

生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明(第二次) (平成12年度～平成14年度)

世話人 奥 田 晴 宏
合 田 幸 広

本研究は平成9年度～平成11年度特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明(第一次)」¹⁾の研究成果を踏まえて実施されたものである。本第二次特別研究は、第一次特別研究と同様、本研究 所・生薬部、有機化学部、食品部・大阪支所食品試験部、衛生微生物部、環境衛生化学部(大阪大学大学院薬学系研究科との共同研究)の研究員より構成される学際的研究であり、以下に記すように背景の基に化学物質と生体との作用を立体構造に立脚して解明することを目的として実施された。

化学物質が体内に取り込まれ生体に影響を及ぼす際には、医薬品や栄養物質などの有効作用であれ、劇毒物や環境汚染物質などの有害作用であれ、これらの化合物は生体構成タンパク等の高分子化合物との結合過程を経る。一方、化学物質の生体影響に関しては、特にタンパク質の詳細情報が十分でなかったために、化学物質とタンパク質の相互作用を分子レベルで解析を行うことには大きな困難があった。

しかし、近年の急速な科学技術の進歩は研究内容を大きく変化させた。即ち、生体構成蛋白や受容体の精製技術、物理測定機器の精密化、高速化の発展に呼応して、種々の生体反応系が解明されはじめたこと、最近コンピューターが高速化され高磁場核磁気共鳴装置や分子力場計算により分子の複雑な3次元構造の予測や解析が可能になりつつあること、ポストゲノム時代の到来により、遺伝子解析による生体タンパクの情報が集積されつつあること、などである。

このような状況の変化を踏まえ、化学物質とタンパク質との相互作用を三次的に解析することを目的として多角的に本特別研究は遂行された。

第一次特別研究においては、以下の研究を実施した。即ち、強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の3次元解析に関する研究として、代謝産物の構造と活性に多様性を有する *Trichoderma* 属の代謝産物の3次元構造解析及び HIV プロテアーゼ活性を有するサイトカラシン類のタンパクモデリングによる活性作用機構の解明、緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析に関する研究として、ポリフェノールのラジカル反応の分子軌道計算及び反応生成物分析による抗酸化作用機構の解明並びに天然に存在するポリフェノールの脂質代謝に及ぼす影響及びポリフェノール代謝経路の解明、生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析に関する研究として、各種塩素化エチレン化合物を用いたこれら化合物群によるラット肝シトクローム P450 の変動と構造活性相関に関する研究並びに遺伝子発現変化解析による発癌プロモータの生化学作用と発癌プロモーション活性との相関に関する研究が実施された。

第二次特別研究は下記 ～ の研究を実施した。

1. 強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の3次元解析

高分解能 NMR を基盤とする天然化合物と生体タンパクの3次元構造解析に関する研究

化学計算を用いた生理活性物質の構造と反応性に関する研究

2. 緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析

カテキン類の3次元構造と抗アレルギー作用の解明
フラボン類の構造と抗酸化活性に関する研究

3. 生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析

環境汚染物質と細胞内受容体との結合親和性と構造相関との研究

化学物質の機能と細胞生物学的活性の間に介在する事象する研究

本第二次特別研究の対象は、化合物としては熱帯産薬用植物に含有される生理(薬理)活性天然物ならびに核受容体に作用する合成ビタミン類などの医薬品候補化合物、食品中に含まれる各種有用な効果が期待されているポリフェノール類、反対に安全性の観点からの研究が必要な発癌プロモーターあるいは内分泌系に影響が想定される各種塩素化化合物等多岐にわたっている。本研究により得られた成果は生命活動の動的解析の基礎を与え、医薬品をはじめとする各種化学物質の有効性と安全性を評価する重要な知見を得ることに資することが期待される。

本第二次特別研究の対象は、化合物としては熱帯産薬用植物に含有される生理(薬理)活性天然物ならびに核受容体に作用する合成ビタミン類などの医薬品候補化合物、食品中に含まれる各種有用な効果が期待されているポリフェノール類、反対に安全性の観点からの研究が必要な発癌プロモーターあるいは内分泌系に影響が想定される各種塩素化化合物等多岐にわたっている。本研究により得られた成果は生命活動の動的解析の基礎を与え、医薬品をはじめとする各種化学物質の有効性と安全性を評価する重要な知見を得ることに資することが期待される。

本第二次特別研究の対象は、化合物としては熱帯産薬用植物に含有される生理(薬理)活性天然物ならびに核受容体に作用する合成ビタミン類などの医薬品候補化合物、食品中に含まれる各種有用な効果が期待されているポリフェノール類、反対に安全性の観点からの研究が必要な発癌プロモーターあるいは内分泌系に影響が想定される各種塩素化化合物等多岐にわたっている。本研究により得られた成果は生命活動の動的解析の基礎を与え、医薬品をはじめとする各種化学物質の有効性と安全性を評価する重要な知見を得ることに資することが期待される。

¹⁾ 国立医薬品食品衛生研究所報告 118, 178-196 (2000)

1. 強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の三次元解析

(1) 高分解能NMR(核磁気共鳴装置)を基盤とする天然有機化合物の三次元構造解析

生薬部 代田 修, 合田幸広
筑波薬用植物栽培試験場 関田節子

[目的]

植物や微生物, 海洋生物などが生産する天然有機化合物の構造は多種多様に富み, しばしば医薬品開発における重要なモチーフとなる. 特にその立体構造は, 単に合成的手法で任意に作り出す化合物(コンビナトリアル・ケミストリー)と比べても, 天然物が有する奇抜な構造多様性の方が勝っている. さて, その様な天然有機化合物の立体構造を決定する手法には, 主に, NMR(核磁気共鳴)を用いるものと, CD(円二色性)を用いる手法がある. 前者は, 絶対構造既知のキラル補助剤を対象となる化合物に導入してジアステレオマーとすることで, ジアステレオマー間のNMR化学シフトの差を用いて絶対構造を決定する方法が主流であり, Mosherらにより開発された α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル)フェニル酢酸(MTPA)法が度々用いられる^{2,3)}. しかしこのキラル補助剤の適用は, 二級水酸基または二級アミノ基に限られる. 近年, 楠見らにより二級カルボン酸に導入するキラル補助剤である, フェニルグリシンメチルエステル(PGME)が報告されている⁴⁾.

我々は, 南米大陸をはじめ中国や東南アジアなどの国々から, 現地で薬として用いられている生薬・薬用植物を収集し, それらに含まれる多種多様な天然有機化合物の単離・構造決定に関する研究を行っている. その中で, フィリピンで利尿, 尿石症の治療薬, 関節炎薬および鎮咳薬として用いられる生薬である“Sambong”(*Blumea balsamifera*)から6種の新規化合物を単離した. 今回, その絶対立体構造を含めた構造解析において, 前述のNMRキラル補助剤, MTPA及びPGMEを用いて解析を行った. 特にPGMEについては, 今回初めて α -エポキシカルボン酸への適用を試みた.

[方法]

“Sambong”(*Blumea balsamifera*)の葉をメタノールにて抽出し, 得られたメタノールエキスを定法によりシリカゲル・オープンカラム, シリカゲル中圧カラムおよび逆相系HPLCにて分離・精製を行い, 6種の新規化合物(~)を単離した.(Fig.1)これらの相対配置を含めた構造は, 各種二次元NMRスペクトルを解析することにより決定した. 絶対立体配置の決定は, 化合物

を水酸化リチウムにて母核とカルボン酸部分とに加水分解し, それぞれキラル補助剤であるMTPA及びPGMEを導入することにより行った. 又, カルボン酸部分の絶対配置決定においては, アンゲリカ酸より導いたジアステレオマー混合物を標品として用い, そのPGME誘導体と比較することで決定した.

[結果及び考察]

各種二次元NMRスペクトルの解析により, 化合物 ~ はセスキテルペンである1,9,10-trihydroxyguaian-4-en-6-one骨格の9位水酸基にカルボン酸がエステル結合した構造であることが判明した. また, 化合物 は9-hydroxyguaian-4-en-6,10-dioneと決定された. 化合物 ~ の母核は相対配置を含め同一で, 化合物 , 及び は同一の平面構造を有しており, 化合物 及び と の違いは9位の立体が異なること, 化合物 と の違いはエステル結合している α -エポキシカルボン酸の立体が異なるものと推定された. そこで, 化合物 の絶対立体構造を決定することで, 他の化合物の絶対構造もしくは母核の絶対立体配置が決定できるものと考えた.

化合物 の α -エポキシカルボン酸部分の絶対構造決定を行うため, アンゲリカ酸より導いた α -エポキシアンゲリカ酸のジアステレオマー混合物を(R)-PGME誘導体とした. HPLCにより両ジアステレオマーを分離し, NOESYスペクトルを含む各種NMRスペクトルを解析することで, HPLCにおいて最初に溶出されるジアステレオマーを2R, 3R体, 後に溶出されるジアステレオマーを2S, 3S体と推定した(Fig.2). 次に, 化合物 を水

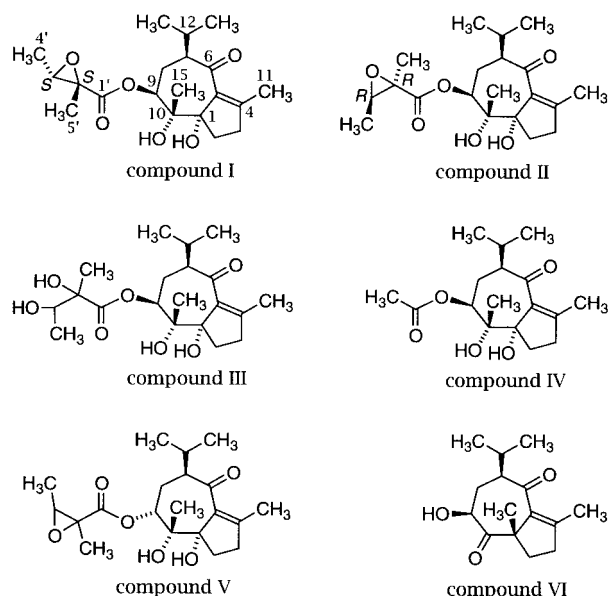


Fig.1 Structures of novel compounds isolated from Philippine medicinal herb "Sambong" (*Blumea balsamifera*)

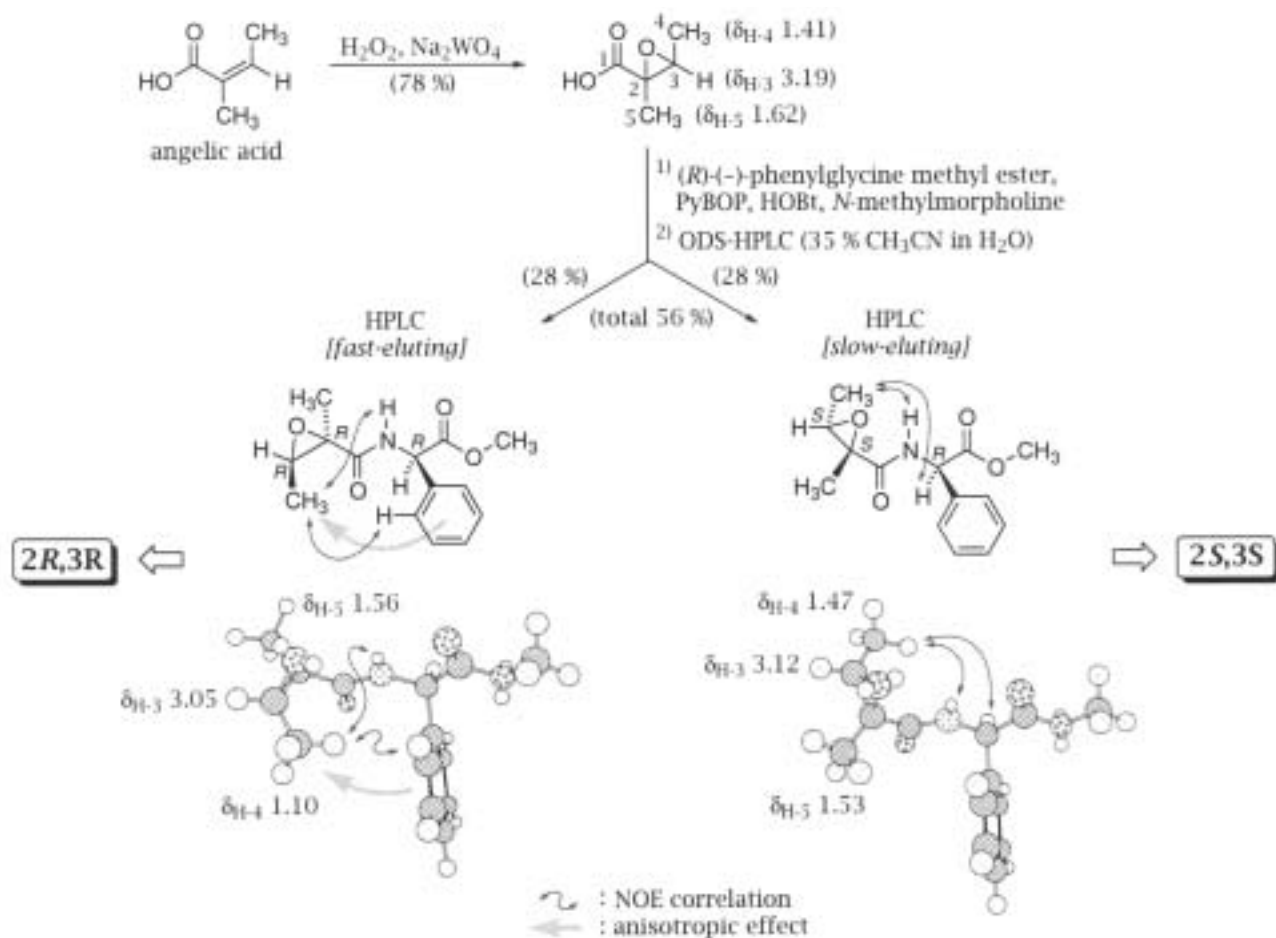


Fig.2 Stereochemistry of epoxyangelic acid

酸化リチウムにて加水分解し、セスキテルペン骨格とエポキシアンゲリカ酸とを得た。母核は(R)・及び(S)・MTPA誘導体とし、改良Mosher法³⁾によりその絶対配置を1S, 7S, 9S, 10Rと決定した。また、カルボン酸部分は(R)・PGME誘導体とし、先の両ジアステレオマー(R)・PGME誘導体とそのHPLC保持時間を比較した結果、後に溶出されたため2'S, 3'S体と決定した (Fig.3)

