

表 6 様々な物質の ERR $\gamma$  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 $\beta$ -estradiol (E2)	-	-	-
ethynylestradiol	-	-	-
dihydrotestosterone (DHT)	-	-	-
testosterone	-	-	-
progesterone	-	-	-
Dexamethasone (DEX)	-	-	-
cortisone	-	-	-
cortisol	-	-	-
deoxycorticosterone	-	-	-
corticosterone	-	-	-
5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	-	-	-
biochanin A	-	-	-
genistein	-	-	-
diadzein	-	-	-
zearalanone	-	-	-
gossypol	-	-	-
phenol red	-	-	-
phenol phthalein	-	-	-
methyl orange	-	-	-
methylene blue	-	-	-

このような状態に対して、インバースアゴニスト活性を示す 4-OHT に感応するセンシング抗体は無応答である。そこで、BPA 共存下で 4-OHT を反応させたところ、BPA の濃度依存的に 4-OHT による抗体応答が減少した (図 20A)。これは、BPA が 4-OHT のインバースアゴニスト活性を抑制・阻害する状態を表しており、インバースアゴニスト活性と呼ばれる。

次に、4-OHT による不活性化に対するインバースア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  $\mu$ M の 4-OHT で ERR $\gamma$  を不活性化状態に置き、これに化合物の活性回復作用性を測定する (図 20B)。どのくらい回復させたかを抗体応答として化学物

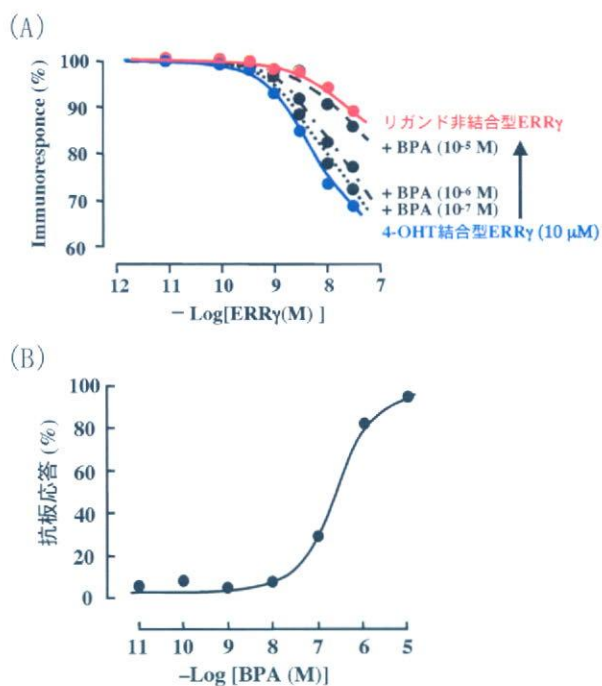


図 20. 4-OHT を基盤としたセンシング抗体アッセイ  
4-OHT と共存させることにより BPA 濃度依存的な抗体応答が検出できる。(A) 受容体濃度依存性の調査、(B) BPA 濃度依存性の調査

質の濃度を変えて測定するとシグモイド形の曲線が得られ、これから抗体応答有効濃度が求められる。図 21 で示されるように、BPA、BPE および BPF にインバースアゴニスト活性が見られた。これらは ERR $\gamma$  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。

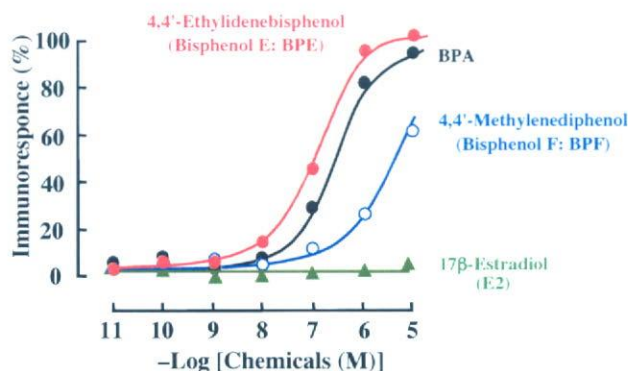


図 21 ERR $\gamma$  センシング試験 (インバースアゴニスト活性)

表 7 様々な物質の ERR $\gamma$  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 $\beta$ -estradiol (E2)	—	—	—
ethynylestradiol	—	—	—
dihydrotestosterone (DHT)	—	—	—
testosterone	—	—	—
progesterone	—	—	—
Dexamethasone (DEX)	—	—	—
cortisone	—	—	—
cortisol	—	—	—
deoxycorticosterone	—	—	—
corticosterone	—	—	—
5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	—	—	—
biochanin A	—	—	—
genistein	—	—	—
diadzein	—	—	—
zearalanone	—	—	—
gossypol	—	—	—
phenol red	—	—	—
phenol phthalein	—	—	—
methyl orange	—	—	—
methylene blue	—	—	—

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 $\gamma$  受容体に結合する化合物は非常に特異的である。

なお、このような ERR $\gamma$  受容体に対するモノクローナル抗体の作製を試みたが、ファージディスプレイ法でも、細胞融合法でも有効な抗体は現在まで得られていない。

#### (9) エストロゲン関連受容体 $\gamma$ (ERR $\gamma$ ) に対する化学物質の受容体応答

エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) にビスフェノール A が強く結合する。このことは *in vitro* の試験系で詳細に調べた。

#### ★ 飽和結合試験

結合試験に用いる受容体タンパク質は、ヒト腎臓の cDNA より ERR $\gamma$  のリガンド結合ドメインに対応するクローンを得て、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て得た。量的な発現条件、精製条件の改良により、最終的に 10 の培養液から約 5 mg の発現タンパク質を得ることができた。これを定常的な受容体タンパク質発現条件として確立した。次に、結合試験系を構築するため ERR $\gamma$  と結合が報告されている 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) の  $^3\text{H}$ -標識体をトレーサーとして反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件を詳細に検討した。その結果、 $^3\text{H}$ 4-OHT の特異的結合を十分量与える要件の設定に成就した。

