

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成 29年 2月 28日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 帯広畜産大学

職 准教授

氏名 久保田 彰

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

発達期ゼブラフィッシュにおけるビスフェノール類の影響評価と作用機序解析

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 久保田 彰	帯広畜産大学	准教授	受精卵を用いたビスフェノール類の影響評価および研究総括
分担者 川合佑典	帯広畜産大学	助教	受精卵を用いたビスフェノール類の影響評価
芳之内結加	愛媛大学	大学院生	エストロゲン受容体とビスフェノール類の <i>in silico</i> 相互作用解析
拠点対応教員 岩田久人			エストロゲン受容体とビスフェノール類の <i>in silico</i> 相互作用解析

3 研究内容（別紙）

研究課題

発達期ゼブラフィッシュにおけるビスフェノール類の影響評価と作用機序解析

研究代表者 久保田 彰（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）

共同研究者 川合 佑典（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）

中村 倫子（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）

若山 裕己（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）

森田 友理（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）

芳之内結加（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

岩田 久人（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

研究目的

ビスフェノール A（BPA）は、ポリカーボネート製プラスチックの製造やエポキシ樹脂の原料として、哺乳瓶や食品容器、感熱顕色剤など様々な用途で利用されてきた。しかしながら、BPA はエストロゲン受容体を介して内分泌攪乱作用を引き起こすことが明らかにされた。その結果、BPA の代替物質としてビスフェノール S（BPS）やビスフェノール F（BPF）など他のビスフェノール類（BPs）の利用が増加しつつある。さらに、低濃度の BPA が中枢神経系に対する毒性を引き起こすことが明らかにされ、国内外で BPA によるリスクの再評価や規制が実施されてきた。近年の再評価の結果、BPA のヒトに対するリスクは低いと結論されたものの、環境生物に対するリスクについては不明な点が多いのが現状である。さらに、ヒト MCF-7 細胞を用いたエストロゲンルシフェラーゼレポーターアッセイ系において、一部の代替 BPs は BPA よりもエストロゲン活性が高いことも報告されている。従って、多様な BPs について環境生物に対する影響を評価することが重要である。そこで本研究では、環境毒性脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用いて、感受性の高い胚発達期における BPs の内分泌攪乱作用を評価することを目的とした。

研究内容

本研究ではまず、分子シミュレーションソフト（Molecular Operating Environment）を用いてゼブラフィッシュエストロゲン受容体（zfERs）の 3D ホモロジーモデルを構築し、多様な BPs と zfERs の結合エネルギーを *in silico* 解析で算出して一次スクリーニングをおこなった。次いでスクリーニングした BPs のうち 9 物質と E2 を対象に、受精後 72 時間のゼブラフィッシュ胚（25 匹／ペトリ皿）に水性曝露した。

曝露胚は受精後96時間で採材し、液体窒素で急速凍結させた後 -80°C で保管した。また、E2 および一部の BPs については ER 拮抗薬（フルベストラント）との共処置をおこなった。曝露胚から全 RNA を抽出し、cDNA 合成をおこなった後、CYP19A1b の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。

研究成果

受精後 72 時間のゼブラフィッシュ胚に E2 を曝露したところ、濃度依存的な CYP19A1b mRNA の発現誘導が認められた (Fig. 1)。誘導能を表す EC_{50} を算出したところ $0.003 \mu\text{M}$ となった。また、E2 により誘導された CYP19A1b の発現は、ER 拮抗薬との共処置により有意に抑制された (Fig. 1)。これらの結果より、ゼブラフィッシュ胚においても E2 は ER を介して CYP19A1b mRNA の発現を誘導することが示された。

