

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12340

研究課題名(和文) 核内受容体どうしの協働作用が引き起こすビスフェノールの低用量シグナル毒性効果

研究課題名(英文) Low-dose signaling toxicity effects of bisphenol compounds on the cooperative action between the nuclear receptors

研究代表者

劉 曉輝 (LIU, XIAOHUI)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：60596849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビスフェノールA(BPA)や、その代替えとなる「新世代ビスフェノール」の核内受容体を介した低用量シグナル毒性の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、以下の4点が明らかになった。エストロゲン受容体ER_α、ER_βにおいては、自発活性化型核内受容体が協働的に働いて、BPAによる活性を大きく増強する。一連の新世代ビスフェノールが多くの核内受容体に対して高リスクである。ER_α-アゴニスト、ER_β-アンタゴニストとして働く新世代ビスフェノールが複数存在する。ER_α-アンタゴニスト活性を示す原因となる主要な構造要因はLondon分散力である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

豊かな現代生活を彩る化学製品から漏出する原料ビスフェノールA(BPA)。このBPAがもたらす深刻な、メカニズム不明の内分泌攪乱作用。ヒトの健康に悪影響を及ぼすBPAの内分泌攪乱作用は、核内受容体を介したシグナル毒性と考えられている。本研究は、BPAを含む新世代ビスフェノールのこうしたヒト遺伝子に対するシグナル毒性の分子機構を解明しようとするもので、学術的意義、社会的意義はきわめて大きい。また、ヒト核内受容体48種のうち約4分の1存在する自発活性化型核内受容体の、通常の転写因子としての機能とは別な、しかし、本質的に備わった新奇な機能を明らかにする点でもその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The adverse effects of bisphenol A (BPA) on human health have been believed to occur by “the toxicity in signalling through nuclear receptors (NRs).” To avoid such hazardous BPA, various kinds of BPA-free plasticwares made of so-called next-generation bisphenol compounds are increasingly being seen as important, and are increasingly being produced. However, almost none of these bisphenols have been evaluated for their signalling toxicity. In this study, we attempted to elucidate the molecular mechanisms of such low-dose signalling toxicity of bisphenols. As a result, the following four issues were clarified. (i) ERs are strongly activated by BPA when constitutively self-activated NR co-exists. (ii) There are several bisphenols showing a high risk for human health through some certain NRs. (iii) Some bisphenols act as ER_α-agonist and also as ER_β-antagonist. (iv) The structural element responsible for the ER_α-antagonist activity was identified to be the London dispersing force.

研究分野：化学物質影響化学、受容体科学

キーワード：ビスフェノール 有害化学物質 核内受容体 シグナル毒性 転写制御

1. 研究開始当初の背景

ビスフェノールA（BPA）はかなり強いエストロゲン様活性を示し、その「低用量効果」は現在でも未解明の「内分泌攪乱物質」問題の核心である。2008年にアメリカ国家毒性プログラム・NTPが、「化学物質・BPAは胎児・乳幼児において、特に脳神経系、生殖腺系で悪影響が懸念される」とする報告書を公開した。2010年には、カナダ政府が「BPAは有毒な化学物質」と公認し、その後2011年までに、カナダを始め、EU諸国、中国がBPA製のポリカーボネート製の乳瓶を禁止した。さらに、2016年にはスウェーデンが上水道管の内面塗布にBPA製のエポキシ接着剤を全面的に使用禁止にした。従来、BPAの内分泌攪乱作用はエストロゲン受容体・ERへの結合に原因があると言われていたが、BPAとERの結合性は天然ホルモンのエストロゲンの1/1,000~10,000ときわめて弱く、これでは低用量効果を説明できず、長年にわたって謎とされてきていた。

