

核内受容体を利用したバイオ技術による内分泌攪乱化学物質の 分析と生物影響評価

Biotechnology for Analysis of Biological Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Wildlife Using Nuclear Hormone Receptor Superfamily

斎藤 幸一*, 住田 佳代

KOICHI SAITO and KAYO SUMIDA

住友化学工業株式会社生物環境科学研究所 〒554-8558 大阪市此花区春日出中3-1-98

* TEL: 06-6466-5306 FAX: 06-6466-5319

* E-mail:saitok5@sc.sumitomo-chem.co.jp

Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., 1-98, 3-Chome,
Kasugade-Naka, Konohana-Ku, Osaka 554-8558, Japan

キーワード: 核内受容体, 内分泌攪乱化学物質, レポーター遺伝子アッセイ, エストロゲン受容体, 種差

Key words: nuclear hormone receptor, endocrine disrupting chemicals, reporter gene assay, estrogen receptor, species
difference

(原稿受付 2003年6月17日/原稿受理 2003年8月12日)

1. はじめに

1996年の Colborn 博士らの著書 (Our Stolen Future: 邦題“奪われし未来”)⁴⁾ の刊行を発端として, 内分泌攪乱化学物質の問題が社会の大きな関心を集めるようになり, ヒトや野生生物に対する化学物質の影響がクローズアップされるようになった。しかし, 一時の過熱的な報道において, 魚類, 爬虫類, 鳥類等の野生生物の生殖機能や行動の異常, 雄の雌性化, 孵化能力の低下等が数多く報告されてきたが, これらの報告の中で, 表現型の原因を精緻なメカニズム研究によって証明したものは少なく, 内分泌攪乱化学物質の野生生物に対する影響評価の大きな課題となっている。一方, ヒトに対する影響は1940~1960年代に流産防止等の医薬品として使用された合成エストロゲン (DES: ジエチルスチルベステロール) を胎児期に曝露された女性の生殖器に遅発性のがん等が発生したことが確認されているが, 精子の質・量の低下の報告等, 多くの場合, 測定法や解析法によって結果が異なり正確な議論は難しいのが現状である。しかしながら, 内分泌攪乱化学物質のメカニズム研究においては, 医学, 毒性学, 生物学等の多くの分野から研究者が参入し, 分子生物学的手法をはじめとした様々な手法を駆使して新しい研究結果が報告されてきているのも事実である。

内分泌攪乱化学物質の定義は, 1997年の米国の環境保護庁 (EPA) によれば「生体の恒常性, 生殖, 発生, あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成, 貯蔵, 分泌, 体内輸送, 結合そしてホルモン作用そのもの, あるいはそのクリアランスなどの諸過程に阻害作用を持

つ外来性物質」とされている。ホルモンとは生体内外の情報に応じて生物の内分泌細胞や神経細胞等のホルモン産生組織 (細胞) から産生・分泌され, 体液を介してその情報を他のホルモン標的細胞へ伝達する物質の総称であり, 生体の恒常性, 生殖, 発生, あるいは行動をつかさどる重要な内因性物質である。従って, 生体内のいずれかのホルモン環境に影響し, 結果として有害作用を示すものは全て内分泌攪乱化学物質に包括されると解釈できる。哺乳類, 鳥類, 爬虫類, 両生類, 魚類等の脊椎動物のホルモンは, 一般的に, ある器官・臓器で産出され, 血液で運搬され, 標的組織で受容体 (レセプター) と結合し, この結合により細胞内で情報が遺伝子に伝達され, 種々の遺伝子応答が起こり, 最終的にはホルモン作用として現れる。そこで, 内分泌攪乱化学物質のホルモン環境に対する作用点は, ①ホルモンと受容体との結合および②ホルモンの生合成・運搬・分解の2点に大別できる。①および②の検討において, 簡便さ, コスト等の理由で様々なバイオ技術を用いた *in vitro* 試験法が提案され, それらを用いた化学物質の内分泌攪乱作用を示唆する報告が相次いでなされている。その中で, 内分泌攪乱化学物質の影響が生殖・発生に関するものが中心であることから, ①の作用点として女性ホルモン (エストロゲン) や男性ホルモン (アンドロゲン) 等が結合するステロイド受容体に関する研究は高い関心もたれている。

そこで本稿では, ステロイド受容体が属する核内受容体を利用したバイオ技術による内分泌攪乱化学物質の分析法を概説し, あわせて筆者らが研究を進めているエストロゲン受容体の種差に関する研究成果を紹介し将来展望を述べたい。

2. 核内受容体スーパーファミリー

ステロイドホルモン受容体が属する核内受容体は、構造の類似したスーパーファミリーを構成していることが知られており¹⁹⁾, 近年その命名法も提案された⁴³⁾。先に報告された線虫ゲノムプロジェクトの結果、200個以上の核内受容体構造を持ったタンパク質の遺伝子が報告されたため²⁹⁾, ヒトを含めた哺乳動物に関する多数の核内受容体の存在が示唆されたが、ヒトゲノムがほぼ解読された現在、ヒトの核内受容体構造を持つタンパク質の遺伝子は約50種類と考えられている³⁰⁾。その中で、結合する内因性リガンドや機能が解明または推定されているのは約25種類存在する。なお、線虫の核内受容体遺伝子数がヒトと比較して多い理由は、線虫は、生活環により土壌中の毒性を持った低分子脂溶性物質に適応した核内受容体が特異的に増幅されたと考えられている¹⁹⁾。

2.1. 核内受容体の構造と機能

核内受容体の構造は、機能上の特徴から A~F の 6 つの領域に分けることができる (図 1)。リガンドへの結合は C 末側の E 領域に存在するリガンド結合領域で行われ、特異的な DNA の結合はタンパク質の中央に位置する 2 つの Zn フィンガー構造を持つ C 領域を介して行われる。転写活性化能は A/B 領域と E 領域の 2 箇所が存在し、それぞれ AF-1 (activation function-1), AF-2 (activation function-2) と呼ばれているが、AF-1, AF-2 の転写活性化能の強さは受容体や存在する細胞により異なることが知られている。AF-2 はリガンドの結合によりその活性が誘導されることが特徴で、AF-1 は恒常的な転写活性化能を有している。AF-1 の転写活性化能は特に AR, ER 等のステロイドホルモン受容体で重要なことが知られているが、受容体間でアミノ酸配列が大きく異なることから、各受容体固有の機能を有するものと考えられている。

2.2. 核内受容体の転写調節機構

ステロイドホルモン受容体に代表される核内受容体の一般的な機能は、リガンド依存的な転写調節である³⁸⁾。即ち、ホルモン等のリガンドが受容体に結合するとリガンド-受容体結合体は特異的な遺伝子の転写を制御する。まず、核内受容体リガンドが細胞内に入ると、特異的な受容体と結合体を形成し、DNA 上に存在する特異配列を認識して結合する。この特異配列は、一般的にはリガンドの標的遺伝子の 5' 上流側に存在し、核内受容体応答配列 (Nuclear receptor Responsive Element: NRE)

