

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01741

研究課題名(和文)ビスフェノールの核内受容体を介した内分泌攪乱シグナル毒性

研究課題名(英文)Nuclear receptor-mediated bisphenol endocrine disrupting signal toxicity

研究代表者

下東 康幸 (SHIMOHIGASHI, Yasuyuki)

九州大学・理学研究院・名誉教授

研究者番号：00211293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールA(BPA)の核内受容体を介したシグナル毒性、低用量効果の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、(i) BPA暴露はマウスやショウジョウバエに多動性症状を引き起こすこと、(ii) それは概日リズム伝達の神経ペプチド時計遺伝子での異常であり、(iii) BPAによるDNAメチル化の異常に端を発すること、(iv) BPAの強い活性は自発活性化型核内受容体の協働作用による効果であり、核内受容体一般的に起こるシグナル毒性の本質であることが明らかとなった。分子レベルでのBPAの低用量効果の原因が証明されたのは初めてのことである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to clarify the nuclear receptor-mediated molecular mechanisms of signal toxicity and low-dose effects of endocrine disruptor bisphenol A. As a result, the followings to prove those objectives have been elucidated. Those include (i) BPA-exposure causes hyperactivity both in the fruit fly *Drosophila*, and mice, (ii) such hyperactivity was found to associate with the disorder of genes of circadian rhythm-transmitting neuropeptides, (iii) the disorder appeared to originate from the suppression or facilitation of DNA methylation, and (iv) BPA's high transcriptional activation activity is due to the cooperative work with highly constitutively active self-activated nuclear receptors.

研究分野：内分泌かく乱物質と核内受容体の構造機能生化学

キーワード：有害化学物質 内分泌かく乱物質 ビスフェノール 核内受容体 シグナル毒性

1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールA (BPA) の特異的ターゲットとしてエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) が発見され、これを契機に BPA の核内受容体を介したシグナル毒性の機構解明が開始された。こうしたなか、BPA の「DNA のメチル化への関与」が指摘され、その分子機構解明の取組みは、メチル化促進、あるいはメチル化抑制の両方が指摘されて混迷を深めていた。一方、『エストロゲン受容体 ER に ERR γ が協働的に働いて、BPA の弱い活性を大きく増強し、タンパク質の過剰発現が起こる分子機構』を発見し、これが BPA の核内受容体を介したシグナル毒性の分子機構の本質である可能性が急浮上し、この協働作用の一般性の証明、分子機構解明が切要となった。

2. 研究の目的

本研究の主要な課題は、BPA が多動性や低活動症状を起こす時計遺伝子へ関与する分子機構の解明である。まず、BPA がメチル化剤とメチル捕捉剤のラジカルに開裂し、遺伝子と反応する可能性を明らかとする。さらに、核内受容体を介したシグナル毒性・低用量効果として、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) をはじめとする自発活性化型核内受容体、及びエストロゲン受容体 (ER) や甲状腺ホルモン受容体 (TR) などのリガンド活性化型核内受容体の協働作用における分子機構を解明する。これらのため、① BPA 暴露ショウジョウバエ・マウスにおける歩行活動の解析と原因遺伝子の詳細解析、② 活動異常における BPA による DNA メチル化促進および抑制の分子機構の解明、③ 甲状腺ホルモン受容体系における一連の自発活性化型核内受容体の協働作用の分子メカニズムの解明、④ BPA 暴露による自閉症関連遺伝子への影響解析、等の項目について調べる。

3. 研究の方法

研究に重要で必要な解析結果をもたらした研究方法について、その主要なものを以下に列挙する。

(1) DNA 試料からのメチルシトシンの定量：BPA による DNA メチル化を解析するために、4 種のヌクレオチド塩基の一つであるシトシンのメチル化を定量した。市販キット、及び特異的抗体を用いて 5-メチルシトシンを検出・定量した。なお、メチル化基質はシトシンを 10、20 個含むオリゴを調製した。

(2) メチル化シーケンス：BPA により 5-メチルシトシンを含む DNA 遺伝子の解析は、市販のキットを用いるパイサルファイトシーケンス法で実施した。DNA 上のシトシンはパイサルファイトを反応させるとウラシルに