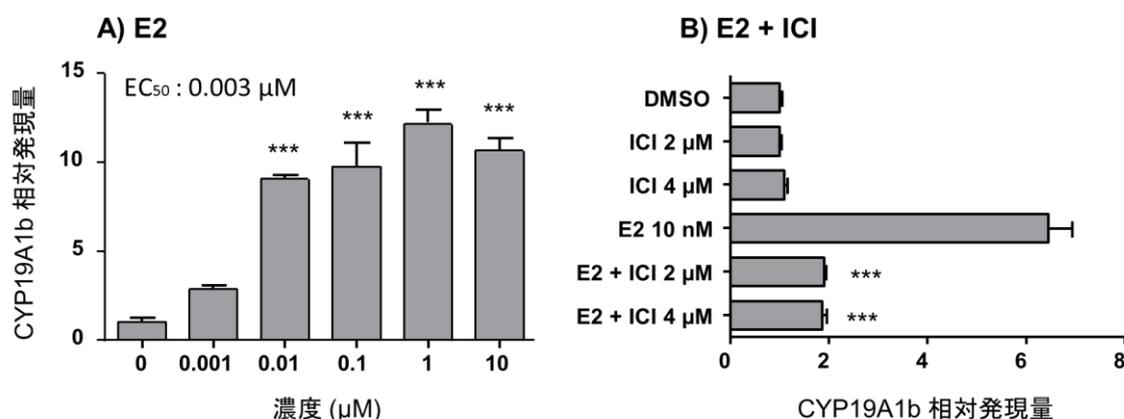


Fig. 1. ゼブラフィッシュ胚における E2 単独および ER 拮抗薬 (ICI) との共処置による CYP19A1b mRNA 発現量への影響 (***) $p < 0.001$)

次に、9 種の BPs について同様に曝露試験を行い CYP19A1b mRNA 発現に対する影響を評価した (Fig. 2)。その結果、BPA は濃度依存的に CYP19A1b mRNA の発現を誘導し、その EC_{50} は $7.6 \mu\text{M}$ となった。その他の評価したすべての BPs (BPC、BP C2、BPE、BPF、2,2'-BPF、2,4'-BPF、BPS、BPAF) についても、BPA 同様に濃度依存的な CYP19A1b mRNA の発現誘導がみられた。BPE や BPF では CYP19A1b の誘導倍率は高く BPA と類似の応答性を示し、BPC、BP C2、BPAF では誘導倍率は低いものの誘導能は高い傾向が認められた。これらの結果は、多様な BPs が濃度依存的に CYP19A1b mRNA を誘導すること、ならびに物質ごとに誘導倍率や誘導能が異なることを示している。CYP19A1b 誘導能の EC_{50} から推測した各物質のエストロゲン活性は、 $\text{E2} > \text{BP C2} > \text{BPAF} > \text{BPC} \approx \text{BPS} \approx \text{BPE} \approx \text{BPA} \approx \text{BPF} > 2,4'\text{-BPF} > 2,2'\text{-BPF}$ の順となった。BPs の構造的特徴を比較すると、フェニル環の *para* 位に OH 基が置換した物質で高い誘導能を示した。