ビスフェノール A (BPA) が結合することが判明したため、平成 18 年度には、 $^3\text{H}$ BPA を用いた飽和結合試験を試みた。その結果、非常に容易に  $^3\text{H}$ BPA の特異的結合を十分量与える要件の設定に成就した。Scatchard プロット解析の結果、 $K_d$  値は 5.5 nM であり、非常に強く結合することが分かった。

#### ★ 競合結合試験

まず、競合結合試験に必要な受容体タンパク質として GST-ERR $\gamma$ -LBD を十分量確保する量的発現法を確立した。そこで、 $^3\text{H}$ 4-OHT をトレーサーとして用いて様々な化学物質、生体の内因性ホルモンや合成エストロゲン、植物エストロゲンについて受容体競争結合試験を行った (表 8)。

平成 17 年度には、 $^3\text{H}$ 4-OHT をトレーサーとして試験し、自身が非常に強く結合すること、また、diethylstilbestrol (DES) や tamoxifen (TAM) も強く結合することが分かった。これらに対して、E2 などの内因性ホルモンや植物エストロゲン等は、ERR $\gamma$  に対してほとんど結合しなかった。また、biochanin A などのイソフラボン類も ERR $\gamma$  に対してほとんど結合能を示さなかった。一方、内分泌かく乱化学物質候補であるビスフェノール A (BPA) が ERR $\gamma$  に対して強い結合能を示した (13.1 nM)。平成 18 年度には、 $^3\text{H}$ BPA を用いて調べたところ、 $\text{IC}_{50}$  値 9.8 nM で実際非常に強く結合することが確認された。 $^3\text{H}$ BPA を用いる結合試験については後に詳しく記述する。 $^3\text{H}$ BPA が市販されていたのは、解析に非常に好都合であった。



表 8. 化学物質の ERR $\gamma$  に対する結合能

化学物質	結合能
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	++
tamoxifen (TAM)	++
diethylstilbestrol (DES)	++
4-nonylphenol	++
bisphenol A (BPA)	++
estrone (E1)	+
coumestrol	+
17 $\alpha$ -estradiol	+
equilin	+
methylene blue	-
methyl orange	-
phenol phthalein	-
phenol red	-
gossypol	-
zearalanone	-
diadzein	-
genistein	-
biochanin A	-
5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	-
corticosterone	-
deoxycorticosterone	-
cortisol	-
cortisone	-
dexamethasone (DEX)	-
progesterone	-
testosterone	-
dihydrotestosterone (DHT)	-
ethynylestradiol	-
estriol (E3)	-
17 $\beta$ -estradiol (E2)	-

★ BPA のステロイド受容体結合性

ステロイドホルモン受容体にそれぞれ特異的な放射標識リガンドを用いて結合試験を行った。その結果、4-OHT は ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERR $\gamma$  に強く結合した。一方、BPA は ERR $\gamma$  に最も強く結合し、ER $\alpha$  と ER $\beta$  には 100 倍弱く、AR、GR、PR は全く結合しなかった。

(10) エストロゲン関連受容体  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) 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  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) 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 $\gamma$  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 $\gamma$  受容体の結合試験

放射標識された BPA、<sup>3</sup>H]BPA を用い、GST 融合 ERR $\gamma$  に対して一連の競合結合試験を実施した。

★ ERR $\gamma$  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 22) )。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

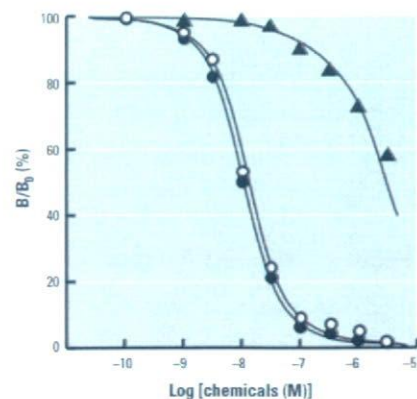
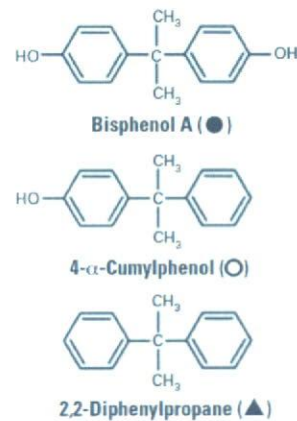


図 22. フェノール性 OH 基の効果  
OH 基を 1 つ欠失した化合物 (○) は、BPA (●) と同等の結合性を維持した。両方を欠失した化合物 (▲) では結合性が著しく低下した。

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 23)。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、ERRγ への結合性は上昇せず、逆に低下した (図 24)。

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 (-CH<sub>3</sub>) をエチル基 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) やフェニル基 (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) に置換したところ、結合性が低下した (図 25)。したがって、ERRγ 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)

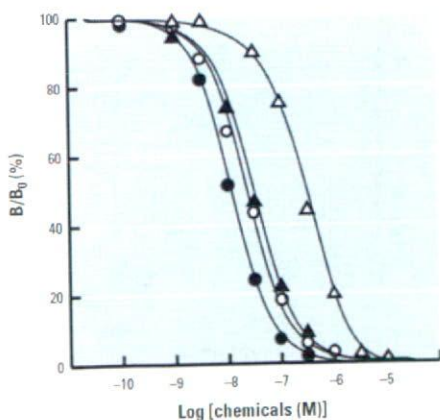
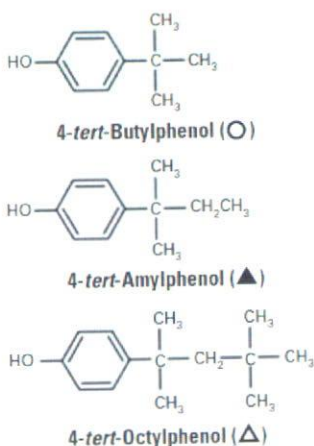


図 23. フェノール環の効果①  
フェノール環を削除すると結合性が大きく低下するが、さらに小さな分子になると結合性が部分的に回復する。グラフ中の (●) は BPA。

