

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05057

研究課題名(和文) New POPsによるPPAR シグナル伝達攪乱の比較生物学的リスク評価

研究課題名(英文) In silico and in vitro evaluations of disruption of peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling pathway by emerging persistent organic pollutants

研究代表者

石橋 弘志 (Ishibashi, Hiroshi)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90403857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脂質代謝等に関与するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)シグナル伝達経路に対する新たな残留性有機汚染物質(new POPs)の比較生物学的リスク評価を行うことである。ヒト、水棲哺乳類および魚類PPAR を用いたインビトロ・インシリコアッセイ系を開発し、近年発見された新たなPPAR リガンド結合ポケット(LBP)を含め2種のPPAR LBPに対する短鎖および長鎖の有機フッ素化合物(PFASs)の結合親和性を初めて明らかにした。また、これらPPAR LBPに対するPFASs結合親和性の種間差に関与する要因についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したヒト、水棲哺乳類および魚類PPAR を用いたインビトロ・インシリコアッセイ系により、各(野生)生物種の2種のPPAR LBPに対するnew POPsの結合親和性の評価が可能となり、その種間差の要因が明らかになった。本研究の成果は、世界をリードする学術情報を発信するだけでなく、POPsに関するストックホルム条約等に関連した国際社会のニーズや生態系保全を考慮した化学物質の安全性評価・利用指針の構築に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study assessed the binding affinities of perfluoroalkyl substances (PFASs) to the Baikal seal (*Pusa sibirica*; bs) and human (h) peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) using in silico and in vitro assays. The in silico docking simulations revealed that the 1st ligand-binding pocket (LBP) of bsPPAR had higher affinities than that of hPPAR; however, the 2nd LBP of bsPPAR had lower affinities than that of hPPAR. An in vitro competitive binding assay showed that PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFHxS and PFOS could bind to recombinant bs and hPPAR LBD proteins. Interspecies comparison of the in vitro binding affinities revealed that bsPPAR had higher preference for PFASs with long carbon chains than that of hPPAR. Structure-activity relationship analyses suggested that the binding potencies of PFASs to PPAR might depend on LBP binding cavity volume, hydrogen bond interactions, the number of perfluorinated carbons, and the hydrophobicity of PFASs.

研究分野：生態毒性学

キーワード：残留性有機汚染物質 核内受容体 野生生物 リスク評価 生態系保全 有機フッ素化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) などの臭素系難燃剤 (BFRs) やペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) などの有機フッ素化合物 (PFASs) は新たな残留性有機汚染物質 (new POPs) として学術的・社会的関心を集めている。これまでヒトや野生生物を対象として、化学分析による new POPs の濃度分布や環境動態、生物蓄積などに関する研究が行われてきた。一方、マウスやラットなどの齧歯類を用いた研究によると、new POPs は神経系、免疫系、内分泌系、生殖・発生系などに対して毒性影響を示すことが明らかにされている。しかしながら、特に野生生物に対する毒性影響については不明な点が多い。そのため、生物多様性の保全を考慮し、多種多様な生物種に対する new POPs のリスク評価を推進するためには、new POPs による毒性影響とその発現メカニズムに関する基礎情報を集積する必要がある。

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーに属し、糖・脂質代謝に関与する種々の標的分子を調節する転写因子である。哺乳動物では 3 種類のサブタイプ (PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  及び  $\gamma$ ) が存在する。ペルオキシソーム増殖因子は、脂肪酸結合タンパク質、アシル CoA オキシダーゼなど脂肪酸輸送関連タンパク質やペルオキシソーム性  $\beta$  酸化酵素の発現レベルを変化させ、齧歯類では肝細胞の増殖、アポトーシスの抑制、肝腫瘍の形成などの毒性を示すことが知られている。また、これらの毒性作用の発現には PPAR $\alpha$  の介在が必要であり、PPAR $\alpha$  欠損マウスではペルオキシソーム増殖因子による肝腫瘍の発現はみられない。さらに、PFASs はマウスやヒトの PPAR $\alpha$  を活性化することが明らかとなっており、ヒト培養細胞系を用いた研究では、POPs に指定されているポリ塩化ビフェニル (PCBs) によって誘導された炎症やアテローム性動脈硬化に PPAR $\alpha$  が関与することが示唆されている。これらの事実は、PFASs や PCBs は PPAR $\alpha$  を起点とした情報伝達機構を攪乱し、生理機能の生体恒常性に影響することを意味する。これらに加えて、従来から知られている PPAR $\alpha$  リガンド結合ポケット (PPAR $\alpha$  1st LBP) に加え、第 2 の新たな PPAR $\alpha$  リガンド結合ポケット (PPAR $\alpha$  2nd LBP) が発見された。しかし、PPAR $\alpha$  2nd LBP に対する new POPs の影響については不明である。

