

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660228

研究課題名(和文)ゲノム-核内受容体の相互作用アレイによる化学物質影響評価系の開発

研究課題名(英文)Chemical hazard assessment with the genome-nuclear receptor interaction array system

研究代表者

岩田 久人 (IWATA, Hisato)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：10271652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、バイカルアザラシのエストロゲン受容体(bsER)を介した遺伝子転写活性化能を指標にした有害な環境汚染物質のin vitroスクリーニング法を構築することである。bsERおよびbsER発現ベクター、ER標的遺伝子の5'上流域に存在するER応答配列を含むレポーターベクターをCOS-1細胞に導入し、in vitroレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。この系を用いてビスフェノール類(BPs)26種、水酸化ポリ塩化ビフェニル(OH-PCBs)16種をスクリーニングした結果、ほとんどの化学物質がbsER・bsERを活性化することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to construct an in vitro assay system to screen hazardous environmental chemicals that can transactivate the gene via Baikal seal estrogen receptors (bsERs). We constructed the in vitro reporter gene assay system where a expression vector containing bsER or bsER cDNA and a reporter vector containing ER response element were introduced in COS-1 cells. Using this in vitro assay system, we screened the transactivation potencies of 26 bisphenol A and its analogues (BPs) and 16 hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners (OH-PCBs). The results showed that most of the test chemicals were able to activate bsER and bsER.

研究分野：環境毒性学

キーワード：核内受容体 ビスフェノール類 水酸化ポリ塩化ビフェニル

### 1. 研究開始当初の背景

生物は細胞間・内で多くの情報のやりとりをして生命を維持する。この情報ネットワークは、進化の過程で種特異的な発展を遂げ、ゲノムに刻み込まれている。化学物質に曝されると、生物はゲノムを介して反応する。このことは、化学物質による情報ネットワークかく乱の実態が把握できれば、それらが制御する生理機能への影響やリスクについて評価できることを意味する。

一方、化学物質に対する反応・感受性には大きな種差が存在することが知られている。その大部分は各生物種のゲノムの差に起因する。したがって、多様な生物種のリスクを評価するには、生物種自身の反応を測定する必要がある。ところが、投与実験・試料入手が困難であることから、モデル動物以外の生物の反応を測定するのは容易ではない。その結果、化学物質の生態毒性試験の必要性は劇的に増加しているが、大半の化学物質の評価は、未試験のまま「保留」状態となっている。

このような状況を考慮して、米国学術研究会議(NRC)は、毒性試験に関して、動物個体を用いたインビボ試験からインビトロ試験に移行することを2007年に提案した。NRCは、近年発展してきたゲノム解読技術やハイスループットなインビトロ試験技術を用いて、生命システムの異常を評価するための新しい毒性試験の構築を奨励している。

### 2. 研究の目的

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)などの残留性有機汚染物質(POPs)やプラスチックの原材料として使用されているビスフェノール類(BPs)の一部は、エストロゲン受容体(ER)を活性化することで本来のエストロゲンの応答をかく乱することが知られている。

一方、これら環境汚染物質によるERへの作用には種差がある。水棲哺乳類は、水圏生態系の頂点に位置するため、食物網を通じてこれら環境汚染物質を高濃度に蓄積する。しかしながら、環境汚染物質曝露による水棲哺乳類のERシグナル伝達経路への影響に関する知見は欠如している。

そこで本研究では、バイカルアザラシエストロゲン受容体(bsER)の遺伝子転写活性化能を測定するための*in vitro*レポーター遺伝子アッセイ系の構築を試みた。さらにこの系を用いて、有害な環境汚染物質をスクリーニングした。

### 3. 研究の方法

(1) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)およびrapid amplification of cDNA ends(RACE)法によりbsER $\alpha$ およびbsER $\beta$ の相補的DNA(cDNA)を単離し、各bsERの発現ベクターを作製した。

(2) bsER $\alpha$ およびbsER $\beta$ 発現ベクター、ER標的遺伝子の5'上流域に存在するER応答配

列を含むレポーターベクターをCOS-1細胞に導入し、*in vitro*レポーター遺伝子アッセイ系を構築した。

(3) この系を用いて、26種のBPsと16種の水酸化ポリ塩化ビフェニル(OH-PCBs)のbsERを介した転写活性化能を測定した。

(4) bsERsの3Dホモロジーモデルを構築し、BPsおよびOH-PCBsとbsERsの*in silico*結合シミュレーションをおこない、bsERs活性化の分子機序の解明を試みた。

