

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710071

研究課題名(和文) 環境化学物質の脱ヨウ素化酵素の阻害による新たな甲状腺ホルモン攪乱作用の解明

研究課題名(英文) Novel disruption mechanism of thyroid hormone system via deiodinase activity inhibition by environmental chemicals

研究代表者

清水 良 (SHIMIZU, Ryo)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：00570491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、甲状腺ホルモン代謝酵素の一種であるヨードチロシン脱ヨウ素化酵素(IYD)が、水酸基およびハロゲン基を有する環境化学物質によって阻害されることを明らかにした。このIYD活性阻害物質は、環境汚染物質PCB、臭素化難燃剤PBDEの他、一部の医薬品、動物用駆虫薬、農薬、食品添加物が該当した。このような化学物質は、IYDの阻害を介して甲状腺ホルモンの代謝系に影響を及ぼしていることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that halogenated environmental chemicals substituted hydroxyl group and halogen atom on a phenyl ring inhibited iodotyrosine deiodinase (IYD). IYD-inhibitory agents included polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, pharmaceuticals, antiparasitics for animal use, agrichemicals and food colorants. These chemicals may disturb thyroid hormone homeostasis via inhibition of IYD activity.

研究分野：衛生化学，環境科学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：脱ヨウ素化酵素 甲状腺ホルモン 内分泌攪乱化学物質 ハロゲン化合物

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは、全身の細胞のエネルギー産生量促進、基礎代謝維持だけでなく、胎児期や幼少期の知能発達、全身の発育にも重要な役割を示すホルモンである。このホルモンは分子内にヨウ素原子を含有しており、甲状腺ホルモンの生合成におけるヨウ素原子の供給経路としては体外からのヨウ素摂取の他、脱ヨウ素化酵素である iodotyrosine deiodinase (IYD) によるサルベージ経路が存在し、後者がその主要な経路である。IYD は甲状腺ホルモンの代謝によって生成した iodo-L-tyrosine 類からの脱ヨウ素化反応を触媒する酵素であり、この反応によって脱離したヨウ素原子が甲状腺ホルモンの生合成に再利用される。したがって、この酵素は甲状腺ホルモンの代謝において極めて重要な役割を果たすものである。実際、IYD の欠損はヨウ素欠乏による甲状腺機能低下症を引き起こし、胎児期における発達障害や幼少期の発育不全の原因となるだけでなく、その影響は成人後も大きいことが報告されている。一方、IYD は iodotyrosine の他、bromotyrosine および chlorotyrosine からの脱ハロゲン化反応も触媒し、ヨウ素原子だけではなく塩素や臭素原子の脱離反応をも触媒することが示唆されている(図1)。そのため、このハロゲン化 tyrosine (Tyr) のように芳香環に水酸基およびハロゲン基が結合した化学物質は、この酵素を阻害し甲状腺ホルモンの代謝を攪乱する可能性があるが、この点に着目した研究は未だ行われていない。

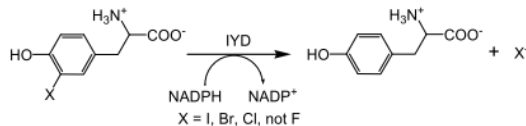


図1 IYD によるハロゲン化チロシンの還元的脱ハロゲン化反応

環境汚染物質 polychlorinated biphenyl (PCBs)、臭素化難燃剤 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) のようなハロゲン化合物やその水酸化代謝物(図2)は、甲状腺ホルモン受容体への結合活性を示し、その曝露によって胎児期における発達障害や神経障害を引き起こす可能性が懸念されている。この活性発現の鍵を握る構造的要素として、甲状腺ホルモンである 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine (T₃) の部分構造に類似した、芳香環への水酸基およびハロゲン基の結合がある。したがって、このようなハロゲン含有化学物質は、IYD の基質となり得る構造的要素を有しているため、甲状腺ホルモン受容体への結合だけでなく、IYD の阻害による

