



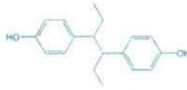


環境ホルモンについては、21-12 で示したペンタクロロフェノールや 22-11 や 22-25 のような有機スズ化合物、22-20 のようなスチルベン系の化学物質と結合することが判明した。有機スズ化合物については、nM オーダーで PPAR γ の転写活性を促進することが知られており、本研究の結果と同様であった。

表4. PPAR γ と結合した環境ホルモンの構造と IC₅₀ 値

化学物質番号	構造	IC ₅₀ 値 (μ M)
21-12		2.12
22-11		0.647
22-25		0.298
22-20		5.24
1-28		NC

NC: 算出できず

本研究で実施した競争結合試験の結果から、PPAR γ に結合する化学物質の候補

として、ビスフェノールAやジフェニルメタンのフェニル環メタ位におけるハロゲン等の付加や、有機スズ化合物が挙げられる。これら化学物質については、今後さらに詳細な構造活性相関研究を展開する必要があるだろう。また、今回結合性が確認された化学物質は、構造的に PPAR γ リガンド結合ポケットを完全に満たすほどのものではないと考えられるため、これら化学物質が複数分子同時に結合する可能性がある。実際に幾つかの脂肪酸は、1 分子の PPAR γ に対して 2 分子が結合することが報告されている。このようなことから、リガンド結合ポケットが非常に大きい PPAR γ は、受容体結合試験のみでは化学物質の応答性を正確に判断できない可能性がある。今後、計算化学的手法や転写活性化の解析等をおこない、今回明らかになった結合性との相関関係を解析し、アゴニストおよびアンタゴニストの区別や、PPAR γ を介した化学物質のリスクを総合的に評価することが必要と考えられる。

E. 研究発表

論文発表・学会発表

特になし。

F. 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

ヒト核内受容体における化学物質の結合競争試験：ROR β および Rev-erb

研究分担者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院准教授

研究要旨

近年、エストロゲン関連受容体 γ に対するビスフェノールAの強い結合性が判明するなど、従来研究が中心に行われてきた性ホルモン受容体やサイロイド受容体以外の受容体が関わる未知の内分泌攪乱作用に関する注目が高まっている。我々は、そのような現状を踏まえすべての核内受容体に対する化学物質リスク評価法の確立に取り組んでいる。本研究では、レチノイン関連オーファン受容体および Rev-erb 受容体に関する化学物質の結合性評価の試験系の構築を実施した。レチノイン関連オーファン受容体および Rev-erb は、時計遺伝子との関連性が指摘されるなど現在注目を集めている。また、Rev-erb のリガンド結合部位はリガンド結合部位を構成する構造要因のうち、最もC端側に存在する第12 α ヘリックスを欠損するという、構造的な特徴を有している。受容体タンパク質を発現し、放射標識リガンドを用いた結合競争試験、および、Rev-erb に関してはヘムをリガンドとした結合試験を吸光度法によって実施した。これらの試験系が機能する事が確認されたため、化学物質の結合性スクリーニングが実施可能となった。

A. 研究目的

これまで環境ホルモンの影響を最も顕著に受ける核内受容体として、女性ホルモン（エストロゲン）受容体（ER）が注目を集めてきた。これは、ERは主に生殖に関与し、野性生物において多くの生殖異常が発見された事実から、人類においてもERのかく乱作用は子孫、特に個体数の減少を引き起こすと考えられているためである。ところで、ヒトゲノム解析が終了した結果、ヒトには48種類の核内受容体が存在することが判明した。近年、女性ホルモン関連受容体 γ 型（ERR γ ）にポリカーボネートプラスチックの原料であるビスフェノールA（BPA）が結合することが明らかとなった。この発見により、ER以外の核内受容体を介した化学物質の攪乱作用が危惧される様になった。そこで我々は、ヒトの48種類の受容体すべてを対象に研究を行うこととした。

