

平成22年5月15日現在

研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20710053
 研究課題名（和文） ERR γ ヘテロダイマー受容体を介したビスフェノールAの
 エストロゲン様低用量活性
 研究課題名（英文） Estrogen-like effects of low-dose Bisphenol A induced
 by ERR γ receptor heterodimer
 研究代表者
 松島 綾美（MATSUSHIMA AYAMI）
 九州大学・大学院理学研究院・助教
 研究者番号： 60404050

研究成果の概要（和文）：エストロゲン関連受容体 α 型（ERR α ）をおよびエストロゲン関連受容体 γ 型（ERR γ ）をエストロゲン受容体 α 型（ER α ）と共発現することにより、女性ホルモン17 β -エストラジオールの活性が増強されることが初めて明らかとなった。そこで、細胞内で発現した後に自然にダイマー形成する「強制ダイマー」をそれぞれ作製して解析したところ、この活性増強は、ER α とERR α のホモダイマー同士が相互作用することに由来すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that the activity of bisphenol A mediated through the estrogen receptor α (ER α) is increased with coexpression of either estrogen-related receptor α (ERR α) or estrogen-related receptor γ (ERR γ). We newly made several series of plasmids to express dimer receptors of ERR α and ERR γ to analyze the activity of ER α . The results indicated that the activity enhancement is due to the interaction between ER α homodimer and ERR α homodimer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：内分泌かく乱物質、有害化学物質、蛋白質、分子認識、生体分子、核内受容体、転写因子、ビスフェノールA

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向

BPAは、1891年にロシアのDianinにより初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にはドイツのZinkeによる合成法の改良で、ア

セトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの原料として幅広く使用されており、身の回りに非常に多く存在する一方、代表的な内分泌かく乱物質としても知られていた。つまり、BPAを原料としたプラスチックには、高分子化されずに残留するBPA単量体が極微量ながら存在し、これを取り除くことが困難であり、その漏出が問題になったわけである。さらに、1990年代後半より、マウスなど実験動物で、ビスフェノールAの「低用量効果」が指摘された。「低用量効果」とは、BPAが規制値(2.5~3.0 ppm)よりはるかに低い量で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすことである。これを受け、2000年には米国厚生省所轄National Toxicology Program(NTP)が Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Reviewを行った。この調査では、低用量効果は一部では認定され、一部では否定されたため、統合的には認定されなかった。しかし近年、マウスの脳の性分化や行動の異常など、ビスフェノールAの多様な低用量効果が相次いで報告され、この発現機構解明は緊要の課題となっている。

(2) 着想に至った経緯

研究開始当初の国内外の研究潮流は、ビスフェノールAがエストロゲン受容体(ER)に直接結合することにより低用量効果を説明しようとするものであった。ERの遺伝子転写機能発現には、転写共役因子(コアクチベータ)とERの相互作用が必要である。したがって、ビスフェノールAがERに結合し、コアクチベータとの相互作用に差異が生じないか?等を調べる研究が行なわれていた。しかし、ビスフェノールAはERにほとんど結合しない。こうしたなか、申請者らは、ビスフェノールAはERR γ にきわめて強く結合することを発見した。これ以降、次第に、多くの研究者がERR γ を念頭に置いた研究に方向転換するようになった。

申請者らは、さらに、変異受容体を用いた結合試験、ビスフェノールA/ERR γ 複合体のX線結晶構造解析にも成功し、多くのフェノール類がERR γ に結合するなど、次々に新事実を明らかにしていた。こうして、結合メカニズムに関する知見は進んだが、何故、ビスフェノールAがERR γ に結合すると低用量効果が生じるか?は未解明のままであった。こうした過程で、申請者はERR γ の結晶構造解析に取り組む中で、ERR γ が二量体(ダイマー)として得られることに気付き、ERR γ は自身のみならずERともダイマーを形成して機能し、ビスフェノールAはERR γ と結合して間接的にERの活性を調節するのではないだろうかと考えた。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で述べた通り、当時、国際的に注目される内分泌攪乱物質問題の最大の課題は、「ビスフェノールAの『低用量効果』の解明」であった。低用量効果とは、規制値よりもはるかに低い濃度のビスフェノールAが、前立腺肥大や攻撃的な「キレる」マウスなど、エストロゲン様の内分泌攪乱作用を示すことを意味する。「ビスフェノールAがERR γ に結合する」という新発見により、生理機能未知の核内受容体ERR γ が、低用量効果に関与すると疑われ始めたが、その機構は不明のままであった。一方で、ERR γ は、エストロゲン受容体(estrogen receptor: ER)とヘテロダイマーを形成すると示唆された。そこで、申請者は、ERR γ がERとヘテロダイマー化し、このERR γ にビスフェノールAが結合することで、相手のERに影響してERの活性を調節するのではないかと思いついた。この解析には、ERR γ -ERヘテロダイマーを自在に調製することが必須である。申請者は、ごく最近、ERR γ とERをタンデム(直列)に繋ぎ、強制的にダイマーにする「強制ダイマー法」に成功した。