「甲状腺ホルモン代謝系の攪乱」という、新たな甲状腺ホルモン攪乱作用を引き起こす可能性がある。

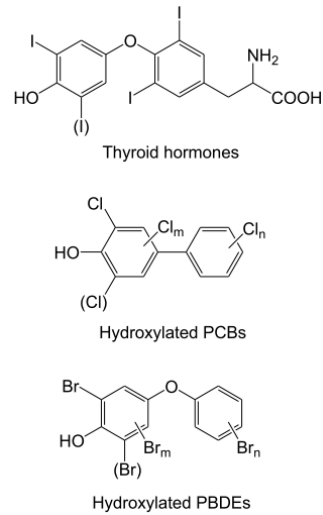


図2 甲状腺ホルモンに対する水酸化 PCB および PBDE の構造類似性

2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究においては、PCB、PBDE の他、医薬品、動物用駆虫薬、農薬、食品添加物などの多種多様なハロゲン含有化学物質を取り上げ、これら化学物質とその代謝物の IYD 活性阻害作用を指標とした甲状腺ホルモン攪乱作用のリスク評価を行うことによって、「甲状腺ホルモン代謝系の攪乱」という新たな甲状腺ホルモン攪乱作用の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) IYD 過剰発現 HEK-293T 細胞株の樹立
IYD 遺伝子をヒト肝臓 cDNA ライブラリーから PCR によってクローニングし、プラスミド pcDNA-IYD を構築した。このプラスミドをヒト胎児腎細胞由来 HEK-293T 細胞にトランスフェクション後、hygromycin により IYD 過剰発現 HEK-293T 細胞を選抜し、細胞株を樹立した。この細胞における IYD 発現はウェスタンブロット法にて、および酵素活性は(2)の方法に従って確認を行った(図3)。

(2) IYD 活性阻害を指標とした *in vitro* 甲状腺ホルモン攪乱作用評価

IYD 過剰発現 HEK-293T 細胞を超音波破砕し、遠心分画法にてミクロソーム画分を調製した。この細胞ミクロソーム画分と被検物質を 3-iodo-L-tyrosine および NADPH 存在下で反応後、固相抽出し、HPLC で反応液中の Tyr

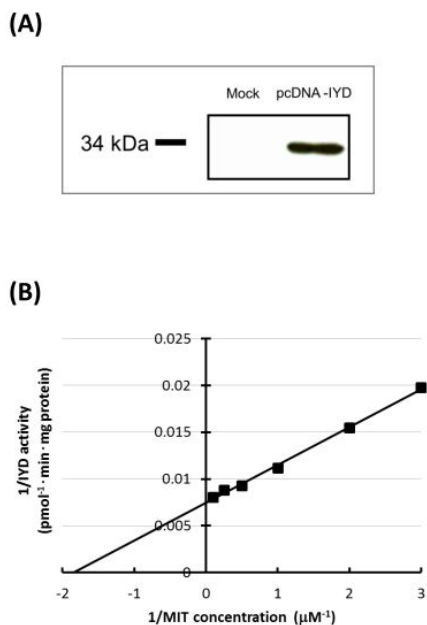


図3 IYD 過剰発現 HEK-293T 細胞の IYD 発現 (A) および酵素活性パラメーター (B)

量を定量した。この Tyr 生成量からその被検物質の IYD 活性に対する IC₂₀ 値 (20% 阻害濃度) を算出し、IC₂₀ 値が算出された被検物質を IYD 活性阻害作用陽性と判定した。

本研究においては、被検物質として、PCB 類 17 種、PBDE 類 15 種、医薬品 2 種、動物用駆虫薬 5 種、農薬 2 種、および食品用着色料 3 種を用いた (図 4)。

