

3. エストロゲン様/抗エストロゲン作用の測定
エストロゲン様活性の評価では試料溶液による単独処理時の吸光度を、陽性対照である 100 nM E₂ 処理時の吸光度と比較した。抗エストロゲン活性及び細胞毒性の評価では試料溶液と共に 1 nM E₂ を添加し、同様の操作を行った。

エストロゲン様活性については陽性対象の 10% 以上の β -galactosidase 活性を示したものを活性ありと定義した。抗エストロゲン活性については Positive control の β -galactosidase 活性を 20% 以上抑制した物質を活性ありと定義した。陽性対象としてエストロゲン様活性評価には E₂ 100 nM を、抗エストロゲン活性評価には E₂ 1 nM を用いた。測定結果から、試験物質 (10 μ M) が示す各活性の強さをエストロゲン様活性の場合は E₂ (100 nM) の活性に対する値 (Induction) として、抗エストロゲン活性の場合は E₂ (1 nM) の活性を阻害する値 (Inhibition) として百分率を求めた。

尚、酵母 two-hybrid アッセイ法を用いてエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定する場合、化学物質の毒性がその評価の妨げとなる。抗エストロゲン活性の測定においては、E₂ による β -galactosidase 誘導の活性の低下が試験物質のアンタゴニスト活性によるものか、酵母への毒性によるものかは区別することができない。そこで *Saccharomyces cerevisia* Y190 株に GAL4-DBD と p53 の融合蛋白を産生するプラスミド (pGBKT7-53) 及び GAL4-AD と SV40 large T 抗原の融合蛋白を産生するプラスミド (pGADT7-T) を導入し、恒常的に β -galactosidase を発現する酵母を用いて各試験物質の酵母への影響を検討し、 β -galactosidase 活性の低下が 10% 以内となるとき影響が無いと判断した。

4. 物理化学的特性の測定

以上の被検化合物について、物理化学的特性

(パラメータ) (環数、長軸長/短軸長比、水酸基等の官能基と最遠水素との間の距離、分極率等) を計算化学統合プラットフォーム (SCIGRESS) で算出した (詳細は、細井信造分担研究報告に記載)。

C. 研究結果

1. OHPAH 類の活性

PAH とモノ水酸化体 (OHPAH) の hER \cdot におけるエストロゲン様及び抗エストロゲン活性の測定結果を Table 1 にまとめた。被検物質のエストロゲン様または抗エストロゲン活性の強さを評価するために陽性対照としてそれぞれ E₂、4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) を用いた。即ち、被検物質が示す各活性の強さをエストロゲン様活性の場合は E₂ の活性に対する相対値として、抗エストロゲン活性の場合は 4-OHT の活性に対する相対値として表した。

Table 1 より、母核構造の PAHs はエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を示さないが、OHPAH のいくつかは活性を示すことが明らかとなった。さらに、活性の強さは OHPAH を構成するベンゼン環の数によって異なる傾向が見られた。例えば、2 環構造を持つ OHNaP は活性をほとんど示さなかったが、3 環構造を持つ 2-OHFlu、2-OHPhe は比較的強いエストロゲン様活性を示した。4 環構造を持つ OHPAH については、多くの化合物がエストロゲン様活性/抗エストロゲン活性を示し、その強さは 2、3 環構造の化合物よりも強かった。その中でも BaA 及び Chr のモノヒドロキシ体 (4-OHBaA、10-OH BaA、1-OHCh、2-OH Ch、3-OHCh) は強いエストロゲン様活性を、BaA 及び Chr、BcPh のモノヒドロキシ体 (2-OHBaA、9-OHBaA、2-OHCh、6-OHCh、2-OHBcPh、3-OHBcPh、4-OHBcPh) は強い抗エストロゲン活性を示した。特に 3-OHBcP は ER へのアンタゴニストと知られている 4-OHT よりも強い抗エストロゲン活性を示した。5 環構造を持つ OHPAH について

は、OHBbFRのうち10-OHBbFRのみ抗エストロゲン活性を示した。11-OHBgChと13-OHBgChは強い抗エストロゲン活性を示し、特に11-OHBgChは5環構造OHPAHの中では最も強い活性を示した。一方、6環構造を持つOHIDPはいずれの活性もほとんど示さなかった。これより、5、6環構造のOHPAHのエストロゲン様または抗エストロゲン活性の強さは、全体的に4環構造のOHPAHよりも弱いことが明らかになった (Fig. 5、Fig. 6)。

以上の結果より、2～6環構造を有するOHPAHの中では4環構造を有する化合物が強い活性を示し、同じ環数を有していても母核構造の違いにより活性の強さが異なることが明らかとなった。さらに、同じ母核構造を有するOHPIAHでも、水酸基の位置の違いにより発現する活性やその強さが異なることも明らかとなった。

2. PAHQ及びPAHK類の活性

OHPAH以外のPAH酸化体であるPAHQとPAHKの抗エストロゲン活性の測定結果をTable 2に示した。試験した20種のPAHQのうち、11種(1,4-PQ、1,2-CQ、1,4-CQ、5,6-CQ、BcP-5,6-Q、BeP-5,6-Q、BaP-1,6-Q、BaP-4,5-Q、BaP-7,8-Q、BaP7,10-Q、BaP-11,12-Q)が活性を示し、特に強い抗エストロゲン活性を示した1,2-CQ、1,4-CQ、5,6-CQ、BaP-7,8-Qは1 μ Mにおいて、E₂ 1 nM存在下で約50%の β -galactosidase産生を抑制した。また8種のPAHKは活性を示さなかった。また、OHPAHでは強いエストロゲン様/抗エストロゲン活性が認められたのは4環構造を有するOHPAHであったが、PAHQではBcP-5,6-Q、BeP-5,6-Q、BaP-1,6-Q、BaP-4,5-Q、BaP-7,8-Q、BaP7,10-Q、BaP-11,12-Qのように5環構造を有するPAHQにも強い抗エストロゲン活性があることがわかった。

OHPAHを除くPAH酸化体(PAHQとPAHK)のエストロゲン様活性の測定した結果、20種の

PAHQのうち3種(1,2-CQ、BaP-3,6-Q、BaP-7,8-Q)が活性を示した。1 μ Mにおいて、それぞれE₂ 100 nMの約25%、約47%、約12%の β -galactosidase産生を誘導したことより、これらのエストロゲン様活性は弱いといえる。

D. 考察

酵母two-hybrid法によって得られたPAH及びOHPAH、PAHQの活性測定の結果から、母核構造のPAHは全て活性を示さず、OHPAHとPAHQの中に活性を示すものがあった。

まず、PAHとOHPAHを比較すると、第一にフェノール性水酸基の存在は活性発現に必須である。次に、2～6環構造を有するOHPAHのうち、3～5環構造の化合物にエストロゲン様または抗エストロゲン活性が認められ、特に4環構造の化合物の活性は強かった。しかし、同じ環数を有しても活性の種類やその強さは全く異なり、環数のみで活性の有無を説明することはできない。

また、これまでにエストロゲン様活性やERに対する結合親和性を有する多くの化合物に共通する構造的特徴に関する報告がなされ、フェノール環のパラ位に疎水性部を持つとエストロゲン様活性を示し、オルト位がかさ高いとその活性が減弱することが報告されている。しかしながら、酵母two-hybrid法によって得られたOHPAHの測定結果より、オルト位の炭素が縮合にあずかるOHPAHの中でも0.5以上の相対活性値を示す化合物があることから、この条件でも活性の有無の説明には不十分である。この原因として、PAHの分子構造を考える上で2つの因子、即ち、母核構造と水酸基の位置とが活性の発現に関与していることが考えられた。

今回、細井信造氏より分担研究で得られたPAH、OHPAH、PAHQの物理化学パラメータの中から、上記結果を良く説明できると推定された2つのパラメータを用いて以下の考察を進める。まず、母核構造の違いを表すパラメータと

して Length-to-breadth ratio (L/B 比)を用いた。L/B 比とは、分子のファンデルワールス表面を囲むように書いた四角形の長軸を L 軸、短軸を B 軸とし、この L 軸と B 軸の比の最大値を示したものである。一方、水酸基の位置の違いを表すパラメータとして O-H distance を使用した。O-H distance は水酸基の酸素原子から最も離れた位置に存在する水素原子との距離を示したものである。

OHPAH の L/B 比及び O-H distance とエストロゲン様及び抗エストロゲン活性の強さとの関係を Fig. 7 に示した。まずエストロゲン様活性について、相対活性値 0.5 以上のほぼ全ての化合物は、L/B 比が 1.46~1.73、O-H distance が 9~12 Å の範囲に集中することが明らかとなった。同様に抗エストロゲン活性について、相対活性値 0.5 以上のほぼ全ての化合物は、L/B 比が 1.28~1.73、O-H distance が 8~12 Å の範囲に集中することが明らかとなった。一方、L/B 比及び O-H distance が前述の各範囲を満たさない OHPAH には強い活性を示すものはほとんど存在しなかった。これより、PAH モノヒドロキシ体の L/B 比及び O-H distance が前述の各範囲を満たすことは、強いエストロゲン様または抗エストロゲン活性を示すための必須条件であることが明らかとなった。

