

## (2) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

研究者 西川淳一 (大阪大学大学院薬学研究科助教授)

### 研究要旨

ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性低分子ホルモンの受容体である核内受容体群は、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている。内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に深刻な影響を及ぼすと考えられている。これら内分泌攪乱物質の潜在的なターゲットと考えられる核内受容体ファミリーはリガンド作動性の転写調節因子であり、N 端側に Zn フィンガーを含む DNA 結合領域、C 端側に転写活性化領域とリガンド結合領域を有するという一次構造上の特徴がある。近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定されたが、このような特徴を持つ核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトゲノム上には 48 種類存在した。48 種類の内訳は、リガンド既知の受容体が 23 種類、リガンド未知のオーファン受容体が 25 種類であった。本研究では、すべてのヒト核内受容体について網羅的に内分泌攪乱化学物質との結合性を調べ、疫学調査や動物実験で得られたデータと比較・検討することにより、新たな内分泌攪乱物質の作用点を明らかにすることを目的とするが、本年度はまずアッセイ系の検証が可能なりガンド既知の 23 種類の受容体について検討した。

受容体をコードする遺伝子を RT-PCR により増幅後、塩基配列を決定したところ、23 種類の受容体はすべて GenBank に登録されている配列と同じであった。これらの遺伝子を用いて酵母 two-hybrid 法によるアッセイ系を構築し、それぞれのリガンドに対する応答性を検証した。その結果、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、PR、GR、MR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、FXR、CAR の 17 種類については良好なりガンド応答性が認められたが、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、SXR の 6 種類の受容体については、リガンドを加えない状態でも高い活性を示し、信頼性のあるアッセイ系とはいえなかった。次に、構築したアッセイ系を用い、環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質について結合性を調べたところ、多くの化学物質が複数の受容体に作用することがわかった。

以上の結果から、内分泌攪乱作用が疑われる候補物質の多くはエストロゲン受容体との結合だけでなく、複数の核内受容体に影響を及ぼし、これらの複合した作用が内分泌攪乱物質としての毒性につながるものと考えられた。

### 研究協力者

今川正良 (名古屋市立大学薬学部・教授)

### A. 研究目的

内分泌攪乱作用は、急性毒性や慢性毒性、発癌性や催奇形成といったこれまでの毒性学とは違う新しい概念の毒性であり、ホルモンの受容体を介して生物の発生や分化に深刻な影響を及ぼすと考えられている。従来、ホルモンの受容体はそれぞれのリガンドに対し特異性が高く、人間が非意図的に作り出した化学物質がホルモン受容体に結合して毒性を発揮するとは一般には考えられてこなかった。ところが、大量に環境中に放出される化学物質 (例えば農薬や洗剤、プラスチックの原料など) の中でも、ホルモン受容体と結合して、天然のホルモン作用を模倣して働く物質が数多く

存在することが分かってきた。本来、ホルモンとは極微量でその作用を発揮するため、必要な時に必要な量だけ合成され、必要なくなれば代謝され効果を持たなくされる。しかし、人工的に作り出された化学物質が体内に取り込まれれば、生体のホルモン制御系を無視して働き、人の健康や生態系に悪影響を与える可能性がある。

ホルモン受容体の中でも核内受容体は脂溶性低分子生理活性物質の受容体であることから、環境中に放出された低分子化学物質のターゲットとして最も重要である。最近のゲノムプロジェクトの進展により、これら核内受容体ファミリーの遺伝子数はヒトゲノム中に48種類存在することが確定された<sup>1)</sup>。48種類の受容体は、そのほとんどが生物の発生・分化や恒常性の維持に重要な役割を果たしていると推定されており、これらの受容体のいずれに対して化学物質が干渉しても、生物の健康は害される可能性がある。これまで、内分泌攪乱化学物質のターゲットとしてはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体を中心に研究・調査が進められてきたが、化学物質による内分泌系攪乱作用という観点からは十分とは言えない。また、現在、内分泌攪乱化学物質の作用点がエストロゲン受容体以外にある可能性がさかんに議論されるようになり、そのような観点からも多くの受容体について結合性を調べておく必要がある。そこで本研究では、ヒトの核内受容体すべてについて網羅的に内分泌攪乱化学物質との結合性を調べ、疫学調査や動物実験で得られたデータと比較・検討することにより、新たな内分泌攪乱物質の作用点を明らかにすることを目的とする。

## B．研究方法

### 1．核内受容体 cDNA の単離

#### (1) プライマーの設計

ヒト核内受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) を RT-PCR で増幅するため、GenBank に登録されている配列を基にプライマーを設計した。

#### (2) RT-PCR

Clontech よりヒト臓器由来 mRNA を購入し、これを鋳型として逆転写酵素 (Revert ra Ace、東洋紡) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (Ampli Taq Gold、Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行い、LBD をコードする DNA を増幅した。

#### (3) 塩基配列の決定

PCR により増幅した DNA 断片を pBluescript (Staratagene 社) にサブクローニングし、自動蛍光式 DNA シーケンサー DSQ1000 (島津製作所) にて塩基配列を決定した。

### 2．酵母 two-hybrid 系の構築

1.(1) で単離したそれぞれのヒト由来核内受容体 LBD を酵母 two-hybrid 用ベクター pGBT9 (Clontech 社) に挿入し、得られた発現ベクターを pGAD424-TIF2 とともに酵母 Y190 に組み込んだ<sup>2)</sup>。

### 3．試薬

各種核内受容体に対する標準リガンドとしては以下の物質を用いた。

17 $\beta$ -Estradiol---ER $\alpha$ ,  $\beta$  5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone---AR Progesterone---PR  
Corticosterone---GR Aldosterone---MR *all-trans*-Retinoic acid---RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

3,3',5-Triiodo-L-thyronine---TR $\alpha$ ,  $\beta$  1,25(OH)<sub>2</sub>VitaminD<sub>3</sub>---VDR  
9-*cis*-Retinoic acid---RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Linoleic acid---PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$   
22(R)-Hydroxycholesterol---LXR $\alpha$ ,  $\beta$  Chenodeoxycholic acid---FXR  
5- $\beta$ -Pregnane-3,20-dione---CAR Rifampicin---SXR

環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質は、日本エヌ・ユー・エス株式会社より供与して頂いた。

#### 4．被検試薬の調整

標準リガンドを含め全ての試薬は DMSO に溶解後-20 で保存し、使用前に DMSO で段階希釈して用いた。

#### 5．酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ

各種受容体 LBD とコアクチベーター (TIF2) を組み込んだレポーター遺伝子発現酵母の懸濁液に被検物質 ( $10^{-8}$  ~  $10^{-4}$ M) を加え、30 で 4 時間反応させた。その後、酵母を遠心分離により集め、Zymolyase で酵母細胞壁を溶解後、被検試薬で誘導された  $\beta$ -galactosidase 活性を比色法にて定量した<sup>2)</sup>。試験はすべて n=3 で行った。

(倫理面での配慮)

アッセイ系に用いた遺伝子は、個人を特定できないように市販の mRNA を購入し、それを鋳型として RT-PCR により取得した。

### C．研究結果

#### 1．ヒト核内受容体遺伝子の単離

ヒト核内受容体ファミリーのうちリガンド既知の 2 3 種類の受容体 (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, GR, MR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , VDR, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , FXR, CAR, SXR) について、LBD 部分をコードする DNA を PCR により得ることに成功した。得られた DNA 断片の塩基配列を解析し、すべての受容体 LBD について既報の塩基配列と一致していることを確認した。

\* 略号

ER (エストロゲン受容体) AR (アンドロゲン受容体) PR (プロゲステロン受容体) GR (グルココルチコイド受容体) MR (ミネラルコルチコイド受容体) RAR (ビタミン A 受容体) TR (甲状腺ホルモン受容体) VDR (ビタミン D 受容体) RXR (レチノイド X 受容体) PPAR (ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体) LXR (肝臓 X 受容体) FXR (ファーネソイド X 受容体) CAR (構成的アンドロスタン受容体) SXR (外来異物応答性受容体)