またこのことにより、化合物 は化合物 とは逆の立体構造である2'R, 3'R体のエポキシアンゲリカ酸がエステル結合した構造と決定した。化合物 はその量が少なかったためエポキシアンゲリカ酸の絶対配置決定には至らなかったが、全ての化合物の母核部分については化合物 の絶対構造に類した絶対配置を取るものと推定した。

今回、 α ・エポキシカルボン酸であるエポキシアンゲリカ酸の絶対配置決定にキラル補助剤であるPGMEをはじめて適用し、その有用性を明らかにした。天然には

α ・エポキシカルボン酸類をその分子中に有する生理活性化合物が多く発見されているが、現在までにはNMRを用いてその絶対配置を決定することは為されていなかった。今後、今回用いたPGMEをキラル補助剤として用いる手法により、容易に決定されていくものと思われる。

【発表及び参考文献】

- 1) Shirota, O., Oribello, J. M., Sekita, S., Satake, M.: *in preparation*.
- 2) Dale, J. A., Mosher, H. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 512-519 (1973)
- 3) Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991)
- 4) Nagai, Y., Kusumi, T.: *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1853-1856 (1995)

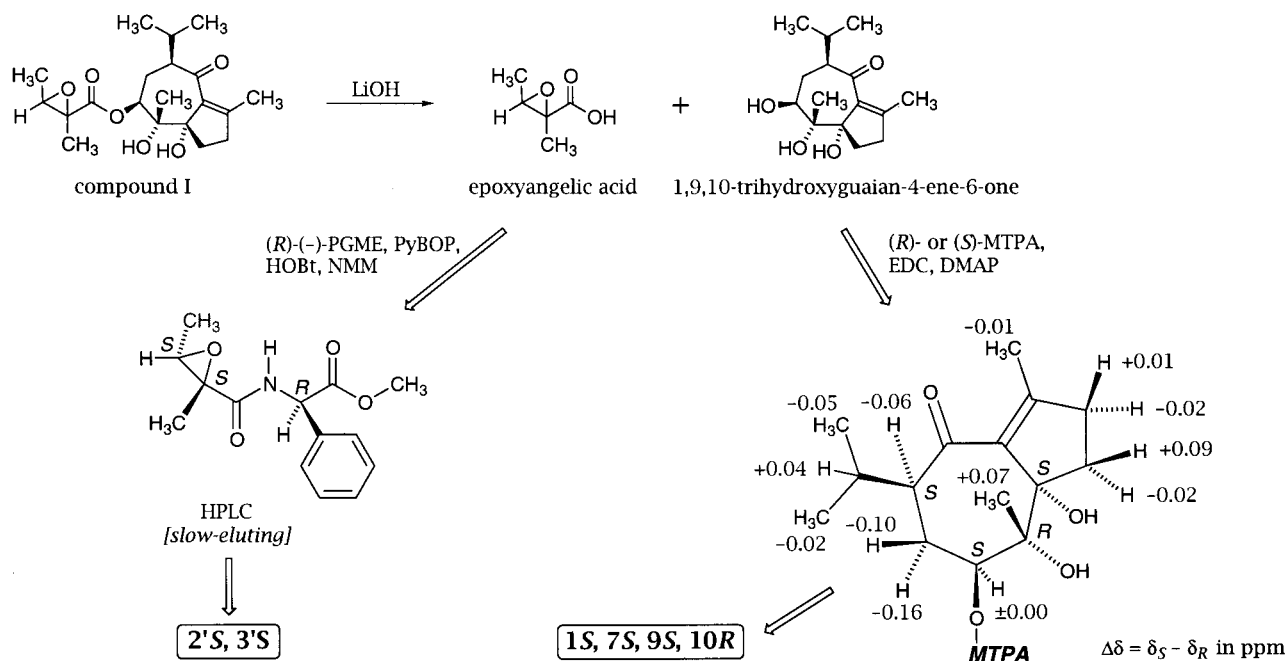


Fig.3 Determination of the absolute stereochemistry of compound I

(2) A環修飾ビタミンDアナログのVDR結合モデル

有機化学部 栗原正明

[目的]

活性型ビタミンD₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) 1は核内受容体ビタミンDレセプター (VDR) と結合し、標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御している。現在、ビタミンD誘導体は、抗腫瘍薬や骨粗しょう症薬等として研究、開発が行われている。また、最近VDRのX線構造解析が行われ、VDRの3次元構造および、VDRと活性型ビタミンD₃との結合様式が明らかとなった。著者らはこれまでにビタミンDレセプターの3次元構造に基づいたビタミンD誘導体の設計と合成を行ってきた。その中で、活性型ビタミンD₃のA環部分を修飾した2 α 置換体を合成し、天然体である活性型ビタミンD₃よりVDRとの結合能や細胞分化活性が増強したのを見いだした。(Fig.1) ここでは、A環修飾ビタミンD誘導体と受容体の相互作用の解析を目的とし、VDRの3次元構造を基に、ビタミンD誘導体との結合モデルの構築を行った。

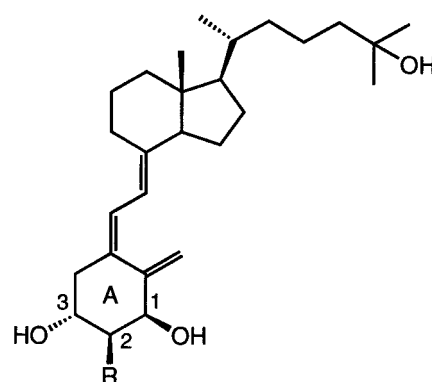
[方法]

活性型ビタミンD₃が結合したビタミンDレセプター (VDR) のX線座標 (Rochel, N. et al., Mol. Cell, 2000, 5, 173) を基に、VDRのLBDのリガンド周りの残基 (32 ~ 71個) を切り出し、受容体のモデルとした。残基には constrain (100 ~ 100000 kJ/A) をかけ、molecular dynamics

(MD) を行い、つづいて molecular mechanics (MM) によるエネルギー最小化を行い、エネルギーの最も小さいものを、それぞれのリガンドとVDRの最安定結合モデルとした。力場はAMBER*を用いた。プログラムはMacroModel (ver. 6.5及びver. 8.0) を用いた。

[結果及び考察]

活性型ビタミンD₃の3つの水酸基はそれぞれVDRの2つの残基と水素結合を形成している。すなわち、1位の



- 1: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (100) R=H
 2 α -substituted analogues
 2: R= Me (400)
 3: R=CH₂CH₂CH₂OH (300)
 4: R=OCH₂CH₂CH₂OH (180)
 (VDR binding affinity)

Fig. 1. Structure of 1 α ,25(OH)₂D₃ and 2 α -substituted analogues

水酸基は, Ser・237とArg・274と水素結合を形成している。3位の水酸基はTyr・236とSer・278と, 25位の水酸基はHis・305とHis・397と, それぞれ水素結合を形成している。A環部のコンフォメーションは α -formと β -formがあり, 活性型ビタミンD₃分子単独では両コンフォメーション間ではエネルギーの差はほとんどない。(Fig.2) X線解析によりこの天然形のコンフォメーシ

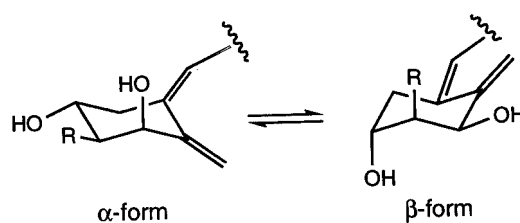


Fig.2 Conformers of A-ring

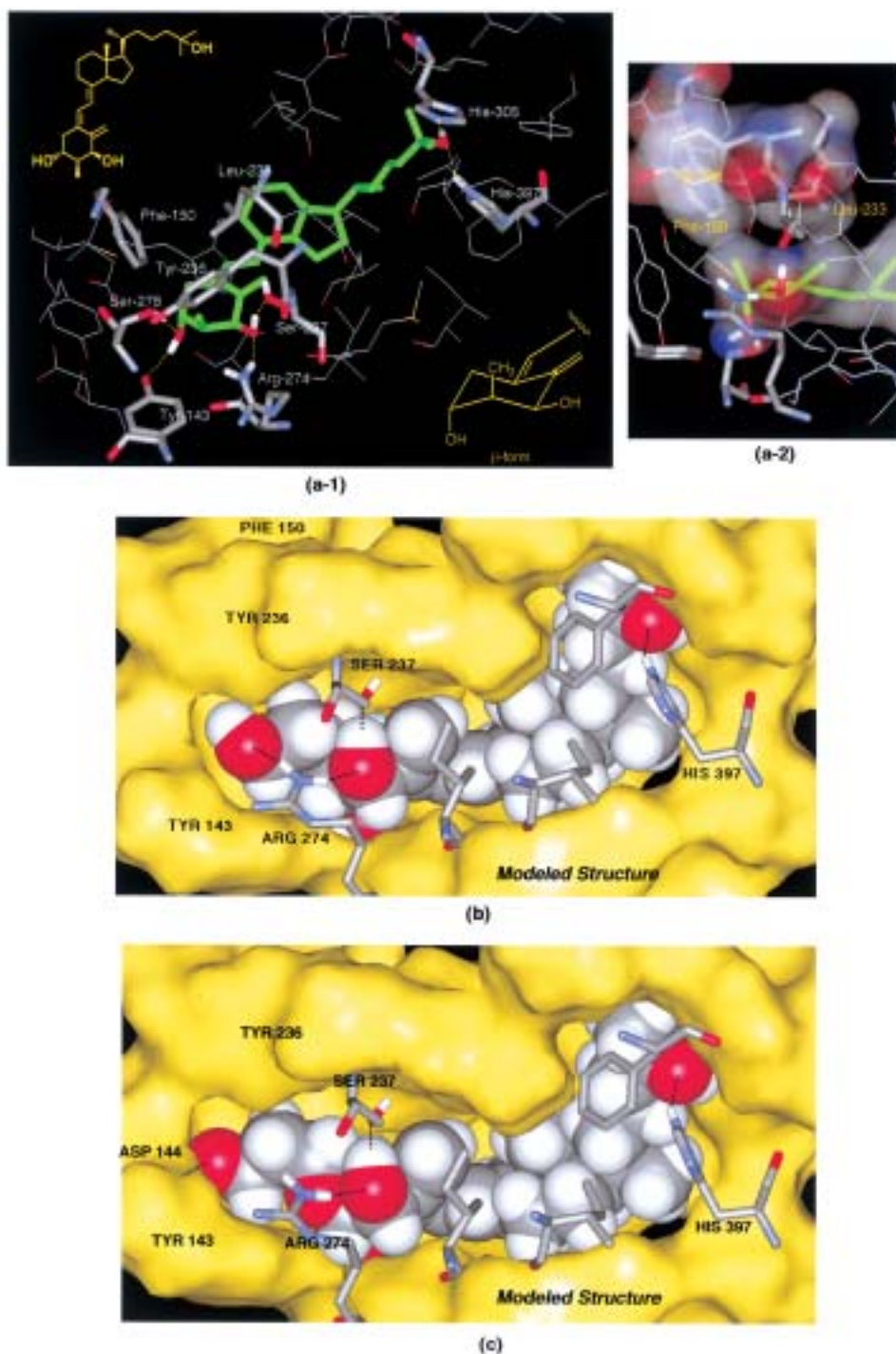


Fig.3 (a-1) Modeled Structure of 2 bound to VDR. (a-2) Side view of a-1. (b) Modeled Structure of 3 bound to VDR
(c) Modeled structure of 4 bound to VDR

ンは、 β -formであることが明らかとなった。モデリングにより、 2α アナログのコンフォメーションも β -formであった。(2α アナログでは α -formの方が安定であるに関わらず) VDRのA環結合部位には比較的大きな空間がある。VDR結合部位のA環2位付近は疎水的環境にある(Phe・150, Leu・233, Tyr・236)。 2α メチル体1の結合能の上昇は、この領域とメチル基の疎水相互作用が大きな要因と考えられる。この領域にはメチル基の大きさが至適であり、エチル以上では立体反発が大きくなり結合能の低下を招く。しかし、さらに大きな置換基を持つ、2, 3の結合能が上昇するのは、水素結合の寄与が大きいと考えられる。すなわち、2のヒドロキシプロピル基、3のヒドロキシプロポキシ基の末端の水酸基は、ヒドロキシプロピル基ではArg・274と、ヒドロキシプロポキシ基ではAsp・144とそれぞれ水素結合を形成している。(Fig.3)の炭素のみでは3つ、炭素と酸素では炭素3酸素1が至適であることは、モデリングと良い一致を見た。