本研究の目的は、この「強制ダイマー法」でヘテロダイマーの機能解析を行い、ビスフェノールAのERR γ を介した低用量効果発現メカニズムを分子レベルで解明することである。

3. 研究の方法

(1) 発現プラスミド作成

ヒト腎臓cDNAよりERR α 、ERR β 、ERR γ をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。得られた産物をクローニングベクターpBlueScriptII SK+に導入し、全長の配列を確認した。配列確認の後、それぞれのプラスミドを適切な制限酵素で消化の後、発現ベクターpcDNA3.1に導入した。強制ダイマー発現のための発現プラスミド作成に、①ERR α とERR α を直繋ぎにしたもの、②ERR α とERR α の間にFLAGエピトープタグをいれたもの、の2種類を作成した。FLAGは、スパーサーとしての役割と、発現確認のための2通りの役割を期待して導入した。

(2) 細胞培養

常法に従い、10%血清ヒト子宮頸癌由来の細胞であるHeLa細胞およびアフリカミドリザル腎臓CV-1細胞を培養した。培養に用いた血清は、デキストラン被膜活性炭処理により、内在性の低分子化合物を取り除いて用いた。

(3) ウサギ網状赤血球による無細胞発現系

ERR γ とER α が直接繋がっている発現ベクターを用いて、ウサギ網状赤血球によるタンパク質発現を行った。本発現系を用いる利点は、これまでの申請者らの研究により、発現タンパク質の精製を必要とせずに、発現溶液をそのまま用いて放射リガンド受容体結合試験が、できる点である。結合試験の結果、直接つないだER α とERR γ が、それぞれE2およびビスフェノールAに対する結合能を保持していることが確認された。

(4) 放射リガンド競合結合試験

一連の環境ホルモン候補物質のERR γ に対する結合能は、トリチウム標識エストラジオール([³H]E2)およびトリチウム標識ビスフェノールA([³H]BPA)の受容体結合を阻害する能力で評価した。評価する一連の化学物質をトリチウム標識リガンドとウサギ網状赤血球で発現したタンパク質溶液と共にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。遊離のトリチウム標識リガンドはデキストラン被膜活性炭により取り除いた。化学物質のIC₅₀値([³H]BPA受容体結合を50%阻害する値)はプログラムALLFITにより算出した。

(5) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞であるHeLa細胞に、ERR γ の発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、ERR γ の活性を検出するために、ERR γ の結合により発現が促進されるルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを用いた。細胞への発現プラスミドの導入には、lipofectamine2000とプラス試薬を用いた。24時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに24時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質によるERR γ の活性への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) ERR γ とER α の強制ダイマー

ERR γ -ER α の順番に繋がっているものと、前後が逆のER α -ERR γ の順で繋がっている2つのヘテロダイマーを発現する発現プラスミドを構築し、さらに、ER α -ER α のホモダイマーを発現するプラスミドも構築した。ERR γ -ER α を無細胞発現系であるウサギ網状赤血球で発現し、放射標識リガンドを用いた受容体結合試験を行った。その結果、1 nMのエストラジオール(E2)とビスフェノールA(BPA)のどちらにも結合した。ER α はE2と

は結合するが、BPAとはほとんど結合しない。また、ERR γ はBPAと強く結合するが、E2とは結合しない。E2とBPAの両方がERR γ -ER α に結合するという結果は、ERR γ とER α は、強制的に繋いでERR γ -ER α としても、それぞれのリガンド結合能を保持出来ることを明確に示した。

さらに、ヒト子宮頸癌由来培養細胞Helaで発現し、E2による転写活性を評価したところ、ナノモル濃度(ナノは百万分の1)付近で最大活性を示し、リガンド濃度が濃くても薄くても、転写活性化能は低いという興味深い実験結果が得られた。こうしたユニークなリガンド応答性が、低用量問題に関係する可能性があると考えられた。