#### 2．酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ系の確立

核内受容体 LBD は、リガンド依存的にコアクチベーターと相互作用することが知られている。そこで、1.で得た受容体 LBD とコアクチベーター-TIF2 を酵母に導入し、two-hybrid 法により両タンパク質のリガンド依存的な相互作用を調べた (図 1 ~ 2 3)。

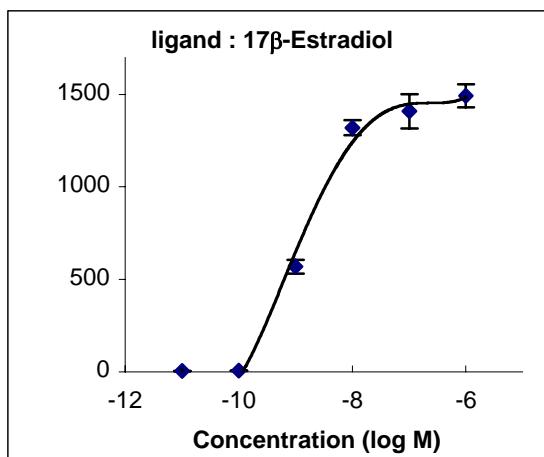


図 1 ER $\alpha$ の標準曲線

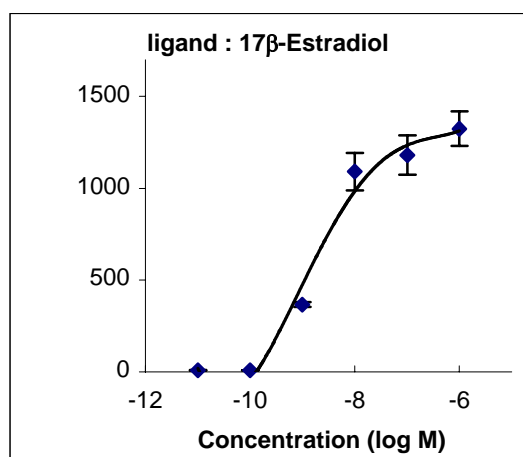


図 2 ER $\beta$ の標準曲線

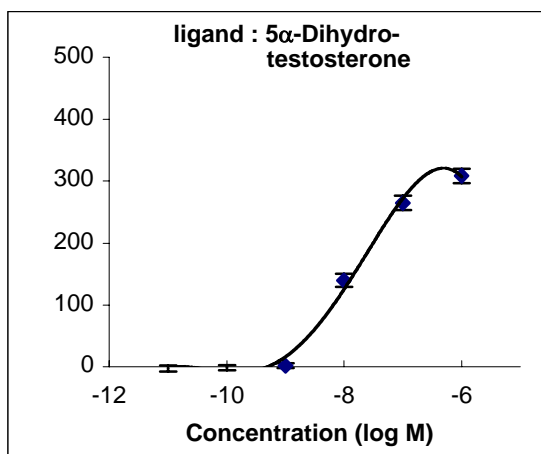


図 3 ARの標準曲線

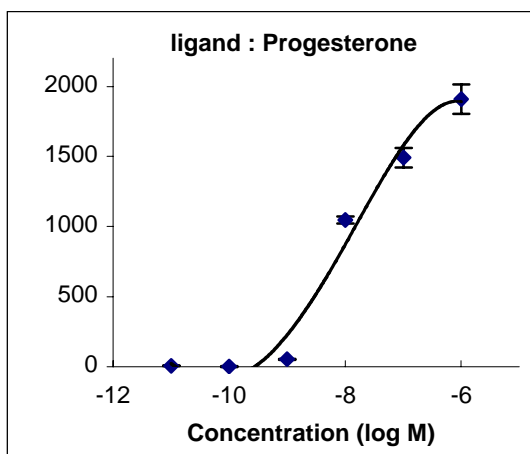


図 4 PRの標準曲線

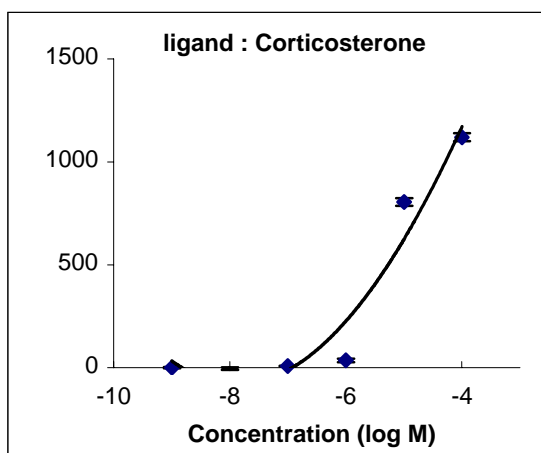


図 5 GRの標準曲線

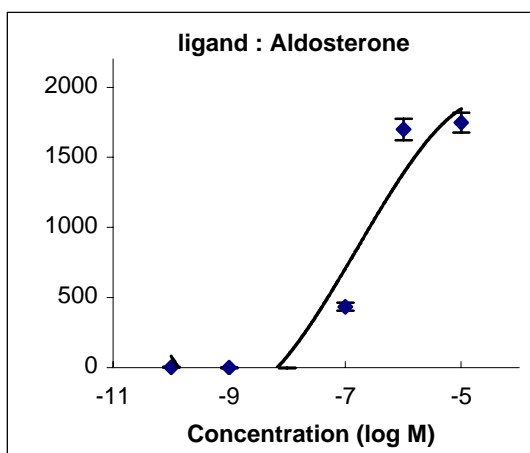


図 6 MRの標準曲線

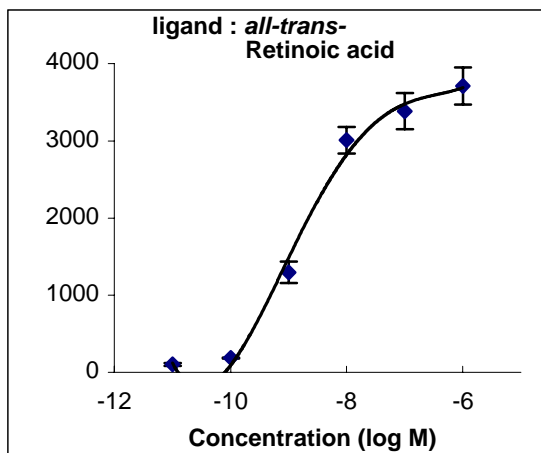


図 7 RAR $\alpha$ の標準曲線

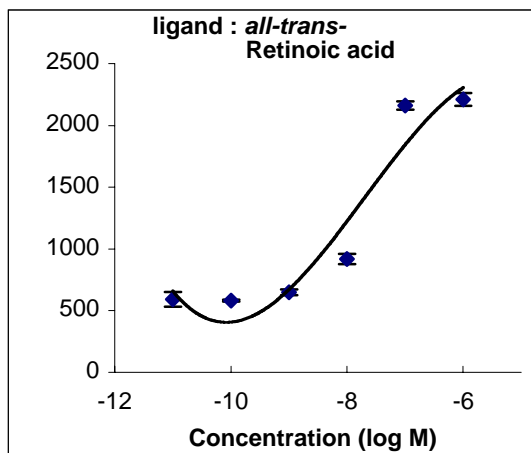


図 8 RAR $\beta$ の標準曲線

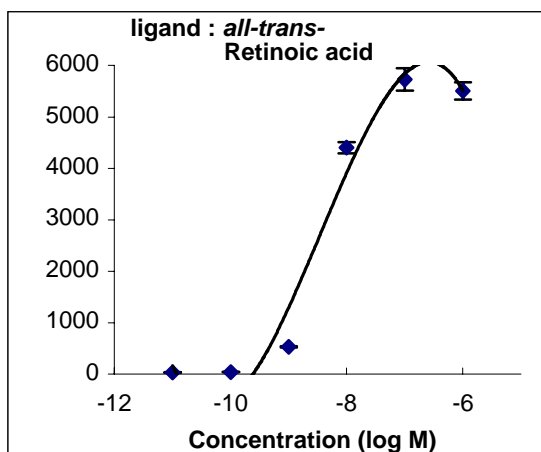


図 9 RAR $\gamma$ の標準曲線

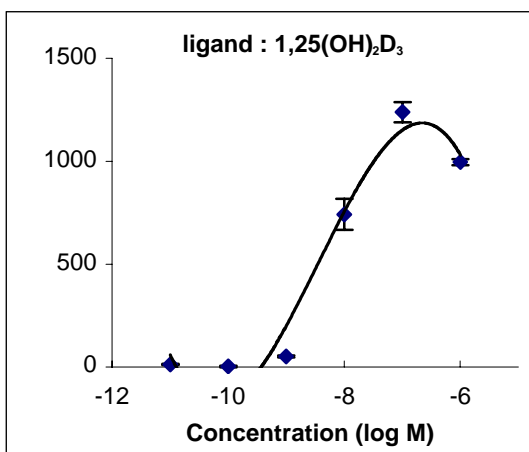


図 10 VDRの標準曲線

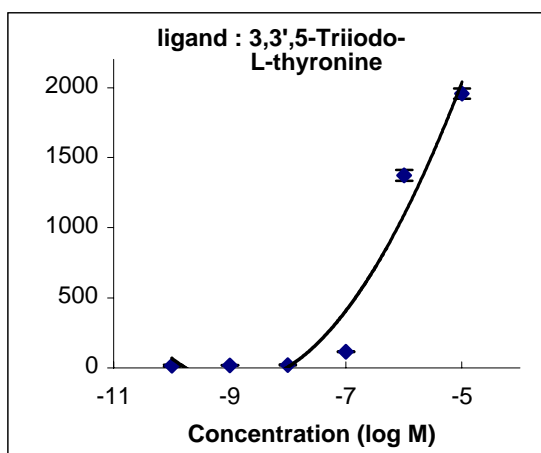


図 11 TR $\alpha$ の標準曲線

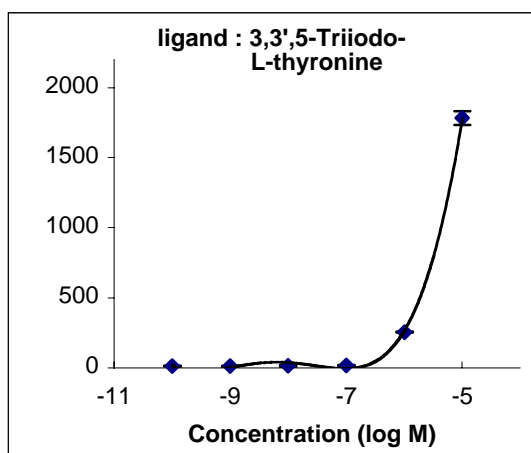


図 12 TR $\beta$ の標準曲線

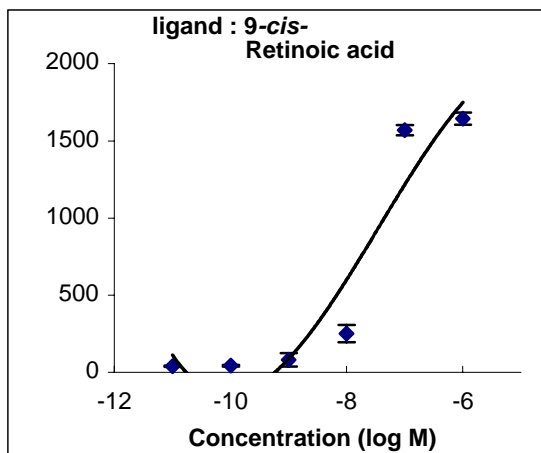


図 1 3 RXR $\alpha$ の標準曲線

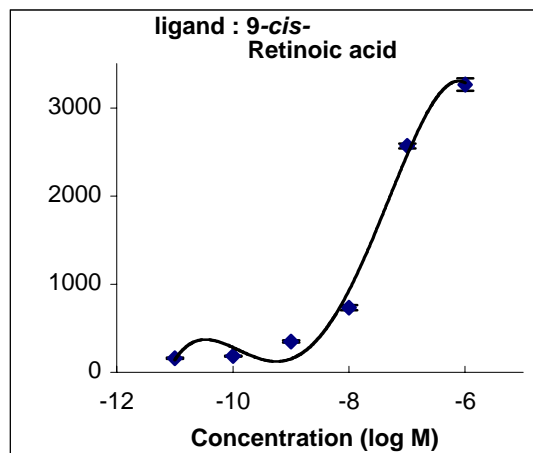


図 1 4 RXR $\beta$ の標準曲線

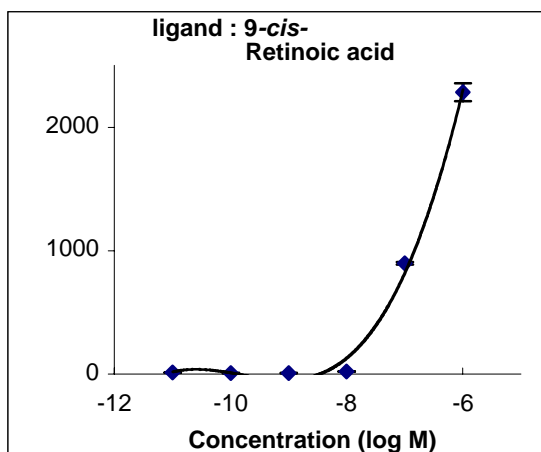


図 1 5 RXR $\gamma$ の標準曲線

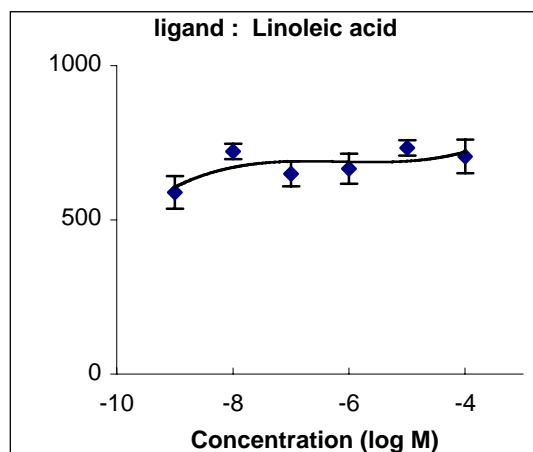


図 1 6 PPAR $\alpha$ の標準曲線

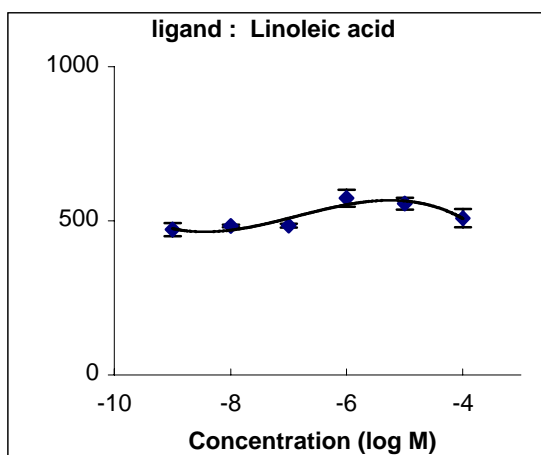