4. 研究成果

今回用いた 44 種の被検物質のうち、IYD 活性に対する阻害作用は 22 種で陽性と認められた (表 1)。これら化学物質の構造活性相関を精査した結果、すべて芳香環に水酸基およびハロゲン基が結合した部分構造を有するものであった。その阻害活性は、着色料である rosebengal、erythrosine B および phloxine B が、他の IYD 阻害物質と比較して顕著に高く、高尿酸血症治療薬である benzobromarone、殺菌剤である triclosan、PCB の水酸化代謝物である 4-OH-2',3,4',5,6'-PCB、PBDE の水酸化代謝物である 4'-OH-BDE-17、4-OH-BDE-42、4'-OH-BDE-49、4-OH-BDE-90 などが、比較的強い IYD 活性に対する阻害作用を示した。一方、水酸基を有しない PCB および PBDE、ならびにそのメトキシ化代謝物は、いずれも IYD 活性の阻害作用を示さなかった。

以上の結果から、化学物質の IYD 活性に対する阻害作用発現の構造的要因として、芳香環への水酸基およびハロゲン基の結合が必須であった。このようなハロゲン含有環境化

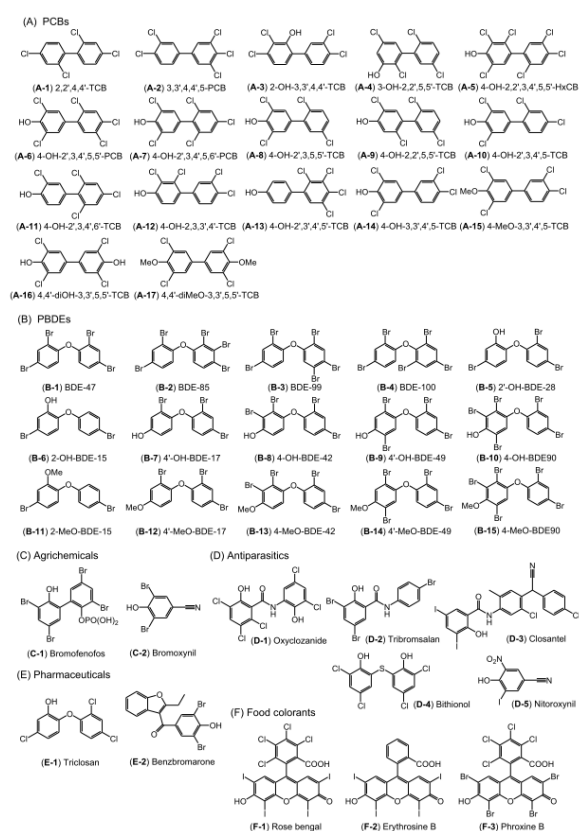


図4 被検物質 44 種の化学構造

表1 IYD 活性阻害における IC₂₀ 値

(A) PCBs	Compound	IC ₂₀ (μM)	(C) Agrichemicals	Compound	IC ₂₀ (μM)
(A-7)	4-OH-2',3,4',5,6'-PCB	17	(C-2)	Bromoxynil	85
(A-11)	4-OH-2',3,4',6'-TCB	21	(C-1)	Bromophenofos	n/a ^a
(A-9)	4-OH-2',5,5'-TCB	26	(D) Antiparasitics		
(A-16)	4,4'-diOH-3,3',5,5'-TCB	28		Compound	IC ₂₀ (μM)
(A-4)	3-OH-2,2',5,5'-TCB	89	(D-1)	Oxyclozanide	21
(A-1)	2,2',4,4'-TCB	n/a ^a	(D-4)	Bithionol	27
(A-2)	3,3',4,4',5-PCB	n/a ^a	(D-2)	Tribromsalan	66
(A-3)	2-OH-3,3',4,4'-TCB	n/a ^a	(D-5)	Nitroxylin	96
(A-5)	4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	n/a ^a	(D-3)	Closantel	184
(A-6)	4-OH-2',3,4',5,5'-PCB	n/a ^a	(E) Pharmaceuticals		
(A-8)	4-OH-2',3,5,5'-TCB	n/a ^a		Compound	IC ₂₀ (μM)
(A-10)	4-OH-2',3,4',5-TCB	n/a ^a	(E-2)	Benzobromarone	11
(A-12)	4-OH-2,3,3',4'-TCB	n/a ^a	(E-1)	Triclosan	19
(A-13)	4-OH-2',3',4',5'-TCB	n/a ^a	(F) Food colorants		
(A-14)	4-OH-3,3',4',5-TCB	n/a ^a		Compound	IC ₂₀ (μM)
(A-15)	4-MeO-3,3',4',5-TCB	n/a ^a	(F-1)	Rose bengal	0.2
(A-17)	4,4'-diMeO-3,3',5,5'-TCB	n/a ^a	(F-2)	Erythrosine B	0.8
(B) PBDEs			(F-3)	Phloxine B	0.8
	Compound	IC ₂₀ (μM)			
(B-7)	4'-OH-BDE-17	16			
(B-8)	4-OH-BDE-42	16			
(B-9)	4'-OH-BDE-49	19			
(B-10)	4-OH-BDE-90	20			