BPAの低用量作用の懸念がヒト健康への悪影響として現実味を帯びて来ると、近年になって、BPAの代替えとなる「新世代ビスフェノール」が急ピッチで開発され、その優れた性質や製品性から、大量に用いられるようになった。これら新しいビスフェノール素材が産生されると、新奇な物性が得られる反面、その曝露はヒトや動物への深刻な健康影響を示す顕著な事例が数多く報告され、大きな社会問題となり始めたのである。しかし、これらの内分泌攪乱リスクについて、原因究明、解析研究はほとんど実施されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、BPAの特異的な受容体としてエストロゲン関連受容体 γ 型（ERR γ ）を世界に先駆けて発見した。そして、「ER α にERR γ を始めとする一群の自発活性化型核内受容体を働かせると、協働的に作用して、BPAの弱い活性を低用量で大きく増強し、異常なほどにタンパク質を過剰発現させる」という、低用量効果を説明するきわめて重要な現象を発見した。さらに、ビスフェノールAF（BPAF）はER α とER β に強く結合する一方、「ER α を100%フルに活性化するが、ER β では不活性であり、しかも、ER β ではエストロゲン・E2に対してアンタゴニストとして働く」という、まったく予想外な事実を世界に先駆けて明らかにした。本研究の目的は、BPAと新世代ビスフェノールの低用量でのシグナル毒性の機構について、核内受容体を介した分子機構として解明することである。

3. 研究の方法

(1) リガンド活性化型核内受容体に協働作用する自発活性化型核内受容体の探索

CV-1細胞を用いて、リガンド活性化型核内受容体、あるいは自発活性化型核内受容体のプラスミドを単独、あるいはそれぞれを組み合わせる細胞に共発現させた。その際、受容体の活性を検出するために、それぞれの受容体に特異的に認識するDNA応答配列レポータープラスミドも細胞に発現させた。種々の濃度の化合物を暴露させて受容体に対する転写活性をルシフェラーゼ・レポーター遺伝子アッセイによって調べた。

(2) 自発活性化型核内受容体がホモダイマーとして協働作用を示す機能の解析

核内受容体のリガンド結合ドメイン（LBD）について、まず、X線結晶構造を用いて *in silico* 解析し、LBDがホモダイマーを形成しているか？ ホモダイマー形成に関わる構造要因は何か？ を検討した。次いで、確かにホモダイマーとして機能することを証明するため、下記3つの方法で調べた。① 分子間相互作用に関与しているアミノ酸をAlaに変異させて、レポーター遺伝子アッセイにより転写活性化能の軽減程度の検討。② ダイマーインターフェイス構成の α -ヘリックスをペプチド断片化して切り出し合成させ、自発性転写活性の阻害程度の検討。③ α -ヘリックスペプチドのN端にFLAGエピトープを導入し、ペプチドが核内移行して転写活性を実際に阻害するのかについて、細胞内免疫染色による検討。

③の解析では、 α -ヘリックスペプチドが核内受容体LBDに結合し、細胞核内に移行して転写を阻害するのを、活性阻害の測定と免疫染色の手法で観察するものである。

(3) 新世代ビスフェノールが結合性・転写活性を示す核内受容体の探索・同定

化学物質の核内受容体に対する結合性を評価するため、まず、ヒト核内受容体 48 種のうち、2019 年現在において特異的なトリチウム放射標識リガンドについて、入手可能な 21 種全てを入手した。これらの 21 種核内受容体について、その LBD を GST 融合タンパク質として大腸菌 BL21 に発現し、精製した。次いで、それぞれの受容体結合試験系の確立に取り組み、これに成就した。そして、BPA と新世代ビスフェノールの競合結合試験を実施した。

結合性を示した一連のビスフェノール誘導体について核内受容体に対する転写活性を測定すべく、HeLa 細胞を用いたルシフェラーゼ・レポーター遺伝子アッセイを実施した。アンタゴニスト活性の評価については、フルアゴニスト活性に対する阻害活性を定性的分析法、及び定量的分析法である Schild plot 分析を実施して調べた。

(4) 新世代ビスフェノールのエストロゲン受容体で異なる受容体応答の分子メカニズムの解析

ER α -LBD、ER β -LBD の立体構造について、既報の X 線結晶構造を調べた。そして、ER β でアンタゴニスト活性発現に関与しているアミノ酸残基の同定を試みた。さらに、これらのアミノ酸残基がアラインメントして同位置に該当する ER α のアミノ酸に置換した ER β 変異受容体を調製した。作製したプラスミドを用いて、ビスフェノール誘導体の転写活性化をレポーター遺伝子アッセイより調べ、アンタゴニスト活性発現の機構の解析を試みた。

