

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

エストロゲン受容体 α のビスフェノールA誘導体のX線結晶構造解析

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

近年、プラスチックの熱耐性などの機能を向上させた、様々な機能性ビスフェノール（BPA）が工業原料として用いられている。そこで、これら「新世代ビスフェノール」について、各種の核内受容体に対する結合スクリーニングを実施した。その結果、新世代ビスフェノールは様々な核内受容体に結合することが明らかとなった。中でも女性ホルモン受容体であり、最も内分泌攪乱作用の標的となりうると期待される代表的核内受容体の一つである、エストロゲン受容体 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種類のBPA類似化合物が、BPAより強い結合性を示すという驚くべき事実が明らかとなった。さらにER 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ところ、米国衛生局の国家毒性プログラム（NTP）において、BPA類似化合物の中でも特に注目されているビスフェノールAF（BPAF）が、ER 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。そこで、レポーター遺伝子アッセイ系を構築して転写活性を測定した。これより、BPAFはER 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。この構造要因を明らかにするためには、BPAFとER α の結合体のX線結晶構造解析が非常に有用である。そこで今回、ER α -LBDとBPAFとの複合体のX線結晶構造解析を試みた。文献調査により、ER α に存在する3つのシステイン残基は、システインの側鎖のSH基が持つ高い反応性のために、結晶化を阻害すると考えられたため、これら全てをセリンに置換した。さらに、フレキシブルなFドメインも、結晶化の邪魔になると考えられたためを削除した。こうして作製したER α （C381S, C417S, C530S）-LBDを用いてBPAF結合体の結晶化を行ったところ、微細な針状結晶が多数得られた。しかし、今まで構造解析に十分な大きさを持つ結晶は得られていない。そこで、結晶作製法をハンギングドロップ法から、シッティングドロップ法に変え、BPAF以外の新世代ビスフェノールについてもスクリーニングを行った。その結果、構造解析可能な大きさの結晶を得ることに成就した。

A. 研究目的

ビスフェノールA（BPA）は、分子量228.29の比較的小さな化学物質である。これは、HO-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。一方で、最近になって、BPA類似化合物に対する安全性の懸念が高まっている。米国厚生省では、2008年のNTPの報告で指摘されたBPA類似化合物に対する内分泌攪乱物質としての懸念を受けて、BPAには及ばないが比較的プラスチック原料として多く使用されているビスフェノールAF（BPAF）を毒性試験の対象化合物として取り上げた。米国における、BPAFの1986年から2002年における生

産量は、10,000～500,000ポンドであり、この量は'moderate production'に分類される。2008年9月の報告書によると、BPAFはポリマー原料として用いられており、フッ素含有高分子化合物 (fluoroelastmer) として、食品加工・製造装置のホース等に用いられていることが報告されている。しかし、特定の用途や、ヒト暴露の可能性、世界生産量、さらには、環境放出量などについては、一切不明となっている。また、ラットにおける経口の半数致死量 (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。

我々は、この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を明らかにしたそこで、レポーター遺伝子アッセイ系を構築して転写活性を測定した。これより、BPAFはER 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 (H20年度報告書 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 参照)。この構造要因を明らかにするためには、BPAFとER α の結合体のX線結晶構造解析が非常に有用である。そこで今回、BPAFとER α の結合体のX線結晶構造解析に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 受容体 ER α -LBD 発現プラスミドの構築

ER α の結晶構造に関しては、既に多くの報

表 1. ER α の結晶構造解析文献

文献	LBD発現領域 (全長595aa)	変異	精製法の特徴
nature 389, 753, 1997	301-553		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
Protein Expr. Purif. 22, 165, 2001	301-553		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
PNAS, 95, 5998, 1998	297-554		5M urea, E2存在下巻き戻し
JBC, 276, 15059, 2001	302-552	C381S, C417S, C530S	estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
PNAS, 100, 11273, 2003	304-550	C381S, C417S, C530S	PenVera社が発現, 精製
Cell. 1998 Dec 23;95(7):927-37	297-554		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
J Med Chem. 2003 Jul 3;46(14):2945-57	301-553	C381S, C417S, C530S	estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 変異体でないとは結晶が出なかった
J Am Chem Soc. 2004 Nov 24;126(46):15106-19			estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化
Structure. 2004 Dec;12(12):2197-207	301-554		4M urea存在下Estradiol-Sepharose
J Med Chem. 2005 Jan 27;48(2):364-79	301-553		
J Biol Chem. 2006 Jun 30;281(26):17909-19			magic strain E Coliスクリーニングに特化した方法
Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Mar 8;102(10):3593-8	FDメイン無し		estradiol-Sepharose, 可溶性画分, アセチル化
EMBO Rep. 2007 Jun;8(6):583-8	298-554	Y537S	6xHis and TEVprotease
Chem Biol. 2007 Jun;14(6):659-69	298-554	Y537S	6xHis and TEVprotease

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

(2) ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD の発現

大腸菌 (BL21) を用いて ER α (C381S, C417S, C530S)-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 ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD が結合した状態のまま、プレシジョンプロテアーゼによる酵素消化を行い、GST を ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD から切り離して ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD を回収した。これを限外濾過により濃縮して -80°C で保存した。

(3) イオン交換クロマトグラフィー

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

(4) 結晶作製

ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD と BPAF の結合体結晶作製のために、Hampton Research 社製のスクリーニングキット Crystal Screen, Crystal Screen II、および Ion/PEG Screen で結晶化条件のスクリーニングを行った。ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD の物理量の 3 倍量になる BPAF を ER α (C381S, C417S, C530S)-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、3 種類の条件で結晶が形成され、これを最適化して最終的な結晶化条件を決定した。

(5) X 線回折データ収集およびプロセッシング

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

(6) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cで行った。ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD と各濃度の放射標識された BPAF を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の BPA を放射標識された BPA と併に加えることにより調べた。遊離の [^3H]BPAF はデキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

C. 研究結果

(1) BPAF と ER α 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、PEG3350 液中で塩化ナトリウムを晶出剤として結晶を得ることに成就した (図 1)。