E2 や DES のような ER への結合親和性が強い化合物は 2 つの水酸基を有し、それらの酸素原子間距離 (O-O distance) と ER への結合親和性との間に相関性があることが報告されている³⁰⁾。今回の結果より、強いエストロゲン様または抗エストロゲン活性を示す OHPAH モノヒドロキシ体の O-H distance は 8~12 Å であることが明らかとなった。この範囲は E2 及び DES の O-O distance (10.965 Å 及び 12.034 Å) と類似しており、これが活性を強く発現する原因の一つであることが考えられた。また、L/B 比と活性の発現程度や hER への結合親和性との相関性については未だ報告されておらず、今回の結果より、OHPAH の母核構造も活性の発現程度

及び hER への結合親和性に寄与している可能性が示唆された。

以上の結果より、強い活性を示す PAH モノヒドロキシ体は母核構造を表す L/B 比と水酸基の位置を表す O-H distance が一定範囲の値を持つような分子構造を有することが明らかとなった。しかし、その範囲内においても活性を示さない化合物も存在した。この原因として、構造上の特徴に加えて化合物特有の物理化学的特性の違いが考えられた。

一方、いくつかの PAHQ に比較的強い抗エストロゲン活性が認められた結果 (Table 2)は、その活性発現にはフェノール性水酸基は必須ではないことを意味している。そこで、PAHQ についても L/B 比と O-H distance を求めて考察した。尚、PAHQ の 2 つあるカルボニル基のうち、酸素原子と水素原子の距離が最も離れた O-H distance を用いた。

L/B 比及び O-H distance とエストロゲン様及び抗エストロゲン活性、結合親和性の強さとの関係を Fig. 8 に示した。エストロゲン様活性を示した 3 種の PAHQ は L/B 比が 1.32~1.80、O-H distance が 10.290~11.519 Å の狭い範囲に存在した。この O-H distance の範囲は E₂ の値 (11.185/11.695 Å) に近似しており、これが活性を発現する要因の一つであることが考えられた。抗エストロゲン活性を示した 11 種の PAHQ は L/B 比が 1.18~1.80、O-H distance が 8.189~11.519 Å の範囲に存在し、結合親和性を示した 12 種の PAHQ は L/B 比が 1.25~1.80、O-H distance が 7.434~11.519 Å の広い範囲に存在した。

以上の結果を総合すると、強いエストロゲン様/抗エストロゲン活性を示す OHPAH は、E2 との構造類似が示されたことより、E2 とエストロゲン受容体の結合の様に、OHPAH の水酸基がエストロゲン受容体の Glu353 残基及び Arg394 残基と水素結合を形成するとともに、OHPAH の芳香環と Phe404 の芳香環の間に van der Waals 力が働くことが推定された (Fig. 9)。一方、比較的強い抗エストロゲン活性を有する

PAHQ については、やはりエストロゲン受容体の Glu353 残基及び Arg394 残基と水素結合を形成すると考えられる。さらに、PAHQ の芳香環と Phe404 の芳香環の間に van der Waals 力が働く。これらの相互作用によって、PAHQ が E2 と類似の結合を行うと考えられた (Fig. 10)。

E. 結論

以上より、酵母 two-hybrid アッセイ法により PAH 酸化体類 (OHPAH 65 種、PAHQ 20 種、PAHK 9 種) のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定したところ、PAHK はいずれの活性も示さなかったが、PAHQ のいくつかはエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を示した。水酸基以外のキノン体のように官能基に酸素を持つことでも ER を介するエストロゲン様活性や抗エストロゲン活性を発現することが初めて示された。さらに、強い活性を示す OHPAH と PAHQ は、環数、L/B 比及び O-H distance の 3 つの構造パラメータが E2 の値と近い狭い範囲にあることから、明確な構造活性相関のあることが明らかになった。

以上のことは、逆にこれら 3 つの構造パラメータの値から、未知の PAH 酸化体類のエストロゲン様/抗エストロゲン活性の有無を予測可能になることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miller-Schlze, J. P., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Tamura, K., Dong, L., Simpson, C. D., Exposures to particulate air pollution and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons amongst taxi drivers in Shenyang, China. *Environ Sci. Technol.*, **44** (1), 216-221 (2010).
- 2) Yang, X.-Y., Igarashi, K., Tang, N., Lin, J.-M., Wang, W., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res.*, **695**, 29-34 (2010).
- 3) Kishida, M., Imamura, K., Kameda, T., Hayakawa, K., Bandow, H., Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere using gas chromatograph-mass spectrometer. *J. Environ. Chem.*, **20** (2), 173-181 (2010).
- 4) Chujo, S., Okamoto, S., Sunahara, R., Hayashi, H., Takii, T., Hayakawa, K., Onozaki, K., Cigarette smoke condensate extracts augment collagen-induced arthritis in mice" has been accepted for publication, *Int. Immunopharmacol.*, **10** 1194-1199 (2010).
- 5) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Determination of particle-associated hydroxynitropyrenes with correction for chemical degradation on a quartz fibre filter during high volume air sampling. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **90** (13), 976-987 (2010).
- 6) 早川和一, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 鈴木信雄, 総説: 多環芳香族炭化水素から見た海洋油汚染, *安全工学*, **50** (2), 85-92 (2011).
- 7) 戸次加奈江, 滝上英孝, 鈴木 剛, 唐 寧, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一, 中国・北京及び日本・金沢の大気を示す AhR 活性化作用への PAH 類及びダイオキシン類の寄与, *環境化学*, **21** (1), 27-33 (2011).
- 8) 片山裕規, 後藤知子, 亀田貴之, 唐 寧, 松木 篤, 鳥羽 陽, 早川和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測-濃度レベルの把握と発生要因の検討-, *大気環境学会誌*, **46**, 20-29 (2011).

- 9) Okamoto, S., Adachi, M., Chujo, S., Yamada, K., Akita, K., Itoh, S., Takii, T., Hayakawa, K., Onozaki, K., Etiological role of cigarette smoking in rheumatoid arthritis: Nasal exposure to cigarette smoke condensate extracts augments the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 1088-1092 (2011).
- 10) Hayakawa, K., Bekki, K., Yoshita, M., Tachikawa, C., Kameda, T., Tang, N., Toriba, A., Hosoi, S., Estrogenic/antiestrogenic activities of quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Health Sci.*, **57** (3), (2011), in press.
- 11) Hayakawa, K., Tang, N., Sato, K., Izaki, A., Tatematsu, M., Hama, H., Li, Y., Kameda, T., Toriba, A., Development of HPLC determination method for trace levels of 1-, 2-nitropyrenes and 2-nitrofluoranthene in airborne particulates and its application to samples collected at Noto Peninsula, *Asian J. Atmos. Environ.*, **5**, (2011), in press.
- 12) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Atmospheric formation of hydroxynitropyrenes from a photochemical reaction of particle-associated 1-nitropyrene, *Environ. Sci. Technol.*, **45** (8), 3325-3332 (2011), in press.
3. 学会発表
- 1) Yamada, M., Iwasaka, Y., Zhang, D., Matsuki, A., Chen, B., Trochkin, D., Nagatani, M., Nagatani, T., Hayakawa, K., Shi, G., Submicron aerosols over KOSA source areas in Northwest China. International Symposium on Aerosol and Radiation Studies, 2010. 4. 25-28, Zibo, Shandong, China.
- 2) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Toshita, M., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., Toxi effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. Water Pollution 2010, 2010. 6. 9-11, Bucharest, Romania.
- 3) Yamada, M., Kobayashi, F., Zhang, D., Chen, B., Maki, T., Kakikawa, M., Tobo, Y., Hayakawa, K., Shi, G., Iwasaka, Y., Mixing state of bioaerosols and Asian dust particles examined with microscopes. The 8th International Symposium on Advanced Environmental Monitoring, Sapporo, 2010. 6. 29- 7.1, Hokkaido, Japan.
- 4) 亀田貴之, 後藤知子, 鳥羽 陽, 唐 寧, 早川和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測: 濃度レベルの把握と発生要因の検討, 第19回環境化学討論会, 2010. 6. 21-23, 愛知.
- 5) 安積愛理, 亀田貴之, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一, 越境輸送中の黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素ニトロ化の可能性, 第19回環境化学討論会, 2010. 6. 21-23, 愛知.
- 6) 戸次加奈江, 滝上英孝, 鈴木 剛, 唐 寧, 早川和一, ラット肝細胞株における多環芳香族炭化水素誘導体の核内受容体を介した毒性影響, 第19回環境化学討論会, 2010. 6. 21-23, 愛知.
- 7) 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 中国北京における大気中多環芳香族炭化水素の推移, 第51回大気環境学会年会, 2010. 9. 8-10, 大阪.
- 8) 安積愛理, 亀田貴之, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一, 黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素のニトロ化と越境汚染の可能性, 第51回大気環境学会年会, 2010. 9. 8-10, 大阪.
- 9) 片山裕規, 後藤 知子, 亀田貴之, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの濃度の測定: 汚染レベルの比較ならびに発生要因の検討, 第51回大気環境学