変換されるが、メチル化シトシンはメチル化シトシンのまま変換されない。

(3) ERR γ によるシトシン含有オリゴヌクレオチドのメチル化解析：シトシンを含むオリゴヌクレオチドを、ERR γ 、及び BPA と共にインキュベートし、オリゴヌクレオチドがメチル化されるかを HPLC で解析した。

(4) ERR γ によるビスフェノールAの脱メチル化解析：BPA がラジカル分裂してメチルラジカルが分離すると、メチル基が1個欠失したビスフェノール E、2個欠失したビスフェノール F が生成する。この可能性を調べるため、ERR γ タンパク質と BPA を反応させた後に、HPLC で解析した。

(5) ビスフェノールA暴露マウスの活動量解析：BPA 暴露マウスの母親マウスから生まれた仔マウスについて、活動量を ACTIMO 自発歩行運動量測定装置で 16 週齢まで間断なく測定し、活動度・活動量を解析した。

(6) 視交叉上核の神経ペプチド遺伝子の解析：多動性症状、及び低活動性のマウスについて、視交叉上核 SCN に存在する一連の(約 10 種)概日リズム伝達の神経ペプチドとその受容体の遺伝子解析を実施。mRNA 発現量、突然変異、選択的スプライシング、選択的ポリアデニレーション等を精査した。

(7) リガンド活性化型核内受容体の自発活性化型核内受容体による協働効果の分子機構解析：甲状腺ホルモン受容体は、甲状腺ホルモンにより活性化される典型的なリガンド活性化型核内受容体である。これに対して、ERR γ をはじめとする 13 種類の自発活性化型核内受容体が協働作用を示すかを、CV-1 細胞を用いたレポーター遺伝子転写活性化試験によって調査した。天然の甲状腺ホルモン triiodothyronine (T₃)の活性が増強されるかを調べた。甲状腺ホルモン受容体は、 α 型、 β 型についてそれぞれ個別に試験した。

(8) 自閉症関連遺伝子への影響解析：BPA と自閉症との関連が注目されている。そこで、BPA 暴露マウス脳内の CHD8 や REST などの自閉症関連遺伝子への影響を調べた。

4. 研究成果

本研究の特色の一つは、BPA 食餌・暴露についてホ乳類・マウスと、ヒト遺伝子の最良モデルであるショウジョウバエについて並列的に、あるいは一方を先行・パイロット実験として実施し、その結果をお互いにフィードバックしながら相補的に解析を進めてきたことである。これまでに明らかとなった主な研究

成果は以下に挙げる。

(1) ビスフェノールA暴露による歩行活動量への悪影響：初期の研究により「BPA暴露がマウスでは低活動性症状、ショウジョウバエでは多動性症状を引き起こす」ことが明らかになった。ショウジョウバエのごく少数に低活動性症状が見られたものの、両者での差違について、特にマウスではそれまで多動性、低活動性と報告が混乱していたので、今回、非常に注意深い再検討を実施することにした。

継続的なBPA暴露による行動への定量的な影響を評価するために、行動活動量は幼若期から成体期まで約3~4ヶ月間、常時に測定した。その結果、まず、一部のマウスは成長とともに活動量が増加し大きな多動性症状を示し、その他のほとんどのマウスはこれらに比較するとはるかに低い活動量であるものの、終生一定した活動量を示すことが判明した。そして、BPA暴露すると、前者の多動性マウスの平均活動量は有意に低下することが明らかとなった。一方、一定した活動量を示す大部分のマウスの活動量はBPA暴露によって有意に増加し、多動性症状になることが判明した。この症状は雌マウスでより著明であった。

こうして、最終的にはマウス、ショウジョウバエともに「BPA暴露により多動性症状を引き起こす」ことが明らかになった。少数に見られる異常な活動量は、BPA暴露により明確に抑制されることも明らかとなった。

(2) 雌雄で異なる概日性神経ペプチド遺伝子が誘導するビスフェノールA暴露マウスにおける多動性症状：BPA暴露マウスの多動性症状は、体内時計のシグナル伝達機構が影響を受けたためと考えられ、概日リズム振動体・視交叉上核 (SCN) で機能する一連の神経ペプチドとその受容体について調べた。その結果、メスでは活動量を抑制するアルギニンバソプレシン (AVP) のmRNA発現量が有意に減少しており、これはオスでは見られなかった。反対に、オスでは活動量を促進するニューロメディンU (NMU) が有意に増加していたが、メスでは変化していなかった。