本研究は、帝京大学薬学部の高山浩明教授、橘高敦史助教授、藤島利江講師との共同研究である。

発表論文

- 1) Kittaka, A.; Suhara, Y.; Takayanagi, H.; Fujishima, T.; Kurihara, M.; Takayama, H. *Org. Lett.*, **2**, 2619-262 (2000)
- 2) Konno, K.; Fujishima, T.; Maki, S.; Liu, Z.; Miura, D.; Chokki, M.; Ishizuka, S.; Yamaguchi, K.; Kan, Y.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Smith, C.; DeLuca, H. F.; Takayama, H. *J. Med. Chem.*, **43**, 4247-4265 (2000)
- 3) Fujishima, T.; Konno, K.; Nakagawa, K.; Tanaka, M.; Okano, T.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Takayama, H. *Chem. Biol.*, **8**, 1011-1024 (2001)
- 4) Suhara, S.; Nihei, K.; Kurihara, M.; Kittaka, A.; Fujishima, T.; Konno, K.; Miyata, N.; Takayama, H. *J. Org. Chem.*, **66**, 8760-8771 (2001)
- 5) Suhara, Y.; Kittaka, A.; Ono, K.; Kurihara, M.; Fujishima, T.; Yoshida, A.; Takayama, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3533-3536 (2002)
- 6) Kittaka, A.; Kurihara, M.; Peleg, S.; Suhara, Y.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 57-358 (2003)

関連する発表論文

- 1) Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Toyoda, M. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 485-488 (2000)
- 2) Kobayashi, S.; Kobayashi, H.; Yamaguchi, T.; Nishida, M.; Yamaguchi, K.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Tanaka, A. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 920-934 (2000)
- 3) Nishikawa, A.; Furukawa, F.; Kasahara, K.; Ikezaki, S.;

- Itoh, T.; Suzuki, T.; Uchida, K.; Kurihara, M.; Hayashi, M.; Miyata, N.; Hirose, M. *Cancer Lett.*, **148**, 81-86 (2000)
- 4) Fukuhara, K.; Kurihara, M.; Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8662-8666 (2001)
 - 5) Tanaka, M.; Oba, M.; Imawaka, N.; Tanaka, Y.; Kurihara, M.; Suemune, H. *Helv. Chim. Acta.*, **84**, 32-46 (2001)
 - 6) Kurihara, M.; Hayashi, T.; Miyata, N. *Chem. Lett.*, 1324-1325 (2001)
 - 7) Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K. *Methods in Enzymology*, **335**, 203-217 (2001)
 - 8) Kurihara, M.; Kondo, K.; Toyoda, M.; Miyata, N. *JCPE Journal*, **13**, 255-262 (2001)
 - 9) Kittaka, A.; Takayama, H.; Kurihara, M.; Horii, C.; Tanaka, H.; Miyasaka, T.; Inoue, J. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **20**, 669-672 (2001).
 - 10) Oba, M.; Tanaka, M.; Kurihara, M.; Suemune, H. *Helv. Chim. Acta.*, **85**, 3197-3218 (2002).
 - 11) Satoh, T.; Itoga, A.; Isogai, Y.; Kurihara, M.; Yamada, S.; Natori, M.; Suzuki, N.; Suruga, K.; Kawachi, R.; Arahira, M.; Nishio, T.; Fukazawa, C.; Oku, T. *FEBS letters*, **531**, 543-547 (2002).
 - 12) Kurihara, M.; Tanaka, M.; Oba, M.; Suemune, S.; Miyata, N. *Peptide Science 2001*, 287-288 (2002).
 - 13) Kurihara, M.; Hakamata, W. *J. Org. Chem.*, **68**, 3413-3415 (2003)
 - 14) Kurihara, M.; Tanaka, M.; Oba, M.; H. Suemune, H. *Peptides 2002*, 786-787 (2003)
 - 15) Kurihara, M.; Sato, Y.; Tanaka, M.; Oba, M.; Demizu, Y.; Suemune, H. Okuda H. *Peptide Science 2002*, 323-324 (2003)

2. 緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析

(1) ポリフェノールの抗酸化作用機構と抗アレルギー作用

食品部 近藤一成, 米谷民雄

[目的]

本特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明」(第1次)において、カテキンおよびその重合体であるプロシアニジンの抗酸化作用(ラジカル消去作用)とそのメカニズムについて検討を行い、カテキンは他のフラボノイドとは異なるメカニズムで抗酸化作用を発揮すること、さらにその重合体であるプロシアニジンは極めて強い抗酸化作用を有することを明らかにした。その後ポリフェノール系化合物は、抗アレルギー作用を示すものが多いことから更に検討を行

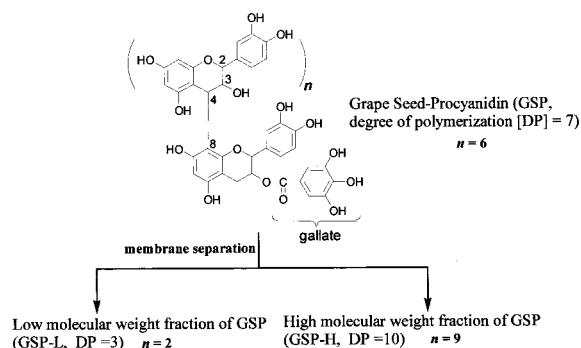
い、プロシアニジンがIgE依存性I型アレルギーの即時相反応の原因となるメディエーター遊離を効果的に抑制する事を見いだした。

フラボノイドの抗アレルギー作用に関する報告はこれまでにいくつか報告されており、肥満細胞株(RBL・2H3, PT・18), mouse bone marrow derived mast cell(BMMC)を用いたアッセイ等の結果から、比較的脂溶性の高いフラボノイド Quercetin, Luteolin, Fisetinは低濃度(数 μ M)で histamine や IL・4, TGF・ β などメディエーター遊離を抑制するとされている。しかしながら、これらの化合物は kinase inhibitor として働くことや bolybasic な分泌促進剤 compound 48/80, substance P, somatostatin などによる histamine 遊離を促進する作用も有しているため、抗アレルギー作用物質として、あるいはそのリード化合物として展開するのは困難である。また、Quercetinは抗酸化物質であると同時にこの化合物が置かれた環境によっては逆に酸化促進剤として作用し、酸化的損傷の引き金にもなることが知られている。

そこで、これまでのポリフェノールの抗酸化作用およびその作用機構の検討結果から、強い抗酸化作用を示しかつ酸化促進剤としては働かない化合物としてプロシアニジンを見出し、これについて抗アレルギー作用を検討する目的でRBL・2H3細胞を用い、メディエーター遊離抑制効果、細胞内 Ca^{2+} 、種々のkinase(Syk, PLC γ , MAPKs, FAK, Pyk2など)に与える影響について検討した。

[方法]

1. 検討したサンプルは、ブドウ種子(*Vitis vinifera* L.)により抽出したプロシアニジン画分(GSP)を用いた(Fig.1)。また、このGSPから、平均分子量3000以下(GSP・L)と3000以上(GSP・H)の分画に分けた。さらに、プロシアニジン中のフェノール性水酸基をアセチル化したアセチル体も調整した。



*GSP was extracted from *Vitis vinifera* L.

**The degree of polymerization [DP] for GSPs was determined by ^{13}C -NMR experiments.

Fig.1 Structure of procyanidins

2. メディエーター遊離抑制効果については、24穴プレートに anti-dinitrophenyl (DNP)・IgE を含む RBL・2H3 細胞を 2×10^5 cell/well で播き、一晩インキュベートしたものをを用いた。サンプルで 10 分インキュベート後、DNP₃₀・HSA(Ag) または thapsigargin(Tg) で刺激し、40 分後細胞内外の β ・hexosaminidase 活性を測定し、脱顆粒を調べた。併せて LTC₄, IL・4 も測定した(本報告では結果を省略)。

3. 細胞内 Ca^{2+} は、RBL・2H3 cell suspension について指示薬として fluo-3 を用いて測定した。測定後, ionomycin, Triton を用いて calibration を行った。必要に応じて calibration buffer も用いた。

4. Kinase 活性化に与える影響は、目的とする一次抗体及び protein・A/G sepharose/agarose を用いて免疫沈降後, SDS・PAGE, Immunoblotting を行い AP 標識二次抗体により発色させた。

5. 細胞内活性酸素測定には、種々の活性酸素を検出するために DCFH, nitric oxide(NO) 測定用に DAF・2 を用いて, DNP30・HSA で刺激前後の変化について検討した。

[結果および考察]

GSP・L および GSP・H の β ・hexosaminidase 活性を指標に脱顆粒に与える影響を検討したところ、抗原刺激(Ag)ではプロシアニジン低分子分画である GSP・L には全く活性が認められず、高分子分画 GSP・H に脱顆粒抑制効果が認められた(Fig.2)。この結果は、 Ca^{2+} ・ATPase inhibitor である thapsigargin で刺激しても同様の結果が得られたことから、GSP・H は高親和性 IgE 受容体(Fc ϵ RI)を介したシグナルの、PLC γ より下流に作

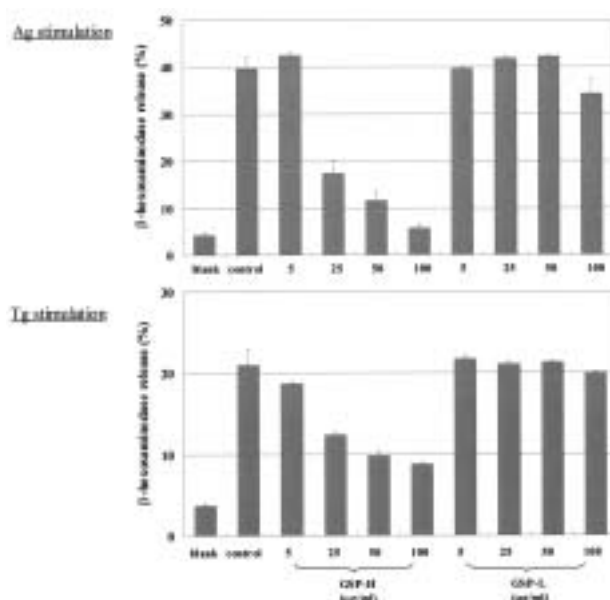


Fig.2 Inhibition of antigen-induced (Ag) and thapsigargin-induced (Tg) secretion from RBL-2H3 cells by procyanidins

用することが示唆された。また、脱顆粒抑制効果はGSP・HのOH基をアセチル化した場合には消失することから、このOH基が必修であると考えられた。さらに、GSP・Hはin vivoにおいても効果が認められた(data not shown)。

次に、脱顆粒抑制効果のあったGSP・Hについて細胞内 Ca^{2+} に与える影響を検討した。その結果、GSP・Hは25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (8.7 μM) までは全く影響は与えなかったが、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (17.4 μM) 以上では抗原刺激(Ag)に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し(Fig.3A), これは主に細胞外からの膜電位非依存性store-operated calcium (SOC) channelを介した Ca^{2+} の取り込み抑制の結果によるものであることが、同様の結果を示した Mn^{2+} -quenchingの結果(data not shown)と併せて判った(Fig.3B)。

GSP・Hの細胞膜に与える影響についても検討した。これは、SOC channelの機能はそれが存在する膜の性質に影響するため、SOC channelを介した取り込み抑制がSOC channel自身の阻害によるものか膜機能の変化による間接的な効果かを明らかにするためである。検討の結果、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (8.7 μM) 以下の濃度では膜流動性には全く影響しなかったが、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (17.4 μM) 以上の濃度では若干この化合物が抗原刺激により起こる膜流動性亢進を抑制することが、さらに、 Ca^{2+} イオノフォアionomycin刺激による実験から膜機能に変化を与えることが判明した(Fig.4)。以上の結果は、先の Ca^{2+} の取り込み抑制作用はGSP・Hの膜の性質変化による間接的作

用であることが示唆された。一方で、細胞内 Ca^{2+} かつ膜の性質に全く影響を与えない25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (8.7 μM) でも約50%脱顆粒を阻害することから、主たるGSP・Hの作用部位は他にあると推察された。

そこで、種々のkinase活性化に与える影響について検討した。その結果、src familyであるLynによる $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\beta,\gamma$ リン酸化の直後活性化されるSykや $\text{PLC}\gamma 1$, $\text{PLC}\gamma 2$ だけでなく、比較的下流にある $\text{ERK}1/2$ (以上Fig.5)やFAK, Pyk2の活性化にもGSP・Hは影響を与えないことが判った。このことは、GSP・Hが $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を介し脱顆粒に至るシグナルの末端exocytosisそのものを抑制する可能性を示唆していると考えられ、今後SNARE, syntaxin, Munc18などのexocytosisのtethering, fusionに関与する分子との関連から解明する必要がある。

細胞内活性酸素の関与については、肥満細胞は高親和性IgE受容体を抗原刺激した時に、NOを含め活性酸素の生成は認められなかった。この結果は、強い抗酸化作用を有するGSP・Hであるが、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を介したシグナルにおいてはGSP・Hの作用は抗酸化作用ではないと考えられた。

以上の結果から、ブドウ種子由来のプロシアニジン高分子画分GSP・Hは強い抗酸化作用を示すとともにそれとはことなる機構により肥満細胞からのメディエーター遊離を効果的に抑制することを明らかにすることができた。

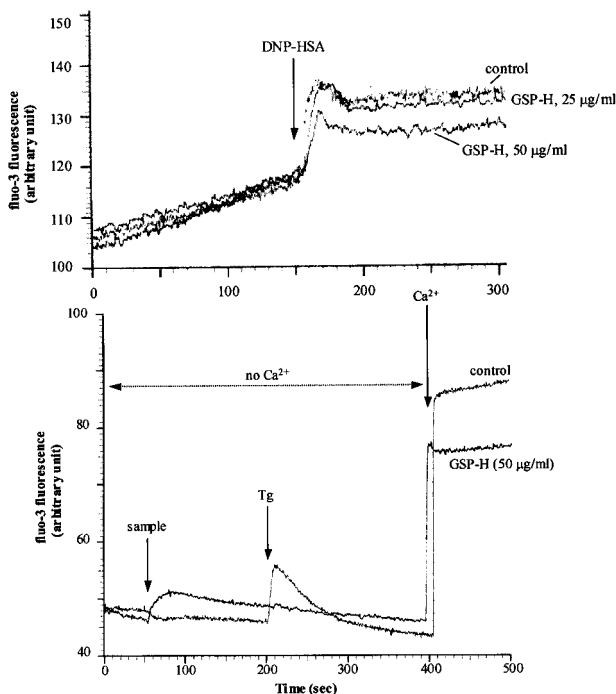


Fig.3 Effect of GSP-H on intracellular Ca^{2+} (top) and SOC channels (bottom)

