

## 内分泌攪乱物質の核内受容体ファミリーを介する作用発現

### Effect of Suspected Endocrine Disruptors on Various Kinds of Nuclear Hormone Receptors

西川 淳一\*, 間宮 聡, 金山 知彦, 西原 力

JUN-ICHI NISHIKAWA, SATORU MAMIYA, TOMOHIKO KANAYAMA and TSUTOMU NISHIHARA

大阪大学大学院・薬学研究科・微生物動態学分野 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6

\* TEL: 06-6879-8241 FAX: 06-6879-8244

\* E-mail: nisikawa@phs.osaka-u.ac.jp

Laboratory of Environmental Biochemistry, School of pharmaceutical Sciences, Osaka University,

1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(原稿受付 2003年6月18日/原稿受理 2003年8月12日)

Nuclear receptors constitute a large superfamily of ligand-inducible transcription factors. By ligand binding, nuclear receptors regulate expression of their target genes and play key roles in various physiological actions. Recently, human genome has been reported to contain 48 members of nuclear receptor family. Despite wide variation in ligand sensitivity, nuclear receptors have similar structure and share an extensive homology. Recently, endocrine disruptors have emerged as a major public health issue due to their potentially disruptive effects on physiological processes, particularly through interaction directly with nuclear receptors. In this study, we have made assay systems for several nuclear receptors and examined agonistic activities of suspected endocrine disruptors. We cloned ligand-binding domain of human nuclear receptors and subcloned these genes into a two-hybrid vector to detect ligand-dependent interaction with coactivator (TIF2). Resulted recombinant vectors which contain  $\beta$ -galactosidase gene as a reporter were introduced into a yeast strain Y190. Using these constructed systems, we tested induction of  $\beta$ -galactosidase by adding known-ligands to the yeast. As results, we could see dose-response curves as expected in concerned with all receptors tested here. Finally, the yeast two-hybrid systems were applied to 22 suspected endocrine disruptors. Several chemicals showed agonistic activities on vitamin A receptor or thyroid hormone receptor as well as estrogen receptor. These results suggest that some man-made chemicals may disturb endocrine systems by targeting to multiple nuclear receptors.

**Key words:** endocrine disruptors, nuclear receptor, estrogen, thyroid hormone, vitamin A

**キーワード:** 内分泌攪乱物質, 核内受容体, エストロゲン, 甲状腺ホルモン, ビタミンA

#### 1. 緒 言

内分泌攪乱作用は、急性毒性や慢性毒性、発癌性や催奇形性といったこれまでの毒性学とは違う新しい概念の毒性であり、ホルモンの受容体を介して生物の発生や分化に深刻な影響を及ぼすと考えられている<sup>1)</sup>。従来、ホルモンの受容体はそれぞれのリガンドに対し特異性が高く、人間が非意図的に作り出した化学物質がホルモン受容体に結合して毒性を発揮するとは一般には考えられてこなかった。ところが、大量に環境中に放出される化学物質(例えば農薬や洗剤、プラスチックの原料など)の中にも、ホルモン受容体と結合して、天然のホルモン作用を模倣して働く物質が数多く存在することが分かってきた。本来、ホルモンとは極微量でその作用を発揮するため、必要な時に必要な量だけ合成され、必要がなくなれば代謝され効果を持たなくされる。しかし、人工的に作り出された化学物質が体内に取り込まれれば、生体のホルモン制御系を無視して働き、人の健康や生態系に悪

影響を与える可能性がある<sup>10)</sup>。

ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性低分子ホルモンの受容体である核内受容体群は、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている<sup>4)</sup>。内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して生体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に深刻な影響を及ぼすと考えられている。これら内分泌攪乱物質の潜在的なターゲットと考えられる核内受容体ファミリーはリガンド作動性の転写調節因子であり、N 端側に亜鉛フィンガーを含む DNA 結合領域、C 端側に転写活性化領域とリガンド結合領域を有するという一次構造上の特徴がある<sup>8)</sup>。近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定されたが、このような特徴を持つ核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトゲノム上には48種類存在することが確定された<sup>1)</sup>。48種類の受容体は、そのほとんどが生物の発生・分化や恒常性の維持に重要な役割を果たしていると推定されており、これらの受容体のいずれに対して化学物質が干渉しても、生物