## 2. 研究の目的

実験動物に加え、系統学的・生態学的に重要視されている野生生物を対象として、脂質代謝等に関与するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$  1st LBP・PPAR $\alpha$  2nd LBP) シグナル伝達経路に対する new POPs の比較生物学的リスク評価を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) インビトロ受容体結合試験

PPAR $\alpha$  と new POPs の直接的相互作用をスクリーニングするため、無細胞タンパク質発現系などにより大量合成・精製した PPAR $\alpha$  組換えタンパク質と new POPs との結合親和性について測定し、50% 結合阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を算出した。また、PFOA の IC<sub>50</sub> 値を 1 としたときの各 PFASs の IC<sub>50</sub> 値から相対結合親和性 (RBA) を算出した。

### (2) インシリコドッキングシミュレーション解析

Protein Data Bank と分子シミュレーションソフトウェアを用いて、哺乳類 PPAR $\alpha$  との相同性モデリングにより各生物種の PPAR $\alpha$  の立体構造を予測した。次いで、ドッキングシミュレーション解析から、PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$  1st LBP・PPAR $\alpha$  2nd LBP) に対する new POPs の安定な結合状態 (結合ポテンシャルエネルギー) を求め、標的となるリガンド結合部位 (アミノ酸残基等) の推定を行った。

### (3) インビトロレポーター遺伝子アッセイ<sup>1,2)</sup>

各生物種の PPAR $\alpha$  cDNA クローンをを用いたレポーター遺伝子アッセイ系を用いて、new POPs による転写活性化能を測定した。PPAR $\alpha$  発現ベクターやレポーターベクターをサル腎臓由来細胞 CV-1 で一過性に発現させ、new POPs を CV-1 細胞に曝露し、転写活性化能を測定し 50% 影響濃度 (EC<sub>50</sub> 値) を算出した。

#### 4. 研究成果

従来から知られている PPAR $\alpha$  リガンド結合ポケット (PPAR $\alpha$  1st LBP) に加え、近年発見された第 2 の PPAR $\alpha$  リガンド結合ポケット (PPAR $\alpha$  2nd LBP) について、PFASs とのドッキングシミュレーション解析を行い (図 1) PPAR $\alpha$  リガンド結合領域 (LBD) の組換えタンパク質に対する PFASs のインビトロ競合結合試験の結果と比較した。その結果、ヒト (h) およびバイカルアザラシ (bs) の PPAR $\alpha$  1st/2nd LBPs に対する PFASs の結合親和性を初めて明らかにした (表 1)。

また、PPAR $\alpha$  LBD 組換えタンパク質に対する PFASs のインビトロ競合結合試験から得た RBA とインシリコ評価系の結果から得た結合ポテンシャルエネルギーとの比較から、両者の間に有意な相関関係がみられた (図 2)。このことから、1st および 2nd PPAR $\alpha$  LBPs-リガンド分子間相互作用を分子レベルで評価するためのインシリコ解析系を確立することができた。