図 1 7 PPAR $\gamma$ の標準曲線

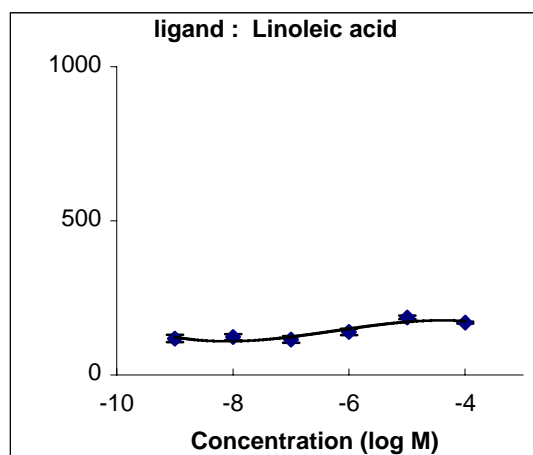


図 1 8 PPAR $\delta$ の標準曲線

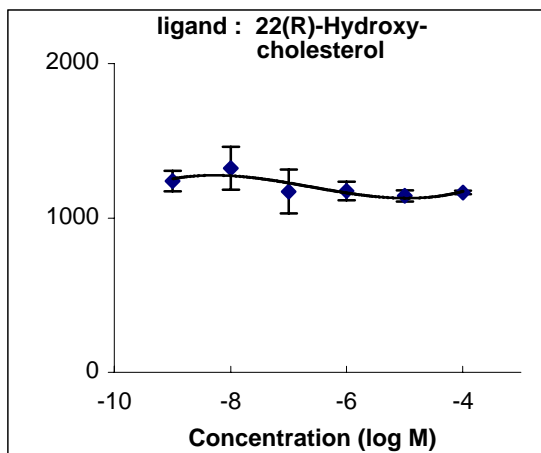


図 1 9 LXR $\alpha$ の標準曲線

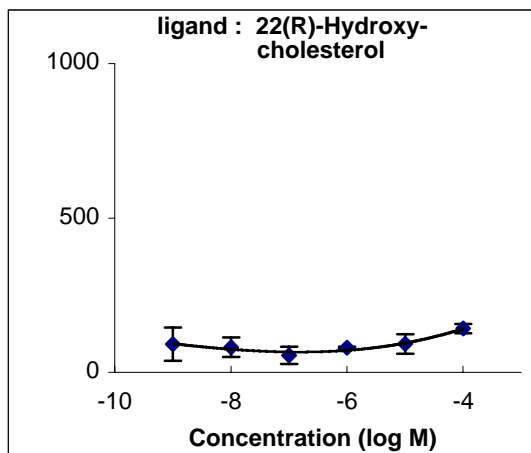


図 2 0 LXR $\beta$ の標準曲線

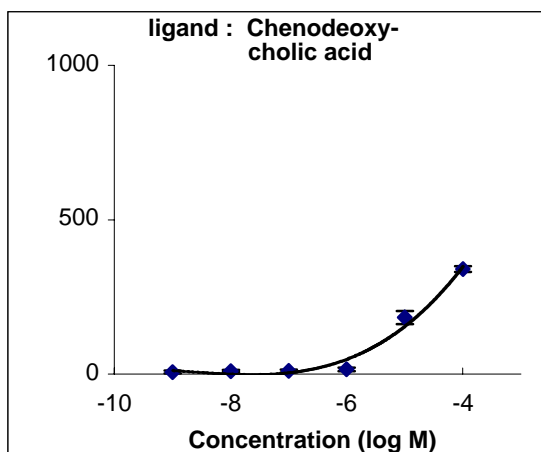


図 2 1 FXR の標準曲線

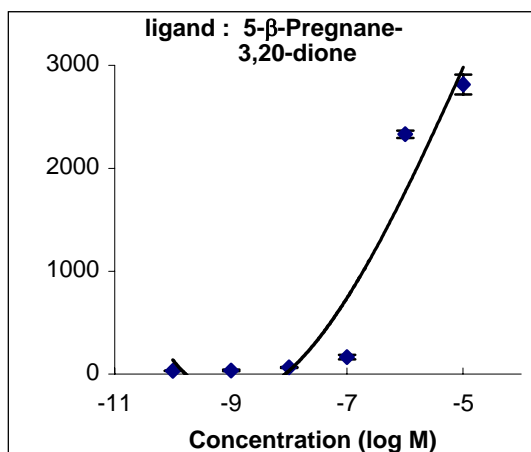


図 2 2 CAR の標準曲線

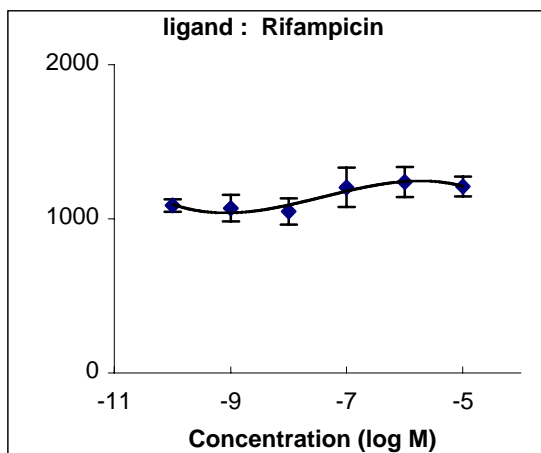


図 2 3 SXR の標準曲線

その結果、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、PR、GR、MR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、FXR、CAR については文献等に記載のあるリガンドに対し良好な応答性が認められたが、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、SXR についてはリガンドを加えない状態でも高い活性を示すものが多く、信頼性のあるアッセイ系とはいえなかった。また、LXR のリガンドについては、24(S),25-Epoxycholesterol が最も高い結合性を示すとの報告があるが、入手不能であったため、代わりに 22(R)-Hydroxycholesterol を用いた。

### 3 . 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の各種核内受容体に対する影響

2. で作成した酵母 Two-hybrid 系を用い、環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質について、各種核内受容体に対するアゴニスト作用を検討し、その結果を表 1-1 及び表 1-2 に纏めた。

その結果、アジピン酸ジ-2-ジエチルヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロールはいずれの受容体に対しても不活性であったが、残りの 15 化合物はいずれかの受容体に対し活性が認められた。その中でも、アルキルフェノール類は既報の通り ER に対して活性を示したが、それ以外にも RAR に対し強い活性を示した(図 2-4-27)。試験したノニルフェノールとオクチルフェノールは、RAR に対し  $10^{-6}$  M から影響を示し、ER への最少影響濃度とほぼ同じであった。