AVP mRNA、及びNMU mRNAのアイソフォームの発現様式を詳細に調べたところ、BPA暴露によって著しく影響を受けることが判明した。こうしてBPA暴露によって、雌雄で異なる脳内神経ペプチド遺伝子mRNAの発現量が増加し、それを起因として行動異常を引き起こし

ている可能性が強く示唆された。さらに、AVPと非常に類似した構造を持ち、また遺伝子位置も相互に隣接しているオキシトシン (OXT) のmRNA発現量も大きく変化していた。このAVPとOXT遺伝子の間にERR γ が結合し、特にAVP mRNAの発現を制御する可能性が示された。

(3) ショウジョウバエのBPA食餌のDNAメチル化への影響：BPA食餌による遺伝子DNA転写機構への影響を調べるために、ショウジョウバエ核内受容体ERRとそのDNAメチル化に着目し、解析した。しかし、BPAはERRには結合せず、ERRの転写活性はBPA暴露により変化しないことが分かった。一方、ショウジョウバエの培養細胞を用い、BPAを暴露したところDNAメチル化量が増加することが判明し、BPAはDNAメチル化機構を介して遺伝子発現を攪乱している可能性が判明した。

(4) ビスフェノールA-ERR γ 結合体はメチル化剤を創成するかの検討：ERR γ に結合するBPAはかなり窮屈な状態にあり、ラジカル分解でメチル化剤、被メチル化剤が創成し、DNAにランダムな変異が誘起される可能性が考えられる。一方、ベンゼン環を持つBPA自体がメチル基受容体として働く可能性も考えられる。そこで、以下のモデル実験を検討した。

シトシンCを10、あるいは20含むオリゴヌクレオチドを発現ベクターpcDNA3.1に導入した発現プラスミドを作製して、HeLa細胞にERR γ を発現させ、BPA暴露の有無でメチル化量の変化を比較・解析した。10 μ M BPAで、24 hr後に細胞からDNAを抽出し、5-メチルシトシンを調べた。その結果、BPA暴露によりメチル化が減少し、BPAがメチル基受容体として機能することが示唆された。

ERR γ を介したBPAのラジカル反応が起こるかどうかが、特に生成するビスフェノールEが検出されるか？ HPLCで調べた。しかし、有意な生成は確認されなかった。

(5) 甲状腺ホルモン受容体-トリヨードチロシンの自発活性化型核内受容体による活性増強：ER α に対してBPAの転写活性は非常に低いものの、ERR γ を共発現すると著しく増強される。これが他の核内受容体でも起こる一般的な事象かを、本研究ではまず甲状腺ホルモン受容体 α 型 (TR α) について調べた。TR α に対して、BPAは全く活性を示さなかった。そこで、天然の甲状腺ホルモンtriiodothyronine (T₃)による転写活性が一連の自発活性化型核内受容体によって増強され

るか？ を系統的に調べた。

ERR α や ERR γ を TR α と共発現して T₃ の活性を測定したところ、TR α の転写活性は著しく増強された。さらに、ER α では増強を示さなかった ERR β が TR α の活性を最も強く増強することが判明した。これらの結果は、自発活性化型核内受容体は活性増強する核内受容体を識別する能力を持つことを明らかにした。自発活性化型核内受容体の全 13 種と TR α との共発現について、活性増強度 (fold-elevation) の考え方を導入して比較・検討した結果、合計 10 種の核内受容体が下図に示すような活性増強を起こすことが明らかとなった。また、ERR α 、ERR γ は、そのリガンド結合ドメイン (LBD) のみ活性増強を示すことが判明した。