と呼ばれている。この特異配列に、各種ステロイドホルモン受容体はホモ 2 量体、甲状腺ホルモン受容体等は RXR (レチノイド X 受容体) とヘテロ 2 量体を形成して結合する。そして、これらの 2 量体が応答配列に結合すると、リガンド-受容体結合体を認識する一群のタンパク質である転写共役因子 (コアクチベーター)^{3,11,23,40,41)} がさらに結合することがわかってきている (図 2)。コアクチベーターの多くはヒストンアセチル化活性を持ち³³⁾, DNA の構造を弛緩して基本転写調節因子群の相互作用を促し、その結果、標的遺伝子の転写が活性化されると考えられている。AF-2 活性を持つ E 領域には 12 個の α ヘリックス構造が存在し、特にリガンド依存的なコアクチベーターの結合にはコアクチベータータンパク質中に存在する LXXLL (L はアミノ酸のロイシンを示す) 配列⁹⁾ と E 領域の 12 番目のヘリックスのリガンド結合後の角度が重要であることが報告されている^{2,28)}。即ち、この角度の違いにより LXXLL 配列を介したコアクチベーターの結合性が大きく変化し、そのために転写活性が変動する。従って、現在ではコアクチベーターの結合様式による転写活性の変動は、核内受容体のアゴニストやアンタゴニストを規定する重要な要素の一つと考えられている。

3. 核内受容体と内分泌攪乱化学物質

核内受容体スーパーファミリーはリガンドの種類によってステロイドホルモン受容体、甲状腺ホルモン受容体、生体異物関連受容体、脂溶性ビタミン関連受容体、胆汁酸関連受容体および脂質代謝関連受容体等に分類できる。また、核内受容体の約半分はリガンドが未知なオーファン受容体である。以下に各種受容体のヒト遺伝子の Accession No. と内分泌攪乱作用との関連性を紹介する。

3.1. ステロイドホルモン受容体

ヒトにおいてステロイドホルモン受容体は、アンドロゲン受容体 (AR: M20132), プロゲステロン受容体 (PR: M15716), グルココルチコイド受容体 (GR: M10901), ミネラルコルチコイド受容体 (MR: M16801) および 2 種のエストロゲン受容体 (ER α : M12674 および ER β : AB006590) の 6 種類が存在する。これら受容体は、それぞれの特異的生体内リガンド (ステロイドホルモン) であるテストステロン, プロゲステロン, コルチコステロン, アルドステロン, エストラジオール等により転写活性化され機能を発現する。特に女性ホルモン (エストロゲン) と結合する ER α , ER β , 男性ホルモン (アンドロ

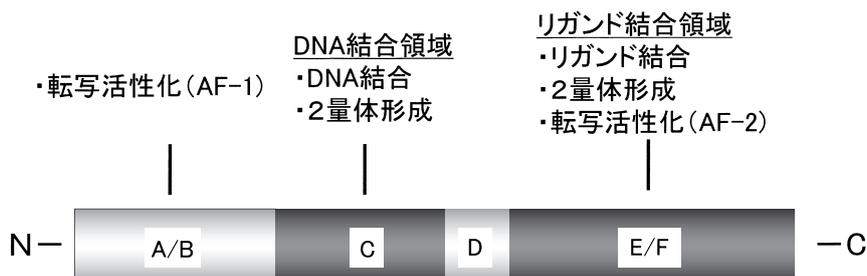


図 1. 核内受容体タンパク質の構造と機能領域。

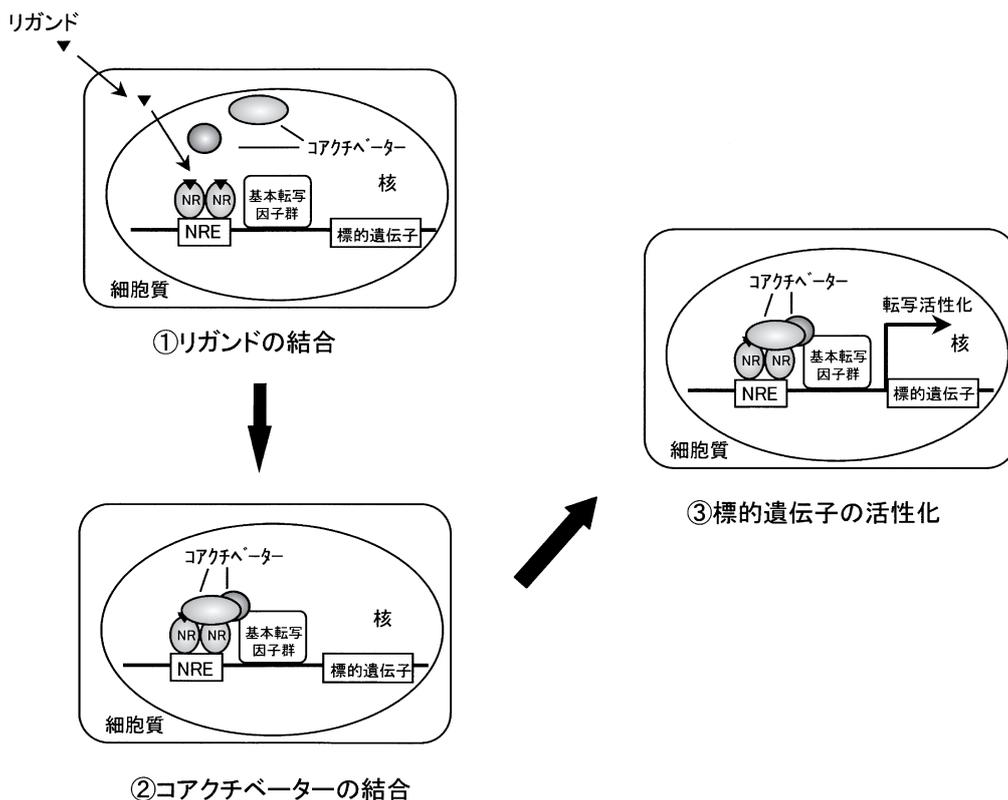


図2. 核内受容体の転写活性化機構の模式図。NRは核内受容体、NREは核内受容体応答配列を示す。

ゲン)と結合するAR, 妊娠維持等に重要な黄体ホルモン(プロゲステロン)と結合するPRは生殖・発生等に重要な受容体である。この中でも、内分泌攪乱化学物質として見出されているものの多くは、ERを標的とするエストロゲン様化学物質である。我々のまわりに数多く存在する化学物質の中には女性ホルモンと類似構造を有し、同様の活性を示すものがあり、これらエストロゲン様化学物質は環境エストロゲンとも呼ばれている。

3.2. 甲状腺ホルモン受容体

ステロイドホルモン以外の脂溶性ホルモンの核内受容体として2種類の甲状腺ホルモン受容体(TR α : X55005, TR β : X04707)が知られている。TRは甲状腺ホルモンであるチロキシン(T4), トリヨードチロニン(T3)等と結合してホルモン作用を発現する。甲状腺ホルモンの生理作用は幼若動物の成長・成熟の促進および成熟動物の基礎代謝の維持等であり、特に乳幼児の成長等の問題から、AR, ERと並んで内分泌攪乱化学物質研究の重要な標的と位置付けられている。

3.3. 生体異物関連受容体

我々は食事等から摂取する様々な生体異物に対し、多くの場合、水溶性化合物に代謝変換して排泄するという解毒機能を備えている。この解毒機能の主役となるのが肝臓に存在する一群の薬物代謝酵素チトクロームP450(CYP)群である。ヒトにおいて最も多量に存在するCYP3Aを中心として、CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E等の多くの分子種が様々な構造の生体異物の代謝に関与している。以前より、これらCYPに