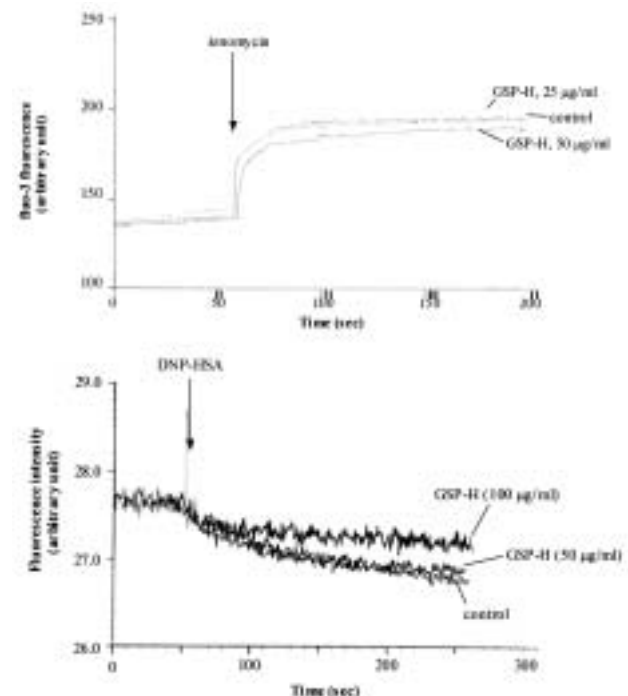


Fig.4 Effect of GSP-H on membrane fluidity. Top: Ca^{2+} ionophore ionomycin Bottom: DCVJ

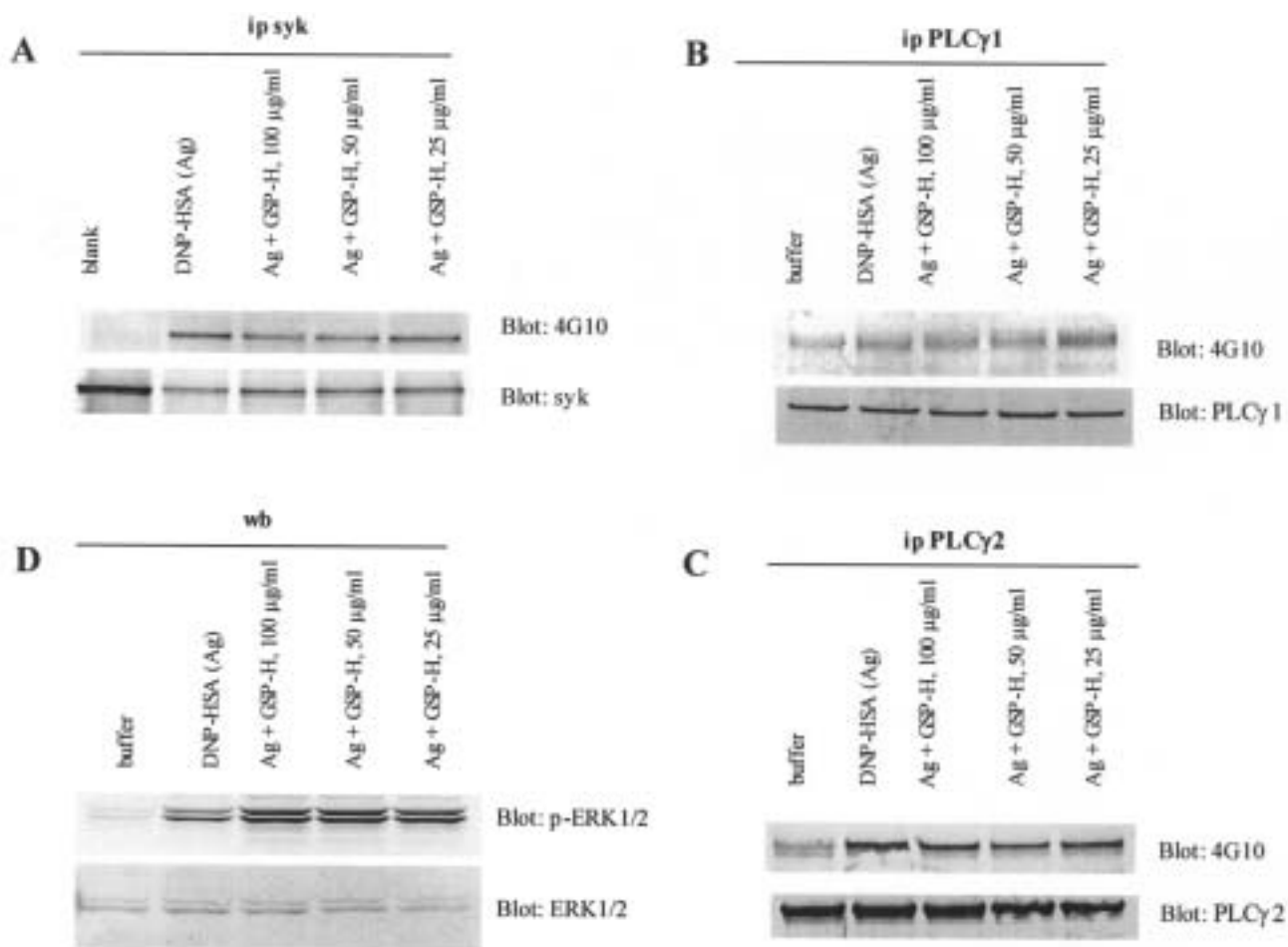


Fig.5 Effect of GSP-H on kinases, syk, PLCγ1, PLCγ2, ERK

特別研究での発表論文

- a) Kondo, K. et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 79-86 (1999)
- b) Kondo, K. et al, *Free Radical Biol. Med.* 27, 855-863 (1999)
- c) Kondo, K. et al, *Tetrahedron Lett.* 41, 485-488 (2000)
- d) Kondo, K. et al, *Methods in Enzymology* 335, 203-217 (2001)
- e) Kondo, K. et al, 磁気共鳴と医学 12, 91-94 (2001)

(2) ポリフェノールのラットにおける代謝に関する研究

大阪支所食品試験部 中村優美子
(現・高槻市保健所),
外海泰秀

[目的]

ポリフェノールは従来は非栄養素と考えられてきた。しかし、近年になって抗酸化作用，抗癌作用，抗高脂血症作用等さまざまな生理作用のあることが明らかとなり，健康食品素材として注目されるようになってきた。

ポリフェノールには単純フェノール誘導体のような分子量の小さいものから分子量30000Daを超えるタンニン

まで多種多様なものがある。タンニンを大別すると，タンニン酸等の加水分解性タンニンとプロアントシアニジン等の縮合型タンニンの2種がある。タンニン酸及びプロアントシアニジンの化学構造式をFig.1, 2に示す。

タンニンの毒性や有用な生理作用については

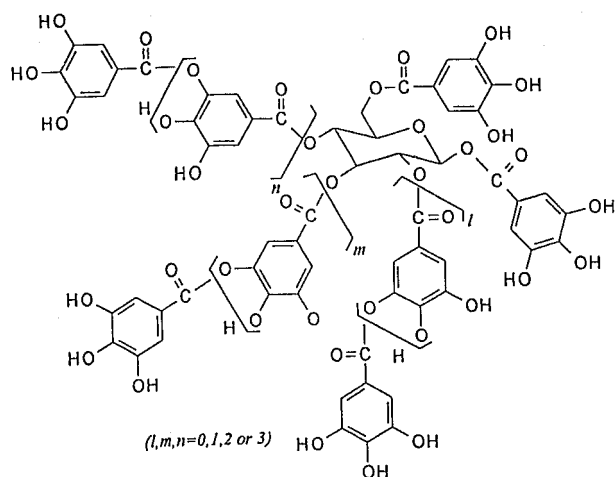


Fig.1 Chemical structure of tannic acid

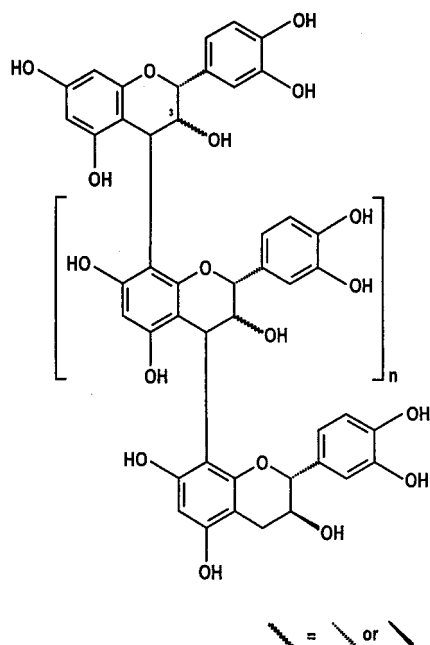


Fig.2 Chemical structure of proanthocyanidin

様々な報告があるが、タンニンの代謝については殆ど知られていない。

そこで、加水分解性タンニンとしてタンニン酸(TA)、縮合型タンニンとしてブドウ種子ポリフェノール(GSP)の2種を選択し、ラットに経口投与してそれぞれの代謝を調べた。Fig.3にTA代謝物及びその関連化合物、Fig.4にGSP代謝物及びGSPに含まれる低分子化合物の化学構造式をそれぞれ示す。

[方法]

実験1. TAの代謝

体重252・282 gのWistar系雄性ラットを用い、1群5・6匹とし、TAを0.1 g/kgの用量で強制経口投与して実験を行った。先ず、0.5, 1, 1.5, 2, 4, 5, 6, 17, 24時間後にエーテル麻酔下で心臓より採血し、血清中のTA代謝物濃度の経時的変化を調べた。次に、代謝ケージを用いて投与5.5, 24.5, 54時間後にそれぞれ尿及び糞を採取し、尿及び糞中へのTA代謝物及びTA排泄量を調べた。

実験2. GSPの代謝

体重286・304 gのWistar系雄性ラットを用い、1群5・6匹とし、GSPを0.1 g/kgの用量で強制経口投与して実験を行った。先ず、投与0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5.5, 7, 20時間後にエーテル麻酔下で心臓より採血し、血清中の代謝物濃度の経時的変化を調べた。次に、代謝ケージを用いて投与4.5, 24.5, 54時間後にそれぞれ尿及び糞を採取し、尿及び糞中へのGSP代謝物排泄量を調べた。

さらにKantsら¹⁾の方法を参考にしてGSPより低分子

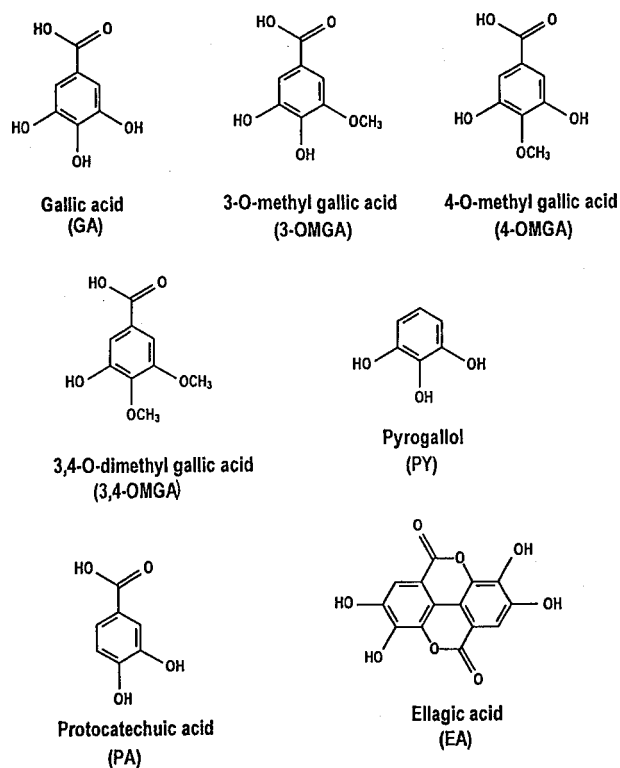


Fig.3 Chemical structures of the metabolites of TA and their related compounds

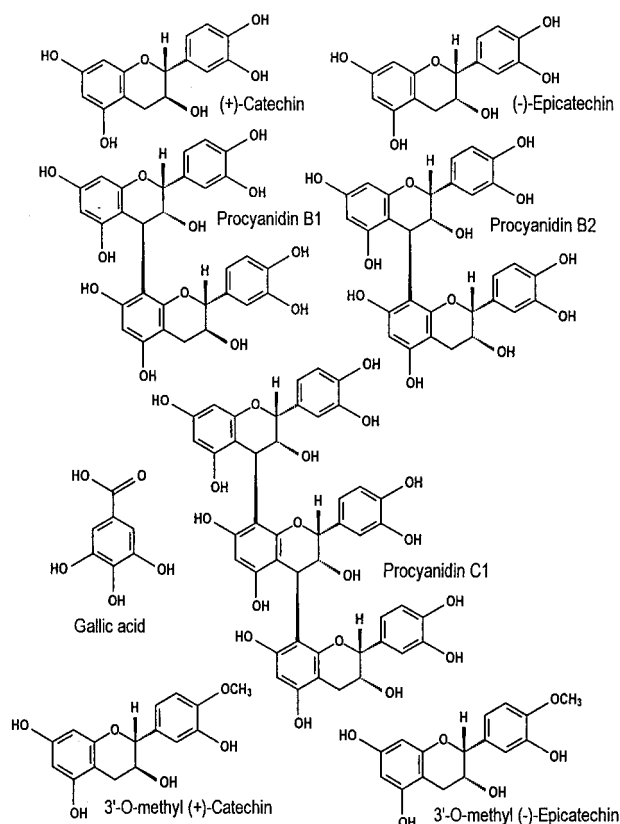


Fig.4 Chemical structures of some GSP components and GSP metabolites

量の (+)-catechin (CT) 及び (-)-epicatechin (EC) を殆ど含まない高分子画分 (GSPH) を調製した。1群4匹とし、GSPH 0.5 g/kg をラットに強制経口投与し、投与2.25時間後の血清中の代謝物濃度を調べた。また実験1及び2と同様に代謝ケージを用いて投与4.5, 24.5, 54時間後にそれぞれ尿及び糞を採取し、尿及び糞中へのGSPH代謝物排泄量を調べた。