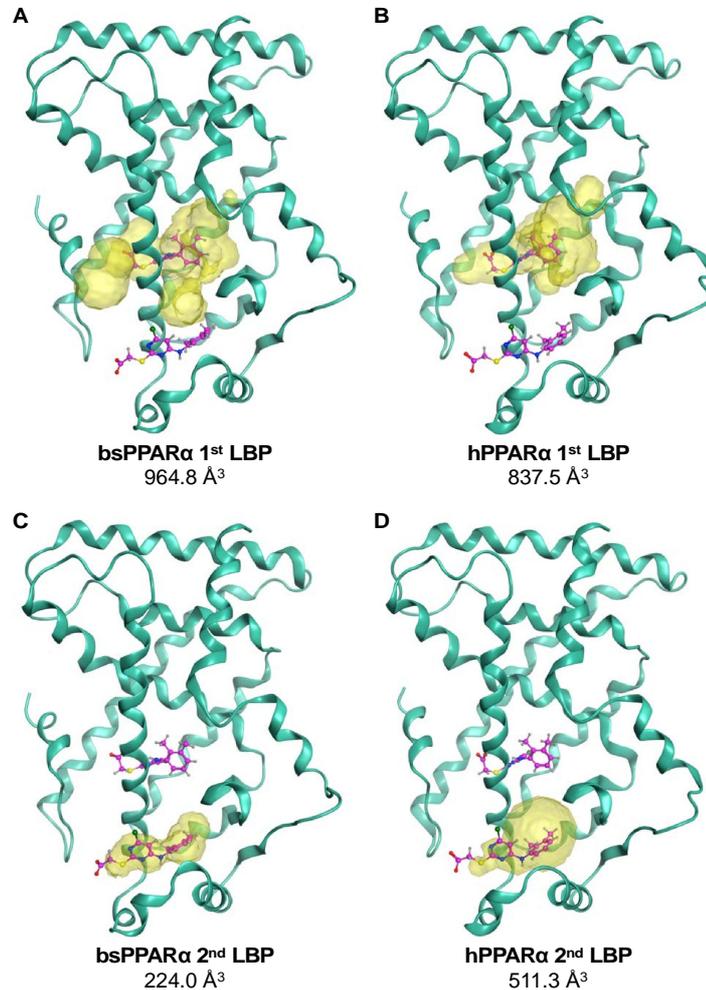


図 1. bs (A) および hPPAR $\alpha$  1st LBPs (B) と bs (C) および hPPAR $\alpha$  2nd LBPs (D). 値は LBP の体積。

表 1. bsPPAR $\alpha$  1st/2nd LBPs および hPPAR $\alpha$  1st/2nd LBPs に対する PFASs の結合ポテンシャルエネルギー (S-score) と水素結合相互作用に關与するアミノ酸残基

PFASs	bsPPAR $\alpha$				hPPAR $\alpha$			
	1st LBP		2nd LBP		1st LBP		2nd LBP	
	S-score	amino acid	S-score	amino acid	S-score	amino acid	S-score	amino acid
<b>PFCA</b> s								
PFBA	-4.732	His440, Tyr464	-4.053	—	-4.322	Glu286	-4.394	Cys275, Glu251
PFPeA	-5.245	—	-4.087	—	-4.573	Glu286	-4.550	Cys275
PFHxA	-5.557	His440, Tyr464	-4.190	Lys266	-4.921	Glu286	-4.944	Cys275
PFHpA	-6.170	His440, Cys276	-4.223	Cys275	-5.113	—	-4.816	Cys275
PFOA	-5.871	Ser280	-4.275	—	-5.623	Ser280	-5.069	Cys275
PFNA	-6.467	His440, Tyr464	-4.605	His274	-5.707	—	-5.017	—
PFDA	-6.490	—	-4.398	—	-5.578	Glu286	-5.377	Cys275
PFUnDA	-6.788	His440, Tyr464	-4.510	Thr279	-5.901	Glu286	-5.996	Thr279
PFDoA	-7.721	—	-4.301	—	-6.499	—	-5.262	Cys278
PFTTrDA	-7.290	—	-4.896	—	-6.189	His440	-5.900	Cys275
PFTeDA	-8.156	His440, Tyr464	-4.844	Lys266	-6.242	—	-4.979	—
PFHxDA	-6.411	Tyr464	-4.828	—	-6.807	—	-5.347	—
PFODA	-6.967	—	-4.839	—	-6.340	His440, Tyr464	-5.949	—
<b>PESA</b> s								
PFBS	-5.133	—	-4.181	Lys266, His274	-4.867	Thr283	-4.914	Cys275
PFHxS	-5.702	His440, Tyr464	-4.052	Cys275	-5.500	—	-5.179	Cys275, Glu251
PFOS	-6.520	His440, Tyr464	-4.388	Cys275	-5.306	Ser280	-5.374	Cys275

—: not found.