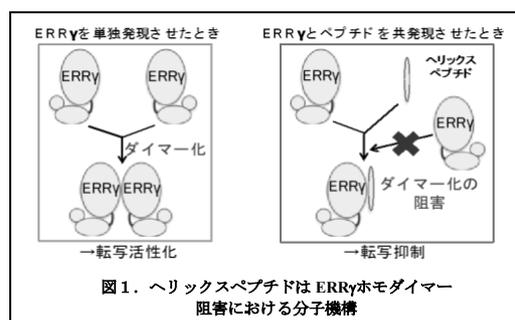
4. 研究成果

(1) リガンド活性化型核内受容体に協働作用する自発活性化型核内受容体の探索

ヒト核内受容体 48 種のうち、転写阻害に働く SHP を除く 34 種が特異的なリガンドにより活性化される「ホルモン活性化型核内受容体」である。一方、残りの 13 種がリガンド無しでも 100%フルに活性化されている「自発活性化型核内受容体」である。我々は既に、これら 13 種のうち 6 種が ER α に対して協働作用を示し、7 種は協働しないことを明らかとした。本研究では、もう一つのエストロゲン受容体 ER β に対して、これら 13 種の協働作用の有無を検討した。その結果、約半数の 6 種が ER β の活性を 2 倍以上も増強することが明らかになった。次いで、ERR γ は LBD だけでも ER α と協働作用し、「ERR γ は DNA に結合しなくて良い」ことから、この協働作用の本質的機構解明のため、ER 受容体に協働作用を示す自発活性化型核内受容体について LBD だけの発現プラスミドを作製し、協働作用の有無を調べた。その結果、ERR α は LBD だけでも ER α と協働作用を示すことが判明した。

(2) 自発活性化型核内受容体はホモダイマーとして協働作用を示す機能の解析

「自発活性化型核内受容体は、ホモダイマーとして働くのか、それともモノマーで働くのか」長い間、論争になっていた。我々は最近、ダイマー形成の分子間相互作用部位でインターフェイスを構成するペプチドをダイマー形成阻害に用いる新奇な方法を確立し、ERR γ はホモダイマーとして機能することを証明した [図 1]。そこで、ERR α について同様の方法を用いて、ERR α について検討した。まず、ERR α -LBD の X 線結晶構造解析よりホモダイマー化に必要と思われる 3 種のアミノ酸残基、構造要因を明らかにした。次いで、それらを Ala に変異させ、レポーター遺伝子アッセイにより転写活性化能を検討した結果、いずれも自発活性が大きく低下し、また、ER α に対する協働作用も失われることが判明した。さらに、ダイマーインターフェイス構成の α -ヘリックスペプチドのプラスミドと全長 ERR α を細胞に共発現させて調べた。その結果、ERR α の自発的なフル活性は共存ペプチドの濃度依存的に抑制・阻害されることが判明した。これらにより、ERR α はホモダイマーとして機能することが証明された。同様に ER β もホモダイマーとして機能することを証明した。



(3) 新世代ビスフェノールが結合性を示す核内受容体の探索・同定

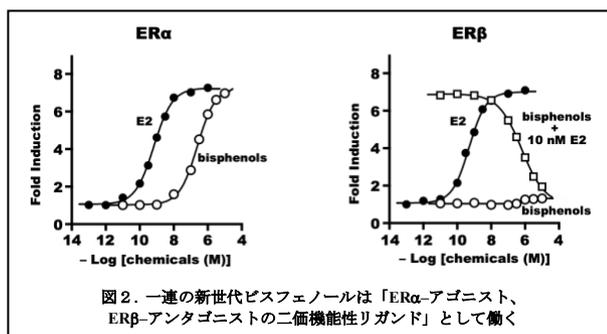
新世代ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性の本質を明らかにするため、こ

れら化学物質の核内受容体に対する結合親和性の有無、強さの程度を測定・解析した。その結果、BPAF、BPAP、BPB、BPC、BPE、BPZが、ER α 、ER β 、GR、CAR、ERR γ に対して、高リスクであることが判明した。BPMとBPPも標的の核内受容体は異なるものの、同様に高リスクなビスフェノールであることが明らかになった。一方、結合親和性を調べた21種の核内受容体のうち、ER α 、ER β に加えて、ERR γ 、CAR、GRが新世代ビスフェノールについて高リスクな核内受容体であることが判明した。こうして、現在使用に供されている新世代ビスフェノールの多くには、BPAと類似したシグナル毒性があると強く疑われ、BPAだけでなく、BPAの代替えとしての使用には、もしそれらの漏出、ヒトへの暴露が明確になれば、直ちに使用を中止するなど、適切な判断が求められると考えられる。