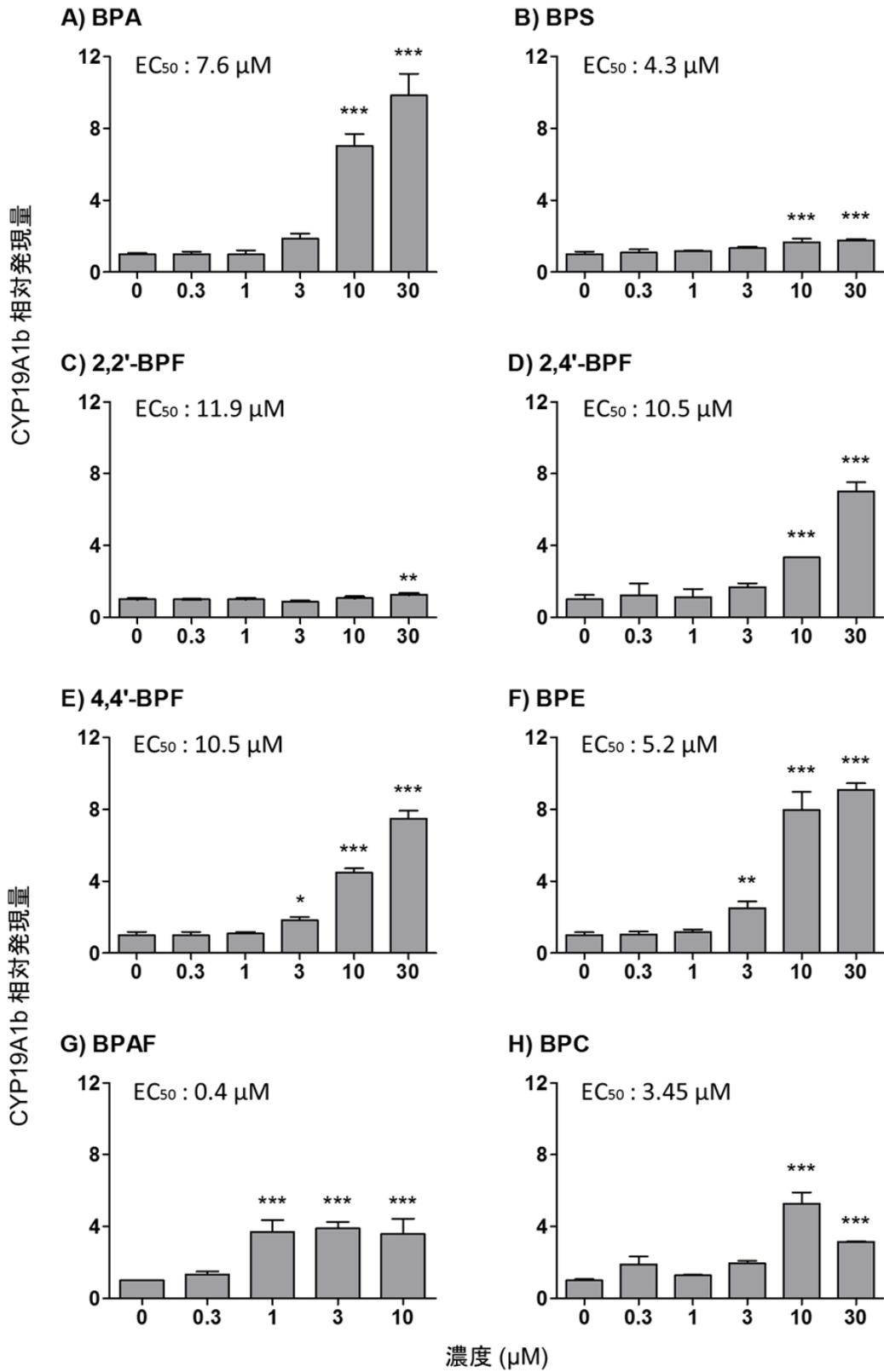


Fig. 2. ゼブラフィッシュ胚における BPs による CYP19A1b mRNA 発現量への影響 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

また、BPsの中で誘導倍率の高かったBPFやBPE、ならびに誘導能の高かったBPAFやBP C2についてER拮抗薬との共処置をおこなった。その結果、いずれのBPsによるCYP19A1b mRNAの発現誘導も有意に抑制された(Fig. 3)。これらの結果から、E2同様BPsも、少なくとも一部は、zfERを介してCYP19A1b mRNAを誘導することが示唆された。

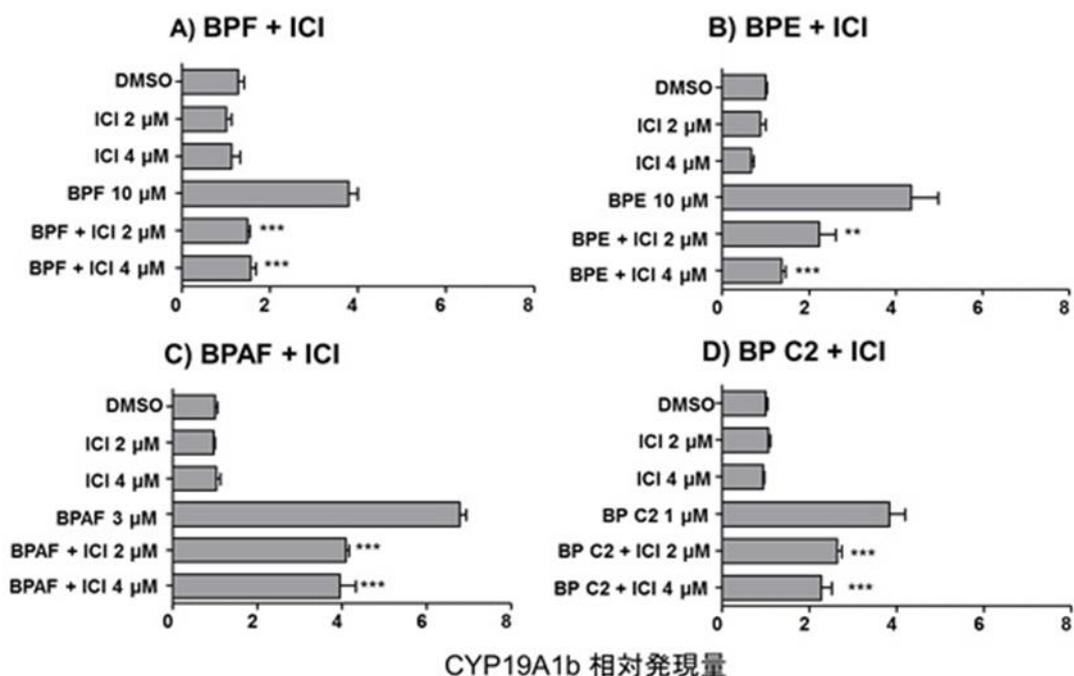


Fig. 3. ゼブラフィッシュ胚におけるBPsとER拮抗薬(ICI)の共処置によるCYP19A1b mRNA発現量への影響 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

