

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：植物成分由来の内分泌かく乱物質の検索

分担研究者 梅原 薫 静岡県立大学 薬学部助手

（以下の研究者との共同研究として行った）

出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授（主任研究者）

根本 清光 静岡県立大学 薬学部助手（分担研究者）

研究要旨：植物界における glucocorticoid (GC) 様物質の存在状況を明らかにするとともに、それらの単離及び構造決定を目的として、GC に対し高感度かつ特異的な作用点を有し、GC の作用発現機構を模したルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。この新たに構築した GC アッセイ系を用い、93 種の生薬・植物メタノールエキスのスクリーニングを行った結果、39 種のエキスが活性を示し、GC 様物質が広く植物界に分布することが認められた。活性を示したエキスの内、イヌマキについて活性成分の分離、構造決定を行った結果、GC 様物質として 8 種のフラボノイドを含む、計 11 種の化合物を得た。イヌマキより得られたフラボノイド、ならびに関連化合物計 28 種の GC 様活性を検討したところ、水酸基の数・結合位置の違い、及び糖の有無が活性に差を与えることが認められた。このアッセイ系は GC 以外にも、プロモーター部位を変える事で異なるホルモンに対する応答性を測定できる特長を持つ事から、広く環境ホルモン探索ツールとしての利用が期待される。

A. 研究目的

内分泌系は神経系及び免疫系と共に生体の恒常性を保つために重要な制御機構であり、乳癌や前立腺癌等、様々な疾患がその異常により引き起こされる。一方、医薬品はもとより、農薬、工業用化学物質等の中には、内分泌ホルモン様の生体内作用を持つものが少なくなく、蓄積性を示すこれらの物質が、環境中にて検出される例が相次いでいる。野生生物の繁殖や形態の異常現象が 1980 年代より論議の的となっているが、これら環境中の内分泌障害性物質（環境ホルモン）による暴露が原因とする指摘もある。

ある種のクローバーを大量に摂取した羊に

生殖異常が起きたように、内分泌ホルモン様作用を有する物質は植物中にも存在することが知られる。その一例として、豆類、クローバー、アルファルファ等に含まれる coumestrol、genistein、daidzein 等の phytoestrogen と称される化合物群の存在はよく知られる。

ステロイドホルモンレセプターが核内レセプタースーパーファミリーを形成すること、植物二次代謝産物が多彩な有機化合物を擁することから、phytoestrogen 同様、高等植物中に他のステロイドホルモン様作用を持つ化合物が存在する可能性も推察された。食品・生薬等として摂取される植物は、その摂取量の多さから人間の暴露源として重要な意味を持

ち、その影響に関心が寄せられているが、その他の植物成分のホルモン様作用に関する報告は乏しいのが現状である。

一方で、副腎皮質ホルモンの一種である GC は糖質代謝に効果を示すことからそのように呼ばれるが、全身ほとんど全ての組織に作用し、糖質代謝だけでなく多くの生理作用に広く関わっている。特にストレス時には GC の分泌は増加し、糖、タンパク質、脂肪、電解質等の代謝系への作用の他に、中枢神経系の機能の調節、抗炎症、抗免疫作用の調節等に働き、生体の生存のために抗ストレスホルモンとして中心的な役割を果たす事が知られる。そのため、GC が欠乏した状態や、副腎が機能しない状態では生命維持が危ぶまれることになる。そこで申請者らは、高等植物中の GC 様物質検索を目的に、高感度な GC 検出系を構築し、ランダムスクリーニング、分離を行うこととした。

B. 研究方法

植物由来 GC 様物質の検索系として、以下のアッセイ法を用いた。

1) M1 分化誘導活性

マウス骨髄性白血病由来 M1 細胞は、GC による分化誘導を受けマクロファージに分化する。各サンプルの分化誘導活性を、GC antagonist 共存下の活性と比較し、GC 活性を検討した。