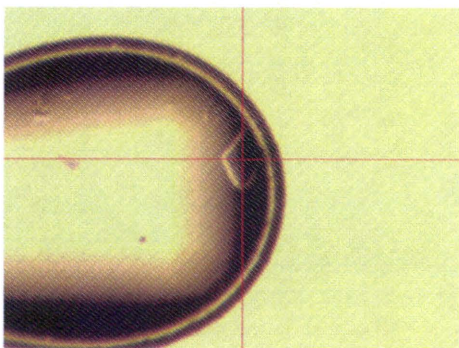


図 1. BPAF と ER α の結合体の結晶
中心付近の赤線が交差するところに
結晶がある。

(2) X 線回折データ収集および構造解析

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

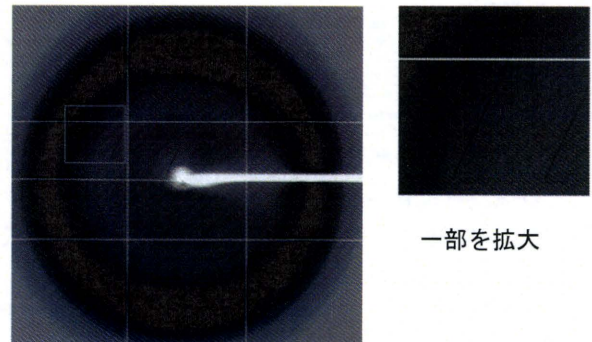


図 2. 結晶の回折結果
回折点が分離しておらず、
構造解析できなかった。

(3) タンパク質精製法の検討

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

(4) 結晶作製法の検討

タンパク質精製法を様々に検討したが、十分な回折を得る結晶作製には至らなかった。そこで、結晶作製法をハンギングドロップ法に加え、ナノリッター分注システムを用いたシッティングドロップ法でも行い、再度スクリーニングをやり直した。その結果、それまでの結晶化条件とはことなる沈殿剤組成である、0.2 M Mg(NO $_3$) $_2$ 、20% PEG3350 で結晶が

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

D. 考察

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

E. 結論

大腸菌で 3 箇所のシステイン残基をセリ

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

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

本件に関連する論文発表はまだ無い。

学会発表

本件に関連する学会発表はまだ無い。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

複数の鋳型を用いたドッキング計算によるリガンド結合性解析

分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院准教授

研究要旨

リガンド依存的に転写活性の調節を受ける核内受容体は、ホルモンなどのリガンドが核内受容体のリガンド結合部位と特異的に結合することで様々な生理作用を引き起こす。この核内受容体のリガンド結合部位へのリガンドの結合、そして両者の間の化学結合の形成が、正常な受容体活性化の最初期のイベントである。それとは逆に核内受容体を攪乱する化学物質も、同様に核内受容体のリガンド結合部位へと結合することで、その活性を発揮する。本研究では、従来実施されてきた *in vitro* 試験法や *in vivo* 試験法に加え、迅速かつ安全に化学物質の核内受容体攪乱リスクを試験可能な計算化学的手法を用いた、ドッキング計算手法に基づくリガンドの受容体結合性をスクリーニングする手法の開発を実施した。

本研究では、これまでに最も研究が進んでいる核内受容体の一つ・エストロゲン受容体 α 型をモデルとして取り上げた。この受容体では、複数の異なる活性を持つリガンドが結合した立体構造が同定されている。そこで、このエストロゲン受容体 α 型のリガンド結合部位構造を複数用いたドッキング計算を用いて、化学物質の受容体結合性が予測可能かの検討を行った。その結果、アルキルフェノール類、特に、1-アダマンチルフェノールの高親和性結合を予測可能であるなど、ドッキング計算の有用性が示された。

A. 研究目的

核内受容体は、シグナル分子である内在性のリガンドを特異的に自身のリガンド結合部位 (Ligand Binding Domain: LBD) に結合することでリガンドのシグナルを受領し、そのシグナルを起点に転写因子として働くことで情報伝達系において重要な役割を持つ。また、外来の内分泌攪乱物質と呼ばれる化学物質も同様に、核内受容体の LBD と結合して、受容体を活性化、もしくは不活性化するなど様々な作用を引き起こす。このリガンドと LBD との間で起こる化学結合の形成が、正常なホルモン活性や内分泌攪乱作用の最も初期段階のイベントである。

ところで、現在までに多くの化学物質の受容体結合性を解析する試験法が開発されてきた。それらは、*in vitro* の試験法である結合競争試験やレポーター遺伝子試験や実験動物を用いた *in vivo* 試験等である。それらを用いた試験により、これまでに多くの有用な試験結果が報告されており、それ

らの試験法の有効性は広く認められている。

一方、核内受容体には、女性ホルモン受容体などの性ホルモン受容体・ステロイドホルモン受容体が含まれる。ヒトゲノム解析研究が終了した結果、ヒトには少なくとも 48 種類の核内受容体が存在することが判明した。また、複数の核内受容体に対して高い結合性を示す化学物質が見いだされたため、すべての核内受容体に対する環境化学物質の影響が懸念されるようになった。そこで、環境化学物質の影響を正確に知るためには、多数の化学物質すべての核内受容体への影響を迅速に検討する必要性が高まった。

すべての化学物質の受容体結合性をタンパク質や細胞を用いた試験系や実験動物を用いる試験系で調査するには、膨大な手間がかかる。また、ラジオアイソトープの使用には制限が多く、放射標識リガンドの入手も簡便ではない。特に実験動物の使用は、近年代替法を用いるべきとして困難になっ

てきている。そこで、我々は計算化学的手法によりリガンドと受容体の結合性を予測する方法が構築できれば、近年のコンピュータの高速化と相まって、迅速な化学物質のリスクのスクリーニング法が構築されると考え本研究を実施することとした。

核内受容体の特異的なリガンドの結合に関与する領域・LBDは、リガンドを結合することで立体構造を変化させる。このLBDは12個の α -ヘリックスからなる。リガンド未結合状態（アポ型）とLBDにアゴニスト、もしくはアンタゴニストが結合した構造は互いに異なる。（図1）一般的なホルモン受容体は、リガンドがLBDに結合するとLBDのC末端に存在する第12番目の α -ヘリックスが構造と位置取りを変化させる。この構造変化が次なる情報伝達を引き起こす。

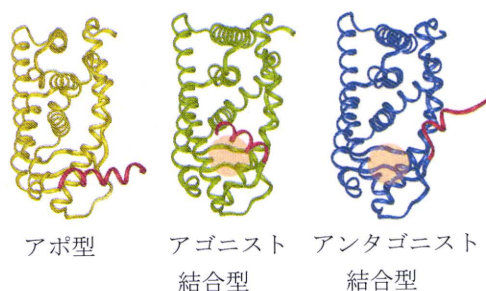


図1 核内受容体リガンド結合ドメインにおけるリガンド結合
赤で示す部分が第12 α -ヘリックス。

本研究では、上記の様に結合したリガンドの生物活性により立体構造を変化させるLBDを複数用いることで、リガンドの受容体結合性ひいては、生物活性を予測する事がドッキング計算により可能であるか検討することを目的とする。まずは、女性ホルモン受容体 α 型とアルキルフェノール類を題材として検討した（図2）。