また、図 2-8 に示したように RXR には様々な化合物がアゴニスト活性を示したが、その中でも有機スズ化合物は内因性のリガンドである 9-シスレチノイン酸とほぼ同等の活性であった。ノニルフェノールとオクチルフェノールも、有機スズ化合物と比較するとかなり弱い活性であるが、有意な影響である。また、ベンゾフェノンや 4-ニトロトルエンも  $10^{-4}$  M では有意な活性を持つ。

ER、RAR、RXR 以外に、多くの化学物質が陽性反応を示したのは CAR である。CAR には、試験した 20 化合物のうち半数以上の 12 の化合物がアゴニスト活性を示し、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール、オクチルフェノールは、標準物質として使用した 5- $\beta$ -Pregnane-3,20-dione と同等か、それ以上の活性を示した。



表 1 - 1 試験化学物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性

化学物質	ER <sub>α</sub>	ER <sub>β</sub>	AR	PR	GR	MR	RAR <sub>α</sub>	RAR <sub>β</sub>	RAR <sub>γ</sub>	TR <sub>α</sub>	TR <sub>β</sub>	VDR	RXR <sub>α</sub>	RXR <sub>β</sub>	RXR <sub>γ</sub>	FXR	CAR
ベンゾフェノン			×	×	×	×				×	×	×	×	×	×	×	
オクタクロロスチレン	×	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ジエチル	×	×	×	×	×	×		×		×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ブチルベンジル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
(塩化)トリフェニルスズ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				×	×
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジシクロヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ-n-ブチル	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	
(塩化)トリブチルスズ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				×	×

