

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
Signal toxicity mediated through nuclear receptors
of new generation bisphenols

下東 康幸 (SHIMOHIGASHI YASUYUKI)

九州大学・大学院理学研究院・教授



研究の概要

内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールAの低用量作用が懸念されるなか、まず、この分子機構を解明する。一方、ビスフェノールAの代替としてビスフェノールAFなどを原料とする新プラスチックが続々と開発され、これらの内分泌攪乱作用が心配されている。こうした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、内分泌攪乱作用の分子機構を解明する。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 ・ 放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質・ビスフェノール・核内受容体・シグナル毒性

1. 研究開始当初の背景

「内分泌攪乱化学物質」問題の中で、未解決のままの課題があり、これがいわゆる「ビスフェノールA (BPA) の低用量効果」問題である。特に、胎児・乳幼児の生殖腺系や脳神経系で懸念があり、詳しい検討が求められていた。国内外の研究潮流は、例えば、低用量効果をエストロゲン受容体 (ER) への相互作用から何とか説明しようとする試みなどがあつたが、分子メカニズムはほとんど分かっていなかった。また、新世代ビスフェノールについても、それらの受容体応答性や毒性を分子レベルで解析した報告はなかった。

2. 研究の目的

内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールAの低用量作用が懸念されるなか、我々は特異的ターゲット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、報告した。そして、ビスフェノールAが胎児 (仔) 期の脳神経成長に影響する可能性を突き止めた。本研究ではまず、こうしたビスフェノールAの低用量作用の分子メカニズム解明を目的とする。

一方、ビスフェノールAの代替としてビスフェノールAFなどが次々と開発され、生産量が急増している。こうしたなか、これらの内分泌攪乱作用が心配されている。我々は、例えば、ビスフェノールAFがエストロゲン受容体 α 型 (ER α) にはアゴニスト、 β 型 (ER β) にはアンタゴニストとして強力に働

くことを発見した。そこで、本研究ではこうした所謂、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、内分泌攪乱作用の分子メカニズム解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔脳 ERR γ の ChIP-Seq 解析: ビスフェノールAの特異的受容体 ERR γ の ChIP-Seq 解析をマウス胎仔脳について実施し、約 7,500 の DNA 領域を同定。マウス核内受容体全 49 種のうち、ERR γ を含めて ERR γ の転写制御を受けている 27 種、受けていない 22 種を明らかとした。

(2) マウス核内受容体遺伝子 (mRNA) の解析: ERR γ の転写制御を受ける核内受容体の mRNA を解析したところ、突然変異や遺伝子挿入や欠失の有るものと、無いものがあつたため、全 49 種について配列構造を解析。同様に全 49 種について、mRNA 発現量について胎仔日齢 12.5~18.5 を一日毎に解析。

(3) ショウジョウバエの多動性障害の原因となる時計遺伝子 PDF のビスフェノールA暴露の影響解析

(4) ショウジョウバエ株化神経細胞 BG2-c6 のビスフェノールA暴露の影響解析

(5) ハロゲン含有ビスフェノールA誘導体のエストロゲン受容体応答の分子メカニズム解析

(6) ビスフェノールAのエストロゲン様活性の分子メカニズム解析: エストロゲン受容体

ER と ERR の協働作用について CV-1 細胞で解析。

4. これまでの成果

本研究の特色の一つは、BPA食餌・暴露についてホ乳類・マウスと、ヒト遺伝子の最良のモデルであるショウジョウバエについて並列的に、あるいはどちらかを先行・パイロット実験として実施し、その結果をお互いにフィードバックしながら相補的に解析を進めていることである。これまでに明らかとなった主な研究成果は以下の通りである。