2) ルシフェラーゼアッセイ

GC は、細胞質内グルココルチコイドレセプター (GR) と複合体を形成した後、標的遺伝子の転写調節を行うが、中でもマウス乳頭腫ウイルスの long terminal repeat (MMTV-LTR) は、この複合体により転写活性化を受けるプロモーター領域を有する。そこで MMTV-LTR を luciferase 遺伝子上流に挿入したプラスミドベクター (MMTV-luciferase) を安定導入したラット線維芽細胞 3Y1 を用い、サンプル添加後の luciferase による発光量

を測定し、GC 活性を評価した。

(倫理面への配慮)

実験に際して研究者が、ホルモン様作用を有すると考えられる高濃度の被験物質に曝されることのないように、マスク、手袋等の着用を心掛けた。

C. 研究結果

GC に対し高感度かつ特異的な作用点を有するアッセイ系の構築を目的に、まず著者は GC の作用発現機構を模したレポーターアッセイ系の作製に着手した。

GC は細胞質内のグルココルチコイド受容体 (GR) と複合体 (GC-GR) を形成した後、ホモ二量体を形成する。この時、GR はそれまで複合体を形成していた hsp 90 と解離して活性型となり、この GC-GR 二量体が標的遺伝子のプロモーター領域に存在するグルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE) に結合し、標的遺伝子の転写が活性化される。

GC 感受性プロモーターを有する遺伝子として知られるマウス乳頭腫ウイルスの long terminal repeat (MMTV-LTR) は、転写開始点より上流 200 塩基対の間に 4 個の GRE を持ち、遺伝子発現調節の実験モデルに繁用されている。そこで、MMTV-LTR をレポーター遺伝子である luciferase 遺伝子上流に挿入したプラスミドベクター (MMTV-luciferase) を作製し、このプラスミドベクターが安定に導入されたラット線維芽細胞 3Y1 の選抜を行い、GC に対する感度、及び特異性を検討した。

GC 処理で M1 細胞が分化誘導された時に獲得する食食能、及び MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU 値) を指標に、両アッセイの感受性を比較した。その結果、ルシフェラーゼアッセイが 10^{-10} M 以上の dex. で活性を検出したのに対し、M1 細胞分化誘導アッセイは 10^{-9} M 以下では活性を検出しなかったことから、ルシフェラーゼアッセイが M1 細胞分化誘導アッセイよりも 10 倍低濃度の GC に応答する事が確認された。

また、それぞれのアッセイの最大効果を比較した結果、ルシフェラーゼアッセイが約 30 倍の T/C を示したのに対し、M1 細胞分化誘導アッセイでは約 10 倍と、ほぼ 3 倍の開きが認められた (Fig. 1)。

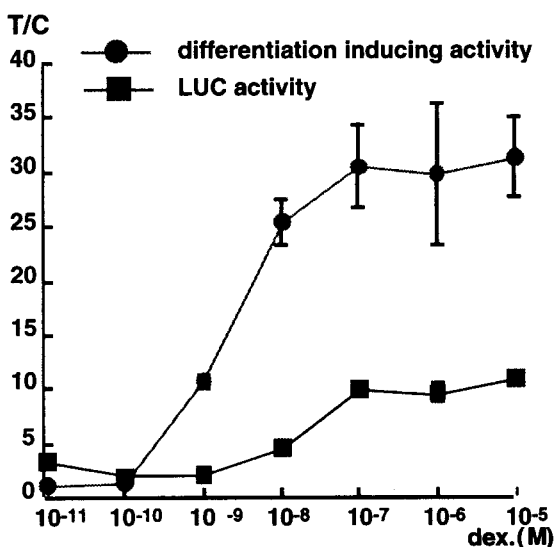


Fig. 1 Dex. に対する M1 細胞分化誘導活性及び MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞のルシフェラーゼ活性

以上の結果から、ルシフェラーゼアッセイが M1 細胞分化誘導アッセイよりもより低濃度の GC に応答し、かつ GC の存在がより明確な差となって現れる、高感度な GC 検出系である事が確認された。

MMTV-LTR は GC の他、プロゲステロン、アンドロゲンによっても転写制御を受けるこ

とが知られている。この事は、今回作製したルシフェラーゼアッセイ系が、プロゲステロン、アンドロゲンにも応答する可能性を示唆する。そこで MMTV-luciferase の GC 特異性を調べるため、構造類似の他のステロイドホルモンを含めた、各種ステロイド化合物をサンプルとし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