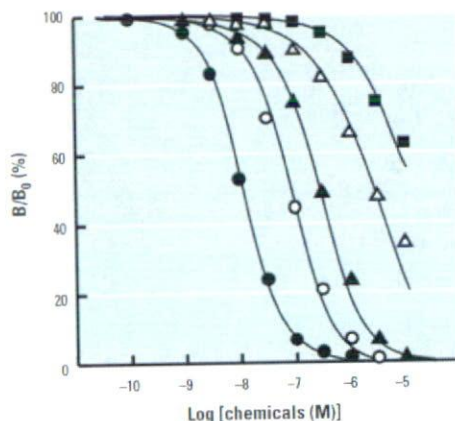
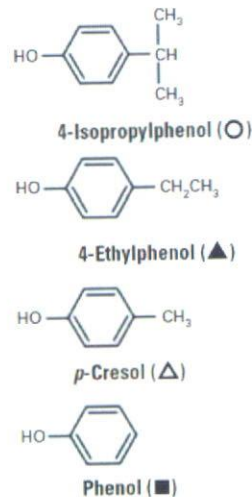


図 24. フェノール環の効果②  
4-*tert*-butylphenol より小さくした場合、結合性が段階的に減少する。グラフ中の (●) は BPA。

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 (-CF<sub>3</sub>) に置換した場合でも結合性が大きく低下した (図 26)。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

内分泌かく乱物質・環境ホルモンとして疑われているアルキルフェノール類が、ERRγ 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=1~12) が付加されたアルキルフェノール類につ



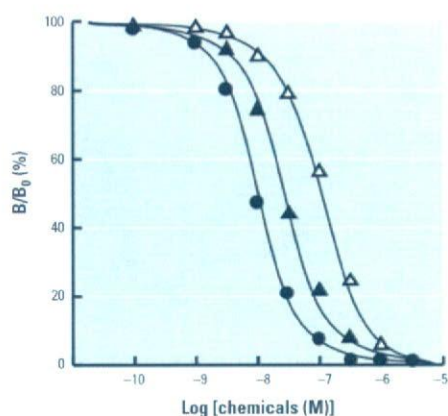
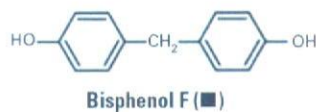
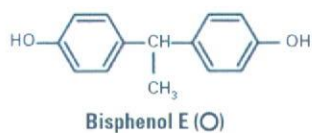
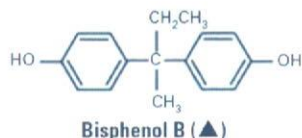
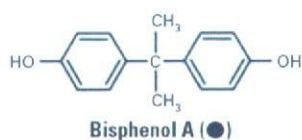


図 25. 中央メチル基の効果①

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 (△)。

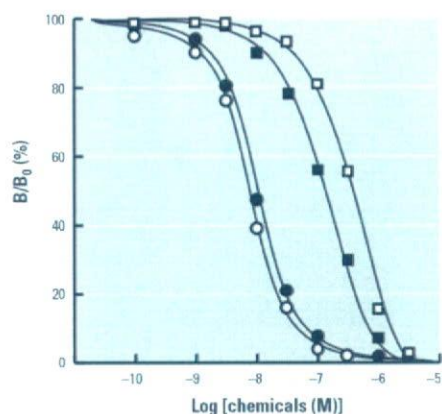


図 26. 中央メチル基の効果②

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 27 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 28)。

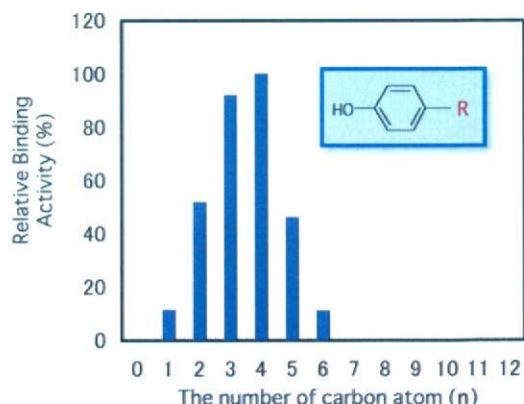


図 27. アルキル鎖の長さとの結合性

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 <sub>50</sub> )
4- <i>n</i> -		150 ± 19.3
4- <i>sec</i> -		32.3 ± 3.84
4- <i>tert</i> -		26.1 ± 2.45

図 28. 各種ブチルフェノールについての解析結果

★ ERR $\gamma$  に対する活性への影響評価

ERR $\gamma$  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- $\alpha$ -クミルフェノール、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 $\gamma$  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サ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 $\gamma$  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 29A, B)。また、1  $\mu$ 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、インバーサアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。インバーサ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 29C, D)。

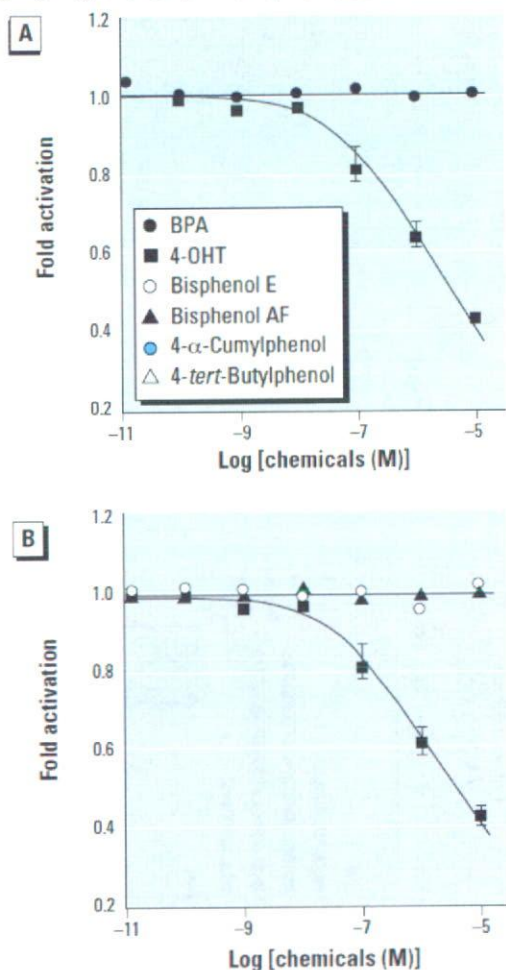


図 29(A, B). レポーター遺伝子試験①  
BPA は ERR $\gamma$  に結合しても基盤活性に影響を与えない。4-OHT はインバーサアゴニストとして機能する。試験化合物はすべて基盤活性に影響を与えなかった。

