

(別添2)

厚生科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

研究課題名(課題番号): 内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた新しいハイ・スルー・

プットスクリーニング法の開発 (H11-生活-017)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成13(2001)年 4月

別添 3

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた新しいハイ・スループットスクリーニング法の開発

菅野 純

II. 分担研究報告書

1. 超高速選別法の検証の評価に関する調査研究

井上 達

2. 内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発

小野 敦

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた
新しいハイ・スルー・プットスクリーニング法の開発
主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

内分泌かく乱物質問題の緊急性、即ち内分泌かく乱化学物質(EDCs)についての対応は、その候補物質であるホルモン作動性化学物質がすでにヒトを取り巻く環境中に存在し、それらが日常的に暴露対象となっていると考えられるものも少なくない事等に鑑みて、ホルモン様作用を示す可能性のある物質を効率的に把握し、その有害性を評価するためのプレスクリーニング試験としての検討、すなわち(1)レポーター遺伝子導入細胞による高速分析(High Through Put Screening: HTPS)、及び各種化学物質とホルモンレセプターとの結合、さらにその結果としてホルモンレセプターが制御する遺伝子に注目した(2)表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)を応用した新規無細胞 HTPS 系(SPR-HTPS)により、化学物質による内分泌かく乱に関する研究、情報の収集を行う。

A. 研究目的

化学物質が生物の内分泌系を攪乱し、野生生物及びヒトの健康に影響を及ぼすことが懸念されている。その一方、我々の現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質が内分泌かく乱作用を有するかどうかを早急に調査する必要がある。このため、米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行うための研究を平成 10 年度に立ち上げた(厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「ハイ・スルー・プットスクリーニング(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究」)。平成 10 年度中に 75 物質(350 測定)、引き続き当研究班において平成 11 年度は 118 の化学物質について試験を行い、信頼性のある HTPS を確立した。内分泌かく乱化学物質問題には、1) ヒトが暴露される既存化学物質及び、今後暴露される新規化学物質の類ホルモン作用活性の緊急的検出作業、2) 無作用量と無毒性量の見極めや、胎児影響の解析など、化学物質による内分泌かく乱の分子生物学的メカニズム解明が必要な研究対象とがあり、既存概念に基づく手法の技術開発のみならず、メカ

ニズム研究によりもたらされる新しいエンドポイントと手法の検討が必須である。これらの情勢をふまえ Firefly Luciferase 遺伝子の上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER alpha を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に且つ安定的に組み込まれたヒト由来の細胞(HeLa cell)を使用し、化学物質のホルモン様活性の高速スクリーニング試験法の開発及びその検証を目的として(1)ハイ・スルー・プットスクリーニング(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究を行った。また、表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)は各種ホルモン受容体分子に対する化学物質の相互作用を高精度に測定可能な新規性の高い、しかも実用性を兼ね備えた方法である。このシステムの測定原理は、金薄膜上に接する液体の屈折率変化を測定するものであり、屈折率は局所の分子量の変化に比例する事から、膜上の質量変化に換算することが出来ることを利用するものである。この系で得られるリアルタイム情報からの、受容体における agonist 効果(作動)/antagonist 効果(阻害)などの詳細な解析と予測の確立を目的として(2)表面プ

ラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening、SPR-HTPS)の開発について検討した。現在、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系で代謝活性系を含み実用に耐え得るレベルにあるものとしては、我が国の ER α に関するシステムが世界をリードしている。この系から発信されるデータの有用性を含めて、研究開発の方向性を見極める作業が必要であり、内分泌かく乱作用の有無を確認するための優先順位付けを早急に行うことが求められている。

B. 研究方法および研究結果

(1) ハイ・スルー・プットスクリーニング (High Through Put Screening、HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究

(1)-1. レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究 (主任研究者:(財)化学物質評価研究機構に対する委託業務)

研究目的:化学物質の内分泌攪乱作用を評価するための毒性試験法開発・評価プロジェクトが OECD などの国際機関を中心に展開されており、本委託研究では通産省との共同研究として、EDSTAC が提案した化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行う事を目的とする。

供試化学物質:リストにはこれまでに本委託事業で実施した全ての化学物質を含んでおり、今年度の事業で実施したものは HTS00157 以降の化学物質である。

化合物原液の調製: 各化合物を秤量した後、10mM となるように Dimethyl sulfoxide(DMSO、ナカライテスク)を加えて溶解した。10mM に調製した化合物は DMSO にて 1/10 希釈を行い 1mM 100 μ M、10 μ M、1 μ M、100nM、10nM 及び 1nM とした。化合物は終濃度が 1 μ M、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM 及び 1pM となるように EMEM-10%FBS 培地に添加した。

細胞:HeLa(ER α) 安定形質転換細胞株を住友化学株式会社より入手し、実験に使用した(H12 年 4 月入手株)。

EMEM-10%FBS 培地:粉末培地(イーグル MEM ニュスイ) 4.7g、10% 炭酸水素ナトリウム(10g \rightarrow 100mL) 9mL 及び 3% L-グルタミン(3g \rightarrow 100mL) 6mL に精製水を加えて 500mL とした(EMEM 基礎培地) 後 Dextran coated charcoal(DCC)処理した牛胎児血清(FBS) 56mL を加え、ろ過滅菌した。

細胞溶解剤: 5x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR、プロメガ株式会社) 10mL に精製水を加えて 45mL とした。

Luciferase Assay Reagent の調製: Luciferase Assay Substrate (プロメガ株式会社)の容器に Luciferase Assay buffer 105 mL 全量を直接加えて溶解した。

① ER alpha agonist 検出系

①-1 Assay プレート上のサンプル配列

Plate format (Table 1) に従い、自動試薬分注装置 (Biomek 2000、Beckmann-Coulter 株式会社)を用いて化学物質の添加を行った。

①-2 測定の手順: 以下の手順に従って測定を行った。

↓ 細胞を測定用の 96well プレートに播種 (10⁴/well)

↓ 化合物の添加 (終濃度 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM 及び DMSO 各 n=4)*

↓ CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓ 培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L \times 2 回)

↓ 細胞溶解剤の添加(15 μ L/well)

↓ 10 分間室温で静置

↓ ルミノメータによる発光測定

注入量 : 50 μ L/well

測定時間: 注入 1 秒後 \sim 5 秒間(100msec \times 50 interval)の積算

①-3 結果の解析:

各濃度区で得られた発光強度の平均値は陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍数 (Transcriptional activity) を求めた。また、陰性対照区の発光強度の平均+3SD を陽性と判断される

閾値 (Threshold)、陽性対照区の転写活性化倍率の 1/2 の値を与える濃度(PC50)を近似式より求めた。

②-1 Assay プレート上のサンプル配列
plate format (Table 2) に従い、自動試薬分注装置 (Biomek 2000、Beckmann-Coulter 株式会社) を用いて化学物質の添加を行った。

② ER alpha antagonist 検出系

(Table 1)

	化合物 1				化合物 2				化合物 3			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 μ M	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	100nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	10nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	1nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	100pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	10pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	1pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	NC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