(B-6)	2-OH-BDE-15	22			
(B-5)	2'-OH-BDE-28	26			
(B-1)	BDE-47	n/a ^a			
(B-2)	BDE-85	n/a ^a			
(B-3)	BDE-99	n/a ^a			
(B-4)	BDE-100	n/a ^a			
(B-11)	2-MeO-BDE-15	n/a ^a			
(B-12)	4'-MeO-BDE-17	n/a ^a			
(B-13)	4-MeO-BDE-42	n/a ^a			
(B-14)	4'-MeO-BDE-49	n/a ^a			
(B-15)	4-MeO-BDE-90	n/a ^a			

^aIC₂₀ value could not be calculated.

学物質は、IYD の阻害を介して甲状腺ホルモンの代謝系に影響を及ぼしていることが懸念される。

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2件)

Sakazaki F., Arakawa T., Shimizu R., Ogino H., Okuno T., Ueno H., Allergies are aggravated by mild selenium deficiency and abrogated by supplementation with selenomethionine. *Food Agric. Immunol.*, in press. 査読有
DOI: 10.1080/09540105.2013.837866

Shimizu R., Yamaguchi M., Uramaru N., Kuroki H., Ohta S., Kitamura S., Sugihara K., Structure-activity relationships of 44 halogenated compounds for iodotyrosine deiodinase-inhibitory activity. *Toxicology*, 314, 22-29 (2013). 査読有
DOI: 10.1016/j.tox.2013.08.017

[学会発表](計19件)

増田莉奈, 高田 鑑, 大上 凌, 清水 良, 小林秀丈, 北村繁幸, 太田 茂, 杉原数美. 医薬品類の塩素消毒処理による分解と毒性発現. 日本薬学会第134年会, 2014年3月28日~3月30日, 熊本.

増岡さゆり, 濱岡裕美, 段野正裕, 入江朋子, 佐能正剛, 清水 良, 北村繁幸, 太田茂, 杉原数美. マウス肝 aldehyde oxidase 発現への性ホルモンの影響. 日本薬学会第124年会, 2014年3月28日~3月30日, 熊本.

石川宏美, 田崎智也, 田山剛崇, 清水 良, 杉原数美. 生薬・漢方エキスによるヒト肝 aldehyde oxidase 活性の阻害. 日本薬学会第124年会, 2014年3月28日~3月30日, 熊本.

塚田真妃, 田島慎也, 渡部容子, 浦丸直人, 杉原数美, 清水 良, 北村繁幸. シトクロム P450 及びアルデヒドオキシダーゼ活性に対する睡眠導入剤ザレプロンの影響. 日本薬学会第124年会, 2014年3月28日~3月30日, 熊本.

Ryo Shimizu, Masafumi Yamaguchi, Naoto Uramaru, Hiroaki Kuroki, Shigeru Ohta, Shigeyuki Kitamura, Kazumi Sugihara. Influence of halogenated

phenolic compounds on thyroid hormone system via inhibition of iodotyrosine deiodinase activity. 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), March 23-27, 2014. Phoenix, Arizona, USA.