- 会年会, 2010. 9. 8-10, 大阪.
- 10) 中瀬久淑, 木下千尋, 谷口 昇, 川西琢也, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 環日本海域における多環芳香族炭化水素の分布・輸送の解析, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
 - 11) 細住智恵美, 鳥羽 陽, Thaneeya Chetianukornkul, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一, 親水和相互作用クロマトグラフィー／タンデム質量分析法による尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の分析, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
 - 12) 鳥羽 陽, 矢部和昭, 細住智恵美, Thaneeya Chetianukornkul, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一, メトキシフェノール類をバイオマーカーとした木材燃焼煙の曝露評価, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
 - 13) Li, Y., Araki, Y., Tang, N., Toriba, A., Kameda, T., Hayakawa, K., On-line concentration and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in small volume seawater samples with HPLC with fluorescence detection, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
 - 14) 安間麻莉, 李 英, 中瀬久淑, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 海洋中多環芳香族炭化水素類の分析法の開発, 日本分析化学会第 59 回年会, 2010. 9.15-17, 仙台.
 - 15) Hayakawa, K., Behaviors of polycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia. The 4th International Symposium on Environment of Rim of the Japan/East Sea, 2010. 10. 18-19, Jeju, Korea.
 - 16) Hong, C-S., Seo, K-J., Park, S-H., Jung, W-S., Lee, D-I., Iwasaka, Y., Hayakawa, K., Characteristics of Atmospheric Aerosol at Ullengdo, Korea in 2009. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry, 2010. 11. 3-5, Soul, Korea.
 - 17) Yamada, M., Zhang, D., Iwasaka, Y., Shi, G., Hayakawa, K., Vertical Distribution of Dust and Sulfate particles over Asian Dust Sources. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry, 2010. 11. 3-5, Soul, Korea.
 - 18) Hayakawa, K., Tang, N., Izaki, A., Kameda, T., Toriba, A., Atmospheric pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Hawaii, USA.
 - 19) Sato, K., Inomata, Y., Kajino, M., Ueda, H., Hayakawa, K., Tang, N., Kurokawa, J., Model simulation of atmospheric concentrations and depositions of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organic pollutants in East Asia. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Hawaii, USA.
 - 20) 早川和一, 中瀬久淑, 洪天祥, 鳥羽陽, 亀田貴之, 川西琢也, 日本海が多環芳香族炭化水素類の濃度分布調査, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011. 3. 18-20, 札幌.
 - 21) 戸次加奈江, PAH の生体影響に対し輸送及び生体内代謝がどの様に関与しているのか, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.
 - 22) 片山裕規, 亀田貴之, 後藤知子, 鳥羽 陽, 唐 寧, 早川和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノン濃度, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.
 - 23) 旭 美樹, 鳥羽 陽, 外山喬士, 熊谷嘉人, 亀田貴之, 唐 寧, 早川和一, 活性酸素を生成する 9,10-phenanthrenequinone の尿中代謝物の同定と定量, 日本薬学会第 131 年会,

2011. 3.28-31, 静岡.

- 24) 濱 寛貴, 伊崎陽彦, 徳田貴裕, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 多環芳香族炭化水素類による東アジア諸国の大気汚染の変遷, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.
- 25) 立松路也, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 立山における多環芳香族炭化水素類汚染の実態, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.
- 26) 鳥羽 陽, 竹内直樹, 田村憲治, 呉 慶, 董 麗君, 張 雪梅, 亀田貴之, 唐 寧, 早川和一, ディーゼル排ガス曝露指標を指向したヒト尿中 1-ニトロピレン代謝物の測定, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.
- 27) 亀田貴之, 安積愛理, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一, 越境輸送中の黄砂粒子表面におけるニトロ多環芳香族炭化水素の二次生成, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3.28-31, 静岡.

4. 招待講演

- 1) 早川和一, 化学物質による海洋汚染の現状と課題, 第43回安全工学研究発表会オーガナイズドセッション, 2010. 11. 11, 東京.
- 2) Hayakawa, K., Contribution of International Monitoring Network to Environmental Preservation in East Asia, The 17th Asian Symposium on Ecotechnology (ASET17), 2010. 11. 11, Kurobe, Toyama.
- 3) 早川和一, 環境汚染物質の国際共同研究を通じた衛生薬学教育, 熊本大学薬学部 第4回エコファーマシンポジウム, 2011. 2. 8, 熊本.