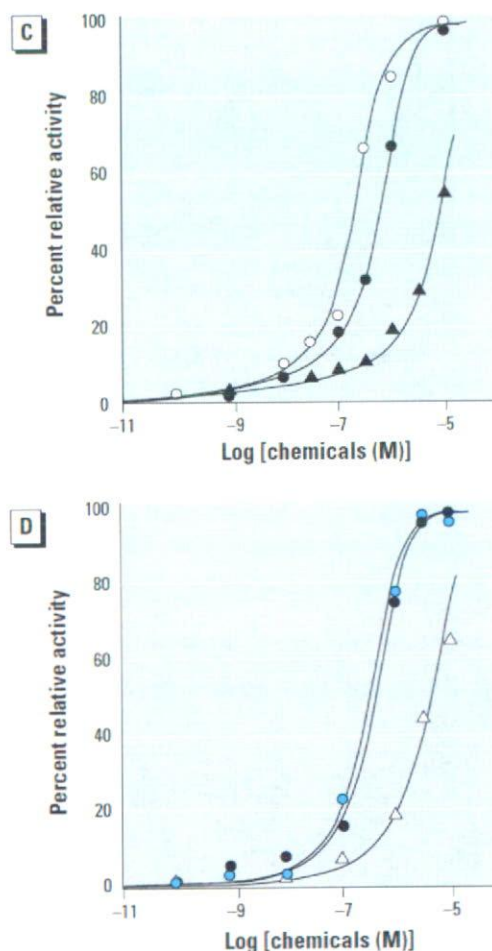


図 29(C, D). レポーター遺伝子試験②  
4-OHT 存在下 (活性を下げた状態) で、試験化合物による活性の変化を測定した場合、インバーサアンタゴニスト活性が観測された。



## ② エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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1.6Åの良好な構造が得られた(図30)。

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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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31)。また、BPAがERR $\gamma$ -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para

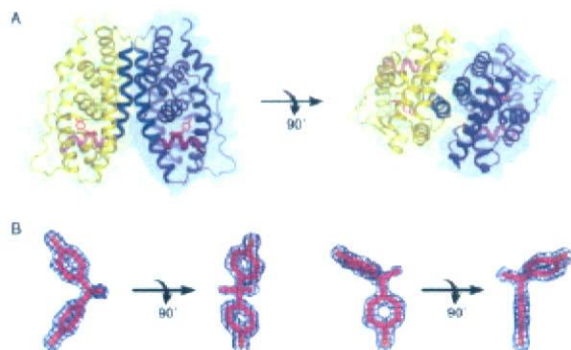


図30. BPAとERR $\gamma$ の複合体構造  
Aは二量体の全体構造を、BはBPAの構造を示す。

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32)。

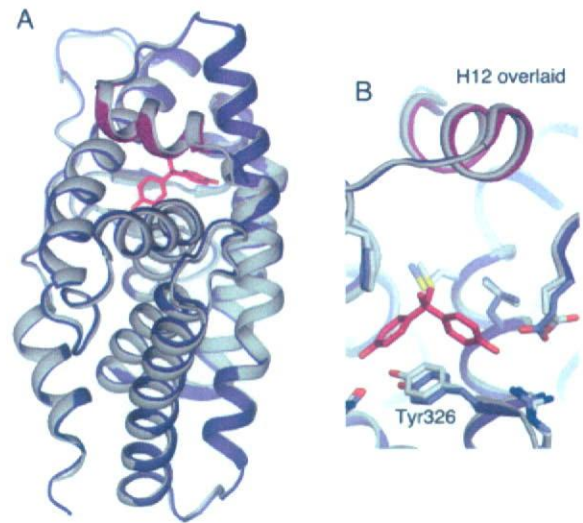


図31. BPAとERR $\gamma$ の複合体と、ERR $\gamma$ の活性型構造の重ね合わせ  
灰色がリガンド無しのERR $\gamma$ 活性型構造、青がBPAとERR $\gamma$ の複合体構造である。

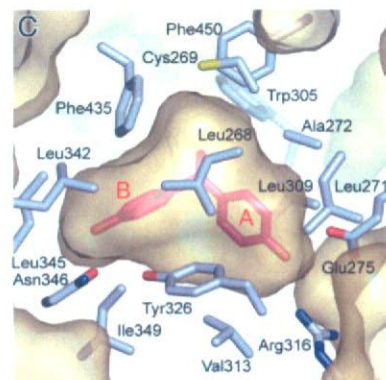


図32. BPAとリガンド認識部位を形成するアミノ酸



### ③ エストロゲン関連受容体 $\gamma$ の変異受容体による化学物質結合部位解析

なぜ ERR $\gamma$ 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 $\gamma$ -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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ の結合の構造要因の解析を実施することにした。

#### ★ ERR $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ -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  $B_{\text{max}}$  値はスキャッチャードプロット解析で算出した (表 9)。

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 変異体ははるかに大きく、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 33 に示す。BPA は ERR $\gamma$ に最も強く結合し、 $\text{IC}_{50}$  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 $\gamma$ 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

表 9. 変異受容体に対する BPA の結合能

Amino acid residues of ERR $\gamma$ receptors <sup>1)</sup>		Binding characteristics of $^3\text{H}$ BPA	
Position 275	Position 316	Dissociation constant ( $K_D$ , nM)	Receptor density ( $B_{\text{max}}$ , 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 <sup>2)</sup>	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

<sup>1)</sup> Specifically mutated residues are designated in italics.