は生体異物を多量に摂取した時の生体防御の機構として酵素誘導現象が知られていた。近年、CYP3A遺伝子の誘導に核内受容体のPXR/SXR(AF061056)¹²⁾が、CYP2B遺伝子の誘導に核内受容体CAR(Z30425)¹⁰⁾が関与していることが明らかとなった。これらCYPは、本来は内因性のステロイドホルモン等の代謝に関与していることから、PXR/SXRを制御する化学物質の内分泌機能に対する影響を懸念する報告もある^{20,36)}。PXR/SXRのリガンド結合領域の特異性は低く、多種多様な生体異物をリガンドとしてCYP3Aを制御している。今後は、実験動物等を用いて生体内での影響を検討する必要があるが、PXR/SXRはリガンド選択性に大きな種差が知られており¹⁵⁾、今後の詳細な検討が待たれる。

3.4. 脂溶性ビタミン、胆汁酸および脂質関連受容体

脂溶性ビタミンおよびその関連物質をリガンドとする核内受容体としてビタミンD受容体(VDR: J03258), 3種のビタミンA受容体(RAR α : X06538, RAR β : Y00291, RAR γ : M57707)およびRXR α (X51773), RXR β (M84820), RXR γ (X66225)が知られている。また、コレステロールの異化経路である胆汁酸関連受容体として4種の受容体(LXR α : NM005693, LRH-1: AF146343, FXR: XM006576, SHP: L76571)¹⁷⁾の関与も明らかにされている。脂質代謝に関連する3種の受容体(PPAR α : L02932, PPAR β : L07592, PPAR γ : L40904)のリガンドは、近年、インスリン抵抗性糖尿病の治療薬として脚光を浴びており¹⁴⁾、また、VDRの新しい内因性リガンドとして胆汁酸代謝物のlithocholic acidが見つかるなど核内受容体の多様な働きが注目されている¹⁸⁾。これらの核内受容

体に対するリガンドは内分泌攪乱作用等の毒性学的意義より薬理学的意義に比重を置いた研究が大半を占めている。

4. 核内受容体を用いたバイオ技術による 内分泌攪乱化学物質の評価法

核内受容体の転写調節機構を利用した内分泌攪乱化学物質の評価に用いる *in vitro* 分析法は幾つか知られているが、感度や作用点が明確な方法としては、受容体とリガンドの結合性を直接評価する受容体結合アッセイ(バインディングアッセイ)^{1,8,21)}、核内受容体の標的遺伝子の転写活性化機構を利用したレポーター遺伝子アッセイ^{13,21,25,42)}、リガンド依存的な核内受容体とコアクチベーターの相互作用を検出する two-hybrid アッセイ²²⁾ を挙げることができる。

4.1. 受容体結合アッセイ (バインディングアッセイ)

古くから用いられている最も一般的な手法である。放射性もしくは蛍光標識したリガンドと被験化合物を共存させて、核内受容体との競合的な結合による標識リガンドの追い出しを測定し、結合性を調べる方法である。核内受容体タンパク質は精製すると構造が不安定になる場合が多く、一般的には組織や細胞の粗精製画分を使用する。遺伝子工学的手法を用いて結合力を維持できる受容体タンパク質が発現可能な場合は、例えば、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞で大量発現させ調製する場合もある。また、特定の核内受容体を多く発現する培養細胞(ER α の場合、MCF-7、T-47D 等)に通常のバインディングアッセイのように培養液中に放射性標識のリガンドと被験化合物を添加して受容体に対して競合結合させた後、結合および遊離したリガンド量を測定することにより被験化合物と受容体との結合を知る方法も可能で

ある (whole cell binding assay)。しかし、本法では被験化学物質がアゴニストなのかアンタゴニストであるかは判定できない。

4.2. レポーター遺伝子アッセイ

図2に示した核内受容体の転写調節機構に基づき、リガンドが受容体に結合し標的遺伝子を活性化する機構を利用した方法である。この方法には培養細胞を用いる方法と酵母を用いる方法がある。培養細胞を用いる方法では、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞やサル腎臓由来 CV-1 細胞等の培養細胞に核内受容体遺伝子を発現する環状 DNA (プラスミド) とレポータープラスミドを同時に導入する。レポータープラスミドは活性の指標となる遺伝子 (レポーター遺伝子: ルシフェラーゼや β -ガラクトシダーゼ等の酵素) の上流に、NRE を挿入したプラスミドを用いる。細胞内で発現した受容体にホルモンが結合すると、レポーター遺伝子上流にある応答配列に結合して下流にあるレポーター遺伝子の転写を増大させてレポーター酵素が発現する。その酵素活性を測定することにより受容体と化学物質との結合を知ることができる (図3)。また、エストロゲン受容体 (ER) の場合、細胞内で ER が発現している MCF-7 や T-47D 細胞等を用いれば、レポーター遺伝子のみを導入してアッセイが可能となる。その他、宿主に酵母を用いてもアッセイは可能であるが、酵母には細胞壁があり化学物質の透過性が哺乳動物細胞と異なる問題点がある。しかし、酵母の形質転換株の作製は培養細胞に比べて著しく容易で、維持等にかかるコストも安い利点がある。この方法では、アゴニスト活性だけでなく、典型リガンドを試験系に加えておいてレポーター遺伝子の活性を上昇させ、同時に被験化学物質を共存させることによりアンタゴニスト活性を検出できる利点がある。

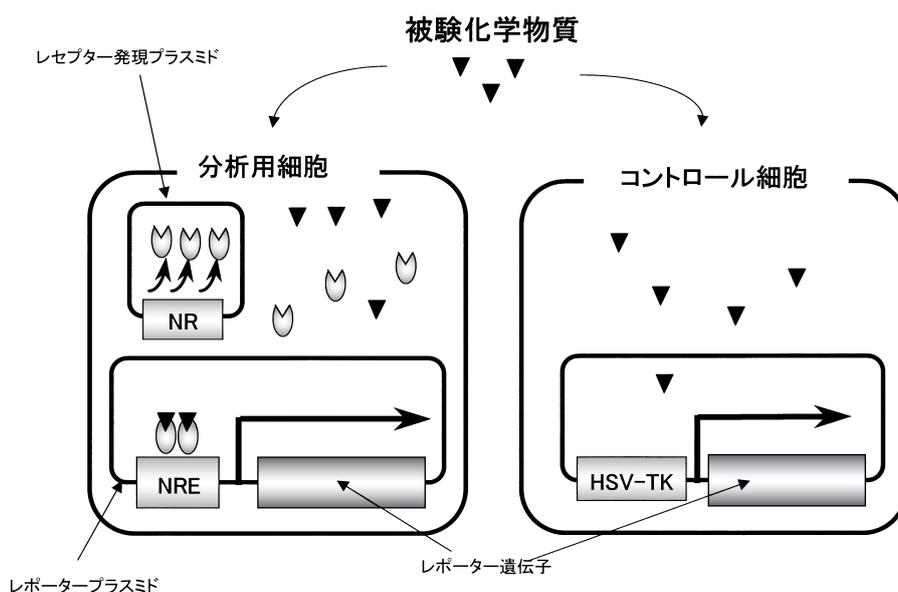


図3. 核内受容体を用いたレポーター遺伝子アッセイによる内分泌攪乱化学物質の分析法の模式図。筆者らは HeLa 細胞を使用し、レポーター遺伝子にはルシフェラーゼを用いている。また、コントロール細胞を用いて細胞毒性等を示さない適正な被験化学物質の濃度設定を行っている。コントロール細胞のプロモーターとして HSV-TK(ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ)プロモーターを用いている。