アッセイに供したステロイド化合物は 1 μM の dex., dex. acetate (dex. Ac), hydrocortisone (corti.), progesterone (proge.), GC antagonist の RU486, 17 b-estradiol (E2), E2 antagonist の tamoxifen, testosterone propionate (TP), testosterone antagonist の flutamide, pregnenolone, b-sitosterol の 11 種である。

MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞は、GC である dex. (RLU : 2724), dex. Ac (2725), corti. (2326) に対し高い応答性を示す一方、その他のほとんどのホルモンに対してはコントロールレベルの RLU を示したに過ぎず、GC に対する特異性が示唆された (Fig. 2)。

この新たに構築した GC アッセイ系を用い、M1 細胞分化誘導作用を示し GC 様作用を持つ可能性の高い 50 種の試料を中心に 93 種の生薬・植物メタノールエキスのスクリーニングを行った結果、39 種のエキスが活性を示した。

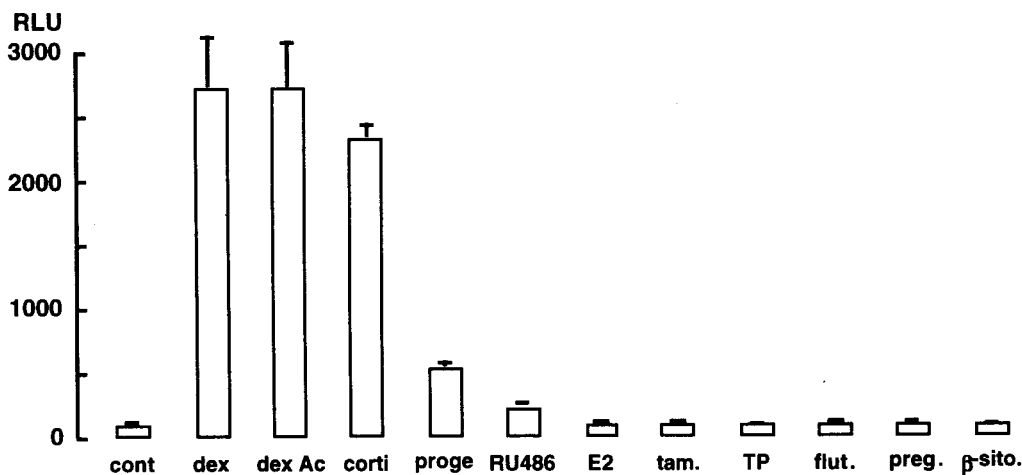


Fig. 2 様々なステロイド化合物のGC様活性

また、M1 細胞分化誘導作用との比較では、50 %以上の M1 細胞の分化を誘導したエキスは全てが GC 様活性を示したのに対し、25 %以上の M1 細胞の分化を誘導したエキスでは 25 種中 15 種 (60 %) が、10 %以上の M1 細胞の分化を誘導したエキスでは 19 種中 8 種 (42 %) が GC 様活性を示すに止まった (Table 1)。更に、分化誘導作用を示さないエキスでは、わずかに 43 種中 10 種 (23 %) が GC 様活性を示したに過ぎなかった。この事は、M1 細胞の分化誘導に GC receptor が強く関与する事を示唆する。

(19), trihydroxychalcone (20), resveratrol (21) の 11 種の分化誘導物質を供し、それぞれ 100 ~ 0.1 μ M を MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞に作用させ活性を測定した。

その結果、フラボノイド (14, 15)、プレグナン配糖体(19)、カルコン (20)、スチルベン (21) は 200 %を越える T/C を示した。中でも 15 の nobiletin は 100 μ M で 410 %の T/C を示し、今回ルシフェラーゼアッセイに供した化合物中で最強の GC 様活性を示した。一方、トリテルペン (12, 13)、リグナン (16, 17)は 130 %前後の T/C を示すに過ぎなかった。