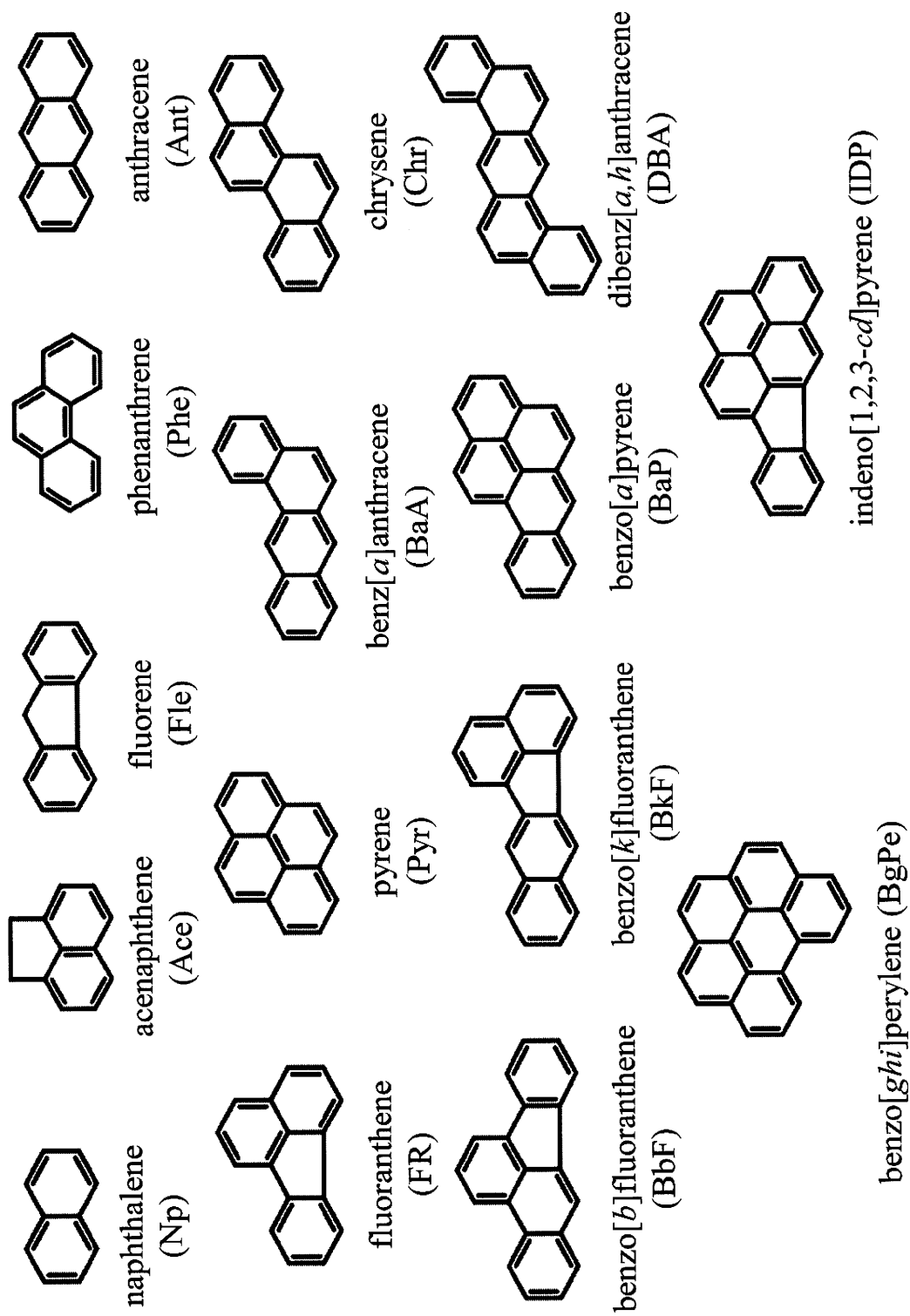


Fig. 1 Structures and Abbreviations of PAHs Tested

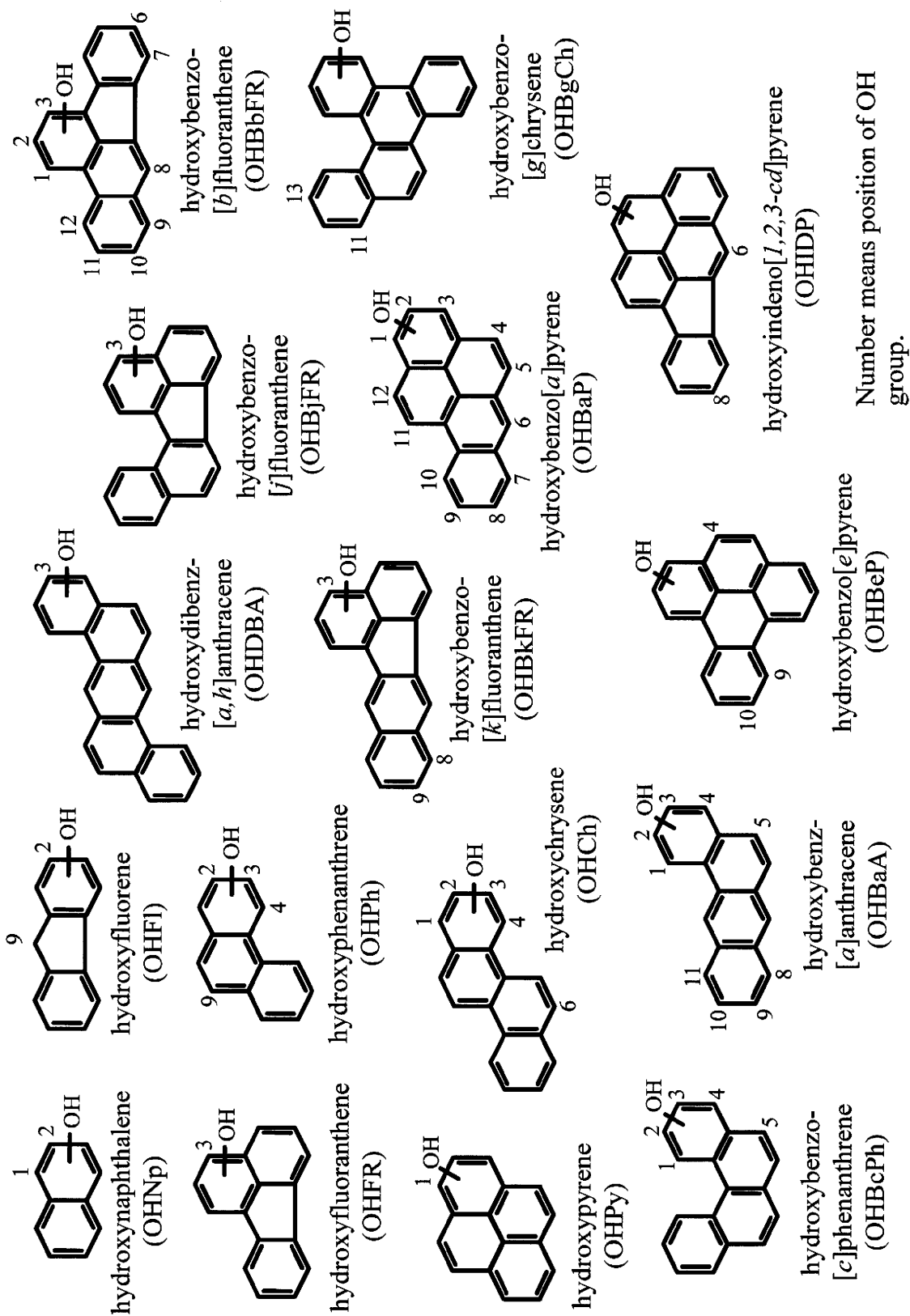


Fig. 2 Structures and Abbreviations of OHPAHs Tested

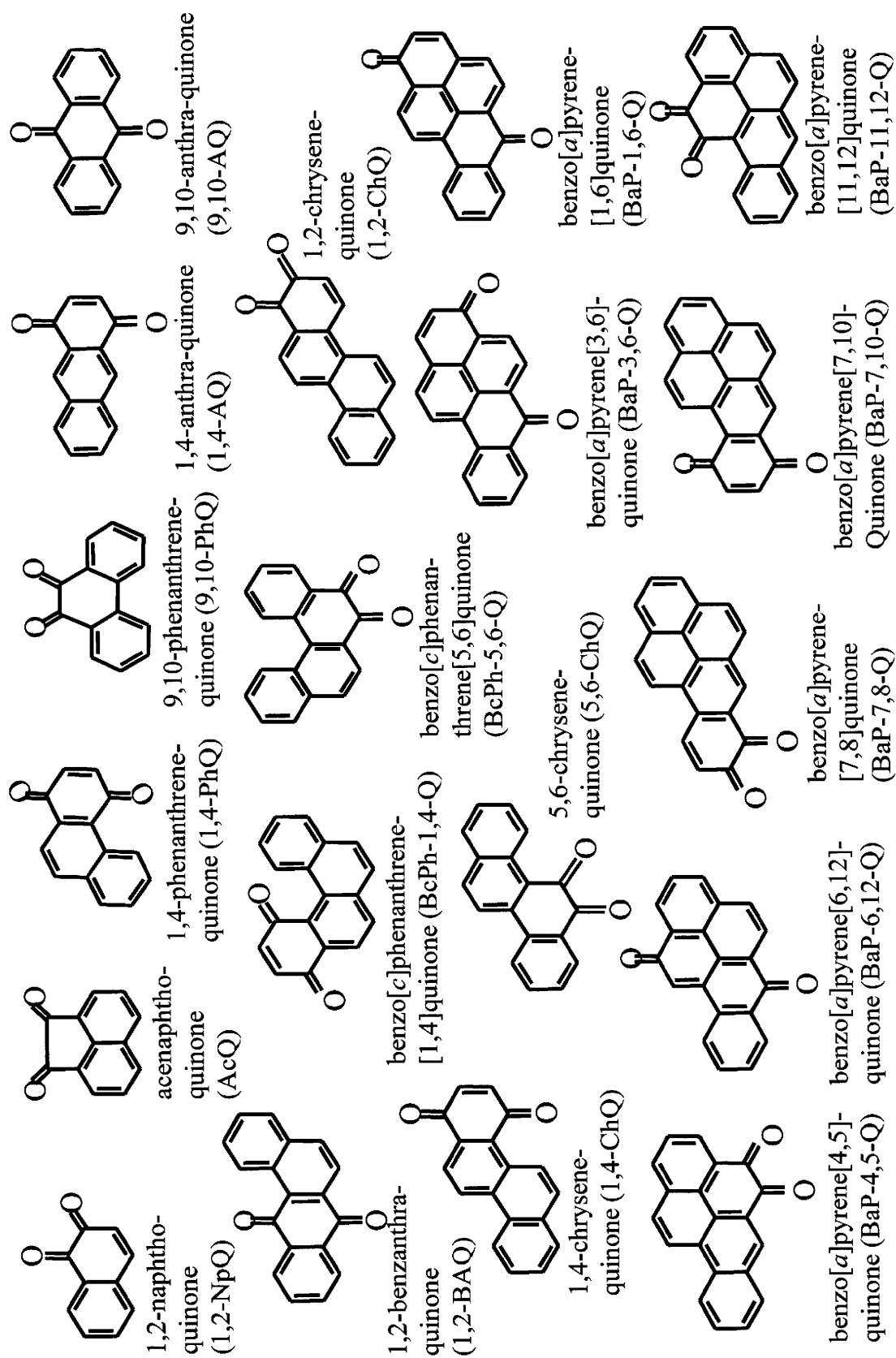


Fig. 3 Structures and Abbreviations of PAHQs Tested