；標準リガンドと同等の活性、 ；標準リガンドと比較して 1 ~ 1/1000 の活性

；標準リガンドと比較して 1/1000 ~ 1/1000000 の活性、 × ；活性なし

表 1-2 試験化学物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性

化学物質	ER α	ER β	AR	PR	GR	MR	RAR α	RAR β	RAR γ	TR α	TR β	VDR	RXR α	RXR β	RXR γ	FXR	CAR
4-ノニルフェノール			×	×	×	×				×	×	×			×	×	
p-t-オクチルフェノール			×	×	×	×				×	×	×	×		×	×	
ビスフェノールA			×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
2,4-ジクロロフェノール			×	×	×	×	×		×	×	×	×			×	×	×
4-ニトロトルエン	×	×	×	×	×	×			×	×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ジ-n-ペンチル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ジ-n-プロピル	×	×	×	×	×	×				×	×	×	×	×	×	×	
ペンタクロロフェノール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
アミトロール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ-n-ヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	

；標準リガンドと同等の活性、 ；標準リガンドと比較して 1 ~ 1/1000 の活性

；標準リガンドと比較して 1/1000 ~ 1/1000000 の活性、 × ；活性なし

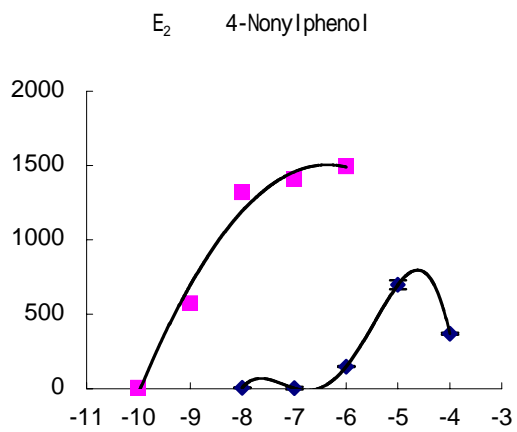


図 2 4 ノニルフェノールの ER $\alpha$  に対する影響

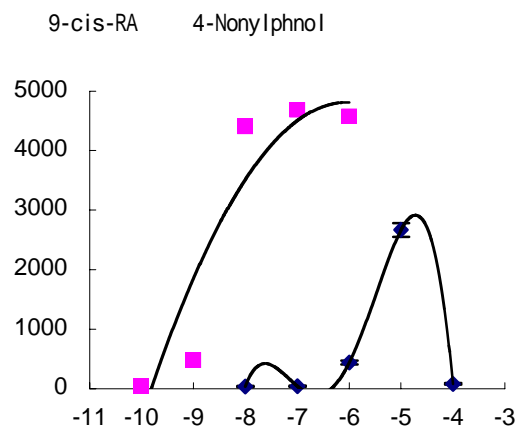


図 2 5 ノニルフェノールの RAR $\gamma$  に対する影響

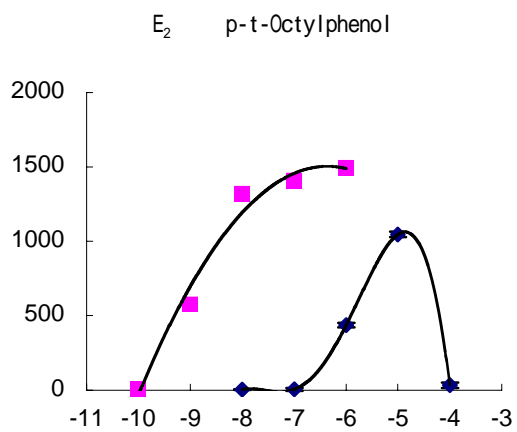


図 2 6 オクチルフェノールの ER $\alpha$  に対する影響

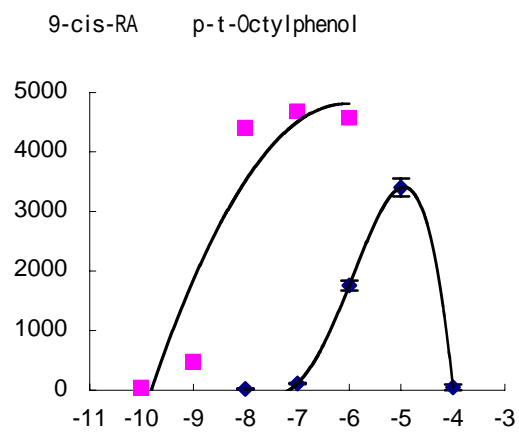


図 2 7 オクチルフェノールの RAR $\gamma$  に対する影響

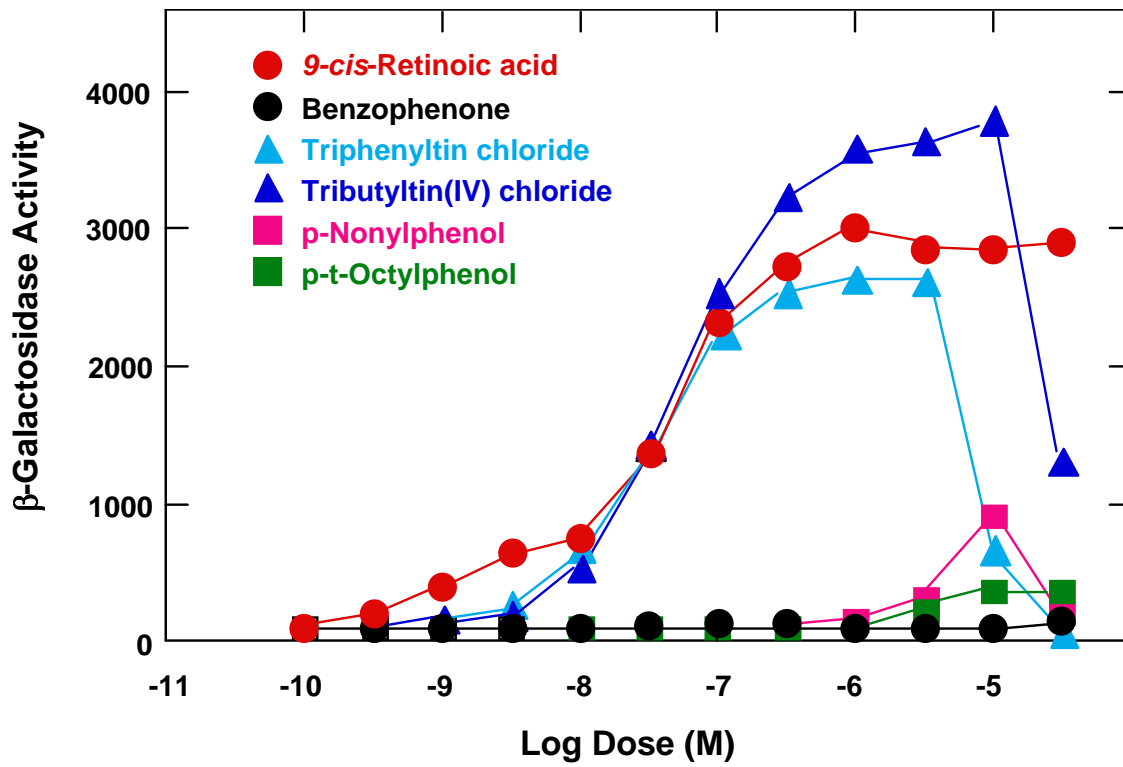


図 2 8 RXR $\beta$ に対する内分泌攪乱物質の影響

## D．考察

### 1．アッセイ系

今回、アッセイ系の確立が出来なかった PPAR や LXR は、もともとはオーファン受容体としてクローニングされ、後のリガンド探索から結合性のある化合物が同定されてきたものである。そのため、高親和性の内因性リガンドについては、現在においてもなお議論の多いところであり、本研究で用いたリガンドが間違いであった可能性も否定できない。また、これらの受容体は、低親和性ながら幅広い種類の脂肪酸に結合するといわれており、培地成分や酵母内にもともと存在する脂肪酸に反応して高いバックグラウンド値を示したのかもしれない。