NC:Negative control (Vehicle, DMSO)

PC:Positive control(17 β -Estradiol, 100pM)

(Table 2)

	化合物 1				化合物 2				化合物 3			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 μ M	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	100nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	10nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	1nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	100pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	10pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	1pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	NC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

NC:Negative control (Vehicle, DMSO)

PC:Positive control(17 β -Estradiol, 25pM)

②-2 測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

↓細胞を測定用の 96well プレートに播種 (10⁴/well)

↓化合物の添加(終濃 1μM,100nM,10nM,1nM, 100pM,10pM,1pM 及び DMSO 各 n=4)*

(化合物を添加する well の培地中には E2 を終濃度 25pM になるよう予め添加する)

↓CO₂インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓培地の除去及び PBS による洗浄 (100μL×2 回)

↓細胞溶解剤の添加(15μL/well)

↓10 分間室温で静置

↓ルミノメータによる発光測定

注入量 : 50 μL/well

測定時間 : 注入 1 秒後～5 秒間 (100 msec×50 interval)の積算

(Transcriptional activity)を求め、陽性対照区の転写活性化倍率の 1/2 の値まで転写活性化倍率が阻害される供試化学物質の濃度 (IC50) を Logistic 式より求めた。

結果:

① ER alpha agonist 検出系

177 物質について本実験系にて ER alpha アゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果 (Table 3)、以下の 29 物質について PC50 が算出され、比較的強いアゴニスト活性を有するものと推察された。

② ER alpha antagonist 検出系

177 物質について本実験系にて ER alpha アゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果 (Table 4)、以下の 6 物質について IC50 が算出され、比較的強いアンタゴニスト活性を有するものと推察された。

②-3 結果の解析

各濃度区で得られた発光強度の平均値は陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率

(Table 3)

	Chemical Name	PC50 (pM)
1	Estradiol,ethynyl	5.68E+00
2	Estradiol, 17 β	8.17E+00
3	Estradiol, 17 α	3.99E+01
4	Zearanol	4.57E+01
5	Diethylstilbestrol	8.24E+01
6	Equilin	1.82E+02
7	Fenbuconazole	2.88E+02
8	Zearalenone	6.73E+02
9	Estrone	8.31E+02
10	Equol	3.70E+04
11	5,7-dihydroxy-2,3-diphenyl-4H-chromen-4-one	3.86E+04
12	HPTE	7.33E+04
13	Coumestrol	1.04E+05
14	6,4'-dihydroxyflavone	1.12E+05
15	4',5,7-Trihydroxyisoflavone	1.44E+05
16	Norethindrone	1.71E+05

17	Bisphenol B	1.96E+05
18	3,6,4'-trihydroxyflavone	2.21E+05
19	testosterone,19-nor	2.36E+05
20	Diadzein	2.68E+05
21	Norgestrel	3.38E+05
22	4-Octylphenol(tert)	3.91E+05
23	4-Nonylphenol	4.56E+05
24	Testosterone, dihydro	4.75E+05
25	5,7-dihydroxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one	4.84E+05
26	2,3-diphenyl-7-hydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	5.05E+05
27	4-Dodecylphenol	6.55E+05
28	Phenol,p-cumyl	7.48E+05
29	Bisphenol A	8.28E+05

(Table 4)

	Chemical Name	IC50 (pM)
1	Retinoic Acid, 13-cis	5.85E+03
2	Retinoic Acid, all trans	1.56E+04
3	Tamoxifen-4-OH	2.70E+04
4	Nafoxidine	9.44E+04
5	Cortisol	1.33E+05
6	ICI 47699	7.71E+05

(1)-2.超高速選別法(HTPS)の検証の評価に関する調査研究(分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

研究方法:本班研究の前身的研究班であった「内分泌かく乱物質の超高速選別法の開発・検証に関する調査研究(H10-生活-508)」で、数次にわたって開催した厚生省・経済産業省を主体とし、農林省・環境庁を含んだ「内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合」において得られた情報を中心に、国内の進捗状況及び、諸外国の情報を集積した。また WHO/IPSC や OECD/EDTA への出席、米国 EPA メンバーとの情報交換により、国際的動向および我が国の立場を把握するための情報を収集し、別途、会議報告資料としてこれをまとめた。

研究結果:米国 EPA/EDSTAC が OSI Pharmaceuticals に委託したヒト由来培養細胞-レポーターアッセイ系立ち上げ研究に関する報告 (Endocrine Profiling Pilot Screen Report) によると、まずホルモン受容体の発現が細胞株自体に見られるヒト細胞株 (ER=T47D 細胞、AR=MDA-MB-453 細胞、TR=HeLa 細胞) にレポーター遺伝子のみを導入する方法で行われた HTPS 系は、経費の見積もりが低すぎたため、所定の結果を得るところまで検討が続行出来なかった点以外に ①細胞株の応答性が乏しく、更に、この②培養血清のロット間での反応性のばらつきも見られ③代謝系を模倣する系の組み込み (cyp3A4 系) が完了していない、④手作業とロボット作業での反応性に差があり、ロボット設定が至適でない、などの問題点も指摘されている。

今後の EDSTAC の対応として、EPA は現行の HTPS は中止し、「HTPS Challenge Program」と称する方法を開始することとした。これは、情報が豊富な既知の化学物質(数百物質)について、参加希望者が個々に持っている既存のシステムを用いてそれが HTPS として機能するかの如何を試行し、そのデータを持ち寄ることにより最良の方法を見いだすというものである。他方、OECD は子宮肥大試験、Hersh-berger 試験、および改良テストガイドライン 407(28 日間反復投与試験)のプロトコールのプレバリデーション・バリデーション作業の目途が立ち始めたことから、未知の物質に遭遇した際の用量設定方法を含む体系的な内分泌かく乱物質問題対応構図の描出に着手する意向が顕在化しつつあり、*in vitro* 評価系の一つとして HTPS そのもの、あるいはそこから発信されるデータの入手法、利用法についての提案が準備されつつある。

国内では、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系を、全て HeLa 細胞をベースに構築し、少なくとも ER α について、代謝活性系を組み合わせたものも含めて、本研究で必要とされる感度を保存したロボットが完了している。しかし細胞株の不安定性、方法の煩雑さ、経費の問題などから、この系の細胞株を含めた改良の必要性が指摘されている。特に安定細胞株を得て、それを維持する事の難しさが明らかとなり、transient transfection 法の再考論も現場からは持ち上がっている。併せて無細胞系の新しい方法(小野・橋本班員報告参照)の開発も同時に進行させる事の重要性が確認されている。

(2)-1. 「表面プラズモン共鳴高速分析によるデータの高速取得技術及び HTPS に特化するための試験」(主任研究者:ピアコア株式会社に対する委託業務)

研究目的:内分泌系をかく乱するさまざまな化学物質の存在が懸念されており、これらの化学物質の作用機構として内分泌系を制御する種々のホルモンレセプターと化学物質との相互作用が指摘されている。ホルモンレセプターのなかでも、エストロゲンレセプターに代表される核内レセプターは本来のリガンド分子である脂溶性ホルモンと結合するこ

