

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^{-8} M 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。

4. 解析

各化合物の存在下および非存在における ER-ERE 相互作用の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ーソフト(BIAevaluation 3.0 (BIACORE AB) および JMP ver.3 (SAS institute)) を用いて行った。

C. 研究結果

1、ヒト遺伝子プロモーターERE 配列を用いた検討;

ヒト遺伝子由来 ERE 配列としてまず始めに ERE による制御が報告されている cathepsin D の上流プロモーター由来の ERE 配列を用いた検討において、これまで用いてきた測定条件では十分な結合が認められなかった(図 1)。不完全 ERE と ER とのアフィニティーについては、VitA2ERE の完全配列と比べ $10\sim 100$ 倍程度低いことがこれまでも報告されている。そこでこれらアフィニティーの低い ERE と ER の相互作用を検討するため測定条件の再検討を行った。検討の結果、buffer 中の Mg^{2+} 濃度が、これら低アフィニティー ERE と ER の相互作用に大きく影響することが明らかとなった。これは、 Mg^{2+} による DNA2 本鎖構造への影響によると考えられる。そこで不完全 ERE 配列への結合を検討するため Mg^{2+} および KCL 濃度を調整した。新たに調整した測定条件下で、代表的な ER リガンドによる ER-ERE 相互作用への影響を CathD、C3、Oxytocin、fos などの ERE を用いて検討した。図 2 に結果の一部を示す。検討した配列のうち特定化合物に特異的応答を示すものはなかったが、化合物ごとの相互作用の差はより

明らかに示され、HTTPS 系としてより有用であると判断された。

2、ERE 結合における ER2 量状態の実験的解析;

ER は ERE 対向配列に対して、ダイマーを形成して結合することが知られている。ヒト遺伝子プロモーター由来のいくつかの ERE では、対向配列の片側部分シーケンスが VitA2 とは完全に異なり、ER 結合サイトを片側しか持たないものもある。各種 ERE 配列における ER-ERE 相互作用の速度論解析の結果から、いくつかのシーケンスにおいて ER の結合速度が非常に遅いのみならず、固定化した ERE オリゴ量に対する最大結合量が理論値より低いことが示唆された。そこで、チップに固定化する ERE 量を変化させて、それぞれ ER-E2 複合体を結合がほぼ飽和するまでインジェクトして最大結合量を実験的に求め、ERE オリゴ 1 分子あたりに結合する、ER の分子数を求めた(図 3)。その結果、最大 ER 量は ERE オリゴ量に比例関係にあることが示され、さらに ER とそれぞれのオリゴとの分子量比から、VitA2 や C3 など対向配列を形成する ERE では、ERE1 分子あたり ER2 分子が結合し、Oxytocin や fos の片側 ERE では ERE1 分子あたり ER1 分子すなわちモノマーで結合していることが示された(図 4)。このことから、少なくとも本実験条件において ER は ERE 上でダイマーを形成する可能性を示唆した。

3、アダプターオリゴ法の検討;

測定結果の再現性の向上や相互作用プローブ固定化の簡便性の向上のためビオチン化プローブを直接結合させるプローブ固定化法にかえて、プローブを解離、再固定できる方法として新たにアダプターオリゴを用いた固定化法の検討を行った。すなわち、まず始めにビオチン化アダプターオリゴをあらかじめアビジン表面に固定化しておき、結合アダプター配列に相補の配列をセンス鎖に付加した 2 本鎖 ERE オリゴをハイブリダイズさせて固定化した(図 5)。アダプター配列としてヒトゲノムへの

blast によりホモロジーのないことが確認できた配列を用いた。また、測定 buffer の塩濃度が高いため短いオリゴでは、容易に解離してしまうことが示され、これらの検討より 18mer の配列を決定した (図 6)。始めにアダプターオリゴへの ER の非特異結合がないことを確認し、さらにアダプター付加 1 本鎖 ERE をハイブリして ER の結合が認められないことを確認した。次に、アダプター法で固定化した 2 本鎖 ERE に、E2 結合 ER サンプルをインジェクトして結合を確認した。引き続き NaOH をインジェクトして変性し、アダプターのみに残ったチップに再度サンプルを流して、結合がないことを確認した。また、同様のサイクルを繰り返し行い再現性を確認した。以上の結果より、本固定化法により適時 ERE オリゴプローブを解離、再固定することが可能であることが示された。

D. 考察

近年のマイクロアレイ等による遺伝子発現解析技術の進歩により、ERE により制御されることが知られる遺伝子であっても、その発現動態には大きな差があり、また同程度にエストロゲン様活性を示す化合物それぞれが *in vivo* における遺伝子発現への影響は、遺伝子ごとに大きく異なることが示唆されている。その全てが必ずしも ER を介したものではないとしても、それらの結果は単一の指標や限られた特定の遺伝子変化のみにより化合物の生体作用を予測することの困難を示している。エストロゲン様化合物の組織特異的作用には、臓器特異的に発現する転写共役因子の関与が示唆される一方で、同一組織においてさえも遺伝子発現への影響が異なる事実や、さらに我々がこれまでに示してきた化合物特異的な ER-ERE 相互作用は、ヒト遺伝子プロモーターにおいて見出されている多様な ER 結合配列における化合物特異的な ER 認識による可能性を示唆している。すなわち、ERE により制御され、かつ化合物特異的に発現する遺伝子プロモーターでは、化合物特異的な ER-ERE 相互作用が示される可能性を示唆している。

これまで ERE プローブとして用いてきたビテ

ロゲニン ERE(VitA2ERE)は、レポータージーンアッセイなどにも用いられる代表的な ERE シークエンスであるが、ヒトを始めとする哺乳動物プロモーターにおいてこれまで報告されている ERE ではないずれも数塩基が置換されたもので、VitA2ERE と完全に一致する配列は報告されていない。そこで、ER-ERE 相互作用のヒトにおける生理学的意義についてさらに解析するため、Vit-ERE にかえて、ER 結合が報告されているヒト遺伝子プロモーターにおける ERE 配列を用いて ER-ERE 相互作用解析を行った。はじめに、ER による制御が示されている CathepsinD の ERE について検討を行ったところ、VitA2ERE と ER の相互作用と同じ条件下では十分な結合を測定することは出来なかった。多くの不完全 ERE では ER とのアフィニティーが、VitA2ERE の完全配列と比べ 10 ~100 倍程度低いことがこれまでに報告されており、測定系がアフィニティーの強い VitA2ERE を用いて至適化したものであることから、今回の結果はそれらと一致するものと考察された。ビテロゲニンは両生類や魚類に発現するタンパクであり、それら体温の生物で ER-ERE 相互作用を引き起こす必要から非常にアフィニティーの高い配列を必要とするものと考察される。そこでアフィニティーの低い ERE と ER の相互作用を検討するため測定条件の再検討を行った。検討の結果、buffer 中の Mg^{2+} 濃度がこれら低アフィニティー ERE と ER の相互作用に大きく影響することが明らかとなった。これは、 Mg^{2+} による DNA 2 本鎖構造への影響によると考えられた。新たに至適化した条件で VitA2, cathepsinD, fos, C3 などの ERE 配列について、代表的な ER 作用物質による ER-ERE 相互作用を検討した(結果)。検討を行った ERE のなかで化合物特異的に ER が結合する配列は認められなかったが、新たな測定条件下において相互作用変化における化合物特異性はむしろ強く示された。今後、測定を行う ERE のバリエーションを増やし、各種 ER リガンドの違いによる、それぞれの ERE 結合における特異性について検討を行い、さらにその差と *in vivo* における遺伝子

発現との関連について検討することより各種 ER リガンドの化合物特異的生体作用の分子レベルでの解明が期待される。一方、各種 ERE 配列に対する ER の最大結合量を実験的に求めるため、チップに固定する ERE 量を変化させて、ER-E2 複合体を結合がほぼ飽和するまでインジェクトした結果から、VitA2 や C3 などの ERE では、ERE1 分子あたり ER2 分子が結合するのに対して、fos や Oxytocin などの ERE では ERE1 分子あたり ER1 分子すなわちモノマーで結合していることが明らかとなった。この結果は、少なくとも本実験条件において ER は ERE 上でダイマーを形成する可能性を示唆しており、さらに ER の遺伝子発現制御機構における ER 以外の核内因子との相互作用や、いくつかの報告にみられる ER リガンドではない化合物と ER リガンドとのシナジスティックな効果の可能性を示唆する結果と考察された。また、本研究により構築された系が ER の 2 量体形成機構の解析や ER2 量を阻害することによりアンタゴニスティックな作用を惹起する化合物の検出にも応用可能であることを示すものである。今後は、ダイメライゼーションの阻害が報告されている化合物を用いて検討を進める。

上記に合わせて、多種の ERE プローブとの相互作用解析を簡便に行うことおよび HTPS 系としてデータの再現性向上のための新たなプローブ固定化法の検討を行った。これまでの検討においては、センサーチップ上のストレプトアビジンにビオチン化プローブを直接結合して、ER との相互作用解析に用いてきた。これまでの検討からは、新たに作成したチップでの反応再現性は非常に良いものの連続測定を行った場合の。新たに調整したサンプルを用いた検討からチップに固定化したプローブ自体の不活性化による反応レベルの低下が認められており、特にオリゴヌクレオチドプローブでは、LxxLL ペプチドプローブに比べ反応不活性化が早いことが明らかとなっている。この原因としては、2 本鎖オリゴの螺旋構造の変化やプローブの切断、一本鎖への解離などが考えられるが、詳細は不明である。また、本

系で用いているアビジン-ビオチン結合は非常に強固であるが、測定-洗浄を繰り返すことで一部のプローブが脱離する可能性も否定できない。固定化プローブ量やプローブの ER 結合活性変化は、詳細な速度論解析に影響を及ぼすことから好ましくない。また、アビジン-ビオチン結合において、一度結合したプローブを完全に解離させることは不可能なため、プローブ固定化量の制御の難しさなどの難点があった。そこで、ビオチン化プローブを直接結合させるプローブ固定化法にかえて、ビオチン化アダプターオリゴを用いた間接固定化法を構築した。新たな方法では、一度固定化したプローブオリゴを、アルカリ条件により容易にチップ表面より解させ、チップ上のアダプターオリゴには繰り返しプローブをハイブリすることが可能である。これにより測定における再現性が向上より正確な解析を可能とした。また用いた配列は、高塩濃度条件下で解離することなく、またヒトゲノムにおいて相同性の無い配列であることから、今後、ER-ERE 以外のタンパク-DNA 相互作用を検討するうえでも有用と考えられる。本法により、固定化プローブを容易に変更することが可能であることから、多種の DNA について短時間で相互作用を検討することが可能である。

E. 結論

内分泌かく乱化学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。ビテロゲニン ERE を用いたこれまでの研究において ER リガンド化合物特異的な ER-ERE 相互作用変化が示され、リガンド特異的な遺伝子制御機構との関連が示唆された。本年度、ヒトにおける ERE 制御が知られる遺伝子の ERE について、ER-ERE 相互作用変化の検討より、これら ERE では化合物間の相

相互作用の違いは、VitA2 よりむしろ明らかに示された。本系は従来のエストロゲン様作用アッセイ法とは異なり、個々の化合物の受容体構造への影響を検討することが可能である。今後、ERE のバリエーションを増やすことで、単にホルモン様作用を有するか否かではなく、化合物特異的な変化から対象化合物の生体作用プロファイルを遺伝子発現制御の観点から、クラス分けすることが可能と考えられる。また、SPR 法による測定は非常に短時間であることから ER を始めとしたホルモンレセプターを作用点とする内分泌かく乱化学物質 HTTPS 系として有用である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

誌上発表

表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法：実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編 pp.199-204（羊土社、2002）

学会発表

橋本 セつ子，小野 敦，浅野 和信，大藤 努，井上 達，菅野 純：表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法 第 74 回 日本生化学会大会 2001 年

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

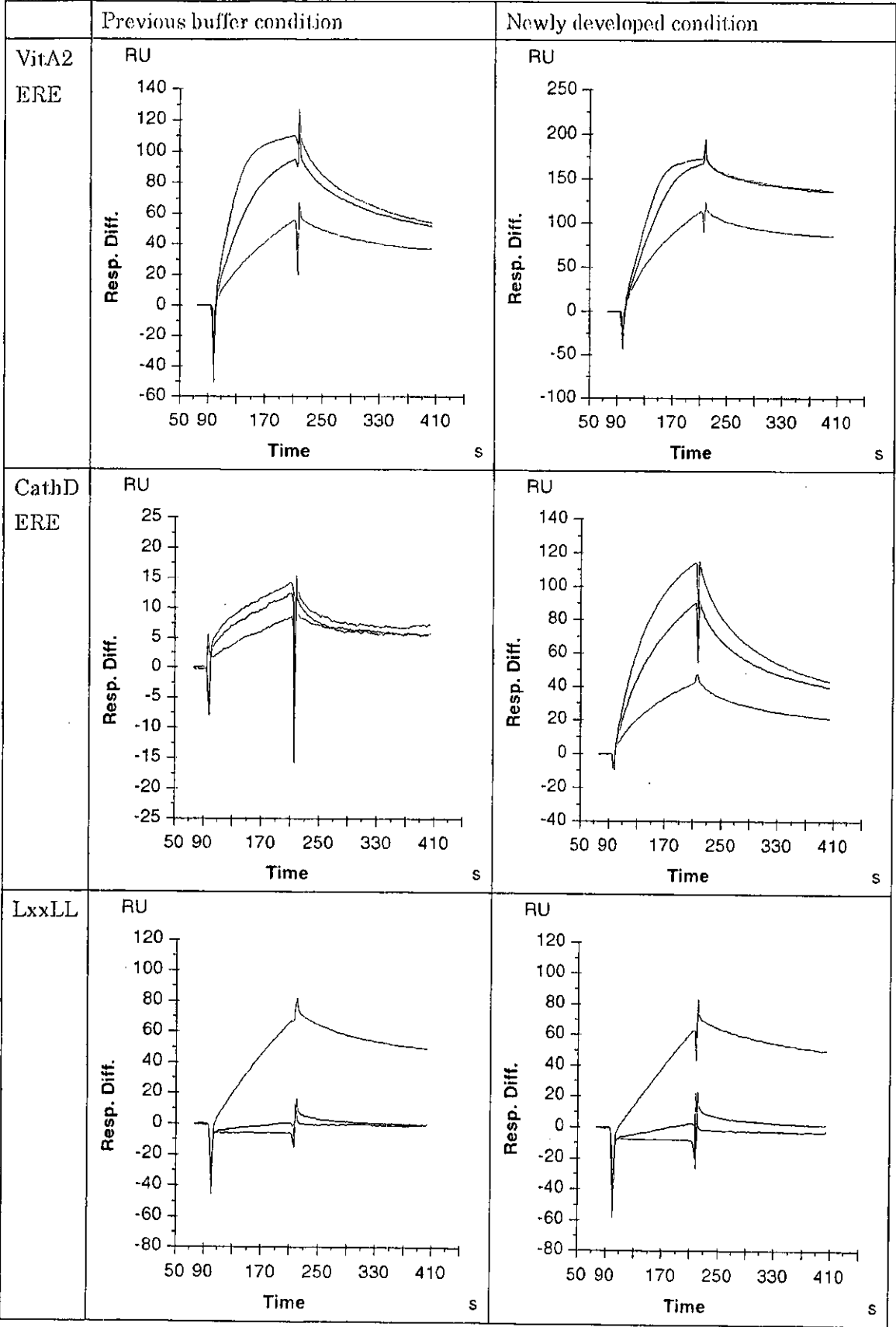


Fig.1 The ER-ERE and ER-LxxLL interaction under newly optimized condition

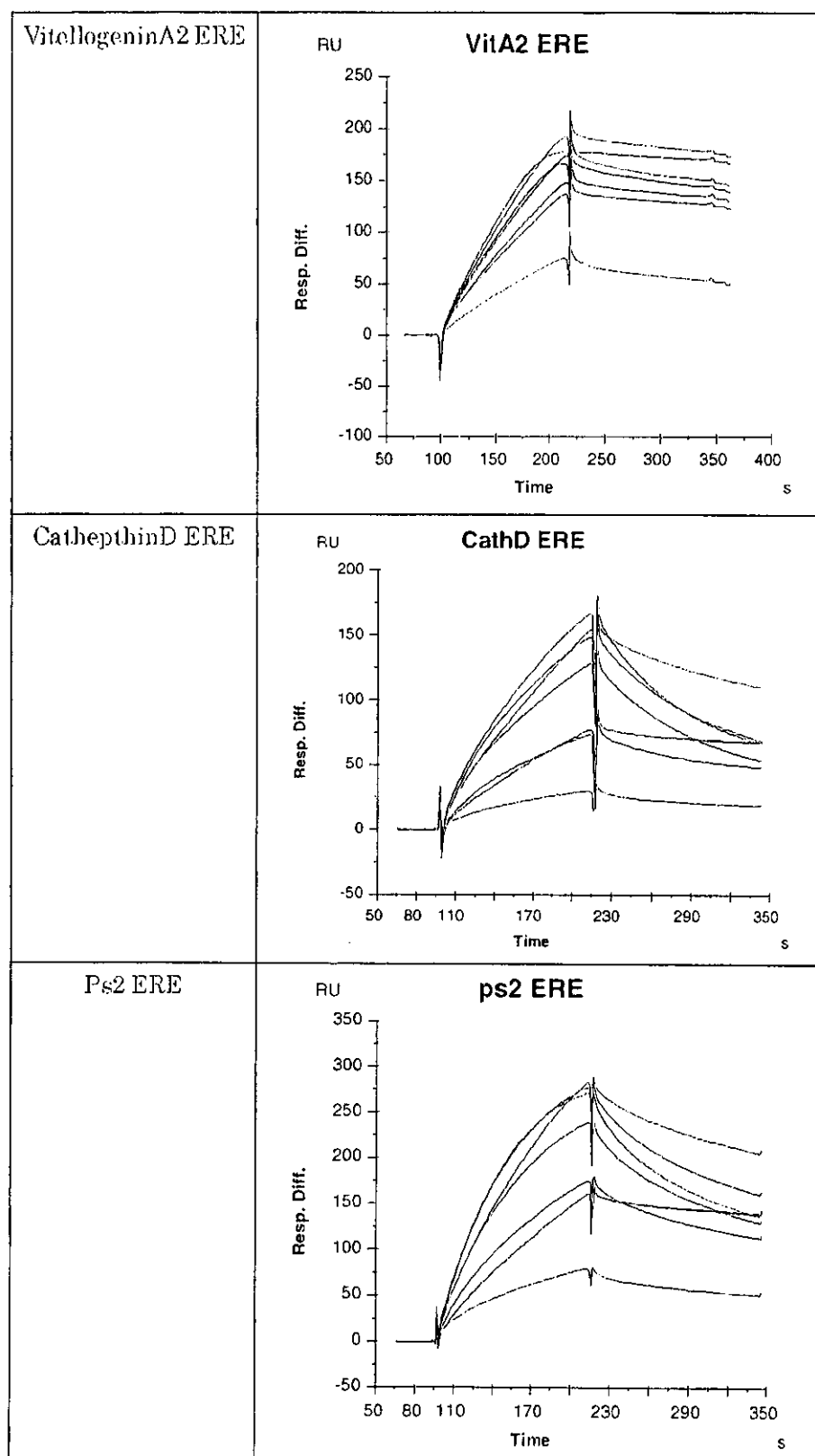


Fig. 2 Ligand effects on ER interactions with various sequences ERE under newly developed buffer condition.

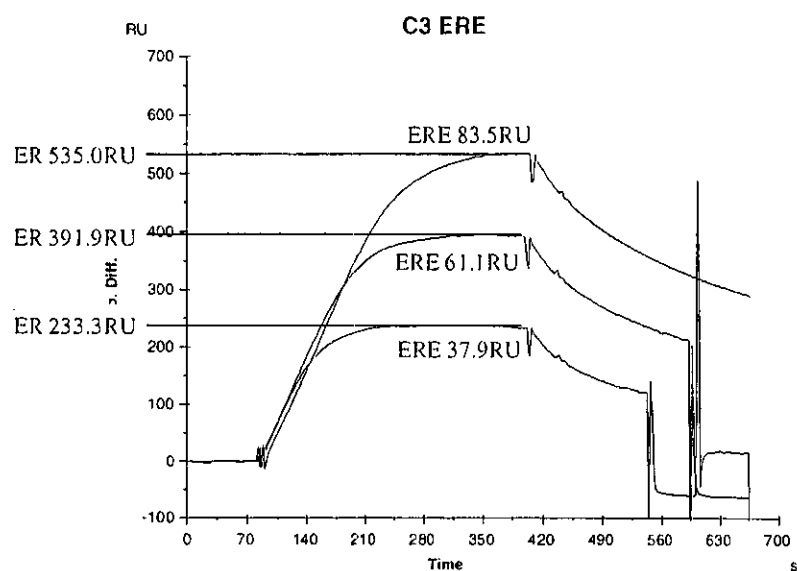


Fig.3 Saturated ER-E2 complex binding on the sensor surface immobilizing different quantity of C3 ERE.

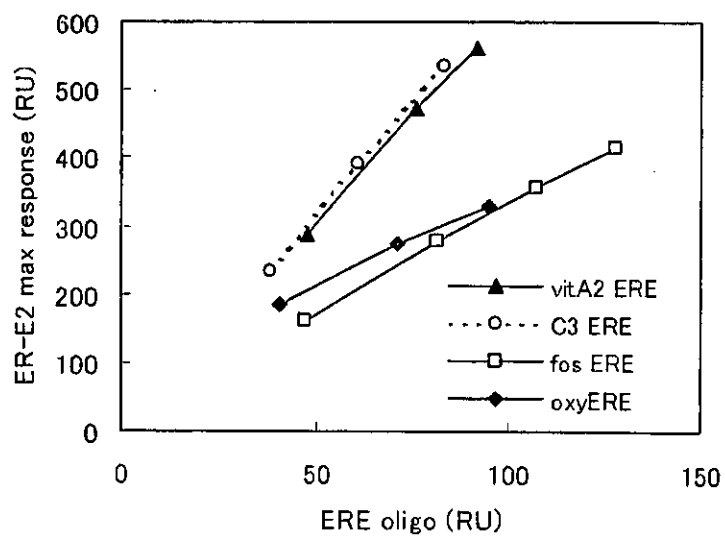
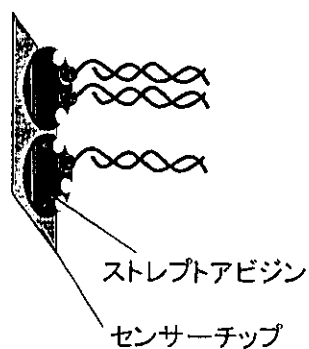


Fig.4 Resulted stoichiometry of ER-ERE interaction for varied ERE sequences.

従来の方法



従来の方法では、一度固定化したオリゴを完全に解離させることは困難である。一方、測定・洗浄を繰り返すことで一部のプローブは脱離してしまう。

アダプターオリゴ固定化法

NaOHで解離させることでプローブの再固定化が可能

アダプター相補配列を付加したプローブをハイブリにより固定化

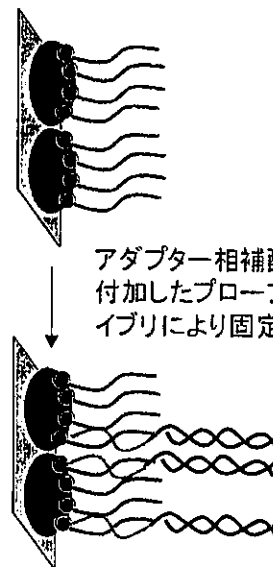
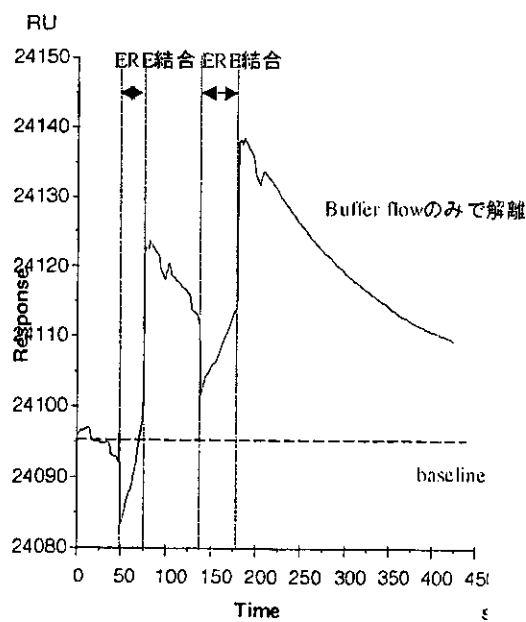


Fig.5 アダプターオリゴを用いた ERE プローブ固定化法

7mer adaptor



18mer adaptor

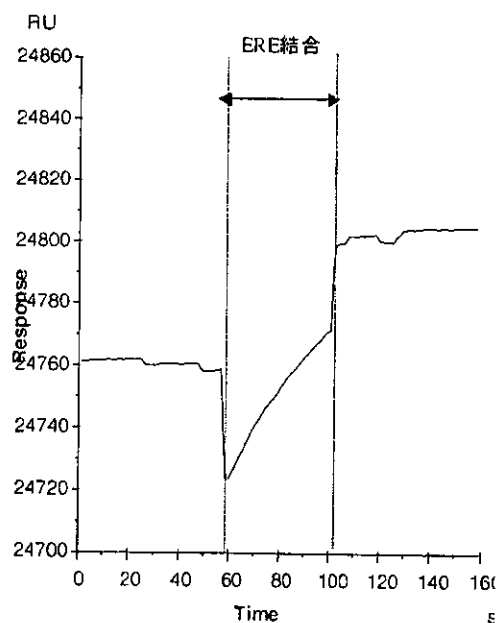


Fig.6 Adaptor oligo の検討

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小野 敦、浅野和信、橋本せつ子	表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法		実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編	羊土社	東京	2002	199-204

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kanno,J.,Onyon,L., Haseman,J., Fenner-Crisp,P.,Ashby,J.,and Owens,W	The OECD program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses Phase I	Environmental Health Perspectives	109(8)	785-794	2001
Haraguchi, S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y	Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development.	Mech Dev	108	59-69	2001
浅野和信、小野敦、橋本せつ子、井上達、菅野純	表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法	分析化学			2002