また、ステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体などの古くからそのリガンドが良く知られている受容体は、試験管内での結合実験ではそれぞれのリガンドに対し高親和性 ( $K_d=0.1\sim 10$  nM) で結合する。しかし、今回作成した酵母 two-hybrid 系では GR、MR、TRs の感度はかなり悪い。これらの受容体も、哺乳動物細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは、酵母の系に比べ 1000 倍から 10000 倍の感度を得られることから、今回作成したアッセイ系の感度の悪さは、酵母の細胞壁や細胞膜の透過性に起因するものと考えられる。

### 2．アルキルフェノール類の RAR に対する影響

これまで、パラ位に疎水性側鎖を持つアルキルフェノール類は ER に結合して内分泌攪乱作用を発揮すると考えられてきた。しかし、本研究において 4-ノニルフェノールや p-t-オクチルフェノールは、ER だけではなく、RAR に対しても比較的高い活性を示すことがわかった。RAR のリガンドである全トランスレチノイン酸は、催奇形性試験の陽性コントロールとして使われるほど強い催奇形性作用を持ち、RAR に結合する物質が生殖や発生段階において毒性を示すことはよく知られている。今回、内分泌攪乱物質と疑われているアルキルフェノール類が RAR にアゴニスト活性を示したことは、これらの物質が ER との結合だけでなく、RAR を介して、場合によっては両者の複合作用として生体に悪影響を及ぼす可能性を強く示唆している。さらに、データには示していないが、パラ位以外に側鎖を持つアルキルフェノール類は ER には結合しないが RAR には結合した。このことは、今後、アルキルフェノール類について、さらに別の観点からその内分泌攪乱作用を検討しなければいけないことを示唆している。

### 3．有機スズ化合物の RXR に対する影響

RXR は、リガンド未同定のままクローニングされたオーファン受容体であったが、その後のリガンドスクリーニングにより 9-シスレチノイン酸が結合することが分かった。RXR と RAR はアミノ酸配列が非常に似ており、9-シスレチノイン酸は RXR と RAR の両方のリガンドとなることができる。しかし、RAR のリガンドである全トランスレチノイン酸は RXR のリガンドとなることができない。RXR は 9-シスレチノイン酸に結合して転写を活性化するリガンド依存性の転写活性化因子であるが、それ以外にも重要な機能を持つ。即ち、非ステロイド型の核内受容体とヘテロ 2 量体を形成して、DNA への結合親和性を飛躍的に上げる。核内受容体ファミリーのうち、ステロイドホルモン受容体はホモダイマーとしてパンドローム型の応答配列に結合するが、それ以外のほとんどの受容体は RXR とヘテロダイマーを形成してダイレクトレピート型の応答配列に結合する。RXR の遺伝子は、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$  の 3 種類存在するが、これらのサブタイプ間でリガンド依存的な転写活性化能や他の核内受容体とヘテロダイマーを形成して DNA に結合する能力には、さほど違いは見出せない。

しかし、ノックアウトマウスの表現型にはかなりの差異が認められる。RXR $\alpha$ のノックアウトマウスは胎生致死であり、心筋と目に奇形が認められる<sup>3)</sup>。RXR $\beta$ ノックアウトマウスの半数近くは出生前後に死亡するが、生き残ったマウスは、外見上、野生型マウスとの違いは認められない。しかし、オスにおいて生殖能の欠損が認められ、原因はセルトリ細胞における脂質代謝の異常と考えられている<sup>4)</sup>。RXR $\gamma$ のノックアウトマウスは正常に生まれ、成長においても異常は認められない<sup>5)</sup>。

一方、有機スズ化合物は毒性が強い化学物質であり、本研究においても $10^{-5}$  Mあたりから、酵母に対する細胞毒性が現れた。しかし、それよりも低濃度ではRXRに対し強いアゴニスト活性が認められた。これらの結果は、低濃度の有機スズ化合物によるイボニシのインポセックスの誘導とよく一致している。また、前述したようにRXR $\beta$ を欠損したマウスではオスの生殖能に欠損が認められるが、その逆の現象としてRXRアゴニストが過剰に作用することにより雄生殖器の過形成が起こったとの推測も成り立つ。

また、RXRはステロイドホルモン受容体と異なり、種差を越えてよく保存されている(表2)。RXRの相同遺伝子はハエや虫類においても存在し、DNAへの結合に関しては脊椎動物のRXRと同様の働きをするが、リガンド結合に関しては違いがある。つまり、ハエや虫由来のRXR(USPとも呼ばれる)は9-シスレチノイン酸に結合できないのである。しかし、興味あることに海産性の下等生物であるクラゲからクローニングされたRXRは、哺乳類のRXRより強い親和性で9-シスレチノイン酸に結合する<sup>6)</sup>。今後は、イボニシからRXRをクローニングし、有機スズ化合物による内分泌攪乱作用がRXRを介していることを証明していく予定である。

表2 各種生物RXRのDNA結合ドメインPボックス付近のアミノ酸配列

種	アミノ酸配列
ヒト	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKR
アフリカツメガエル	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKR
ゼブラフィッシュ	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKR
クラゲ	CSVCSDKAYVKHYGVFACEGCKGFFKR
ショウジョウバエ	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKR
回虫	CSICSDRASGKHYGVFSCEGCKGFFKR

#### 4. CARに対する内分泌攪乱候補物質の影響

CAR(構成的アンドロスタン受容体)は、発見当初、リガンド非存在下でも構成的に転写活性化状態にあり、アンドロスタノールやアンドロステノールが構成的な転写活性化能を抑制することから、他の核内受容体とは異なる転写調節作用をもつ受容体と考えられていた。しかし、その後の研究により、CARはCYP2Bの強力な誘導剤であるTCPOBOPに結合し、転写を活性化することから、SXRと同様に外来異物に対するセンサーとしての役割が考えられる。CARとSXRに結合する化学物質は部分的に重なっているが、基本的にはCYP3Aの誘導剤にはSXRが、CYP2Bの誘導剤にはCARが対応している。

また、CARやSXRの誘導剤は、それによって誘導されるCYP系酵素に代謝されやすい。つまり、

本実験で CAR を誘導した化学物質は CAR により誘導される CYP2B により代謝されやすいと言える。このような理由から、CAR に結合する物質は、生体内では代謝されやすく、残留性が小さく危険度が少ないと言えるかもしれない。このような意味で、アルキルフェノール類は、ER や RAR に強い作用を持つが、体内に留まる時間が短く影響が軽微であるが、有機スズ化合物は全く CAR に結合性を示さない事から代謝を受け難く、体内に長く滞留してしまうために、重大な影響がでると言えるかもしれない。

しかしながら、このような外来異物により誘導された CYP 系酵素は、誘導剤の化学変化を触媒すると同時にステロイドホルモンの代謝をも活性化してしまい、その結果としてホルモンバランスを崩してしまうという二次的な内分泌攪乱作用を生む可能性は残されている。

## E . 結論

環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質について多種類の核内受容体への影響を調べたところ、多くの化学物質が複数の受容体に作用することがわかった。その中でも、特に、アルキルフェノール類の RAR への影響と有機スズ化合物の RXR への影響は重要であり、今後の検討を要する。