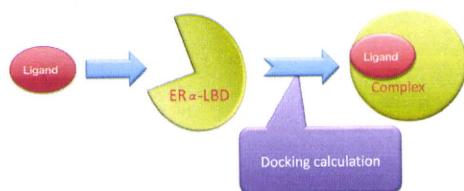


図2 ドッキング計算を用いた核内受容体リガンド結合ドメイン・リガンド複合体の予測

B. 研究方法

① 立体構造データの検索と入手

核内ホルモン受容体、エストロゲン受容体 ER α -LBD のアゴニスト結合型（1ERE, 3ERD）、アンタゴニスト結合型（1ERR, 3ERD）の立体構造は、PDB（Protein Data Bank）に登録されている。これらのX結晶構造解析データを、インターネットを通じて直接に入手した。

② 受容体構造の解析

PDBより入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム Discovery Studio（Accelrys社製）で解析した。コンピュータはSGI社製、グラフィックワークステーションFuelを使用した。

③ 水素原子の付加および構造最適化

PDBから入手したLBDの3次元構造データには水素に関する情報が無いため、Discovery studioを用いて水素原子を付加した後、分子力学計算モジュールCHRAMmにより構造最適化計算を行なった。

④ ドッキング計算

アルキルフェノール類とER α -LBDのドッキング計算は、4種類の受容体構造に対しドッキング計算プログラムAutoDock 3.0により行なった。

（倫理面への配慮）

本研究は、すべてをコンピューター上のバーチャル空間で実施するため、倫理上の問題は生じていない。

C. 研究結果

一般に、ドッキング計算により結合性化学物質を探索する研究は、新薬のシード（種）を探す目的で薬学関連研究において広く実施されている。本研究では、この探索手法における結合性表すスコアを利用して、環境化学物質の核内受容体結合性を評価できないかを検討したものである。

エストロゲン受容体 α 型（ER α ）は、いわゆる女性ホルモン受容体で、リガンドが受容体LBDに結合することで活性化コンホメーションを取っている。この活性化コンホメーションは、リガンドを結合したポケットに覆いかぶさるように第12番目の α -ヘリックスが位置している（図1）。一方、アンタゴ

ニストがリガンド結合ポケットに結合した場合、第12番目の α -ヘリックスは活性化コンホメーションで位置を占めていた場所には存在できなくなり、その結果、受容体活性を失っている(図1)。この位置取りを変化させているのはアンタゴニスト分子の構造そのものであり、 $ER\alpha$ は分子構造が異なる様々なアゴニストとアンタゴニストを自分のリガンド結合ポケットの構造を変化させることで結合させている。ところで、環境化学物質の受容体結合リスクを適切に評価するには、アゴニストと同様に受容体に結合する化学物質のみならず、アンタゴニストと同様に受容体と結合する化学物質をもスクリーニングする必要がある。そこで、本研究においては、アゴニスト結合型の受容体構造2種およびアンタゴニスト結合型の受容体構造2種の計4種類の受容体構造を用いて検討を実施した。ドッキングに使用した化学物質は、合計18種類のフェノール基を有する化合物である。

まず、既知のアゴニスト(17 β -エストラジオール(E2)、DES)およびアンタゴニスト(ラルキシフェン(RAL)、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT))を用いて検討を実施した。この結果、アゴニストは、 $ER\alpha$ の活性化型コンホメーションと、アンタゴニストはアンタゴニスト結合型コンホメーションとより高い結合親和性を持つことが判明した。

今回研究に用いた化学物質の計算結果を図3に示す。縦軸に計算された予想結合エネルギー(ΔG)を、横軸にアゴニスト型とアンタゴニスト型のどちらの受容体構造に親和性を示すかを示すパラメータ($\Delta\Delta G$)を取り、計算に用いた化学物質をプロットしたところ、既知のアゴニスト(E2、DES)は左側、結合エネルギー-8 kcal/mol以下の領域に、既知のアンタゴニスト(RAL、4-OHT)は右側、結合エネルギー-8 kcal/mol以下の領域に位置した。また、4-アダマンチルフェノール(ADA)は、アゴニスト性の結合物質として指摘された。そこで、ADAに対して結合競争試験とレポーター遺伝子試験を実施したところ、受容体結合性とアゴニスト活性が確認された。

D. 考察

本研究では、ドッキング計算を用いて種々の化学物質と $ER\alpha$ -LBDの結合性を予測可能か検討した。また、得られた計算結果

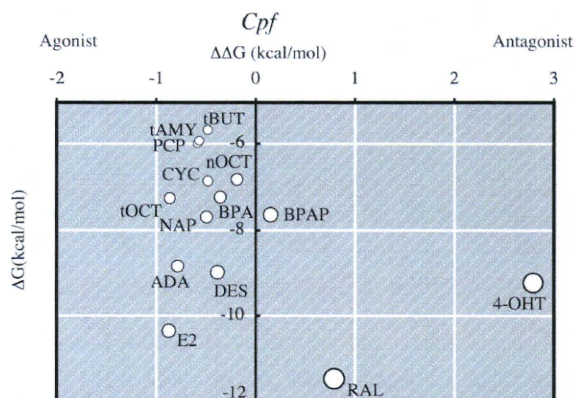


図3 4つの鑄型を用いたドッキング計算により予測された種々の化学物質の $ER\alpha$ -LBDとの結合性と生物活性

縦軸(ΔG): ドッキング計算により算出された平均の結合性パラメーター(単位 kcal/mol)

横軸($\Delta\Delta G$): ドッキング計算により算出された、アゴニスト結合型およびアンタゴニスト結合型への結合性パラメータの差

○印は、分子の大きさを示す。

から、化学物質の生物活性を推定することが可能かについても検討を行った。今回の結果からは、類似の構造要因(フェノール基)を持つ化合物群においては、計算による結合性リスク評価と生物活性の予測が可能であることが示された。今後は、さらに多様な化学物質に対する計算によるリスク評価が可能となるように、計算手法の最適化、適切な受容体構造の選択等を実施して行く必要があると考えられた。

E. 結論

今年度の本研究では、エストロゲン受容体 α 型とアルキルフェノールの結合性が正しく予想されるかについて、ドッキング計算を用いて精査した。その結果、既知のアゴニスト、アンタゴニストおよび結合性を示す4-(1-アダマンチルフェノール)における結合性と生物活性を正しく予測した計算結果が得られ、ドッキング計算の有用性が示された。

F. 健康危険情報

該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. Exploration of endocrine-disrupting chemicals on estrogen receptor α by the agonist/antagonist differential-docking screening (AADS) method: 4-(1-Adamantyl)phenol as a potent endocrine disruptor candidate, Takeru Nose, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi, *Toxicology Letters.*, 191(1), 33-39 (2009).

