

ニトロフェノール化合物の Transthyretin 結合親和性

青柳光洋¹、鹿島勇治²、長谷川淳³、堺温哉²、松井三明²、益永茂樹¹、岡部とし子²
(¹横浜国立大学大学院 環境情報学府、²横浜市立大学医学部、³愛媛大学農学部)

【はじめに】

甲状腺ホルモンの L-Thyroxine (L-T4) と類似構造を持つ環境汚染物質は、甲状腺ホルモン輸送タンパク質である Transthyretin (TTR) に対して L-T4 と競争結合し、甲状腺ホルモン機能を攪乱すると考えられている。有機ハロゲン化合物である PCBs 水酸化体(HO-PCBs)及び PCDD/Fs 水酸化体(HO-PCDD/Fs)、Tetrabromobisphenol A、ハロゲン化フェノールなどの環境汚染物質は、TTR との結合親和性が比較的高く、^[125I]L-T4 Binding Assay を行った結果、本来の TTR のリガンドである L-T4 に対して、10 倍以上の親和性を示す化合物も存在することが明らかになっている¹⁻³⁾。一方、ニトロ基が置換したフェノール化合物である 2,4-Dinitrophenol は、Amyloid Fibril Assay によって TTR 結合親和性を有することが確認されているが、^[125I]L-T4 Binding Assay による詳細な検討は行われていない⁴⁾。そこで本報告では、Amyloid Fibril Assay 及び TTR+^[125I]L-T4 Binding Assay の 2 つの方法を用い、ニトロ化フェノール類と TTR との結合親和性について検討したので、その結果を報告する。

【実験方法】

対象物質

ニトロ化フェノール 3 物質[2,4-Dinitrophenol (DNP)、2,4,6-Trinitrophenol (TNP)、2,6-Diiodo-4-nitrophenol (INP)]及びニトロ基を有する農薬 2 物質[Chloronitrofen (CNP)、Nitrofen (NIP)]、計 5 物質を対象とした。また、ハロゲン化フェノール 10 物質も比較のため検討を行った。

Amyloid Fibril Assay⁵⁾

対象物質の濃度は、TTR の 0.1 ~ 4.0 倍の濃度範囲で各 6 段階設定し、対象物質共存下における TTR の Amyloid Fibril 生成(障害)能を検討した。TTR 及び対象物質の混合溶液をインキュベート後、分光光度計(UV-260、Shimadzu)により吸光度(OD₃₃₀)を測定し、Amyloid Fibril 生成量を推定した。また、同溶液に Amyloid Fibril を染色する Congo Red 溶液を加え、吸光度(OD₄₇₇、OD₅₄₀)を測定することにより Amyloid Fibril の生成を確認した。

^[125I]L-T4 Binding Assay⁶⁾

対象物質の濃度は各 7 段階設定し、55nM TTR に対する 30nM ^[125I]L-T4 との競争結合試験を行った。TTR-^[125I]L-T4 結合画分を Spin column P-6 (Bio-Rad)で分画し、放射性強度(cpm)を γ -counter (Cobra 5003、Packard)で測定した。なお、ポジティブ・コントロールとして L-T4 (native)を用いた。

Binding affinity of nitrophenol compounds with human transthyretin.

Mitsuhiro AOYAGI¹, Yuji KASHIMA², Jun HASEGAWA³, Haruya SAKAI², Mitsuaki MATSUI¹, Shigeki Masunaga¹, Toshiko OKABE¹,

¹ Graduate School of Environment Information & Sciences, Yokohama National University, Tokiwadai 79-7, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501. TEL 045-339-4366. FAX 045-339-4373

² Department of Hygiene, Yokohama City University School of Medicine, Fuku-ura 3-9, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004. TEL 045-787-2606. FAX 045-786-5219

【結果及び考察】

L-T4 と TTR の結合親和性を 1.0 としたときの相対親和性強度(Relative Potency, R.P.)を用い、Amyloid Fibril Assay の結果を比較すると、INP、TNP の R.P.は各々4.2、3.3 であり、比較的強い TTR との相互作用が認められた。

次に、各ニトロ化フェノールについて、 $[^{125}\text{I}]\text{L-T4}$ Binding Assay を行い、塩素化あるいは臭素化フェノールとの TTR 結合親和性の比較を行った(表1、図1)。その結果、TNP は L-T4 の TTR 結合親和性の約 1/10 の強度を示し、TCP 及び DBP とほぼ同等であることが確認された。また、各ニトロ化フェノールの TTR 結合親和性は、同位置に塩素が置換する塩素化フェノールと非常に近い値を示した。

ニトロ化ベンゼン及びニトロ化フェノールが環境中へ放出された場合、物理化学的性状から、水圏及び底質中をはじめ広範囲に分布することが予想される。また、これらの化合物は有機ハロゲン化合物ほど生物への蓄積性は高くはないが、ディーゼル排ガスや廃棄物焼却過程でニトロ化芳香族炭化水素が生成されるため⁸⁾、少なからずヒト及び野生生物への曝露があると予想され、甲状腺ホルモン機能の攪乱等の生体影響が懸念される。以上のことから、有機ハロゲン化合物と同様に、ニトロ化フェノールなどニトロ化合物のモニタリングも必要と考えられる。

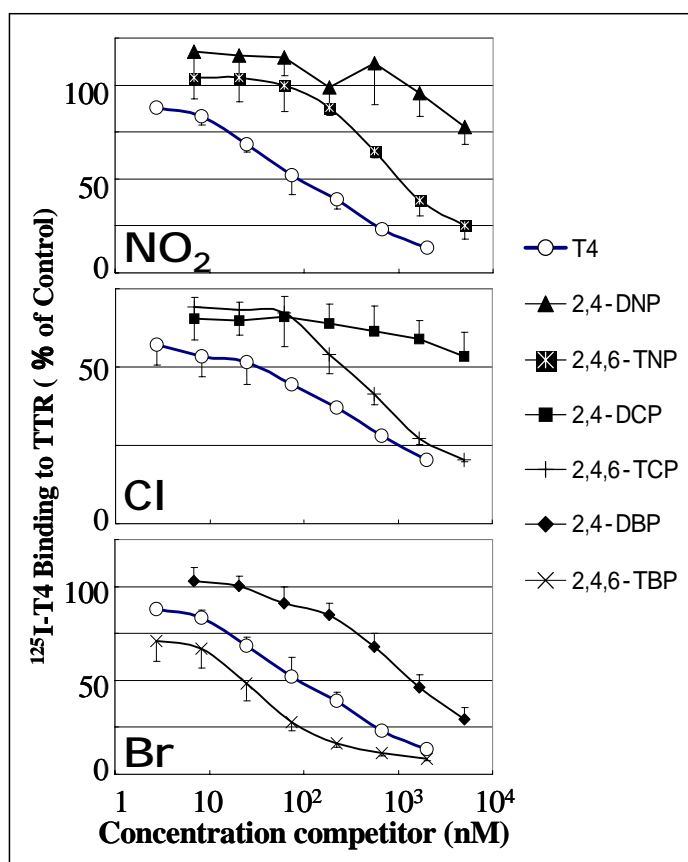


図1 対象物質による $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ -TTRへの結合阻害作用

表1 $[^{125}\text{I}]\text{L-T4}$ Binding Assayによる IC_{50} 及びRelative Potency

Compounds		IC_{50} (nM) ^a	Relative Potency ^b
L-Thyroxine	T4	24	1.0
2,4-Dinitrophenol	DNP	n.d.	n.d.
2,4,6-Trinitrophenol	TNP	1041	0.087
2,6-Diiodo-4-nitrophenol	INP	3.2	7.5
Triiodophenol	TIP	0.41	58
2,4-Dibromophenol	DBP	1400	0.065
2,4,6-Tribromophenol	TBP	14	1.7
Pentabromophenol	PBP	5.9	4.0
2,4-Dichlorophenol	DCP	n.d.	n.d.
2,4,6-Trichlorophenol	TCP	178	0.10
Pentachlorophenol ⁷⁾	PCP	23	1.74

Note. n.d., not determined, no displacement observed within tested range.
^aConcentration of competitor at 50% competition.
^bCalculated as ratio of $\text{IC}_{50}(\text{T}_4)/\text{IC}_{50}(\text{competitor})$.

- 参考文献 -

- 1) Meerts *et al. Toxicol Sci* 2000;56(1):95-104.
- 2) Chauhan *et al. Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;162(1):10-21
- 3) Cheek *et al. Environ Health Perspect.* 1999;107(4):273-8.
- 4) Raghu *et al. Arch Biochem Biophys.* 2002;400(1):43-7
- 5) Lans *et al. Chem Biol Interact.* 1993;88(1):7-21.
- 6) Lai *et al. Biochemistry.* 1996;35(20):6470-82
- 7) Van Den Berg *et al. Chem Biol Interact.* 1990;76(1):63-75.
- 8) Manabe *et al. Mutat Res.* 1985;158(1-2):3-18