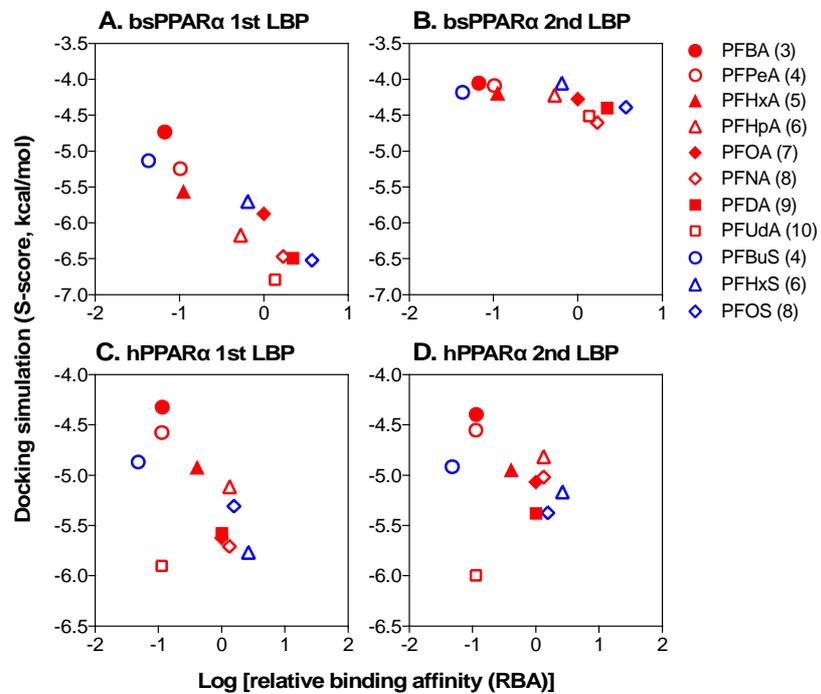
インシリコドッキングシミュレーション解析から、bsPPAR $\alpha$  1st LBP は hPPAR $\alpha$  1st LBP と比較して、長鎖の PFOA、PFNA、PFDA および PFOS に対して強い結合親和性を示し、インビトロ受容体結合試験でも同様の結果を示した。また、これらの PFASs はインビトロレポーター遺伝子アッセイ系でも bsPPAR $\alpha$  を活性化した。PFOA、PFNA、PFDA および PFOS は、野生個体のアザラシ肝臓中において高レベルで蓄積しており<sup>3)</sup>、これら PFASs の高蓄積性と PPAR $\alpha$  作用濃度、PFASs の化学特

性との関連を今後検討する必要がある。一方、bsPPAR $\alpha$  2nd LBP は hPPAR $\alpha$  2nd LBP と比較して、PFOA、PFNA、PFDA および PFOS などに対して弱い結合親和性を示した。そこで、bs および hPPAR $\alpha$  1st/2nd LBP に対する PFASs の結合状態を詳細に解析したところ、両生物種の PPAR $\alpha$  1st/2nd LBP の体積や水素結合に關与するアミノ酸、PFASs のフッ素化された炭素数（分子量）や疎水性などの違いが PFASs 結合親和性の強さに關与すると考えられた（**図 2**、**表 1**）。

ヒトおよび水棲哺乳類の PPAR $\alpha$  1st LBP および PPAR $\alpha$  2nd LBP に対する短鎖および長鎖の PFASs の結合親和性をインビトロ/インシリコアッセイ系により初めて明らかにした。そこで、さらに魚類（ゼブラフィッシュ、メダカ、コイ科魚類）の PPAR $\alpha$  1st LBP および PPAR $\alpha$  2nd LBP に対する PFOA・PFOS を含めた短鎖および長鎖の PFASs との結合親和性を検討した。その結果、PPAR $\alpha$  1st LBP および PPAR $\alpha$  2nd LBP に対する PFASs の結合親和性は、ゼブラフィッシュとコイ科魚類では PPAR $\alpha$  1st LBP に、メダカでは PPAR $\alpha$  2nd LBP に対して強い結合親和性を示す傾向にあった。また、これら結合親和性の違いには、PPAR $\alpha$  1st LBP あるいは PPAR $\alpha$  2nd LBP と PFASs の分子間相互作用に關与する LBP のアミノ酸の種類や、PFASs の炭素鎖数・側鎖の構造などが關与すると考えられた。これらのことから、（水棲）哺乳類に加え、魚類の PPAR $\alpha$  1st LBP および PPAR $\alpha$  2nd LBP に対する PFASs の結合親和性ポテンシャルが本研究で初めて明らかになった。