2. The Agonist/Antagonist Differential-docking Screening (AADS) Method for Exploration of the Estrogen Receptor-binding Chemicals, Takeru Nose, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi, *Peptide Science* 2009, 463-464 (2010).

学会発表

1. 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、2009. 5. 16-17。

2. Takeru Nose, and Yasuyuki Shimohigashi, In silico screening of endocrine disrupting chemicals for estrogen receptor: A novel docking method for estimation of binding and biological activities, The 19th Joint Seminar between the Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan, 2009. 5.29~30.

3. Mitsuhiro Nishigori, Takeru Nose, Satoshi Murata, Yusuke Nagata, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi, Screening of Endocrine Disruptors for Retinoid-related Orphan Receptor β (ROR β) by the Competitive Receptor Binding Assay, The 19th Joint Seminar between the Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan, 2009. 5.29~30.

4. 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 におけるヘム結合性の解析、第46回化学関連支部合同大会、2009. 7. 11。

5. 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、2009. 10. 22~24.

6. 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回日本ペプチド学会、2009. 11. 4~6。

7. 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。

8. 野瀬 健、下東康幸、女性ホルモン受容体の化学物質結合性予測計算における受容体構造の役割、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。

9. 野瀬 健、錦織充広、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。

10. 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
2010. 12. 16~17。

H. 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

エストロゲン関連受容体 γ の変異受容体による化学物質結合部位解析

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

ヒト・エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ : ERR γ ）は、リガンドなしで活性化状態にある「自発活性型」核内受容体である。内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールA（BPA）は、低用量で脳神経系や生殖系で悪影響を及ぼす化学物質として、ヒトへのリスクが強く懸念されている。我々は最近、BPAがERR γ に非常に強く結合することを発見した。さらに、BPA/ERR γ -LBD（リガンド結合ドメイン）複合体のX線結晶構造解析では、この結合にはERR γ ヘリックス12（H12）のPhe450による結合ポケット充填が必須であると示唆された。一方、ERR γ を不活性にする4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）は、H12との相互作用はなく、むしろ、受容体の構造要因が必要では？と推定された。そこで、本研究では、ERR γ -H12の受容体のリガンド結合選択性および受容体活性化機構への関与の解明を目的とし、H12を段階的に削除して、部分的欠損変異受容体はBPAおよび4-OHTとの結合性、受容体の自発活性化への影響を解析した。これらの解析により、ERR γ のビスフェノールA結合および自発活性には、H12が必須な構造要因であることが証明された。

A. 研究目的

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、ステロイドホルモン受容体グループに分類される。ヒトでは α 、 β 、 γ 型の3つのサブタイプが存在し、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い。さらに、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。ERR γ は、ヒト成人では脳や脾臓、肺、骨髄、副腎、前立腺、胃など高濃度に発現しており、また、胎盤には最も高濃度の発現している。特に注目されるのは、ヒト胎児で脳に非常に高濃度に発現していることである。

さらに、ERR γ は、脳の性分化や成熟、脳神経系の発達に関与していると推測されている。

一方、内分泌攪乱化学物質、いわゆる「環境ホルモン」の問題は、数年前まで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）および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ていたが、現在は、ヒト・ゲノム解析から判明したヒト核内受容体の合計48種類すべてにきわめて高リスクである可能性が強く懸念されるようになってきた。こうしたなか、我々は2006年に、内分泌攪乱物質であるビスフェノールA（BPA）はERR γ と非常に強く結合し、ERR γ の高い自発活性を保持することを明らかにした。

BPA は、女性ホルモン様作用を示すとされてきた内分泌攪乱物質であるが、ER への直接の作用は人間の体内で作られるエストロゲン 17 β -estradiol の 1/1,000~1/10,000 と非常に弱いものである。しかしながら、近年、BPA についてきわめて低濃度において脳の性分化、成熟、さらに生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす「低用量効果」が明らかとなり、この作用機序、分子メカニズムの解明が急務となっている。こうしたなか、BPA が ERR γ に非常に強く結合するということから、BPA が「低用量で攪乱作用を示す機構」と「脳神経系の発達を攪乱する分子機構」に ERR γ が関与している可能性が強い。

我々は最近、BPA/ERR γ -LBD (LBD; リガンド結合ドメイン) 複合体の X 線結晶構造解析に成功した。この結合には、ERR γ ヘリックス 12 (H12) の Phe450 および Leu454 の結合ポケット充填が必須であると示唆された。その結果、ERR γ を不活性化する 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は、H12 との相互作用はなく、むしろ、他の受容体構造要因が必要では? と推定された。

そこで、本研究では、受容体自発活性化およびリガンド結合の選択性における構造要因の解明を目指して、ERR γ の H12 を段階的に削除して受容体のリガンド結合性および自発活性化への影響を解析することにした。このことは、BPA の結合に必要な構造要因のみならず、受容体活性コンホメーションについての構造情報をもたらすと期待される。

B. 研究方法

(1) ERR γ 変異体の設計

ERR γ の自発活性およびリガンド結合選択性に関して H12 どのぐらい残基が必要なのか? を調べるため、ERR γ の C 端側からアミノ酸 1 残基ずつ削除して 3 種類、さらには、H12 から 1 または 3 残基ずつ削除して 10 種類、合計 13 種類の部分欠損 ERR γ 変異受容体を設計した (図 1)。

(2) 変異受容体の作製

ヒト腎臓の cDNA を鋳型として、PCR の増幅より、ERR γ の LBD (222-458 aa) および全長領域のクローニングを行った。さらに、

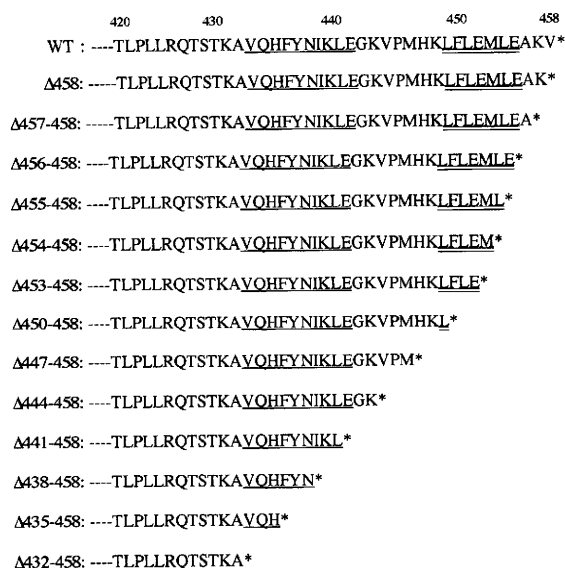


図 1. H12 の段階的削除変異受容体の概略図

(“—”: H11 相当する部位; “—”: H12 相当する部位)
(C 端側 458 の 1 アミノ酸残基削除を Δ 458 で表記、以下表記方法同じ)