の健康は害される可能性がある。これまで、内分泌攪乱化学物質のターゲットとしてはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体を中心に研究・調査が進められてきたが、化学物質による内分泌系攪乱作用という観点からは十分とは言えない。また、現在、内分泌攪乱化学物質の作用点がエストロゲン受容体以外にある可能性がさかんに議論されるようになり、そのような観点からも多くの受容体について結合性を調べておく必要がある。そこで本研究では、ヒトの核内受容体ファ

ミリーのうち、その生体内における役割が良く知られているステロイドホルモン受容体、甲状腺ホルモン受容体、脂溶性ビタミンの受容体に焦点をあて、化学物質の影響を調べた。その結果、内分泌攪乱物質と疑われる候補物質が、エストロゲン受容体との結合だけではなく、複数の核内受容体に影響を及ぼし、これらの複合した作用が内分泌攪乱物質としての毒性につながると考えられる結果を得たので報告する。

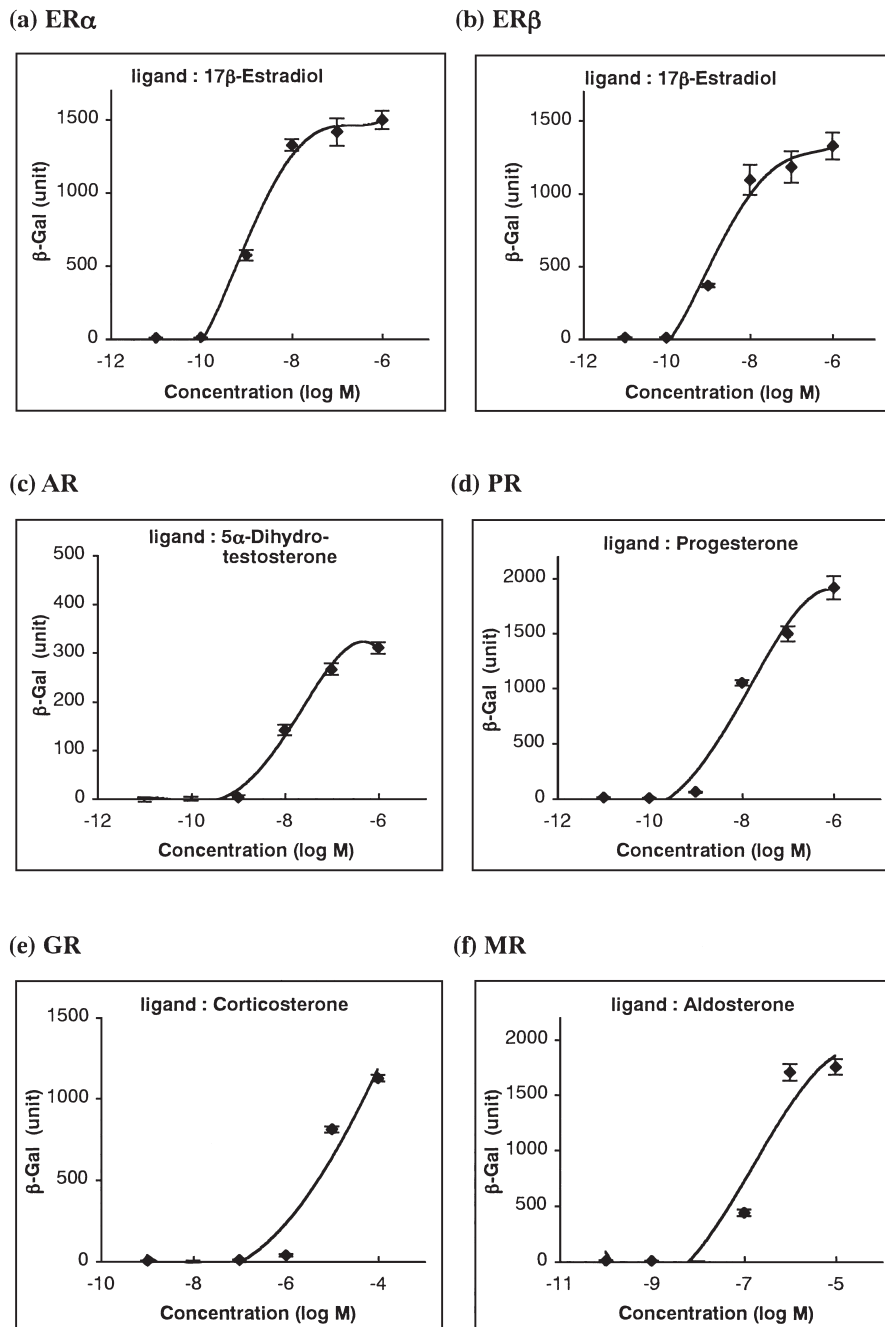


図1 (1). 核内受容体の内因性リガンドに対する容量-応答曲線(1)

エストロゲン受容体アルファ (ER $\alpha$ ) とエストロゲン受容体ベータ (ER $\beta$ ) には 17 $\beta$ -Estradiol, アンドロゲン受容体 (AR) には 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone, プロゲステロン受容体 (PR) には Progesterone, グルココルチコイド受容体 (GR) には Corticosterone, ミネラルコルチコイド受容体 (MR) には Aldosterone を用いて、それぞれのリガンド濃度を変化させた時の  $\beta$ -galactosidase の活性を調べた。縦軸は  $\beta$ -galactosidase の活性を、横軸はそれぞれのリガンド濃度を示す。

2. 実験方法

2.1. 核内受容体 cDNA の単離

(プライマーの設計)

ヒト核内受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) を RT-PCR で増幅するため、GenBank に登録されている配列を基にプライマーを設計した。

(RT-PCR)

RNA はすべて OriGene Technologies, Inc. (MD, USA)

から購入し、これを鋳型として逆転写酵素 (Revertra Ace, 東洋紡) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (AmpliTaQ Gold, Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行い、LBD をコードする DNA を増幅した。

(塩基配列の決定)

PCR により増幅した DNA 断片を pBluescript (Stratagene 社) にサブクローニングし、自動蛍光式 DNA シーケンサー DSQ1000 (島津製作所) にて塩基配列を