<sup>2)</sup> NB means "no specific binding" in the saturation binding assay.



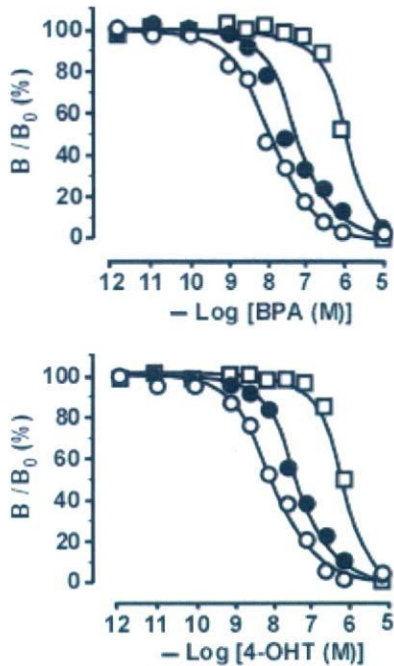


図 33.  $[^3H]$ BPA を用いた競争結合試験 (A) BPA および (B) 4-OHT。受容体は WT-ERR $\gamma$  (○)、Glu275→Ala (●)、Arg316→Ala (□)。

★ ERR $\gamma$  変異受容体の自発活性化

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-ERR $\gamma$  の高い自発活性を 100% とすると、Glu275→Ala の自発活性は WT-ERR $\gamma$  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 $\gamma$  の自発活性化に關与する重要な残基であることが判明した (図 34)。

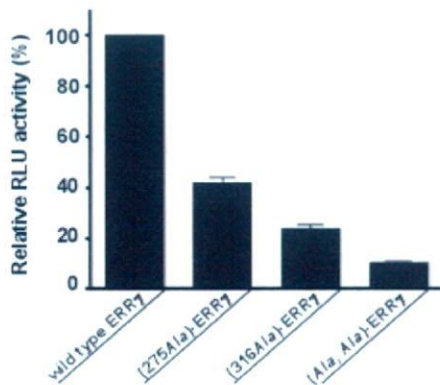


図 34. ERR $\gamma$ -WT および変異受容体の自発活性化の比較

★ BPA および 4-OHT における ERR $\gamma$  受容体活性化の影響

以前の研究より、BPA は 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 ERR $\gamma$  の自発活性を抑制するインバースアゴニストである。4-OHT の 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、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 をインバース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 に対するインバース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 $\gamma$  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 35)。

以上より、BPA は 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。BPA は ERR $\gamma$  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、 $\alpha$ -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。

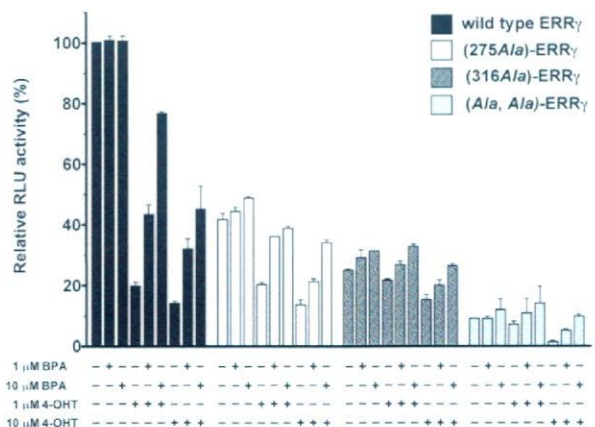


図 35. ERR $\gamma$ -WT および変異受容体の BPA および 4-OHT により活性化の影響



### (11) 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。実地には、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 含有培地

#### ★ 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、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することが分かった。

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 36)。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。

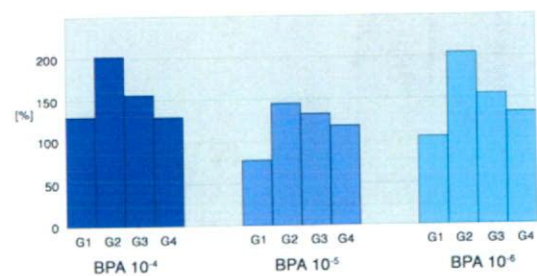


図 36. キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S オスにおよぼすビスフェノール A の影響-継代効果(次世代繁殖数相対値)



## D. 考察

「内分泌かく乱作用の本質は受容体を介するシグナル毒性である」という理解が進むなか、内分泌かく乱作用が懸念される化学物質が真に受容体に結合して、受容体応答を誘導しているという確かな証拠はほとんど無かった。例えば、この10年間で最も研究が進んだエストロゲン女性ホルモン受容体 ER およびアンドロゲン男性ホルモン受容体 AR についてでさえ、受容体に天然型のホルモンと同じ程度に強く結合する化合物は無かった。しかしながら、「ERR $\gamma$ にビスフェノールAが天然ホルモンと同じくらいに非常に強く結合する」ことが我々によって明らかにされたのち、内分泌かく乱物質を取り巻く状況は激変しつつある。すなわち、ビスフェノールAの微量暴露によって観察されたいろいろな事象が、核内受容体 ERR $\gamma$ およびそれに連関する系を介した生理学的な事象として生化学的に解明されようとしているのである。

こうしたなか、ビスフェノールA以外の多種多様な化学物質、化合物が受容体に結合して、有害なシグナルを誘導する内分泌かく乱作用の可能性が強く懸念されるようになり、また、ERR $\gamma$ 以外のどの受容体でもその可能性が危惧されるようになった。また、ビスフェノールAが結合する他の受容体がないか、また、ERR $\gamma$ に結合する他の化学物質がないか、危惧されるようになった。したがって、ある特定の受容体に対してその応答を適切に解析できる試験系が必要であり、また、ある特定の化学物質について受容体をスクリーニングできる試験系が必要である、という危急な状況を生み出している。こうした双方向からのスクリーニングを可能にする試験系の一つが本研究課題である。