高等植物中の GC 様物質単離を目的に、今回 25 %以上の M1 細胞分化誘導作用を持ち、且つ GC 様作用も併せ持つエキスからイヌマキを選び、分離・構造決定を行った。イヌマキ *Podocarpus macrophyllus* (Thumb.) D. Don (マキ科 Podocarpaceae) は、本州中南部、四国、九州、沖縄の暖地の山林に生え、日本各地及び中国で植栽される常緑高木である。種子と花托を採集して日干しにしたものを羅漢松実と称し民間的に心胃痛に用いられる他、葉と根皮も薬用とされる。

まず、イヌマキの枝葉乾燥重量 1.7 kg を熱時メタノールで還流抽出後、減圧濃縮しエキスとした。得られたエキスを水に懸濁しヘキサンで分配した後、水層はさらに酢酸エチルで分配を行った。MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞を用いた GC 様活性試験の結果、酢酸エチル層に強い活性が認められた。そこで酢酸エチル層について、GC 様活性を指標としながらヘキサン-酢酸エチル系、クロロホルム-メタノール系による順相シリカゲルクロマトグラフィー、水-アセトニトリル系、水-メタノール系による逆相 ODS カラムを用いた HPLC 等による分離を繰り返し、amentoflavone (1)、podocarpusflavone A (2)、isoginkgetin (3)、sciadopitysin (4)、hinokiflavone (5)、2,3-dihydrohinoki-flavone (6) 等のフラボンダイマーをはじめとする 8 種の化合物を GC 様物質

Table 1
生薬・植物メタノールエキスの M1 細胞分化誘導作用及び GC 様活性

食食率	ルシフェラーゼ活性 1)	
	+	-
> 50 %	ゴボウシ、チョウジ、カミツレ、コンズランゴ、マキバブラシノキ、イチイ	
> 25 %	インテンコウ、ビャクジュツ、テンピ、ポンカン、エノキ、アマチャ、ヒマラヤキンシバイ、ヒキオコシ、ハギ、ヤマモモ、オウバク、イヌマキ、ダイオウ、ヤーコン、タンポポ	アオキ、トウガン、キャベツ、イブキ、ビャクゼン、ジョウザンアジサイ、マサキ、サニールタス、スイセン、ゴカヒ

1) +, > 130 % T/C; -, < 130 % T/C.

ゴボウシ、チョウジ、カミツレ、コンズランゴ、マキバブラシノキ、イチイの各エキスは、GC 様作用ならびに分化誘導作用 (50 %以上の食食能) を併せ持つ事が認められた。これらの薬用植物について、著者らは既に M1 細胞分化誘導アッセイを用いて、活性本体の単離及び構造決定を行ってきた。それらの化合物の GC 様作用を、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

アッセイには、oleanolic acid (12)、maslinic acid (13)、ponkanetin (14)、nobiletin (15)、matairesinol (16)、(-)-arctigenin (17)、condurangoglycoside A (18)、condu-rangoside B

として得た (Chart 1)。

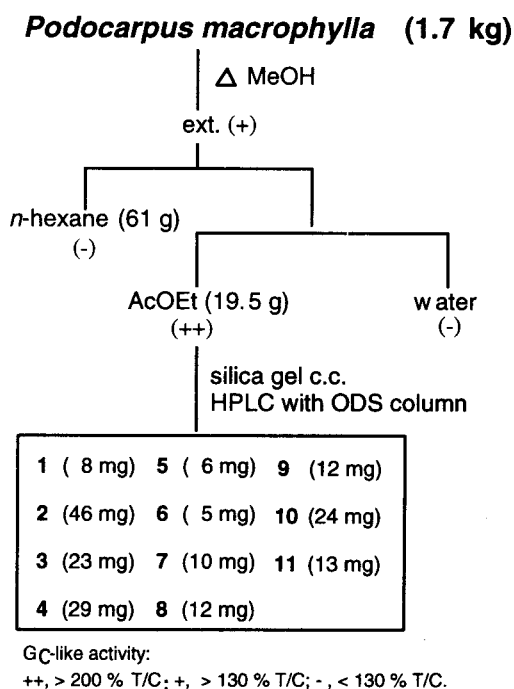


Chart 1

今回イヌマキからはフラボン同士が C-3' と C-8" 間で結合したものと、C-4' と C-6" 間で結合した、2 つのタイプのフラボンダイマーが得られている。