続いて、E2およびBPsとzfERsの*in silico*ドッキングシミュレーションを行い、相互作用エネルギー(U_{dock})を解析した。また、E2および2,2'-BPF、2,4'-BPF、4,4'-BPFとzfER α の結合状態をFig. 4に示した。*In silico*解析の結果から、*ortho-para*位置換型である2,4'-BPFと*para-para*位置換型である4,4'-BPFでは、E2同様、zfER α と水素結合を有し、その相互作用エネルギーも低値を示した。一方で、*ortho-ortho*位置換型である2,2'-BPFはzfER α との水素結合を作らず、その相互作用エネルギーも高い値を示した。加えて、*in silico*シミュレーションで得られたすべてのBPsとzfER α の結合状態に関する結果から、*para-para*位置換型および*ortho-para*位置換型のBPsは、いずれも*para*位のOH基とzfER α LBDのE321との間に水素結合を有し安定的な結合状態を形成することが示唆された。さらに、各BPsについて、*in silico*シミュレーションにより算出した相互作用エネルギーは、*in vivo*におけるCYP19A1b誘導能と有意な正の相関関係($r = 0.69$, $p = 0.031$)を示し、エネルギー値が低い物質ほどEC₅₀も低い値となる傾向が認められた(Fig. 5)。一方、ER β 1およびER β 2とBPsの相互作用エネルギーとEC₅₀の間には有意な相関関係は認め

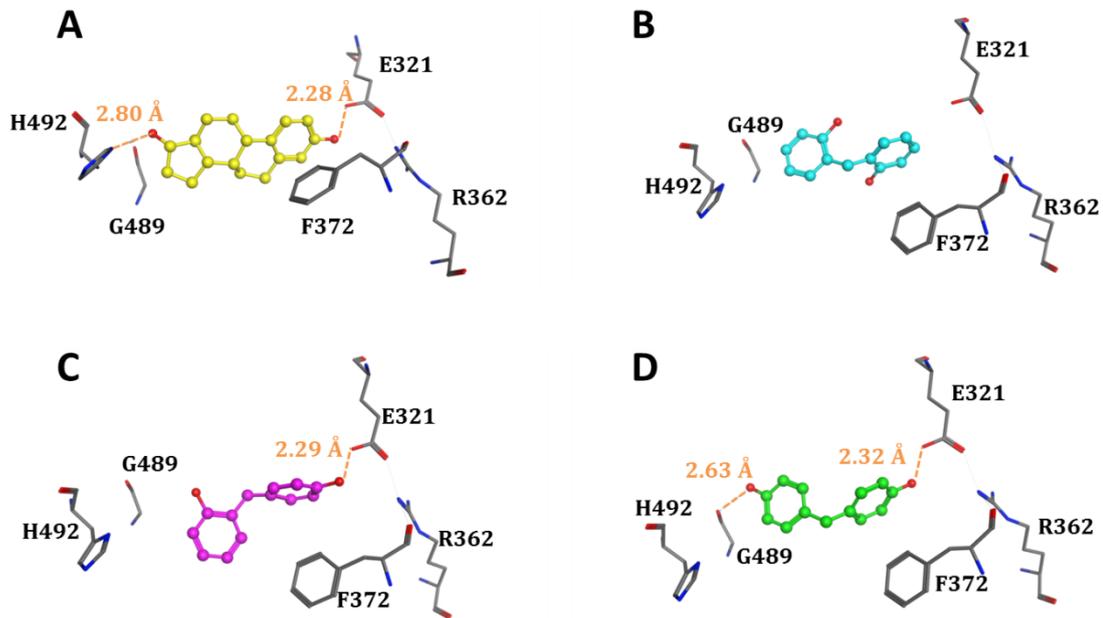


Fig. 4. E2 および BPFs と zER α LBD の結合状態
E2 (A)、2,2'-BPF (B)、2,4'-BPF (C)、4,4'-BPF (D)。点線は ER α のアミノ酸残基との水素結合を、橙色の文字はその結合距離を表わしている。