4.3. Two-hybrid アッセイ

核内受容体にリガンドが結合すると、2.1で述べたように受容体の立体構造が変化し、コアクチベーターが結合する。本法は、コアクチベーターと受容体のリガンド依存的なタンパク質間の相互作用を two-hybrid 法により検出する。two-hybrid 法は当初酵母を用いて開発されたが⁹⁾、近年、培養細胞を用いても可能となった⁹⁾。具体的には酵母を宿主細胞とした場合、図4に示すように核内受容体（一般的にはリガンド結合領域を使用する）と酵母転写因子 GAL4 の DNA 結合領域との融合タンパク質およびコアクチベーターと GAL4 の転写活性化領域の融合タンパク質を発現させる。もし酵母内でリガンドがレセプターに結合すると両融合タンパク質は結合し転写因子 GAL4 の働きを持つタンパク質が複合体が形成される。このタンパク質複合体は転写因子として機能し、レポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼを発現する。従って、化学物質のレセプターとの結合性を β -ガラクトシダーゼ活性で評価することができる。培養細胞を用いた場合は、核内受容体と酵母転写因子 GAL4 の DNA 結合領域との融合タンパク質を発現するプラスミド、コアクチベーターと VP16 の転写活性化領域の融合タンパク質を発現するプラスミドおよび GAL4 の結合配列の下流にルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を組み込んだ3種のプラスミドを同時に哺乳動物培養細胞に導入する。酵母に比べて培養細胞は取扱いの煩雑さ、高コスト等の問題はあるが、レポーター遺伝子アッセイ同様、化学物質の透過性では利点がある。本法もレポーター遺伝子アッセイ同様、アゴニスト活性だけでなくアンタゴニスト活性を検出できる。

4.4. in vitro 分析法の比較

上記の in vitro 分析法は、当初は核内受容体やコアクチベーターの機能解析等の基礎研究を目的に開発された。しかし、化学物質の内分泌攪乱作用のリスク評価等に用いるには評価法としての改良が必要である。EPA の EDSTAC は、高い感度や作用点の明確さから、レセプター結合性試験（バインディングアッセイ）とレポーター遺伝子アッセイを分析法として推奨している。Two-hybrid アッセイは近年開発された方法で感度、メカニズムの明確さは上記試験に匹敵すると考えられる。しかし、これらの手法を内分泌攪乱化学物質の評価に用いるには、まず第一にアッセイに用いる被験化学物質の適正な濃度設定が必要である。受容体結合アッセイは、本質的に受容体タンパク質と化学物質のみを使用するため、結果に影響を与える因子の関与が少ない長所があるが、被験化学物質にタンパク質変性作用がある場合、化合物を高濃度で実験すると、競合結合とは異なる標識リガンドの追い出し効果を測定することになり誤った結果を与える。レポーター遺伝子アッセイおよび two-hybrid アッセイにおいても、例えば、被験化学物質に細胞毒性があれば、アンタゴニストと同様な結果を与えるために偽陽性の結果が出てしまう。従って、in vitro 分析法は簡便であるが、実験条件に十分注意を払わないと評価を誤る可能性がある。そこで筆者らは、レポーター遺伝子アッセイを用いて評価を行う場合、図2で示すようなレポーター遺伝子を恒常的に発現するコントロール細胞を使用し、被験化学物質がレポーター遺伝子発現に与える影響濃度を必ず検討している。また、受容体結合アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、酵母 two-hybrid アッセイのようなメカニズムの明らかな in vitro 試験を複数組み合わせられて被験化学物質を評価することになっている^{26,32)}。

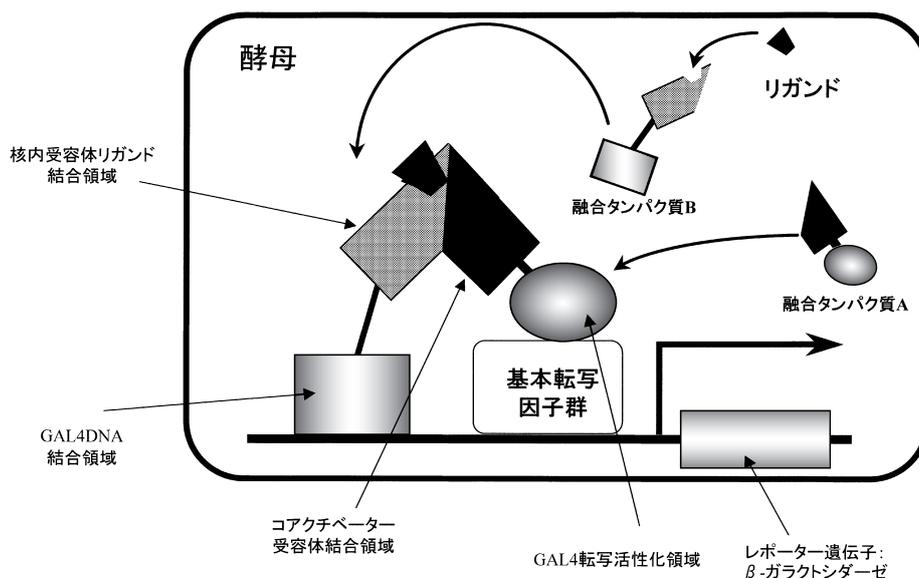


図4. 核内受容体を用いたツーハイブリッドアッセイによる内分泌攪乱化学物質の分析法の模式図。酵母ツーハイブリッドアッセイの例を示す。転写因子 GAL4 を欠損した酵母内に融合タンパク質 A および B を発現するプラスミドを構築し導入する。GAL4 は本来 β -ガラクトシダーゼの誘導にかかわる転写因子である。リガンドが核内受容体と結合すると核内受容体リガンド結合領域と LXXLL モチーフを持ったコアクチベーターの受容体結合領域がタンパク質間相互作用し、GAL4 と同じ働きをするタンパク質複合体が形成される。この複合体の作用によりレポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼが発現するため、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性測定によりリガンドの受容体への結合能が判定できる。

その他, 一般的に化学物質は生体内に入ると薬物代謝酵素により代謝物に変換されるが, 親化合物には内分泌攪乱作用がなくても, 代謝物が活性を持つ場合が考えられる。そこで, 著者らは, Ames 試験と同様の考えからトランススチルベンを肝臓薬物代謝酵素画分で前処理し代謝物のエストロゲン様活性をレポーター遺伝子アッセイにより検出した³³⁾。しかし, 今のところ操作が煩雑であることから更なる分析法の改良が必要と考えている。

5. 核内受容体を用いた内分泌攪乱化学物質の種差の検討

核内受容体の中で遺伝子や機能の種差について最も多くの研究報告があるものはエストロゲン受容体 (ER) である。先述したように, 我々のまわりに数多く存在する化学物質の中で, エストロゲン様化学物質 (環境エストロゲン) は内分泌攪乱物質のなかでも最も研究が進められている化学物質群の一つである。環境エストロゲンは, エストロゲン受容体と結合しその作用を発揮する。そこで, 本項ではヒトを含めた各種生物のエストロゲン受容体のアミノ酸配列やエストロゲン様化学物質に対する応答性の種差について, 筆者らの研究成果を含めた最近の知見を紹介する。

5.1. 各種生物のエストロゲン受容体 (ER) 分子種

2003年5月現在, GeneBank には, 部分配列を含めて約30種類の ER α 遺伝子と約20種の ER β 遺伝子が登録されている。GenBank の遺伝子情報と筆者らがクローニングした未公開の魚類 (ファットヘッドミノールおよびブルーギル: 5.2参照) の全長遺伝子のアミノ酸配列をもとに, 独自に分子系統樹解析を行った結果を図5に示す。全般的に ER α , β のアミノ酸配列は進化の過程をよく反映しており, 硬骨魚類, 両生類, 爬虫類, 鳥類, 哺乳類といった生物学的な分類によく合致していた。このように, ER は様々な生物種でクローニングされている貴重なタンパク質の一例であり, 生物の分類や進化を研究する上でも興味深い対象といえる。