本研究課題においては、こうした試験系として核内受容体のコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法を確立した。既に、例えば、ER および AR について確立した。特に、前者については当初 500 種の化学物質（化合物）について精査し、受容体結合試験、レポーター遺伝子アッセイと良い相関を証明した。方法論としてのセンシング抗体法は、ER および AR 以外の核内受容体について展開を始めるや否や「ERR $\gamma$ にビスフェノールAが非常に強く結合する」事実の発見につながった。この発見は、「ERR $\gamma$ に強く結合する化学物質はビスフェノールA以外にはないか?」、「ビスフェノールAが強く結合する受容体はERR

$\gamma$ 以外にはないか?」という疑問への回答を求めた。そして、前者の疑問からはビスフェノールAよりも強く結合するビスフェノールA誘導体、あるいは同等に結合するアルキルフェノール類が見出された。しかし、後者の疑問については、現在のところ、「ビスフェノールAは、9種類あるステロイドホルモン受容体のうち ERR $\gamma$ にしか結合しない」という限定的な回答しか得られていない。こうしたなか、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の両方が必要である。さらには、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 $\alpha$ -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



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」の意味が違ってくる。

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相当の変化量、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関しては、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ふ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、この3カ年にわたる総合的な考察として取りまとめた。

#### ★ ポリクローナル抗体センシングアッセイ

本研究においてはまず、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) についてセンシング抗体法アッセイを完成させた。当初約 500 の化学物質をスクリーニングし、この後毎年試験・スクリーニングを続け、その数は現在まで総計約 800 にのぼる。しかしながら、当初作製の準位表に入る化合物は見付かっていない。

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。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

モノクローナル抗体の最良の作製法として導入したものであるが、最初は方法論の確



立に取り組んだ。すなわち、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、などを明らかにした。実際に GR、ER $\alpha$ 、および ERR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  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 $\alpha$  においては機能性 scFv の獲得はならなかった。特に ER $\alpha$  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。

19 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、その後モノクローナル化する方法を考案した。これにより、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 $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、FXR、VDR、ER $\alpha$  について scFv スクリーニングを行った。その結果、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、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必要がある。

#### ★ 細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製

細胞融合法により作製したモノクローナル抗体を用いたセンシング抗体法おしては、既に ER $\alpha$  について完成させた。しかし、この段階で細胞融合法による抗体作製の困難性が明らかとなり、問題解決への取り組みも必要となった。こうしたなか、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、直ちにモノクローナル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、EC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> 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 $\gamma$ (ERR $\gamma$ ) のセンシング抗体応答解析

ビスフェノール A (BPA) の標的受容体として同定されたエストロゲン関連受容体 $\gamma$  型・ERR $\gamma$  について、その受容体応答の詳細な解析が必要である。インバースアゴニストである 4-OHT を基準化合物として、センシング抗体法を有効なアッセイ法として確立することに成功した。現在までにポリクローナル抗体を用いたセンシング抗体法を確立した。一方、モノクローナル抗体では有効なものはまだ得られていない。

こうして確立したポリクローナル抗体を用いた ERR $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) とビスフェノール A の受容体応答



インバースアゴニスト 4-OHT のトリチウム標識体での受容体結合試験系を確立し、詳細に検討した。BPA が強く結合することが判明したので、さらには、 $[^3\text{H}]$ BPA を用いた詳細解析がこのような試験を構築した。

$[^3\text{H}]$ BPA との競争結合試験により、BPA 類似体の ERR $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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<sub>50</sub> 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 $\gamma$  だけでなく、ER $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\gamma$  に選択的に結合する化学物質であり、ERR $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\alpha$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  に結合することが確認された化学物質のうち、BPE、BPAF、4- $\alpha$ -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タゴニストであることが判明した。

ERR $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$ -LBD 結合体の X 線結晶構造解析により、ERR $\gamma$ -LBD が自発的に取る活性型構造を保持したまま、BPA は ERR $\gamma$ -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 $\gamma$ -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  $\pi$  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 $\gamma$ -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、HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-C(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-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<sub>3</sub> 基は、CH<sub>3</sub> 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 $\gamma$  の天然ホルモンが存在する可能性も考えられる。

BPA/ERR $\gamma$ -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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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・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。

本研究では、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。成虫なってはじめて 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。この 3 カ年の研究機関に 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。19 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、トリプチルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル) をスクリーニングし、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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$ 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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 種の核内受容体において、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りガンド=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. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor. O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 333-334 (2005).
2. Structural Characteristics of *Drosophila* Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Nonpeptide Ligands. X.H. Liu, A. Matsushima, N. Shirasu, Y. Tominaga, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi, and T. Nose: *Peptide Science* 2004, 303-304 (2005).
3. Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies. A. Shibuya, T. Tokunaga, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 351-354 (2005).
4. Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal  $\alpha$ -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor.

T. Tokunaga, H. Okada, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 291-294 (2006).

5. Monoclonal antibody sensing assay for conformation change induced by metal binding to prion protein N-terminal octarepeat domain. S. Yokotani, T. Honda, M. Kawano, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 455-456 (2006).

6.  $\alpha$ -Helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change in nuclear receptors. H. Okada, T. Tokunaga, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 475-478 (2006).

7. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) with high constitutive activity. S. Takayanagi, T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Toxicol. Lett.* **195**, 95-105 (2006).

8. Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal  $\alpha$ -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor. T. Tokunaga, H. Okada, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 291-294 (2006).

9.  $\alpha$ -Helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change in nuclear receptors. H. Okada, T. Tokunaga, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 475-478 (2006).

10. Structural isoforms of the circadian neuropeptide PDF expressed in the optic lobes of the cricket *Gryllus bimaculatus*: Immunocytochemical evidence from specific monoclonal antibodies. T. Honda, A., Matsushima, K. Sumida Y. Chuman K. Sakaguchi, H. Onoue, I.A. Meinertzhagen, Y. Shimohigashi, and M. Shimohigashi: *J. Comp. Neurol.* **499**, 404-421 (2006).

11. Conformation Change of  $\alpha$ -Helix Peptide for Sensing of Deactivation of Nuclear Receptor: Immunoassay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal  $\alpha$ -Helix 12 of Estrogen-related Receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ). T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2006, 176, (2006).