(4) 新世代ビスフェノールのエストロゲン受容体で異なる応答性を示す分子メカニズムの解析

分子内にトリフルオロメチル (CF₃) 基を2個持つBPAFは、ER α とER β のどちらにも強く結合し、ER α にはアゴニスト、ER β にはアンタゴニストとして働く。そして、CF₃基、トリクロロメチル基 (CCl₃) 基、あるいはトリブromoメチル基 (CBR₃) 基を1個持つビスフェノールEの誘導体 (BPE-X; Xはハロゲン) もそれぞれが同様な二価性の活性を示すことを確認した。BPE-X誘導体のER α 、及びER β に対する結合親和性、ER α に対する転写アゴニスト活性、ER β /E2に対する転写アンタゴニスト活性は、いずれも「BPE-Br > BPAF \geq BPE-Cl > BPE-Fの順番」と判明した。ビスフェノールの骨格構造はこれらの化学物質分子に共通する。そこで、2つのフェノール基をつなぎ、CX₃基を持つ中央のアルキル基 (>CHCX₃) について、各原子の電荷、双極子モーメントの大きさ・方向などを算定、評価したところ、いずれも活性の順番を説明しないことが明らかとなった。ところで、London分散力は分子末端に存在するハロゲン原子の表面に $\delta+$ 、 $\delta-$ を発生させ、これらのどちらか一方、あるいは両方が受容体ポケット内の極性サイトに静電結合、いわゆるハロゲン結合する原動力となる。こうしたLondon分散力に起因するハロゲン結合の強さは「臭素 > 塩素 > フッ素」の順序である。これに因ると、ER α 、及びER β での活性の順番が合理的に説明されることから、London分散力がアンタゴニスト活性の主要要因であることが判明した。塩素原子を2個持つBPCでも同様な活性を示し、ハロゲン含有ビスフェノールの「ER β -アンタゴニスト」活性を示すのはLondon分散力に基づくハロゲン結合に起因することが明らかとなった。

一方、London分散力はハロゲンだけでなく、通常炭化水素基 (アルキル基またはアリール基) でも起こる。そこで、こうした炭化水素基を持つビスフェノール化合物、BPAP、BPB、及びBPZについてER受容体に対して二価性異機能的 (二機能性) に働くかどうかを調べた。その結果、いずれもER α 、ER β に強く結合し、ER α に対してはアゴニスト、ER β に対しては完全に不活性で、E2に阻害活性を示すアンタゴニストであると確認された [図2]。このように、炭化水素基を持つビスフェノールもそのLondon分散力に起因して、二機能性に働くことが判明した。



(5) ER β -アンタゴニストをアゴニストに機能転換する決定的なアミノ酸・部位の同定

「二機能性ビスフェノールのER β アンタゴニスト活性はどのようにして起こるのか？」の究明に取り組んだ。まず、ER α とER β のLBDのアミノ酸配列の比較・検討から、両者で異なるアミノ酸を全て同定した。さらに、ER α について、N端ドメイン中の活性化要因構造AF-1がLBDのどこに結合するのかを突き止めるため、クライオ電子顕微鏡法で解明された複合体構造を参照しながら検討し、LBDの分子表面上におけるAF-1結合部位を推定した。そして、これらの部位をER α のものへ変異させて調べた結果、BPAF、BPCに関してはそれらの部位の一つがアンタゴニスト構造要因であることを突き止めた。これについてはさらに詳細なアミノ酸残基の検討が必要であり、現在、その検討を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 劉 暁輝	4. 巻 233
2. 論文標題 内分泌攪乱物質・ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性の分子メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO九州	6. 最初と最後の頁 5~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Liu Xiaohui, Suyama Keitaro, Nose Takeru, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Bisphenol-C is the strongest bifunctional ER -agonist and ER -antagonist due to magnified halogen bonding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Liu Xiaohui, Matsuyama Yutaka, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 345
2. 論文標題 ER -agonist and ER -antagonist bifunctional next-generation bisphenols with no halogens: BPAP, BPB, and BPZ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 24~33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2021.04.001	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 -
1. 著者名 Liu Xiaohui, Sakai Hiroki, Nishigori Mitsuhiro, Suyama Keitaro, Nawaji Tasuku, Ikeda Shin, Nishigouchi Makoto, Okada Hiroyuki, Matsushima Ayami, Nose Takeru, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 377
2. 論文標題 Receptor-binding affinities of bisphenol A and its next-generation analogs for human nuclear receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114610~114610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2019.114610	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 -