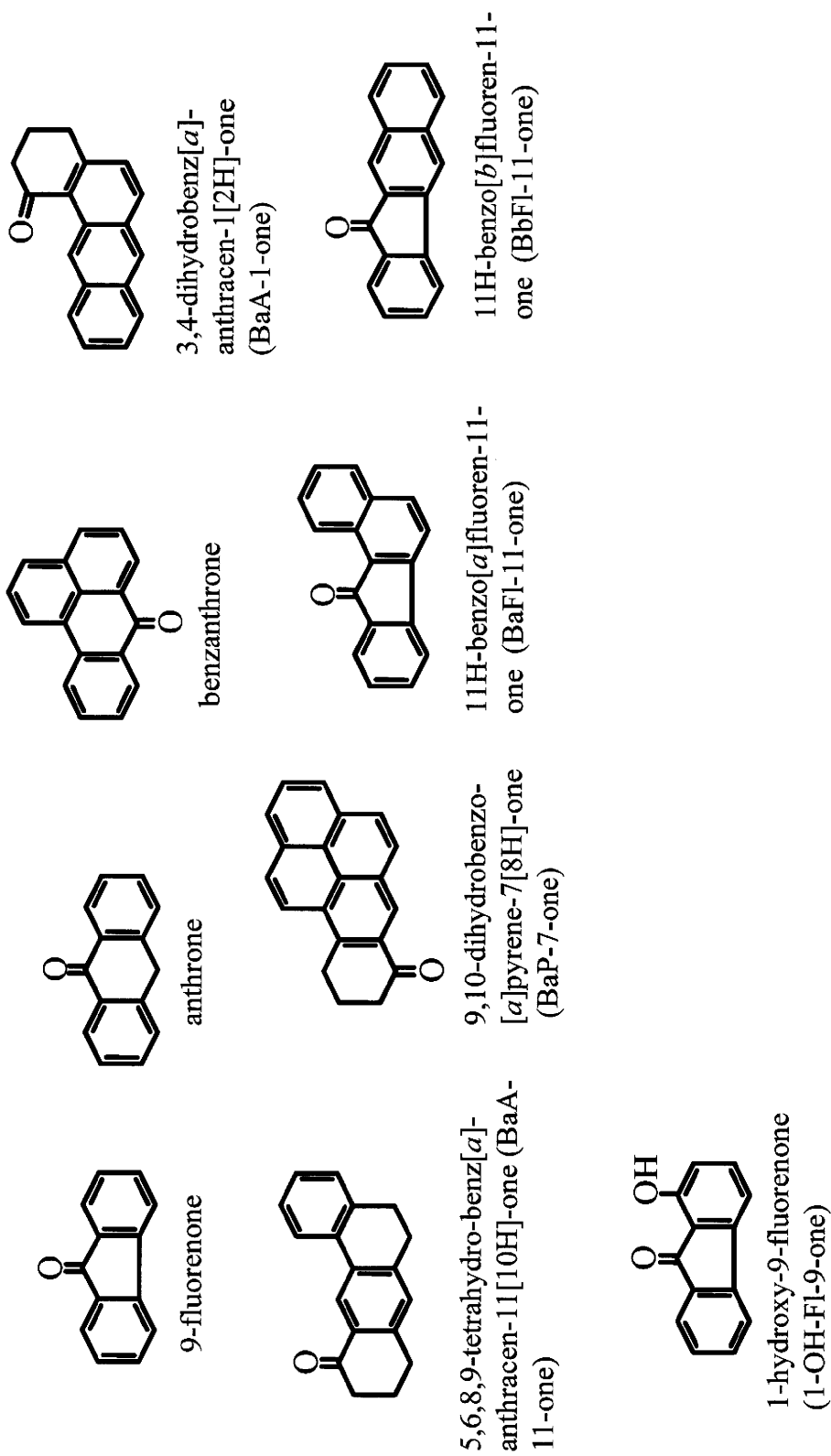


Fig. 4 Structures and Abbreviations of PAHs Tested

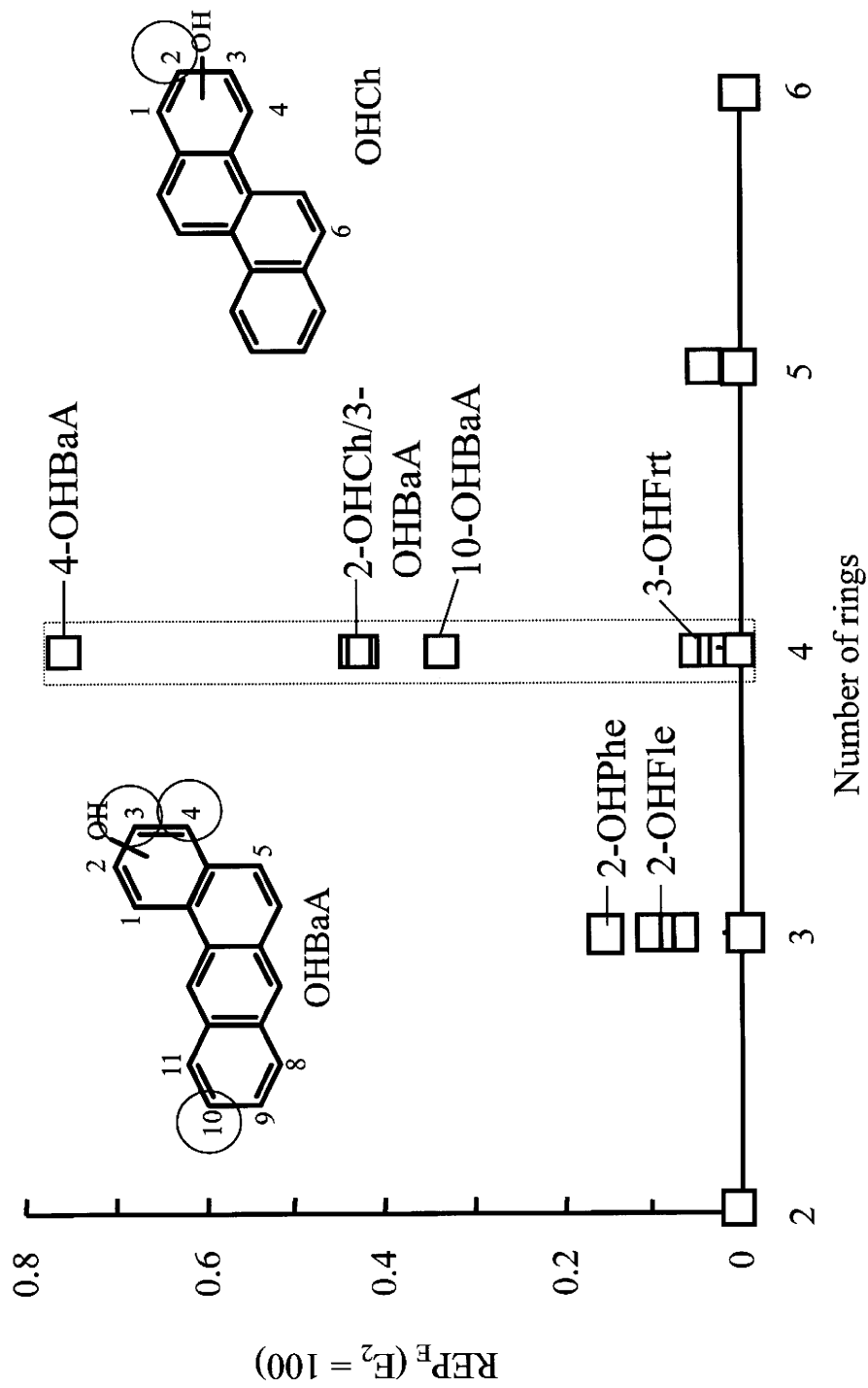


Fig. 5 Relationship between Number of Rings of OHPAHs and Estrogenic Activity

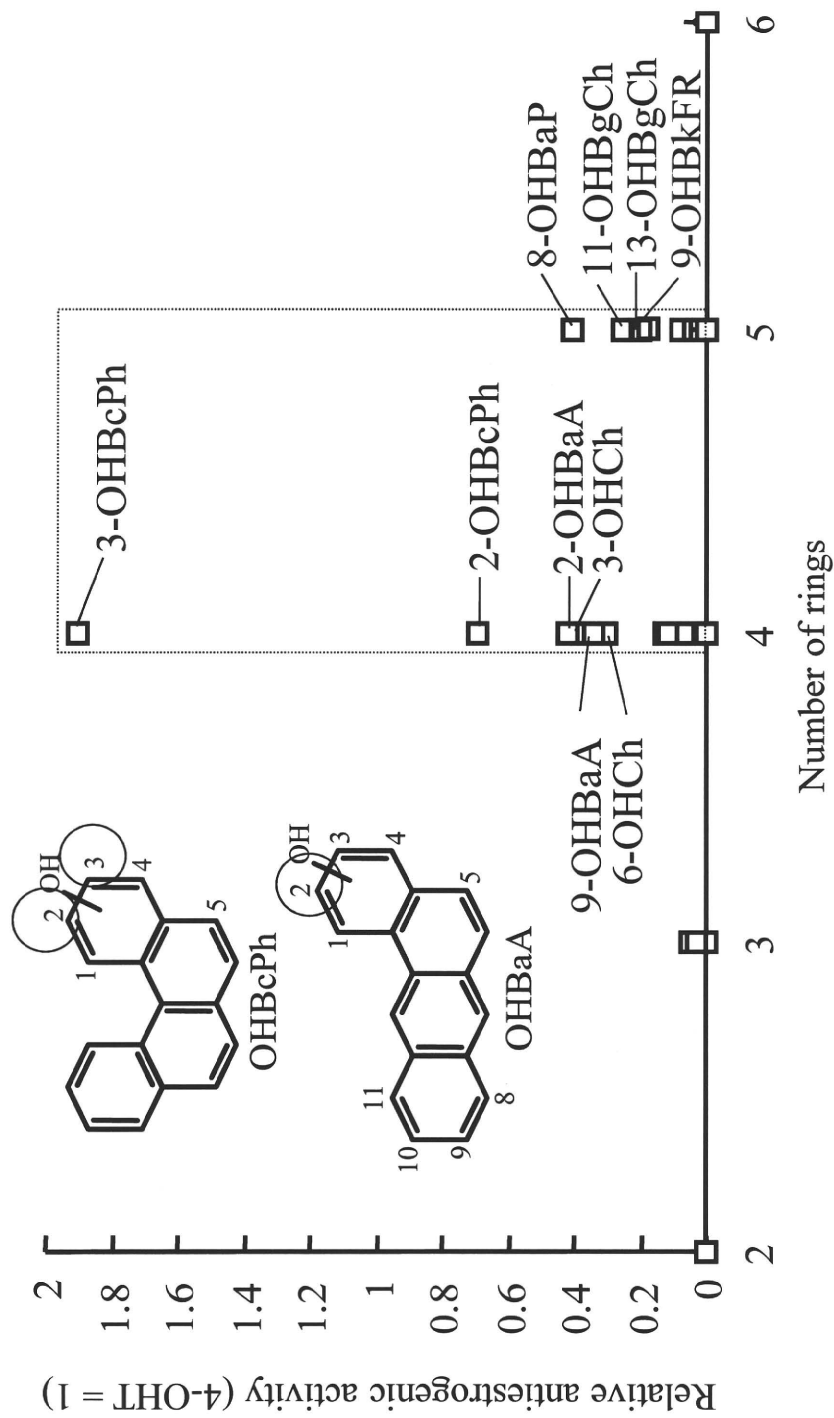


Fig. 6 Relationship between Number of Rings of OHPAHs and Antiestrogenic Activity