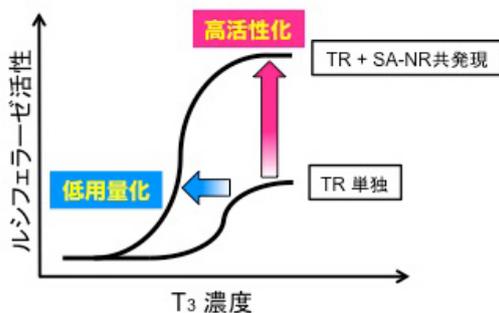


図1. 甲状腺ホルモン受容体 (TR) と自発活性化型核内受容体 (SA-NR) の共発現でのレポーターアッセイにおける活性増強・低用量効果を示す証左。

β 型 TR β -T₃ の系についても活性増強を調べたところ、明確な活性増強を示した核内受容体は TR α -T₃ の系で活性増強を示した 10 種のうちの 5 種のみで、その程度は TR α の場合よりずっと小さかった。以上より、「リガンド活性化型核内受容体の活性は自発活性化型核内受容体によって増強される」ことの一般性が証明された。

(6) ビスフェノール A 暴露の自閉症関連遺伝子への影響解析: 近年 BPA と自閉症との関連が注目されている。このため、BPA 暴露マウス脳内の自閉症関連遺伝子への影響について調べた。遺伝子発現量を測定したところ、ほとんどが BPA 暴露によって胎生期の発現日齢リズムが 1 日早くなっていることが判明した。特に、神経分化遺伝子の抑制に働くタンパク質の発現量が低下しており、その働きが適正に行えない可能性が示された。さらに、神経分化の時期を早めてしまうような遺伝子発現の変化が見られた。神経発達の早熟については未解明なことが多いが、脳形成異常など、脳神経系への悪影響が報告されており、BPA 暴露がこれ

らを強く促進する可能性が示された。

本研究においては、内分泌攪乱化学物質・ビスフェノール A (BPA) や、その代替となる新世代ビスフェノールについて、核内受容体を介したシグナル毒性、低用量効果、内分泌攪乱作用の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、① BPA 暴露がマウス、ショウジョウバエともに多動性症状を引き起こすこと。そして、② この多動性症状は、概日リズム伝達の神経ペプチド時計遺伝子の異常に伴う悪影響であること。③ 時計遺伝子の異常は DNA メチル化の異常に端を発する可能性があること。④ BPA の強いエストロゲン様活性は、自発活性化型核内受容体の協働作用による低用量効果であること。そして、⑤ この協働作用は、リガンド活性化型核内受容体と自発活性化型核内受容体の共発現下で一般的に起こり得る事象であり、ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性の本質であること、などが明らかとなった。分子レベルでの BPA の低用量効果の原因が証明されたのは世界で初めてのことである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

- ① X. Liu, H. Nakagawa, M. Sugiyama, A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: Homodimer function of human nuclear receptor ERR α evidenced using α -helix peptides in the dimer interface. *Peptide Science* 2017, 査読有, 190-191 (2018).
- ② K. Torikai, R. Koga, X. Liu, K. Umehara, T. Kitano, K. Watanabe, T. Oishi, H. Noguchi, and Y. Shimohigashi: Design and synthesis of benzoacridines as estrogenic and anti-estrogenic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, 25(20), 5216-5237 (2017). DOI: 10.1016/j.bmc.2017.07.067
- ③ X. Liu, H. Nishimura, A. Fujiyama, A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: Bisphenol A receptor ERR γ physiologically functions as homodimer. *Biomedical Advances*, ep-20178-10 (2017). <http://biomedical-advances.org/ep-20178-10/>
- ④ X. Liu, H. Nishimura, A. Fujiyama, A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: α -Helix-peptides composing the human nuclear receptor ERR γ competitively provoke inhibition of functional homomeric dimerization. *Biopolymers-Peptide Science*, 査読有, 106(4), 547-554 (2016). DOI: 10.1002/bip.22795
- ⑤ 下東康幸: 内分泌攪乱物質「ビスフェノール」のホルモン受容体応答. 學士會会報, 査読無, 919, 93-97 (2016).