本研究においては、近年、脂質代謝や生物時計など身体の恒常性や中枢の発達に関わ

る事から注目されている核内受容体・レチノイン関連オーファン受容体 β 型（ROR β ）およびヘムと結合し、生物時計との関連から注目されているRev-erbに対する化学物質の結合性を調べることにした。

RORの3つのサブタイプにおいては、 α 型にはコレステロールが、 β 型および γ 型には all-*trans*-レチノイン酸が結合する事が知られている。今回、ROR β に対して、トリチウム標識した all-*trans*-レチノイン酸を用いた結合競争試験系の確立に取り組んだ。一方、Rev-erbのリガンド結合部位（LBD）は、他の核内受容体とは異なり、活性調節に関わる第12 α ヘリックスを欠損しているという特徴を有している。また、ヘムと結合することが報告されており、今回、そのヘム結合性を実験的に確認できるか、今後の化学物質スクリーニング法として使用できるかについて検討した。一方、多くの核内受容体に結合性を示すERアンタゴニストの4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）の放射標識体を用

いた結合試験についても検討を行なった。

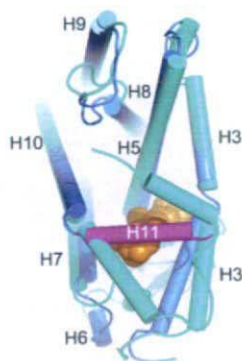


図1. 第12 α ヘリックスを欠損した Rev-erb β -LBDの立体構造
第11ヘリックス(H11)が折れ曲がり、第12ヘリックスの代用をしている。
J. Mol. Biol. (2007) **373**, 735.より。

B. 研究方法

(1) 受容体LBDの調製

ヒト cDNA ライブラリーより、PCR を用いて ROR β および Rev-erb α 、 β 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) を用いてタンパク質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。

(2) 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 $^{\circ}$ Cで行った。GST-ROR β -LBD においては各濃度の [3 H] 標識された all-trans-retinoic acid を GST-Rev-erb β -LBD においては同様に各濃度の [3 H] 標識された 4-OHT 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非標識試薬を放射標識試薬と併に加えることにより調べた。遊離の放射標識試薬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。

(3) 競争結合試験

一連の環境ホルモン候補物質の ROR β に対

する結合能は、 [3 H] all-trans-retinoic acid の受容体結合を阻害する能力で評価した。評価する一連の化学物質を [3 H] all-trans-retinoic acid と ROR β と共に binding buffer 中で混合し、インキュベートした。遊離の [3 H] all-trans-retinoic acid 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 IC₅₀ 値 ([3 H] all-trans-retinoic acid 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) ヘム結合試験

ヘム結合試験は、GST-Rev-erb-LBD を GST-Sepharose カラムに固定後、様々な濃度のヘミンをカラムにアプライし、次いで未結合ヘミンを洗い出した後、Rev-erb-LBD に結合していたヘミンを 1% SDS で溶出して、400 nm の吸光度で溶出してきたヘミンの量を定量する事により行なった。

C. 研究結果

(1) ROR β 受容体の発現と飽和結合試験

ヒトの cDNA ライブラリーからクローニングより ROR β のクローンを得て、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、アッセイに必要な発現タンパク質を得ることができた (図2)。次に、結合試験系を構築するために ROR β と結合が報告されている all-trans-レチノイン酸 (ATRA) の 3 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 H] all-trans-retinoic acid の特異的結合を十分量与える要件の設定に成功した。

