

## 研究課題

ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* および *in silico* 解析によるビスフェノール類の抗エストロゲン作用の評価

研究代表者 久保田 彰 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

共同研究者 Lee, Jae Seung (帯広畜産大学獣医学研究部門)

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

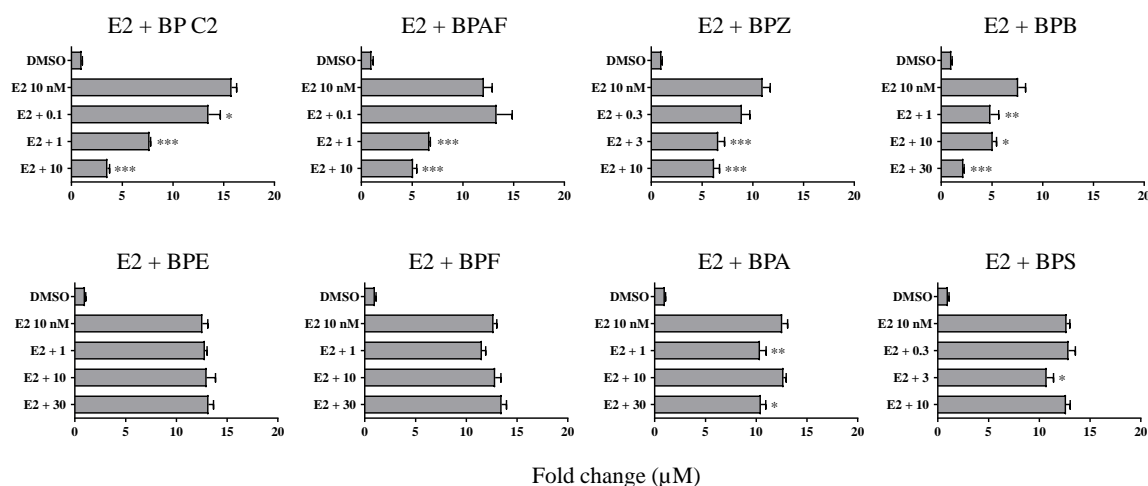
ビスフェノール A (BPA) は、ポリカーボネート製プラスチックの製造やエポキシ樹脂の原料として、哺乳瓶や食品容器、感熱顕色剤など様々な用途で利用されてきた。このため、BPA は大気や水、土壌、食品など多様な媒体から検出されている。BPA は、エストロゲン受容体 (ER) を介した内分泌攪乱作用や中枢神経系に対する毒性を引き起こすことが明らかにされ、ヒト健康に悪影響を及ぼすリスクがあることから世界各国で生産・使用が規制されてきている。他方、BPA の代替物質として類似の化学構造をもつ BPS や BPF、BPAF などの新世代ビスフェノール類 (BPs) の利用が近年増加しつつある。しかしながら、一部の代替 BPs は BPA よりもエストロゲン活性が高いことが *in vitro* および *in vivo* で報告されている。従って、新世代 BPs が代替物質として適しているかどうかは不明な点が多く、多様な BPs について、ヒト健康および環境生物に対する影響を評価することが重要である。申請者らは最近、ゼブラフィッシュをモデルとして、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 が多数存在すること、ならびに BPs と zfER サブタイプ (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 1、ER $\beta$ 2) リガンド結合ポケットの相互作用を *in silico* 解析することで、*in vivo* 曝露試験によるエストロゲン活性を評価できることを明らかにした。さらに、相対的に用量効果 (potency) の高い BPs は 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) と比べて最大効力 (efficacy) が低い傾向にあり、部分アゴニストの特徴を示すことを明らかにした。この結果は、BPs のなかにはエストロゲン様作用だけでなく、抗エストロゲン作用を有する化合物も存在することを示唆している。そこで本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、*in vivo*・*in silico* 解析により多様な BPs の抗エストロゲン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、研究代表者・久保田の研究室で、受精後 72 時間のゼブラフィッシュ胚 (20 匹/ペトリ皿) を用いて E2 と多様な BPs をそれぞれ単独で共曝露した。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  $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。曝露胚から全 RNA を抽出し、cDNA 合成をおこなった後、アロマターゼ (シトクロム P450arom; *CYP19A1b*) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。また、愛媛大学 CMES 環境毒性学研究室で、分子シミュレーションソフト (Molecular Operating Environment) を用いて ER アンタゴニスト (ヒドロキシタモキシフェン; OHT) との共結晶構造 [PDB ID: 3ERT] をテンプレート構造として、各 BPs と ER サブタイプの結合状態を *in silico* でシミュレーションした。