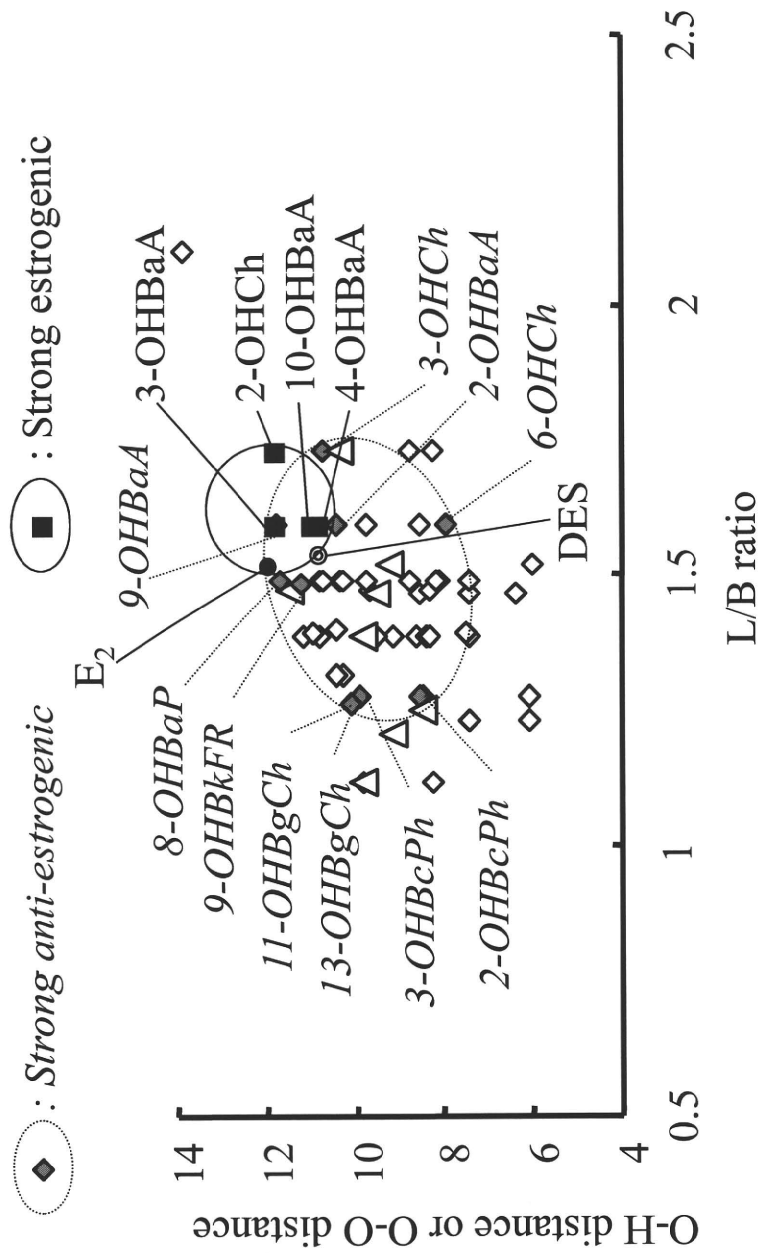


Fig. 7 L/B Ratios and O-H Distances of Strong Estrogenic or Strong Anti-Estrogenic OHPAHs

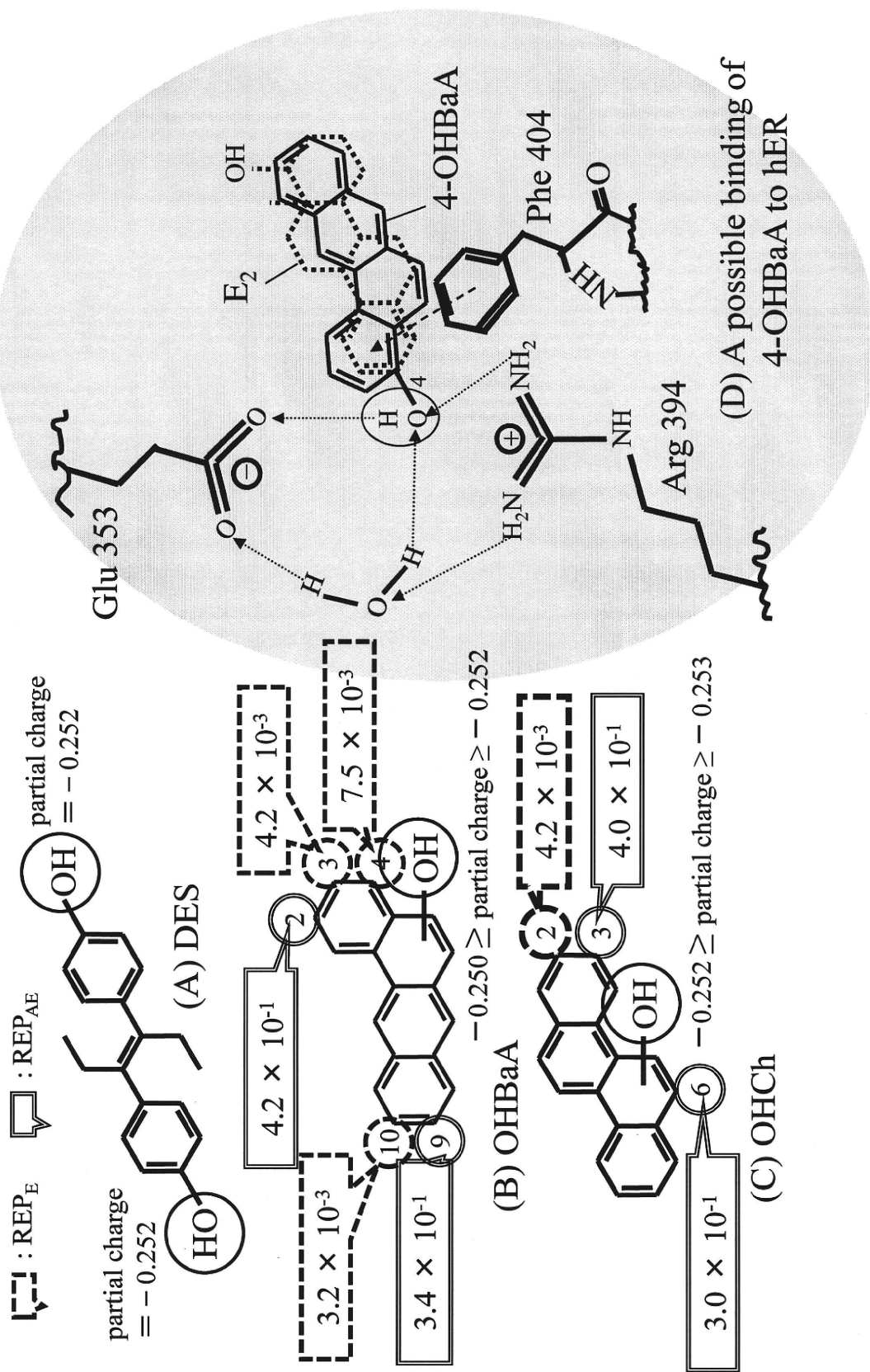


Fig. 8 Structures of Strongly Estrogenic and Antiestrogenic OHPAHs and Binding to ER