1. 著者名 Masuya Takahiro, Iwamoto Masaki, Liu Xiaohui, Matsushima Ayami	4. 巻 9
2. 論文標題 Discovery of novel oestrogen receptor agonists and antagonists by screening a revisited privileged structure moiety for nuclear receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9954-9954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46272-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu Xiaohui, Suyama Keitaro, Shiki Junichi, Torikai Kohei, Nose Takeru, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Bisphenol AF: Halogen bonding effect is a major driving force for the dual ER -agonist and ER -antagonist activities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115274 ~ 115274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115274	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 -

1. 著者名 Suyama Keitaro, Kaneko Shuhei, Kesamaru Hitoshi, Liu Xiaohui, Matsushima Ayami, Kakuta Yoshimitsu, Okubo Takashi, Kasatani Kazumi, Nose Takeru	4. 巻 33
2. 論文標題 Evaluation of the Influence of Halogenation on the Binding of Bisphenol A to the Estrogen-Related Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 889 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.9b00379	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 -

1. 著者名 枅屋宇洋, 岩本雅樹, 劉 曉輝, 松島綾美	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 内分泌攪乱物質から薬ができるかもしれない -新規な創薬シード期待される三環系ビスフェノール-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Disrupter News Letters (日本内分泌攪乱化学物質学会)	6. 最初と最後の頁 2-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 劉 暁輝、松山祐昂、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 ER ⁻ -アゴニスト・ER ⁻ -アンタゴニストの二価性活性はハロゲン結合だけが原因ではなかった：炭化水素基をもつ新世代ビスフェノールのER / ER ⁻ -異機能性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉暁輝、嵯山慶太郎、志岐潤一、鳥飼浩平、野瀬健、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 トリハロゲン化メチル基含有ビスフェノール：ER ⁻ -アゴニスト・ER ⁻ -アンタゴニストの二価性活性の原動力はハロゲンに働く分散力である
3. 学会等名 令和2年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉暁輝、嵯山慶太郎、志岐潤一、鳥飼浩平、野瀬健、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 エストロゲン受容体に対する強い ⁻ -アゴニスト/ ⁻ -アンタゴニスト二価性活性はビスフェノール含有ハロゲンに働くLondon分散力に起因する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 暁輝、酒井大樹、錦織充広、嵯山慶太郎、縄司 奨、池田 伸、西垣内 誠、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 新世代ビスフェノールのヒト核内受容体に対するリスク評価
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田川幸樹、多田悠亮、行武美華、劉 暁輝、松島綾美
2. 発表標題 近接ライゲーションアッセイによるエストロゲン受容体とエストロゲン関連受容体の相互作用解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 暁輝、酒井大樹、錦織充広、巢山慶太郎、縄司 奨、池田 伸、西垣内 誠、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 新世代ビスフェノールのヒト核内受容体に対する結合活性
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 袈裟丸仁志、金子周平、大久保貴史、笠谷和見、巢山慶太郎、劉 暁輝、松島綾美、野瀬 健
2. 発表標題 ビスフェノールAへの位置特異的ハロゲン置換が引き起こすエストロゲン受容体 および に対する異なる結合性および転写活性の変化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 暁輝、酒井大樹、錦織充広、巢山慶太郎、縄司 奨、池田 伸、西垣内 誠、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸
2. 発表標題 新世代ビスフェノールのヒト核内受容体21種に対する結合親和性評価
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会 研究発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

崇城大学 研究業績データベース
<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=ymdegedggy>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------