得られた野生型 (WT) の WT-ERR γ -LBD および WT-ERR γ -full length を鋳型として 13 種類の LBD および full-length 変異受容体を作製した。変異された LBD および全長はそれぞれ発現ベクター pGEX-6p-1 および pcDNA3.1(+) に組み換えた後、塩基配列を確認した。

(3) 変異受容体タンパク質の調製

得られた ERR γ -LBD/ pGEX-6p-1 変異受容体は、大腸菌 (BL21) を用いて GST との融合タンパク質として大量発現をした。1 mM イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で 37 $^{\circ}$ C、3 時間、発現誘導させ、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した。20 mM のグルタチオンでビーズより溶出後、Sephadex G-10 で脱塩して、Bradford 法でタンパク質濃度を測定した。

(4) 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 $^{\circ}$ Cで行った。野生型および各種変異受容体 GST-ERR γ -LBD と各濃度の放射標識された BPA または 4-OHT を binding buffer 中で混合

し、2時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の BPA または 4-OHT を放射標識された BPA または 4-OHT と共に加えることにより調べた。遊離のリガンドは 1% 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。受容体の結合解離定数 (K_d) および最大結合濃度 (B_{max}) はスキッチャードプロット解析により算出した。

(5) レポーター遺伝子アッセイ試験

ヒト子宮ガン細胞である HeLa 細胞を用いて、全長の野生型 (WT) および各種変異受容体 $ERR\gamma$ 発現プラスミドと 3 × ERRE ルシフェラーゼレポータープラスミドを遺伝子導入し、一過性の強制発現を行った。24 時間インキュベート後、化学物質を暴露した。さらに 24 時間後、ルシフェラーゼ活性は発光基質を用いて測定した。WT- $ERR\gamma$ が自発的に持っているルシフェラーゼ活性を 100% として、各誘導受容体の転写活性を評価した。

C. 研究結果

(1) BPA に対する結合試験

$ERR\gamma$ -LBD-WT 受容体の飽和結合試験

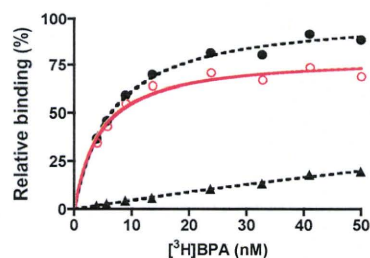
$ERR\gamma$ -LBD-WT はグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌で発現した。放射標識された BPA ($[^3H]$ BPA) を用いて、飽和結合試験を行った。スキッチャードプロット解析を行った。

測定の結果、 $ERR\gamma$ -LBD-WT の K_d 値は 5.7 nM であり、 B_{max} は 18.4 nmol/mg であった。これは理論値 B_{max} (18.9 nmol/mg) とほぼ一致した (図 2)。この結果より、BPA の $ERR\gamma$ に対する結合は、生体内で機能するホルモンとその受容体の結合親和性に匹敵するほど強いものであることが改めて確認された。

$ERR\gamma$ -LBD 変異受容体の飽和結合試験

$ERR\gamma$ -LBD の C 端側アミノ酸の削除による、BPA の結合性への影響を調べるため、13 種の変異受容体を作製した。これら 13 種の変異受容体は、WT と同様にグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌で発現・精製した。 $[^3H]$ BPA を用いて、 $ERR\gamma$ -LBD-WT と同じ反応温

度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件 (A)



(B)

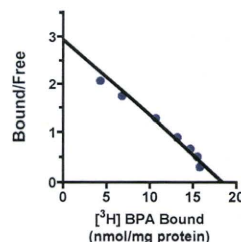


図 2. $ERR\gamma$ -WT 飽和結合試験

(A) $ERR\gamma$ に対する $[^3H]$ BPA の全結合(●)、特異的結合(○)、非特異的結合(▲)を示す。

(B) スキッチャードプロット解析

で飽和結合試験を行った。その結果、C 端側の 3 残基を 1 残基ずつ削除した場合— $\Delta 458$ 、 $\Delta 457-458$ 、 $\Delta 456-458$ 受容体は BPA との結合性は逐次に弱くなった。さらに H12 から 1 または 3 残基ずつ削除すると、BPA と全く結合しないことが分かった。

(2) 4-OHT に対する結合試験

$ERR\gamma$ -LBD-WT 受容体の飽和結合試験

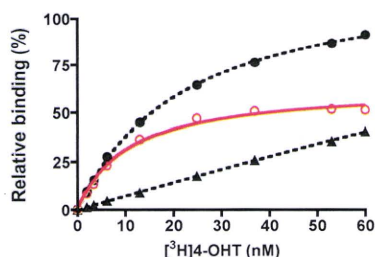
前述で得られた $ERR\gamma$ -LBD-WT タンパク質について、 $[^3H]$ 4-OHT を用いて、飽和結合試験を行った。スキッチャードプロット解析を行った結果、 K_d 値は 10.1 nM であった。しかし、 B_{max} は 2.20 nmol/mg であり、理論値 (18.9 nmol/mg) の約 1/10 しかなかった (図 3)。4-OHT 分子は BPA より約 2.5 倍大きく、結合によって、H12 は活性化コンホメーションより離れることから、4-OHT と受容体の結合は H12 必要ではなく、逆に邪魔になると考えられた。

$ERR\gamma$ -LBD 変異受容体の飽和結合試験

$[^3H]$ 4-OHT を用いて $ERR\gamma$ -LBD 変異受容体タンパク質との飽和結合試験を行った結果、変異受容体はいずれとも 4-OHT と結合することが分かった。スキッチャードプロット解析により K_d 値および B_{max} 値を算出し

た。その結果、H12 部分的欠損の変異受容

(A)



(B)

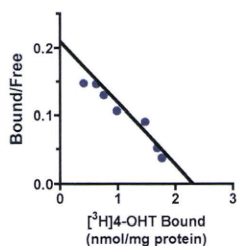


図 3. ERRγ-WT 飽和結合試験

(A) ERRγに対する³H]4-OHTの全結合(●)、特異的結合(○)、非特異的結合(▲)を示す。

(B)スキャッチャードプロット解析

体Δ456-458、Δ455-458、Δ454-458、Δ453-458、Δ450-458 は WT に対するのと同様の³H]4-OHT 結合性を示した。また、H12 と H11-H12 loop とも欠損の変異受容体 Δ441-458 も同様であった。H12 全欠損に加え、H11-H12 loop 部分的削除した変異受容体 Δ447-458 およびΔ444-458 は、³H]4-OHT との結合性が WT の3~4倍弱くなった。H11 部分的削除した変異受容体 Δ438-458、Δ435-458、Δ432-458 は、³H]4-OHT と結合性が弱く、解析できなかった(図4)。