分析法

TA代謝物、TA及びGSP代謝物の分析は既報^{2,3)}に従った。TA代謝物の分析にはprotocatechuic acidを内部標準とし、TA及びGSP代謝物の分析にはflavoneを内部標準として使用した。糞中TAは既報²⁾に従いタンナーゼを作用させて生ずるgallic acid (GA) を測定する方法で定量した。但し、尿中のGSP代謝物については、塩酸酸性下で酢酸エチル抽出を行う代わりにSep-pak[®] C₁₈ミニカートリッジにより精製を行った。

測定値は平均±SD (タンナーゼの検討) 或いは平均±SEM (動物実験の結果) で示した。

[結果]

実験1. TAの代謝

タンナーゼの種々のポリフェノールに対する反応性についての検討結果をTable.1に示す。タンナーゼはTA等のgallotanninのみならずカテキン類のエステル結合部位に作用し、gallic acid (GA) を生じた。

血清中のTA代謝物濃度の経時的変化をFig.5に示す。血清からは4-O-methyl gallic acid (4-OMGA), pyrogallol

(PY) 及びresorcinol (RE) が検出され、それぞれ投与後1.5, 4, 17時間で血中濃度が最大となり、29時間後には殆ど消失した。

尿中のTA代謝物排泄量の経時的変化をFig.6に示す。尿中から検出された代謝物はgallic acid (GA), 4-OMGA, PY及びREの4種であった。投与後49時間以内に排泄された代謝物の一部は遊離型として存在し、遊離型の割合は12.9-44.4%であった。

糞中のTA代謝物排泄量の経時的変化をFig.7に示す。糞中から検出された代謝物は4-OMGA, PY及びREの4種であった。投与後49時間以内に排泄された代謝物の一部は遊離型として存在し、遊離型の割合は0-74.8%であった。糞中へのTA排泄量の経時的変化をFig.8に示す。メタノール可溶性画分のTAは総TA排泄量のうちのごく微量であった。

投与量に対する尿及び糞中へのTA及びTA代謝物の排泄率 (w/w%) をTable.2に示す。経口投与されたTAは投与後54時間以内に尿中へGAとして0.01%, 4-OMGAとして0.10%, PYとして0.24%, REとして2.06%, 糞中へTAとして62.74%, GAとして0.19%, PYとして0.02%, REとして0.76%が投与後54時間以内に排泄された。

実験2. GSPの代謝

血清中のGSP代謝物濃度の経時的変化をFig.9に示す。血清からはCT, EC, 3'-O-methyl-(+)-catechin (3'-OMCT), 3'-O-methyl(-)-epicatechin (3'-OMEC) の4種化合物が検出された。また殆どがグルクロン酸或

Table.1 Tannase reactivity towards various polyphenols

Compounds ¹⁾		Contents			Tannase reactivity ²⁾	GA yield [w/w %]	Detected compounds
		MW	[µg]	[nmol]			
CG	Flavan-3-ol	442.4	191.2	432.2	○	32.59±0.28 ³⁾	GA+CT
ECG	Flavan-3-ol	442.4	205.6	464.7	○	31.72±0.45	GA+EC
GC	Flavan-3-ol	306.3	179.6	586.4	×		GC
EGC	Flavan-3-ol	306.3	195.6	638.6	×		EGC
GCG	Flavan-3-ol	458.4	191.6	418.0	○	32.04±0.51	GA+GC
EGCG	Flavan-3-ol	458.4	185.6	404.9	○	32.31±0.50	GA+EGC
EA		338.1	135.5	400.8	×		
TGG	gallotannin	788.6	186.4	236.4	○	61.93±1.44	GA
PGG	gallotannin	940.7	234.4	249.2	○	61.47±1.36	GA
TA	gallotannin		1000		○	85.42±1.38	GA
Food additive TA 1	gallotannin		1000		○	82.68±3.62	GA
Food additive TA 2	gallotannin		1000		○	79.95±2.21	GA
Polyphenon-100	green tea polyphenol		204.4		○	23.58±1.28	GA+GC+EGC+CT+EC

1) Abbreviations are: CG, (-)-catechin gallate; ECG, (-)-epicatechin gallate; GC, (-)-gallo catechin; EGC, (-)-epigallocatechin; GCG, (-)-gallo catechin gallate; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate; EA, ellagic acid; TGG, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose; PGG, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose; TA, tannic acid; GA, gallic acid; CT, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin.

2) To the test tube containing each compounds, 5 mL of 0.05 M citrate buffer (pH 5.5) and tannase (50 U) were added, and the mixture was incubated at 30°C for 2 hrs. Tannase was inactivated by addition of 0.5 mL of 1.0 N HCl.

After evaporation to dryness, the residue was dissolved in 2 mL of methanol and the hydrolyzate was determined by HPLC.

3) Data are means±SD for 5 trials.

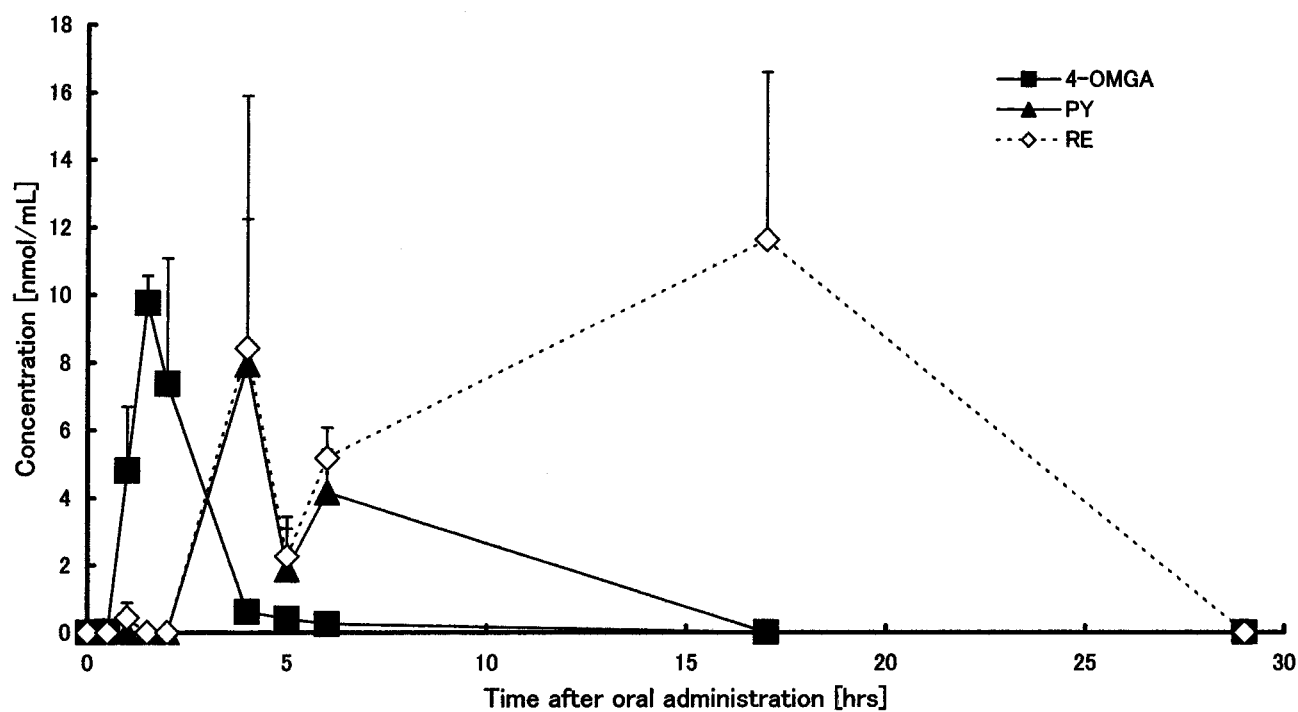


Fig.5 Serum concentration of TA metabolites as a function of time (TA 1.0/kg)

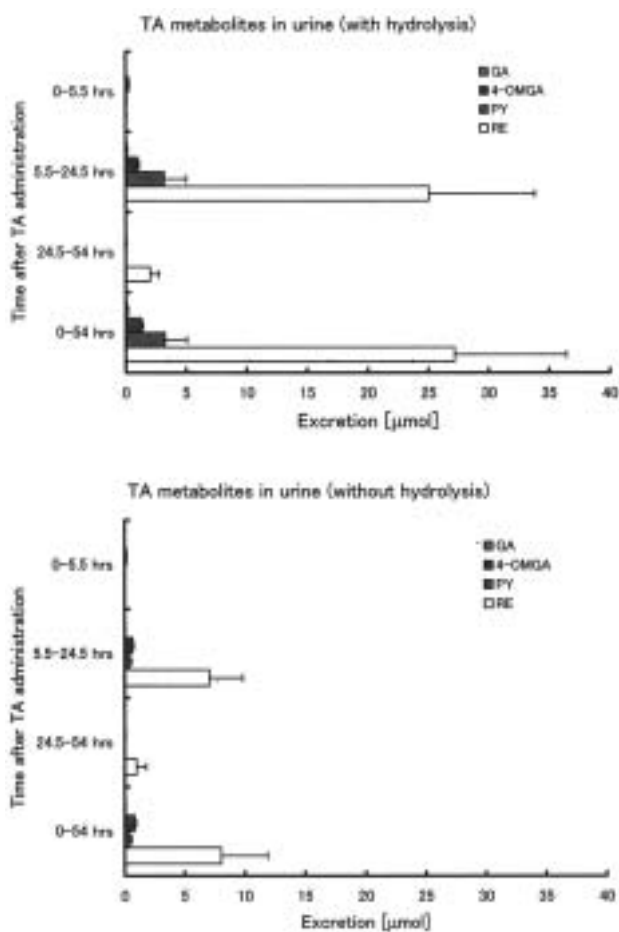


Fig.6 Urinary excretion of TA metabolites as a function of time (TA 1.0g/kg)

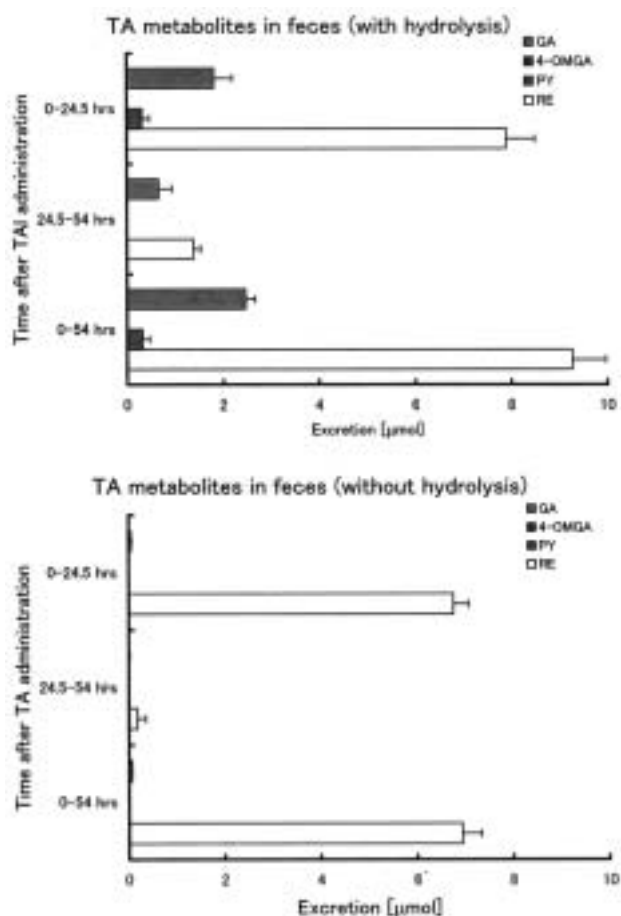


Fig.7 Fecal excretion of TA metabolites as a function of time (TA 1.0g/kg)

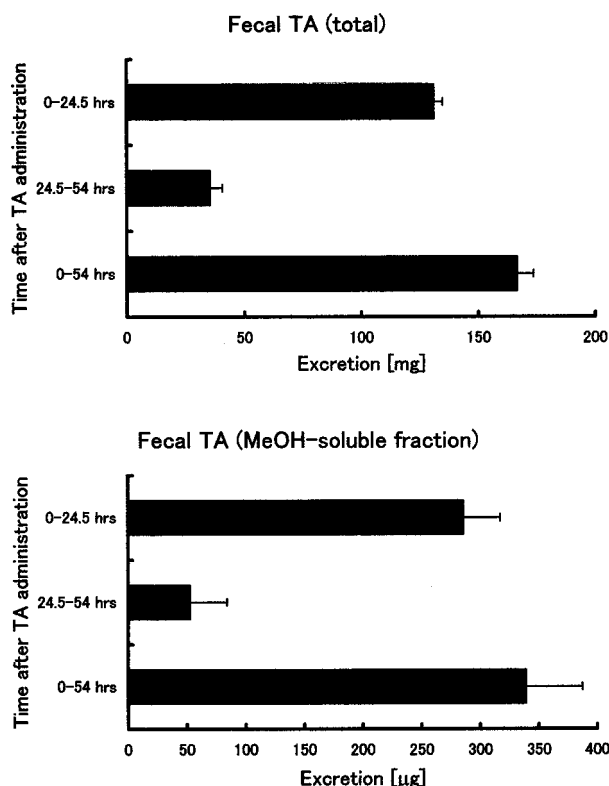


Fig.8 Fecal excretion of TA as a function of time (TA 1.0g/kg)

