

グさせ、ERE センサーチップを作成した。

2、ER-ERE 相互作用の測定

ER α を Flow バッファーで希釈して、17 β -Estradiol(E2)もしくは、測定対象の化合物を混合し、氷冷下約1時間インキュベート後、上述の ERE センサーチップにインジェクトして、SPR 装置(Biacore 3000, Biacore, Sweden)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。ER α は、リコンビナント Human ER α を、加える化合物濃度は、結合試験の結果をもとにした。

3、バッファーおよび測定条件の検討

バッファー組成の影響及びアッセイに最適な条件の検討のため、バッファー中の KCl、Tween20 の濃度、緩衝剤及び pH を変えてそれぞれ測定を行い、この結果をもとに測定用バッファーの組成を決定し、Flow バッファーとして用いた。

4、ER-ERE 相互作用の変化の速度論解析

リガンドの結合による ER-ERE 相互作用への影響を定量的に解析するため、結合解離過程の速度論解析を行った。化合物とインキュベートした ER サンプルを Flow バッファーで4~5段階に系列希釈して、ERE センサーチップにインジェクトした。得られたデータより、結合定数(kd)、解離定数(ka)及び結合度(KA)を求め、結合したリガンドがそれぞれのパラメータに及ぼす変化を検討した。なお、解析にはコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0)を用い、Langmuir 型 1 対 1 結合式によりパラメータを算出した。

C. 研究結果

精製 ER は、リガンドの存在なしで ERE に対する結合活性を示した。さらに、17 β -estradiol(E2)の結合は ER の ERE への親和性を濃度依存的に増加させた。また ER-ERE 相互作用に変化を及ぼす E2 の濃度範囲は結合試験による濃度範囲と同じであることから相互作用の変化は E2 結合に

よるものである事が示された(図 1)。E2 結合による変化を速度論的に解析した結果、E2 の結合は、ER-ERE 相互作用の結合、解離反応のいずれもを増加させ、この時、ka の増加が kd の増加に比べ大きいことにより見かけの結合定数(KA)が増大することが示された。

Bisphenol-A(BPA)や Genisteine(Gen)でも同様に ER の ERE へのアフィニティーの増大が示された。しかし解析の結果、BPA や Gen が結合した状態では、E2 が結合した時に比べて、ERE からの解離が遅いことが示された(図 2)。これらの差はわずかであるがそれぞれの化合物が結合した ER では DBD の構造が異なり、生体においては特異的な障害を惹起する可能性が示唆された。一方、アンタゴニストである ICI-182,780 や パーシャルアンタゴニストの 4OH-Tamoxifen では、いずれも ER の ERE からの解離が非常に遅くなることが示された(図 3)。しかし 4OH-Tamoxifen に比べ ICI-182,780 では、解離がより遅くそれぞれが結合した ER は互いに構造が異なることが示された。

D. 考察

今回、ER は E2 の結合により ERE への親和性が濃度依存的に増加し、リガンド結合が ER の DBD 構造変化を引き起こす事が明らかとなった。細胞内では ER は HSP 等と結合して存在することが示されており、それらが ERE への結合を抑制しているとも考えられる。E2 結合構造の ER では ERE に対して結合、解離反応のどちらも増加し、ER が E2 の結合により結合し易くより離れやすい状態になっていると考察された。一方、アゴニストとして知られる Bisphenol-A(BPA)や植物性エストロジェンの Genisteine(Gen)結合 ER は、ER-ERE 相互作用の違いから E2 結合 ER とは異なる立体構造を持つことが示された。アンタゴニストである ICI-182,780 や 4OH-Tamoxifen では、これら化合物の阻害の機序については、ER の ERE への結合阻害によるともいわれているが、実際、結合速