とにより活性化され、ホモダイマーを形成し、標的遺伝子の上流にあるホルモン応答 DNA 配列に特異的に結合する。さらに補因子等が結合し、特定の遺伝子の転写が活性化される(図1)。本委託研究では、エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター等の複数の核内レセプターに関して、ピアコア株式会社が開発した表面プラズモン共鳴センサーを用いて、核内レセプターとの分子間相互作用に基づく内分泌かく乱候補化学物質アッセイ系の確立をめざしている。表面プラズモン共鳴センサーは分子の結合を非標識、リアルタイムに測定することができる利点を有している。即ち結合の有無だけでなく、結合の反応速度論的解析が可能であるという特徴を持っている。アッセイに用いるレセプターとしてはリガンドが既知のエストロゲンレセプター(α 型と β 型)、アンドロゲンレセプター及びリガンドが未知の核内レセプターである Ad4BP/SF-1 と Dax-1 の 5 種類を対象としている。Ad4BP/SF-1 と Dax-1 は分子内にリガンド結合ドメインと予想される領域を有しているがいまだに本来のリガンド分子は同定されていない。この2つのレセプターは生殖腺や副腎皮質などのステロイドホルモン産生組織の分化に不可欠な転写因子であり、また、その転写活性は生体内でのステロイドホルモン量の変動を調節している。したがって、これらの転写因子を用いたアッセイを組むことができれば、これまでエストロゲンレセプターやアンドロゲンレセプターに絞られてきた内分泌かく乱物質の研究を生殖腺に対する影響も含めて多面的に展開することができ、幅広い内分泌かく乱候補化学物質のスクリーニング法の開発が期待される。アッセイに用いるレセプターを供給するために、5 種類のレセプターについてバキュロウイルスを用いた発現システムにより昆虫細胞での発現、精製を行った。得られたレセプターについて性状解析を行った。一方、表面プラズモン共鳴センサーを用いて α 型エストロゲンレセプターとホルモン応答 DNA 配列との相互作用を測定する系を小野班員の指導の下で構築した。即ち、予め化学物質とレセプターを共存させた後、レセプターとホルモン応答 DNA 配列との相互作用を測定し、結合反応の結合速度定数および解離速度定数を算出する。本来のリガンドであるエストロゲン存在下

での反応速度と化学物質存在下での反応速度とを比較することにより、化学物質のホルモンレセプターへの作用に関してより詳細な知見を得ることができる。アッセイ系を検証するために、複数の化学物質について測定を行った。さらに、大規模なスクリーニングが可能なアッセイ系の確立のために、このエストロゲンレセプターアッセイ系をハイスループット化するための技術開発を行った。

研究方法

① ホルモンレセプターの発現と精製

レセプターを安定的に供給するために、 α 型エストロゲンレセプター($ER\alpha$)、 β 型エストロゲンレセプター($ER\beta$)、アンドロゲンレセプター(AR)、さらにリガンドが未知の核内受容体であるAd4BPおよびDax-1の5種類のホルモンレセプターの発現、精製を試みた。

レセプターの発現:レセプターの発現には Bac to Bac Baculovirus 発現系を用いた。GibcoBRL社から購入したバキュロウイルス用のマルチサイトベクターpFASTBACに各レセプターのcDNAを挿入した発現ベクターを構築した。このベクターを用いると目的のタンパク質はN末端に6個のHisをつけたHis融合タンパク質として発現される。これを昆虫細胞sf21(GibcoBRL社)に感染させウイルス粒子を調整する。調整したウイルス粒子ストックをさしsf21細胞に感染させる。この際により発現量を上げるために細胞とウイルスの至適濃度(Multiplicity of Infection, MOI)を確認した。また感染後、経時的に発現量を測定してそれぞれの目的タンパク質発現の至適時期を確認した。こうして得られた至適条件下で細胞を培養、回収した。

レセプターの精製:回収した細胞は可溶化バッファーに懸濁し、超音波処理後、レセプター毎にそれぞれの精製法により精製した。

α 型エストロゲンレセプター($ER\alpha$)

↓ $ER\alpha$ のエストロゲン応答配列DNA(ERE)へのアフィニティーを利用して磁性ビーズ法により精製した。

可溶性画分に Poly dl/dC 500 μ g を添加し、4

°Cで1時間静置。

↓ERE配列を含むビオチン化DNA 20 μ mol を添加し、4°Cで5時間静置。

↓トレプトアビジン(SA)コートした磁性ビーズを添加しビオチン化DNAに結合した $ER\alpha$ を回収した。
↓磁性ビーズを洗浄バッファーで5回洗浄した後に、溶出バッファーでビオチン化DNAから $ER\alpha$ を溶出させた。

可溶化バッファー: 50mM Tris-HCl pH8.0、100mM KCl、1mM PMSF、1mM 2-ME、1% NP-40

洗浄バッファー: 50mM Tris-HCl pH8.0、100mM KCl、1mM 2-ME

溶出バッファー: 50mM Tris-HCl pH8.0、1 M KCl、1 m M 2-ME、1 m M EDTA、10% Glycerol、0,05% Tween20

β 型エストロゲンレセプター($ER\beta$)

$ER\beta$ は昆虫細胞では発現量が上がらなかったため、大腸菌を用いて発現させた。発現した $ER\beta$ の大半が不溶性画分に来るために、グアニジンで可溶化後、リフォールディングをしながらHisタグによるアフィニティー精製を行った。

↓不溶性画分をグアニジン塩酸塩で変性させ、 $ER\beta$ を可溶化した。

↓可溶性画分をNiキレートしたHisタグ精製用NTAカラムに添加し $ER\beta$ を吸着させ、洗浄バッファーで洗浄後、グラジエントを掛けながら徐々に巻戻しバッファーに置換し $ER\beta$ のリフォールディングを行い、溶出バッファーで溶出した。

可溶化バッファー: 20mM Tris-HCl pH8.0、0.5M NaCl、5mM Imidazole、6M Guanidine-HCl 1mM 2-ME

洗浄バッファー: 20mM Tris-HCl pH8.0、0.5M NaCl、20mM Imidazole、6M Urea、1mM 2-ME

巻き戻しバッファー: 20mM Tris-HCl pH8.0、0.5M NaCl、20mM Imidazole、1mM 2-ME

溶出バッファー: 20mM Tris-HCl pH8.0、0.5M NaCl、0.5M Imidazole、1mM 2-Me、10% Glycerol

アンドロゲンレセプター(AR)

His タグによるアフィニティー精製を行った。

↓可溶性画分に His タグ精製用ニッケルキレート NTA アガロース 500 μ l を添加し 4°C で 1 時間混合した。これをカラムに充填し、10 倍容量の洗浄バッファーで洗浄した。

↓1ml の溶出バッファーで AR を溶出した。

Ad4BP

Ad4DNA を用いた磁性ビーズによるアフィニティー精製を行った。操作方法は ER α と同じ。

Dax-1

リフォールディングをしながら His タグによるアフィニティー精製を行った。操作は ER β と同じ。

② ER α -ERE アッセイ

表面プラズモン共鳴センサー (BIACORE) を用いた α 型エストロゲンレセプターのアッセイは国立医薬品食品衛生研究所の小野らの方法に従って行った。表面プラズモン共鳴センサーのセンサーチップ上にエストロゲンレセプターのホルモン応答 DNA 配列 (ERE) を固定化し、ここに予め化学物質と共存させた精製 ER α をインジェクトし、ER と ERE の結合を観察する (図 2)。

②-1 BIAOCRE によるアッセイ法

使用機器: BIACORE 3000

センサーチップ: ストレプトアビジンを固定化したセンサーチップ SA を使用

ランニングバッファー: 25mM Tricine、160mM KCl、5mM MgCl₂、0.05% Tween20 (pH 7.8)

再生バッファー: A 0.05 % SDS、B 10mM TE バッファーは調整後フィルターボトルでフィルター、脱気する。pH は、厳密にあわせる。

流速: 20 μ l/min.

アナライト (ER) のインジェクト: 結合 2 分間、解離 2 分間の kinject mode を使用

アナライトの再生: 1 回目 0.05 % SDS 1 分間インジェクト、2 回目、10mM TE 30 秒インジェクト

アッセイサイクル: 1 サイクル約 10 分

②-2 センサーチップへの ERE の固定化

リガンド: ビテロジェニンの ERE 配列を含む 5' をビオチン化した 34 mer の合成オリゴマーを用いた。

biotin-sense ERE:

5'-biotin-tcgagcaaagt caggtcacagt gacctgatcaat-3'

antisense ERE:

5'- attgatcaggtcactgtgacctgactttgctcga-3'

↓ BIACORE 3000 に SA チップを dock し、ランニングバッファーを流した後、50mM NaOH (1M NaCl 含む) を 1 分間、3 回インジェクトし、さらに再生バッファー A、B で 1 回ずつ洗浄する。

↓ ビオチン化した 1mg/ml の biotin-sense ERE をランニングバッファーで 10,000 倍希釈する。ERE の相補鎖である 1mg/ml の antisense ERE はランニングバッファーで 100 倍希釈し、いずれも 95°C で 5 分間加熱後、急冷して直鎖化する。

↓ 流速 5 μ l/min でフローセル 2 に biotin-sense ERE を Manual Inject で添加し、結合量を観察しながらセンサーチップに約 60RU 固定する。何も固定しないフローセル 1 をブランクコントロールとして使用する。

↓ antisense ERE を 2 分間 Inject し、固定化した ERE とアニーリングさせ、SA チップ上に 2 本鎖 DNA を約 120RU 形成させる。

↓ 再生バッファー A、B で 1 回ずつ洗う。

↓ ポジティブコントロールとして ER 10nM + エストラジオール (E2) 100nM のサンプルをインジェクトして、適度な結合レスポンスが得られることを確認したのち、biotin をインジェクトして、free の SA をマスクする。

②-3 ER の調整

↓ 化学物質を含む DMSO 溶液 1 μ l を 500 μ l のランニングバッファーに希釈する。

↓ ER を 20nM となるようにランニングバッファーに希釈する。

↓ 各々の溶液を 40 μ l ずつサンプルチューブに取り、37°C、5 分間加熱後、4°C に冷却した BIACORE 3000 のサンプルラックに乗せる。

↓ 上記サンプルを下記のプログラムに従って ERE を固定化した SA チップにインジェクトする。

↓ センサーチップの再生は 0.05 % SDS, 10mM TE で行う。

*この時、サンプル中の ER 最終濃度は 10nM、化学物質濃度は元の濃度の 1/1000、DMSO は 0.1 %となる。

*アッセイ法の至適化には市販品の ER α (PanVera 社製)を用いた。

②-4 被検化学物質の調整

↓ 化学物質を 0.1M となるように DMSO に溶解。溶解しない場合は見かけ上溶解するまで DMSO で希釈する。

↓ 化学物質が溶解した濃度を基準とし、10 倍ずつ 5 段階、DMSO で希釈する。

↓ 5 段階の希釈サンプルを 4mL ガラスバイアルに入れ、-30°C で保存。

②-5 被検化学物質のスクリーニング

一次アッセイとして各化学物質毎に 5 段階 (化学物質の溶解度によっては 3-4 段階) の濃度で ER と ERE の相互作用を測定し、ER の結合について濃度依存的活性化作用の有無を調べた。アッセイサイクル毎に化学物質を加えないサンプルをネガティブコントロール、100nM E2 を加えたサンプルをポジティブコントロールとして測定し、E2 存在下での ER の ERE への結合量との比を求めた。すなわち測定結果から以下の式で得られる相対的な活性化度 (% activation) を求めて比較した。

% activation = (化学物質存在下での結合量 - ネガティブコントロールでの結合量) / (100 nM E2 存在下での結合量 - ネガティブコントロールでの結合量) x 100。さらに ER の結合活性の経時的低下の影響を補正するために、各化学物質毎に 1 セットのスクリーニングの最初と最後に測定したネガティブコントロールおよびポジティブコントロールの結合量からサイクル毎の ER 結合活性の低下率を求め、これから各サイクルでのネガティブコントロールおよびポジティブコントロールの推定結合量を算出し、この値をもとに対象被検化学物質の活性化度を % で表わし、被検化学物質の濃度との相関を解析した。次に一次アッセイで ER の結合促進が見られた化学物質の一部について、反応速度論的解析を

行うために、化学物質の濃度を一定にし (一次アッセイで結合促進が観察されたうち最も低い濃度を採用した)、ER の最終濃度をそれぞれ 10, 20, 40 nM と振って ER と ERE の結合を測定し、この結果の解析から、結合速度定数 (k_b)、解離速度定数 (k_d) を求めた。データ解析は BIACORE に付属する BIAevaluation ソフトウェアを用いて行った。

③ AR-ARE アッセイ

表面プラズモン共鳴センサー (BIACORE) を用いたアンドロゲンレセプターのアッセイは、センサーチップ上にアンドロゲンレセプターのホルモン応答 DNA 配列 (ARE) を固定化し、ここに予め化学物質と共存させた精製 AR をインジェクトし、AR と ARE の結合を観察した。ランニングバッファー、再生バッファー等は前述の ER-ERE のアッセイと同様の条件で行った。センサーチップに固定化した ARE の DNA 配列を以下に示す。

biotin-sense ARE:

5'-biotin-actagctctttgatcagaacactgtgttctgaactt-3'

antisense ARE:

5'- aagttcagaacacagtggttctgatcaaagagctagt-3'

④ Ad4BP-Ad4 アッセイ

Ad4BP-Ad4 アッセイは SA チップにビオチン化した Ad4 配列をもつ DNA フラグメントを固定化し、ここに精製 Ad4BP をインジェクトし、結合を観察した。ランニングバッファー、再生バッファー等は前述の ER-ERE のアッセイと同様の条件で行った。センサーチップに固定化した Ad4DNA 配列を以下に示す。

biotin-sense Ad4:

5'-biotin-actagctctttgatctcaaggtcagaactt-3'

antisense Ad4:

5'-aagttctgaccttgatcaaagagctagt-3'

研究結果

① ホルモンレセプターの発現・精製: 各レセプターごとに最適なウイルスタイター、MOI、発現までの time course を得る実験を行った。その結果を図 3 に示す。各レセプター精製品の SDSPAGE、ウエスタンブロットを図 4 に示す。

ER α : 昆虫細胞での ER α の発現量は低く、感染、培養条件をいろいろ変えてみたが、これ以上発現量を上げることはできず、必要量を精製するために大量培養を行った。また、精製にあたっては、His タグを利用した NTA アフィニティーカラムで得られたレセプターには活性のない場合が多かった。そのために ERE に対するアフィニティーを用いて結合活性をもつレセプターのみを精製することにした。可溶化画分をビオチン化した ERE を含む DNA フラグメントと反応させた後、SA を付けた磁性ビーズと混合し、アフィニティー精製を行なった。この方法により 2.1 リットルの培養液(可溶性タンパク質 900 mg)からスタートして約 100 μ g の DNA 結合活性をもった ER α を得ることができた。

ER β : ER β は昆虫細胞ではほとんど発現を見ることができず、宿主細胞を大腸菌に変えて発現させた。発現したレセプターは封入体に不溶性タンパクとして存在するために、精製にあたってはグアニジンで変性させ、その後リフォールディングを行うという方法をとった。この方法により SDS-PAGE で観察されるバンドが 1 本の夾雑物のないレセプターを 300 μ g 得ることができた。

AR: 200ml の培養液(可溶性タンパク質 80mg)から約 100 μ g の AR を精製した。ウエスタンブロットの結果をみると AR のトランケート産物あるいは分解産物とおもわれるバンドが多数含まれている。

Ad4BP: Ad4BP の場合も ER α と同様に DNA 結合活性を利用したアフィニティー精製を行った。400ml の培養液(可溶性タンパク質 150mg)から約 150 μ g の Ad4BP を精製した。ウエスタンブロットから本来の Ad4BP より分子量の小さい分子もほぼ等量存在していることがわかる。

Dax-1: Dax-1 は昆虫細胞で発現させたが、大部分が不溶性画分にくるためにグアニジンによる変性処理を行い精製した。ウエスタンブロットの結果から、トランケート産物あるいは分解産物が多数含まれていることが見られた。

② 精製レセプターの性状解析: 精製したレセプターを用いて BIACORE で結合活性を測定した。

ER α : 定法にしたがって ERE を固定化した SA チップに精製 ER α をインジェクトして ER の結合を観察した(図5)。市販品の ER α と比較すると、結合活性が低く、E2 100nM、ビスフェノール A(BPA) 100nM 存在下での結合促進も見られなかった。このため、これ以降の被検化学物質のスクリーニングは市販品の ER α を用いることとした。スクリーニングのために活性を保持したレセプターを安定的に調整するには、今後さらに発現、精製の条件の検討が必要と考える。

AR: 精製した AR を用いて BIACORE で活性を測定した。ER α のアッセイ法と同様に、SA チップにビオチン化した AR が認識する結合配列をもつ DNA フラグメントを固定化し、ここに精製 AR をインジェクトした。これまでの実験では AR の ARE への結合は見られなかった。さらにテストステロン 100 nM、ジヒドロテストステロン(DHT)100 nM 存在下でも AR と ARE の結合は観察されなかった。AR の安定性、アッセイ条件の至適化等今後さらに検討が必要である。

Ad4BP: 精製した Ad4BP を用いて BIACORE で活性を測定した。ER α のアッセイ法と同様に、SA チップにビオチン化した Ad4 配列をもつ DNA フラグメントを固定化し、精製 Ad4BP をインジェクトした。結合を示すセンサーグラムを図6に示す。Ad4BP は濃度依存的に AD4 サイトに結合し、データ解析により 2 分子の反応速度定数を求めた。

Dax-1: Dax-1 は Ad4BP と結合することが予測されている。しかしながら、これまで 2 分子の結合を直接示すデータは得られていない。今回精製した Ad4BP と Dax-1 を用いて BIACORE で 2 分子の結合を測定してみた。Ad4BP をセンサーチップに固定しここに Dax-1 をインジェクトした。また、逆に Dax-1 を固定化し Ad4BP をインジェクトする実験も行ってみた。現在までのところ、Ad4BP と Dax-1 の結合を証明できるデータは得られていない。今後、アッセイの条件を再検討する予定である。

③ ER α -ERE アッセイの至適化

ERE の DNA 配列:アッセイに用いた ER はヒト由来のレセプターであるが、ERE については強い結合の見られるビテロジェニン遺伝子の ERE 配列を用いた。より大きな結合あるいは被検化学物質による特異性を検出する可能性を求めて、現在、ヒトの遺伝子由来の ERE を用いて比較検討を行っている。

センサーチップの再生条件:ハイスループットのスクリーニング法を確立する上で、アッセイ系の再現性は最も重要な要件である。BIAcore を用いたアッセイの場合、センサーチップをいかに十分に再生できるかが再現性の鍵となる。前年度の研究においても、センサーチップの再生条件についてさまざまなバッファー条件を組み合わせながら検討した。その結果、0.05% SDSを1分間、次に TEを30秒インジェクトするという再生条件が設定された。しかしながら、その後、多数の化学物質を用いて繰り返し測定を行う過程で、この条件でもセンサーチップの再生は不十分であり、サイクルを重ねると次第に結合シグナルが減少する傾向が観察された。従来、このアッセイでは結合シグナルが 50-150RU 程度で測定を行っており、化学物質の種類によってはサイクル毎にベースラインが 10-20RU も上昇してしまうと、センサーチップの ER の結合能が落ちサイクルを繰り返して測定すると同じサンプルでも結合シグナルが減少してしまうという問題に直面した。ハイスループットを目指すスクリーニング法にとっては致命的な問題である。センサーグラムを詳細に検討したところ、DNA を固定化していないブランクのフローセルではベースラインは安定であるが、ERE の DNA を固定化したフローセルでのみサイクルを重ねる毎にベースラインが上昇して行くことが判明した(図7)。これはインジェクトしたサンプル中に含まれるなんらかの物質が SDS では再生しきれずに次第にセンサーチップに固定化した DNA 上に蓄積していることを示唆している。これを解決するために、さまざまな再生方法をさらに検討した結果、アッセイサイクル毎に antisense DNA を解離させ、新たに antisense DNA をアニーリングさせる方法によって最良の再生結果を得ることができると判った。この再生法では 12 サイクル連続して測定した場合で

も、最初と最後のベースラインの上昇は 30-40RU 程度であり、再生が大幅に改善され、アッセイ系の再現性が大きく向上した(図8)。

ER α の安定性:リガンドが結合していない状態の ER α は非常に不安定である。化学物質のスクリーニングには 1 セットの測定毎にポジティブコントロールとして E2 100nM、ネガティブコントロールとして化学物質を加えない ER のみのサンプルを測定の最初と最後に測定している。現在の 1 サイクルの所要時間が約 15 分であり、化学物質の濃度を振った 1 セットの測定には 2-3 時間程度の時間を要する。この間に ER の活性をなるべく保持すべく条件検討を行った。昨年度の研究では化学物質と ER をプレインキュベートする場合、室温で 1 時間反応させた後、測定まで 4℃で保持していた。しかしながら、この方法では ER の活性は短時間の内に落ちてしまい、結果の判定が困難なケースが多かった。その後国立医薬品食品衛生研究所の小野らの検討で化学物質との反応を 37℃ 5 分間行い、その後 4℃に急冷することにより、結合シグナルは相対的に小さくなるが、活性の安定性は増すことが見出された。この方法で ER の活性の安定性を 12 サイクルの実験で確認したところ、化学物質なしの場合 12 サイクル目で最初の活性の約 65-80%、E2 存在下では 85-95%という結果が得られた(図8)。さらに ER の安定性の問題を検討する。

アッセイの至適化、ハイスループット化:アッセイの再現性、堅牢性を向上させるためにセンサーチップの再生条件、ER の安定性等考えられる要因について検証作業を行なった。数十種類の化学物質を用いたプレリミナリーなスクリーニングを行った結果をもとにアッセイ系の再現性に影響を及ぼす可能性のある要因を拾い上げ、改善するための確認を繰り返しおこなった。次のサイクルへの化学物質のキャリーオーバーをなくすための洗浄操作プロトコルも検証した。これらの結果から、アッセイのための制御ソフトウェアを開発した(図9)。今後はこれをさらにハイスループット化するための検討が必要である。

④ 被検化学物質のスクリーニング

これまでに開発したアッセイの有効性を検証するために多数の化学物質を用いたスクリーニングを行った。まず、一次スクリーニングとして化学物質毎に5段階の濃度で測定を行った。これまでに60種類の化学物質について一次スクリーニングを行った。ただし、このスクリーニングではERと化学物質のインキュベーション条件、センサーチップの再生条件等は昨年度に設定した条件で測定した。このスクリーニングの過程で前述のセンサーチップの再生条件等再現性を左右する条件が明らかになり、それらの改善を行ったために、このスクリーニングの結果は必ずしも比較検討できない。今後、改良したアッセイプログラムに沿って再スクリーニングを行う予定である。一次スクリーニングでERの結合に変化をおよぼす結果が得られた化学物質の一部について、二次スクリーニングとしてその結合反応の反応速度論的解析を行った。ビスフェノール A (BPA) について反応速度論的解析を行った連続測定の一例を図9に示す。この解析においてはBPAがERの結合を促進することが示されている。結合速度定数、解離速度定数を解析したところ、測定データは解析ソフトウェアに組み込まれている1:1の結合モデルには必ずしも一致はしなかった。また、解析結果からはE2とBPAでは結合速度定数、解離速度定数の差異は確認できなかった。これまでの実験から化学物質の影響を判定する基準としては、100 nMのE2をポジティブコントロールとし、化学物質なしをネガティブコントロールとして、E2存在下でのERのEREへの結合量に対する化学物質存在下でのERのEREへの結合量の比で表す相対的な活性化度(% activation)が最もよい指標となると考えられた。

こうした検討によって確立した新たなアッセイ方法の有効性、再現性を確認するために30種類の被検化学物質についてスクリーニングを2回行った。第1回目のスクリーニングの結果を図10に、第2回目のスクリーニングの結果を図11に示す。各被検化学物質とも1-100,000 nM(溶解度によっては1-10,000 nM)で測定を行った。化学物質毎に1セットのセンサーグラムの重ね書き、サイクル毎の結合量、被検化学物質の濃度と相対活性化度の相

関を示した。仮に3段階の判定基準を設けて、スクリーニングの結果から30品目の化学物質を分類してみた。その判定基準は、100nMにおいてE2と比較して50%以上の活性化が起こる物質を高反応性物質(high responder)、20-50%の活性化が起こる物質、あるいは20%よりも低いがあきらかに濃度依存的に活性化が見られる物質を低反応性物質(low responder)、活性化が20%以下の物質を無反応性物質(non-responder)とした。分類した結果を表1に示す。1回目と2回目のスクリーニングの結果を比較すると、30品目のうち、28品目で同じ判定結果が得られた。判定が異なった2品目についても、一部データに不備があったために充分判定できなかったのものであり、今後さらに測定を繰り返して再確認する。アッセイの再現性をみるために、各被検化学物質毎に1回目と2回目の相対活性化度の結果をグラフに重ね書きした(図12)ところ、ほとんどの化学物質で2回のスクリーニングの結果はほぼ同様の濃度依存カーブが得られており、このアッセイ法の再現性の高さが確認された。

(2)-2. 内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発(分担研究者:小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部):

研究目的:本研究では、内分泌かく乱物質のレセプターを介した生体作用における、セプターシグナル伝達系の個々のステップへの影響を解析し、その結果をもとにした新規ハイスループット(HTPS)系への応用を目的としている。これまでに、表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー(BIAcoreTM)を用い、化学物質のエストロジェンレセプター(ER)への結合がERとそのレスポンスエレメント(ERE)との相互作用に及ぼす影響の検討を行い、ERに結合した化合物により大きく異なる相互作用変化を引き起こすことから、それぞれの結合したERではDNA結合ドメイン(DBD)の立体構造が異なることを示してきた。本年度はER-ERE結合とともにリガンド依存性遺伝子制御における重要なステップであるERとコファクターの結合に及ぼす各種リガンドの影響を同様に検討した。

研究方法:ERE 固定センサーチップの作成:ストレプトアビジンを予めコートしたセンサーチップにエストロゲンのレスポンスエレメントを含むビオチン化合物オリゴヌクレオチド(5'- Biotin- tcgagcaaagtcAGG TCAcagTGACCTgatcaat-3')をインジェクトして固定化し引き続き、相補配列のオリゴヌクレオチドをインジェクトしてセンサーチップ上でアニーリングさせ ERE センサーチップを作製した。

コファクター結合モチーフ固定化センサーチップの作成:ER-コファクター相互作用を検討するにあたっては、ER による遺伝子発現においてコファクターとして機能することを示す TIF2 の ER 結合サイトをコードするオリゴペプチドを合成して用いた。すなわち、活性化 ER はコファクターの LxxLL モチーフと相互作用することが知られている。そこで、TIF2 の LxxLL モチーフを含む領域のペプチドをコファクタープローブとして用いた。TIF2 は 3 つの LxxLL モチーフを有するが、実験では第 2 モチーフを含むビオチン化ペプチドを合成して、ERE と同様にストレプトアビジンコートセンサーチップに固定化した。

相互作用の測定:ER は、リコンビナント Human ER α を使用した。予備検討の結果 E2 結合 ER は ER-ERE 相互作用解析における測定条件下で特異的結合を示すことが確かめられたため ER-ERE および ER-LxxLL 相互作用いずれも同じ条件下で測定を行った。ER をバッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8, 160mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Tween 20)で希釈して、対象化合物と混合し、37°C で 5 分間インキュベートした後、サンプルを ERE および LxxLL を固定化したセンサーチップにインジェクトして SPR 装置(Biacore 3000, BiacoreAB) を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。化合物の結合による相互作用への影響を解析するにあたっては、化合物を 10⁻⁵~10⁻⁸M の濃度範囲で 10nM ER と混合し、ER の ERE および LxxLL ペプチドに対する結合解離過程を測定した。

解析:各化合物の存在下及び非存在における結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してそのレスポンスの変化を比較した。また、2 分間のレスポンスの

増加を、結合量として求めた。解析は市販のコンピュータソフト(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)および JMP ver.3(SAS institute))を用いて行った。

研究結果:リガンド非存在下において ER の LxxLL ペプチドへの結合は認められなかった。一方、17 β -estradiol (E2) の共存により強い結合が E2 濃度依存的に認められた。ER-LxxLL 結合を引き起こす E2 の濃度範囲は ER-ERE 相互作用と同等であることから、E2 の結合が ER の DNA 結合ドメイン(DBD)およびコファクター結合ドメイン双方の構造を変化させることが示された。一方、アンタゴニストである ICI-182,780 (ICI) やパーシャルアンタゴニストの 4OH-Tamoxifen (OHT) では、いずれも ER の LxxLL への結合を引き起こさなかった。そこで、これらのアンタゴニストと E2(10⁻⁸M)とを共存させて測定を行ったところ、E2 による ER-LxxLL 相互作用はアンタゴニスト濃度依存的に阻害された。次に、エストロゲンアゴニストおよびレポーターアッセイ系などでこれまでにエストロゲン様作用が報告されている化合物について同様に ER-LxxLL 相互作用への影響の検討した。エストロゲンアゴニストとして用いられる Diethyl-stilbestrol (DES や Ethynyl-estradiol (EE))は、E2 と同程度の ER-LxxLL 結合活性を示した。これらの化合物による ER-ERE 相互作用の変化に E2 との差は認められないが ER-LxxLL 最大反応を示す濃度下での反応カーブを示した。DES や EE による最高アフィニティーは E2 に比べて若干弱く、コファクター結合サイト近傍即ち ER-LBD 立体構造が異なることを示している。さらに、内分泌かく乱物質としての作用が懸念される Bisphenol-A (BPA) や植物エストロゲンである Genisteine (Gen)、 Coumesterol (CS) について同様の検討を行ったところ、いずれの化合物でも同様に ER の LxxLL 結合を引き起こすものの、最大作用濃度下においても BPA ではその作用は非常に限定的であり、また Gen についても E2 と比較して結合解離反応は大きく異なっていた。一方、Gen と同じ植物エストロゲンである CS では E2 とほぼ同程度の結合を引き起こし、Gen と CS はいずれも植物エストロゲンであるが、その ER への作用は大きく異なることが示唆された。相互作用変化における化合物濃

度との関係は、これまでに GST pull-down や yeast two hybrid 系を用いて報告されている ER-TIF2 相互作用変化の報告結果と一致した。これらの化合物は、ER-ERE 相互作用解析においてわずかであるが E2 と異なる結合解離パターンを示すこととあわせて、それぞれの化合物が ER の立体構造に及ぼす影響が異なることを明らかに示しており、生体内における化合物特異的作用との関連が示唆された。

C. 結論

(1) ハイ・スルー・プットスクリーニング

(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究は、(1)-1. レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究（主任研究者：(財)化学物質評価研究機構に対する委託業務）および(1)-2. 超高速選別法の検証の評価に関する調査研究（分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部）よりなり、前者委託研究では通産省との共同研究として、EDSTAC が提案した化学物質の内分分泌かく乱作用の有無を評価する方法としてのヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系の有用性を独自の立場から検討した。その結果、Firefly Luciferase 遺伝子上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER alpha を常時発現するための Plasmid が同時に且つ安定的に組み込まれた細胞を使用し、177 物質の化学物質についてその ER alpha アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、アゴニスト検出系では 29 物質、アンタゴニスト検出系では 6 物質が比較的強い活性を有する物質として選出された。本法により選出された物質の in vivo 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要があるが、本法の簡便さ、短時間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点などから、有用な内分分泌かく乱化学物質試験法の候補になるものと思われる。後者研究によって、米国 EPA/EDSTAC、OECD との連携の方向で国際的な研究の必要性が示されてきたが、欧州共同体(EU)諸国の参加を得、今後の研究の継続の重要性が改

めて認識された。

(2)表面プラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)の開発研究は、(2)-1. 「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」(主任研究者:ピアコア株式会社に対する委託業務)(2)-2. 内分分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発(分担研究者:小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)よりなる。内分分泌かく乱物質の受容体を介した作用は、その結合による受容体立体構造変化により惹起される。受容体構造の変化は、DNA や他の生体分子との相互作用を変化させることでこれに続く生体反応を引き起こすことから、それぞれの化合物が受容体構造に与える影響を検討することにより、その生体作用を受容体作用メカニズムに応じて検討することが可能である。これまでに ER-ERE 相互作用の変化が結合した化学物質の生体作用を反映することを示してきた。今回これにあわせて、コファクターとの結合においても結合した化合物により大きく異なることが明らかになった。

D. 考察及び今後の展望

177 物質の化学物質についてその ER alpha アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、アゴニスト検出系では 29 物質、アンタゴニスト検出系では 6 物質が比較的強い活性を有する物質として選出された。本法により選出された物質の in vivo 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要があるが、本法の簡便さ、短時間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点などから、有用な内分分泌かく乱化学物質試験法の候補になるものと思われる。また、内分分泌かく乱物質の作用メカニズムに焦点をあてたスクリーニング法の開発のためにホルモンレセプターを用いたアッセイ方法の開発研究については、5 種類のホルモンレセプターの発現、精製を行うことにより得られたレセプターを用いてアッセイ法の開発を試みた結果、さら

に ER α についてはすでに開発されたアッセイを高精度、ハイスループット化するための至適化研究に多くの改良を行うことにより、堅牢なアッセイの開発にはレセプター特に ER α の安定性が大きな課題であることが明らかになった。さらに再現性の高いアッセイを組むための検討を行い、アッセイの精度、効率等の改善を加える予定である。また、2001年3月に OECD の傘下で開催された「内分泌かく乱化学物質に関する世界規模戦略開発に向けての国際協調のための提案」と題する日米欧3局会合に観るように、すでに構築された本問題に関する研究協力・連携体制によって内分泌かく乱作用が疑われる化学物質を効果的にスクリーニングするための手法を中心とした試験法の開発等に鋭意取り組むことを目的としてヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系の扱いを継続検討している米国 EPA、OECD などの国際機関と連絡を密に取り、世界的協調およびデータ互換の立場から本研究の遂行、また国際的な位置付けからも今後の研究の継続の重要性が改めて認識された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T., Review Prevention of the down-regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol., *Carcinogenesis*. 21(9):1671-6, 2000

Iwama T, Kamikawa J, Higuchi T, Yagi K, Matuzaki T, Kanno J, Maekawa A., Development of invasive adenocarcinoma in a long-standing diverted ileal J-pouch for ulcerative colitis: *Dis Colon Rectum*. 43(1):101-4, 2000

Fujiwara M, Okayasu I, Oritsu M, Komatsu J, Yoshitsugu M, Katoh Y, Bandoh T, Toyoshima H, Kase Y, Sugihara K, Kanno J, Hayashi Y., Significant increase in prostaglandin E-main urinary Metabolite by laxative administration: comparison with ulcerative colitis., *Digestion*.;61(3):201-6, 2000

菅野 純, 内分泌かく乱化学物質試験法-スクリーニング試験法、測定法、毒性試験:In vivo 系を用いた暴露試験による評価, *日本臨床*, 58, 12, 121-127, 2000

菅野 純, 内分泌かく乱のメカニズムを考慮した生物試験, *医学のあゆみ*, 190, 751-752, 1999

菅野 純, 他, 内分泌かく乱化学物質の生物影響, *ファルマシア* (日本薬学会), 35, 219-223, 1999

菅野 純, 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から, *有機合成化学協会誌*, 57, 35-39, 1999

Byung-IIYoon, Yoko Hirabayashi, Yasushi Kawasaki, Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, Daeyong Kim, and Tohru Inoue, Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells(CFU-GM), *Experimental Hematology*, 29, 278-285, 2001

Thakahashi Y, Koizumi K, Takagi A, Kitajima S, Inoue T, Koseki H, Saga Y, Mes2 initiates somite segmentation through the Notch signaling pathway. *Nat Genet.*, 25, 390-6, 2000

Kitajima S, Takagi A, Inoue T, Saga Y, MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* 127: 3215-26, 1999

Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T, MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126(15): 3437-47, 1999

小野敦, 井上達, ホルモン様化学物質と”内分泌攪乱”, *病理と臨床* 18 / 7 707-714(2000)

2. 学会発表

Kanno J, Kato H, Inoue T, Uterotrophic effect of dietary genistein/daidzein-Modification of NIH-

07 open formula-.Hormones and Endocrine Disrupters in Food and Water: Possible Impact on Human Health Copenhagen, Denmark, 27-30 May 2000

Kanno J, Kato H, Iwata T, and Inoue T, A Modified NIH-07 open formula a diet containing undetectable genistein/genistin and daidzein/daidzin reduces uterine weights in ovariectomized rats, Gordon conference - Environmental Endocrine Disruptors-, Plymouth State College Plymouth, New Hampshire June 18-24, 2000

Kimie Sai , Jun Kanno, Tohru Inoue, and Toyozo Kaneko, Effects of TCDD on GJIC and cell growth in v-ras-transfected rat liver epithelial cells. Dioxin 2000, August 13-17, 2000

Jun Kanno, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa, James. E . Trosko and Tohru Inoue, Prevention of the down-regulation of gap junctional inter-cellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology ASIATOX II, August 23-25, 2000

A. Ono, J. Kanno, and T. Inoue,; Conformational changes on ER α induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone Symposia; Nuclear Receptor 2000 (E3), 2000.3.

A. Ono, J. Kanno, and T. Inoue,; MOLECULAR ASPECTS OF FUNCTIONAL DIFFERENCES AMONG ESTROGEN RECEPTOR LIGANDS
11th International Congress of Endocrinology, 2000.10.

J. Kanno, K. Igarashi, A. Ono, M. Takeyoshi, M. Takatsuki, A. Kubo, A. Itai, and T. Inoue, : Estrogen receptor alpha point mutation altered responses to flavones in the reporter assay.

11th International Congress of Endocrinology, 2000.10.

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

図 1 エストロゲンレセプターの作用機構

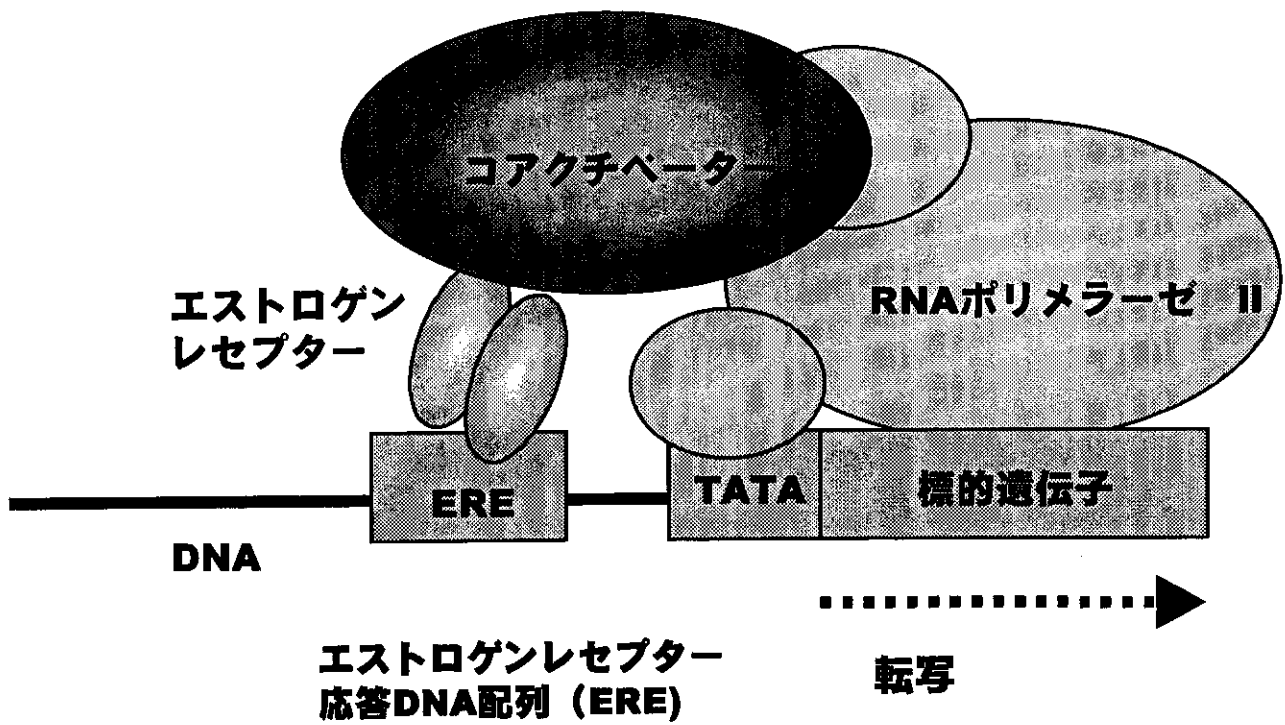


図 2 表面プラズモン共鳴高速分析法 ER α - ERE のアッセイ

ERと化学物質を
プレインキュベート (37°C, 5分加温後 4°C静置)



EREを固定化した
SAセンサーチップヘインジェクト (結合2分間、解離2分間)



センサーチップの再生



EREとERの相互作用の解析
反応速度定数の算出

繰り返し