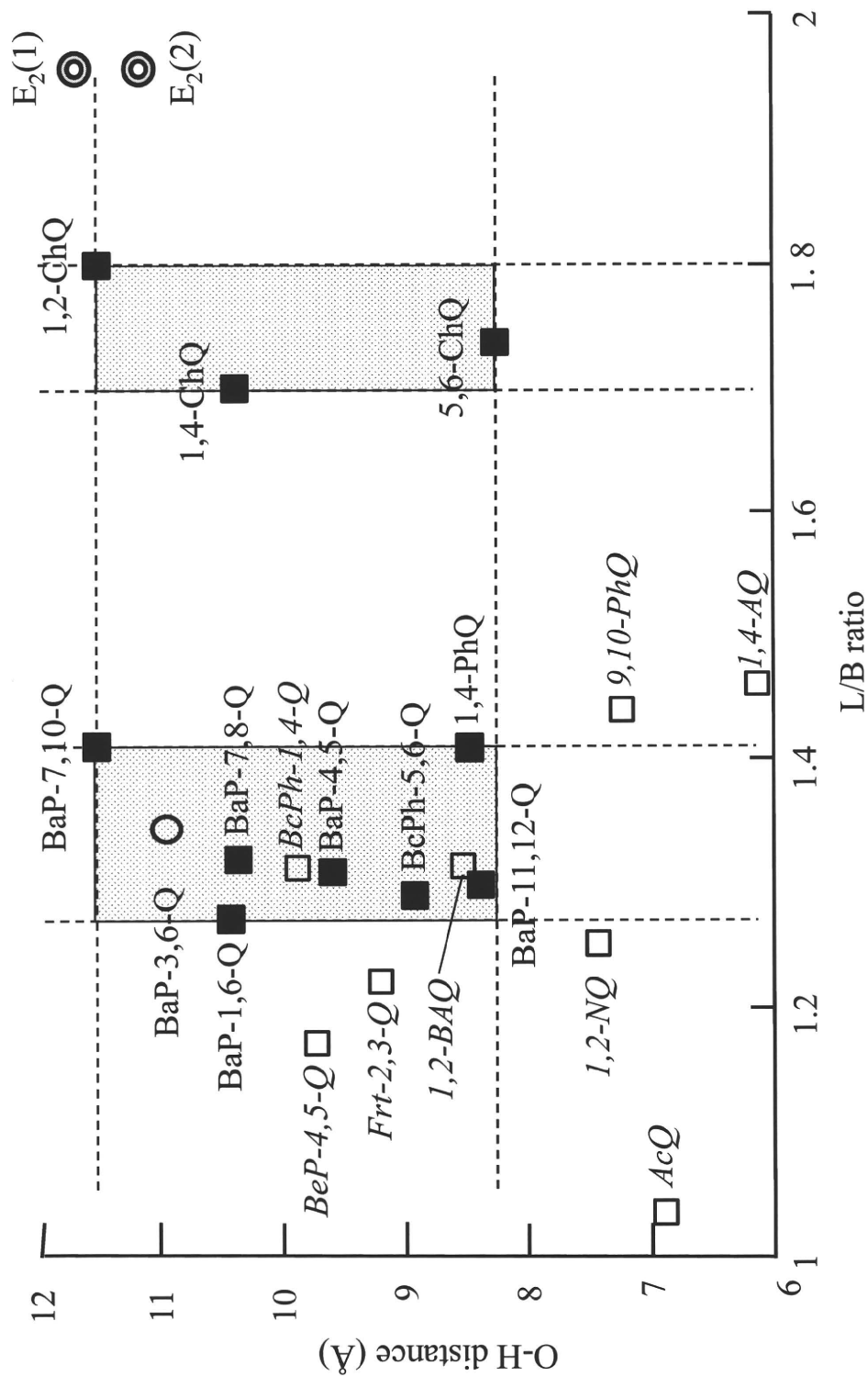


Fig. 9 Relationship between O-H Distance and L/B ratio of PAHQs

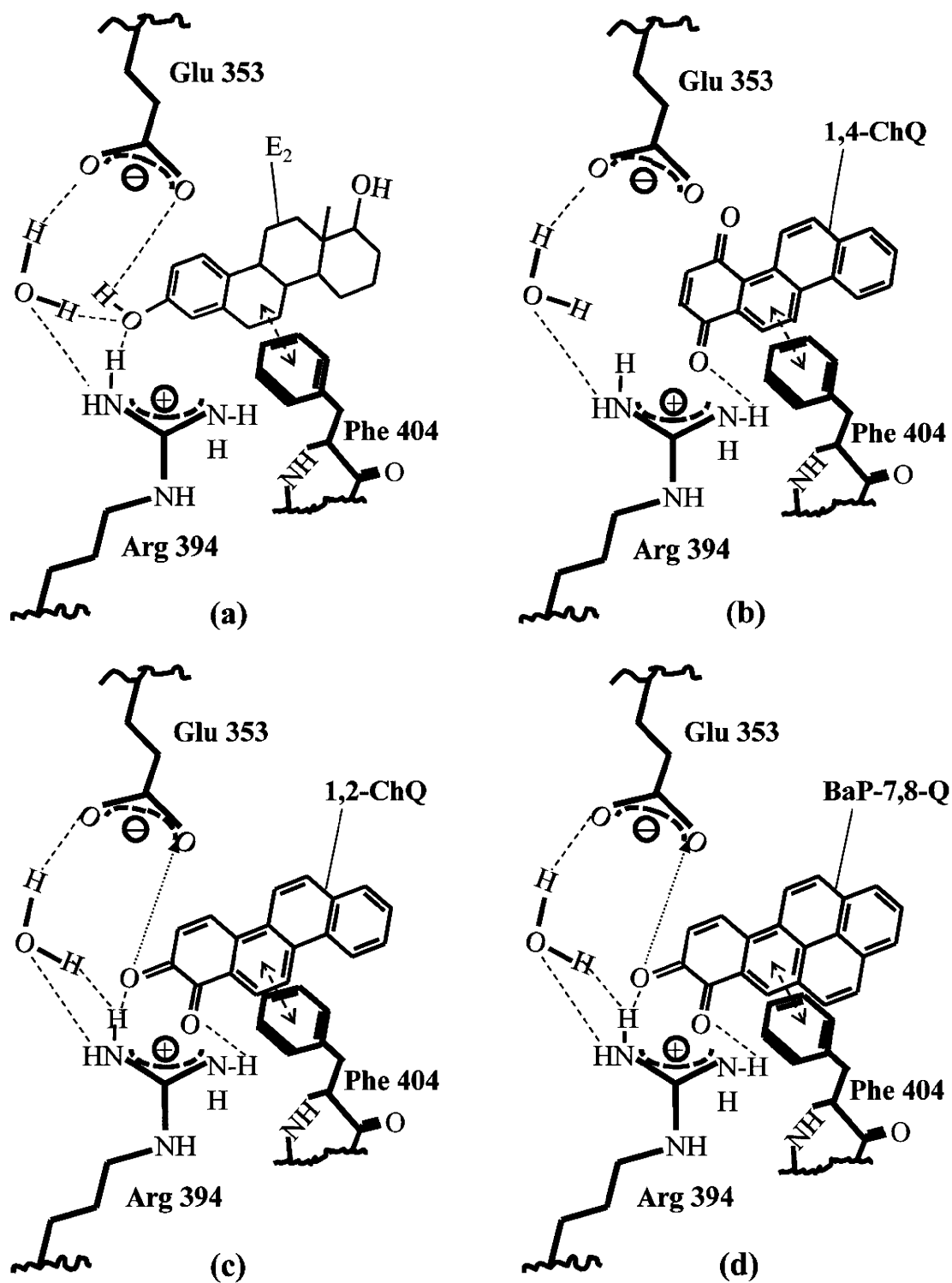


Fig. 10 Binding between E_2 and ER and possible bindings between PAHQ and ER

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システム
に関する研究
平成 22 年度分担研究報告書

構造活性相関の解析
—多環芳香族炭化水素のキノン体の分子構造と活性との関係—

研究分担者 細井 信造 京都薬科大学 薬学教育研究センター 准教授

研究要旨

早川和一分担研究において実施した酵母two-hybridアッセイ法で、多環芳香族炭化水素の水酸化体（OHPAH）以外の酸化体で活性が見られたキノン体（PAHQ）についても同様に構造活性相関の有無を検討したところ、一定の構造パラメータ範囲内に活性が存在することが示唆された。即ち、エストロゲン様活性を示すPAHQでは、O-H distance、第一イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P でそれぞれ 10.290~11.519 Å、8.526~9.029 eV、4.909~5.556 debye、3.462~3.782 の狭い範囲に存在した。また、抗エストロゲン活性を示す PAHQでは、第1イオン化エネルギー、log P でそれぞれ8.526~9.201 eV、2.459~3.782 の比較的狭い範囲で存在することから、これらのパラメータの範囲が活性予測の指標となる可能性が示唆された。さらに、エストロゲン様及び抗エストロゲン活性共に強い活性を持った PAHQ は4環性 CQ 骨格を共通構造とし、2つのケトン基を末端の環に持つことが分かった。