度は非常に遅いものの同時に解離速度も非常に遅くなっていることがわかる。興味深いことに、ICI-182,780 が完全なアンタゴニストであるのに対して 4OH-Tamoxifen はパーシャルアンタゴニストとして働くことが知られており、結果はそうした違いを反映しているものと考察された。今回の結果は、ER-ERE 相互作用の差として示される ER 構造の違いが結合した化合物特異的な生体作用と関連する事を示唆した。特に他のアッセイにおいては、単にアゴニストとして示される BPA や Gen が ER に引き起こす構造変化は、E2 と異なり、このことより生体内においては E2 とは異なる特異な作用を惹起する可能性が示唆された。現在、用いられているいずれの系においても、そのエンドポイントはエストロジェンの一部の作用、すなわち単一のレポーター遺伝子発現や子宮肥大といった単一の作用におけるエストロジェンとの同等性をのみ捕らえることを目的としている。これに対して、我々の方法ではエストロジェンレセプターへ与える影響のエストロジェンとの差について感度良く捕らえる事が出来る。こうした構造の差が生体内でどのような異なる effects として現されるのかについては、今のところ不明であるが、今後、これらの化合物の *in vivo* 系における作用の詳細な検討(特にそれぞれの化合物のより転写活性化される遺伝子の違い等)との比較において明らかになるものと考察された。

E. 結論

SPR による方法は生体分子間の相互作用をリアルタイム解析するシステムであり、これにより内分泌かく乱物質による、受容体の DNA 結合性、および受容体と共役因子との相互作用への影響を、それぞれの結合・解離過程の変化を解析することで、内分泌かく乱性の検討を行う。更に本系は生体内でのホルモン作用機構に即した解析を特徴としており、個々の化合物の生体内作用の予測性の高い解析が可能である。この方法によれば、他の HTPS 系と同様にロボティカ

ルなアッセイシステムを構築できるのと同時に、単にホルモン様の作用を有するか否かではなく、ホルモンレセプターを介したシグナル伝達系に対する機能修飾をリアルタイムに速度論的に測定すること、また対象とする化学物質の作用プロファイルを極短時間に鋭敏に検出することが可能となる。

今回、エストロジェン受容体に作用する化学物質では、アゴニストとアンタゴニストそれぞれで特徴的な変化を示すことが明らかとなり、今後、アンドロジェンなど他のレセプターに関しての同様の解析および co-factor との相互作用の解析などを行い、EDCs の内分泌かく乱のメカニズムの解析を進める。

F. 研究発表 学会発表

A.Ono, M.Yamamoto, A.Takagi, J.Kanno, and T.Inoue, Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) A American Association of Cancer Research special conference on The Steroid Receptor Superfamily, 1999.

A. Ono, J.Kanno and T.Inoue, Differences of Estradiol and non-steroidal agonists and/or antagonist effects on the estrogen receptor and estrogen response element interaction kinetics. Keystone Symposia conference on Endocrine Disruptors, 1999.

A.Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using biosensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology

G. 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

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

表面プラズモン共鳴高速分析によるデータの高速度取得技術及びHTPS に特化するための試験

分担研究者 橋本 せつ子 ビアコア株式会社 開発部

研究要旨

内分泌かく乱物質の生体への影響を評価するにあたり、各種化合物と核内受容体分子との結合を定量的に測定することが求められる。一方で、核内受容体分子と外来性化合物の多様性を考慮した場合に、定量測定系にはハイ・スルー・プットスクリーニングが可能であることが求められる。本研究は表面プラズモン共鳴高速分析法を用いることで、迅速かつ定量的に両者の結合を測定する新たな解析法を確立することを目的とする。初年度においてはハイ・スルー・プット性能を考慮した際にアッセイ系確立に必要な基礎データを得るために、エストロゲン受容体を用いた予備実験を行った。

A. 研究目的

内分泌系の確立が多細胞生物の生存にとって極めて重要なステップであったことは、個々の独立した組織が協調的に機能することで個体としての生存を可能にしていることを考えれば容易に理解されることである。この調節系では、種々の組織から分泌されるホルモンがメッセンジャーとしての機能を通じまたホルモンに対する特異的なレセプターがメッセージを受け取ることで、それぞれ重要な働きを担っている。ホルモンを広義に捉えた場合には、すなわち一群の細胞増殖因子をホルモンの一種と見なすならば、このような調節系は単に組織の機能調節に関する寄与のみならず、組織形成過程における寄与も極めて重要であると言える。本来、内分泌かく乱物質はこのような広義のホルモン調節系に関わる問題であると解釈する必要があるかもしれないが、多くの場合ホルモンの中でも、とりわけステロイドホルモンに対するレセプター(核内受容体)に親和性を有する物質を議論する機会が多い。本研究で対象とするレセプターも核内受容体であるが、今後細胞増殖因子などのレセプターを対象とした研究が必要であろうと思われる。

種々の人工化合物がホルモン様作用を有することが明らかになっているなかで、人工の化合物は年々増加の一途をたどっており、内分泌かく乱物質としての潜在的能力を有

する化合物も同時に増加している可能性がある。一方で、当初ステロイドホルモンレセプターとして発見されたエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体などの核内受容体も、その後新たな受容体分子の発見に伴い、その数が増加している。現在ではステロイドホルモンだけでなく、これまでステロイドホルモン産生過程での中間代謝産物とされていた物質や分解産物をリガンドとする核内受容体や、ステロイド以外の、プロスタノイドやレチノイドなどをリガンドとする核内受容体分子種の存在が明らかにされてきた。これらのリガンド分子が明らかな核内受容体に加え、核内受容体としての構造上の特長を有しながらそのリガンドが不明であるいわゆるオーファンレセプターと総称される一群の核内受容体も数多く存在する。これらのオーファンレセプターに結合する化合物も内分泌かく乱物質として機能する可能性があり、化合物とレセプターの両面から広範で大規模なアッセイが必要であることは明らかである。

本研究ではビアコア社が開発した表面プラズモン共鳴センサーを用いて、核内受容体をターゲットにした内分泌かく乱候補物質のアッセイ系の確立をめざす。また、このアッセイ系をもとに高速分析法とそれに基づくハイスループット化のための技術開発を行い、大規模なスクリーニングが可能なアッセイ系の確立をめざす。実験にはリガンドが既知の

エストロゲン受容体(α 型と β 型)とアンドロゲン受容体の他にリガンドが未知の核内受容体であるAd4BP/SF-1とDax-1をも対象に加えるが、本研究で構築されることが期待される実験系は広く他の核内受容体へ応用が可能であると思われる。

B. 研究方法

1) ホルモンレセプターの発現と精製(α 型と β 型エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体とオーファンレセプターであるAd4BP/SF-1とDax-1)はピアコアとの委託研究により行う。

2) エストロゲン受容体とDNA及び、内分泌かく乱候補物質の結合活性に関する予備実験

アッセイでは受容体の標的配列をもつDNA短鎖を結合させたピアコアセンサーチップをもちいる。具体的には図1に示すように、ビオチン標識した標的配列を持つDNAをあらかじめstreptavidinコートしたセンサーチップ上に結合させる。このチップ上でDNAと受容体の複合体が形成されることになるが、ピアコアを用いたアッセイでは複合体の形成をセンサーチップの重量の変化として検出することが可能である。本年度は、受容体と標的配列の結合に影響を与える種々の条件の解析、センサーチップを再生する際に用いる条件の検討のため、溶媒の組成、インキュベーション条件、チップ再生試薬の条件を検討した。

C. 研究結果

1) エストロゲン受容体とDNA及び、内分泌かく乱物質の結合活性に関する予備実験
本実験では以下に示すように、スウェーデンのピアコア本社と連絡を取り合い、種々の条件を検討した。

1, Initial experiments and optimization of regeneration

Initially we made scouting experiment where the buffer substance, pH, KCl, MgCl, TWEEN contents in the buffers were varied. The reproducibility in the initial experiments was poor probably due to impro

per regeneration. The initial reagent used for regeneration -SDS 0.05%- gave a drifting baseline and the time between cycles was therefore kept long. The regeneration conditions were optimised. X agents (a, b, c, d) were tested and 0.1% sds and then washed by TE buffer was found to be best for regeneration.

2, Screening

The experiments shown in Table 1 were designed to fix the buffer condition which showed the best selectivity in the scouting experiments. Four parameters, pH, KCl, MgCl, and Tween, in the assay were varied. The experiments were run in both HBs and Tricine buffers. The binding of ER to oligo-x was studied in the presence of Estradiol, BPA and without a low molecular weight binder. ER concentration was kept 10 nM. Concentrations of compounds were set as ER is occupied with chemicals completely, i.e. 10^{-6} M Estradiol and 10^{-4} M BPA were used respectively. The binding level after 10 sec in the dissociation phase was used as response (D1). The binding level varied between 10-300 RU depending on the buffer composition.

The selectivity, calculated as $D1_{Est} - D1_{non} / D1_{Est} * 100$, varied between -96 % in buffer-1 to 95 % in buffer 8 (Fig 1. cube1-2). A pareto plot from the regression models for the relative selectivity for estradiol (R_{Sest}) and BPA (R_{Sbpa}) is shown in Fig 2 (pareto a,b). The regression coefficient pattern between the buffer composition and the relative selectivity for estradiol and BPA induced binding are different. BPA selectivity seems to significantly increase with increased pH. The relative selectivity for estradiol (R_{Sest}) is significantly influenced by pH, KCl, the interaction effect between KCl and pH and TWEEN. The coefficient pattern is similar for estradiol in

HBS and Tricine buffers (REH and RET), while the BPA shows some difference between the buffers (RBH, RBT). In Tricine the pH and KCl and their interaction was ranked as highest effects but in HBS-buffer only KCl gave an significant effect. A simple scatterplot between the relative selectivity for BPA in the two buffers show that HBS gives a higher selectivity (up to 60%) compared with Tricin (approx 20%). The high design settings in all buffer parameters gave the highest selectivity for EST (95%) and BPA(60%), however for the latter it was also accompanied by a low binding signal of 30 RU. A general conclusion: an increase in KCl and pH increases selectivity but the strong negative interaction effect between these factors (KCl and pH) decrease the selectivity. BPA and Estradiol induced binding responds differently to the variation in assay buffers. KCl and pH was selected as parameters useful for the next optimisation run.

3, Optimization

The design used for the detailed study of the effects of KCl and pH, and the response parameters determined are shown in table 2. A general conclusion is that the selectivities in this experiment are generally higher in comparison with experiment

1. The experiments were performed at higher pH and KCl concentrations. The square plot in Fig. Square displays the relative selectivity for and the binding signal in presence of or estradiol in the 9 buffers using HBS-buffer as vehicle (one missing experiment - air-injection). The binding level/signal decreases as function of increased pH and KCl concentration. The effect on the relative selectivity was more complex due to interaction effects and a nonlinearity (quadratic effect) Fig a-b. The strong interaction effect manifest

it self by the fact that at high KCl concentrations (300 mM) the increase in pH do not give any Effect on selectivity. Furthermore at high pH an increase in KCl gives decreased selectivity and diminished binding level. In HBS-buffer the highest selectivity's(estradiol, 60 %; BPA 51%) and acceptable binding signal (290-240 RU) was achieved in experiment-8 (pH 9.0; KCl 100mM). In tricin buffer the selectivity was better at higher KCl concentrations but the binding signal was low. The best compromise for HBS-buffer, i.e. highest possible selectivity and a high estradiol and BPA induced signal is at pH 9.0 using 100mM KCl. The triplicate experiments using intermediate settings for all assay parameters showed for the Tricin-buffer a high variability. The relative selectivity increased and the binding signal decreased. This correlated with increased time after mixing of the ER with the compounds. Therefore a separate experiment was performed where the incubation time of the ER/compound mix was varied at different temperatures (Fig Time) In the final assay the samples were incubated 1h at room temperature and stored at 4 degrees before analysis.

4, Binding kinetics in different buffers

The shapes of the binding curves vary considerably in different buffers (Fig. sensorgrams).

In buffer-1 the association phase is linear mass-transport limited binding giving a very stable complex with low off-rate ($K_{off} 10^{-37}$). The selectivity is poor. In buffer-2 the selectivity is higher and estradiol/BPA induced bindings are linear with a slightly increased dissociation rate ($5 \cdot 10^{-37}$). The nonactivated ER binds slower indicating that increasing the interaction time (or dilution) can increase selectivity. In buffer-3 the on-rate is much slower and off rate higher in comparison with the above mentioned

HBS and Tricine buffers (REH and RET), while the BPA shows some difference between the buffers (RBH, RBT). In Tricine the pH and KCl and their interaction was ranked as highest effects but in HBS-buffer only KCl gave an significant effect. A simple scatterplot between the relative selectivity for BPA in the two buffers show that HBS gives a higher selectivity (up to 60%) compared with Tricin (approx 20%). The high design settings in all buffer parameters gave the highest selectivity for EST (95%) and BPA(60%), however for the latter it was also accompanied by a low binding signal of 30 RU. A general conclusion: an increase in KCl and pH increases selectivity but the strong negative interaction effect between these factors (KCl and pH) decrease the selectivity. BPA and Estradiol induced binding responds differently to the variation in assay buffers. KCl and pH was selected as parameters useful for the next optimisation run.

3, Optimization

The design used for the detailed study of the effects of KCl and pH, and the response parameters determined are shown in table 2. A general conclusion is that the selectivities in this experiment are generally higher in comparison with experiment

1. The experiments were performed at higher pH and KCl concentrations. The square plot in Fig. Square displays the relative selectivity for and the binding signal in presence of or estradiol in the 9 buffers using HBS-buffer as vehicle (one missing experiment - air-injection). The binding level/signal decreases as function of increased pH and KCl concentration. The effect on the relative selectivity was more complex due to interaction effects and a nonlinearity (quadratic effect) Fig a-b. The strong interaction effect manifest

it self by the fact that at high KCl concentrations (300 mM) the increase in pH do not give any Effect on selectivity. Furthermore at high pH an increase in KCl gives decreased selectivity and diminished binding level. In HBS-buffer the highest selectivity's(estradiol, 60 %; BPA 51%) and acceptable binding signal (290-240 RU) was achieved in experiment-8 (pH 9.0; KCl 100mM). In tricin buffer the selectivity was better at higher KCl concentrations but the binding signal was low. The best compromise for HBS-buffer, i.e. highest possible selectivity and a high estradiol and BPA induced signal is at pH 9.0 using 100mM KCl. The triplicate experiments using intermediate settings for all assay parameters showed for the Tricin-buffer a high variability. The relative selectivity increased and the binding signal decreased. This correlated with increased time after mixing of the ER with the compounds. Therefore a separate experiment was performed where the incubation time of the ER/compound mix was varied at different temperatures (Fig Time) In the final assay the samples were incubated 1h at room temperature and stored at 4 degrees before analysis.

4, Binding kinetics in different buffers
The shapes of the binding curves vary considerably in different buffers (Fig. sensorgrams).

In buffer-1 the association phase is linear mass-transport limited binding giving a very stable complex with low off-rate ($K_{off} 10^{-3?}$). The selectivity is poor. In buffer-2 the selectivity is higher and estradiol/BPA induced bindings are linear with a slightly increased dissociation rate ($5 \cdot 10^{-3?}$). The nonactivated ER binds slower indicating that increasing the interaction time (or dilution) can increase selectivity. In buffer-3 the on-rate is much slower and off rate higher in comparison with the above mentioned