① ビスフェノール食餌・暴露による遺伝子への影響

ビスフェノールA (BPA) を食餌、あるいは暴露し、その影響を核内受容体遺伝子の異常性や活動リズムの異常性(多動性や低活動性)に求め、そして、遺伝子 mRNA への影響を解析し、その結果、3' UTR に塩基変異が集中し、また、選択的ポリアデニレーションに異同が起きていることが判明した。さらに、こうした遺伝子への影響は、ERR γ の転写制御の有る無しに関わらず起こることが判明した。このような分子レベルでの内分泌攪乱作用の影響解析はこれまでに例がない。

② ビスフェノールAのエストロゲン様活性の分子メカニズム

ER 受容体に結合性の弱い BPA が、強いエストロゲン様活性を示す原因が、ERR との協働作用であることを明らかとした。BPA は ERR に結合不要で、ER に結合することが必要であること、また、ERR の DNA 結合は必要がないこと、しかし、ERR の自発構成活性が必須なことなどが判明した。

③ ハロゲン含有ビスフェノールA誘導体のエストロゲン受容体応答

ハロゲン化メチル基が一つでも存在すると、ビスフェノールは ER α にアゴニスト、ER β にアンタゴニストとして働くことが明らかとなった。また、ER との間にハロゲン結合の形成が明らかとなった。

④ 小胞体等の細胞内オルガネラ膜受容体への影響解析

ビスフェノールA誘導体が、小胞体膜に存在する受容体タンパク質に結合することが初めて判明した。化学物質のシグナル毒性が、核内受容体や細胞膜受容体だけでなく、細胞内オルガネラの膜タンパク質一般に及ぶ可能性が実証された。

5. 今後の計画

研究の進展に伴って研究内容は深化してきた。以下に、今後、最終的な目標に向かって推進すべき主な項目をあげる。

- (1) ビスフェノールA暴露の遺伝子影響の分子メカニズムの解析
- (2) ビスフェノールA暴露による多動性症

状マウス及び低活動量ショウジョウバエの作出と遺伝子影響解析

- (3) メチル基の数の異なるビスフェノール暴露による遺伝子変異の異同の解析
- (4) 二重 *in situ* ハイブリダイゼーションによる ERR γ と共発現する核内受容体の同定
- (5) ビスフェノールA暴露選択的ポリアデニレーションの異同の原因の解析
- (6) ショウジョウバエ株化神経細胞成長阻害に関わる因子の遺伝子のビスフェノールA暴露の影響解析
- (7) ビスフェノールA誘導体が結合する小胞体膜受容体の同定と攪乱作用の解析
- (8) オーファン核内受容体の結合試験系の確立とリガンドの探索
- (9) ビスフェノールAのERを介したERR協働によるエストロゲン様活性増強の分子メカニズム解明
- (10) ハロゲン化ビスフェノール誘導体のエストロゲン受容体アゴニスト/アンタゴニスト応答の分子機構解析

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. X. Liu, A. Matsushima, M. Nakamura, T. Costa, T. Nose, and Y. Shimohigashi: Fine spatial assembly for construction of the phenol-binding pocket to capture bisphenol A in the human nuclear receptor ERR γ . *Journal of Biochemistry*, **151**, 403-415 (2012).
2. M. Nishigori, T. Nose, and Y. Shimohigashi: Highly potent binding and inverse agonist activity of bisphenol A derivatives for retinoid-related orphan nuclear receptor ROR γ . *Toxicology Letters*, **212**, 205-211 (2012).
3. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, and Y. Shimohigashi: Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR γ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. *Journal of Biochemistry*, **148**, 247-254 (2010). 日本生化学会より、欧文誌(JBと略称)の平成23年度論文賞・2011 The JB Prizeを受賞。
4. 平成23年度文部科学大臣表彰若手科学者賞(科学技術分野):研究分担者・松島綾美助教(現・准教授)「ビスフェノールとその受容体の構造と活性に関する研究」
5. 日本ペプチド学会 学会賞(平成23年):研究代表者・下東康幸教授「受容体分子機能解明のためのペプチド探索子」

ホームページ等

<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp/>

<http://RSRC.scc.kyushu-u.ac.jp/index.html>