12. Functional analysis of F-domain peptides important for the basal constitutive activity of human nuclear receptor. H. Okada, N. Shirasu, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2006, 177, (2006).

13. 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  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ). X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, and Y. Shimohigashi: *FEBS J.*, **274**, 6340-6351 (2007).

14. Double-labeled *in situ* Hybridization Reveals the



Lack of Co-localization of mRNAs for the Circadian Neuropeptide PDF and FMRFamide 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).

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

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

17. 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).

18. 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).

19. 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).

20. 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).

21. Optimization of the N-Terminal Group of Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> as ORL1 Receptor Antagonist. J. Li, Kaname Isozaki, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2007*, 257-260 (2008).

22. 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).

23. 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).

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

25. Direct Measure of Fluorescence Intensity for Efficient Receptor-binding Assay: Conjugates of Ethinylcarboxyestradiol and 5(and 6)-Carboxy-

fluorescein via  $\alpha,\omega$ -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).

## 2. 学会発表

1. 野瀬 健、徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、下東康幸、Computational structural analysis of the nuclear receptor conformation changes from the ligand-free apo form to the ligand-bound holo form、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005. 1. 22-23。

2. 徳永隆俊、桑田 治、渋谷あゆみ、浅井大輔、毛利資郎、小泉 修、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、下東康幸、The ELISA-based Conformation Change Sensing Assay: Simultaneous Evaluation of Receptor Binding and Hormonal Activity of Endocrine Disruptors、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005. 1. 22-23。

3. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイによる核内受容体コンホメーション変化センシングモノクローナル抗体の作製、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。

4. 是恒幸恵、松島綾美、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、イエバエ FMRFamide 受容体のクローニングと発現、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。

5. 徳永隆俊・浅井大輔・横谷 聡・吉田美由紀・野瀬 健・下東康幸、蛍光 7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール (NBD) 誘導体を用いたステロイドホルモン受容体結合試験系の確立、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。

6. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、野瀬 健、富永佳也、下東美樹、下東康幸、フラボンおよびイソフラボン類化合物によるショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体の転写活性化、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。

7. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体認識モノクローナル抗体の調製、第 42 回化学関連支部合同九州大会、2005. 7. 27。

8. 是恒幸恵、松島綾美、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、イエバエ FMRFamide 受容体



のクローニングと発現、第 42 回化学関連支部合同九州大会、2005. 7. 27。

9. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、Simultaneous Evaluation of Binding and Hormonal Activities of Human Glucocorticoid Receptor by the Sensing Assay for Receptor Conformation Change、11th Asian Chemical Congress、2005. 8. 24-26。

10. 松島綾美、是恒幸恵、吉田太一、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、Structure-activity studies on the FMRamide-related Peptides and Receptors in the Housefly *Musca domestica*、11th Asian Chemical Congress、2005. 8. 24-26。

11. 岡田浩幸、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイにおけるファージディスプレイ法の導入、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

12. 高柳明香、ヒト・エストロゲン関連受容体 ERR の受容体結合試験系の確立、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

13. 徳永隆俊、蛍光トレーサーを用いた高効率な核内受容体結合試験系の確立、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

14. 劉 曉輝、フラボンおよびイソフラボン類化合物が結合性を示すショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体 ERR、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

15. 岩崎 茜、イエバエ *Musca domestica* 時計遺伝子 period における選択的ランプライシングの探索、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

16. 角田一徳、イエバエの概日リズムペースメーカーホルモン PDF および PAP の脳内局在の免疫組織化学的解析、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

17. 金木淳史、吉田太一、ショウジョウバエ概日リズムペースメーカーホルモン PDF の受容体探索における GPCR のクローニング、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。

18. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、糖質コルチコイド受容体に対する内分泌攪乱作用性のコンホメーション変化センシング抗体法による評価、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。

19. 下東康幸、徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、受容体コンホメーション変化センシング抗体法による受容体結合能およびホルモン活性の同時評価：黄体ホルモン・プロ

ゲステロン受容体に対する化学物質の応答解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。

20. 高柳明香、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) の発現および結合試験系構築、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。

21. 徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸、高感度センシング抗体によるエストロゲン受容体-化学物質系のリスク評価、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。

22. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、 $\alpha$ ヘリックス認識抗体による糖質コルチコイド受容体におけるリガンド依存的コンホメーション変化の識別、第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

23. 徳永隆俊、岡田浩幸、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、男性ホルモン受容体と黄体ホルモン受容体におけるコンホメーションセンシングアッセイ、第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

24. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、野瀬 健、富永佳也、下東美樹、下東康幸、植物エストロゲン・フラボンおよびイソフラボン類によるショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体のアゴニスト活性、第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

25. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体コンホメーション変化センシング抗体調製のための $\alpha$ -ヘリックスペプチド、第 42 回ペプチド討論会、2005. 10. 27-29。

26. 徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸、糖質コルチコイド受容体と黄体ホルモン受容体における C 端  $\alpha$ -Helix 認識抗体を用いたコンホメーションセンシングアッセイ、第 42 回ペプチド討論会、2005. 10. 27-29。

27. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、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による糖質コルチコイド受容体における化学物質の内分泌攪乱作用性評価、第 52 回日本臨床検査医学会・第 45 回日本臨床化学会合同大会、2005. 11. 17-20。

28. 徳永隆俊・浅井大輔・横谷 聡・野瀬 健・下東康幸、蛍光トレーサーを用いた B/F 分離有・無両系のステロイドホルモン受容体結合試験、第 52 回日本臨床検査医学会・第 45 回日本臨床化学会合同大会、2005. 11. 17-20。