A. 研究目的

酵母 two-hybrid アッセイ法によって得られた多環芳香族炭化水素（PAH）の水酸化体（OHPAH）のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性について、いくつかの構造的または物理化学的特徴との間に相関が見られることが分かっている。そこで、酵母 two-hybrid アッセイ法及び受容体結合試験法で活性及び結合親和性が見られた PAH のキノン体（PAHQ）についても同様に相関の有無を検討した。

B. 研究方法

分子モデリングソフト CAChe を用いたコンピューターシミュレーション解析により、半経験

的分子軌道法である PM3 法を用いて、PAHQ の構造最適化及び物理化学的特性（部分電荷、第1イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P）の計算を行い、得られた結果と活性及び結合親和性との関係を検討した（Table 1, 2）。

C. D. 結果・考察

1. 分子構造と活性との関係

酵母 two-hybrid アッセイ法及び受容体結合試験法によって得られた測定結果から、活性発現にはフェノール性水酸基が必須ではなく、キノン体構造でも十分であることが明らかとなった。これまでにエストロゲン様活性や ER に対する結合親和性を有する多くの化合物に共通

する構造的特徴に関する報告がなされている (Fang *et al.*, 2001)。西原らはフェノール環のパラ位に疎水性部を持つとエストロゲン様活性を示し、オルト位がかさ高いとその活性が減弱することを報告している。(Nishihara *et al.*, 2000)。しかし、OHPAH ではオルト位の炭素が縮環にあずかる OHPAH の中でも強い活性を示すものがあることから、この条件でも活性の有無の説明としては不十分であった。OHPAH では母核構造と水酸基の位置とが活性の発現に関与していると考え、2つのパラメーターを用いた。まず、母核構造の違いを表すパラメーターとして Length-to-breadth ratio (L/B 比) (Collantes *et al.*, 1996 ; Sander *et al.*, 1997) を用いた。L/B 比とは、分子のファンデルワールス表面を囲むように置いた四角形の長軸を L 軸、短軸を B 軸とし、この L 軸と B 軸の比の最大値を示したものである (Fig. 1)。一方、水酸基の位置の違いを表すパラメーターとして O-H distance を使用した。O-H distance は水酸基の酸素原子から最も離れた位置に存在する水素原子との距離を示したものである (Fig. 2)。そこで、E₂ 及び PAHQ の L/B 比と O-H distance を Table 1 に示し、OHPAH 同様に PAHQ でもこれらのパラメーターについて考察した。PAHQ では、2つあるケトン基のうち、酸素原子と水素原子の距離が最も離れた O-H distance を用いた。L/B 比及び O-H distance とエストロゲン様及び抗エストロゲン活性の強さとの関係を Fig. 3 に示した。エストロゲン様活性を示した3種の PAHQ は L/B 比が 1.32 ~ 1.80、O-H distance が 10.290~11.519 Å の狭い範囲に存在した。この O-H distance の範囲は E₂ の値 (11.185/11.695 Å) に近似しており、これが活性発現の要因の一つであることが考えられた。抗エストロゲン活性を示した11種の PAHQ は L/B 比が 1.18 ~ 1.80、O-H distance が 8.189~11.519 Å の範囲に存在した。

2. 酸素原子の部分電荷と活性及び結合親和性の関係

体内ホルモンである E₂ は ER の LBD の binding pocket 内でいくつかのアミノ酸残基と水素結合する。E₂ の3位のフェノール性水酸基は Glu 353、Arg 394、水と水素結合を形成する。また17位のアルコール性水酸基は His 524 と水素結合を形成する (Tanenbaum *et al.*, 1998 ; Fang *et al.*, 2001) (Fig. 4)。

また、Fig. 4 に示すように E₂ の分子内では電子密度の偏りが生じている。特に水酸基の酸素原子は電気陰性度が大きいため、その部分電荷は大きくなり、それらは水素結合の donor として働くことが考えられる。この時、Glu 353 との水素結合距離が 2.37 Å と他のアミノ酸と比べて最も小さく、水素結合が最も強いことが分かる。この E₂ の3位の水酸基は水素結合の donor として働くため、ER との結合には酸素原子の電子状態が大きく関与していることが考えられる。従って、PAHQ の酸素原子の部分電荷との関係性を評価し、その結果を Fig. 5 に示した。活性の指標として、Induction 値及び Inhibition 値、高濃度曝露での阻害割合 (Binding affinity) を用いた (Table 3)。

エストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示す PAHQ の部分電荷はそれぞれ -0.312 ~ -0.253、-0.320 ~ -0.256 の範囲に存在した。この範囲は PAHQ 全体の部分電荷の範囲とほとんど変わらず、活性発現の要因は得られなかった。

3. 第1イオン化エネルギーと活性及び結合親和性との関係

上述のように、E₂ の3位のフェノール性水酸基は Glu 353 に対して水素結合の donor として働くため、ER との結合にはフェノール性水酸基の電子供与性の違いが大きく関与していることが考えられる。従って、試験物質の第1イオン化エネルギーとの関係性を評価し、その結果を Fig. 6 に示した。

エストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示す PAHQ の第 1 イオン化エネルギーはそれぞれ 8.526~9.029、8.526~9.201 eV の比較的狭い範囲に存在し、 E_2 の値 (8.876 eV) もこの範囲内であった。このことから PAHQ では第 1 イオン化エネルギーが各活性の強さに影響を及ぼす可能性が示唆されたが、結合親和性を示す PAHQ の第 1 イオン化エネルギーは 8.526~9.766 eV の広い範囲に存在したため、これらの範囲は PAHQ 全体の部分電荷の範囲とほとんど変わらなかった。

4. 双極子モーメントと活性との関係

述べたように、ER のリガンドである E_2 の分子内には水酸基の寄与による電子密度の偏りが存在する。フェノール性水酸基の酸素原子は電気陰性度が大きく、そのため酸素原子に負の電荷が偏ることが予想される。従って、分子内の電子密度の偏りが活性及び結合親和性に及ぼす影響を検討する一つの指標として、双極子モーメントとの関係の評価し、その結果を Fig. 7 に示した。

エストロゲン様活性を示した PAHQ の双極子モーメントは 4.909~5.556 debye の狭い範囲であったが、 E_2 の値 (1.44 debye) は範囲外であった。また、抗エストロゲン活性および結合親和性を示した PAHQ では、1.085~5.556 debye の広い範囲に存在し、活性発現の要因は得られなかった。

5. 分子の疎水性 (log P) と活性及び結合親和性との関係

これまでに、hER α に対する結合親和性とフェノール類の疎水性 (log P 値; 水/オクタノール分配係数) との間にある一定範囲内において比例関係の成立が報告されている (Fang *et al.*, 2001)。従って、PAHQ も同様の傾向を示す可能性が考えられたため、各化合物の log P 値と活

性の強さとの関係性を評価した (Fig. 8)。

エストロゲン様活性を示した PAHQ の log P 値は 3.462~3.782 の狭い範囲に存在し、抗エストロゲン活性を示した PAHQ の log P 値は 2.459~3.782 の比較的狭い範囲に存在した。 E_2 の値 (4.008) に近づくほど活性が強くなり、活性を示す割合が多くなることが示唆された。しかし、結合親和性を示した PAHQ の log P 値は 1.457~3.782 の広い範囲に存在していた。

6. ER に対する PAHQ の結合

抗エストロゲン活性を評価できなかった 9,10-PQ、BcP-1,4-Q、1,4-AQ の 3 種を除いた 17 種の PAHQ のうち、酵母 two-hybrid アッセイ法で活性を有した PAHQ は 1,2-CQ、1,4-CQ、BaP-7,8-Q、BaP-7、10-Q の 4 種になる。この 4 種の PAHQ は四環性の chrysenequinone (CQ) 骨格を共通構造として持ち、さらに 2 つのケトン基が末端の環に存在するという構造的特徴を持つ。つまり、CQ であれば 1, 2, 3, 4 位、BaP であれば 7, 8, 9, 10 位のいずれか 2 つにケトン基が存在している。一方、ER のリガンドである E_2 の構造は四環性構造を持ち、官能基は両末端の A 環および D 環に存在する。このことから、1) CQ 型四環性構造を共通構造とする、2) 官能基を持つ環は末端に存在する、という 2 つの構造的特徴があることがわかった (Fig. 9)。

また、chrysen (Chr) 骨格を持つ 3 種の PAHQ と BaP 骨格を持つ 6 種の PAHQ を同じ母核構造の PAHQ 同士で比較したところ、酵母 two-hybrid アッセイ法において *o*-PAHQ である 1,2-CQ、BaP-7,8-Q が最も強い活性を示した。理由として、この 2 つの PAHQ が Fig. 10 の様な結合様式をとることが考えられる。2 つのケトン基がオルト位に存在することで Arg 394 と水分子の水素原子に対して 1 つのケトン基が作用するよりも 2 倍の相互作用で水素結合を作ることができるため、同じ母核構造を持つほかの PAHQ よりも活性が強くなることが推定される。