- ⑥ M. Sugiyama, Y. Motomatsu, Y. Matsuyama, S. Kajiyama, T. Kameda, T. Saito, E. Uchimura, X. Liu, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: SCN circadian rhythm signal transduction neuropeptides evoke hypoactive phenotype differently in male and female mice. *Peptide Science* 2015, 査読有, 53-54 (2016).
- ⑦ A. Tokumaru, A. Matsuo, S. Umeno, Y. Matsuyama, M. Nakamura, M. Sumiyoshi, X. Liu, A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: Expression analysis of neuropeptide *pdf* mRNA in the hypoactive and hyperactive fruit flies *Drosophila melanogaster*. *Peptide Science* 2015, 査読有, 317-318 (2016).
- ⑧ 劉 曉輝, 松島綾美, 下東康幸: 乳がん細胞におけるビスフェノールのエストロゲン様活性. *BIO Clinica*, **30(10)**, 90-95, (2015).

[学会発表] (計 54 件)

- ① 劉 曉輝 他: Inactive AF1 domain- lacking ER α isomer is activated by constitutively active human nuclear receptor ERR α and ERR γ (不活性な ER α -AF1 ドメイン欠損体は自発活性化型核内受容体 ERR により活性化される). 第 90 回日本生化学会大会 (BMB2017), 平成 29 年 12 月 6 - 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ② 杉山真季子 他: ビスフェノール A 暴露・低活動性症状マウス脳内の自閉症関連遺伝子の発現解析. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 平成 29 年 5 月 13 - 14 日, 宮日会館・宮崎大学清武キャンパス (宮崎市)
- ③ 劉 曉輝 他: 核内受容体 ERRs は不活性 ER α -AF1 ドメイン欠損体とも協働してビスフェノール A 低用量効果を示す. 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会, 平成 28 年 12 月 8 - 9 日, 文部科学省 研究交流センター (つくば市)
- ④ 松山祐昂 他: ヒト甲状腺ホルモン受容体の活性増強因子として働く構成的に自発活性化核内受容体. 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会, 平成 28 年 12 月 8 - 9 日, 文部科学省 研究交流センター (つくば市)
- ⑤ 杉山真季子 他: 仔マウスにビスフェノール A 暴露が誘起する低活動性症状の原因遺伝子探索. 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会, 平成 28 年 12 月 8 - 9 日, 文部科学省 研究交流センター (つくば市). [優秀ポスター賞]
- ⑥ 杉山真季子 他: BPA 暴露マウスの低活動性症状は雌雄で異なる遺伝子が原因である (Hypoactivity of bisphenol A- exposed

mouse proceeds by the genes different between sexes). 環境ホルモン学会第 18 回研究発表会, 平成 27 年 12 月 10 - 11 日, 自治医科大学 地域医療情報研修センター (下野市). [優秀ポスター賞]

- ⑦ 松尾文香 他: ビスフェノール A 暴露によるショウジョウバエ核内受容体 mRNA への影響解析 (Human nuclear receptors work as a homodimer to exert the signaling toxicity of bisphenol A). 環境ホルモン学会第 18 回研究発表会, 平成 27 年 12 月 10 - 11 日, 自治医科大学 地域医療情報研修センター (下野市)
- ⑧ Makiko Sugiyama 他: SCN Circadian Rhythm Signal Transduction Neuropeptides Evoke Hypoactive Phenotype Differently in Male and Female Mice. 第 52 回ペプチド討論会, 平成 27 年 11 月 16 - 18 日, 平塚中央公民館 (平塚市). [優秀口頭発表賞]

[その他]

ホームページ等

<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp/index3.html>

<http://RSRC.scc.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下東 康幸 (SHIMOHIGASHI, Yasuyuki)
九州大学・大学院理学研究院・名誉教授
研究者番号: 00211293

(2) 研究分担者

劉 曉輝 (LIU, Xiaohui)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 60596849
(H26 年度まで)

松島 綾美 (MATSUSHIMA, Ayami)
九州大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 60404050
(H26 年度まで)

中川 裕之 (NAKAGAWA, Hiroyuki)
福岡大学・理学部・教授
研究者番号: 80274562

(3) 連携研究者 (H27 年度より)

劉 曉輝 (LIU, Xiaohui)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 60596849

松島 綾美 (MATSUSHIMA, Ayami)
九州大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 60404050

(4) 研究協力者

博士研究員:

下東 美樹 (SHIMOHIGASHI, Miki)

学振特別研究員：

松尾 文香 (MATSUO, Ayaka)

松山 祐昂 (MATSUYAMA, Yutaka)

杉山 真季子 (SUGIYAMA, Makiko)

その他の大学院修士学生