2001年に著者らがはじめて爬虫類のトカゲやワニの cDNA 配列を報告した時の解析によりラット, ニワトリ, カエル, ワニ, トカゲ, ニジマス由来の ER α のアミノ酸配列はヒト ER α と比較して, DNA 結合領域である C 領域は, 硬骨魚類のニジマスから哺乳類のヒトまで90%以上の高い相同性を有していた³⁴⁾。また, リガンド結合領域である E 領域は, 進化の過程に相関してヒト ER α に対し60~96%の相同性を示したが, ラット, ニワトリ, カエル, ワニ, トカゲの相同性の高さ比べ, 硬骨魚類のニジマスは若干の相同性の差異が認められた。

5.2. 魚類のエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子

現存する脊椎動物の中で, 最も原始的な生物はヤツメウナギ, スタウナギ等の無顎類である。Thonton³⁵⁾ は, ヤツメウナギの ER の部分構造を解析し, 分子系統樹解析の結果, ER α , β の両方の祖先である1種類の ER の存在を報告している。また, 同様に, ヤツメウナギでは哺乳類等で存在するグルココルチコイド受容体 (GR) とミネラルコルチコイド受容体 (MR) は1種類のコルチコ

イド受容体であり, さらにプロゲステロン受容体とアンドロゲン受容体の祖先と考えられる1種のステロイド受容体が存在することを報告している。

無顎類の他, 現存する魚類は, サメやエイの仲間である軟骨魚類と魚類の約96%占める硬骨魚類に分類できる。魚類の祖先の一部は淡水に進出し, その中で魚の姿を選択して海水, 淡水で繁栄した一群が硬骨魚類と考えられている。また, 淡水に進出した魚の一部は両生類として陸上に上がったと考えられている。その他, 淡水に進出せずに海中で進化したものが現在の軟骨魚類と考えられている。軟骨魚類では唯一 spiny dogfish (サメの一種) の ER β の報告がある。従って, 軟骨魚類の ER α の存在は今のところ不明である。硬骨魚類では, ER α または β の存在が報告されているが, Hawkins⁸⁾ らは Atlantic croaker にはエストロゲン受容体遺伝子が3種存在することを報告している。第3番目の遺伝子は ER γ と名づけられたが, 著者らの解析ではこの ER γ は ER β に分類され, さらに, zebrafish においても, 別々の研究室から2種の ER β が報告されていることが明らかとなった。従って, 硬骨魚類では2種類の ER β 分子種が存在するようであり, 魚の種類によって片方あるいは両方を発現している可能性がある。今後, 両 ER β の発現と生理学上の役割についての報告を待ちたい。また, 無顎類では ER は1種であることから硬骨魚類の進化以前に生物は2種の ER 分子種を獲得したと推定できる。

公開されている魚類とは別に, 著者らはエストロゲン様化学物質の各種環境生物に対する影響を評価する上で重要との観点から, 米国等で提唱されている環境毒性試験に使用される, 硬骨魚類のブルーギルおよびファットヘッドミノール ER α およびブルーギルの ER β の全長 cDNA をクローニングした。ブルーギルおよびファットヘッドミノール ER α は582および602個のアミノ酸からなり, ブルーギルの ER β は554個のアミノ酸から構成されていた。さらに, ブルーギルの ER α には ER 機能を有した506個のアミノ酸からなるスプライシングアイソマーの発現も明らかになった (投稿準備中)。

5.3. 両生類のエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子

両生類では African clawed frog (アフリカツメガエル) の ER α の報告がある。

5.4. 爬虫類のエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子

内分泌攪乱化学物質の問題として米国アポプカ湖のワニの生殖器異常が知られているが²⁷⁾, 著者らが GeneBank に登録されている ER の cDNA を検索したところ, 爬虫類 ER α の全長 cDNA 配列の登録は無かった。そこで, 著者らはワニ (カイマン) およびトカゲ (オマキトカゲ) の肝臓から ER α のクローニングを試み, それぞれ587および581アミノ酸からなる全長 cDNA 配列とその性質を報告した³⁴⁾。

5.5. 鳥類のエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子

鳥類ではニワトリで ER α および ER β の報告がある。その他, zebra finch (キンカチョウ) の ER α , Japanese quail (ウズラ) および common starling (ムクドリ) の ER β が報告されている。分子系統樹を見るとニワト

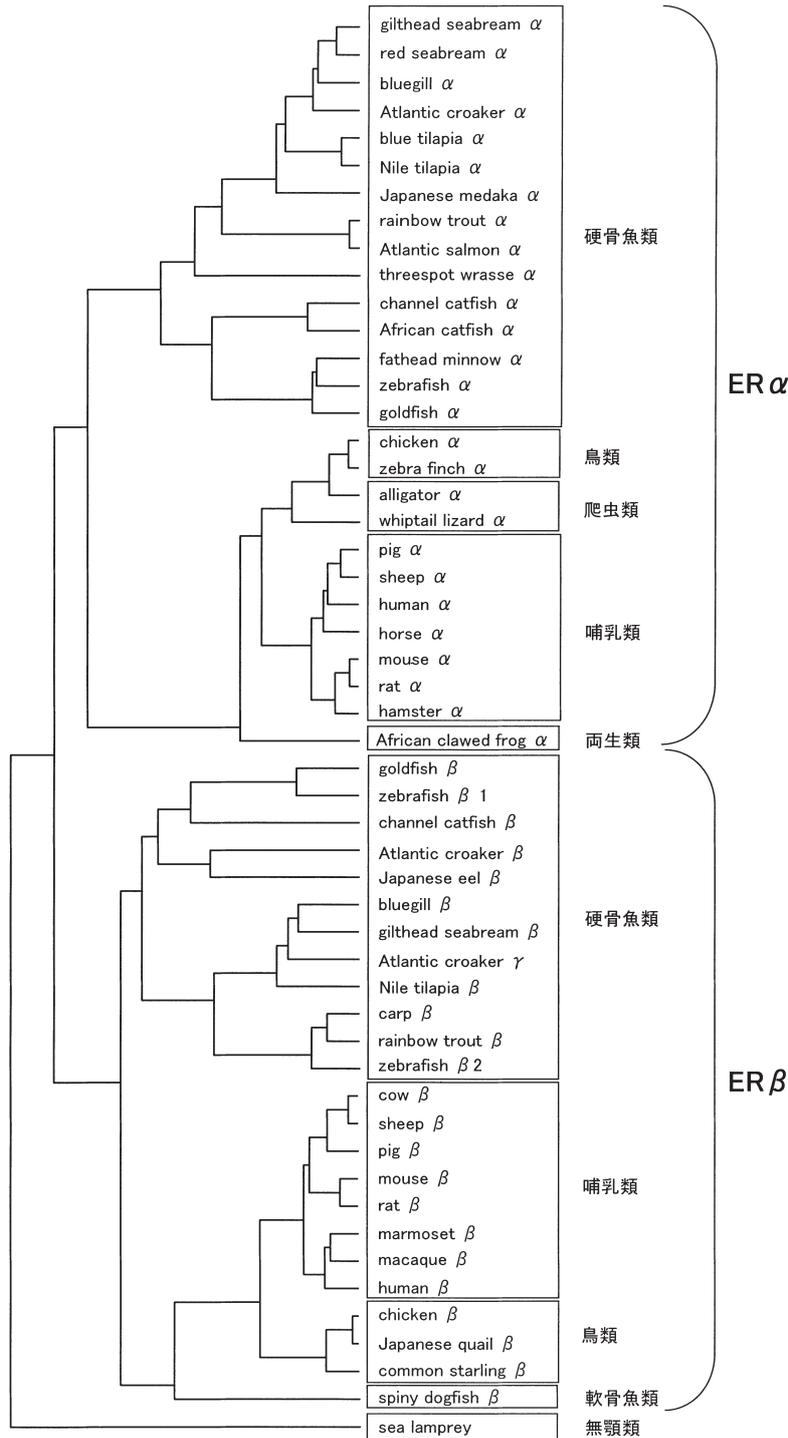


図5. 脊椎動物 ER タンパク質の分子系統樹解析。解析には遺伝子解析ソフト Genetyx ver.5.0 の Evolutional Tree 解析を用いた。各遺伝子の Accession No. を () に示す。African catfish (X84743), African clawed frog (L20735), alligator (AB055220), Atlantic croaker (AF298181, AF298182, AF298183), Atlantic salmon (X89959), blue tilapia (X93557), carp (AB083064), channel catfish (AF253505, AF185568), chicken (X03805, AB036415), common starling (AF113513), cow (AF110402), gilthead seabream (AF136980, AJ006039), hamster (AF181077), goldfish (AY055725, AF177465), horse (AF124093), human (M12674, AF051427), Japanese eel (AB003356), macaque (AF393815), marmoset (AF393816, Y09372), medaka (AB033491), Japanese quail (AF045149), mouse (M38651, U81451), Nile tilapia (U75605, U75604), pig (AF164957, Z37167), rainbow trout (AJ289883, AJ242740), rat (X61098, U57439), red seabream (AB007453), sea lamprey (AY028456), sheep (Z49257, AF177936), spiny dogfish (AF147746), threespot wrasse (AF326201), whiptail lizard (AB055221), zebra finch (L79911), zebrafish (AF349412, AJ275911, AF349414)。bluegill および fathead minnow は未公開。

りと Japanese quail (ウズラ) のアミノ酸配列は非常に近い位置にあり興味深い。

5.6. 哺乳類のエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子

哺乳類ではヒト以外に、サル、ブタ、ヒツジ、ウマ、

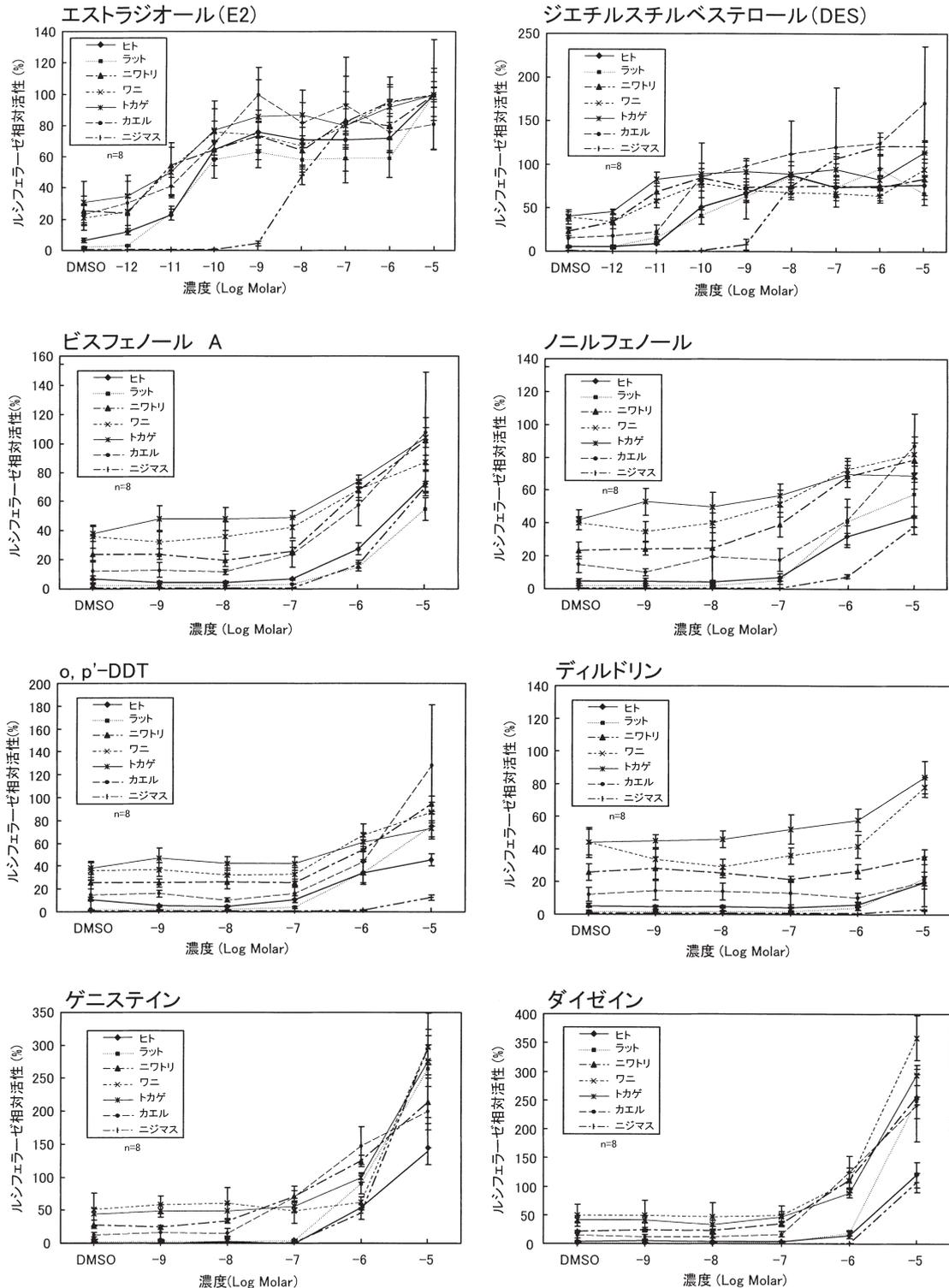


図6. 各種環境生物のER α のエストロゲン様化合物による転写活性化の比較。HeLa細胞(培養温度37°C)にレセプター発現プラスミドおよびレポータープラスミドを導入し、各種エストロゲン様化合物を処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれの系における最大転写活性を100とした時の相対転写活性化率を示した。データはn=8の平均値±標準偏差。Sumida, K. et al. (2003)³⁵ Fig. 2を一部改変。

マウス、ラット、ハムスター、ウシ等のER α またはER β 遺伝子の報告がある。分子系統樹解析の結果、げっ歯目(ネズミ)、奇蹄目(ウマ)、偶蹄目(ウシ、ヒツジ、ブタ)、霊長目(ヒト)は明確に分類されている。

5.7. 各種生物のエストロゲン受容体(ER)を用いた内分泌攪乱化学物質の種差の検討³⁵⁾

著者らがクローニングした爬虫類の他、既報の各生物種のER α 遺伝子を用いて、レポーター遺伝子アッセイ

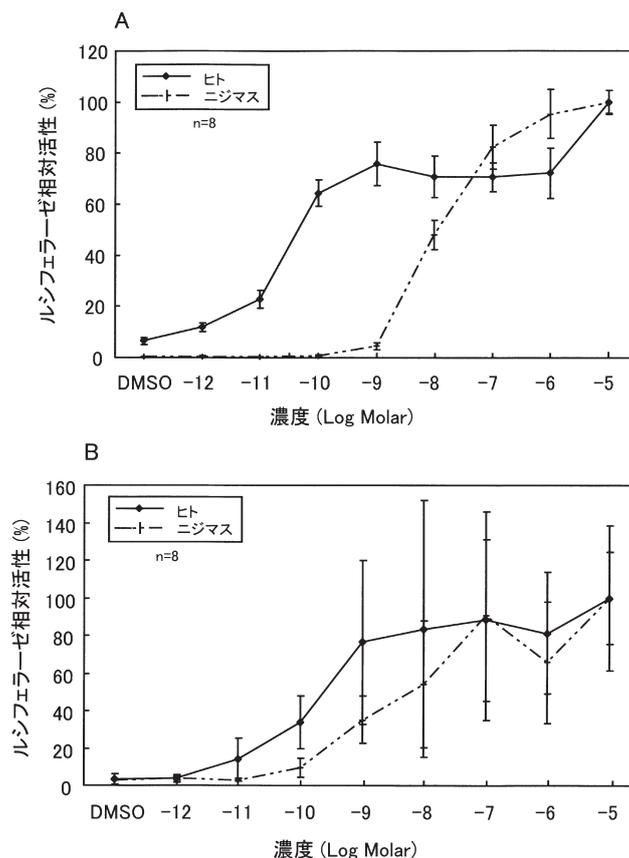


図7. ヒトとニジマス ERα のエストロゲンによる転写活性化の比較。レセプター発現プラスミドおよびレポータープラスミドを A: HeLa 細胞 (培養温度 37°C) あるいは B: BF-2 細胞 (培養温度 24°C) に導入し、エストラジオール (E2) を処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれの系における最大転写活性を100とした時の相対転写活性化率を示した。データは n=8 の平均値±標準偏差。Sumida, K. et al. (2003)³⁵ Fig. 4 を一部改変。

により各種エストロゲンの転写活性化の種差を検討した。今回、哺乳類からヒト、ラット、鳥類からニワトリ、爬虫類としてワニおよびトカゲ、両生類からカエル、硬骨魚類として環境毒性試験に汎用されるニジマスを選択した。方法としては、ワニおよびトカゲ以外は、報告されている ERα の cDNA 配列に従い、プライマーを設計し、各動物の cDNA ライブラリーを用いて PCR により ERα cDNA をクローニングした。各生物の ERα の全長 cDNA を発現プラスミド pRc/RSV ベクターに導入し各種 ERα 発現プラスミドとした。また、ルシフェラーゼ遺伝子を持つ pGL3 ベクターの上流にアフリカツメガエルのピテロゲニン遺伝子由来のエストロゲン応答配列 (ERE) を 5 回縦列して組み込みレポータープラスミドを構築し、両プラスミドをリポフェクション法により一過性に HeLa 細胞に導入した。この導入細胞に各種化学物質を添加し、約40時間インキュベートした後、発現したルシフェラーゼ活性を測定した。エストロゲン様化学物質としては、女性ホルモンのエストラジオール (E2)、合成女性ホルモンのジエチルスチルベステロール (DES)、植物エストロゲンのゲニステインおよびダイゼイン、有機塩素系農薬の o,p'-DDT およびディルドリン、合成化学物質のビスフェノール A およびノニルフェノールを使用した。その結果、ラット、ニワトリ、ワニ、トカゲ、カエルの E2 に対する応答性は、ヒトと比較して顕著な差は認められなかった (図6)。しかし、ニジマ

ス ERα においては、E2 に対する応答性が他の生物種の ERα に比較して著しく低いことが判明した。ニジマス ER では、ヒト ER に比べて E2 の応答性が約 1/100 に低下しており、その他の化合物においても、転写活性化の強度に違いが有るものの E2 と同様の傾向を示した。そこで、硬骨魚類の ER に関しては、温度の上昇と共にレセプターへの結合能が低下することが報告されていたため^{24,37}、培養温度が HeLa 細胞 (37°C) よりも低いブルーギル由来の BF-2 細胞 (24°C) を用いて転写活性化能を比較した (図7)。その結果、応答性に明らかな上昇が認められ、細胞の培養温度がこの応答性の差の一因である可能性が示唆された。その他、各 ERα のアンタゴニストの作用も検討した。アンタゴニストとしては乳癌治療薬のタモキシフェンの活性代謝物である4-ヒドロキシタモキシフェンおよび骨粗鬆症治療薬のラロキシフェンを用いた。ラット、ニワトリ、ワニ、トカゲ、カエルのアンタゴニスト作用はヒトと顕著な差は認められなかったが、ニジマスにおいてはアゴニスト作用が認められた (図8)。ニジマスにのみ認められた現象の詳細なメカニズムは不明であるが、硬骨魚類の ERα のリガンド結合領域が、他の生物種と比べてアミノ酸配列が若干異なることが一因かもしれない。今後は、近年飛躍的に進歩している核内受容体の X 線構造解析等のアプローチを行えば、詳細なメカニズムが明らかになると考えられる。

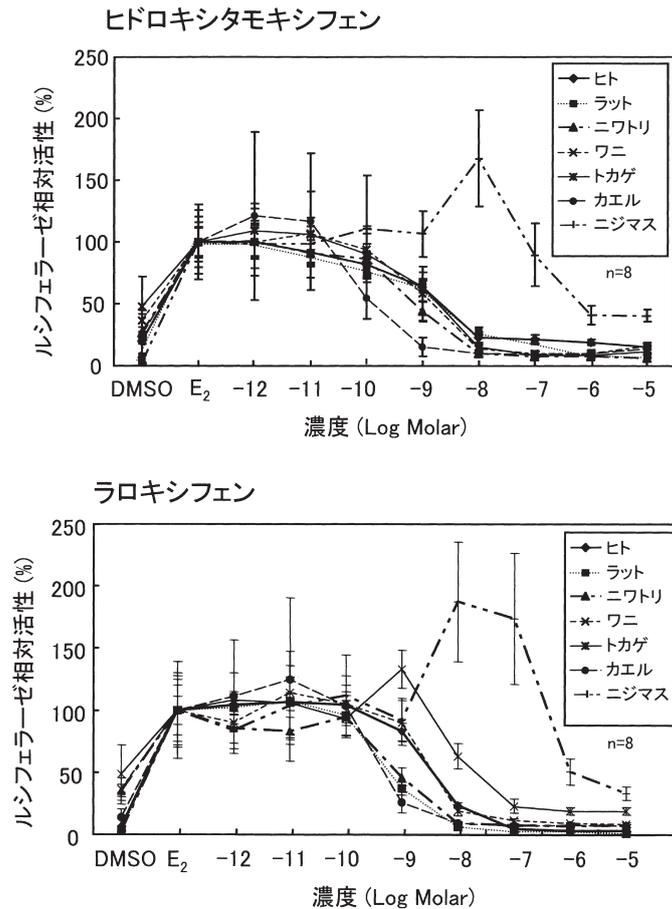


図8. 各種環境生物のER α の抗エストロゲン様化合物による転写活性阻害の比較。HeLa細胞(培養温度37°C)にレセプター発現プラスミドおよびレポータープラスミドを導入し、エストロゲンと共に抗エストロゲン化合物を処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれの系においてエストロゲンのみで処理した時の転写活性を100とした時の相対転写活性化率を示した。データはn=8の平均値±標準偏差。Sumida, K. et al. (2003)³⁹ Fig. 3を一部改変。

6. おわりに

簡単ではあるが、核内受容体を中心とした内分泌攪乱化学物質の作用点とバイオ技術を利用した分析法による生物影響評価について概説した。さらに、ヒトを含めた各種生物の種差の検討についても著者らの実験データを紹介した。

ここで述べたように、内分泌攪乱化学物質は広義では非常に広範囲の活性を持つ化学物質が対象となる。今後、それぞれの作用点について分子メカニズムに基づいた様々な分析法が開発され、生物影響評価がおこなわれるであろう。しかし、今回中心に紹介した核内受容体スーパーファミリーは、主としてホルモン等の低分子脂溶性化学物質をリガンドとしたタンパク質群であり、天然や我々が作り出す低分子化学物質の分子標的となる機会は多いと考えられる。従って、今回紹介した*in vitro*分析法を、様々な核内受容体に有効に用いることにより、我々のまわりにある多くの化学物質の生物影響を簡便に評価可能になるであろう。

文 献

- Berthois, Y., J.A. Katzenellenbogen, and B.S. Katzenellenbogen. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2496–2500.
- Brzozowski, A.M., A.C.W. Pike, Z. Dauter, R.E. Hubbard, T. Bonn, O. Engström, L. Öhman, G.L. Greene, J.-Å. Gustafsson, and M. Carlquist. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753–758.
- Chen, H., R.J. Lin, R.L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M.L. Privalsky, Y. Nakatani, and R.M. Evans. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90: 569–580.
- Colborn, T., D. Dumanoski, and J.P. Myers. 1996. *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? — A Scientific Detective Story.* Dutton New York, USA.
- Field, S., and O.-K. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245–246.
- Finkel, T., J. Duc, E.R. Fearon, C.V. Dang, and G.F. Tomaselli. 1993. Detection and modulation *in vitro* helix-loop-helix protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 268: 5–8.
- Hammond, B., B.S. Katzenellenbogen, N. Krauthammer, and J. McConnell. 1979. Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (kepone) and interaction with uterine estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 6641–6645.
- Hawkins, M.B., J.W. Thornton, D. Crews, J.K. Skipper, A. Dotte, and P. Thomas. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in

1) Berthois, Y., J.A. Katzenellenbogen, and B.S. Katzenellenbo-

- teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10751–10756.
- 9) Heery, 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.
 - 10) Honkakoski, P., I. Zelko, T. Sueyoshi, and M. Negishi. 1998. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5652–5658.
 - 11) Hong, H., K. Kohli, A. Trivedi, D.L. Johnson, and M.R. Stallcup. 1996. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4948–4952.
 - 12) Kliewer, S.A., J.T. Moore, L. Wade, J.L. Staudinger, M.A. Watson, S.A. Jones, D.D. McKee, B.B. Oliver, T.M. Willson, R.H. Zetterstrom, T. Perlmann, and J.M. Lehmann. 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92: 73–82.
 - 13) Legler, J., C.E. van den Brink, A. Brouwer, A.J. Murk, P.T. van der Saag, A.D. Vethaak, and B. van der Burg. 1999. Development of stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.* 48: 55–66.
 - 14) Lehmann, J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, and S.A. Kliewer. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270: 12953–12956.
 - 15) Lehmann, J.M., D.D. McKee, M.A. Watson, T.M. Willson, J.T. Moore, and S.A. Kliewer. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* 102: 1016–1023.
 - 16) Lindblom, T.H., G.J. Pierce, and A.E. Sluder. 2001. C. elegans orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. *Curr. Biol.* 11: 864–868.
 - 17) Lu, T.T., M. Makishima, J.J. Repa, K. Schoonjans, T.A. Kerr, J. Auwerx, and D.J. Mangelsdorf. 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* 6: 507–515.
 - 18) Makishima, M., T.T. Lu, W. Xie, G.K. Whitfield, H. Domoto, R.M. Evans, M.R. Haussler, and D.J. Mangelsdorf. 2002. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296: 1313–1316.
 - 19) 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.
 - 20) Masuyama, H., Y. Hiramatsu, M. Kunitomi, T. Kudo, and P.N. MacDonald. 2000. Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate Pregnane X receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 14: 421–428.
 - 21) Miksicek, R.J. 1994. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 49: 153–160.
 - 22) Niishikawa, J.-I., K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, and T. Nishihara. 1999. New screening method for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154: 76–83.
 - 23) Oñate, S.A., S.Y. Tsai, M.-J. Tsai, and B.W. O’ Malley. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354–1357.
 - 24) Petit, F., Y. Valotaire, and F. Pakdel. 1995. Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 233: 584–592.
 - 25) Pons, M., D. Gagne, J.C. Nicolas, and M. Mehtali. 1990. A new cellular model of response to estrogens: A bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. *Biotechniques* 9: 450–459.
 - 26) Saito, K., Y. Tomigahara, N. Ohe, N. Isobe, I. Nakatsuka, and H. Kaneko. 2000. Lack of significant estrogenic or anti-estrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor α -mediated mechanisms. *Toxicol. Sci.* 57: 54–60.
 - 27) Semenza, J.C., P.E. Tolbert, C.H. Rubin, L.J. Jr Guillette, and R.J. Jackson. 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environ. Health Perspect.* 105: 1030–1032.
 - 28) Shiau, A.K., D. Barstad, P.M. Loria, L. Cheng, P.J. Kushner, D.A. Agard, and G.L. Greene, 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95: 927–937.
 - 29) Sluder, A.E., S.W. Mathews, D. Hough, V.P. Yin, and C.V. Maina. 1999. The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes. *Genome Res.* 9: 103–120.
 - 30) Sluder, A.E., and C.V. Maina. 2001. Nuclear receptors in nematodes: themes and variations. *Trends Genet.* 17: 206–213.
 - 31) Spencer, T.E., G. Jenster, M.M. Burcin, C.D. Allis, J. Zhou, C.A. Mizzen, N.J. McKenna, S.A. Onate, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O’ Malley. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389: 194–198.
 - 32) Sumida, K., K. Saito, N. Ooe, N. Isobe, H. Kaneko, and I. Nakatsuka. 2001. Evaluation of in vitro methods for detecting the effects of various chemicals on the human progesterone receptor, with a focus on pyrethroid insecticides. *Toxicol. Lett.* 118: 147–155.
 - 33) Sumida, K., N. Ooe, H. Nagahori, K. Saito, N. Isobe, H. Kaneko, and I. Nakatsuka. 2001. An in vitro reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 85–91.
 - 34) Sumida, K., N. Ooe, K. Saito, and H. Kaneko. 2001. Molecular cloning and characterization of reptilian estrogen receptor cDNAs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183: 33–39.
 - 35) Sumida, K., N. Ooe, K. Saito, and H. Kaneko. 2003. Limited species differences in estrogen receptor alpha-mediated reporter gene transactivation by xenoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84: 33–40.
 - 36) Takeshita, A., N. Koibuchi, J. Oka, M. Taguchi, Y. Shishiba, and Y. Ozawa. 2001. Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur. J. Endocrinol.* 145: 513–517.
 - 37) Tan, N.S., V. Freecer, T.J. Lam, and J.L. Ding. 1999. Temperature dependence of estrogen binding: importance of a subzone in the ligand binding domain of a novel piscine estrogen receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1452: 103–120.
 - 38) Tsai, M.-J., and B.W. O’Malley. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 451–486.
 - 39) Thornton, J.W. 2001. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 5671–5676.
 - 40) Torchia, J., D.W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 677–684.
 - 41) 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.
 - 42) White, R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, and M.G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175–182.
 - 43) 1999. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161–163.