いは硫酸抱合されており、遊離型は殆ど検出されなかった。CT, EC, 3'-OMCT, 3'-OMECともに投与3時間後に血中濃度が最大となり、20時間後には殆ど消失した。

尿中のGSP代謝物排泄量の経時的变化をFig.10に示す。尿中から検出された主要な代謝物はCT, EC, 3'-OMCT, 3'-OMECの4種であった。投与後49時間以内に排泄された代謝物の一部は遊離型として存在し、遊離型の割合は27.5・49.1%であった。しかし、糞中からはこれらの代謝物は検出されなかった。

投与量に対する尿中へのGSP代謝物の排泄率(w/w%)をTable.3に示す。代謝物の排泄は投与後早い時間より始まり、検出された代謝物のうち投与後4.5時間以内に26.3・48.5%, 25時間以内に79.7・91.7%が排泄された。

一方, GSPH投与ラットの血清からはGSP代謝物は全く検出されず, 尿中からもGSP代謝物は殆ど検出されなかった。

[考察]

タンナーゼはTable.1に示したように, TA等に含まれるGAのエステル結合を加水分解してGAを生ずる。我々はこの作用を利用してこれまで困難とされてきた糞中のTA分析を試みた。投与されたTAは66.12%が尿及び糞中へTA或いはその代謝物として排泄されることが明らかとなった。糞中へは62.74%がTAとして, 0.97%がTA代謝物として排泄され, 尿中へは2.41%がTA代謝物として排泄された。一方, 投与したTAに含まれるGA含量は0.3%以下であることより, 投与されたTAの一部が腸管内でタンナーゼの働きで加水分解され, 生じたGAが腸管より吸収されてさらに代謝される, 或いは腸管内でさらに代謝された化合物が吸収される可能性が考えられた。回収されなかった部分については, GAがさらに代謝されてTCA回路に組み込まれて呼気中にCO₂として排気される可能性, 或いは糞と結合しているTAの一部がタンナーゼを作用させても回収されなかった可能性の両方が考えられる。

一方, GSPの代謝に関しては報告が殆どない。糞中のGSP分析について, TAと同様タンナーゼを作用させる方法を試みたが, うまくいかなかった。また, GSP分析に一般的に適用されているバニリン・塩酸法⁴⁾は, 糞抽出液そのものが着色しているため適用できなかった。糞中からのGSP分析法は今後の課題である。

GSPには元来少量のCT及びECが含まれているため, 血中及び尿中のCT, EC, 3'-OMCT及び3'-OMECがGSPに含まれるCT及びECに由来するのか, 或いはGSPの高分子化合物が一部消化管内で加水分解されて生ずるCT及びECにも由来するのか見極める必要があると思われる。そのため, GSPよりCT及びECを殆ど含まない高分子化合物GSPHを投与し, 血中及び尿中の代謝物濃度を調べた。その結果, 血中からも尿中からもCT, EC, 3'-OMCT, 3'-OMECが殆ど検出されなかつ

Table.2 Excretion rate of TA and its metabolites in urine and feces (% of total)

Compounds	Excretion rate [% of total]						
	In urine				In feces		
	0-5.5 hr	5.5-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr	0-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr
TA					49.48±1.47	13.26±1.88	62.74±2.36
GA	0.00±0.00 ¹⁾	0.01±0.00	ND ²⁾	0.01±0.00	0.16±0.02	0.03±0.01	0.19±0.02
4-OMGA	0.02±0.00	0.07±0.01	ND	0.10±0.01	ND	ND	ND
PY	0.00±0.00	0.24±0.13	ND	0.24±0.13	0.02±0.01	ND	0.02±0.01
RE	0.00±0.00	1.87±0.65	0.18±0.05	2.06±0.70	0.65±0.04	0.10±0.01	0.76±0.04

Abbreviations are: TA, tannic acid; GA, gallic acid; 4-OMGA, 4-O-methyl gallic acid; PY, pyrogallol; and RE, resorcinol.

1) Data are means ±SEM for 6 rats.

2) ND, not detected.

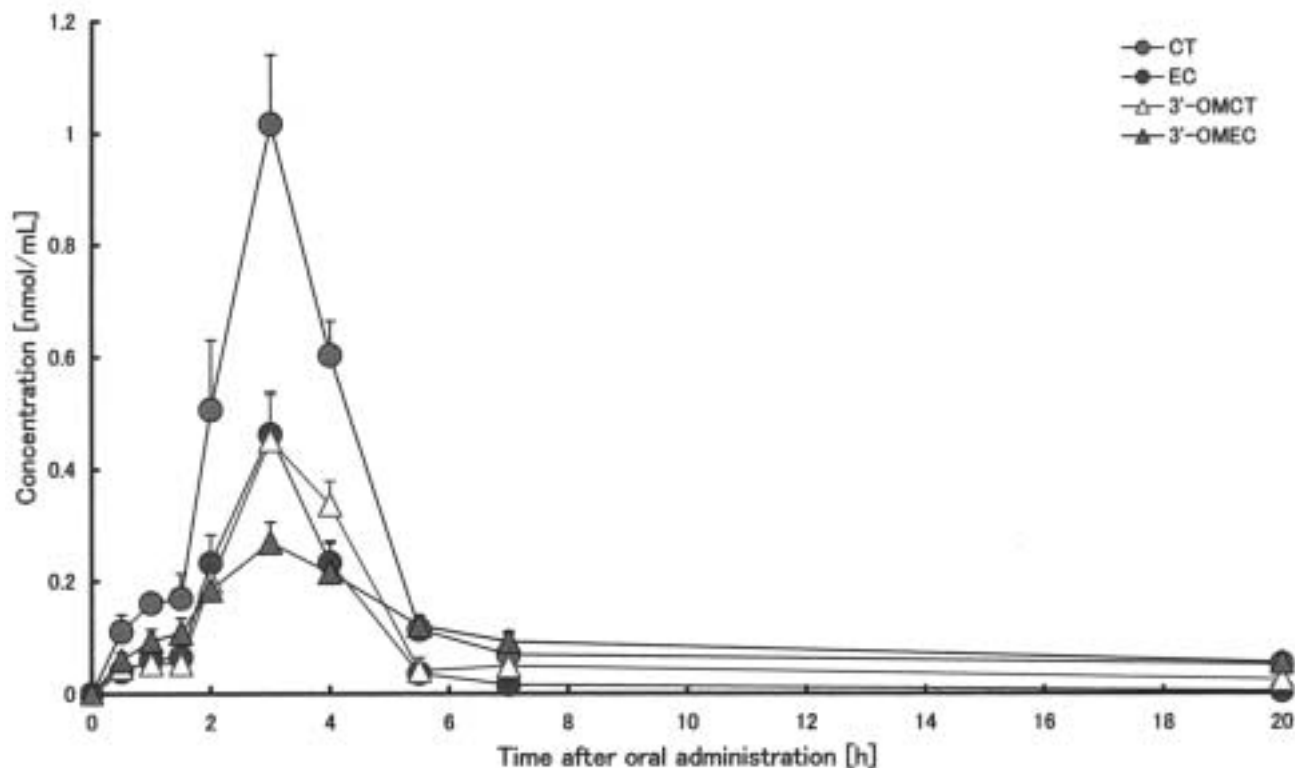


Fig.9 Serum concentration of GSP metabolites as a function of time (GSP 1.0 g/kg)

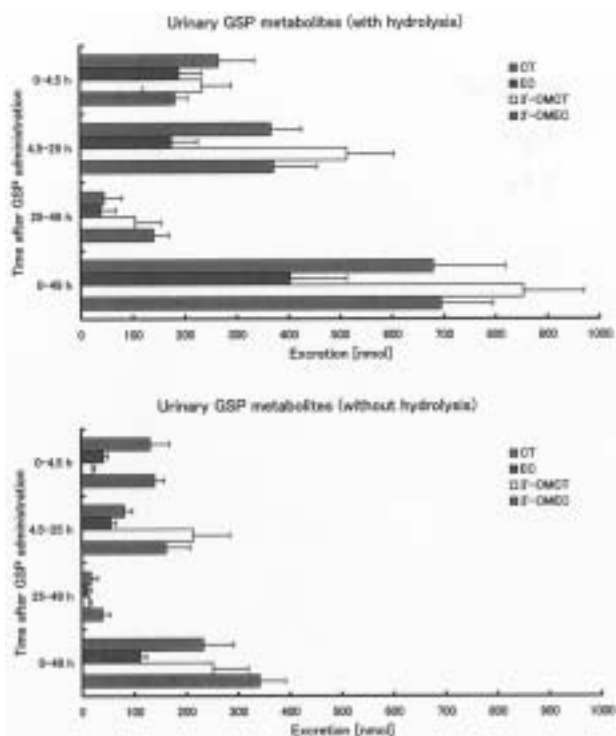


Fig.10 Urinary excretion of GSP metabolites as a function of time (GSP 1.0 g/kg)

た。そのことより、血中及び尿中に検出されたGSPの代謝物は、GSPが消化管内で加水分解されて生じるCT及びECに由来すると考えるよりも、寧ろGSPに少量含

Table.3 Excretion rate of GSP and its metabolites in urine (GSP 1.0 g/kg)

Compound ^b	Excretion rate ^a (w/w % of total) in urine			
	0-4.5 hr	4.5-25 hr	25-49 hr	0-49 hr
GSP				
CT	0.027±0.007	0.024±0.006	0.005±0.004	0.055±0.014
EC	0.019±0.005	0.017±0.005	0.004±0.003	0.040±0.011
3'-OMCT	0.024±0.006	0.053±0.009	0.011±0.005	0.088±0.013
3'-OMEC	0.019±0.003	0.038±0.008	0.015±0.003	0.071±0.010

^a Data are means±SEM for 6 rats.

^b Abbreviations: GSP, grape seed polyphenol; CT, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; 3'-OMCT, 3'-O-methyl-(+)-catechin; 3'-OMEC, 3'-O-methyl-(-)-epicatechin.

^c ND, not detected.

まれているCT及びECに由来すると考える方が妥当であるように思われた。

【文 献】

- 1) Kantz, K., Singleton, V. L.: Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 223-228 (1990).
- 2) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 331-339 (2003)
- 3) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *J. Health Sci.*, **49**, 45-54 (2003).
- 4) Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I.: Critical factors

of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4267-4274 (1998).

【 発表論文 】

- a) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 331-339 (2003)

【 関連する発表論文 】

- b) Nakamura, Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S. and Tonogai, Y.: Effects of the oral administration of green tea polyphenol and tannic acid on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in rats. *J. Health Sci.*, **47**, 107-117 (2001).
- c) Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: Effects of grape seed polyphenols on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in normal and hypercholesterolemic rats. *J. Health Sci.*, **48**, 570-578 (2002).
- d) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *J. Health Sci.*, **49**, 45-54 (2003).

3. 生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析

(1) エストロゲン受容体結合化学物質の構造と親和性との関係

環境衛生化学部 西村哲治, 金子裕美,
平川江美, 安藤正典
大阪大学大学院薬学研究科 西川淳一, 西原 力

【 目的 】

我々の生活環境には種々多様の合成化学物質が存在している。これらの化学物質は経口、経皮もしくは経気道により吸収されて、健康に影響を及ぼしていると考えられる。その中で、生体で産生されている内因性ホルモンの作用を促進もしくは阻害する化学物質は、内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体が恒常性を保つ機能をかく乱するだけでなく、次世代への影響も懸念され、大きな問題となっている。

内因性ホルモンは標的器官の細胞内特異的受容体と結合し、標的器官を特徴付ける遺伝子の転写発現を制御している。本研究では、この機構を利用して作製されたエストロゲン α 受容体遺伝子組換え酵母株を用いる内分泌かく乱化学物質評価試験系であるTwo・Hybrid Systemにより、エストロゲン受容体との親和性を調べ、化学物

質の内分泌かく乱性と構造との関係について検討をおこなった。

酵母Two・Hybrid Systemは、ヒトエストロゲン α 受容体のリガンド結合部位とGAL4DNA結合領域の融合タンパク質、GAL4転写活性領域とヒトコアクチベーターTIF 転写活性促進領域の融合タンパク質を発現し、GAL4タンパク質のDNA結合配列と β ・ガラクトシダーゼ遺伝子およびそのプロモーターを含む構築プラスミドを持つ遺伝子組換え酵母株を用いる試験系である。細胞内に取り込まれた化学物質は、ヒトエストロゲン α 受容体のリガンド結合部位と結合した結果、構築遺伝子の遺伝子産物である β ・ガラクトシダーゼを誘導産生する。産生された β ・ガラクトシダーゼの活性を測定することにより化学物質のヒトエストロゲン α 受容体との親和性を評価する。

【 方法 】

試験方法は、従法に従って行った¹⁾。対数増殖期にある試験酵母に、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した供試化学物質をDMSOの最終濃度が1%になるように添加し、30℃で4時間曝露した。曝露後、細胞膜を破壊し、細胞質画分を遠心により分離回収し、2・ニトロフェニル・ β ・D・ガラクトシドを発色基質として細胞質画分に含まれる β ・ガラクトシダーゼの活性を測定した。

【 結果及び考察 】

1. フェノール類のエストロゲン受容体への親和性と構造
検討した11種のフェノール類(Fig.1)については、5種類にエストロゲン様活性が認められた。4・tert・オクチルフェノールでは 10^{-7} M以上 3×10^{-5} M以下の濃度範囲で、4・tert・ペンチルフェノールでは 10^{-6} M以上 10^{-5} M以下の濃度範囲で、4・sec・ブチルフェノールおよび4・tert・ブチルフェノールでは 10^{-5} M以上 3×10^{-4} M以下の濃度範囲で、ビスフェノールAでは 10^{-6} M以上 3×10^{-4} M以下の濃度範囲でエストロゲン様活性が認められた(Table.1)。これらの結果から次の2点が推論される。(1) フェノール、3・sec・ブチルフェノール、2・tert・ブチルフェノールおよび2・sec・ブチルフェノールではエストロゲン様活性が検出されなかったことから、ベンゼン環に結合する水酸基に対してパラ位に何かが結合した構造をとることがエストロゲン α 受容体と親和性を持つための要素である。(2) 4・n・オクチルフェノールおよび4・n・ノニルフェノールでは活性が検出されなかったことから、パラ位に結合する側鎖の構造は直鎖のアルキル基ではエストロゲン α 受容体との結合親和性が低い。生理活性物質である17 β ・エストラジオールの構造上に類似の構造を当てはめることが出来ることから、これらの推論を支持することができるものと考えられる。水酸

