できる様々なBPA類似化合物が結合できる。しかし、BPAのメチル基上の水素をフッ素に置換した形のビスフェノールAFは、HO-C₆H₄-C(CF₃)₂-C₆H₄-OHの化学構造をしているが、著しく結合能が低下する。これは、電子が豊富なCF₃基は、CH₃基のように近傍のPhe435とはかなり反発することに起因する。このように、水素結合だけではなく、弱い相互作用もBPAの結合に重要な役割を果たしていることは明らかであり、また、BPAに類似したERR γ の天然ホルモンが存在する可能性も考えられる。

E. 結論

BPZとERR γ -LBD複合体のX線結晶構造解析に成功した。得られた結晶は分解能1.7Åの良好な結晶であった。構造解析の結果、我々がこれまでに報告したBPA/ERR γ -LBD複合体の場合と同様に、リガンド結合部位にすっぽりと取り込まれており、ERR γ の活性型構造を保持していた。BPA/ERR γ -LBD複合体とBPZ/ERR γ -LBD複合体を詳細に比較すると、受容体のLeu345の配向が異なっており、これは、BPZに存在するシクロヘキシル基が、受容体のPhe435およびPhe450と反発することにより、BPZが押されるためであった。

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. 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. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 暁輝1、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。

2. Structural flexibility of human nuclear receptor ERR to adopt endocrine disruptor bisphenol A and its derivatives. Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, Xiaohui Liu, Takatoshi Tokunaga, Takamasa Teramoto, Yoshimitsu Kakuta, and Yasuyuki Shimohigashi. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.

3. 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、松島綾美、岡田浩幸、劉 暁輝、徳永隆俊、寺本岳大、角田佳充、下東康幸、第45回ペプチド討論会、2008.10.29-31。

4. 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、松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、第31回日本分子生化学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.9-12。

5. 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、松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.14。

6. Endocrine disruptor bisphenol A as an inverse antagonist of estrogen-related receptor γ , Ayami Matsushima, The 4th International Workshop on Future Molecular Systems 2008, 2008.12.13.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。