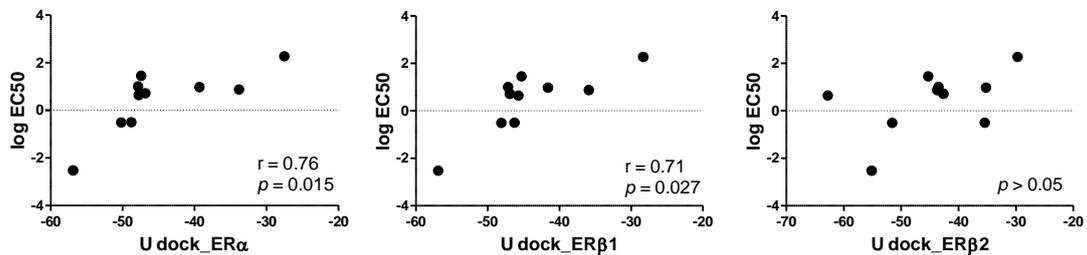


Fig. 5. BPs と各 zERs LBD の相互作用エネルギー (U dock 値) と CYP19A1b mRNA 誘導能の EC₅₀ の相関関係
zER α (A)、zER β 1 (B)、zER β 2 (C)。Spearman 順位相関検定で解析した。

られなかった (Fig. 5)。

本研究の結果は、多様な BPs が *in vivo* で zER を介して CYP19A1b mRNA を発現誘導すること、ならびに BPA と同等もしくは BPA よりも高いエストロゲン活性を有する代替 BPs が存在することを示している。

今後の課題

今後は、より多様な BPs を対象に、ゼブラフィッシュ胚を用いた *in vivo* CYP19A1b mRNA 誘導能の評価と *in silico* ドッキングシミュレーションによる zERs と BPs の

相互作用エネルギーの解析を行う。これらの相関性を解析することで、*in silico* シミュレーションによって未試験の化学物質の *in vivo* エストロゲン活性を評価することができるか否かを検討する。また、BPs は E2 との共存下では抗エストロゲン作用を示すという *in vitro* 試験の結果が散見されることから、ゼブラフィッシュ胚を用いた *in vivo* 試験においても、この点を検討したい。

成果発表リスト

(論文)

1. Nijoukubo, D., Tanaka, Y., Okuno, Y., Yin, G., Kitazawa, T., Peterson, R. E., Kubota, A. and *Teraoka, H. (2016): Protective effect of prostacyclin against pre-cardiac edema caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and a thromboxane receptor agonist in developing zebrafish. *Chemosphere*, 156, 111-117.
2. *Wincent, E., Kubota, A., Timme-Laragy, A. R., Jönsson, M. E., Hahn, M. E. and Stegeman, J. J. (2016): Biological effects of 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole (FICZ) *in vivo* are enhanced by loss of CYP1A function in an Ahr2-dependent manner. *Biochemical Pharmacology*, 110-111, 117-129.
3. Lemaire, B., Kubota, A., O'Meara, C. M., Lamb, D. C., Tanguay, R. L., Goldstone, J. V. and *Stegeman, J. J. (2016): Cytochrome P450 20A1 in zebrafish: Cloning, regulation and potential involvement in hyperactivity disorders. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 296, 73-84.

(学会発表)

【招待講演】

1. 久保田 彰 (2016): ゼブラフィッシュにおける薬物代謝酵素の網羅的解析：魚類とヒト健康影響のモデル動物の観点から。国立環境研究所環境リスク・健康研究センター，つくば，12月。

【国内学会】

1. 久保田 彰・Wincent, E.・Stegeman, J. (2016): 発達期ゼブラフィッシュにおけるCYP1A/AHRフィードバック機構攪乱の影響。第22回日本環境毒性学会研究発表会，松山市，9月，講演要旨集，68-69.
2. Kubota, A.・Timme-Laragy, A.・Jönsson, M.・Hahn, M. E.・Stegeman, J. J.・Wincent, E. (2016): Biological effects of a dysfunctional CYP1A/AHR2 feedback loop in developing zebrafish. 環境ホルモン学会 第19回研究発表会，つくば市，12月，プログラム・要旨集，98.