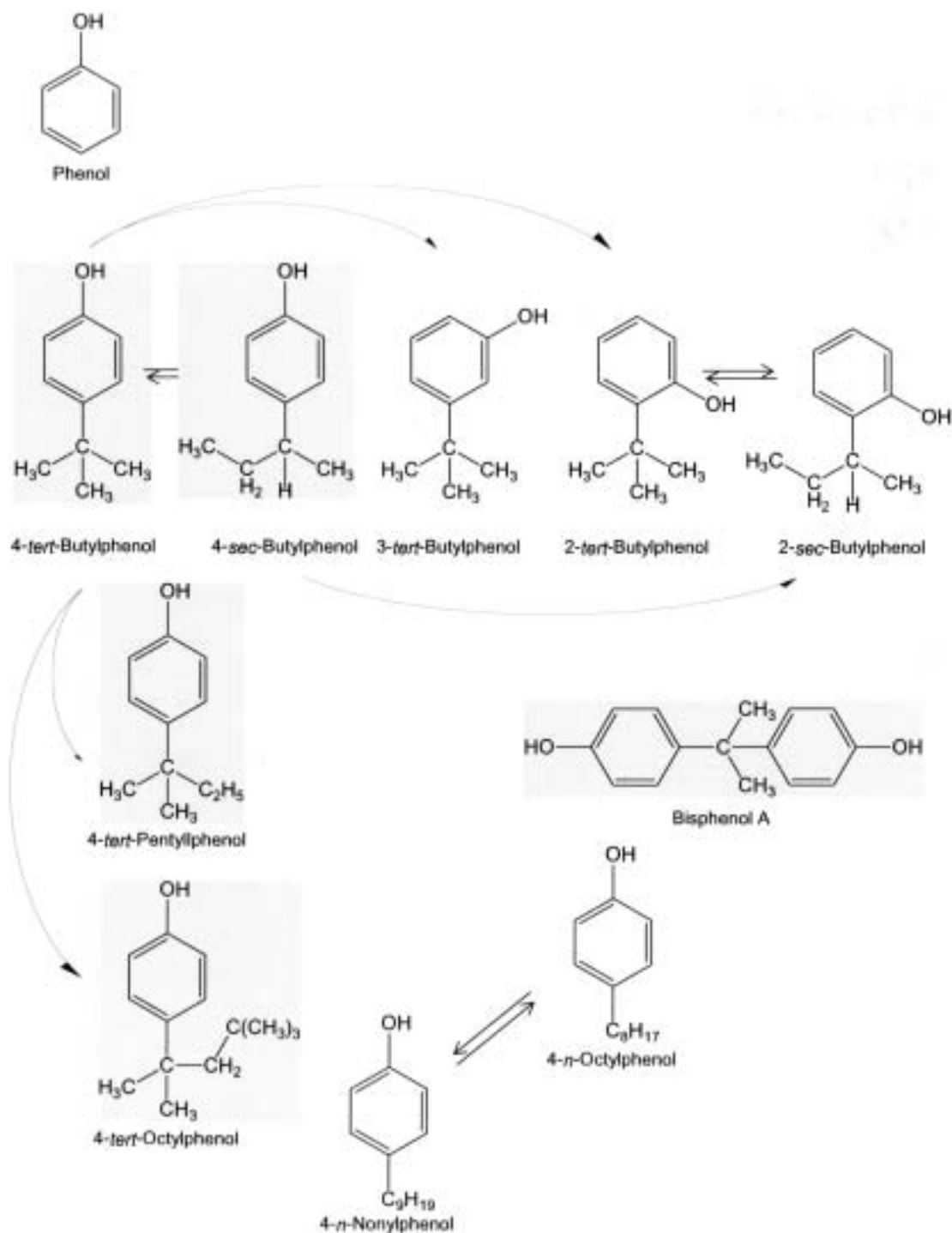


Fig.1 Structures of phenol derivatives

基に対してパラ位に分岐したアルキル基等の構造を持つ、エストロゲン様活性が認められた5物質については、4-*tert*-オクチルフェノールでは 10^{-5} M、4-*tert*-ペンチルフェノールでは 10^{-5} Mで、4-*sec*-ブチルフェノールでは 3×10^{-4} M、4-*tert*-ブチルフェノールでは 10^{-4} MおよびビスフェノールAでは 10^{-5} Mの暴露濃度で、エストロゲン様活性が最大となった。エストロゲン様活性の最大活性が得られる濃度については、*sec*-ブチル基>

tert-ブチル基>*tert*-ペンチル基=*tert*-オクチル基の順に高い暴露濃度を必要とした。これは、分岐した側鎖の炭素数が $-\text{CH}_3\text{CHC}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ と増加するに従い、エストロゲン様活性が最大となる暴露濃度が低くなる傾向を示している。また、4-*sec*-ブチルフェノールと4-*tert*-ブチルフェノール比較すると、 $-\text{C}-2\text{C}-$ よりも $-\text{C}-3\text{C}-$ と、4位に結合している炭素に結合する官能基によりエスト

Table.1 Estrogen-like Activities of Phenols

Compound	Concentration Induced Maximum Activity (M)	Induced Units	% of 17 β -Estradiol (10 ⁻⁸ M)
Phenol	>10 ⁻³	—	—
4- <i>tert</i> -Butylphenol	10 ⁻⁴	95	17.3
4- <i>sec</i> -Butylphenol	3 × 10 ⁻⁴	374	68.2
3- <i>tert</i> -Butylphenol	>10 ⁻³	—	—
2- <i>tert</i> -Butylphenol	>10 ⁻³	—	—
2- <i>sec</i> -Butylphenol	>10 ⁻³	—	—
4- <i>tert</i> -Pentylphenol	10 ⁻⁵	126	23.0
4- <i>tert</i> -Octylphenol	10 ⁻⁵	170	31.0
4- <i>n</i> -Octylphenol	>10 ⁻³	—	—
4- <i>n</i> -Nonylphenol	>10 ⁻³	—	—
Bisphenol A	10 ⁻⁵	164	29.9
17 β -Estradiol	(10 ⁻⁸)	548	100

ロゲン様活性の最大活性を示す暴露濃度が異なっていた。これらのことは、パラ位に結合するアルキル基は構造的に一定以上の空間を占めることが必要であることを示唆している。ビスフェノールAの場合にも、この推論が適合している。被験化学物質のエストロゲン様活性を、10⁻⁸ Mの17 β -エストロゲンを暴露した際のエストロゲン活性に換算すると、最大の活性を示した4-*sec*-ブチルフェノールでは30000倍の濃度で68%相当の活性であった。また、4-*tert*-ブチルフェノールでは10000倍の濃度で、17%相当の活性を示した。4-*tert*-オクチルフェノール、4-*tert*-ペンチルフェノールおよびビスフェノールAでは1000倍の濃度でそれぞれ31%、23%および30%相当の活性であった。側鎖が*tert*構造を持つこれらの化学物質の間では、結合・解離を総括した親和性として10倍の差が認められるながら、エストロゲン様活性には大きな差が認められない結果であった。これだけの結果からは結論を導き出すのは難しいが、側鎖の*tert*構造と空間的に占める体積が、エストロゲン α 受容体のリガンド結合領域がつくる空間と原子間の配位との関係で重要な要素であると推測される。また、側鎖の*sec*構造はエストロゲン α 受容体との親和性については低いが、解離の程度が悪くエストロゲン様活性を誘導する能力を長期に維持する結果、エストロゲン様活性が高く出たのではないかと考えられる。

以上の結果から、エストロゲン様活性を示す化学物質は、酵母Two-Hybrid Systemで解析するかぎりでは、フェノール骨格を持ち、水酸基に対してパラ位に、-C-3Cがとる立体空間を持ち、分岐した炭素鎖を持つ構造を持つと考えられる。エストロゲン様活性が未知の化学物質について、エストロゲン様活性の有無を推測するには上記の要件は一つの指標となりうるであろう。ここでは生化学的な結果のみに基づく推論であるため、コンピュータなどによるエストロゲン受容体と化学

物質の立体構造相互作用シミュレーション解析を進めることによりさらに明確な結論が導かれるものと期待される。

また、ここで仮説を導く根拠とした試験結果は酵母細胞の試験系を用いており、対象とする化学物質の細胞膜透過性については考慮がなされていない。対象とした化学物質が膜を透過しないとエストロゲン受容体と結合できないことから、化学物質の膜透過性の程度が結果に影響していることも考慮しておかなければならない。また、ヒトを対象とする場合、酵母と哺乳動物細胞との膜の違いがあり、化学物質の構造上透過性に差があることも考えられ、哺乳動物の内分泌かく乱性を考えた場合、注意しておく必要があるであろう。

2. オクチルフェノールエトキシレート類およびノニルフェノールエトキシレート類のエストロゲン様活性

界面活性剤などの原料として使用されているオクチルフェノールポリエトキシレートやノニルフェノールポリエトキシレートは、環境中に排出された後、微生物などにより生分解されてジエトキシレートやモノエトキシレート体になることが知られている。そこで、4-*tert*-オクチルフェノールエトキシレート、4-*tert*-オクチルフェノールジエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレートおよびノニルフェノールジエトキシレートのエストロゲン様活性を酵母Two-Hybrid Systemにより測定したが、有意な活性は検出されなかった。他の検出方法ではエストロゲン様活性が認められることから、酵母の系ではこれらの化学物質の膜透過性が低く細胞内に取り込まれずエストロゲン受容体と結合できなかったのではないかと推測された。

3. ビフェニル類のエストロゲン様活性

ビフェニル、*o*-ヒドロキシビフェニル、*m*-ヒドロキシビフェニル、*p*-ヒドロキシビフェニル、2,2'-ジヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルについてエストロゲン様活性を酵母Two-Hybrid Systemにより測定した(Fig.2)。ビフェニルおよび2,2'-ジヒドロキシビフェニルはエストロゲン様活性が認められなかったが、*p*-ヒドロキシビフェニルは10⁻⁶ Mから3 × 10⁻⁴ Mの濃度範囲で活性が見られ、3 × 10⁻⁵ Mの濃度で最高活性を示した。17 β -エストラジオールの10⁻⁸ Mの活性に対して35.9%相当であった。*o*-ヒドロキシビフェニルおよび*m*-ヒドロキシビフェニルでは10⁻³ Mから10⁻⁵ Mの濃度範囲で、最高活性として10⁻⁴ Mの濃度において極わずかであるが検出された。4,4'-ジヒドロキシビフェニルでは3 × 10⁻⁵ Mから10⁻³ Mの濃度範囲で、3 × 10⁻⁴ Mの濃度で17 β -エストラジオールの10⁻⁸ Mの活性に対して55.9%相当の最高の活性を示した。水酸基に対して

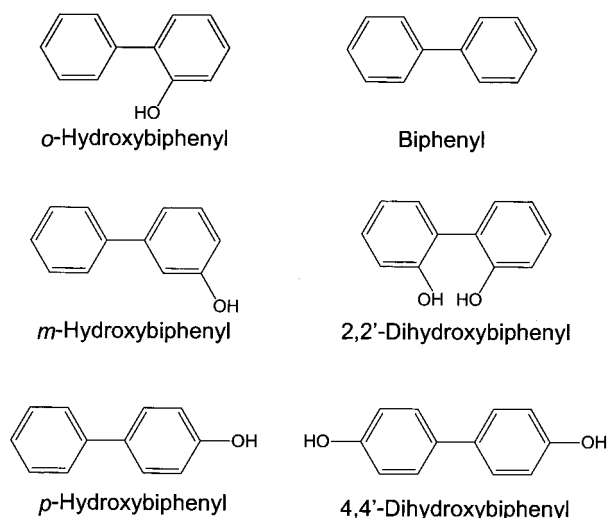


Fig.2 Structures of biphenyl derivatives

パラ位にベンゼン環がついた *p*-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルで強いエストロゲン様活性が認められた結果は、先に推論した仮説を支持するものであった。

さらに、これらのビフェニル類をラット肝ミクロソーム画分により代謝を行い、エストロゲン様活性を測定した。最終濃度として 10 % S9, 4 mM MgCl₂, 16.5 mM KCL, 2.5 mM Glucose-6-phosphate, 2 mM NADPH, 2 mM MNADH, 50 mM Na₂PO₄ (pH 7.4) の組成をもつ溶液を調整してエストロゲン様活性測定反応液に添加し、エストロゲン活性の反応時に代謝を同時に行った。S9は、5,6-ベンゾフランとフェノバルビタールを腹腔内投与し、酵素誘導をかけたラットの肝臓から調製したミクロソーム画分である。代謝することによりエストロゲン様活性が有意に増加する傾向が認められた (Table.2)。ビフェニルは代謝を行わない場合は活性が検出されなかったのに対し、代謝を行うと 10⁻⁸ M の濃度の 17β-エストラジオールを暴露した際の活性に換算すると 33 % 相当の活性が見られるようになった。同様に、*m*-ヒドロキシビフェニル、*p*-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルではそれぞれ、2.4 % が 24.4 %、