### 4. 研究成果

(1) バイカルアザラシ組織からbsER $\alpha$ とbsER $\beta$ のcDNAの単離に成功した。bsER $\alpha$ とbsER $\beta$ の全長オープンリーディングフレームはそれぞれ1788bp(596アミノ酸)、1593bp(532アミノ酸)であり、げっ歯類・ヒトERとのアミノ酸配列の相同性はbsER $\alpha$ で86-90%、bsER $\beta$ で84-87%であった。特にDNA結合領域・リガンド結合領域で高い相同性が認められた(bsER $\alpha$ : 100%・91%、bsER $\beta$ : 98-100%・88-89%)。bsERsの組織別mRNA発現量を測定したところ、bsER $\alpha$ は主に子宮と卵巣で発現しており、bsER $\beta$ は卵巣と筋肉で発現量が高かった。一方、全ての組織でbsER $\alpha$ はbsER $\beta$ より高い発現量を示した。

(2) 本研究で構築した*in vitro*レポーター遺伝子アッセイ系が化学物質曝露に応答するかどうかを確認するために、ER本来のリガンドである17 $\beta$ -エストラジオール(E<sub>2</sub>)で処理した際の反応を測定した。その結果、いずれのbsERも用量依存的な応答を示した。したがって、本研究で構築した*in vitro*レポーター遺伝子アッセイ系はエストロゲン様活性を持つ化学物質のスクリーニングに有効であると判断した。

(3) BPs 26種についてbsER転写活性化能をスクリーニングしたところ、4,4'-(1-methylethylidene) bisphenol (BPA)・4,4'-[2,2,2-trifluoro-1-(trifluoromethyl) ethylidene] bisphenol (BPAF)・4,4'-ethylidene bisphenol (BPE)・2-[(4-hydroxyphenyl) methyl]phenol (2,4'-BPF)・4,4'-methylene bisphenol (4,4'-BPF)・4,4'-sulfonyl bisphenol (BPS)・bis(4-hydroxyphenyl) methanone (HBP)・4-(phenylmethyl) phenol (HDM)・4,4'-(2,2-dichloroethenylidene)bisphenol (BP C2)・4-[[4-(1-methylethoxy)phenyl] sulfonyl]-phenol(BPS-monoP)・1,1'-methylenebisbenzene (DPM)・1,1'-(1-methylethylidene) bisbenzene (DPP)が相対的に高い活性を示した。これら物質の化学構造に着目すると、分子量が小さく、フェニル環の*para*位に付くOH基置換

数が多い物質ほど高活性を示す傾向が認められた。各 BPs の 50% 影響濃度 (EC<sub>50</sub>) と最小影響濃度 (LOEC) を指標に bsER $\alpha$ ・bsER $\beta$  のアイソフォーム間で転写活性化能を比較したところ、bsER $\alpha$  の方が低い濃度で活性化される傾向がみられた。また、アザラシとマウスの種間で転写活性化能を比較したところ、ER $\alpha$  についてはマウスが高感受性、ER $\beta$  についてはマウスと同等もしくはアザラシが高感受性である傾向が認められた。

(4) さらに E<sub>2</sub> 共存下で bsERs を介した BPs の転写活性化能を評価した。また bsERs の種特異的機能を理解するため、マウス ERs (mERs) についても同様に評価した。

レポーター遺伝子アッセイでスクリーニングしたところ、多くの BPs は E<sub>2</sub> 共存下ではアンタゴニスト活性を示した。興味深いことに、これら BPs の多くは、E<sub>2</sub> 非共存下ではアゴニスト活性を示した。BPs によるアンタゴニスト活性は ER アイソフォーム間やアザラシ・マウス間で差が認められた。次いで、アンタゴニスト活性を示した 4,4'-(1-methylethylidene)bis(2-methylphenol) (BPC) と 4,4'-(2,2-dichloroethenylidene)bispheno( BP C2) を対象として、アンタゴニスト活性の用量-応答関係を解析した。BPC 処理の結果、bsERs に対して BPC は弱いアンタゴニスト作用を示したが、mERs に対して有意な作用は示さなかった。一方、BP C2 は BPC よりも 100-1000 倍低濃度で転写活性化能を抑制した。

(5) BPC と BP C2 のアンタゴニスト作用の差を解明するために、両物質の結合状態を *in silico* シミュレーションにより解析した。その結果、BP C2 の相互作用エネルギー値は BPC の値よりも低かった。これらの結果は、*in vitro* アッセイで得られた、BPC の弱いアンタゴニスト活性と、BP C2 の強いアンタゴニスト活性の結果を支持した。

(6) 16 種の OH-PCBs による ER アゴニスト転写活性化能を測定したところ、多くの OH-PCBs が活性を示し、異性体によって誘導倍率が大きく異なっていた。一方、一部の OH-PCBs は E<sub>2</sub> と共処理時に相加・相乗作用を示した。そこで bsER 転写活性化能に対する OH-PCBs の構造的特徴について理解するために、OH 基置換位置の異なる 3 種の OH-CB30 (4'-OH-CB30・3'-OH-CB30・2'-OH-CB30) 異性体の用量-応答関係を評価した。その結果、OH 基置換位置が *para* 位 >