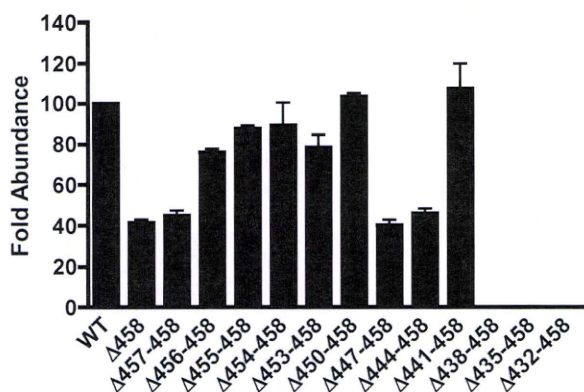


図 4. スキャッチャードプロット解析計算より、各受容体は³H]4-OHT に対する K_d 値の比較。

(WT の K_d 値は 1 とする)

以上のことから、4-OHT と ERRγ の結合に H12 は不必要なことが示された。さらに、H11 と H12 の存在はこの間の loop 構造を安定させるが、H12 が欠失すると、loop 構造は不安定になると考えられる。すなわち、H11-loop-H12 の loop 構造に何が特別な役割があることが考えられる。しかも、H11 構造は受容体と 4-OHT 強い結合に重要な構造であると考えられる。

(3) レポーター遺伝子アッセイ試験

ERRγはリガンドなしでも高い活性化能を持つ「自発活性化型」核内受容体である。そこで、H12 を部分的および全て削除して、受容体の自発活性化への影響を解析するため、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより転写活性を評価した。pcDNA3 からベクターの活性は 1 とすると、WT-ERRγの自発活性は約 4 倍の高い活性を示した。C 端側の 3 残基は 1 残基ずつ削除しても自発活性に何の影響もないものの、H12 を一部でも削除した変異受容体は自発活性を完全に失うことが判明した(図5)。これらの結果により、ERRγのビスフェノールA 結合および自発活性には、H12 が必須な構造要因であることが証明された。

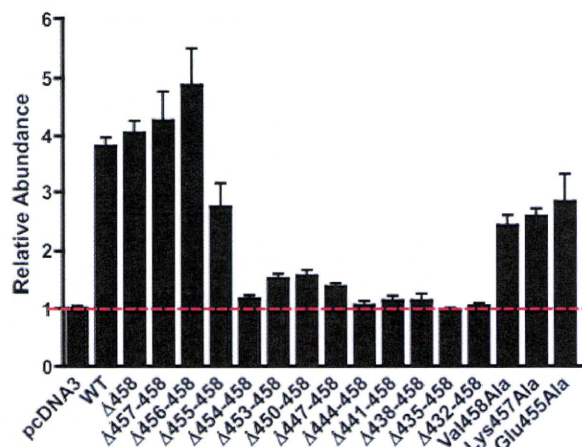


図 5. レポーター遺伝子アッセイ試験

(pcDNA3 空ベクターの活性は 1 とする)

D. 考察

BPA/ERRγ-LBD 複合体の X 線結晶構造解析より、BPA と ERRγの結合には、ヘリック

ス 12 (H12) の Phe450 および Leu454 の結合ポケット充填が必須であると示唆された。さらに、ERR γ の点変異解析より、Phe450 および Leu454 残基を Ala に変異させると BPA と全く結合しないものの、一方で 4-OHT とは強く結合することが以前の研究から分かった。こうして、ERR γ のインーバスアゴニストである 4-OHT との結合は、H12 との相互作用はなく、むしろ、他の受容体構造が必要ではないと推定された。今回は、ERR γ -LBD の C 端から 1 または 3 残基ずつを逐次に削除した部分構造欠損型の 13 種の変異受容体を作製し、GST 融合タンパク質として発現して、 $[^3\text{H}]$ BPA および $[^3\text{H}]$ 4-OHT を用いた結合試験によりリガンド結合の選択性を詳細に解析した。その結果、H12 部分および全欠損型受容体は BPA と全く結合しない、一方、4-OHT はいずれとも非常に強く結合することから、その結合に H12 は不要な構造であることが判明した。このことは、同じ受容体に結合する化学物質であっても、その結合様式が全く異なることを示している。また、受容体がこうした化学物質にそれぞれに対し結合構造要因を持っていることを示している。

さらに、変異受容体の自発活性化を調べたところ、ERR γ は高い活性化を示し、C 端側の 3 残基は 1 残基ずつ削除しても受容体の自発活性に何の影響もないものの、H12 を一部でも削除した変異受容体は自発活性を完全に失うことが判明した。以上の結果により、ERR γ のリガンド結合性の選択性および自発活性に対して、H12 が必須な構造要因であることが証明された。自発活性化型核内受容体はすべて、このような活性構造を持っているのかも知れない。

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

F. 研究発表

論文発表

1. Functional role of the C-terminal helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor γ (ERR γ). Xiaohui Liu, Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, and Yasuyuki Shimohigashi: *Peptide Science* 2009, 435-436 (2010).
2. Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR γ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. Xiaohui Liu, Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, and Yasuyuki Shimohigashi: *J. Biochem.* 148, 247-254 (2010).

学会発表

1. 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 (ERR γ) 誘導体のリガンド結合選択性および自発活性要因の解析、日本生化学会九州支部例会、2009.5.16-17。
2. 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、2009.10.21-24。
3. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸、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。
4. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸、ヒト核内受容体 ERR γ ・C 端ヘリックス 12 のリガンド結合性および受容体活性化機構への役割、日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会、2009.12.7-8。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

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

X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, Y. Shimohigashi	Functional Role of the C-terminal Helix 12 Peptide in the Receptor Activation Mechanism of Estrogen-related Receptor γ (ERR γ)	<i>Peptide Science</i> 2009	2009	435-436	2010
T. Nose, T. Tokunaga, Y. Shimohigashi	The Agonist/Antagonist Differential-docking Screening (AADS) Method for Exploration of the Estrogen Receptor-binding Chemicals	<i>Peptide Science</i> 2009	2009	463-464	2010
岡田浩幸, 下東康幸	放射標識化合物を用いた受容体結合試験による特異的受容体の同定・解析：ビスフェノールAが結合する特異的受容体 ERR γ	<i>RADIOISOTOPES</i>	58	43-46	2009
T. Nose, T. Tokunaga, Y. Shimohigashi	Exploration of Endocrine Disrupting Chemicals on Estrogen Receptor α by the Agonist/Antagonist Differential-docking Screening Method	<i>Toxicology Letters</i>	191(1)	33-39	2009
Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi	Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR γ isoform	<i>Journal of Biochemistry</i>	146	113-122	2009
S. Ikeda, A. Matsushima, Y. Shimohigashi	ER α /ERR α Nuclear Receptor Heterodimer Directly Linked by A Flag Peptide	<i>Peptide Science</i> 2008	2008	511-512	2009
Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi	Bisphenol A-Specific Nuclear Receptor ERR γ : Structure-Function Analysis of the Two Novel Isoforms Lacking Vital Peptide Fragment in the Ligand Binding Domain.	<i>Peptide Science</i> 2008	2008	517-518	2009

A. Matsushima, H. Okada, X. Liu, T. Tokunaga, T. Takemoto, Y. Kakuta, Y. Shimohigashi	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)	<i>Peptide Science</i> 2008	2008	521-522	2009
H. Okada., T. Tokunaga., X. Lui, S. Takayanagi, A. Matsushima, Y. Shimohigashi	Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-related Receptor γ (ERR γ).	<i>Environmental Health Perspectives</i>	116	32-38	2008
A. Matsushima, Y. Shimohigashi	A strategy to explore the target receptor of endocrine disruptors: Estrogen-related receptor γ (ERR γ) as a genuine acceptor of Bisphenol A	<i>Alternatives to Animal Testing and Experimentation</i>	14 Special Issue	495-497	2008
Y. Akahori, M. Naki, K. Yamasaki, M. Takatsuki, Y. Shimohigashi, M. Ohtaki	Relationship between the Results of <i>in vitro</i> Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor and <i>in vivo</i> Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals.	<i>Toxicology in Vitro</i>	22	225-231	2008
M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, Y. Shimohigashi	The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family.	<i>Peptide Science</i> 2007	2007	491-492	2008
T. Nose, Y. Shimohigashi	A docking Modelling Rationally Predicts Strong Binding of Bisphenol A to Estrogen-Related Receptor γ	<i>Protein & Peptide Letters</i>	15	290-296	2008
A. Matsushima, T. Teramoto, H. Okada, X. Lui, T. Tokunaga, Y. Kakuta, Y. Shimohigashi	ERR γ Tethers Strongly Bisphenol A and 4- α -Cumylphenol in an Induced-fit Manner.	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	373	408-413	2008

D. Asai, T. Tokunaga, K. Kondo, T. Kawaguchi, S. Takayanagi, T. Shinmyozu, M. Nakai, Y. Yakabe, Y. Shimohigashi	Direct Measure of Fluorescence Intensity for Efficient Receptor-binding Assay: Conjugates of Ethinylcarboxyestradiol and 5 (and 6) -Carboxyfluorescein via α , ω -Diaminoalkanes as a Tracer for Estrogen Receptor.	<i>Journal of Biochemistry</i>	143(6)	781-792	2008
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------	--------	---------	------

研究成果の刊行物・別刷

Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus¹

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

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

ABSTRACT

The balance between androgens and estrogens is very important in the development of the prostate, and even small changes in estrogen levels, including those of estrogen-mimicking chemicals, can lead to serious changes. Bisphenol A (BPA), an endocrine-disrupting chemical, is a well-known, ubiquitous, estrogenic chemical. To investigate the effects of fetal exposure to low-dose BPA on the development of the prostate, we examined alterations of the in situ sex steroid hormonal environment in the mouse urogenital sinus (UGS). In the BPA-treated UGS, estradiol (E_2) levels and CYP19A1 (cytochrome P450 aromatase) activity were significantly increased compared with those of the untreated and diethylstilbestrol (DES)-treated UGS. The mRNAs of steroidogenic enzymes, *Cyp19a1* and *Cyp11a1*, and the sex-determining gene, *Nr5a1*, were up-regulated specifically in the BPA-treated group. The up-regulation of mRNAs was observed in the mesenchymal component of the UGS as well as in the cerebellum, heart, kidney, and ovary but not in the testis. The number of aromatase-expressing mesenchymal cells in the BPA-treated UGS was approximately twice that in the untreated and DES-treated UGS. The up-regulation of *Esrrg* mRNA was observed in organs for which mRNAs of steroidogenic enzymes were also up-regulated. We demonstrate here that fetal exposure to low-dose BPA has the unique action of increasing in situ E_2 levels and CYP19A1 (aromatase) activity in the mouse UGS. Our data suggest that BPA might interact with in situ steroidogenesis by altering tissue components, such as the accumulation of aromatase-expressing mesenchymal cells, in particular organs.

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

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

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

³These authors contributed equally to this work.

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

Received: 27 July 2010.

First decision: 19 August 2010.

Accepted: 15 November 2010.

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

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

ISSN: 0006-3363

INTRODUCTION

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

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

Some EDCs are reported to alter the in situ sex steroid hormonal environment in the reproductive system. The triazine herbicide atrazine binds directly to adrenal-4-binding protein/steroidogenic factor-1 (official symbol NR5A1) and increases CYP19A1 (cytochrome P450 aromatase) expression and, ultimately, estradiol (E_2) production in human genital cancer cell lines [13]. The aryl hydrocarbon (dioxin) also increases CYP19A1 (aromatase) expression mediated by its receptor in mouse ovaries [14]. In contrast, the phosphorothioate insecticide profenofos increases the expression of steroidogenic genes

and testosterone levels in rat testes [15]. Recently reported adverse effects of BPA on in situ steroidogenesis include increased testosterone levels in mouse Leydig cells and decreased E_2 levels in porcine ovarian granulosa cells [16, 17]. Thus, BPA may have the potential not only to mimic estrogenic action but also to alter in situ steroidogenesis in the prostate as well as other reproductive organs.

To investigate the effects of fetal exposure to low-dose BPA on in situ steroidogenesis in the developing prostate, we first measured sex steroid hormone levels and CYP19A1 (aromatase) activity in the BPA-treated mouse urogenital sinus (UGS), from which the prostate develops embryologically. Subsequently, we examined the alterations of steroidogenic enzyme gene expression to confirm the alterations of the in situ sex steroid hormonal environment in the BPA-treated mouse UGS. Finally, we identified the BPA-specific biological effects for in situ steroidogenesis during fetal prostate development.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In the present study, 36 pregnant female C57BL/6 mice were purchased on the 12th day of gestation from Japan SLC, where the breeding strategy was to mate three female C57BL/6 mice (age, 10 wk) with one male overnight and separate them the next morning (plug date denoted as Day 0). All animals were housed individually in chip-bedded polyolefin cages in a room with controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity (45 to 65%) on a 12L:12D photoperiod. Mice were fed a low-phytoestrogen diet (NIH-07PLD; Oriental Yeast Co.) and tap water ad libitum.

Chemicals

For the present study, both BPA and DES with a purity of 99% or greater were purchased from Nacalai Tesque and Wako Pure Chemical Industries, respectively.

Fetal Exposure to Chemicals

We randomly assigned 36 pregnant female C57BL/6 mice to three different treatment groups: BPA ($20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, $n = 12$) or DES ($0.2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, $n = 12$), both of which were dissolved in tocopherol-stripped corn oil (MP Biomedical, Inc.), administered by oral gavages on Embryonic Day (E) 13 to E16 and the control group, in which pregnant mice were fed tocopherol-stripped corn oil (2 ml/kg , $n = 12$). Previously, our group reported that this protocol of fetal exposure to BPA and DES resulted in similar histopathological changes of adult prostate—that is, increased basal epithelial cell number and induction of cytokeratin 10, a classic marker associated with squamous differentiation, in such cells [8]. Our dose level of BPA for the present study was also based on reported results suggesting that BPA is less than 100-fold less potent than DES. The Mie University's Committee on Animal Investigation approved the experimental protocol.

Termination and UGS Dissection

Between E17 and Postnatal Day (P) 1, all animals were terminated by an overdose of isoflurane followed by cervical dislocation. For each of the three groups, from 15 to 18 fetuses (both male and female) from three pregnant mice were collected at E17, E18, P0, and P1. The bladder and urethra were removed and dissected to isolate the UGS, and then the five or six UGS obtained were pooled as one sample. Thus, the 15–18 UGS were divided into three samples at each time point. The UGS, cerebellum, heart, kidney, testis, and ovary were collected in RNAlater (Applied Biosystems).

To isolate pure UGS, other tissues, such as the bladder, urethra, Wolffian duct, seminal vesicle, and Mullerian duct, were removed from both the male and female urogenital tracts. The histopathology of the mouse UGS was then examined by hematoxylin-and-eosin staining.

Measurements of In Situ E_2 Levels and CYP19A1 (Aromatase) Activity in UGS

The E_2 levels and CYP19A1 (aromatase) activity in UGS were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [18] and a tritiated water

release assay [19], respectively, which were made available by Aska Pharma Medical. Briefly, the organs were homogenized, and the extracts were applied to a C18 Amprep solid-phase column (Amersham Biosciences) to remove contaminating fats. The E_2 was then separated using a normal-phase high-performance liquid chromatography system (Jasco) with a silica gel column (Cosmosil 5S1; Nacalai Tesque), and 100 pg of isotope-labeled [$^{13}\text{C}_4$] E_2 were added to extracts. The evaporated extracts were reacted with 5% pentafluorobenzyl bromide/acetonitrile, under KOH/ethanol, for 1 h at 55°C . After evaporation, the products were reacted with 100 ml of picolinic acid solution (2% picolinic acid, 2% 2-dimethylaminopyridine, and 1% 2-methyl-6-nitrobenzoic acid in tetrahydrofuran) and 20 ml of triethylamine for 0.5 h at room temperature. The reaction products were dissolved in 1% acetic acid and then purified using a Bond Elute C18 column (Varian). The products were measured with a reverse-phase liquid chromatograph (Agilent 1100; Agilent Technologies) coupled with an API 5000 triple-stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems) in the positive-ion mode. This device monitored the m/z 558 to m/z 339 (E_2) and m/z 562 to m/z 343 ([$^{13}\text{C}_4$] E_2) transitions.

The tritiated water release assay was used for the measurement of CYP19A1 (aromatase) activity. This method measures the production of $^3\text{H}_2\text{O}$, which forms as a result of aromatization of the substrate [1b- ^3H]androst-4-ene-3,17-dione (New England Nuclear). Serum-free medium containing [1b- ^3H]androst-4-ene-3,17-dione solution (54 nM) was prepared, of which 0.5 ml was added to each sample. After incubation for 1 h, the samples were placed on ice, and 200 μl of culture medium were withdrawn. The medium was extracted with 500 μl of chloroform, vortexed, and then centrifuged for 1 min at $9000 \times g$. A 100- μl aliquot of the aqueous phase was mixed with 100 μl of a 5% (wt/vol) charcoal/0.5% (wt/vol) dextran T-70 suspension, vortexed, and then incubated at room temperature for 10 min. Then, after centrifugation of the solution for 5 min at $9000 \times g$, a 150- μl aliquot was removed for measurement of radioactivity by liquid scintillation.

RNA Extraction and cDNA Preparation

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc.) in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA concentration was then determined spectrophotometrically by a multidetection microplate reader (Dainippon Sumitomo Pharma Co.). From 50 ng of total RNA, cDNA was reverse transcribed using oligo(dT) and Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen) as previously described [8].

Analysis of Gene Expression Profile

For determining gene expression profiles of the male UGS, GeneChip analysis with the Percellome method was performed [20]. Briefly, organs were prepared using RLT buffer (Qiagen, Inc.). Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit. First-strand cDNA was synthesized by incubating 5 mg of total RNA with a T7 oligo(dT) primer (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The dsDNA was mixed with T7 RNA polymerase (Enzo Biochem, Inc.). During the in vitro transcription, generated cRNAs were labeled with biotin-16-UTP and biotin-11-CTP (Enzo Biochem, Inc.). The purified cRNA was fragmented at 300–500 bp into the target solution. Hybridization was performed with the GeneChip Mouse Genome 430 Version 2.0 (Affymetrix, Inc.) at 45°C for 18 h after staining with streptavidin-R-phycoerythrin conjugates (Molecular Probes, Invitrogen). The reacted arrays were then scanned as digital image files, and the scanned data were analyzed with GeneChip Operating Software (Affymetrix, Inc.). The expression data were converted to copy numbers of mRNA per cell by the Percellome method, quality controlled, and analyzed using Percellome software [20].

Real-Time PCR Analysis

Real-time PCR was carried out in the iCycler iQ Detection System (Bio-Rad Laboratories) with iQ SYBR-Green Supermix reagents (Bio-Rad Laboratories) as previously described [8]. The PCR amplification reaction was performed with specific primers as shown in Table 1. After PCR, melting-curve analysis was performed to verify specificity and identity of the PCR products. All data were analyzed with the iCycler iQ Optical System Software Version 3.0A (Bio-Rad Laboratories). All PCR data were normalized to *Gapdh* mRNA.

Preparation of Primary Cultured Mesenchymal Cells from UGS

The UGS were dissected from the fetuses and separated into UGE and urogenital sinus mesenchyme (UGM) by tryptic digestion and mechanical separation as previously described [21]. UGM were cultured in RPMI-1640