35.9 % が 75.8 %、55.9 % が 107.1 % 相当の活性の増加が認められた。ここで行った代謝は主として酸化反応を促進するものであり、結果的に水酸基が付加する反応であることを考えると、代謝反応をおこなうことにより水酸基が付加したフェノール構造が生じて、エストロゲン様活性の増加が見られたと考えられる。代謝反応後の生成物の構造を同定していないため、結論を述べることは出来ないが、上記の仮説を支持する結果である。

4. おわりに

エストロゲン α 受容体に結合親和性のある化学物質は、酵母 Two-Hybrid System による活性から推測するところでは、フェノール骨格を持ち、水酸基に対してパラ位に、-C-3C がとる立体空間を持ち、分岐した炭素鎖を持つ構造であるとの推論を得た。したがって、このような構造を持つ化学物質は内分泌かく乱性を有する候補物質と推測される。

[参考文献]

- 1) J. Nishikawa, K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, T. Nishihara, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76-83 (1999)

(2) 2段階形質転換試験のプロモーション期に認められる発がんプロモーターによるNP95 mRNAの過剰発現

衛生微生物部 酒井綾子, 高島浩介

[目的]

本研究は、発がんプロモーターが誘導する多様な遺伝子発現変化を分析し、化学物質による発がん促進の機序を解析するとともに、遺伝子発現変化を指標とする簡便な発がんプロモーター検出法を開発することを目的として行っている。BALB/3T3細胞2段階形質転換実験系を2段階発がんの *in vitro* モデル系として用いている。第一次で、作用機序の異なる3つの発がんプロモーター、12-O-テトラデカノイルホルポール-13-アセテート

Table.2 Estrogen-like Activities of Biphenyls

Compounds	Excretion rate [% of total]						
	In urine				In feces		
	0-5.5 hr	5.5-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr	0-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr
TA					49.48±1.47	13.26±1.88	62.74±2.36
GA	0.00±0.00 ¹⁾	0.01±0.00	ND ²⁾	0.01±0.00	0.16±0.02	0.03±0.01	0.19±0.02
4-OMGA	0.02±0.00	0.07±0.01	ND	0.10±0.01	ND	ND	ND
PY	0.00±0.00	0.24±0.13	ND	0.24±0.13	0.02±0.01	ND	0.02±0.01
RE	0.00±0.00	1.87±0.65	0.18±0.05	2.06±0.70	0.65±0.04	0.10±0.01	0.76±0.04

Abbreviations are: TA, tannic acid; GA, gallic acid; 4-OMGA, 4-O-methyl gallic acid; PY, pyrogallol; and RE, resorcinol.

1) Data are means ±SEM for 6 rats.

2) ND, not detected.

(TPA), オカダ酸, オルトバナジン酸塩によって, 共通してネズミ核タンパク質NP95の発現増強が形質転換プロモーション期に誘発されることをmRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ法(DD法)によって示した。第二次では, NP95 mRNAの発現上昇をRT・PCRとノーザンブロットによって確認するとともに, BALB/3T3細胞2段階形質転換試験のプロモーション期におけるNP95 mRNAの経時的発現変化や, NP95 mRNA発現増強の特異性について調べ, 形質転換促進との関連性を論じた。なお, オルトバナジン酸塩は, 実験動物における発がん促進作用を報告されていないが, 細胞形質転換を強く促進するのでin vitro発がんにおけるプロモーターとして用いている。

[方法]

1. 細胞培養

マウス細胞株BALB/3T3クローンA31・1・1(JCRB0601)は, 国立医薬品食品衛生研究所細胞バンクより供与された。形質転換株は, すべて我々の研究室においてBALB/3T3細胞の化学物質による形質転換によって生じたフォーカスから分離したものをを用いた。

2. 細胞の化学物質による処理とRNAの抽出

BALB/3T3細胞の発がんプロモーターによる処理は, 2段階形質転換試験と同じ条件で行った。すなわち, 細胞を 10^4 個/dishの密度で播種し, 途中1回の培地交換を行って1週間培養した。TPA ($0.2 \mu\text{g/ml}$), オカダ酸 ($0.015 \mu\text{g/ml}$, 2回目以降は, $0.012 \mu\text{g/ml}$) またはオルトバナジン酸ナトリウム ($1.8 \mu\text{g/ml}$) を加えた培地で培地交換を行って2週間プロモーション処理を行った。この間, 培地交換は, 0, 4, 7, 11日目に行った。発がんプロモーターを加えない培地で同様の処理を施し, 対照細胞とした。プロモーション処理開始後, 0, 24時間, 3, 7, 14日目に全RNAを抽出した。RNA抽出には, TRIzol (ライフテックオリエンタル) 試薬を用い, さらにISOGEN試薬(和光純薬)で精製してDD法, RT・PCR, ノーザンブロットによるNP95 mRNAの分析に供した。

典型的な発がん物質によってもBALB/3T3細胞を処理した。処理は, 発がんプロモーターによる場合と同様にを行い, ベンゾ[*a*]ピレン(BaP, $0.05 \mu\text{g/ml}$) または3・メチルコラントレン(MCA, $0.2 \mu\text{g/ml}$ または $2 \mu\text{g/ml}$) を加えた培地で培地交換を行って細胞を24時間処理した。全RNAを抽出し, 定量的RT・PCR(RQ・RT・PCR)によるNP95 mRNAの分析に供した。

形質転換細胞は, confluenceに達した後さらに2日間培養して全RNAを抽出し, NP95 mRNAをRQ・RT・PCRによって分析した。

3. mRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ

全RNA $2.5 \mu\text{g}$ とFITCラベルしたGT₁₅VG 50 pmol (Vは, A, CまたはG) とから逆転写酵素反応によって第一鎖cDNAを調製した。この第一鎖cDNAの1/50量に5'側プライマー(OPA・09: 5'-GGGTAACGCC・3', Operon Technologies) 10 pmol とFITC・GT₁₅VG 5 pmolを加えてlow stringencyでPCRを行った。PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離させ, そのままあるいはSYBR Green Iで染色後, 蛍光イメージアナライザーでスキャンして可視化した。

4. RT・PCR

発がんプロモーターによる処理を施した細胞から抽出したRNAから, DD法に用いた第一鎖cDNAとは別に新たに第一鎖cDNAを調整し, NP95遺伝子のオープンリーディングフレーム内に設定した特異的プライマーを用いてhigh stringencyでPCRを実施した。NP95特異的オリゴヌクレオチドプライマーは, 5'-GCAAGGATGATGAAAACAAACC・3'(5' primer) と 5'-CCAGCCAGGACCAATGAGTAGG・3'(3' primer) を用いた。PCR産物は, 3%アガロースゲル電気泳動で分離した。

典型的な発がん物質を作用させた細胞と形質転換細胞から抽出したRNAからは, ランダムプライマー(N₆)を用いて第一鎖cDNAを調整し, NP95特異的プライマーとクアンタムRNAアルタネート18Sインターナルスタンダード(Ambion)を用いてRQ・RT・PCRを行った。

5. ノーザンブロット

発がんプロモーターを作用させた細胞から抽出した全RNA $10 \mu\text{g}$ を1.2%アガロース-0.66 Mホルムアルデヒドゲル電気泳動で分離してナイロンフィルターへブロットし, ³²Pでラベルしたプローブとハイブリダイズした。ナイロンフィルターを洗浄後, イメージングプレートへ暴露し, BAS 1500(富士写真フィルム)を用いて分析した。

6. 5・プロモ・2'-デオキシウリジン(BrdU)の取り込み

BALB/3T3細胞を96穴プレートに播種し(250/well), 通常培地ではほぼconfluenceに達するまで(7日間)培養した。発がんプロモーターを加えた培地に交換して24時間培養した後, 培地にBrdUを添加してさらに1時間培養した。細胞に取り込まれたBrdUは, セルプロリファレーションELISA・BrdUキット(Roche)によって測定した。

[結果]

NP95 mRNAは, DD法では, 約530bpのバンドを生じた。DD法に於ける530bpのバンドの濃さの経時的な

変化とRT-PCR並びにノーザンブロットに於けるNP95のバンドの濃さの変化は、よく一致した。DD法、RT-PCR、ノーザンブロットの結果から、NP95 mRNAの発現は、処理開始24時間後に対照細胞において増加すること、TPA、オカダ酸、オルトパナジン酸塩による処理を施した細胞では、対照細胞よりも大きな増加が認められること、増加の程度は、TPAで最も大きくついでオルトパナジン酸塩、オカダ酸の順であること、対照細胞のNP95 mRNAの発現増加は、3日以内に通常の水準に戻るが、発がんプロモーターによる処理を施した細胞では、3日後も対照細胞よりも高い水準を維持することが明らかになった。さらに、オカダ酸とオルトパナジン酸塩で処理された細胞では、処理開始7日後、14日後になっても対照より高いNP95 mRNAの発現があった。

NP95は、増殖に関係する95・kDaのマウス核タンパク質として同定された。そのcDNAは、782アミノ酸からなる蛋白質をコードしている。NP95は、ATP/GTP結合サイト、ジンクフィンガーモチーフ、サイクリンA/E cdk2リン酸化サイト、レチノブラストーマ結合サイトと推定される構造を有している。NP95の生理学的な機能はまだ明らかになっていないが、NP95 mRNAと蛋白は、静止期の細胞では極めて少なく、10%血清刺激により増加すること、大部分の増殖中の細胞では発現が増加していることが報告されている。対照細胞には、発がんプロモーターを含まない新鮮培地による培地交換が施されている。そこで、新鮮培地の代わりにexhausted mediumを用いて培地交換を行ったところ、NP95 mRNAの発現増加は誘導されなかった。さらに、exhausted mediumに新たに血清を添加して培地交換を行うと処理24時間後のNP95 mRNAの発現が増加した。このことから、対照細胞で認められたNP95発現増加は、血清刺激によるものであると考察した。血清刺激によるNP95の発現増加は、3日以内に通常の水準に戻るもので、24時間後以外のRNAについては、抽出が培地交換の3日後に行われており、血清刺激によるNP95発現への影響は消失していると考えられる。

次に、TPA、オカダ酸、オルトパナジン酸塩による処理にともなう細胞のDNA合成活性の変化をBrdUの取り込みによって調べた。処理開始24時間後、対照細胞でBrdUの取り込みが増加した。発がんプロモーターによる処理を施した細胞では、対照細胞より大きい取り込み増加があり、増加の程度は、TPAで最も大きくついでオルトパナジン酸塩、オカダ酸の順であった。また、対照細胞に認められたDNA合成活性上昇は、exhausted mediumを用いる培地交換では、誘導されなかった。このようにNP95 mRNAの発現増加とDNA合成活性の上昇とは、全く同様の変化を示し、NP95の発現増加は、BALB/3T3細胞においても増殖に関連していることが示

唆された。

NP95 mRNAの発現増強が発がんプロモーション作用に関連するものであるかどうかを調べるために、BALB/3T3細胞を典型的な発がん物質の2つの濃度水準で24時間処理した。すなわち、BALB/3T3細胞形質転換においてイニシエーターとして活性があるが発がんプロモーターの助けなしには形質転換を誘発しないBaP 0.05 $\mu\text{g/ml}$ またはMCA 0.2 $\mu\text{g/ml}$ と、単独で形質転換活性を示すMCA 2 $\mu\text{g/ml}$ とによる処理を行った。BaP 0.05 $\mu\text{g/ml}$ またはMCA 0.2 $\mu\text{g/ml}$ を含む培地で培地交換を行った細胞のNP95 mRNAの発現増加は、対照細胞と同等であったが、MCA 2 $\mu\text{g/ml}$ を含む培地で培地交換を行った細胞では、対照細胞より高いNP95 mRNAの発現増加が認められた。このことは、NP95の発現増強は、発がんプロモーター特異的なものではなく典型的発がん物質によっても濃度が十分であれば誘導されることを示唆している。しかしながら、2段階発がん説では、化学発がんの達成にはイニシエーション作用とプロモーション作用の両方が必要であり、発がんプロモーターは、プロモーション作用のみを有し、イニシエーション作用を持たないため単独では発がんを起こさないが、完全発がん物質は、発がんプロモーション作用とイニシエーション作用の両方を持っているため単独で発がんを起こすことができるという説明されている。この説に従えば、MCA 2 $\mu\text{g/ml}$ が有するプロモーション作用がNP95の発現増強を誘導したと推定することができる。

BALB/3T3細胞由来の形質転換細胞のすべてにおいてNP95 mRNAの発現は、BALB/3T3細胞に比べて増加していた。NP95の発現増加は、形質転換の維持にも関係している可能性があると考えられる。

[まとめ]

この研究の結果は、NP95 mRNAの発現増強が発がんプロモーターによる形質転換の促進に特異的な役割を持っていることを示すものではない。しかしながら、この研究によって作用機序の異なるTPA、オカダ酸、オルトパナジン酸塩が共通してBALB/3T3細胞形質転換のプロモーション期に増殖に関連する遺伝子NP95 mRNAの発現を増強するとともにDNA合成活性をも上昇させることを明らかにすることができた。これによって、形質転換の促進には、少なくとも部分的には、細胞増殖が関係している可能性があることが示唆された。また、化学物質処理後にBALB/3T3細胞に誘導されるNP95 mRNAの発現増加を発がんプロモーター検出のための指標の1つとして利用できる可能性も示された。

発表論文

- 1) Sakai, A., and Teshima, R.: 2,5-Di-tert-butyl-1,4-

- hydroquinone enhances cell transformation accompanied by an increase in intracellular free calcium ion concentration. *Cancer letters*, **168**, 183-190 (2001)
- 2) Sakai, A.: Nonylphenol acts as a promoter in the BALB/3T3 cell transformation. *Mutation Res.*, **493**, 161-166 (2001)
- 3) Sakai, A., Iwase, Y., Nakamura, Y., Sasaki, K., Tanaka, N. and Umeda, M.: Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumor promoters: a review. *ATLA*, **30**, 33-59 (2002)
- 4) Sakai, A., Kikuchi, Y., Muroi, M., Masui, T., Furihata, C., Uchida, E., Takatori, K. and Tanamoto, K.: Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 347-351 (2003)