## 研究成果

昨年度までの研究で部分アゴニスト作用を示した 3 つの BPs (BP C2、BPAF、BPZ、BPB) と、完全アゴニスト作用あるいはそれに近いアゴニスト作用を示した 3 つの BPs (BPA、BPE、BPF)、ならびにアゴニスト作用をほとんど示さなかった BPs について、受精後 72 時間のゼブラフィッシュ胚を用いて E2 との共曝露を実施した。その結果、BP C2、BPAF、BPZ、BPB は、E2 により誘導された *CYP19A1b* の発現を濃度依存的に抑制した (Fig. 1)。他方、完全アゴニスト作用を示した BPE と BPF、ならびにアゴニスト作用を示さなかった BPs では、E2 との共処置によって *CYP19A1b* の誘導性に変化は見られなかった。また BPA では、濃度依存性は見られなかったものの、E2 誘導性の *CYP19A1b* 発現は有意に抑制された。



**Fig. 1: Effects of BPs on E2-induced expression of *CYP19A1b* mRNA in zebrafish larvae at 96 hpf.** Significance of differences in the *CYP19A1b* expression levels between E2 alone and E2+BP co-exposure groups was determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test, and are shown by asterisks (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). N=4. The unit  $\mu\text{M}$  for concentrations of BPs used was omitted in vertical axis.

次いで、ER サブタイプの 3D ホモロジーモデルを構築し、上記 8 つの BPs を含む多様な BPs と ER サブタイプの結合状態について *in silico* でシミュレーションをおこなった。その結果、各 BPs は、OHT と類似の結合状態を示した。例として、OHT および BP C2、BPAF と ER $\alpha$  との結合状態を Fig. 2 に示す。ER サブタイプ間の比較では、ER $\alpha$  と ER $\beta$ 2 で ER $\beta$ 1 よりも相互作用エネルギーが低い傾向を示した (Fig. 3)。化合物ごとの特徴としては、BP C2 とすべての ER サブタイプの間で相互作用エネルギーが低く、相対的に安定した構造を取ることが示唆された。一方、BP C2 と同様に E2 誘導性の *CYP19A1b* 発現を顕著に抑制した BPAF は、いずれの ER サブタイプとも相対的に高い相互作用エネルギーを示した。

本研究の結果は、部分アゴニスト作用を示す多様な BPs が *in vivo* で E2 誘導性のエストロゲン作用に対して抑制的に働くことを示している。こうした BPs の抗エストロゲン作用は、少なくとも一部は、*in silico* ドッキングシミュレーションによって予測できると推察された。

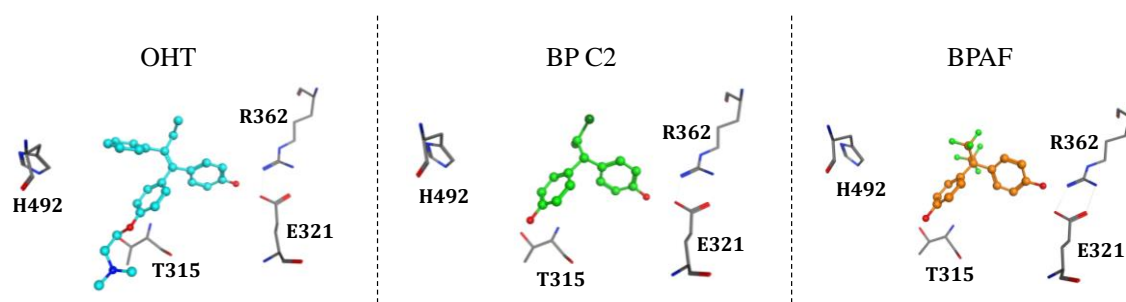


Fig. 2: Binding mode of OHT, BP C2 and BPAF with the zfER $\alpha$ -LBD.

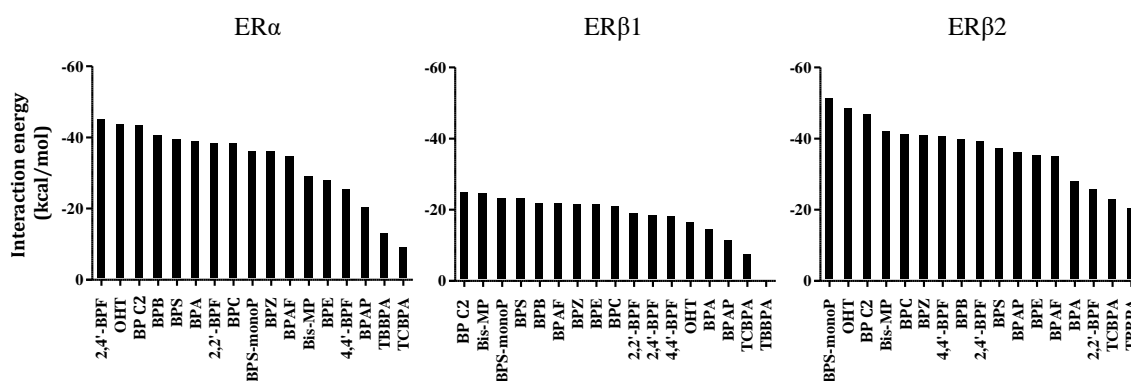


Fig. 3: Interaction energies of OHT and BPs in zfER subtypes calculated by *in silico* docking simulations at an antagonistic mode.

## 成果発表

(論文)

1. Kawai, Y.K., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., **Kubota, A.** (2018): The evolution of UDP-glycosyl/glucuronosyltransferase 1E (UGT1E) genes in bird lineages is linked to feeding habits but UGT2 genes is not. *PLoS One* e0205266.
2. **Kubota, A.**, Kawai, Y.K., Yamasita, N., Lee, J.S., Kondoh, D., Zhang, S., Nishi, Y., Suzuki, K., Kitazawa, T., Teraoka, H. (2019): Transcriptional profiling of cytochrome P450 genes in the liver of adult zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of Toxicological Sciences*, Accepted.

(学会発表等)

### 【招待講演】

1. **久保田 彰** (2018): ゼブラフィッシュをモデルとした化学物質の有害性評価と作用機序に関する研究. 第12回生態影響試験実習セミナー, 国立環境研究所環境リスク・健康研究センター, つくば, 6月.

### 【国際学会】

1. **Kubota, A.**, Wakayama, Y., Lee, J.S., Nakamura, M., Kawai, Y., Yoshinouchi, Y., Iwata, H., Hirano, M., Nakata, H. (2018): Evaluating estrogenic and anti-estrogenic potency of bisphenol A analogues *in vivo* and *in silico* using zebrafish. 38<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Krakow, Poland, August.

### 【国内学会】

1. Jae Seung Lee、若山 裕己、中村 倫子、芳之内 結加、岩田 久人、平野 将司、中田 晴彦、川合 佑典、**久保田 彰** (2018) : ゼブラフィッシュを用いたビスフェノールA代替物質のエストロゲン様作用および抗エストロゲン作用の評価. 第27回環境化学討論会, 那覇市, 5月.
2. **久保田 彰**、Jae Seung Lee、若山 裕己、中村 倫子、川合 佑典、芳之内 結加、岩田 久人、平野 将司、中田 晴彦 (2018) : ゼブラフィッシュを用いたビスフェノールA代替物質の内分泌攪乱作用の評価. 第45回日本毒性学会学術年会, 大阪市, 7月.

## 今後の課題

今後は、今年度ならびに関連する 2016 年度の LaMer 共同研究で得た *in silico*・*in vivo* 統合アプローチによる多様な BPs のエストロゲン様作用・抗エストロゲン作用に関する成果をまとめ、学術論文として英文雑誌に投稿する。また、エストロゲン様作用や抗エストロゲン作用の強かったいくつかの BPs について、胚を用いた発生毒性の評価や高機能シーケンサーによる発現変動遺伝子の網羅的解析とパスウェイ・ネットワーク解析をおこない、エストロゲン受容体シグナル伝達系攪乱を起点とする化学物質の発生毒性とその作用機序を解明したい。