#### < 引用文献 >

- 1) Ishibashi, H., Kim, E.Y., Iwata H. (2011): Transactivation potencies of the Baikal seal (*Pusa sibirica*) peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  by perfluoroalkyl carboxylates and sulfonates: Estimation of PFOA induction equivalency factors. *Environmental Science and Technology*, **45**(7), 3123-3130.
- 2) Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E.Y., Tao, L., Kannan, K., Tanabe, S., Batoev, V.B., Petrov, E.A. (2008): Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal seal (*Pusa sibirica*). 2. molecular characterization, expression level, and transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *Environmental Science and Technology*, **42**(7), 2302-2308.
- 3) Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E.Y., Tao, L., Kannan, K., Amano, M., Miyazaki, N., Tanabe, S., Batoev, V.B., Petrov, E.A. (2008): Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal seal (*Pusa sibirica*). 1. residue level, tissue distribution, and temporal trend. *Environmental Science and Technology*, **42**(7), 2295-2301.



**図 2** . PFASs のインビトロ競合結合試験による RBA とインシリコ評価系による結合ポテンシャルエネルギーの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishibashi, H., Kim, E.Y., Arizono, K., Iwata, H.	4. 巻 52
2. 論文標題 In vitro assessment of activation of Baikal seal (Pusa sibirica) peroxisome proliferator-activated receptor by polybrominated diphenyl ethers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Science and Technology	6. 最初と最後の頁 11831-11837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.8b02501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishibashi, H., Hirano, M., Kim, E.Y., Iwata, H.	4. 巻 53
2. 論文標題 In vitro and in silico evaluations of binding affinities of perfluoroalkyl substances to Baikal seal and human peroxisome proliferator-activated Receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Science and Technology	6. 最初と最後の頁 2181-2188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.8b07273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石橋弘志、平野将司、内田雅也、大倉美咲、石橋康弘、富永伸明、岩田久人、有菌幸司
2. 発表標題 新たな試験法の切り口：内分泌かく乱物質 核内受容体相互作用のin silico解析
3. 学会等名 環境ホルモン学会 第21回研究発表会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishibashi, H., Hirano, M., Kim, E.Y., Iwata, H.
2. 発表標題 In vitro and in silico evaluations of binding affinities of perfluoroalkyl substances to Baikal seal peroxisome proliferator-activated receptor
3. 学会等名 Pollutant Responses in Marine Organisms 20 (PRIM020) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>(1) バイカルアザラシPPAR に対する有機フッ素化合物の結合親和性 <a href="https://www.eurekalert.org/pub_releases/2019-03/eu-bao032719.php">https://www.eurekalert.org/pub_releases/2019-03/eu-bao032719.php</a></p> <p>(2) インビトロ/インシリコ解析系を用いたバイカルアザラシPPAR に対する有機フッ素化合物の結合評価 <a href="https://www.alphagalileo.org/Item-Display/ItemId/177124">https://www.alphagalileo.org/Item-Display/ItemId/177124</a></p> <p>(3) ロシアのバイアルアザラシにおける有機フッ素化合物の影響評価 <a href="http://researchsea.com/html/article.php/aid/12550/cid/1/research/science/ehime_university/investigating_how_chemicals_behave_in_russia_s_baikal_seas.html">http://researchsea.com/html/article.php/aid/12550/cid/1/research/science/ehime_university/investigating_how_chemicals_behave_in_russia_s_baikal_seas.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有園 幸司  (Arizono Koji)  (70128148)	熊本県立大学・環境共生学部・教授    (27401)	