## F . 参考文献

1. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. and Magelsdorf. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. *Science*, 294, 1866-1870
2. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 76-83
3. Kastner, P., Grondona, J. M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J. L., Dolle, P. and Chambon P. (1994) Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*, 78, 987-1003.
4. Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J. M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., and Chambon P. (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev.*, 10, 80-92.
5. Krezel, W., Dupe, V., Mark, M., Dierich, A., Kastner, P. and Chambon, P. (1996) RXR $\gamma$  null mice are apparently normal and compound RXR $\alpha$ <sup>+/-</sup>/RXR $\beta$ <sup>-/-</sup>/RXR $\gamma$ <sup>-/-</sup> mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9010-9014
6. Kostrouch, Z., Kostrouchova, M., Love, W., Jannini, E., Piatigorsky, J. and Rall, J. E. (1998) Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13442-13447

# Effect of suspected endocrine disruptors on various kinds of human nuclear receptors

Jun-ichi Nishikawa

Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

## Abstract

Characterization of human risk assessment resulting from exposure to man-made chemicals, which bind to hormone receptors, has emerged as a major public issue. While effect of chemicals on estrogen receptor has attracted much attention, other nuclear receptors also should be cared as targets of endocrine disruptors. Recently, the human genome is reported to contain 48 members of nuclear receptor family. This superfamily includes not only the classic endocrine receptors that mediate the action of steroid hormones, thyroid hormones, fat-soluble vitamins and prostanoids, but a large number of so-called orphan receptors, whose ligands are still unknown so far. In the present study, we have made assay systems for 23 kinds of ligand-known nuclear receptors and examined agonistic activity of suspected endocrine disruptors.

In order to assess the agonistic activity, we used yeast two hybrid system, which is based on the agonist dependent interaction between nuclear receptor and coactivator. At first, we cloned ligand-binding domain of nuclear receptors including ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, GR, MR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , VDR, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , FXR, CAR and SXR. Second, we subcloned these genes into two-hybrid vector pGBT9 so that they were in the same translational reading frame as the vector's GAL4 DNA binding domain. At the same time, coactivator (TIF2) was amplified by RT-PCR and subcloned into pGAD424 for the production of fusion protein with GAL4 activation domain. Finally, the pGBT9-receptor and pGAD424-coactivator were introduced into yeast strain Y190, which contain  $\beta$ -galactosidase gene driven by GAL4 binding site.

Using these constructed systems, we tested the induction of  $\beta$ -galactosidase by adding known-ligands to yeasts. As results, we could see good dose-response curve in concerned with ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, GR, MR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , VDR, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , FXR and CAR. However, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  and SXR could not work well due to the high background.

Next, the yeast two-hybrid systems were applied to 20 suspected endocrine disruptors. Nonylphenol and octylphenol showed agonist activity to RARs as well as ERs. Surprisingly, triphenyltin and tributyltin showed strong effectiveness on RXRs. These results suggest that industrial chemicals may disturb endocrine systems by targeting to various nuclear receptors.



### (3) ビスフェノール A 膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

研究者 船江良彦 (大阪市立大学大学院医学研究科教授)

#### 研究要旨

胎児期・乳児期においてビスフェノール A (BPA) に暴露されたマウスの中枢神経系への影響について、脳内モノアミン量の変化を検討した。脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられている神経伝達物質である。暴露実験の結果、親マウスへの BPA 投与によって胎仔期・乳仔期に間接的に暴露を受けた仔マウスの脳では、ドパミン (DA) の減少が見られた。また、離乳後 3 週間、BPA の暴露を解除した後でも DA の減少は継続しており、この減少が何らかの不可逆的な変異によって引き起こされる可能性が示唆された。この様に、BPA は DA の減少を引き起こす事で中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた事から、脳神経細胞に BPA 結合タンパク質が存在すると考えた。脳シナプトソーム画分に BPA の結合活性が見られたので、この BPA の結合タンパク質の単離・精製を試みた。可溶化、イオン交換カラムクロマトグラフィー、BPA-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって本タンパク質を SDS-PAGE 上でシングルバンドとして精製する事に成功した。N 末端アミノ酸配列の分析により、このタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) と相同性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。大腸菌内で大量発現させたヒスチジン融合 PDI を用いて競合的結合実験を行ったところ、BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。

以上の結果より、BPA の中枢神経系への作用は PDI に結合する甲状腺ホルモンに影響を与えた結果起こる事が推察された。そこで、PDI への親和性を指標に、平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」の 20 種類の化合物についてスクリーニングを行った。その結果、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、BPA、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールが甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。これらの物質は、PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事によって、内分泌攪乱作用を示すことが示唆された。

#### 研究協力者

今岡 進 (関西学院大学理工学部教授)

廣井 豊子 (大阪市立大学大学院医学研究科講師)

#### A. 研究目的

##### 1. BPA の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン量に及ぼす影響

BPA はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であるほか、歯科用シーラント剤として用いられており、容易に経口的に摂取されうる化合物である。また BPA は、エストロゲン活性を有しており、内分泌攪乱化学物質 (EDCs) の一つとして注目されている化合物である。脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられており、躁鬱病や感情障害・行動障害といった多くの精神疾患、さらには近年問題となっている注意欠陥・多動性症候群 (ADHD) や学習障害 (LD) の発症に関与しているとの報告もある。

本研究では、BPA の胎仔期・乳仔期暴露による脳内モノアミン量の変動を調べる事を目的とした。

##### 2. BPA 結合タンパク質の精製

EDCs の中枢神経系への影響は、不明な点が多く、分子生物学的なメカニズムが明らかにされていない。前研究の結果より、BPA が中枢神経系へ影響を及ぼす事が明らかとなった事から、この BPA が結合するタンパク質 (レセプター様タンパク質) の単離・精製を試みた。

### 3. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

優先してリスク評価に取り組む物質は、内分泌攪乱作用を持つと断定されたものではなく、優先的に調査研究を行う対象として取り上げられたもので、生殖器系や免疫系への影響を指標とした評価法がほとんどであり、近年問題視されるようになった「中枢神経系への影響」をエンドポイントとした評価法は全くと言っていいほど行われていない。それには、EDCs の作用点が捕らえられていないからであると考えられる。

我々の研究の結果より、BPA の結合タンパク質の実体が明らかになった。このタンパク質は甲状腺ホルモンである  $T_3$  の結合タンパク質であった。BPA は甲状腺ホルモンである  $T_3$  の結合を阻害する事によりその働きを模倣・阻害している可能性が示唆された。本研究では H12-13 年度にリストアップされた、優先してリスク評価に取り組む物質の 20 種の化合物を  $T_3$  との競合的結合実験によりスクリーニングし、 $T_3$  の作用を攪乱しうる物質を選定する目的で検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. BPA の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン量に及ぼす影響

BPA を Sire および Dam ddy マウスに混餌で経口投与し、それら親マウスから生まれた offspring マウスを用いて検討を行った。BPA 投与群は、親の BPA 投与の量により、0.002, 0.5, 2, 8 mg / g of food の 4 種に分け、それら 4 種それぞれ、雄、雌各 7 匹の offspring を一群とした。コントロール群は、正常食を摂取させた。Offspring マウスは、離乳直後の 3 週齢と 6 週齢を用いた。摘出した脳は正中二等分し、液体窒素にて凍結後、使用するまで -80 °C にて保存した。

脳内モノアミンの定量には半脳を用いて行った。凍結脳組織に内部標準物質としてイソプロテレノールと、脳組織重量に合わせて過塩素酸を加えてヒスコトロンで懸濁し、タンパク質を変性させた後、遠心分離を行い変性タンパク質を除去した。上澄に酢酸ナトリウムを添加して pH を 3.0 付近に調節した後、HPLC 分析に供した。検出には多電極型電気化学検出器を用いた。脳内の主要なモノアミン系神経伝達物質として DA, ノルエピネフリン (NE), セロトニン (5-HT) を定量した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮として、マウスへの BPA の投与は、苦痛を伴わない混餌で行い、組織摘出は断頭法による安楽死後、速やかに行った。