C 3'- C 8" 結合タイプのフラボンダイマー (1~4) では、メトキシル基を有するものに活性が認められ、更にその数によって活性に差が認められた。2 つのメトキシル基を 4', 4" 位に有する 3 は 10 μM の濃度で T/C 243 % を示し、最も強い活性を示したが、メトキシル基を 3 つ有する 4 は、メトキシル基を有する C 3' - C 8" 結合タイプのフラボンダイマーの中で最も弱い活性であった。

一方、C 4'- C 6" 結合タイプのフラボンダイマー (5, 6) では、同じ水酸基の置換パターンを有しながら、フラボン同士が結合した 5 がフラボンとフラバノンの結合した 6 よりも強い活性を示した (Fig. 3)。

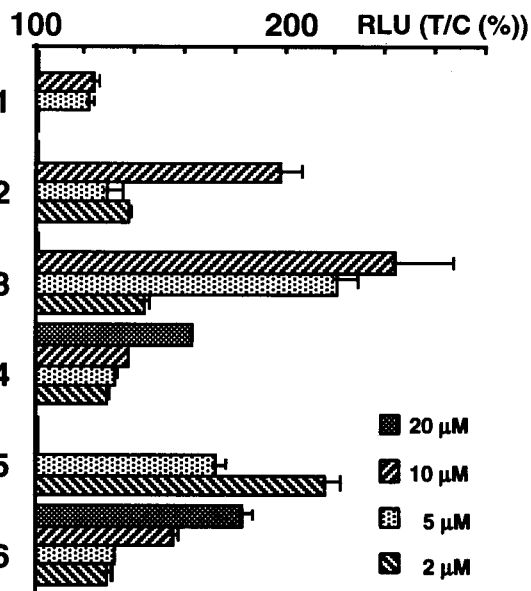


Fig. 3 フラボンダイマーのGC様活性

フラボノイドの GC 様作用が明らかとなったことから、1~6 のフラボンダイマーを構成する apigenin 並びにその類縁化合物についてルシフェラーゼアッセイを行った。則ち、flavone (22)、7-hydroxyflavone (23)、chrysin (24)、apigenin (25)、apigenin-7-glucoside (26)、rhoifolin (27)、naringenin (28)、daidzein (29)、genistein (30)、及びイヌマキより単離した 7, 8 の 11 種についてその GC 様活性を検討した。

A 環の置換パターンに違いを有する化合物 22 - 24 の比較からは、5 位、5, 7 位における水酸基の存在により活性が低下する傾向が認められた。しかし、B 環 (4'位) にも水酸基が置換され、5, 7, 4'位に水酸基をもつ 25 は 22 よりも強い活性を示しており、同様の傾向はイソフラボン 29, 30 の場合にも認められた。

一方、5, 7, 4'位に水酸基を持つフラバノン 28 は強い GC 様活性を示したが、3 位に水酸基を有するフラバノール 7, 8 には僅かな活性を認めるに過ぎなかった。また、25 の配糖体 26, 27 の例から、糖の存在によって活性が低下する事が認められた (Fig.4)。