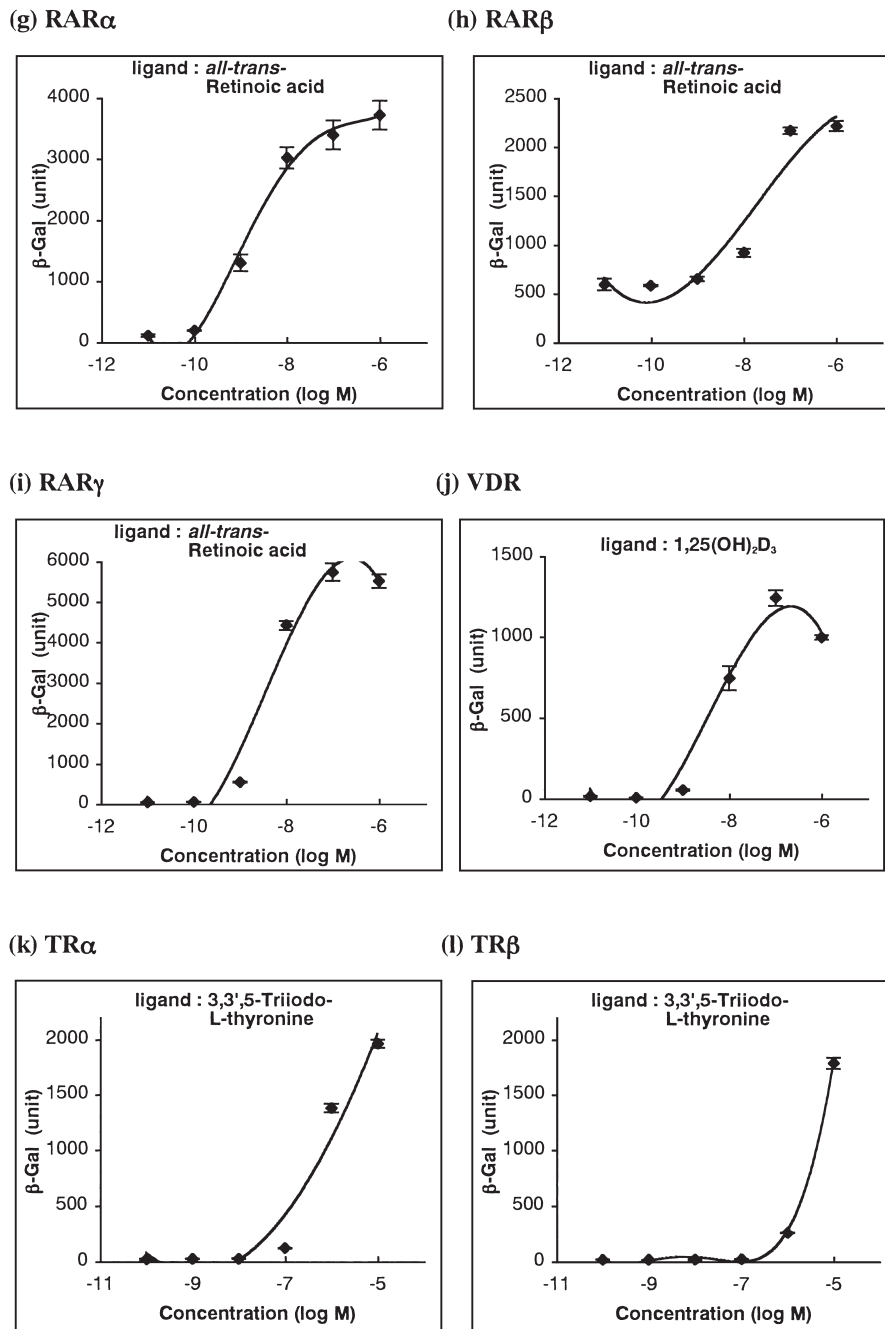


図 1 (2). 核内受容体の内因性リガンドに対する容量-応答曲線 (2)

ビタミン A 受容体アルファ (RAR $\alpha$ ), ビタミン A 受容体ベータ (RAR $\beta$ ) と ビタミン A 受容体ガンマ (RAR $\gamma$ ) には *all-trans*-Retinoic acid, ビタミン D 受容体 (VDR) には 1,25(OH) $_2$ VitaminD $_3$ , 甲状腺ホルモン受容体アルファ (TR $\alpha$ ) と 甲状腺ホルモン受容体ベータ (TR $\beta$ ) には 3,3',5-Triiodo-L-thyronine を用いて、それぞれのリガンド濃度を変化させた時の  $\beta$ -galactosidase の活性を調べた。縦軸は、 $\beta$ -galactosidase の活性を、横軸はそれぞれのリガンド濃度を示す。

決定した。

## 2.2. 酵母 two-hybrid 系の構築

2.1で単離したそれぞれのヒト由来核内受容体 LBD を酵母 two-hybrid 用ベクター pGBT9 (Clontech 社) に挿入し、得られた発現ベクターを pGAD424-TIF2 とともに酵母 Y190 に組み込んだ<sup>9)</sup>。

## 2.3. 試薬

各種核内受容体に対する標準リガンドとしては以下の物質を用いた。

- 17 $\beta$ -Estradiol (ER $\alpha$ ,  $\beta$ )
- 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (AR)
- Progesterone (PR)
- Corticosterone (GR)
- Aldosterone (MR)
- all-trans-Retinoic acid (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )
- 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (TR $\alpha$ ,  $\beta$ )
- 1,25(OH)<sub>2</sub>VitaminD<sub>3</sub> (VDR)

## 2.4. 被験試薬の調整

ベンゾフェノン, *p*-*t*-オクチルフェノール, *p*-*t*-ブチルフェノール, *o*-*t*-ブチルフェノール, フタル酸ブチル

ベンジル, フタル酸ジ-2-エチルヘキシル, フタル酸ジシクロヘキシル, フタル酸ジ-*n*-ブチル, アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル, (塩化)トリブチルスズは和光純薬から購入した。オクタクロロスチレン, フタル酸ジエチル, (塩化)トリフェニルスズ, 4-ノニルフェノールは関東化学から購入した。ビスフェノール A, 2,4-ジクロロフェノール, 4-ニトロトルエン, フタル酸ジ-*n*-ペンチル, フタル酸ジ-*n*-プロピルは東京化成から購入した。

標準リガンドを含め全ての試薬は DMSO に溶解後 -20°C で保存し、使用前に DMSO で段階希釈して用いた。

## 2.5. 酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ

各種受容体 LBD とコアクチベーター (TIF2) を組み込んだレポーター遺伝子発現酵母の懸濁液に被験物質 (10<sup>-8</sup>~10<sup>-4</sup> M) を加え、30°C で4時間反応させた。その後、酵母を遠心分離により集め、Zymolyase で酵母細胞壁を溶解後、被験試薬で誘導された  $\beta$ -galactosidase 活性を比色法にて定量した<sup>9)</sup>。試験はすべて n=3 で行った。

表 1. 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性

| 化学物質                           | ER $\alpha$ | ER $\beta$ | AR | PR | GR | MR | RAR $\alpha$ | RAR $\beta$ | RAR $\gamma$ | TR $\alpha$ | TR $\beta$ | VDR |
|--------------------------------|-------------|------------|----|----|----|----|--------------|-------------|--------------|-------------|------------|-----|
| ベンゾフェノン                        | △           | △          | ×  | ×  | ×  | ×  | △            | △           | △            | ×           | ×          | ×   |
| アミトロール                         | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| オクタクロロスチレン                     | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | △            | ×           | ×          | ×   |
| 4-ニトロトルエン                      | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | △            | △           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| 2,4-ジクロロフェノール                  | △           | △          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | △           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| ペンタクロロフェノール                    | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| 4-ノニルフェノール                     | ○           | ○          | ×  | ×  | ×  | ×  | △            | ○           | ○            | ×           | ×          | ×   |
| <i>p</i> - <i>t</i> -オクチルフェノール | ○           | ○          | ×  | ×  | ×  | ×  | △            | ○           | ○            | ×           | ×          | ×   |
| <i>p</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール  | ○           | ○          | ×  | ×  | ×  | ×  | ○            | ○           | ○            | ×           | ×          | ×   |
| <i>o</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール  | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ○            | ○           | ○            | ○           | △          | ×   |
| ビスフェノール A                      | △           | △          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジエチル                       | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | △            | ×           | △            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ブチルベンジル                    | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジ-2-エチルヘキシル                | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジシクロヘキシル                   | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル           | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジ- <i>n</i> -ペンチル          | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジ- <i>n</i> -プロピル          | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | △            | △           | △            | ×           | ×          | ×   |
| フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘキシル          | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| アジピン酸ジエチルヘキシル                  | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| (塩化)トリフェニルスズ                   | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |
| (塩化)トリブチルスズ                    | ×           | ×          | ×  | ×  | ×  | ×  | ×            | ×           | ×            | ×           | ×          | ×   |

◎; 標準リガンドと同等の活性, ○; 標準リガンドと比較して 1~1/1000 の活性  
△; 標準リガンドと比較して 1/1000~1/1000000 の活性, ×; 活性なし

3. 結果及び考察

3.1. 酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ系の確立

ヒト核内受容体ファミリーのうち、高親和性の内因性リガンドが知られている12種類の受容体、エストロゲン受容体アルファ (ER $\alpha$ )、エストロゲン受容体ベータ (ER $\beta$ )、アンドロゲン受容体 (AR)、プロゲステロン受容体 (PR)、グルココルチコイド受容体 (GR)、ミネラルコルチコイド受容体 (MR)、甲状腺ホルモン受容体アルファ (TR $\alpha$ )、甲状腺ホルモン受容体ベータ (TR $\beta$ )、ビタミン A 受容体アルファ (RAR $\alpha$ )、ビタミン A 受容体ベータ (RAR $\beta$ )、ビタミン A 受容体ガンマ (RAR $\gamma$ )、ビタミン D 受容体 (VDR) について、LBD 部分をコードする DNA を PCR により得ることに成功した。得られた DNA 断片の塩基配列を解析し、すべての受容体遺伝子について既報の塩基配列と一致していることを確認した。尚、取得した受容体の領域 (アミノ酸番号) と、使用した RNA の由来臓器は以下の通りである。ER $\alpha$  (247-596, 卵巣), ER $\beta$  (213-531, 卵巣), AR (625-919, 精巣), PR (634-934, 卵巣), GR (484-778, 腎臓), MR (669-985, 肝臓), RAR $\alpha$  (170-463, 脳), RAR $\beta$  (147-448, 脳), RAR $\gamma$  (172-455, 肝臓), TR $\alpha$  (121-410, 腎臓), TR $\beta$  (175-461, 腎臓), VDR (90-427, 腎臓)。

核内受容体 LBD は、リガンド依存的にコアクチベーターと相互作用することが知られている<sup>3)</sup>。そこで、得られた受容体 LBD とコアクチベーター TIF2<sup>9)</sup> の発現ベク

ターを酵母に導入し、two-hybrid 法により両タンパク質のリガンド依存的な相互作用を調べた (図1)。その結果、ここで調べたすべての受容体については、それぞれのリガンドに対し容量-応答曲線が得られた。ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , VDR では終濃度が約 10<sup>-9</sup> M から良好な応答性が認められたが、GR では 10<sup>-6</sup> M, MR では 10<sup>-7</sup> M, TR $\alpha$  と TR $\beta$  では 10<sup>-6</sup> M からしか応答せず、感度は必ずしも良いとは言えない。これらの受容体も、哺乳動物細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは、酵母の系に比べ100倍から1000倍の感度が得られることから、今回作製したアッセイ系の感度の悪さは、各種リガンドの酵母の細胞壁や細胞膜への透過性に起因するものと考えられる。

3.2. 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の各種核内受容体に対する影響

3.1で作製した酵母 Two-hybrid 系を用い、内分泌攪乱物質として疑われている22物質について、各種核内受容体に対するアゴニスト作用を検討した (表1)。尚、これらの22物質は内分泌攪乱作用を持つと断定されたものではなく、環境省が優先的にリスク評価に取り組むべき物質として公表した、生殖系への影響が懸念されている化学物質を中心に選定した。

内分泌攪乱作用が疑われる22物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性を表1に纏めた。これまでの研究から、パラ位に疎水性の側鎖を持つアルキルフェノール類やビスフェノール A、ベンゾフェノンにエストロゲン様活性

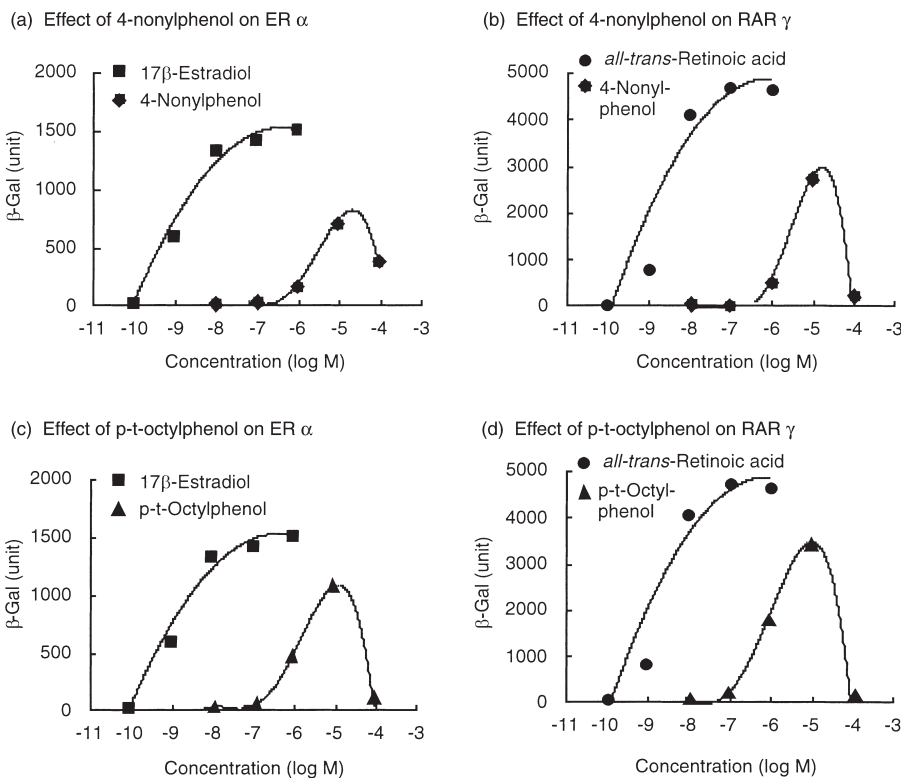


図2. アルキルフェノールのエストロゲン受容体及びビタミン A 受容体への影響  
エストロゲン受容体アルファ (ER $\alpha$ ) とビタミン A 受容体ガンマ (RAR $\gamma$ ) に対する、ノニルフェノール及びオクチルフェノールのアゴニスト活性を調べた。■は 17 $\beta$ -Estradiol に、●は *all-trans*-Retinoic acid に、◆は 4-Nonylphenol に、▲は *p-t*-Octylphenol に対応する。縦軸は、 $\beta$ -galactosidase の活性を、横軸はそれぞれのリガンド濃度を示す。

があることが知られている<sup>7)</sup>。本研究においても、これらの物質は ER にアゴニスト作用を示したが、それに加えて RAR にも活性を持つ事が分かった。また、オルト位に疎水性の側鎖を持つ *o*-*t*-ブチルフェノールは、ER には活性を示さなかったが、RAR と TR にアゴニスト作用を示す事が明らかになった。これら以外の化学物質にも RAR に活性を持つものは多く、今後、内分泌攪乱作用における RAR の関与を検討する必要がある。

### 3.3. アルキルフェノール類のビタミンA受容体 (RAR) への作用

3.2で、アルキルフェノール類が RAR にアゴニスト作用を示すことが明らかになったので、その作用についてさらに詳細に検討した。4-ノニルフェノール及び*p*-*t*-オクチルフェノールは、RAR に対し  $10^{-6}$  M から影響を示し、ER への最少影響濃度とほぼ同じであった (図2)。RAR のリガンドである全トランスレチノイン酸 (ATRA) は、催奇形性試験の陽性コントロールとして使われるほど強い催奇形性作用を持ち、RAR に結合する物質が生殖や発生段階において毒性を示すことはよく知られている<sup>9)</sup>。今回、内分泌攪乱物質と疑われているアルキルフェノール類が RAR にアゴニスト活性を示したことは、これらの物質が ER との結合だけでなく、RAR を介して、場合によっては両者の複合作用として生体に悪影響を及ぼす可能性を強く示唆している。さらに、パラ位以外に側鎖を持つアルキルフェノール (*o*-*t*-ブチルフェノール) は ER には結合しないが RAR には結合した。このことは、今後、アルキルフェノール類について、さらに別の観点からその内分泌攪乱作用を検討しなければいけないことを示唆している。

\* 本研究は、平成14年度「内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムの解明等基礎的研究」(環境省)において行われたもので

ある。

## 文 献

- 1) Chawla, A., J.J. Repa, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. *Science* 294: 1866–1870.
- 2) Colborn, T., D. Dumanoski, and J.P. Myers. 1996. *Our stolen future*. Dutton, New York.
- 3) Herry, D.M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733–736.
- 4) Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835–839.
- 5) Nau, H., Chahoud, I., Dencker, L., Lammer, E.J., and Scott, W.J. 1994. Teratogenicity of vitamin A and retinoids. In *Vitamin A in Health and Diseases* (ed. Blomhoff, R.) 615–664. New York: Marcel Dekker Inc.
- 6) Nishikawa, J., K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, and T. Nishihara. 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154: 76–83.
- 7) Nishihara, T., J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, and H. Utsumi. 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 46: 282–298.
- 8) Tsai, M., and B.W. O'Malley. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 451–486.
- 9) Voegel, J.J., M.J.S. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1996. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 3667–3675.
- 10) 西川淳一, 今川正良, 西原 力. 内分泌攪乱物質の核内受容体に対する影響. *実験医学*. 2000年6月号: 731–736. 羊土社