### 2. BPA 結合タンパク質の精製

#### (1) BPA 結合実験

BPA の結合活性は、BPA の放射性同位体 ( $[^3H]$ -Bisphenol A) とタンパク質標品を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で 4 °C にて 2 時間インキュベーションした後、遠沈法あるいは PEG 沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。

【遠沈法】反応後の反応液を遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) した後、上澄をアスピレーターにより除去した。沈澱を 1.0 mL の洗浄バッファー (150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回、洗浄した。

【PEG 沈澱法】反応後の反応液に等量の 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 (12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2 M  $ZnCl_2$  を含む) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1 M  $ZnCl_2$  を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。

#### (2) ラット脳 P2 画分の調製

以下の操作は全て 4 °C にて行った。ラット脳をバッファー A (0.32 M sucrose / 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.05 % の protease inhibitor cocktail を含む) で 2 回洗浄した後、湿重量に対して 9 倍量のバッファー A を加え、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズ (900 - 1,000 rpm, 10 strokes) した。ホモジネートを遠心分離 (1,500 × g, 20 min) して得られた上澄を S1

画分とした。S1画分を遠心分離（17,000×g, 15 min）して得られた沈澱をバッファー A にて懸濁し、P2画分とした。P2画分をさらに遠心分離（17,000×g, 15 min）して得られた沈澱を P2'画分（粗シナプトゾーム画分）とした。P2'画分は実験に使用するまで-80℃にて保存した。

### (3) BPA 結合タンパク質の精製

以下の操作は「BPA-Sepharose 樹脂の作製」以外すべて 4℃にて行った。

【可溶化】P2'画分（10 mg / mL）250 mg-protein に終濃度 0.5 %となるように sucrose monolaurate を加え、スターラーを用いて 60 分間、穏やかに攪拌し、可溶化を行った。遠心分離（100,000×g, 60 min）して得られた上澄を可溶化画分とした。

【陰イオン交換カラムクロマトグラフィー】可溶化画分を Whatman DE52 カラム(25 mL-bed, 2.5×5 cm)に供した。NaCl によるステップワイズにてタンパク質を溶出し、BPA との結合活性の高い画分を採取した。

【BPA-Sepharose 樹脂の作製】BPA のメチル基を置換した BPA 誘導体（図 1）の合成は、神戸天然物化学株式会社に依頼した。BPA を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) とカップリング反応により結合させ、BPA アフィニティーカラムを作製した。

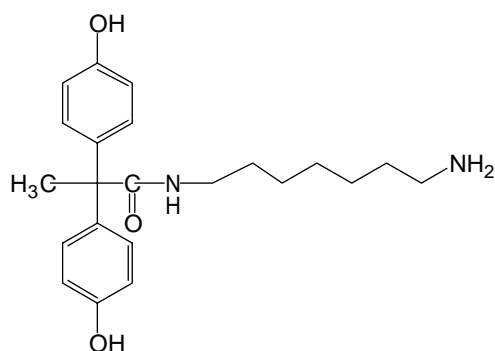


図 1 BPA誘導体の構造

【BPA アフィニティーカラムクロマトグラフィー】陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいて BPA との結合活性の高かった画分を BPA-Sepharose 樹脂(2.0 mL wet vol)と混合し、ローテーターを用いて 2 時間、穏やかに攪拌した。スラリーをカラム（ポリプレップ エンプティーカラム, BIO-RAD）に移し、8 mL の洗浄バッファー（バッファー A + 0.15 M NaCl）で洗浄した。5 mL の溶出バッファー（2 mM BPA を含むバッファー A + 0.15 M NaCl）を加え、スラリーを 1 時間、穏やかに攪拌した。スラリーをカラムに移し、溶出液を採取した後、さらに 5 mL の溶出バッファーにて溶出した。

### (4) ラット脳PDI遺伝子 (*rPDI*) のクローニングとHis-tag融合発現

ラットより脳を摘出し、ISOGEN (QIAGEN) を用いて mRNA を調製した。RT-PCR 法により cDNA を調製し、ラット肝臓 PDI の塩基配列をもとに設計したプライマーを、二つの組み合わせを用いて PCR を行い、遺伝子の増幅を行った。

#### 組み合わせ A (全長 *PDI* 前半部分)

sense : 5'-GGG GGG ATC CTC CGA CAT GCT GAG CCG TGC-3'

antisense : 5'-AGC GAT GAC GAT ATT CTC AT-3'

#### 組み合わせ B (全長 *PDI* 後半部分)

sense : 5'-ACC TGA TGA GCC AGG AAC TG-3'

antisense : 5'-CCC TCG AGA GAT CTG GCT TCT GCA CTA C-3'

組み合わせ A で増幅された PCR 産物を *EcoR* と *BamH* により制限酵素消化し、pBluescript KS+ (TOYOBO) に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞 (DH5 COMPITENT high,

TOYOBO)に導入し、形質転換させた。Ampicillinを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*EcoR* と *Xho* により制限酵素消化した。これに組み合わせBで増幅されたPCR産物を *EcoR* と *Xho* により制限酵素消化したのち組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillinを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*Sac* と *Kpn* により制限酵素消化した。*rPDI*全長を含むDNA断片をpQE-80L(QIAGEN)に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillinを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*rPDI*の全長が含まれている事を確認した。

#### (5) His-tag融合PDIの精製

上記(4)の方法によってられたクローンのグリセロールストックより2×YT培地に植菌し、一晚培養した。10 mLの培養液を500 mLの培養液に植菌し、OD<sub>600</sub>=6.0に達するまで振騰培養を行った。培養液にIPTGを1.0 mg/mLとなるように加え、さらに4時間、振騰培養を行った。遠心分離により細胞を回収し、PBSに再懸濁して遠心分離により洗浄菌体を得た。50 mLの溶菌バッファー (6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.5 % protease inhibitor cocktail, 1 mg/mL lysozyme, pH 8.0) で懸濁し、氷上に30分間おいた。氷中にて5分間の超音波処理を行った後、sucrose monolaurateを0.5%となるように加え、スターラーを用いて4にて60分間、穏やかに攪拌した。遠心分離 (50000×g, 30min, 4 )により得られた上澄を可溶化画分とし、Ni-NTA agaroseカラム (1.0 mL, QIAGEN) に供した。5 mLの洗浄液 (溶菌バッファー + 0.1 % sucrose monolaurate+0.5 % protease inhibitor + 10 mM imidazole) でカラムを洗浄した後、imidazoleによるステップワイズにて溶出した。それぞれの画分をSDS-PAGE分析に供し、必要な画分を集めて50 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) に対して透析を行った。得られた最終画分をHis-tag融合PDI精製標品とした。

### 3 . PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

#### (1) 合的結合阻害実験

本実験に用いた試験物質は全て Wako 社より購入した。

T<sub>3</sub>の結合活性は、試験物質の存在下で、T<sub>3</sub>の放射性同位体 [<sup>125</sup>I]-3,5,3'-triiodothyronine, 1.0 nM) と His-tag 融合 PDI (0.1 mg/mL protein) とを 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で3時間、4にてインキュベーションした後、PEG沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。T<sub>3</sub>の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (30 μM) の T<sub>3</sub>を加えた系を用意した。また試験物質を溶解するためのエタノール濃度は、事前に試験を行い、T<sub>3</sub>の結合に影響を与えない濃度を検討した結果、終濃度 4 %とした。

T<sub>3</sub>の結合率 B / B<sub>0</sub> (%)は下式により求めた。

$$B / B_0 (\%) = (TB - NB) / (T_0B - NB) \times 100$$

TB : 試験物質存在下での T<sub>3</sub> の結合量  
T<sub>0</sub>B : 試験物質非存在下での T<sub>3</sub> の結合量  
NB : 非特異的結合量

#### (2) データ解析

得られたデータは、GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.) により解析を行った。