堀川謙太, 高田 鑑, 大上 凌, 増田莉奈, 清水 良, 北村繁幸, 杉原数美. 抗菌剤パラベン類の毒性と構造活性相関. 第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2013年10月26日~27日, 愛媛.

粟河大史, 堀川謙太, 三間昭平, 伊藤 格, 清水 良, 太田 茂, 杉原数美. 低酸素状態における癌細胞の $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析. 第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2013年10月26日~27日, 愛媛.

高田 鑑, 大上 凌, 増田莉奈, 清水 良, 小林秀丈, 太田 茂, 杉原数美. 医薬品類の塩素処理による分解生成物発生および毒性の調査. 第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2013年10月26日~27日, 愛媛.

清水 良, 山口雅史, 浦丸直人, 黒木広明, 太田 茂, 北村繁幸, 杉原数美. 環境化学物質のヨードチロシン脱ヨウ素化酵素の阻害による甲状腺ホルモン系への影響. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013年9月13日~14日, 福岡.

高田 鑑, 大上 凌, 増田莉奈, 堀川謙太, 清水 良, 北村繁幸, 太田 茂, 杉原数美. 環境中医薬品の下水処理場での塩素消毒による影響調査. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013年9月13日~14日, 福岡.

清水 良, 山口雅史, 浦丸直人, 黒木広明, 北村繁幸, 太田 茂, 杉原数美. PCB および PBDE の水酸化代謝物のヨードチロシン脱ヨウ素化酵素阻害作用における構造活性相関. 第40回日本毒性学会学術年会, 2013年6月17日~19日, 千葉.

清水 良, 山口雅史, 浦丸直人, 黒木広明, 北村繁幸, 太田 茂, 杉原数美. PCB および PBDE の水酸化代謝物のヨードチロシン脱ヨウ素化酵素阻害作用. 日本薬学会第133年会, 2013年3月28日~30日, 横浜.

段野正裕, 垂井真紀, 入江朋子, 田崎智也, 伊藤 格, 三間昭平, 清水 良, 北村繁幸, 杉原数美. 穀物によるマウス肝薬物代謝

酵素の変動．日本薬学会第 133 年会，2013 年 3 月 28 日～30 日，横浜．

清水 良，山口雅史，浦丸直人，北村繁幸，太田 茂，杉原数美．ハロゲン含有環境化学物質のヨードチロシン脱ヨウ素化酵素阻害作用における構造活性相関．第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会，2012 年 11 月 10 日～11 日，島根．

倉八寛史，墨川賢太郎，川畑公平，池ノ上知世，石本亜弓，新屋由美，清水 良，太田 茂，杉原数美．医薬品の環境因子による分解と生態毒性．第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会，2012 年 11 月 10 日～11 日，島根．

三間昭平，伊藤 格，佐光華佳，佐能正剛，清水 良，藤原正子，太田 茂，杉原数美．¹H-NMR を用いた細胞のメタボローム解析．第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会，2012 年 11 月 10 日～11 日，島根．

田崎智也，段野正裕，清水 良，吉原新一，杉原数美．生薬および漢方薬エキスによるヒト肝アルデヒドオキシダーゼ活性の阻害．第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会，2012 年 11 月 10 日～11 日，島根．

Ryo Shimizu, Masafumi Yamaguchi, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta, Kazumi Sugihara. Inhibitory effects of halogenated environmental chemicals on iodotyrosine deiodinase activity. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX VI), July 17-20, 2012. Sendai, Japan.

清水 良，山口雅史，北村繁幸，太田 茂，杉原数美．ヨードチロシン脱ヨウ素化酵素阻害作用を示すハロゲン含有環境化学物質のスクリーニング．第 39 回日本毒性学会学術年会，2012 年 7 月 17 日～19 日，仙台．

6．研究組織

(1) 研究代表者

清水 良 (SHIMIZU, Ryo)
広島国際大学・薬学部・助教
研究者番号：00570491