29. 岡田浩幸、白須直人、下東康幸、Evolutionary Trace Analysis of Human Nuclear Receptors For Exploration of Functional Structural Essentials in the C-terminus Extensions、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
30. 金森史花、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸、鉍質コルチコイド受容体を介した内分泌攪乱作用性評価のためのコンホメーション変化センシング抗体の作製、第43回化学関連支部合同九州大会、2006. 7. 8。
31. 岩崎 茜、武田行正、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエ及びイエバエに共通した選択的スプライシング機構、第43回化学関連支部合同九州大会、2006. 7. 8。
32. 武田行正、岩崎 茜、佐藤聖児、松島綾美、下東美樹、下東康幸、選択的スプライシングおよび選択的ポリ A 付加機構によるフタホシコオロギ時計遺伝子 period mRNA の多様性、第 6 回日本蛋白質科学会年会、2006. 4. 24-26。
33. 金木淳史、吉田太一、磯崎 要、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエ概日リズム神経ペプチド PDF 受容体のクローニングと遺伝子発現解析、平成 18 年度日本生化学会九州支部例会、2006. 5. 20-21。
34. 武田行正、高野克太、岩崎 茜、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエ時計遺伝子 period における新規 mRNA アイソフォーム群の同定、平成 18 年度日本生化学会九州支部例会、2006. 5. 20-21。
35. 岩崎 茜 1、武田行正 1、松島綾美 1、下東美樹 2、下東康幸 1 ショウジョウバエとイエバエに保存される概日時計遺伝子、period 選択的スプライシングの同定、平成 18 年度日本生化学会九州支部例会、2006. 5. 20-21
36. 武田行正、岩崎 茜、佐藤聖児、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Alternative splicing and polyadenylation mechanisms diversify the clock gene period mRNA isoforms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
37. 岩崎 茜、武田行正、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Alternative pre-mRNA splicing mechanisms in the circadian clock gene period conserved between fruit fly *Drosophila melanogaster* and house fly *Musca domestica* 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
38. 横谷 聡、松島綾美、下東康幸、Conformation Change-Sensing Assay to Measure the Metal Binding to Prion Protein N-terminal Octarepeat Domain by Using SAF-32 Monoclonal Antibody、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
39. 松島綾美、是恒幸恵、吉田太一、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、Characterization of an insect G protein-coupled receptor activated by FMRFamide-related peptides present in the housefly *Musca domestica*、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
40. 金木淳史、吉田太一、磯崎 要、松島綾美、下東康幸、下東美樹、cDNA cloning and gene expression analysis of G protein-coupled receptors of circadian neuropeptide PDF in the fruit fly *Drosophila melanogaster*、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
41. 武田行正、岩崎 茜、松島綾美、下東康幸、下東美樹、Diversely regulated circadian clock gene *period* transcripts in the cricket *Gryllus bimaculatus*、第 28 回比較生理生化学会、2007. 7. 27-29。
42. 徳永隆俊、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイ:化学物質の標的受容体への結合能およびホルモン活性の同時評価とリスク評価への応用、第 6 回泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
43. 劉 曉輝、徳永隆俊、ビスフェノール A の結合によるヒトエストロゲン関連受容体  $\gamma$  (ERR  $\gamma$ ) の転写活性化、第 6 回泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
44. 岡田浩幸、Evolutionary Trace 法によるヒト核内受容体リガンド結合ドメインにおける特異機能発現部位の同定、第 6 回泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
45. 金森史花、鉍質コルチコイド受容体を介した内分泌攪乱作用評価のためのコンホメーション変化センシング抗体の作製、第 6 回泉屋コロキウム 2007. 8. 21-22。
46. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸、Conformation Change of  $\alpha$ -Helix Peptide for Sensing of Deactivation of Nuclear Receptor: Immunoassay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal  $\alpha$ -Helix 12 of Estrogen-related



Receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ )、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

47. 岡田浩幸、白須直人、下東康幸、Functional analysis of F-domain peptides important for the basal constitutive activity of human nuclear receptor、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

48. 金木淳史、吉田太一、磯崎 要、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Molecular Cloning and in situ Hybridization of Circadian Neuropeptide PDF Receptor in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

49. 武田行正、住吉美保、古賀啓太、伊東正史、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Multiple Post-Transcriptional Regulations in Circadian Pacemaker Neuropeptide pdf Gene、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

50. 古賀啓太、高山泰昌、平村大輔、武田行正、金木淳史、松島綾美、下東康幸、下東美樹、Immunological Confirmation of Circadian-related Neuropeptide PDF-Isoform Peptide in the Cricket *Gryllus bimaculatus*、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

51. 武田行正、岩崎 茜、松島綾美、下東康幸、下東美樹、Diversely regulated circadian clock gene period transcripts in the cricket *Gryllus bimaculatus*、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

52. 松島綾美、是恒幸恵、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、Structure-activity studies of FMRFamide-related peptides in activating the specific receptor present in the housefly *Musca domestica*、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006.11.5-8。

53. 下東康幸、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田一志、高柳明香、ビスフェノール A の標的受容体は脳内に高発現の核内受容体・エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) である、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

54. 野瀬 健、下東康幸、内分泌攪乱物質ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) へのドッキングモデリング、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

55. 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、ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) 複合体の X 線結晶構造解析、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

56. 徳永隆俊・劉 曉輝・岡田浩幸・松島綾美・野瀬 健・下東康幸、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) のコンホメーション変化センシング抗体アッセイ:ビスフェノール A の受容体応答活性、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

57. 劉 曉輝・徳永隆俊・岡田浩幸・松島綾美・下東康幸、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) の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 の受容体結合部位の同定、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

58. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) への高親和性:ビスフェノール A の必須構造要因、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

59. 下東美樹、海部匡慶、西絵利香、澤田隆行、徳永隆俊、劉曉輝、松島綾美、I. A. Meinertzhagen、下東康幸、ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体 (dERR) と環境ホルモンのリスク評価のためのショウジョウバエ *in vivo* 継代試験の確立、環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、2006.11.11-12。

60. 岡田浩幸、白須直人、下東康幸、進化トレース法による恒常活性を強く保持するヒト核内受容体の構造解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006.12.6-8。

61. 下東康幸、ビスフェノール A 受容体:その構造と活性、環境ホルモン学会第 14 回講演会-低用量問題の現状と今後一、2007.2.28。

62. 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  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) 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。

63. 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  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) 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。

64. 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。

65. 野瀬 健、下東康幸、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) 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。

66. 松島綾美、角田佳充、寺本岳大、小柴琢己、