*meta* 位 > *ortho* 位の順で EC<sub>50</sub> 値が低く、高活性を示す傾向がみられた。

(7) さらに、これらの物質の bsER リガンド結合ポケット内の結合状態を、*in silico* シミュレーションで解析した。その結果、4'-OH-CB30 は E<sub>2</sub> と同様に、*para* 位の OH 基が bsER の 353 番目のグルタミン酸 (E353) と水素結合し、相互作用エネルギーは低値を示した。一方で 3'-OH-CB30 は、4'-OH-CB30 とは異なり、346 番目ロイシン (L346) と水素結合を形成していたが、2'-OH-CB30 は近傍のアミノ酸残基と相互作用しなかった。これらの結果から、OH 基の置換位置の違いが ER リガンドポケット内での相互作用に寄与し、転写活性化能に影響することが示唆された。

(8) 本研究により、bsER の遺伝子転写活性化能を指標とした有害な環境汚染物質の *in vitro* スクリーニング法が構築できた。この方法を適用することにより、BPs および OH-PCBs の bsERs 転写活性化能を評価することに成功した。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

Yoshinouchi, Y., Hirano, M., Nomiyama, K., Tanabe, S., Kim, E. Y. and Iwata, H. (2016): Structural preference of OH-PCBs to activate the Baikal Seal estrogen receptors, International Symposium of Environmental Chemistry and toxicology - To Accelerate a Global Network of Environmental Researchers, 2016 年 3 月 19 日, 愛媛大学 (愛媛県松山市)

芳之内結加, 平野将司, 野見山桂, 田辺信介, 金 恩英, 岩田久人 (2015): OH-PCBs によるバイカルアザラシ エストロゲン受容体  $\alpha$ ・ $\beta$  転写活性化能の評価, 環境ホルモン学会第 18 回研究発表会, 2015 年 12 月 10 日, 自治医科大学 (栃木県下野市)

芳之内結加, 清水沙千子, 李 鎮善, 平野将司, 鈴木賢一, 中田晴彦, 金 恩英, 岩田久人 (2015): バイカルアザラシ エストロゲン受容体を介したビスフェノール類によるアンタゴニスト作用の評価, 第 24 回環境化学討論会, 2015 年 6 月 24 日, 札幌コンベンションセンター

(北海道札幌市)

Yoshinouchi, Y., Shimizu, S., Lee, J. S., Hirano, M., Agusa, T., Suzuki, K. T., Nakata, H., Kim, E. Y. and Iwata, H. (2015): *In vitro* and *in silico* assessment of transactivation potencies of Baikal seal estrogen receptors, 18th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO18), 2015年5月25日, Trondheim (Norway)

芳之内結加, 清水沙千子, 李 鎮善, 平野将司, 阿草哲郎, 鈴木賢一, 中田晴彦, 金 恩英, 岩田久人 (2014): バイカルザラシ エストロゲン受容体  $\alpha \cdot \beta$  転写活性化能の評価: 種差とE2誘導等価係数, 環境ホルモン学会 第17回研究発表会, 2014年12月9日, 東京大学山上会館(東京都文京区)

芳之内結加, 清水沙千子, 李 鎮善, 平野将司, 阿草哲郎, 鈴木賢一, 中田晴彦, 金 恩英, 岩田久人 (2014): バイカルザラシ エストロゲン受容体  $\alpha \cdot \beta$  転写活性化能の評価: *in vitro* ・ *in silico* 法によるリガンド作用機序の解明環境ホルモン学会 第17回研究発表会 2014年12月9日, 東京大学山上会館(東京都文京区)

Yoshinouchi, Y., Shimizu, S., Suzuki, K., Lee, J. S., Nakata, H., Hirano, M., Kim, E. Y., Agusa, T. and Iwata, H. (2014): *In vitro* and *in silico* assessment of transactivation potencies of Baikal seal estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  by persistent organic pollutants and bisphenols, DIOXIN Madrid 2014 / 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 2014年9月4日, Madrid (Spain)

芳之内結加, 清水沙千子, 李 鎮善, 平野将司, 阿草哲郎, 鈴木賢一, 中田晴彦, 金 恩英, 岩田久人 (2014): DDTs ・ビスフェノール類によるバイカルザラシ・マウス エストロゲン受容体転写活性化能の評価, 第23回環境化学討論会, 2014年5月16日, 京都大学百周年時計台記念館および芝蘭会館(京都府京都市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

岩田研究室のサイト日本語版  
<http://ecotoxiwata.jp/>

岩田研究室のサイト英語版  
<http://ecotoxiwata.jp/en/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 久人 (IWATA, Hisato)  
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授  
研究者番号: 10271652

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

芳之内 結加 (YOSHINOUCHI, Yuka)  
愛媛大学・大学院理工学研究科博士前期課程・学生

平野 将司 (HIRANO, Masashi)  
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・特任助教

金 恩英 (KIM, Eun-Young)  
Kyung Hee University, Department of Biology,  
Associate Professor