(2) 共発現系によるE2転写活性化能解析

そこで、「強制ダイマー」の発現系で見られたユニークなリガンド応答性の要因を解明するために、ER α とERR α 、あるいはER α とERR γ の共発現による影響を詳細に解析した。さらに、ER α とERR β の組み合わせでも実験を行った。その結果、ER α の天然リガンドであるエストラジオール(E2)に由来するER α の転写活性が、特にER α とERR α の共発現で増強されるという興味深い事実が明らかとなった。ER α とERR γ の共発現でも、同様の転写活性増強が見られた。しかし、ER α とERR β の場合には増強は観察されなかった。これより、ERR β はERR α やERR γ とは異なる機能を担う可能性が推定された。

さらに、ER α とERR α の共発現の存在率を詳細に検討したところ、活性増強には、ER α 量<ERR α 量である必要があることも判明した[図1]。これは、ER α とERR α の相互作用は1対1ではない、つまり、単純なヘテロダイマーの形成に由来するのではないことを明確に示した。同様の傾向が、ER α とERR γ の共発現の場合でも観察された。しかし、ER α とERR β の共発現では、活性増強は観察されなかった。多量のERR α が存在するために、通常は相互作用しにくいER α ホモダイマーとERR α が相互作用することにより、それが異常であるが故に通常のER α の活性型であるホモダイマーの寿命が延びる可能性がある。また、ダイマー以上の多量体、例えば、ER α とERR α のヘテロダイマーが、ERR α のホモダイマーと相互作用したテトラマーで安定に存在する可能性も考えられる。

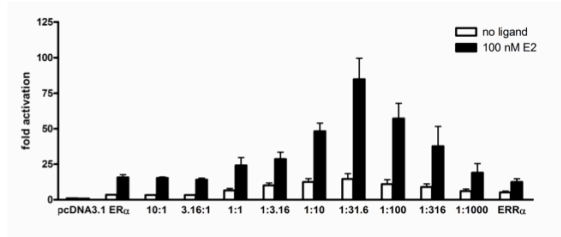


図1 ERαとERRαの共発現系におけるエストラジオールの転写活性化能

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: Bisphenol AF is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ERα, but a Highly Specific Antagonist for ERβ. *Environ. Health Perspect.* in press
2. Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., and Shimohigashi, Y.: Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERRγ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. *J. Biochem.* in press
3. Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., and Shimohigashi, Y.: Functional role of the C-terminal Helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor γ (ERRγ). *Peptide Science* 2009, 435-436 (2010)
4. Liu, X., Matsushima, A., Okada, H., and Shimohigashi, Y.: Functional role of the C-terminal Helix 12 peptide in the receptor activation mechanism of estrogen-related receptor γ (ERRγ). *Peptide Science* 2009, 435-436 (2010)
5. Nishimura, H., Li, J., Iozaki, K., Okada, K., Matsushima, A., Nose, T., Costa, T., and Shimohigashi, Y.: Discriminatory synergistic effect of Trp-substitutions in supERagonist [(Arg/Lys)¹⁴, (Arg/Lys)¹⁵]nociceptin on ORL1 receptor binding and activation. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 5683-5687 (2009)
6. Takeda, Y., Liu, X., Sumiyoshi, M., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERRγ among the human reproductive tissues: predominant expression of type-1 ERRγ isoform. *J. Biochem.* 146, 113-122 (2009)
7. Iozaki, K., Li, J., Okada, K., Nishimura H., Matsushima, A., Nose, T., Costa, T., Shimohigashi, Y.: Spare interERactions of highly potent [Arg14,Lys15]nociceptin for cooperative induction of ORL1 receptor activation. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7904-7908 (2009)
8. Matsushima, A., Okada, H., Liu, X., Tokunaga, T., TERamoto, T., Kakuta, Y., Shimohigashi, Y.: Induced-fit type ligand binding guided by free-rotatory Leu residue present in the 7th α-helix peptide in the estrogen-related receptor γ (ERRγ). *Peptide Science* 2008, 521-522 (2008)
9. Ikeda, S., Matsushim, A., and Shimohigashi, Y.: ERα/ERRα Nuclear Receptor Heterodimer Directly Linked by A Flag Peptide. *Peptide Science* 2008 511-512 (2009)
10. Takeda, Y., Liu, X., Sumiyoshi, M., Matsushima, A., Shimohigashi, Y. and Shimohigashi, M.: Bisphenol A-specific nuclear receptor ERRγ: structure-function analysis of the two novel isoforms lacking vital peptide fragment in the ligand binding domain. *Peptide Science* 2008, 517-518 (2008)
11. Okada, H., Tokunaga, T., Lui, X., Takayanagi, S., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor γ (ERRγ). *Environ. Health Perspect.* 116, 32-38 (2008)
12. Matsushima, A., Teramoto, T., Okada, H., Liu, X., Tokunaga, T., Kakuta, Y., and Shimohigashi, Y.: ERRγ tethers strongly bisphenol A and 4-α-cumylphenol in an induced-fit manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 408-413 (2008)
13. Matsushima, A., Shimohigashi, Y.: A strategy to explore the target receptor of endocrine disruptors: Estrogen-related

receptor γ (ERR γ) as a genuine acceptor of bisphenol A. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*. (AATEX journal) special issue, 495-497 (2008)

14. Yokotani, S., Nose, T., Horiuchi, Y., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Radar chart deviation analysis of prion protein amino acid composition defines characteristic structural abnormalities of the N-terminal octapeptide tandem repeat. *Protein Peptide Sci.*, 15, 949-955 (2008)
15. Li, J. Isozaki, K., Okada, K., Matsushima, A., Nose, T., Costa, T., and Shimohigashi, Y.: Design synthesis of highly potent antagonist of ORL1 nociceptin receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 2635-3664 (2008)

[学会発表] (計 14 件)

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 (ERR γ) 誘導体のリガンド結合選択性および自発活性化要因の解析、平成21年度日本生化学会九州支部例会、平成21年(2009年)5月16-17日、九州大学(福岡市)。
2. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型 (ER α) とエストロゲン関連受容体 α 型 (ERR α) の転写活性制御機構の解析、平成 21 年(2009 年)5 月16-17 日、九州大学(福岡市)。
3. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、Synergistic transactivation of estrogen receptor α and estrogen-related receptor α 、第 19 回日韓ジョイントセミナー、平成 21 年(2009 年)5 月 29-30 日、釜山(韓国)。
4. 赤岩裕也、松島綾美、武田行正、下東康幸、マウス胎仔期における自発活性化型核内受容体の発現解析、第46回化学関連支部合同九州大会、平成21年(2009年)7月11日、北九州国際会議場(北九州市)。
5. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α および ERR α 共発現による相乗的活性増強作用の解析、第 82 回日本生化学会大会、平成 21 年(2009 年)10 月 21-24 日。
6. 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、平成 21 年(2009 年)11 月 4-6 日、神戸ポートアイランド(神戸)。
7. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α および ERR ファミリーの共発現細胞でのエストロゲンの効果、環境ホルモン学会第 12 回研究発表会、平成 21 年(2009 年)12 月 7-8 日、東京大学山上会館(東京)。
8. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、エストロゲン受容体 α 型とエストロゲン関連受容体 α 型とのヘテロダイマーの新規発現系構築とその活性評価、第 45 回化学関連支部会、平成 20 年(2008 年)7 月 5 日、北九州国際会議場(北九州市)。
9. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 曉輝、角田佳充、木村 誠、下東康幸、ビスフェノールA類似化合物のERR γ 結合要因解析、平成20年度日本生化学会九州支部例会、平成20年(2008年)5月17-18日、九州大学(福岡市)。
10. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、ビスフェノールA結合におけるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の構造要因解析、平成20年度日本生化学会九州支部例会、平成20年(2008年)5月17-18日、九州大学(福岡市)。
11. Avami Matsushima, Hiroyuki Okada, Xiaohui Liu, Takatoshi Tokunaga, Takamasa Teramoto, Yoshimitsu Kakuta, and Yasuyuki Shimohigashi、エストロゲン関連受容体 γ 型と内分泌攪乱物質ビスフェノールAおよびその誘導体4- α -クミルフェノールの誘導適合による結合様式、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008)、平成 20 年(2008 年)12 月 9-12 日、神戸ポートアイランド(神戸)。
12. 松島綾美、岡田浩幸、劉 曉輝、徳永隆俊、寺本岳大、角田佳充、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型第ヘリックスペプチドのLeu側鎖の自由回転による適合誘導型リガンド結合、第45回ペプチド討論会、平成20年(2008年)10月29-31日、タワーホール船堀(江戸川区)。
13. 松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 曉輝、角田佳充、下東康幸、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、平成20年(2008年)12月13-14日、星陵会館および東京ビッグサイト(江東区)。
14. 池田 伸、松島綾美、下東康幸、ER α お

よび ERR ファミリーの共発現細胞でのエストロゲンの効果、環境ホルモン学会第12回研究発表会、平成21年(2009年)12月7-8日、星陵会館および東京ビッグサイト(江東区)。

[その他]
ホームページ等
<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 綾美 (MATSUSHIMA AYAMI)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 60404050

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし