

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. Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. A. Matsushima, Y Kakuta, T. Teramoto, T. Koshihara, X. Liu, H. Okada, T. Tokunaga, S. Kawabata, M. Kimura, and Y. Shimohigashi: *J. Biochemistry*, **142**, 517-524 (2007).
2. Receptor binding characteristics of the endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor γ . Chief and corroborative hydrogen bonds of the bisphenol A phenol-hydroxy group with Arg316 and Glu275 residues. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *FEBS Journal*, **274**, 6340-6351 (2007).
3. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor- γ . H. Okada, T. Tokunaga, X. Liu, S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Environmental Health Perspectives*, **166**, 32-38 (2008).
4. A Docking Modelling Rationally Predicts Strong Binding of Bisphenol A to Estrogen-Related Receptor gamma. T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Protein and peptide letters*, **15**, 290-296 (2008).

学会発表

1. 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 結合様式の解析、日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。
2. 岡田浩幸、徳永隆俊、高柳明香、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、日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

3. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 曉輝、角田佳充、下東康幸、結晶構造から明らかになったビスフェノールA受容体の結合構造要因、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 9-11。

4. 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の低用量効果が疑われるヒト生殖組織および脳におけるエストロゲン関連受容体 ERR γ の発現解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 9-11。

5. 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種のうち ERR γ のみに結合する、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 9-11。

6. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、徳永隆俊、下東康幸、ERR γ へのビスフェノールA結合におけるArg316およびGlu275との水素結合機構、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 9-11。

7. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、アルキルフェノール類とエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の結合における構造活性相関研究、日本内分泌攪乱化学物質学会第10回研究発表会、2007. 12. 9-11。

8. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、高柳明香、松島綾美、下東康幸、Structure-activity relationships between estrogen-related receptor γ and bisphenol A derivatives、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。

9. 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 gamma 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。

10. 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、Structure-activity studies on the activation conformation of estrogen-related receptor γ to

bind the endocrine disruptor、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。

11. 武田行正、劉 曉輝、徳永隆俊、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Distribution of bisphenol A receptor, Estrogen-Related Receptor γ (ERR γ) and its isoforms, in human brain and reproductive organs、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。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

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

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

我々は、内分泌かく乱物質と考えられているビスフェノールA（BPA）がエストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に、解離定数 $K_D = 5.5$ nM と天然ホルモン並みに強く結合することを明らかにした。これまで、BPAはエストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）を介して内分泌かく乱作用を示すとされていた。しかしながら、BPAのERへの結合能はエストロゲン・17 β -エストラジオール（E2）に比べると非常に弱い。一方でBPAが低用量で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすという報告がなされている。また、ERRはERの標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列（ERE）と結合する。逆に、ERもERRの応答配列（ERRE）を認識する。こうしたことから、ERRとERは相互に関連した機能制御系を形成している可能性がある。したがって、BPAがERR γ と結合することによってERをも含めた系で内分泌かく乱作用を示す可能性も考えられ、現在、ERR γ の機能解析や効率的な試験系の確立が早急に求められている。本研究では、BPAとERR γ の結合の分子メカニズムに焦点をあて、BPAとERR γ のリガンド結合ドメイン（ERR γ -LBD）の結合体の構造を、X線結晶構造解析により解析した。その結果、自発活性化型核内受容体であるERR γ の活性型構造を保持したまま、BPAはリガンド認識部位に取り込まれていることが判明した。BPAには2つのフェノール骨格が存在する。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た。さらに、リガンド結合ポケットを形成するアミノ酸側鎖が、BPAのベンゼン環あるいはメチル基と相互作用していることが判明した。このように、BPAとERR γ の結合体のX線結晶構造解析により、BPAとERR γ の間には複数の相互作用があり、BPAのERR γ に対する強い結合が形成されること、ERR γ にはBPAが最適に結合できるスペースがあることなどの証明に成功した。

A. 研究目的

ビスフェノールA（BPA）は、 $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ の対称な構造をした化学物質である。これはエストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）を介して作用を示す内分泌かく乱物質、いわゆる「環境ホルモン」と考えられている。しかし、BPAのERへの結合能、活性はエストロゲンに比べると1/1000～1/10,000と非常に弱い。一方、最近になって、BPAが規制値（2.5～3.0 ppm）よりはるかに濃度が低い「低用量」

で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このような低用量作用はどのような分子メカニズムで発現するのか？ 実際にERを介しているのか？ これが「低用量問題」として議論になっている。こうしたなか、我々は「BPAは、ERではなく、エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に強く結合する」ことを発見した。さらにごく最近、BPA様の骨格構造を持つかなり多くの化学物質が、ERR γ に結合することを明

らかにした。これらの成果はイギリスの王立化学会誌chemistry Worldに取り上げられる等、世界中で大きな反響を呼んでいる。

BPAは、1891年にロシアのDianinによって初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にドイツのZinkeによる合成法の改良で、アセトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。また、BPAは、主にポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の生産に用いられる工業原料であり、世界中で年間約300万トンとかなり大量に用いられている。こうした樹脂はいわゆる「プラスチック製品」として身の回りに数多く存在する。このプラスチックには、合成過程で高分子化されずに残留するBPA単量体が極微量ながら存在し、これが漏出することが問題になっている。哺乳瓶を加熱すると、BPAが溶出すること危惧する声もある。したがって、「BPAが低用量で内分泌かく乱作用を示す」ことが事実であれば、その影響ははかり知れないほど重大と考えられているのである。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等の低分子量脂溶性生理活性物質をリガンドとする転写制御因子である。エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor; ERR) は、ERと非常によく似たアミノ酸配列をもつことから発見され、ヒトではERR α 、ERR β 、そしてERR γ と、3つのサブタイプが存在する。しかしながら、これらのいずれについても内在性リガンドや生理機能に関してはほとんど何も分かっていなかった。

ERRは、リガンドなしで活性化コンホメーションとなる、いわゆる「自発活性化型核内受容体」(self-activated nuclear receptors, SA-NR) である。その構成基盤活性 (Constitutive activity) はERよりも非常に大きい。このため、通常の「リガンド活性化型核内受容体」(ligand-activated nuclear receptors, LA-NR) とは異なる活性制御機構の存在が想定された。

一般的に、受容体のリガンド認識部位にリガンドが結合すると、アゴニストとして受容体を活性化するか、アンタゴニストとして活性化を阻害すると考えられている。しかし、我々の研究成果により、BPAはERR γ のリガンド認識部位に非常に強く結合するにも関わらず、活性を全く変化させないことが判明した。すなわち、自発活性化型の構造を変化させずにリガンド認識部位に結合するというユニークなリガンドであると考えられた。さらに、BPAは、ERR γ の活性化構造を不活性化型構造に変化させる4-ヒドロキシタモキシフ

エン (4-OHT) の効果を阻害して、活性を回復させる「インバースアンタゴニスト」であることを見出した。

そこで、本研究では、このインバースアンタゴニスト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必要があると考えた。さらに、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、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とした。

B. 研究方法

(1) 受容体 ERR γ の調製

ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて ERR γ の LBD 領域のクローニングを行った。得られた PCR 産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いて ERR γ -LBD の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製した。さらにグルタチオンセファロース 4B ビーズに ERR γ -LBD が結合した状態のまま、プレジジョンプロテアーゼによる酵素消化を行い、GST を ERR γ -LBD から切り離して ERR γ -LBD を回収した。これを限外濾過により濃縮して-80°Cで保存した。

(2) 結晶作製

ERR γ -LBD と BPA の結合体結晶作製のために、Hampton Research 社製のスクリーニングキット Crystal Screen、Crystal Screen II、および Ion/PEG Screen で結晶化条件のスクリーニングを行った。ERR γ -LBD の物理量の3倍量になる BPA を ERR γ -LBD 溶液に添加して試料溶液とした。2 μ lの試料溶液と 2 μ lの結晶化リザーバー溶液を混合し、ハンギングドロップ法で結晶作製を行った。こうして、試料をセットしたプレートを 20°Cに静置して結晶を作製した。約 400 種の結晶化条件をスクリーニングしたところ、1種類の条件で結晶が形成され、これを最適化して最終的な結晶化条件を決定した。

(3) X線回析データ収集およびプロセッシング

結晶の X線による回析データは、兵庫県佐用郡にある SPring-8 の構造生物学 III ビー

ムライン BL38B1 で収集した。回折データの解析には、HKL2000 パッケージを用いた。

(4) 構造決定および構造精密化

ERR γ -LBD と BPA の結合体構造は、CCP4 パッケージの MOLREP を用いて、ERR γ -LBD と 4-OHT の結合体 (PDB id: 1S9Q) を元にした分子置換法で行った。構造精密化は CCP4 パッケージの Refmac を用いて 1.6 Å の分解能で行った。プログラム Coot を用いて、手動で構造最適化と水分子の付加を行なった。最終構造は、ERR γ -LBD のアミノ酸 232 位-458 位に相当し、1 分子の BPA と 387 個の水分子を含んでいた。

(5) 点変異 ERR γ -LBD の作製

水素結合することで、BPA と ERR γ -LBD の結合に重要な役割を果たすと判明した 275 位グルタミン酸および 316 位アルギニンの 2 アミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換したもの、さらに 346 位アスパラギンをアラニンに置換した変異受容体を、PCR 法を用いて作製し、野生型 ERR γ -LBD と同様に発現・精製した。

(6) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°C で行った。GST-ERR γ -LBD と各濃度の放射標識された BPA を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の BPA を放射標識された BPA と併に加えることにより調べた。遊離の [³H]BPA はデキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

C. 研究結果

(1) BPA と ERR γ の結合体の結晶作製

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。

(2) X 線回折データ収集および構造解析

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 (表 1, 図 1.)。

表 1. 結晶構造データ

Data set	
Space group	$P4_12_12$
Unit cell parameters	$a = 64.05 \text{ \AA}$ $b = 64.05 \text{ \AA}$ $c = 136.87$
Data collection	
Beam line	SPring-8 BL38B1
Wavelength (Å)	1.0
Resolution range (Å)	28.06–1.60
Number of reflections	
Observed	433–326
Unique	36:414
$R_{\text{sym}}^{\text{a,b}}$	0.058 (0.349)
$I/\sigma(I)^{\text{a}}$	40.4 (8.2)
Completeness (%)	99.6
Refinement statistics	
Resolution range (Å)	28.06–1.60
Number of reflections	36,414
Working set	34,493
Test set	1,921
Completeness (%)	99.6
$R_{\text{cryst}}^{\text{c}}$ (%)	16.9
$R_{\text{free}}^{\text{d}}$ (%)	19.7
Root mean square deviations	
Bond length (Å)	0.012
Bond angles (°)	1.333
Average B-factor (Å ²)	
Protein	18.9
BPA	15.5
Glycerol	39.1
Water	35.3
Number of atoms	
Protein	1,935
BPA	17
Glycerol	18
Water	387
Ramachandran analysis	
Most favoured (%)	94.8
Allowed (%)	5.2
Generously allowed (%)	0.0
Disallowed (%)	0.0

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell.
^b $R_{\text{sym}} = \sum (-I) / \sum I$, where I is the intensity measurement for a given reflection and I is the average intensity for multiple measurements of this reflection.
^c $R_{\text{cryst}} = \sum F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}} / \sum F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{cal} are observed and calculated structure factor amplitudes.
^d R_{free} value was calculated for R_{cryst} , using only an undefined subset of reflection data (5%).

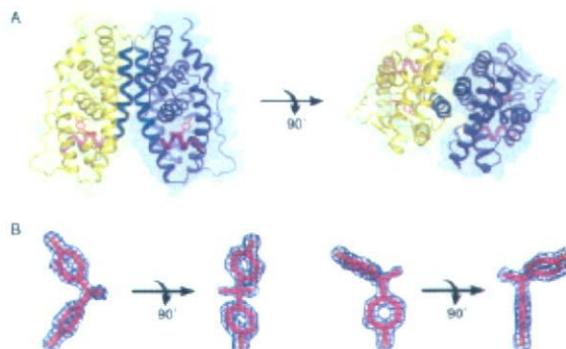


図 1. BPA と ERR γ の複合体構造
A は二量体の全体構造を、B は BPA の構造を示す。

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 2)。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 3)。

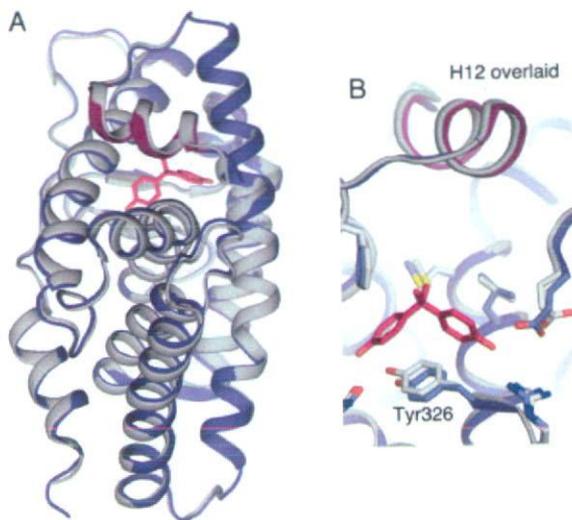


図 2. BPA と ERR γ の複合体と、ERR γ の活性型構造の重ね合わせ
灰色がリガンド無しの ERR γ 活性型構造、青が BPA と ERR γ の複合体構造である。

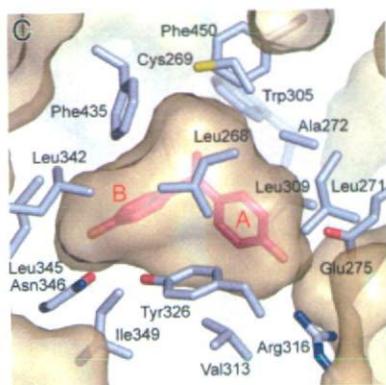


図 3. BPA とリガンド認識部位を形成するアミノ酸

(3) 点変異 ERR γ -LBD を用いた BPA 飽和結合試験

点変異 ERR γ -LBD の発現は、野生型 ERR γ -LBD と全く同様に行った。[3 H]BPA を用いた飽和結合試験により、346 位アスパラギンをアラニンに置換した変異体では解離定数 K_d が野生型の約 2 倍弱くなり、確かに BPA と ERR γ -LBD の結合に寄与していることが示された。さらに、275 位グルタミン酸および 316 位アルギニンの両方を置換したアラニンに置換した変異体では BPA は全く結合出来なくなることが判明し、これらのアミノ酸が必要である事が示された。このように、X 線結晶構造解析で明らかにした構造要因は、確かに BPA の結合に重要である事が判明した。

D. 考察

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。

図 4 に示すように、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、 $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-C}(\text{CF}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ 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 基のように近傍の 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。

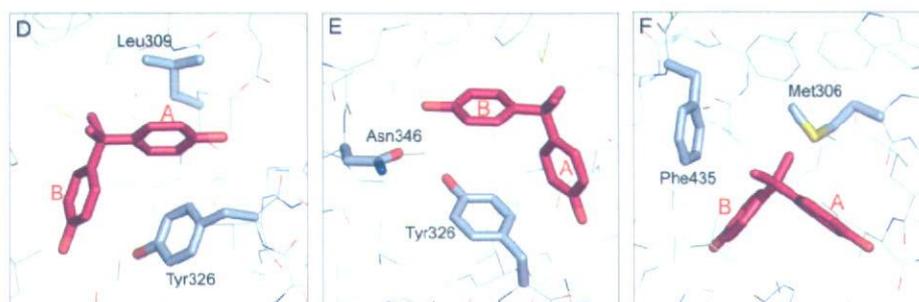


図 5. BPA と π 相互作用するアミノ酸

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

F. 研究発表

論文発表

1. 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).

2. 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).

3. 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).

学会発表

1. 松島綾美、徳永隆俊、劉 暁輝、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. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、結晶構造から明らかになったビスフェノール A 受容体の結合構造要因、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。

6. 松島綾美、環境ホルモン・ビスフェノールAとエストロゲン関連受容体 γ 型の結合要因、化学材料セミナー-分子科学の基礎と応用-、2008. 3. 23。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

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

研究分担者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授
分担研究協力者 劉 曉輝 九州大学大学院理学府博士課程

研究要旨

内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールA（BPA）は、低用量で脳神経系や生殖系で悪影響を及ぼす化学物質として、そのリスクが強く懸念されている。我々は、こうしたBPAの受容体として、脳神経系で高発現されている核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ : ERR γ ）を発見した。ERR γ は、「自発活性化」型オーファン核内受容体として知られているが、その生理機能は未解明であり、また、内在性リガンドも不明である。さらには、なぜ ERR γ が BPA と結合できるのか、構造化学的な要因も未解明であった。我々はごく最近、BPA/ERR γ -LBD（リガンド結合ドメイン）複合体の 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にした。そこで、本研究では ERR γ への BPA 結合における本質的な構造要因を明らかにするため、結合部位として重要な機能を担うと考えられるアミノ酸を他のアミノ酸へ変異することにより、BPA 結合性の変化を解析してそれらのアミノ酸の重要性を評価することにした。今回、BPA のフェノール性 OH 基と水素結合していると思われる 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、Glu275 を Ala、Asp、Gln、Leu、および Arg に、また Arg316 を Ala、Lys、Leu、および Glu に置換した変異 ERR γ を作製し、BPA 結合性や ERR γ の自発的な基盤活性の変化を検討した。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質、いわゆる「環境ホルモン」の問題は、主として女性ホルモン受容体（estrogen receptor；ER）における内分泌攪乱作用とされてきた。しかし、ヒト・ゲノム解析に伴い、ヒト核内受容体には ER を含めて合計 48 種類あることが判明すると、これらすべてに環境ホルモン問題が存在し、しかも、きわめて高リスクである可能性が強く懸念されるようになった。こうしたなか、我々は 2006 年に、環境ホルモンであるビスフェノールA（BPA）はヒト・エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）と非常に強く結合し、ERR γ の高い自発活性を保持することを明らかにした。

BPA は、女性ホルモン様作用を示すとされ

てきた環境ホルモンであるが、女性ホルモン受容体である ER への直接の作用は人間の体内で作られる女性ホルモン 17 β -estradiol の 1/1,000～1/10,000 と非常に弱いものである。しかしながら、近年、BPA についてきわめて低濃度において脳の性分化、成熟、さらに生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすという「低用量効果」の報告が相次ぎ、この作用機序、分子メカニズムの解明が急務とされている。

エストロゲン関連受容体（estrogen-related receptor; ERR）は、ER と非常によく似たアミノ酸配列をもつことから発現され、ステロイドホルモン受容体グループに分類される。ヒトでは α 、 β 、そして γ 型の 3 つのサブタイプが存在し、これらのいずれについても内在性リガンドや生理機能に関してはほとんど

何も分かっていない。さらに、ERRはリガンドなしで活性化コンホメーションとなる、いわゆる「自発活性化型核内受容体」(self-activated nuclear receptors, SA-NR)である。ERR γ は、ヒト成人では脳や膵臓、肺、骨髄、副腎、前立腺、胃など高濃度に発現しており、また、胎盤には最も高濃度の発現している。特に注目されるのは、ヒト胎児で脳に非常に高濃度に発現していることである。さらに、ERR γ は、脳の性分化や成熟、脳神経系の発達に関与していると推測されている。こうしたなか、BPAがERR γ に非常に強く結合するということから、BPAが「低用量で攪乱作用を示す機構」と「脳神経系の発達を攪乱する危険性」の分子機構解明のきわめて有力な端緒になる。

そこで、なぜERR γ がBPAと結合できるのか、構造化学的な解析が急務となった。我々はごく最近、BPA/ERR γ -LBD (LBD;リガンド結合ドメイン)複合体の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。今回、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。

B. 研究方法

(1) 変異受容体の作製

ヒト腎臓のcDNAを鋳型として、PCRの増幅より、ERR γ のLBD (222-458 aa) および全長領域のクローニングを行った。さらに、得られたWT-ERR γ -LBDを鋳型として11種類の変異受容体を、全長領域を鋳型として3種類の変異受容体を作製した。変異させたLBDおよび全長はそれぞれ発現ベクターpGEX6p-1およびpcDNA3.1に組み換えた後、塩基配列を確認した。

(2) 変異受容体タンパク質の調製

得られたERR γ -LBD/pGEX6p-1変異受容体は、大腸菌(BL21)を用いてGST融合タンパク質として大量発現を行った。1 mM イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG)

で37°C、3時間を誘導させ、グルタチオンセファロース 4B ビーズを用いてアフィニティ精製した。20 mMのグルタチオンでビーズより溶出後、Sephadex G-10で脱塩して、Bradford法でタンパク質濃度を測定した。

(3) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cで行った。野生型および各種変異受容体GST-ERR γ -LBDと各濃度の放射標識されたBPAをbinding buffer中で混合し、2時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量のBPAを放射標識されたBPAと併に加えることにより調べた。遊離のリガンドは1%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。受容体の結合解離定数(K_d)および最大結合濃度(B_{max})はスキッチャードプロット解析により算出した。

(3) 競争結合試験

BPAの変異受容体ERR γ に対する結合能は、 $[^3\text{H}]$ BPAの受容体結合を阻害する能力で評価した。各濃度のBPAを $[^3\text{H}]$ BPA (5 nM)と変異受容体ERR γ と併にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。遊離のリガンドはデキストラン被膜活性炭により取り除いた。化学物質の IC_{50} 値($[^3\text{H}]$ BPA受容体結合を50%阻害する値)はプログラムALLFITにより算出した。

(4) レポーター遺伝子アッセイ試験

変異受容体ERR γ 発現プラスミドと3 \times ERREルシフェラーゼレポータープラスミドを、HeLa細胞に遺伝子導入した。24時間インキュベート後、化学物質を暴露した。さらに24時間後、ルシフェラーゼ活性を発光基質を用いて測定した。WT-ERR γ が自発的に持っているルシフェラーゼ活性を100%として、各変異受容体の転写活性を評価した。

C. 研究結果

(1) WT-ERR γ 受容体の飽和結合試験

WT-ERR γ -LBDはグルタチオン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した。放射標識されたBPA($[^3\text{H}]$ BPA)を用いて、飽和結合試験を行った。スキッチャードプロット解析を行った結果、WT-ERR γ -LBDの K_d 値は5.7 nMであり、

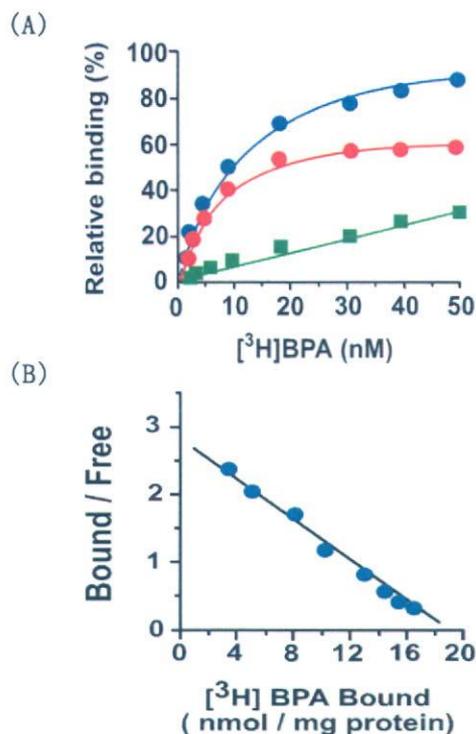


図 1. WT-ERR γ 飽和結合試験
(A). ERR γ に対する [3 H]BPA の全結合 (●)、特異的結合 (●)、非特異的結合 (■)を示す。
(B). スキャッチャードプロット解析

B_{max} は 18.4 nmol/mg であった。これは理論値 B_{max} (18.9 nmol/mg) とほぼ一致した (図 1)。

(2) 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 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 1)。

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 変異体のはるかに大きく、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。

表 1. 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 H]BPA	
Position 275	Position 316	Dissociation constant (K_D , nM)	Receptor density (B_{max} , nmol/mg)
Glu (wild-type)	Arg	5.70 ± 0.88	18.4 ± 0.78
<i>Ala</i>	Arg	17.8 ± 2.74	6.72 ± 0.62
<i>Asp</i>	Arg	22.0 ± 2.86	12.4 ± 0.46
<i>Gln</i>	Arg	23.4 ± 3.34	7.81 ± 0.47
<i>Leu</i>	Arg	NB ²⁾	NB
Glu	<i>Ala</i>	171 ± 39.5	0.56 ± 0.09
Glu	<i>Lys</i>	22.5 ± 4.26	9.98 ± 0.76
Glu	<i>Leu</i>	NB	NB
<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	NB	NB
<i>Arg</i>	<i>Glu</i>	59.7 ± 6.79	3.66 ± 0.29
<i>Ala</i>	<i>Glu</i>	NB	NB
<i>Arg</i>	<i>Ala</i>	54.3 ± 6.82	3.56 ± 0.38

¹⁾ Specifically mutated residues are designated in italics.

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

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2に示す。BPAは $\text{ERR}\gamma$ 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、 $\text{ERR}\gamma$ 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 の結合は弱くなり、両方 Ala に変異させると結合しなくなった。

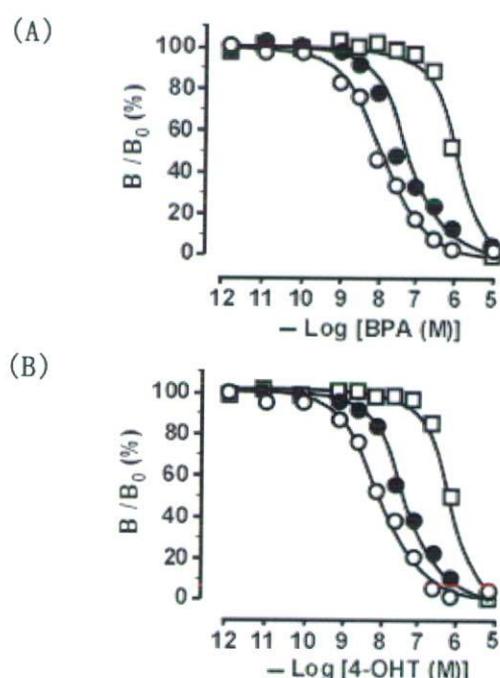


図2. $[^3\text{H}]$ BPA を用いた競争結合試験 (A) BPA および (B) 4-OHT。受容体は WT- $\text{ERR}\gamma$ (○)、Glu275 \rightarrow Ala (●)、Arg316 \rightarrow Ala (□)。

(3) $\text{ERR}\gamma$ 変異受容体の自発活性化

$\text{ERR}\gamma$ 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- $\text{ERR}\gamma$ の高い自発活性を 100% とすると、Glu275 \rightarrow Ala の自発活性は WT- $\text{ERR}\gamma$ の 42%、Arg316 \rightarrow 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 $\text{ERR}\gamma$ 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3)。

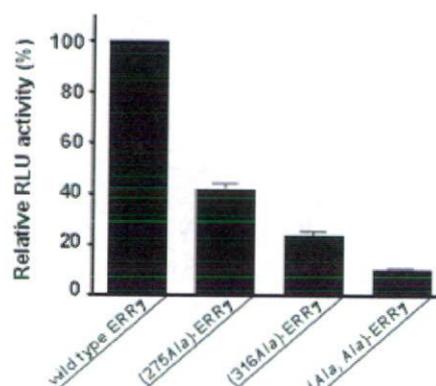


図3. $\text{ERR}\gamma$ -WT および変異受容体の自発活性化の比較

(4) BPA および 4-OHT における $\text{ERR}\gamma$ 受容体活性化の影響

以前の研究より、BPA は $\text{ERR}\gamma$ の高い自発活性化に影響を与えないことが分かった。一方、4-OHT は $\text{ERR}\gamma$ の自発活性を抑制するインバーサントゴニストである。4-OHT の $\text{ERR}\gamma$ 活性抑制は、BPA の添加により BPA 濃度依存的に阻害され、 $\text{ERR}\gamma$ の活性が回復することが判明した。これより、我々は BPA をインバーサント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ントゴニスト活性が検出された。また、変異受容体は全て WT- $\text{ERR}\gamma$ 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4)。

以上より、BPA は $\text{ERR}\gamma$ 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。

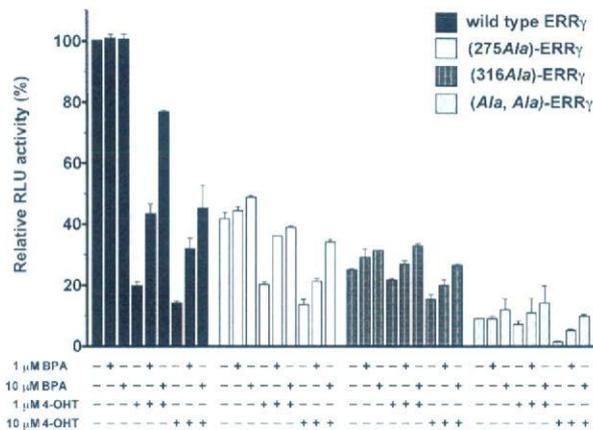


図4. ERR γ -WT および変異受容体の BPA および 4-OHT により活性化の影響

D. 考察

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、³H]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。そこで、核内受容体の進化的な理論的根拠を調べた。ヒトの 48 種類核内受容体のアミノ酸配列を比較したところ、26 種類の核内受容体で、ERR γ の Arg316 に相当する部位に Arg 残基が保存されていた (図 5)。例えば、グループ I の 19 種類うち 7 種類、グループ II の 12 種類うち 5 種類。特に、グループ III (9 種類)、グループ IV (3 種類)、グループ V (2 種類) では、すべて Arg 残基が存在する。Arg316 残基は核内受容体間で

きわめて高く保存されている。これは、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。

一方で、Glu275 はわずか 5 種類の核内受容体でしか保存されていない。すなわち、ERR γ は Arg316 と Glu275 の両方が存在することにより特異的リガンドと結合する構造要因を獲得していると考えられる。

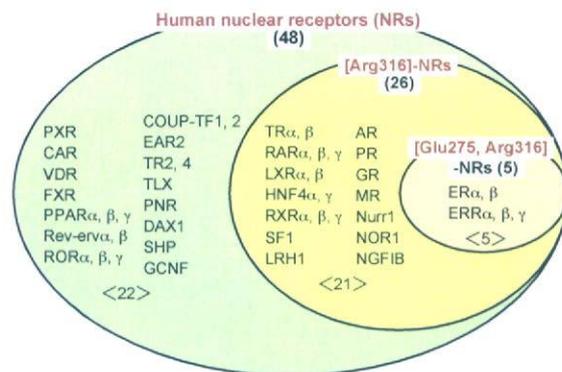


図5. ヒト 48 種類核内受容体の Arg316 および Glu275 残基の比較

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報は無い。

F. 研究発表

論文発表

1. Receptor binding characteristics of endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor γ : Chief and corroborative hydrogen bonds of bisphenol A phenol-hydroxyl group with Arg316 and Glu275 residues. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, and Y. Shimohigashi: *FEBS Journal*, **274**, 6340-6351 (2007).
2. Structure evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR γ . A. Matsushima, Y. Kakuta, T. Teramoto, T. Koshiba, X. Liu, H. Okada, T. Tokunaga, S. Kawabata, M. Kimura, and Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, **142**, 517-524 (2007).
3. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor

(ERR γ) with high constitutive activity. S. Takayanagi, T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Toxicology Letters*, **176**, 95-105 (2006).

学会発表

1. 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。
2. 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. 6-7。
3. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、徳永隆

俊、下東康幸：ERR γ のビスフェノール A 結合における Arg316 および Glu275 との水素結合機構、日本内分泌攪乱化学物質学会第 10 回研究発表会、2007. 12. 10-11。

4. 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。

G. 知的財産権の出願・登録状況 特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
X. Lui, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, Y. Shimohigashi	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).	<i>FEBS J.</i>	274	6340-6351	2007
A. Matsushima. K. Takano, T. Yoshida, Y. Takeda, S. Yokotani, Y. Shimohigashi. M. Shimohigashi	Double-labeled <i>in situ</i> Hybridization Reveals the Lack of Co-localization of mRNAs for the Circadian Neuropeptide PDF and FMRFamide in Brains of the Flies <i>Musca domestica</i> and <i>Drosophila melanogaster</i> .	<i>J. Biochem.</i>	141	867-877	2007
A. Matsushima, Y., Kakuta, T. Teramoto, T. Koshiba, X. Lui, H. Okada, T. Tokunaga, S. Kawabata, M. Kimura, Y. Shimohigashi, Y. Shimohigashi	Structural Evidence for Endocrine Disruptor Bisphenol A Binding to Human Nuclear Receptor ERR γ .	<i>J. Biochem.</i>	142	517-524	2007
H. Okada., T. Tokunaga., X. Lui, S. Takayanagi, A. Matsushima, Y. Shimohigashi	Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-related Receptor γ (ERR γ).	<i>Environ. Health Perspect.</i>	116	32-38	2008
K. Isozaki, J. Li, K. Okada, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, Y. Shimohigashi	Design Synthesis of Highly Potent Antagonist of ORL1 Nociceptin Receptor.	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	16	2635-2664	2008

Y. Takeda, K. Koga, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi	The Output Mechanism of Circadian Pacemaker Neuropeptide PDF in the Regulation of Bimodal Locomotor Distribution.	<i>Peptide Science 2007</i>	2007	65-68	2008
N. Inokuchi, K. Isozaki, Y. Tsuda, Y. Okada, S. Osada, T. Nose, T. Costa Y. Shimohigashi	Differential Receptor Recognition by Dmt-Containing Enkephalin Dimers Cross-Linked by Phenylenediamines.	<i>Peptide Science 2007</i>	2007	65-68	2008
A. Matsushima, Y. Koretsune, A. Kaneki, K. Isozaki, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi	Structural Requirement of Housefly FMRFamide Peptides in Its Receptor Activation.	<i>Peptide Science 2007</i>	2007	313-314	2008
J. Li, K. Isozaki, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, Y. Shimohigashi	Optimization of the N-Terminal Group of Ac-RYYRIK-NH ₂ as ORL1 Receptor Antagonist.	<i>Peptide Science 2007</i>	2007	257-260	2008
M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, Y. Shimohigashi	The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family.	<i>Peptide Science 2007</i>	2007	491-492	2008
K. Isozaki, J. Li, T. Nose, T. Costa, Shimohigashi	The molecular mechanism of ORL1 nociceptin receptor in activation	<i>Peptide Science 2007</i>	2007	289-292	2008
T. Nose, Y. Shimohigashi	A docking Modelling Rationally Predicts Strong Binding of Bisphenol A to Estrogen-Related Receptor γ	<i>Protein & Peptide Letters</i>		In press	
D. Asai, T. Tokunaga, K. Kondo, T. Kawaguchi, S. Takayanagi, T. Shinmyozu, M. Nakai, Y. Yakabe, Y. Shimohigashi	Direct Measurement of Fluorescence Intensity for Efficient Receptor-binding Assay: Conjugates of Ethinylcarboxyestradiol and 5 (and 6) -Carboxyfluorescein via α , ω -Diaminoalkanes as a Tracer for Estrogen Receptor.	<i>J. Biochem.</i>		In press	

研究成果の刊行物・別刷

Receptor binding characteristics of the endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor γ

Chief and corroborative hydrogen bonds of the bisphenol A phenol-hydroxyl group with Arg316 and Glu275 residues

Xiaohui Liu, Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, Takatoshi Tokunaga, Kaname Isozaki and Yasuyuki Shimohigashi

Laboratory of Structure–Function Biochemistry, Department of Chemistry, The Research-Education Centre of Risk Science, Faculty and Graduate School of Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Keywords

bisphenol A; estrogen-related receptor γ ; nuclear receptor; receptor binding site; receptor binding assay

Correspondence

Y. Shimohigashi, Laboratory of Structure–Function Biochemistry, Department of Chemistry, The Research Education Centre of Risk Science, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan
Fax: +81 92 642 2584
Tel: +81 92 642 2584
E-mail: shimoscc@mbbox.nc.kyushu-u.ac.jp

(Received 3 September 2007, revised 14 October 2007, accepted 17 October 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06152.x

Bisphenol A, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, is an estrogenic endocrine disruptor that influences various physiological functions at very low doses, even though bisphenol A itself is ineffectual as a ligand for the estrogen receptor. We recently demonstrated that bisphenol A binds strongly to human estrogen-related receptor γ , one of 48 human nuclear receptors. Bisphenol A functions as an inverse antagonist of estrogen-related receptor γ to sustain the high basal constitutive activity of the latter and to reverse the deactivating inverse agonist activity of 4-hydroxytamoxifen. However, the intrinsic binding mode of bisphenol A remains to be clarified. In the present study, we report the binding potentials between the phenol-hydroxyl group of bisphenol A and estrogen-related receptor γ residues Glu275 and Arg316 in the ligand-binding domain. By inducing mutations in other amino acids, we evaluated the change in receptor binding capability of bisphenol A. Wild-type estrogen-related receptor γ -ligand-binding domain showed a strong binding ability ($K_D = 5.70$ nM) for tritium-labeled [3 H]bisphenol A. Simultaneous mutation to Ala at positions 275 and 316 resulted in an absolute inability to capture bisphenol A. However, individual substitutions revealed different degrees in activity reduction, indicating the chief importance of phenol-hydroxyl \leftrightarrow Arg316 hydrogen bonding and the corroborative role of phenol-hydroxyl \leftrightarrow Glu275 hydrogen bonding. The data obtained with other characteristic mutations suggested that these hydrogen bonds are conducive to the recruitment of phenol compounds by estrogen-related receptor γ . These results clearly indicate that estrogen-related receptor γ forms an appropriate structure presumably to adopt an unidentified endogenous ligand.

Bisphenol A (BPA), 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, has long been recognized as an estrogenic chemical able to interact with human estrogen receptor (ER) [1–3], and recently was reported also to act as an

antagonist for a human androgen receptor (AR) [4,5]. In addition, various so-called ‘low-dose effects’ of BPA have been reported *in vivo* for many organ tissues and systems in mice and rats [6,7]. Because the binding of

Abbreviations

BPA, bisphenol A; ER, estrogen receptor; ERR, estrogen-related receptor; ERRE, ERR-response element; ERR γ , estrogen-related receptor γ ; GST, glutathione S-transferase; LBD, ligand-binding domain; NR, nuclear receptor; 4-OHT, 4-hydroxytamoxifen.

BPA to ER and AR and its hormonal activity is extremely weak (1000–10 000-fold weaker than for natural hormones), it is unlikely that BPA interacts directly with ER and AR to achieve these effects at low doses [8–11].

Based on the idea that BPA may interact with nuclear receptors (NRs) other than ER and AR, we searched a series of NRs and eventually succeeded in exploring a target NR of BPA [12]. BPA was found to bind strongly to estrogen-related receptor γ (ERR γ), one of 48 human NRs [13], with high constitutive basal activity. We found that BPA inhibits the inverse agonist activity of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), which deactivates ERR γ in, for example, the luciferase reporter gene assay. BPA reverses such deactivation to the originally high basal activation state in a dose-dependent manner, and thus acts as an inverse antagonist of ERR γ .

ERRs are a subfamily of orphan NRs and are closely related to two ERs: ER α and ER β [14,15]. The ERR family includes three members (ERR α , ERR β , and ERR γ) with ERR γ being the most recently identified member [16–18]. Amino acid sequences are considerably conserved among ERRs and ERs, especially in their DNA-binding domain and ligand-binding domain (LBD). However, 17 β -estradiol, a natural ligand of ERs, does not bind to any members of the ERR family [14,19]. Likewise, BPA binds only weakly to ERs and does not bind at all to any other receptors of the ERR family.

BPA has the chemical structure HO-C₆H₄-C(CH₃)₂-C₆H₄-OH, with two phenol groups and two methyl groups on the sp³ tetrahedral carbon atom (Fig. 1). We recently carried out crystallization and X-ray structural analysis of the BPA/ERR γ -LBD complex [20]. In the complex, a single molecule of BPA stays at the ligand-binding pocket of each ERR γ -LBD protein molecule, the α -helix 12 (H12) of which is stabilized in an activation conformation. The crystal structure of the complex suggests that several essential interactions occur between the BPA and ERR γ -LBD molecules. For example, the phenol-hydroxyl group of BPA is tethered by hydrogen bonds to the Glu275 and Arg316 residues in the ERR γ -LBD (Fig. 2).

For a better understanding of the basal binding potentials to capture a putative endogenous ligand in a ligand-receptor binding pocket, it is crucial to clarify the structural requirements for ligand(s), if any. In the present study, to shed light on the structural elements of ERR γ , we carried out a site-directed point mutagenesis series for the candidate amino acid residues in ERR γ -LBD. We report that the Glu275 and Arg316

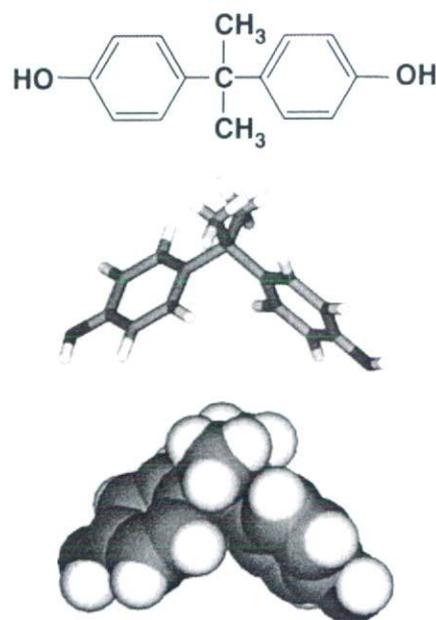


Fig. 1. Chemical structure BPA and its ball-and-stick structure, together with a space-filling structure in the ligand-binding pocket of the ERR γ . The space-filling structure of BPA originated from the X-ray crystal structure (Protein Data Bank with accession code 2E2R) [20].

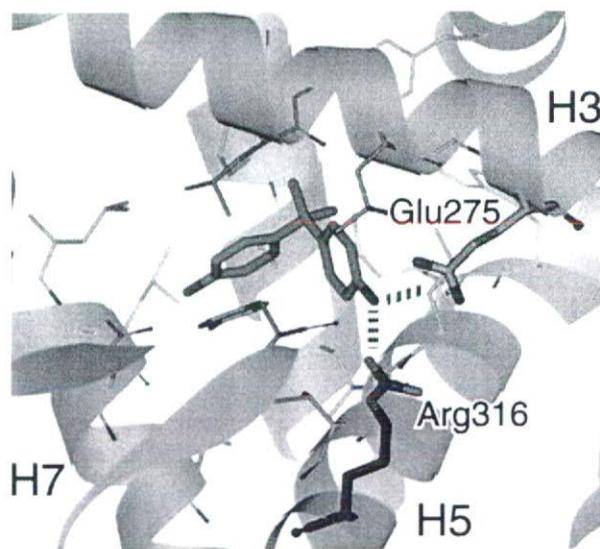


Fig. 2. Structural environments of BPA in the ligand-binding pocket of the ERR γ . The proximity of each amino acid residue (within a distance of 5 Å) to BPA is shown in the boxes depicting the α -helices. The portrait was originated from the X-ray crystal structure (Protein Data Bank with accession code 2E2R) [20].

residues of ERR γ -LBD are structurally essential for capturing conjunctively the phenol-hydroxyl group of BPA.

Results

Deactivation by simultaneous Ala substitution of Glu275 and Arg316

For the receptor binding assays, the LBD of ERR γ was expressed in *Escherichia coli* as a protein fused with glutathione *S*-transferase (GST). A cDNA fragment encoding wild-type ERR γ -LBD (residues 222–458) was generated by PCR from the human kidney cDNA library and cloned into the vector for GST fusion. Mutations were introduced by the PCR mutagenesis method [21], and sequence accuracy was confirmed for each mutant. Site-directed mutations were carried out for positions 275 and 316, the original amino acids for which are Glu (= GAG) and Arg (= CGG), respectively.

Saturation binding assay was performed by using GST-ERR γ -LBD and tritium-labeled [3 H]BPA. Specific binding of this [3 H]BPA was calculated by subtracting the nonspecific binding (with 10 μ M BPA) from the total binding. Figure 3A shows the results of saturation binding assays using [3 H]BPA and the wild-type ERR γ receptor, depicting a sufficient specific binding activity (77%).

To demonstrate the suggestion that the phenol-hydroxyl group of BPA is engaged in hydrogen bonds with the Glu275 and Arg316 residues in the ERR γ -LBD [20], these residues were simultaneously mutated to Ala. As shown in Fig. 3D, the resulting (*Ala, Ala*)-ERR γ mutant receptor did not exhibit a specific

binding sufficient for further analysis. In case no specific binding was measurable under the same experimental conditions for the wild-type ERR γ receptor, the assay was repeated a certain number of times using various concentrations of the receptor or radio ligand. Eventually, we found only nonspecific binding for (*Ala, Ala*)-ERR γ without any specific binding, as preliminarily reported [20] (Fig. 3D).

The results clearly indicate that Glu275 and Arg316 are crucial for the binding of BPA, and thus their side chain carboxyl and guanidino groups are indeed engaged in hydrogen bonding with the phenol-hydroxyl group of BPA (Fig. 2). The phenol-hydroxyl group (-OH) has a proton-donating character as well as a proton-accepting character. Thus, it is easy to bridge by hydrogen bonding between the phenol-hydroxyl group of BPA and both the Glu275 and Arg316 residues.

Differential ability of Glu275 and Arg316 in making hydrogen bonds to hold BPA in the binding pocket

Dissociation constants of [3 H]BPA from the saturation binding assays

Because both Glu275 and Arg316 were involved in the hydrogen bonding with BPA, we attempted to examine which hydrogen bond most strongly holds BPA in the ligand-binding pocket of ERR γ . Thus, these amino acid residues were mutated independently to Ala. When the Glu275 \rightarrow Ala substitution was

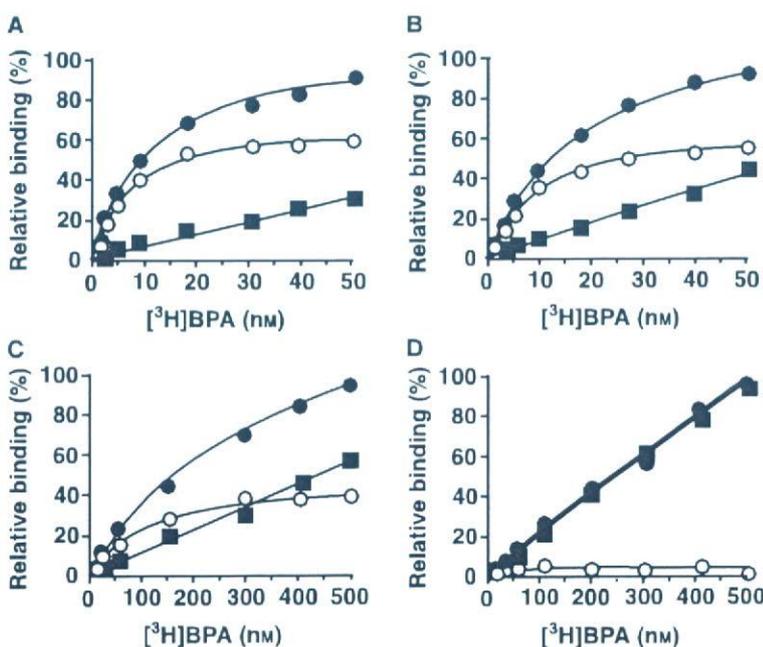


Fig. 3. Saturation binding curves from the radioligand receptor binding assay for the ERR γ by BPA. Saturation binding curves were attained for [3 H]BPA for the recombinant human ERR γ LBD and its site-directed mutant derivatives. The graphs show total (\bullet), specific (\circ), and nonspecific (\blacksquare) bindings. Determination of nonspecific binding was carried out by an excess of unlabeled chemical (10 μ M). (A) Wild-type ERR γ , (B) (275Ala)-ERR γ with the Glu275 \rightarrow Ala substitution, (C) (316Ala)-ERR γ with the Arg316 \rightarrow Ala substitution, and (D) (*Ala, Ala*)-ERR γ with simultaneous Glu275 \rightarrow Ala and Arg316 \rightarrow Ala substitutions.