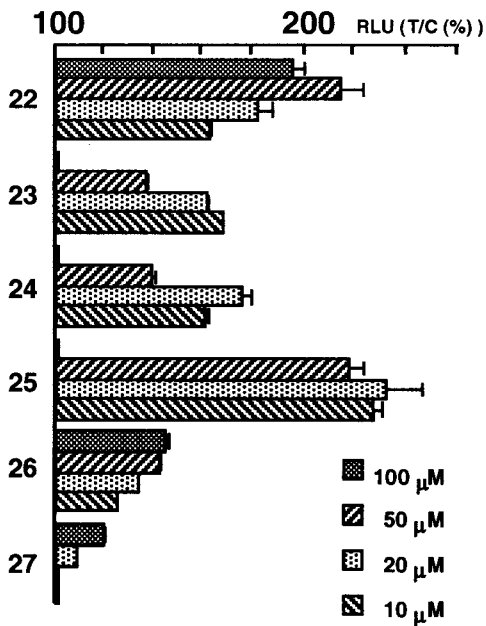


Fig. 4 フラボンダイマーのGC様活性

D. 考察・結論

GCを始め、ステロイドホルモン、ビタミンA、Dのレセプター等が近年クローニングされ、これらのリガンド・レセプター複合体が極めて類似した遺伝子制御機構を持つことが、分子レベルで明らかにされつつある。今回構築したアッセイ系は、*in vitro*でホルモンの遺伝子転写制御機構を分子生物学的手法を用いて再現したもので、 10^{-10} MのGCに応答する高感度性且つ特定された作用点を有する。このアッセイ系はプロモーター部位を変える事により、異なるホルモンに対する応答性を測定できる特徴を持つ事から、広く環境ホルモン探索ツールとしての利用が期待できる。

ステロイドホルモンレセプターは核内レセプタースーパーファミリーを形成することから、phytoestrogen同様、多彩な有機化合物を擁する天然物中に他のステロイドホルモン様作用を持つ化合物が存在する可能性が推察された。事実、オタネニンジン (*Panax ginseng*) に含まれる ginsenoside-Rg1 (G-Rg1) が GR に結合して作用を発現する事が、1998年 Chungらにより報告されている。しかし、G-Rg1以外に植物成分にGC様作用を見出し

た例はなく、植物界におけるGC様物質の存在状況についての報告もなされていない。今回新たに構築したGCアッセイ系を用いた生薬・植物メタノールエキスのスクリーニングの結果、93種の生薬、植物メタノールエキスの内、39種が活性を示し、植物界にGC様物質が広く存在する事が示された。

イヌマキから得られた8種のフラボノイドとその関連化合物、計19種のルシフェラーゼアッセイにおけるGC様作用を測定し、その構造活性相関を検討した。flavone (22)、7-hydroxyflavone (23)、chrysin (24)はそれぞれ水酸基を0個、1個(7位)、2個(5, 7位)有するが、保有する水酸基の数が増加するにつれ活性が低下する傾向が認められた。これは、水酸基数の増加によって分子の極性が増大し、細胞膜に対する親和性、細胞質に存在するGC receptorとの結合能の低下によってもたらされたと考えられる。この事は、naringenin (28)とaromadendrin (7)、taxifolin (8)の場合にも当てはまる。更に、C3'-C8"結合タイプのフラボンダイマー(1~4)において、メトキシル基を有するpodocarpusflavone A (2)、isoginkgetin (3)、sciadopitysin (4)には活性が認められるのに対し、置換基が全て水酸基のamentoflavone (1)には活性が認められなかった事も、水酸基による極性増大の結果と考えられる。しかし、3個の水酸基を5, 7, 4'位に有するapigenin (25)は、水酸基を持たないflavone (22)よりも強い活性を示した。同様の傾向が、水酸基を2個(7, 4'位)有するdaidzein (29)と3個(5, 7, 4'位)有するgenistein (30)のイソフラボン同士を比較した場合にも認められた。以上の事から、GC様活性の発現には保有する水酸基数のみならず、その結合位置も重要な要因であることが示唆された。

また、apigenin (25)とその配糖体apigenin-7-glucoside (26)、rhoifolin (27)の比較から、糖の存在によって活性が大幅に低下する事が認められた。これは、水酸基数の増加の場合と同様に、糖の存在により分子の極性が増大し

た結果と考えられる。置換基が全てメトキシル基である nobiletin (15) が今回ルシフェラーゼアッセイに供した化合物中最強の活性を示したのも、その低極性故と考えられる。

Phytoestrogen の daidzein (29) 及び genistein (30) が、今回の GC 様物質検出アッセイにおいて共に強い GC 活性を示した事は、非常に興味深い。Estrogen receptor と GC receptor のリガンド結合部は、アミノ酸配列において 30 %の相同性を有する事が既に明かとされているが、この結果は phytoestrogen が estrogen receptor のみならず、GC receptor にも結合し、GC 様の作用を発現している可能性を示唆するものと考えられる。

今回構築したアッセイ系で用いたラット細胞の GR は、ヒト GR とアミノ酸配列において 90 %の相同性を有しており、このアッセイ系で検出された GC 様物質がヒトの生体内において作用を発現する可能性も高いものと考えられる。従って、この GC アッセイ系を用いて多彩な有機化合物を擁する植物二次代謝産物中より新たに GC 様物質を検索することにより、従来の GC 剤よりも優れた抗炎症・

免疫抑制作用を持ち、副作用の弱い薬物、あるいは新規制癌剤の開発に役立つことが期待される。また近年、様々な疾患の異常が、遺伝子転写レベルで起こる事が解明されつつあり、特定の遺伝子転写制御能を持つ物質の有効性は増すものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 渥美 宏, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた生薬中グルココルチコイド様成分の検索. 日本生薬学会第 46 回年会(大阪), 要旨集, p.168, 1999 年 9 月 18 日.
2. 梅原 薫, 渥美 宏, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: 植物起源のグルココルチコイド様物質の検索 (2). 日本薬学会第 120 年会(岐阜), 要旨集 2, p.57, 2000 年 3 月 29 日.

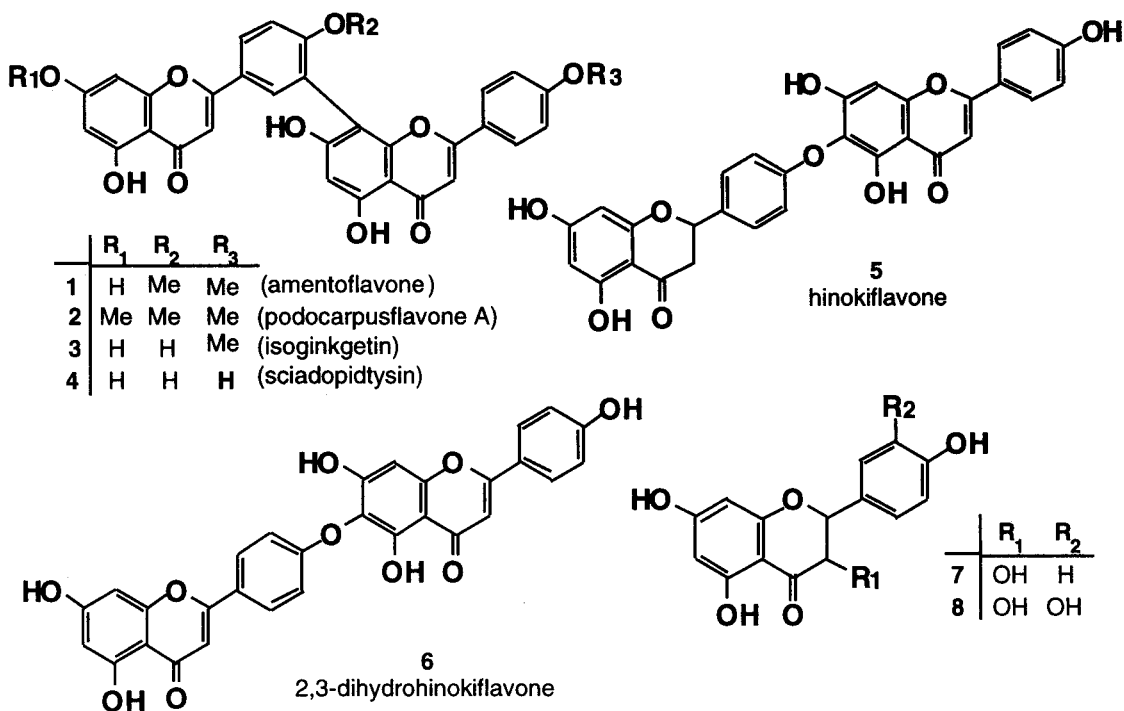


Chart 2

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし