

表 3. ヒト核内受容体 48 種の一覧リスト

TR α	LXR α	TR2	GR
TR β	LXR β	TR4	MR
PPAR α	Rev-erb α	hTLL	PR
PPAR β	Rev-erb β	PNR	AR
PPAR γ	CAR	Coup-TF1	TR3
VDR	PXR	Coup-TF2	Nurr1
RAR α	FXR	EAR2	NOR1
RAR β	HNF4 α	ER α	SF1
RAR γ	HNF4 γ	ER β	LRH1
ROR α	RXR α	ERR α	GCNFI
ROR β	RXR β	ERR β	DAX1
ROR γ	RXR γ	ERR γ	SHP

* グレーの 2 種は抗体調製も抗体価が得られない核内受容体。

表 4. ヒト核内受容体に対する内分泌かく乱化学物質のセンシング抗体法による応答性

	BPA	NP	tOP	TBT	FDE	FDC
ER α	-	+	+	-	-	-
ER β	-	+	+	-	-	-
AR	-	-	-	-	-	-
PR	-	-	-	-	-	-
GR	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	-
ERR γ	++	-	-	-	-	-
TR α	-	-	-	-	-	-
TR β	-	-	-	-	-	-
RXR α	-	-	-	+	-	-
RXR β	-	-	-	+	-	-
PPAR α	-	-	-	-	-	-
FXR	-	-	-	-	-	-

BPA: ビスフェノール A、NP: ノニルフェノール、tOP: *tert*-オクチルフェノール、TBT: トリブチルスズ、FDE: フタル酸ジエチル、FDC: フタル酸ジシクロヘキシル。++: 内在性リガンドと同等か 1/10 程度の強い活性、+: 内在性リガンドと同等か 1/10~1/100 程度の活性、-: 不活性。

この標準アッセイによって改めて分かったことは、ビスフェノール A の ERR γ に対する結合性が強く、特異的であるかということである。ただし、ビスフェノール A の ERR γ に対する応答性はインバースアンタゴニストとして測定したものであり、自発活性化型核内受容体における活性である。

既に実施した ER α に対するセンシング抗体アッセイにおいて、ノニルフェノールと *tert*-オクチルフェノールは順位付けでそれぞれ 55 位、62 位である。これらより強い化合物がいくつも存在したが、いずれもその応答性は天然のホルモンに比べるとかなり弱い。代表的なイソフラボンであるゲニスタインはポリクローナル抗体を用いたアッセイ、モノクローナル抗体を用いたアッセイで、最大抗体応答性は 60~70% あるものの、受容体結合性に対応する抗体有効濃度では E2 に比較して約 100 倍弱い。ビスフェノール A は ER α に対するセンシング抗体法ではまったく不活性である。

② 受容体タンパク質発現のための cDNA クローニング

核内受容体のセンシング抗体法アッセイには、それぞれの受容体タンパク質が必要である。現在市販されている核内受容体は 25 種類ほどあり、ほぼ半数でしかない。48 種すべてに対するセンシング抗体法を完成させるためには、残りの核内受容体についてタンパク質を供給できる必要がある。このため、cDNA クローニングで全長を発現できる系を構築するとともに、センシング抗体法アッセイ用にリガンド結合ドメイン (LBD) を GST に融合させたタンパク質を発現できる系を構築した。

市販されている核内受容体 25 種類についても大量に受容体タンパク質が必要となるので、これらについても同様に cDNA クローニングし、タンパク質発現系を構築することにした。現時点で 37 種類について cDNA クローニングが完了し、残り 11 種類についてもクローニング中である。

③ ファージレイ法によるモノクローナルセンシング抗体の作製

これまでに、核内受容体の α ヘリックス 12 を中心とした断片ペプチドを抗原にし、動物免疫によってコンホメーション変化に対するセンシング能を有するポリクローナ

ルおよびモノクローナル抗体の作製に成功し、それを用いた内分泌かく乱作用性の簡便な評価系構築に成功している。しかしながら、動物免疫を経る抗体作製法では、①経済的・時間的なコストが高い、②核内受容体のように哺乳類間で高度に保存された分子への高親和性抗体を得ることは困難、③免疫動物内での強力な取捨選択により、得られる抗体の抗原認識および機能の多様性が低い、などの問題を内包しているのも事実であり、48 種という数多くの核内受容体についてセンシング抗体を得る上では大きなネックである。

本研究では、これまで、生体内のほぼ全ての細胞で発現する一般的な核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) についてセンシング抗体の作製を行ない、抗体選別操作に適切な抗原ペプチドをデザイン・使用することで目的の結合特異性を持つ抗体を選別することが可能であることを示し、実際にセンシング抗体を得ることに成功した。さらに、本手法を ER α に展開する際には、バイオパニング (抗体選別操作) のスキームを確立させ、ファージディスプレイのメリットである「迅速な抗体作製」すなわち、多くの抗原についての抗体作製を同時並行に行う系の確立を行った。これにより、昨年度までに、ステロイドホルモン受容体 9 種に対してバイオパニングを展開した。

しかしながら、センシング抗体法によるアッセイのためには、ファージ抗体 (ファージに scFv が結合した状態) ではなく、scFv (単鎖可変抗体) に変換して行わなければならない。その理由は、ファージそのものが非常に大きいため、抗体の機能としては物理的に不安定な状態となるからである。scFv への変換は、大腸菌を使ったタンパク質発現の要領で行うことができる。つまり、得られたクローン由来の scFv を大腸菌内で発現すれば良い。そこで、ER α のバイオパニングによって選別されたファージ抗体から scFv の作製を試みた。しかしながら、昨年度までに scFv として機能するクローンは 1 つも得られていない。一般的に、得られた scFv がファージとの融合タンパク質として機能を発揮していたとしても、それらが単独で機能するとは限らないと報告されている。特に scFv の発現においては、封入体 (不溶性タンパク質) を形成したり、発現しても scFv 単独で安定な構造をとることができず、重合体を形成するなどの問題に遭遇することが多い。

そこで、本年度の研究においては、確実に scFv を得ることを目的に、スクリーニング手法の改良を行った。具体的には、スクリーニングによって得られたクローンから scFv を発現するのではなく、単独で発現することが可能な scFv を提示したクローンをスクリーニングすれば良いと考えた。すなわち、バイオパニングによって得られたすべてのクローンを発現用の大腸菌に組み込み、scFv の状態でスクリーニングを行うことにした。

ところで、モノクローナル抗体によるセンシングアッセイは、ポリクローナル抗体によるセンシングアッセイの高効率化を目的とする。ある受容体について、多様な抗体成分の混合物であるポリクローナル抗体センシング抗体法が確立された場合、そのアッセイの感度を十分に配慮してモノクローナル抗体を作製する必要がある。つまり、ポリクローナル抗体での結果と並列して抗体の作製と抗体機能の評価を行う必要がある。この点において、本研究では今回、ポリクローナル抗体の作製を終えている RAR α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α を対象に scFv の取得を試みた。また、これら受容体は、リガンド依存的に活性化する核内受容体であり、創薬を目的とした幾つかの合成リガンドも報告されている。したがって、得られる scFv の機能およびセンシングアッセイの結果を評価するに適した受容体である。

① バイオパニング

各受容体に対して、Tomlinson I ライブラリーよりバイオパニングを行った。合計 3 回のバイオパニングを行い、各パニングを終えるごとに回収されたファージの個体数を算出した (図 22)。この結果、それぞれの受容体の 3 回目のバイオパニングにおいて、回収されるファージ個体の数が増加に転じた。これにより、目的の抗原を認識する抗体を提示したファージが濃縮されたことが示唆された。

② scFv スクリーニング

バイオパニングによって回収されたファージを TG-1 (サプレッサー株) から HB2151 (非サプレッサー株) に組み換えた。さらに、これらをモノクローン化し、96 穴プレートにて scFv の発現を行った。得られた scFv (培養上清) を用いて抗原に対する抗体力価を測定した。その結果、RAR α 、RAR

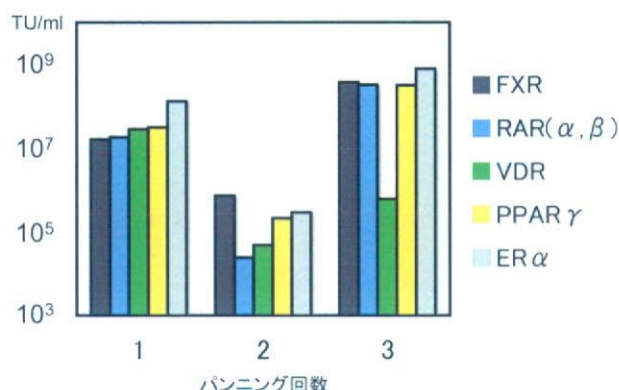


図 22. バイオパニングによるファージ個体数の変化（ファージのタイターチェック）

β 、PPAR、FXR、については、抗原を特異的に認識する scFv の同定に成功した(図 23)。一方、VDR、ER α については、機能性 scFv を発現するクローンが得られなかった。

③ モノクローナルセンシング抗体の作製

前年、平成 18 年度までに得られた各受容体に対するクローンについて、リガンド結合型とリガンド非結合型を識別するかどうか調べた。その結果、TR α において 20 種類のクローン中 1 種類に内在性リガンド 3,3',5-triiodo-L- thyronine (T3) 結合型と非結合型で抗体応答に差が見られた(図 24)。また、ポリクローナル抗体と比べて、モノクローナル抗体では TR α (10 nM) に対して約 2 倍の大きな抗体応答が見られた。

本年度得られた最大の成果は、モノクローナル抗体の感度の高さである。これがモノクローナル抗体を作製する本来の目的であるが、T3 濃度依存的な抗体応答においてモノクローナル抗体 (EC_{50} 値 0.8 nM) はポリクローナル抗体 (EC_{50} 値 7.6 nM) より約 10 倍も感度が良かった(図 25)。様々な化合物に対しての試験結果は、表 5 に示されるようにポリクローナル抗体とモノクローナル抗体で、きわめて相関の良い結果が得られた。内在性リガンド T3 以外には受容体応答は見られなかった。

18 年度得られた GR の 2 種のモノクローン、AR の 4 種のモノクローンについては、反応条件をいろいろと試みたが、受容体の構造変化を識別する条件を得ることはできなかった。

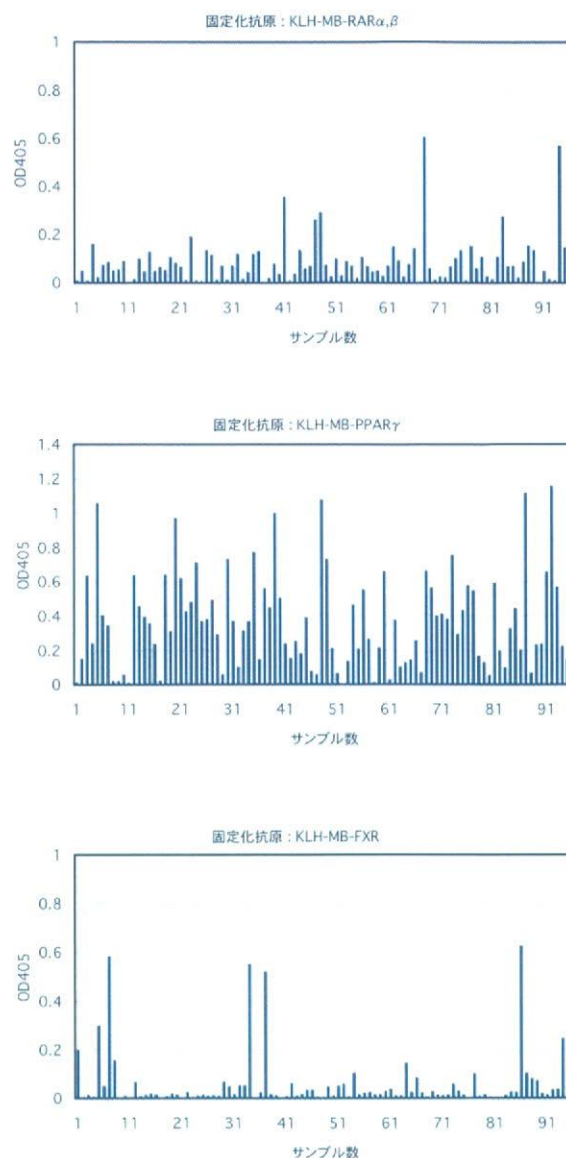


図 23. scFv スクリーニングの結果
上から RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR

た。

一方、最近ビスフェノール A が結合することが明らかとなり、内分泌かく乱作用における影響が非常に注目されているエストロゲン関連受容体 (ERR γ) は、リガンド非結合でも活性型構造を保ち、構成的活性を示す受容体である。内在性リガンドについては未解明であり、インバーサアゴニストである 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) で不活性化されることが知られている。前年度までに 4-OHT 結合型を識別するクローンが得られていたが、感度が非常に悪く、試験系を構築するに至らなかった。

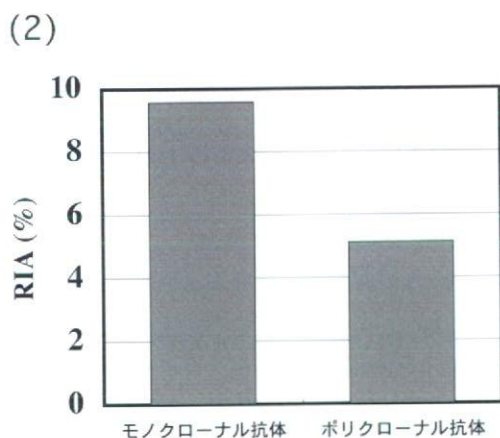
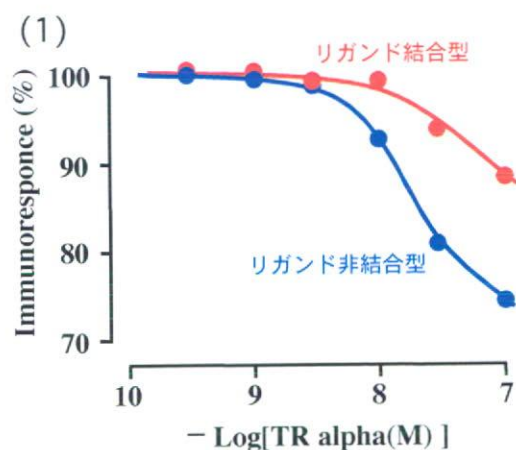


図 24 $TR\alpha$ モノクローナル抗体センシング試験

(1) 受容体濃度変化、(2) $TR\alpha$ 10 nM におけるポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の抗体応答変化の比較

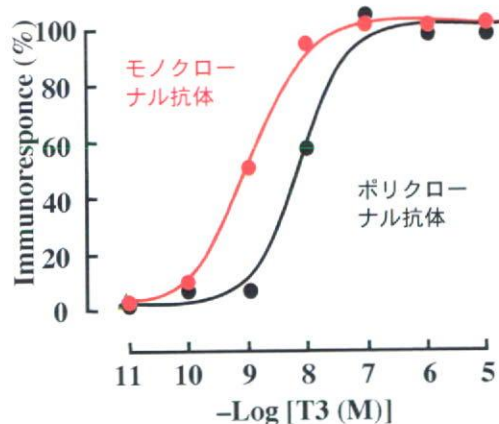


図 25 モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の $T3$ 濃度依存的な抗体応答

表 5. $TR\alpha$ に対する化学物質の抗体応答

化合物名	ポリクローナル抗体	モノクローナル抗体
T3	++	++
E2	—	—
DHT	—	—
4OHT	—	—
progesterone	—	—
Nonylphenol	—	—
Octylphenol	—	—
Tributyltin	—	—
フタル酸ジエチル	—	—
フタル酸ジシクロヘキシル	—	—

④ エストロゲン関連受容体 γ ($ERR\gamma$) のセンシング抗体応答解析

平成 18 年に引き続き自発活性化型核内受容体であるエストロゲン関連受容体 γ 型 ($ERR\gamma$) について、センシング抗体アッセイ法の確立に取り組んだ。既に上述のようにファージディスプレイ法および細胞融合法によるモノクローナル抗体については、 $ERR\gamma$ に特異的な抗体は現在まで得られていない。しかしながら、ポリクローナル抗体については昨年度に作製に成功し、インバースアゴニストおよびインバースアンタゴニストの両方について測定、評価できるようになったので、本年度はこれらの方法で一連の化学物質についてアッセイした。

① $ERR\gamma$ に対するセンシング抗体アッセイ：インバースアゴニスト活性の評価

既に $ERR\gamma$ に対するインバースアゴニストとして報告されている 4-OHT および Diethylstilbestrol (DES) は、図 26 で示されるように、センシング抗体法による試験においても基盤構成活性を濃度依存的に阻害する活性、インバースアゴニスト活性を示した。その活性は EC_{50} 値で 4-OHT が約 20 nM、DES が約 150 nM であり、その受容体結合活性にほぼ匹敵することが分かった。

内分泌かく乱化学物質として懸念されている BPA とその類縁化合物 BPE や BPF を始めとして、代表的なフェノール色素、真性環境ホルモン、そして、ステロイドホルモンや植物エストロゲン等を含む 25 物質について

ERR γ に対するセンシング抗体法によりインバースアゴニスト活性を調べた。その結果、表6に示されるようにERR γ のインバースアゴニスト活性は4-OHTとDESにしか認められず、他の化合物はすべて不活性であった。4-OHTとDESはインバースアゴニストとして特有の機能構造を持っていることが分かった。また、BPAとそのアナログ・BPE（BPAの中央にある2個のメチル基のうち1個しかない誘導体）およびBPF（BPAの中央にある2個のメチル基が両方ともない誘導体）はERR γ に対する結合性を示す（BPEとBPAは共に非常に強いが、BPEが少し優れる。BPFは若干弱い）、インバースアゴニスト活性は見られなかった。

表6 様々な物質のERR γ に対するセンシング抗体アッセイの結果（インバースアゴニスト活性）

化学物質名	センシング 試験	レポーター 遺伝子試験	結合 試験
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	++	++	++
Diethylstilbestrol (DES)	+	+	+
Bisphenol A (BPA)	—	—	++
4,4'-Ethylidenebisphenol (BPE)	—	—	++
4,4'-Methylenediphenol (BPF)	—	—	+
17 β -estradiol (E2)	—	—	—
ethynylestradiol	—	—	—
dihydrotestosterone (DHT)	—	—	—
testosterone	—	—	—
progesterone	—	—	—
Dexamethasone (DEX)	—	—	—
cortisone	—	—	—
cortisol	—	—	—
deoxycorticosterone	—	—	—
corticosterone	—	—	—
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	—	—	—
biochanin A	—	—	—
genistein	—	—	—
diadzein	—	—	—
zearalanone	—	—	—
gossypol	—	—	—
phenol red	—	—	—
phenol phthalein	—	—	—
methyl orange	—	—	—
methylene blue	—	—	—

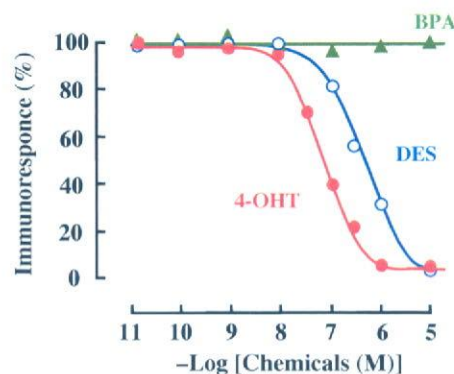


図26 ERR γ センシング試験
(インバースアゴニスト活性)

② ERR γ センシングアッセイ（インバースアンタゴニスト活性）

4-OHTによる不活性化に対するインバースアンタゴニスト活性を各化学物質について検討した。これは、センシング抗体アッセイにおいてまず、10 μ Mの4-OHTでERR γ を不活性化状態に置き、これに化合物の阻害活性を測定する。図27で示されるように、BPA、BPEおよびBPFにインバースアンタゴニスト活性が見られた。これらはERR γ 受容体に対して結合親和性を示すものの、インバースアゴニスト活性を持たなかったため、きわめて妥当な結果である。他の化合物は全てインバースアンタゴニスト活性を示さなかった（表7）。

インバースアンタゴニスト活性を示すBPA、BPEおよびBPF、また、インバースアゴニスト活性を示す4-OHTとDES。ERR γ 受容体に結合する化合物は非常に特異的である。

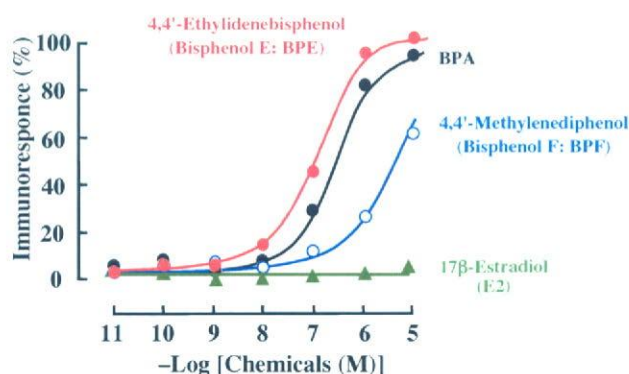


図27 ERR γ センシング試験
(インバースアンタゴニスト活性)

表7 様々な物質の ERR γ に対するセンシング抗体アッセイの結果 (インパースアゴニスト活性)

化学物質名	センシング 試験	レポーター 遺伝子試験	結合 試験
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	—	—	++
Diethylstilbestrol (DES)	—	—	+
Bisphenol A (BPA)	++	++	++
4,4'-Ethylidenebisphenol (BPE)	++	++	++
4,4'-Methylenediphenol (BPF)	+	+	+
17 β -estradiol (E2)	—	—	—
ethynylestradiol	—	—	—
dihydrotestosterone (DHT)	—	—	—
testosterone	—	—	—
progesterone	—	—	—
Dexamethasone (DEX)	—	—	—
cortisone	—	—	—
cortisol	—	—	—
deoxycorticosterone	—	—	—
corticosterone	—	—	—
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	—	—	—
biochanin A	—	—	—
genistein	—	—	—
diadzein	—	—	—
zearalanone	—	—	—
gossypol	—	—	—
phenol red	—	—	—
phenol phthalein	—	—	—
methyl orange	—	—	—
methylene blue	—	—	—

⑤ エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) の 応答解析

平成 18 度に引き続き自発活性化型核内受容体であるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とこれに非常に強く結合する化学物質として発見されたビスフェノール A との構造活性相関の解析について、*in vitro* の試験系で精査した。これらは、ビスフェノール A の一連の誘導体を用いて受容体結合応答を調べるもの、X線結晶解析によって ERR γ とビスフェノール A の結合の構造要因、それを支える構造要因等について分析するもの、さらに、明らかとなった結合部位を他のアミノ酸に変異させた受容体の結合試験から構造要因を分析する 3 つの異なる方法で検討した。

① ERR γ 受容体の結合試験

放射標識された BPA、 $[^3\text{H}]$ BPA を用い、GST 融合 ERR γ に対して一連の競合結合試験を実施した。

★ ERR γ 結合の BPA 構造要因の同定

BPA と類似した構造を持つ化学物質 (BPA 類似体) を用いて、「構造活性相関解析」を行った。まず、BPA からフェノール性 OH 基を 1 つ、もしくは 2 つ欠失させた化合物について試験を行ったところ、2 つの OH 基のうち一方のみが結合に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (図 28)。そこで、OH 基だけでなく、さらに分子構造を小さくした化合物について結合試験を行った。その結果、フェノール環を同程度の大きさのアルキル基にした場合、結合性が著しく低下した。さらに分子サイズを 4-*tert*-ブチルフェノールまで小さくしたところ、結合性が部分的

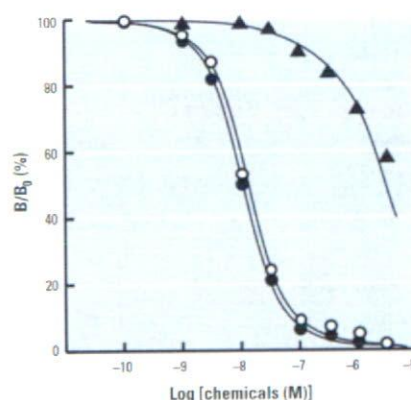
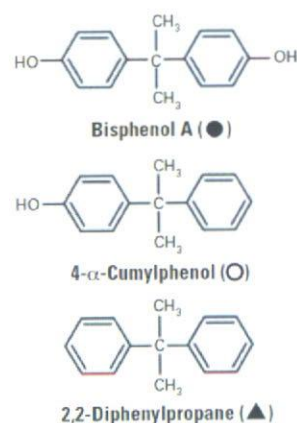


図 28. フェノール性 OH 基の効果

OH 基を 1 つ欠失した化合物 (○) は、BPA (●) と同等の結合性を維持した。両方を欠失した化合物 (▲) では結合性が著しく低下した。

に回復したが、やはり BPA ほど強くは結合しないことが判明した。このことから、BPA のフェノール環は、結合に大きく貢献していることが明らかとなった (図 29)。一方、4-*tert*-ブチルフェノールよりさらに小さな構造にしても、ERR γ への結合性は上昇せず、逆に低下した (図 30)。

次に、2つのフェノール環をつなぐアルキル基部分の寄与について検討した。中央のアルキル基部分を構成するメチル基 (-CH₃) をエチル基 (-CH₂-CH₃) やフェニル基 (-C₆H₅) に置換したところ、結合性が低下した (図 31)。したがって、ERR γ のリガンド結合ポケットに収納されるためには、あまり大きな構造ではない方が有利であることが考えられる。そこで、メチル基を1つ、もしくは2つ削除して、分子サイズを小さくした化合物について試験を行ったところ、メチル基を1つ削除した化合物 (ビスフェノール E: BPE)

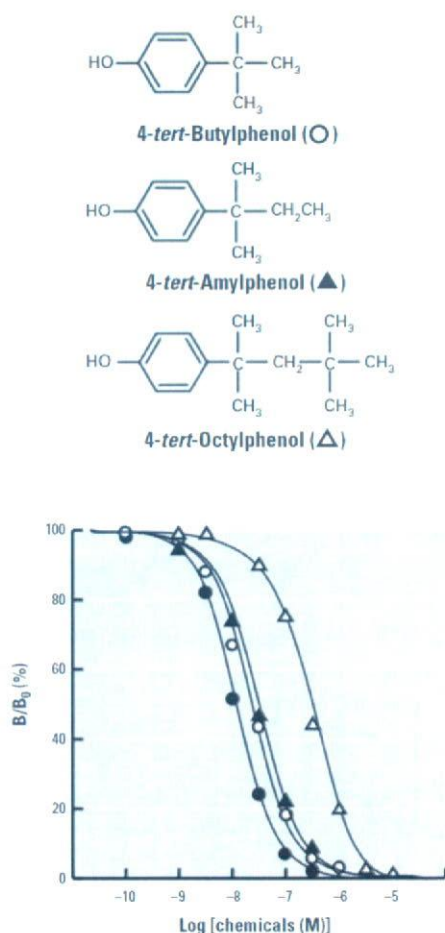


図 29. フェノール環の効果①

フェノール環を削除すると結合性が大きく低下するが、さらに小さな分子になると結合性が部分的に回復する。グラフ中の (●) は BPA。

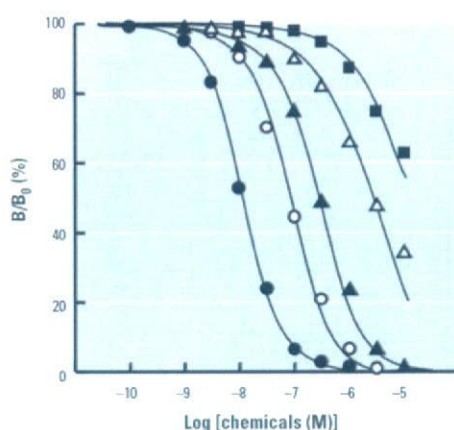
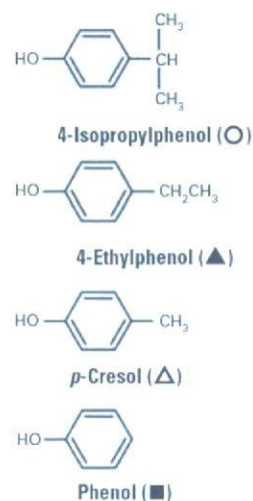


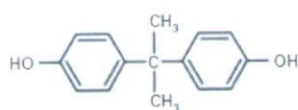
図 30. フェノール環の効果②

4-*tert*-butylphenol より小さくした場合、結合性が段階的に減少する。グラフ中の (●) は BPA。

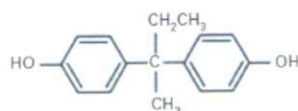
において BPA を超える最大結合活性が確認された。一方、2つ削除した化合物では結合性が減少した。また、メチル基とほぼ同じ大きさであるトリフルオロ基 (-CF₃) に置換した場合でも結合性が大きく低下した (図 32)。これらの結果、少なくとも1つのメチル基が結合に関与していることと、静電的な性質が強いトリフルオロ基は、結合に不利に働くことが明らかとなった。

★アルキルフェノール類に対するスクリーニング

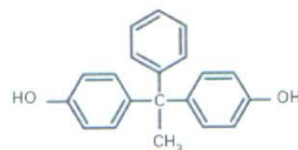
環境ホルモンとして疑われるアルキルフェノール類が、ERR γ に結合する可能性が高いため、競争結合試験によるスクリーニングを行った。フェノール環のパラ位に直鎖アルキル基 (炭素数 $n=1\sim12$) が付加されたアルキルフェノール類につ



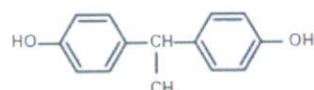
Bisphenol A (●)



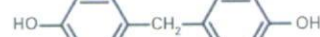
Bisphenol B (▲)



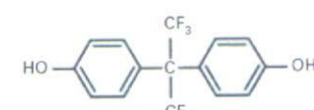
Bisphenol AP (△)



Bisphenol E (○)



Bisphenol F (■)



Bisphenol AF (□)

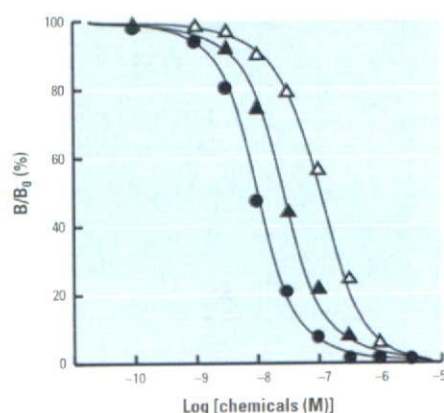


図 31. 中央メチル基の効果①

中央のメチル基部分が大きくなると結合性が低下する。BPA (●)、エチル基に置換した化合物 (▲)、フェニル基に置換した化合物 (△)。

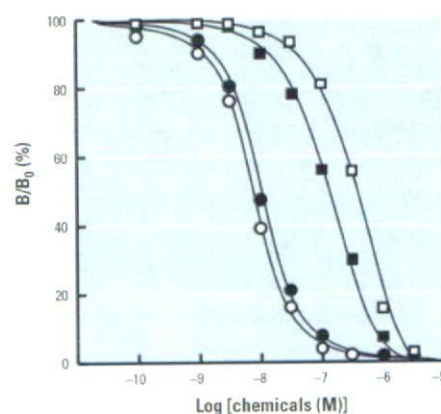


図 32. 中央メチル基の効果②

BPA (●)、メチル基を1つ削除した化合物 (○)、メチル基を2つ削除した化合物 (■)、トリフルオロ基に置換した化合物 (□)。

いて実施した。

競合結合試験の結果、有意な結合親和性を示したのは、図 33 にあるように、メチル基 (n=1) を持つ *p*-クレゾールから、*n*-ヘキシル基 (n=6) を持つ *p*-*n*-ヘキシルフェノールであった。ヘプチル基 (n=7) からドデシル基 (n=12) を持つアルキルフェノールは、ほとんど活性を示さなかった。n=1 から n=6 の間で最も高い結合性を示したのは、*n*-ブチルフェノール (n=4) であった。*n*-ブチルについては枝分かれのある構造異性体が存在するので、それらについて精査したところ、4-*n*-ブチルフェノール < 4-*sec*-ブチルフェノール < 4-*tert*-ブチルフェノールの順で結合性がさらに高くなることが判明した (図 34)。

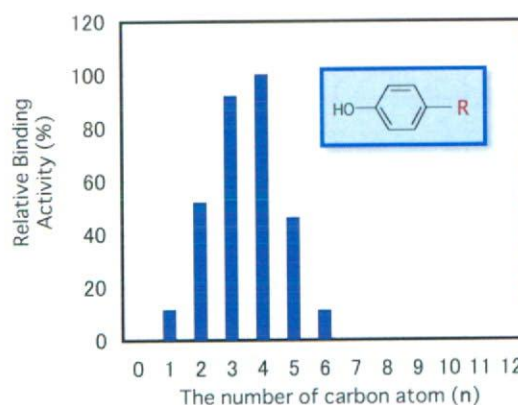


図 33. アルキル鎖の長さとの結合性

グラフ中に示す構造中の「R」部分に炭素数 1~12 までのアルキル鎖を付加した場合の結合性の変化を示す。

Name	Structure	Affinity (IC ₅₀)
4- <i>n</i> -		150 ± 19.3
4- <i>sec</i> -		32.3 ± 3.84
4- <i>tert</i> -		26.1 ± 2.45

図 34. 各種ブチルフェノールについての解析結果

★ ERR γ に対する活性への影響評価

ERR γ への結合が確認された化合物の中から、BPA、BPE、ビスフェノール AF (BPAF)、4- α -ミルフェノール、4-*tert*-ブチルフェノールについて、レポーター遺伝子アッセイによる活性の評価を行った。

既に報告の通り、BPA は ERR γ の基盤活性に影響を与えず、レポーター遺伝子の変化量は見られなかった。また、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は基盤活性を下げるインバースアゴニスト活性を示した。試験に使用した化合物は全て、ERR γ の基盤活性を変化させず、BPA と同じ性質であることが判明した (図 35A, B)。また、1 μ M の 4-OHT 存在化で試験化合物によるリガンド応答を測定したところ、4-OHT で不活性化された基盤活性が、リガンド濃度依存的に回復した。つまり、これらの化合物も BPA と同様に、インバースアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。インバースアンタゴニスト活性の強さは、各化合物の結合親和性の強さに相関しており、BPE で最大の活性を示した。

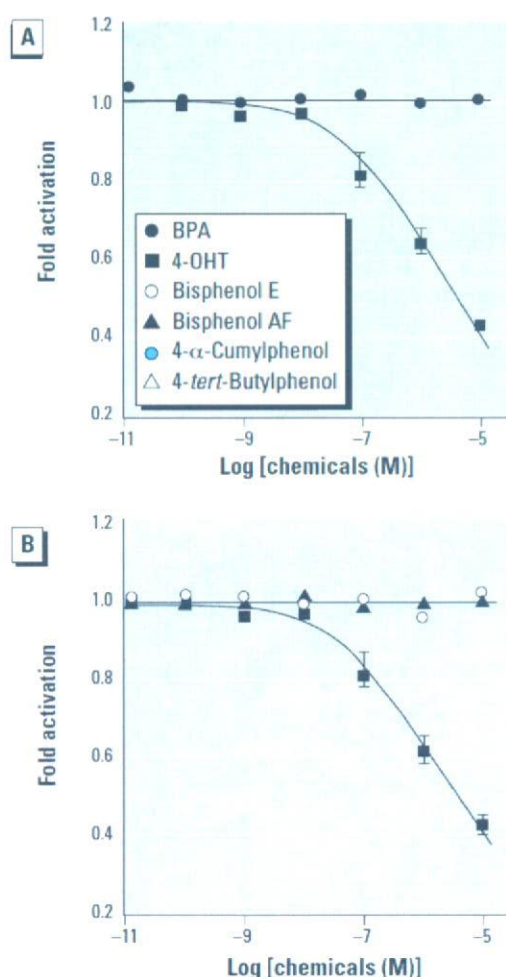


図 35(A, B). レポーター遺伝子試験①
BPA は ERR γ に結合しても基盤活性に影響を与えない。4-OHT はインバースアゴニストとして機能する。試験化合物はすべて基盤活性に影響を与えなかった。

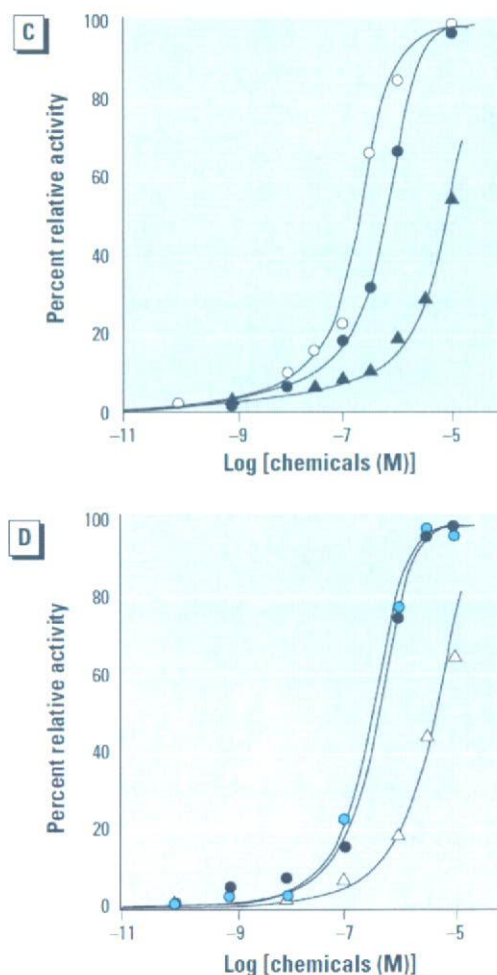


図 35(C, D). レポーター遺伝子試験②
4-OHT 存在下 (活性を下げた状態) で、試験化合物による活性の変化を測定した場合、インバースアンタゴニスト活性が観測された。

② エストロゲン関連受容体 γ のビスフェノールA結合体のX線結晶構造解析

本研究では、BPAのインバースアンタゴニスト活性の分子メカニズムが、BPAがリガンド認識部位に結合して4-OHTと競合するものであることを直接的に示すことを目的とする。BPAのERR γ に対する非常に強い結合能の構造要因を明らかにするためには、BPAとERR γ の結合体のX線結晶構造解析を行い、結合体の構造を明らかにすることが必須である。

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌でERR γ を発現した。GSTはプレジジョンプロテアーゼにより酵素消化して切り離した。結晶化条件のスクリーニングを行い、HEPES 緩衝液中でクエン酸ナトリウムを晶出剤として良質な結晶を得ることに成就した。

得られた結晶を 24%グリセロール溶液に段階的に移すことにより、不凍条件にした。SPRING-8 の構造生物学ビームライン BL38B1 で放射光回折データを収集した。これを基に、構造解析を行ったところ、最終的に 1.6 Å の良好な構造が得られた (図 36)。

これらの構造を、これまでに報告されていたリガンド無しの ERR γ -LBD の活性型構造とスーパーインポーズすることにより、BPAはERR γ -LBDの活性型構造を維持したまま、リガンド認識部位に結合していることがはっきりと示された (図 37)。また、BPAがERR γ -LBDに非常に強く結合する要因は、BPAの一方のフェノール性OH基が275位グルタミン酸および316位アルギニンと、もう一方のフェノール性OH基が346位アスパラ

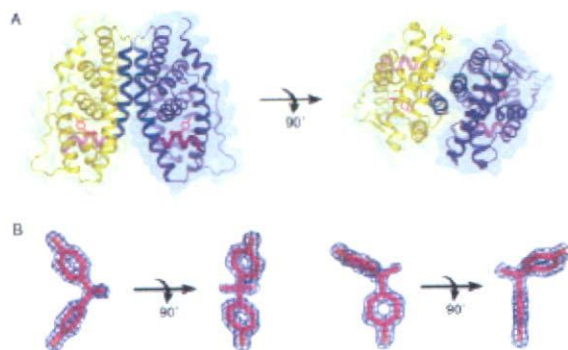


図 36. BPA と ERR γ の複合体構造
A は二量体の全体構造を、B は BPA の構造を示す。

ギンとそれぞれ水素結合を形成し、BPA と強固に結合していること、さらに、リガンド結合ポケットを形成する Leu309、Tyr326、Phe435、Met306 といったアミノ酸側鎖が、BPA のベンゼン環あるいはメチル基と複合的に相互作用しているためであることが判明した (図 38)。

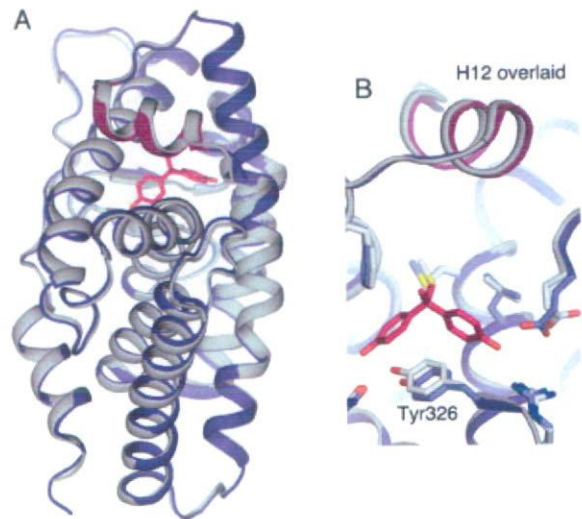


図 37. BPA と ERR γ の複合体と、ERR γ の活性型構造の重ね合わせ
灰色がリガンド無しの ERR γ 活性型構造、青が BPA と ERR γ の複合体構造である。

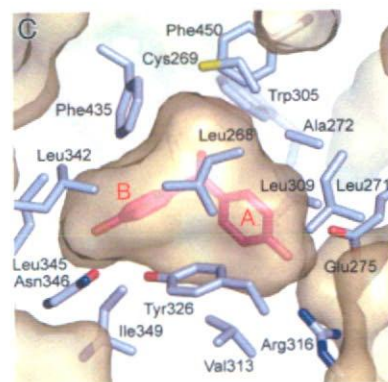


図 38. BPA とリガンド認識部位を形成するアミノ酸

③ エストロゲン関連受容体 γ の変異受容体による化学物質結合部位解析

なぜ ERR γ が BPA と結合できるのか、構造化学的な解析が必要である。上述のように、我々は BPA/ERR γ -LBD (LBD; リガンド結合ドメイン) 結合体の X 線結晶構造解析に成功し、BPA が結合する ERR γ のリガンド結合ポケットを明らかとした。この研究では BPA 結合性および受容体活性化における本質的な分子機構解明を目指して、BPA のフェノール性 OH 基と水素結合を形成する ERR γ のヘリックス 3 (H3) の Glu275 残基および H5 の Arg316 残基について、受容体のアミノ酸を他のアミノ酸へ変異させ、BPA 結合性や ERR γ の自発的な基盤活性の変化を評価することによって、BPA と ERR γ の結合の構造要因の解析を実施することにした。

★ ERR γ 変異受容体に対する BPA の結合試験

アミノ酸の変異による、BPA の ERR γ 結合性への影響を調べるため、11 種の変異受容体を作製した。これら 11 種変異受容体は、WT と同様にグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌で発現・精製した。放射標識された BPA ($[^3\text{H}]$ BPA) を用いて、WT-ERR γ -LBD と同じ反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分

離の条件で飽和結合試験を行った。それぞれの変異受容体の K_d 値および B_{max} 値はスキャッチャードプロット解析で算出した (表 8)。

その結果、Glu275 および Arg316 を Ala に変異させた受容体は、いずれの場合も BPA と結合するが、その結合性はかなり低下した。しかし、その低下の程度は Arg316 変異体よりはるかに大きく、Arg316 との水素結合がより重要であることが判明した。これらを同時に Ala に置換すると、BPA は全く結合せず、これら水素結合の本質的な重要性が分かった。Glu275 の Gln、Asp、Leu などへの変異より、Glu275 による水素結合も支持的役割ながら必須であることが判明した。これらは Arg と Glu を入れ替えた変異体でも証明された。

さらに $[^3\text{H}]$ BPA を用いて受容体競争結合試験を行った。その結果を図 39 に示す。BPA は ERR γ に最も強く結合し、 IC_{50} 値は 9.70 nM を示した。Glu275 $\rightarrow$ Ala は 3.7 倍、Arg316 $\rightarrow$ Ala は 100 倍以上弱くなった。Glu275 と Arg316 を同時に Ala に変異すると、全く結合しなかった。また、ERR γ に対するアンタゴニストである 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は Glu275 および Arg316 と水素結合しているため、これらの残基をそれぞれ 1 つずつ Ala に変異させると、4-OHT の結合は弱く

表 8. 変異受容体に対する BPA の結合能

Amino acid residues of ERR γ receptors ¹⁾		Binding characteristics of $[^3\text{H}]$ BPA			
Position 275	Position 316	Dissociation constant (K_d , nM)		Receptor density (B_{max} , nmol/mg)	
Glu (wild-type)	Arg	5.70	$\pm$ 0.88	18.4	$\pm$ 0.78
<i>Ala</i>	Arg	17.8	$\pm$ 2.74	6.72	$\pm$ 0.62
<i>Asp</i>	Arg	22.0	$\pm$ 2.86	12.4	$\pm$ 0.46
<i>Gln</i>	Arg	23.4	$\pm$ 3.34	7.81	$\pm$ 0.47
<i>Leu</i>	Arg	NB ²⁾		NB	
Glu	<i>Ala</i>	171	$\pm$ 39.5	0.56	$\pm$ 0.09
Glu	<i>Lys</i>	22.5	$\pm$ 4.26	9.98	$\pm$ 0.76
Glu	<i>Leu</i>	NB		NB	
<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	NB		NB	
<i>Arg</i>	<i>Glu</i>	59.7	$\pm$ 6.79	3.66	$\pm$ 0.29
<i>Ala</i>	<i>Glu</i>	NB		NB	
<i>Arg</i>	<i>Ala</i>	54.3	$\pm$ 6.82	3.56	$\pm$ 0.38

¹⁾ Specifically mutated residues are designated in italics.

²⁾ NB means "no specific binding" in the saturation binding assay.

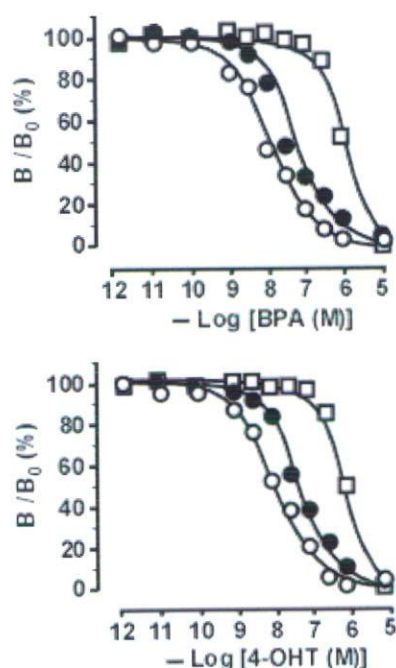


図 39. $[^3\text{H}]$ BPA を用いた競争結合試験
(A) BPA および (B) 4-OHT。
受容体は WT-ERR γ (○)、Glu275→Ala (●)、
Arg316→Ala (□)。

★ ERR γ 変異受容体の自発活性化

ERR γ はリガンドなしでも高い活性化能を持つ「自発活性化型」核内受容体である。そこで、HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイで転写活性を評価した。WT-ERR γ の高い自発活性を100%とすると、Glu275→Alaの自発活性はWT-ERR γ の42%、Arg316→Alaは25%、さらに両方をAlaに変異すると、9%の活性しか示さなかった。以上の結果より、これらのアミノ酸残基はERR γ の自発活性化に関与する重要な残基であることが判明した (図 40)。

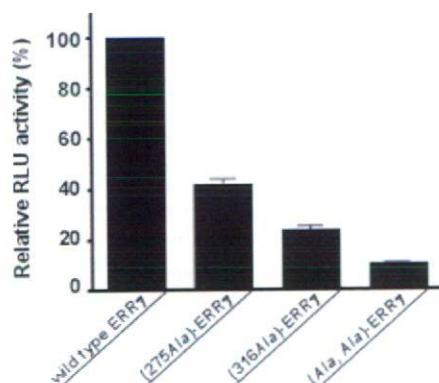


図 40. ERR γ -WT および変異受容体の自発活性化の比較

★ BPA および 4-OHT における ERR γ 受容体活性化の影響

以前の研究より、BPA は ERR γ の高い自発活性に影響を与えないことが分かった。一方、4-OHT は ERR γ の自発活性を抑制するインバーサゴニストである。4-OHT の ERR γ 活性抑制は、BPA の添加により BPA 濃度依存的に阻害され、ERR γ の活性が回復することが判明した。これより、我々は BPA をインバーサアンタゴニストであると同定した。Glu275 および Arg316 をそれぞれまたは同時に Ala に変異させた受容体レポーター遺伝子アッセイ結果より、変異受容体の転写活性化能を評価した。全ての変異受容体に対して、BPA の 4-OHT に対するインバーサアンタゴニスト活性が検出された。また、変異受容体は全て WT-ERR γ より活性が弱くなるが、BPA を添加することにより、BPA 濃度依存的に変異受容体の低下した活性が回復することが判明した (図 41)。

以上より、BPA は ERR γ に結合することにより、その構造を活性化コンホメーションに安定化させる能力を持つと考えられる。Glu275 および Arg316 の変異により、活性化コンホメーションを破壊することで、自発活性化を弱くなると判明した。これに BPA が結合することにより、残存するアミノ酸残基と水素結合を形成して構造が若干回復し、わずかではあるが自発活性が上昇した。BPA は ERR γ に結合するのみならず、結合することで活性化コンホメーションを安定化させることは、生理学的には重要な意味をもつ可能性がある。これは、 α -ヘリックス 12 が BPA によってリガンド結合部位に固定化されるためと思われる。

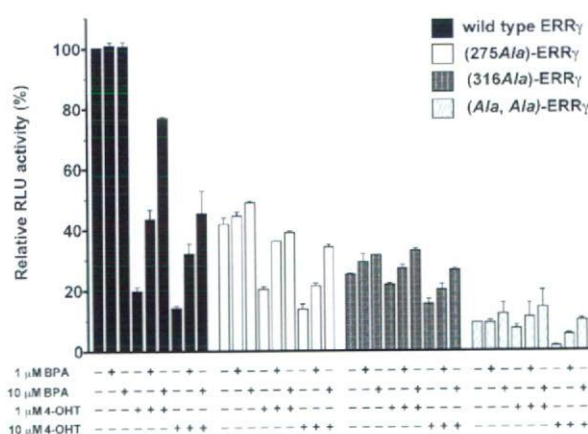


図 41. ERR γ -WT および変異受容体の BPA および 4-OHT により活性化の影響

⑥ ショウジョウバエの化学物質応答解析

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としてはヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずか 2 週間程度で進むことであり、また、乾燥酵母などからなるエサの粉末を溶解凝固させたもので食餌するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常として観察することが容易であることである。実際には、雌の産卵数および成虫の羽化数を計数するのみで、雌雄の生物体への直接的な生殖影響を観察・監修できる貴重な実験系である。こうした生体での試験には、並行して実施する試験管 (*in vitro*) での試験が必要である。したがって、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものである。「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系の開発は緊急な課題であり、本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立しようとするものであり、これまでにない新規な手法を提供するものである。本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

本年度は、これまでに確立したショウジョウバエ雌あるいは雄生体への影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系を改変し、雄の生殖能に対するビスフェノール A の影響を、次世代の繁殖羽化数で検討した。特に、今回は、この化学物質に孵化直後から幼虫時に暴露され食餌する場合と、成虫になってからはじめて開始する場合で影響がどのように異なるか、さらに数代にわたってビスフェノール A に暴露された場合の個体群を検討するため、幼虫時に暴露される系では、成虫以降の暴露による影響を排除する方法で実行した。

ビスフェノール A の成虫時、あるいは幼虫

時における暴露の影響を調べるため、3 組の交配実験による比較を行った。交配に用いた個体群と使用培地の組み合わせは表に示す通りである。実験に用いた個体は、同じ個体群から同日に羽化した成虫をあらかじめ通常培地とビスフェノール A 含有培地に産卵させ、孵化した幼虫を飼育し、同じ日に羽化した個体群から処女雌と未交尾の雄を選別し、メス:オス 10 匹:1 匹/本で交配させた。

	雌個体	雄個体	使用培地
A:control	通常雌	通常雄	通常培地
B: 幼虫時暴露	通常雌	BisphenolA 含有 培地で生育雄	通常培地
C: 成虫時暴露	通常雌	通常雄	BisphenolA 含培地

★ 多世代暴露個体群への影響

個体一代の暴露にとどまらず多世代にわたって暴露された場合の影響を見るために、ショウジョウバエをビスフェノール A 含有の培地で飼育し、1 代目から 4 代目までの影響をオスの羽化後 10 日目までの総次世代繁殖数として評価した。その結果は図 4 に示す通りである。3 段階の濃度のいずれにおいても、2 世代目で次世代の繁殖数が増加した。しかし、その後は世代を追う毎に、徐々に次世代の繁殖数が減少した。

継代でビスフェノール A 含有の培地で飼育された 4 代目の個体群では、羽化後 10 日目までの次世代繁殖数は 3 代目のものより少なかった (図 42)。しかし、通常は羽化直後の 2 日目まではほとんど受精能はないのに対して、いずれの濃度においてもコントロール群より高い受精能があることが判明した。これは、交尾能の成熟が早くなったためと考えられた。

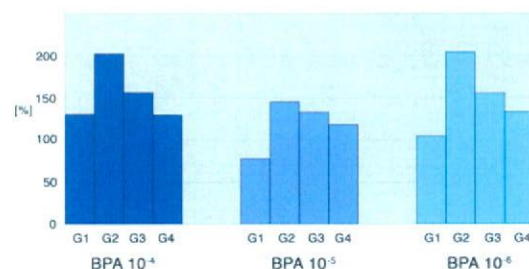


図 42 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S オスにおよぼすビスフェノール A の影響-継代効果 (次世代繁殖数相対値)

D. 考察

48種類存在するヒト核内受容体をなべてアッセイする試験系の早急な確立が求められている。こうした試験系では、48種類の一つ一つについて方法論を確立する必要がある。1種類の核内受容体について完成したからといって、直ちに他のものが連動的に確立するものではない。例えばセンシング抗体法においては、まず、特定の「核内受容体」について、それを認識し、かつ抗原ペプチドを強く認識する「センシング抗体」が必要である。原理的には非常にシンプルなこの試験法では、その核内受容体特異的な要件として十分な量の受容体タンパク質と抗体タンパク質が必要である。この方法論を各核内受容体について確立するに当たって、いくつかの考察すべきポイントがあることが明確となってきた。

まず、標的とすべきヒト核内受容体48種がすべて同じ分子機構で活性化されるのではないことが判明したことである。分子機構について大きく3つの受容体に分類できることが分かった。一つは、これまで考えられてきた、ステロイドホルモンなどのリガンドにより活性化される核内受容体である。ほとんどの核内受容体はこの「リガンド活性化型核内受容体」に分類される。現時点では48種のうち33種がこれに分類される。

第二には、リガンド無しでも生理活性コンホメーションにある「自発活性化型核内受容体」である。13種存在する。そして、あと2種がある第三の核内受容体は、生理活性コンホメーションをつくる α -ヘリックス12(H12)が欠損する受容体である。これら第二、第三のグループの核内受容体の生理的な意義はほとんど分かっていない。

センシング抗体法も、こうした核内受容体の本質に対応する原理、方法論で確立させる必要性が出てきた。「リガンド活性化型核内受容体」では、リガンドの結合によりH12がコンホメーション変化し、これにコアクチベータが誘導される。一方、最初から生理活性コンホメーションにある「自発活性化型核内受容体」は不活性になるときにH12が移動して、コンホメーション変化することになる。このように、コンホメーション変化の内容が異なり、「コンホメーション変化センシング」の意味が違うことになる。

もう一つの考察ポイントは、センシング抗体としての有効性である。ポリクローナル抗体は、コンホメーション変化するH12につい

てほとんど部位を認識する抗体成分の混合物である。「リガンド活性化型核内受容体」では、コンホメーション変化により受容体内部に埋もれて抗体が結合できなるといふ変化が導出される。したがって、この変化によりあぶれる抗体成分の分の変化量、減少量を定量すれば良い。一方、「自発活性化型核内受容体」は不活性になるときにH12が移動して、コンホメーション変化し、これまで受容体内に埋もれていた部分が晒されて、これらを認識する抗体成分の分の変化量、増加量を定量すれば良い。ポリクローナル抗体では、こうした変化に感応する抗体成分がほとんど確実に混在すると考えられる。

このようにセンシング抗体として先導的な役割を担うポリクローナル抗体に対して、モノクローナル抗体はいずれの場合コンホメーション変化を的確に感知するものでなくてはならない。「リガンド活性化型核内受容体」では、コンホメーション変化により受容体内部に埋もれて抗体が結合できなるといふ変化に感応する抗体でなくてはならない。「自発活性化型核内受容体」は不活性になるときにH12が移動するコンホメーション変化を正確に感知するものでなくてはならない。こうした限定性は、センシング抗体としてのモノクローナル抗体の作製を大変に困難にしている。しかしながら、当然なことながら、作製されたモノクローナルセンシング抗体はポリクローナルセンシング抗体よりも感度に非常に優れ（約10倍）、抗体としての有用性は高い。こうした状況で、本研究ではポリクローナル抗体にセンシング抗体としての先導的な役割を担わせ、モノクローナルセンシング抗体に作詳細解析の役割を担わせることとした。

さらにもう一つの考察ポイントは、モノクローナルセンシング抗体の作製法である。モノクローナル抗体の作製においては、ファージディスプレイ法および細胞融合法がある。ファージディスプレイ法によるモノクローナル抗体の作製においては、2つの抗体ライブラリーを使用することで高確率に有用な抗体を得ることができると判明し、これにより抗体選別技術が確立された。また、細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製においては、一次スクリーニングの後、モノクローン化したうえで二次スクリーニングするという方法に改良することができた。しかしながら、モノクローナルセンシング抗体を得る

という方法論として見たとき、ファージディスプレイ法の方が細胞融合法より簡便であり、また、はるかに効率的である。したがって、本研究ではファージディスプレイ法をまず実施し、次いで細胞融合法でさらに高効率化をはかることとした。

以下に各実験項目について、本年、平成 19 年度の研究・実験について概観し、その成果および問題点等を整理する。3 カ年にわたる総合的な考察については、総合報告書に詳しく取りまとめた。

ポリクローナル抗体センシングアッセイ

平成 17 年度までに、発現受容体タンパク質が購入可能な 24 種の核内受容体についてセンシング抗体の作製に取り組んだ。そして、18 年度には残り 24 種類のうち 12 種類、19 年度には 12 種類の核内受容体について、すなわち、19 年度までに 48 種類のすべての核内受容体について取り組んだ。これまで総計 46 種の核内受容体について抗体の作製・精製を完了した（図 43）。これらのうち受容体タンパク質の入手可能な 27 種類でセンシング抗体アッセイ法を確立した。

抗原ペプチド設計は、ほとんどの場合良好である。しかし、十分な抗体力価が見られないケースが最終的に 2 種類存在した。SF-1 および NGFIB の 2 つであるが、この原因は、抗原ペプチド設計の不備か、免疫動物の不調が考えられる。再度免疫して調べたが、良好なものは現在まで得られていない。現在、再度の免疫に取りかかっている。

ファージディスプレイ法によるモノクローナル抗体の作製

18 年度までに、①バイオパンニングにおける抗原ペプチドの固定化方法についての最適化、②バイオパンニングの手法を工夫することでアンタゴニスト結合型構造を認識する抗体を合目的に選別する（作り分ける）ことが可能であること、③複数のライブラリーを使うことの有効性、などを明らかにしてきた。実際に GR、ER α 、および ERR α 、 β 、 γ 、においてセンシングファージ抗体を取得することに成功した。そして、得られたセンシング抗体について、scFv の作製を行った。しかしながら、GR および ER α においては機能性 scFv の獲得にはならなかった。特に ER α については、多くの異なるファージ抗体が得

られたにもかかわらず、scFv として機能するクローンを獲得することが出来なかった。本年度は、バイオパンニングによって得られたクローン（ポリクローナルの状態）をまとめて HB2151（非サブレッサー株）に感染させ、その後にモノクローナル化を行うことにした。これにより、ファージ抗体の作製ができなくなるため、ファージ抗体 ELISA によるスクリーニングが出来なくなるが、直接的に scFv の状態でスクリーニングすることができると考えた。そして実際に、発現誘導を行い、長期培養を行った培養上清に対して SDS-PAGE を行ったところ、scFv が得られることが確認された。

多クローンの scFv を同時に発現することが可能であると判断されたので、実際に、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α について scFv スクリーニングを行った。その結果、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR について抗原を認識する機能的 scFv が検出され、有効なクローンを同定することに成功した。これらについては、現在までに scFv の大量調製に成功しており、早急にセンシングアッセイに取りかかる。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製

平成 18 年度には、細胞融合法によるモノクローナル抗体作製において大きな改良に成就した。それは、選別に時間がかかることから有効なクローンを取得仕損なう欠点を改良するために、二次スクリーニングを後回しにしたことである。すなわち、一次スクリーニングの後、直ちにモノクローン化する手法に変えた。これにより、二次スクリーニングで有効な抗体が定常的に得られるようになり、大きな改善になった。

平成 19 年度には、TR の構造変化を認識するモノクローナル抗体の調製に成功した。ポリクローナル抗体に比べ、モノクローナル抗体では少ない受容体量で構造変化を識別出来るため感度が良く、EC₅₀ 値の面では放射性トレーサーを用いる受容体結合試験の IC₅₀ 値と同程度を示すため精度の良い試験系の構築に成功した。ポリクローナル抗体に比べモノクローナル抗体の方が感度良く、効率的な試験系が構築可能であり、モノクローナル抗体の有用性が示された。

エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) のセンシング抗体応答解析

ERR γ センシング抗体アッセイによる試験において、ステロイドホルモンや植物エストロゲン等を含む 25 化学物質を検討した。その結果、インバースアゴニスト活性、インバースアンタゴニスト活性を非常に明解に検出することができた。また、これらの結果は共に、レポーター遺伝子試験の結果と良い相関を示すことが判明した。

今回、自発活性化型核内受容体である ERR γ の活性を抗体センシング法で評価できたことは、未だ活性評価系が無い自発活性化型核内受容体の活性を調べるうえで大きな意味を持つ。今後は様々な自発活性化型核内受容体の評価も行い、環境ホルモンが人体に与える影響を正確に調査する必要があると考えられる。このため、最も重要なことはインバースアゴニストを同定することである。

エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とビスフェノール A の受容体応答

[^3H]BPA との競争結合試験により、BPA 類似体の ERR γ への結合性を精査した。また、BPA 類似体の結合性を系統的に解析（構造活性相関解析）することで、ERR γ に結合するために必要な構造要因の同定を試みた。今回の構造活性相関解析によって得られた最も重要な知見は、「ERR γ への結合には 1 つのフェノール性 OH 基で十分である」ということである。すなわち、ビスフェノール（ビスとは「2 つ」を意味する）だけではなく、フェノール基を 1 つしか持たないフェノール誘導体が ERR γ に結合することが明らかとなった。

そこで、一連のアルキルフェノール類について ERR γ の結合試験を行ったところ、多くのアルキルフェノールが ERR γ への結合性を示した。特に、4-*tert*-ブチルフェノールが、非常に高い結合性 (IC_{50} 値 26.1 nM) を示すことが明らかとなり、BPA に次いで生体への悪影響が懸念される。また、ERR γ だけでなく、ER α に対する結合性を調べたところ、試験に用いたすべてのアルキルフェノールが、ER α に対する結合性を示さなかった。つまり、これらのアルキルフェノール類は、ERR γ に選択的に結合する化学物質であり、ERR γ を介して内分泌かく乱作用を示す可能性が高いことが判明した。

BPA 類似体を用いた構造活性相関解析では、BPA からメチル基を 1 つ削除した化合物であ

る BPE が、BPA よりさらに強く ERR γ に結合することが発見された。こうした、BPA および BPA 誘導体、アルキルフェノール類については、これまでのように ER α についての評価・スクリーニングだけでは不十分であり、ERR γ を介した生体への影響評価を *in vivo*、*in vitro* の両方で行わなければならない。

そこで、まず、ERR γ に結合することが確認された化学物質のうち、BPE、BPAF、4- α -クミルフェノール、4-*tert*-ブチルフェノールの 4 種について、レポーター遺伝子アッセイによる活性評価を行った。これらの化学物質は、すべて BPA と同様のインバースアンタゴニストであることが判明した。

ERR γ の機能が正確に解明されていない現状において、こうしたインバースアンタゴニストによる生体への影響を理解することは非常に難しい。しかしながら、ERR γ に結合する化学物質が我々の身近に多量に存在していることを認識し、可及的速やかに取りかかる必要がある。

ところで、BPA の ERR γ -LBD 結合体の X 線結晶構造解析により、ERR γ -LBD が自発的に取る活性型構造を保持したまま、BPA は ERR γ -LBD のリガンド認識部位と目されるポケットに結合することが明確に示された。さらに、BPA の ERR γ -LBD に対する天然ホルモンに匹敵するほどの強い結合能は、BPA に存在する 2 つのフェニル基のフェノール性 OH 基による合計 3 つの水素結合と、さらにフェニル基やメチル基による受容体アミノ酸側鎖との複合的な π 相互作用に由来することが判明した。

BPA の周辺には Leu309、Tyr326、Phe435、Met306 といった芳香族アミノ酸やアルキル側鎖をもつアミノ酸が複数存在する。こうしたアミノ酸側鎖に由来する BPA との弱い相互作用も、複数存在することにより BPA と ERR γ -LBD の強い結合を支える要因となる。特に Leu309 と Tyr236 は BPA の芳香環の上下からサンドイッチするように BPA をしっかりと保持している。また、BPA のメチル基上の水素をフッ素に置換した形のビスフェノール AF は、 $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{CF}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ の化学構造をしているが、著しく結合能が低下する。これは、電子が豊富な CF_3 基は、 CH_3 基とは異なり、近傍の Phe435 とはむしろ反発することに起因する。このように、水素結合だけではなく、弱い相互作用も BPA の結合に重要な役割を果たしていることは明らかであり、また、BPA に類似した ERR γ の天然ホルモンが

存在する可能性も考えられる。

BPA/ERR γ -LBD の X 線結晶構造解析より、BPA の一つフェノール性 OH 基は ERR γ の H3 の Glu275 および H5 の Arg316 と水素結合している。今回は、これらの 2 つ残基について 11 種の変異受容体を作製し、 $[^3\text{H}]$ BPA を用いた結合試験により BPA の結合能を詳細に解析した。両方を Ala に置換すると結合能が全くなることから、Glu275 および Arg316 の水素結合の本質的な重要性が判明した。また、どちらか一方を置換した場合には、結合可能であるがその結合能に変化が見られ、Arg316 の水素結合が最も重要であるが、Glu275 による水素結合も支持的役割ながら必須であることが判明した。

一方、レポーター遺伝子アッセイでは ERR γ は非常に強い構成的基盤活性を示し、Arg316 および Glu275 の変異により活性化が弱くなることから、これらの残基は ERR γ の自発活性化を維持する重要な残基であることが分かった。

以上の結果より、Arg316 および Glu275 残基はリガンド結合に重要な役割を果たすことが判明した。核内受容体が、それぞれに分化あるいは進化する過程で、フェノール構造を持つような類似したリガンドと結合するために保存されたと考えられる。このような構造要因が他にも多数保存されていると考えられる。これらの解析は、将来的に化学物質と受容体間の定量的構造活性相関 (QSAR) を構築するにあたり、非常に重要と思われる。

ショウジョウバエのエストロゲン関連受容体 (dERR) へのビスフェノール A の応答解析

ショウジョウバエのゲノムプロジェクトが完了して、その中でヒト・エストロゲン受容体と相同な遺伝子が確認され、*Drosophila* ERR (ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体) と呼ばれている。ショウジョウバエ ERR (dERR) はヒト・エストロゲン受容体 ER、あるいはエストロゲン関連受容体 ERR と非常に類似しており、ショウジョウバエにもエストロゲン受容体があると強く示唆される。現在は、この受容体のリガンドは明らかになっていないが、*in vivo* での内分泌かく乱作用の評価法を確立する意義は高い。ショウジョウバエは、約 10 日で卵から成虫になる。したがって、高等動物に比べると短い期間で何代もの経過を見ることが可能である。例えば、我々ヒトで 10 代の経過を見るのに約 200

年かかるのに比べ、ショウジョウバエは約 100 日で経過を見ることができる。このため、ショウジョウバエによる評価法を確立することは重要な意味があると考えられる。

今回、これまでに確立した評価法を駆使して、ビスフェノール A (BPA) がショウジョウバエオスの受精能、あるいは交尾能に及ぼす影響を、幼虫時と成虫時での影響にわけて観察することができた。成虫なつてはじめて BPA を摂取した場合には、受精能はコントロール群と比較して殆ど変わらなかった。しかし、通常のショウジョウバエオスは羽化後 10 日過ぎても受精能の増加が継続するのに対して、BPA を摂取すると 8 日目頃から受精能が減少することが分かった。このことから、BPA の摂取の影響が 8 日目頃から現れるものと考えられた。一方、孵化直後から幼虫時に BPA を摂取し続けたオスは、羽化後に受精能が発現するのが早まる傾向にあった。また、多世代にわたって、暴露し続けると、受世代総繁殖数が徐々に減少すること、4 代目になると、羽化後の受精能の発現が早くなることから、生殖腺における精原細胞の通常の細胞分裂に負の影響をおよぼすこと、精原細胞から精子への減数分裂の速度が速くなる、あるいは減数分裂の開始が早くおこることが考えられる。

これらの結果から、BPA に対する一代限りの影響と何代にもわたって暴露を受けた場合では、影響が現れる側面が異なること、さらに、何代にもわたって暴露を受けた場合ではその影響が次第に強く現れることが明らかになった。

E. 結論

「ホルモンの受容体結合性およびホルモン活性の同時測定評価法」としてホルモン受容体コンホメーション変化センシング抗体法を確立することが本研究課題の目的である。本年、平成 19 年度までに 48 種のヒト核内受容体のうち、46 種について抗体の作製・精製に成就した。そして、受容体タンパク質が入手可能な 27 種についてセンシング抗体法を確立した。本年度には 15 種の核内受容体について、内分泌かく乱物質と懸念されている化学物質 6 種 (ビスフェノール A、ノニルフェノール、*tert*-オクチルフェノール、トリブチルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル) を試験し、その結果、「ビス

フェノールAはエストロゲン関連受容体 ERR γ に非常に強く結合する」という以外に新規な化学物質、核内受容体の組み合わせは発見されなかった。

このように「化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする」という着想に基づくセンシング抗体法は、「リガンド活性化型核内受容体」のみならず、ERR γ に代表される「自発活性化型核内受容体」のアッセイにも有効であることが立証された。自発活性化型核内受容体においては、インバースアゴニスト、インバースアンタゴニストを区別して測定することを可能にした。今後、ポリクローナル抗体で先導的にセンシング能に優れた抗体の調製をはかり、次いで、対象の核内受容体の抗体応答特性に応じた反応性のモノクローナル抗体を主にファージディスプレイ法から、さらには細胞融合法で得るスキームで実施する予定である。

ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた本研究課題から実際に、『ERR γ におけるビスフェノールAの高活性』が発見され、これにまつわる多くの検討を実施してきた。その結果、エストロゲン関連受容体 ERR γ にビスフェノールAと同等か、より強い化学物質数種が発見された。一方、ビスフェノールAは ERR γ にきわめて特異的に結合することが判明した。ただし、後者は現時点でアッセイされた約 20 種においてという限定的な条件においての特異性である。ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた試験からこのようなリガンド＝化学物質（化合物）と核内受容体の組み合わせ事例が、今後も出現する可能性が高い。また、受容体を核内受容体に限定せずに受容体一般で調べると、さらに多く出現すると思われる。

受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法は、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論であり、すべての核内受容体に適用可能なスクリーニング法である。今後、ヒト、あるいは関連する動物種の核内受容体全般について特異な化学物質をスクリーニングする方法として確立し実用に供してアッセイすることは緊要の課題である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表 論文発表

1. Receptor binding characteristics of endocrine disruptor bisphenol A. Chief and Corroborative Hydrogen Bonds of Bisphenol A Phenol-hydroxyl Group with Arg316 and Glu275 Residues in the Human Nuclear Receptor of Estrogen-related Receptor γ (ERR γ). X. Lui., A. Matsushima., H. Okada., T. Tokunaga., K. Isozaki, and Y. Shimohigashi: *FEBS J.*, **274**, 6340-6351 (2007).

2. Double-labeled *in situ* Hybridization Reveals the Lack of Co-localization of mRNAs for the Circadian Neuropeptide PDF and FMRamide in Brains of the Flies *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster*. A. Matsushima., K. Takano, T. Yoshida, Y. Takeda, S. Yokotani, Y. Shimohigashi, and M. Shimohigashi: *J. Biochem.*, **141**(6), 867-877 (2007).

3. Structural Evidence for Endocrine Disruptor Bisphenol A Binding to Human Nuclear Receptor ERR γ . A. Matsushima., Y., Kakuta, T. Teramoto, T. Koshiba, X. Lui, H. Okada., T. Tokunaga., S. Kawabata, M. Kimura, and Y. Shimohigashi: *J. Biochem.*, **142**(4), 517-524 (2007).

4. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-related Receptor γ (ERR γ). H. Okada., T. Tokunaga., Lui, X., S. Takayanagi, A. Matsushimand Y. Shimohigashi: *Environ. Health Perspect.*, **116**, 32-38 (2008).

5. Design Synthesis of Highly Potent Antagonist of ORL1 Nociceptin Receptor. K. Isozaki, J. Li, K. Okada, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi: *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 2635-2664 (2008).

6. The Output Mechanism of Circadian Pacemaker Neuropeptide PDF in the Regulation of Bimodal Locomotor Distribution. Y. Takeda, K. Koga, A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 65-68 (2008).

7. Differential Receptor Recognition by Dmt-Containing Enkephalin Dimers Cross-Linked by Phenylenediamines. N. Inokuchi, K. Isozaki, Y. Tsuda, Y. Okada, S. Osada, T. Nose, T. Costa and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 3003-306 (2008).

8. Structural Requirement of Housefly FMRFamide Peptides in Its Receptor Activation. A. Matsushima, Y. Koretsune, A. Kaneki, K. Isozaki, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 313-314(2008).

9. Optimization of the N-Terminal Group of Ac-RYYRIK-NH₂ as ORL1 Receptor Antagonist. J. Li, Kaname Isozaki, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 257-260 (2008).

10. The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family. M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 491-492(2008).

11. The molecular mechanism of ORL1 nociceptin receptor in activation: Residual essentials in the sixth transmembrane domain. K. Isozaki, J. Li, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2007, 289-292 (2008).

12. A Docking Modelling Rationally Predicts Strong Binding of Bisphenol A to Estrogen-Related Receptor γ . T. Nose and Y. Shimohigashi: *Protein & Peptide Letters*, **15**, in press (2008).

13. Direct Measure of Fluorescence Intensity for Efficient Receptor-binding Assay: Conjugates of Ethinylcarboxyestradiol and 5(and 6)-Carboxy-fluorescein via α,ω -Diaminoalkanes as a Tracer for Estrogen Receptor. D. Asai, T. Tokunaga, K. Kondo, T. Kawaguchi, S. Takayanagi, T. Shinmyozu, M. Nakai, Y. Yakabe, and Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, in press (2008).

学会発表

1. 松島綾美、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、下東康幸、フェノール化合物の核内受容体結合活性、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に対するビスフェノール A の結合特性、日本ケミカルバイオロジー研究会 第2回年会、2007. 5. 9-10。

2. 下東康幸、ビスフェノール A はエストロゲン受容体 (ER) よりエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に強く結合する、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

3. 下東康幸、生物時計ペースメーカーおよびリズム伝達神経ペプチドの多様性アイソフォームによる概日リズム制御、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

4. 野瀬 健、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とビスフェノール A の結合構造解析、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

5. 松島綾美、角田佳充、寺本岳大、小柴琢己、川畑俊一郎、木村 誠、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ におけるビスフェノール A の π 系結合様式の解析、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

6. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法によるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) への化学物質の影響評価、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

7. 劉 曉輝、徳永隆俊、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、部位特異的アミノ酸変異による内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) 結合部位の同定、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

8. 岡田浩幸、徳永隆俊、高 明香、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型と環境ホルモンビスフェノール A の構造活性相関研究、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

9. 磯野裕章、岡田浩幸、徳永隆俊、松島綾美、下東康幸、自発活性型核内受容体ERR β のコンホメーション変化センシングアッセイのためのファージディスプレイ、モノクローナル抗体の作製、第44回化学関連支部合同九州大会、2007.7.7。
10. 錦織充広、徳永隆俊、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、レチノイド関連オーファン核内受容体 ROR を介した内分泌攪乱作用評価試験系の構築、第44回化学関連支部合同九州大会、2007.7.7。
11. 武田行正、劉曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ERR γ およびdERRの発現解析、比較生理生化学会第29回大会、2007.7.6-8。
12. 武田行正、発現解析からのビスフェノールA受容体ERR γ を介したBPAの影響考察、第7回泉屋コロキウム、2007.8.5-6。
13. 徳永隆俊、自発活性化型エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) におけるコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法の開発、第7回泉屋コロキウム、2007.8.5-6。
14. 劉 曉輝、変異による内分泌攪乱化学物質ビスフェノールAのエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) 結合の構造要因の解析、第7回泉屋コロキウム、2007.8.5-6。
15. 磯野裕章、ファージディスプレイ単鎖可変抗体(scFv)による自発活性化型核内受容体のためのコンホメーション変化センシングアッセイ法の確立、第7回泉屋コロキウム、2007.8.5-6。
16. 錦織充広、レチノイド関連オーファン受容体ROR α 、 β および γ のコンホメーション変化センシング抗体の作製、第7回泉屋コロキウム、2007.8.5-6。
17. 下東康幸、A strategy to explore the Target Receptor of Endocrine Disruptors、Estrogen-related Receptor γ (ERR γ) as a Genuine Acceptor of Bisphenol A、6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences、2007.8.21-25。
18. Matsushima, A., Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., and Shimohigashi, Y., Estrogen-related receptor γ (ERR γ) as a special receptor for endocrine disruptor bisphenol A、The 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants - DIOXIN 2007、2007.9.2-7。
19. 錦織充広、野瀬健、劉曉輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体ファミリーのコンホメーション変化センシング抗体、第44回ペプチド討論会、2007.11.79。
20. 武田行正、劉曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノールA受容体ERR γ とそのアイソフォームのヒト脳および生殖器官における発現分布、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会、2007.12.11-15。
21. 松島綾美、角田佳充、寺本岳大、小柴琢己、川畑俊一郎、木村 誠、下東康幸、内分泌攪乱物質に結合するエストロゲン関連受容体 γ 型の活性化構造の解析、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会、2007.12.11-15。
22. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、Chief and corroborative hydrogen bonds of endocrine disruptor bisphenol A phenol-hydroxy group to the human estrogen-related receptor γ with Arg316 and Glu275 residues、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会、2007.12.11-15。
23. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、高柳明香、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールA誘導体によるエストロゲン関連受容体 γ 型の構造活性相関研究
第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会、2007.12.11-15。
24. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールAはステロイドホルモン核内受容体9種うちERR γ にのみ結合する、第10回環境ホルモン学会研究発表会、2007.12-10-11。