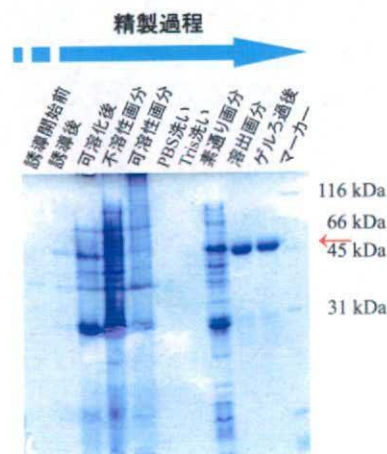


図2. ROR β の発現-SDS-PAGE 解析-GST-ROR β -LBD の分子量は約 54 kDa。

スキッチャードプロット解析を行った結果、 K_d 値は 65.5 nM であり、予想以上に $[^3\text{H}]$ all-trans-retinoic acid の非特異的な結合が見られたが、特異的結合は全結合の 50~60%あり、結合試験を行うに十分と判断された。また、結果として受容体の発現量も結合試験を行うに十分な量が確保できたと判断された。

表 1. ROR β の結合競争試験結果 (1)

Chemicals	IC ₅₀ (nM)	
all-trans retinoic acid (ATRA)	441	± 68
13-cis retinoic acid	4,260	± 770
dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)	2,560	± 390
4-nonylphenol	2,490	± 380
stearic acid	N.D.	
diethylstilbestrol (DES)	N.D.	
bisphenol A (BPA)	N.D.	
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	N.D.	
17 β -estradiol (E ₂)	N.D.	
progesterone	N.D.	
cholesteryl sulfate	N.D.	
cholesterol	N.B.	
stearic acetate	N.B.	
9-cis retinoic acid	N.B.	
bisphenol F	N.B.	
D- α -tocopherol	N.B.	
corticosterone	N.B.	
sitosterol	N.B.	
2,2'-dihydroxydiphenylmethane	N.B.	

(2) ROR β 受容体に対する様々な化学物質の結合能

結合試験可能な GST-ROR β -LBD が十分量確保できたことにより、 $[^3\text{H}]$ all-trans-retinoic acid を用いて様々な化学物質、レチノイン酸関連物質、ROR α のリガンドであるコレステロールおよびその誘導体、生体の内因性ホルモンや合成エストロゲンなどについて受容体競争結合試験を行った (表 1)。その結果、既知の ATRA は高い結合能を持つことが分った。一方、ROR α に結合するコレステロール類や、脂肪酸であるステアリン酸は ROR β に対してほとんど結合能を持たなかった。興味深いことに、これまで内分泌攪乱作用が注目されてきた DDT および 4-ノニルフェノールに弱いながら結合性を示した。

アルキルフェノール類であるノニルフェノールに結合活性が確認されたため、パラクレゾールからドデシルフェノールまでのアルキルフェノール類をそれぞれ結合競争試験で試験し、結合性の鎖長依存性を調べた。その結果、*tert*-オクチルフェノールが最も強い結合性を示したが、ノニルフェノールとほぼ同じであった (表 2)。

表 2. ROR β の結合競争試験結果 (2)

Chemicals	IC ₅₀ (nM)	
all-trans retinoic acid (ATRA)	441	± 68
4-dodecylphenol	2,660	± 520
4-nonylphenol	2,500	± 380
4- <i>tert</i> -octylphenol	2,180	± 650
4- <i>n</i> -octylphenol	N.D.	
4-heptylphenol	N.D.	
4-hexylphenol	N.D.	
4- <i>tert</i> -amylphenol	N.D.	
4- <i>tert</i> -butylphenol	N.D.	
4- <i>sec</i> -butylphenol	N.B.	
4-isopropylphenol	N.B.	
4-propylphenol	N.B.	
4-ethylphenol	N.B.	
p-cresol	N.B.	

(3) Rev-erb α および β 受容体に対するヘム結合試験系

GST-Rev-erb α -LBD および GST-Rev-erb β は、発現実験により十分量確保できた。そこで、ヘミンを用いて発現 LBD に対するヘム結合試験を実施した。ヘムを放射標識した化合物は一般に市販されておらず、その調製には時間と費用が掛かるため、まずは吸光度法によりヘムの定量を行なった。

その結果、図 3 にそれぞれ示すように、Rev-erb α 型および β 型それぞれにヘムは結合性を示し、飽和曲線を与えた。

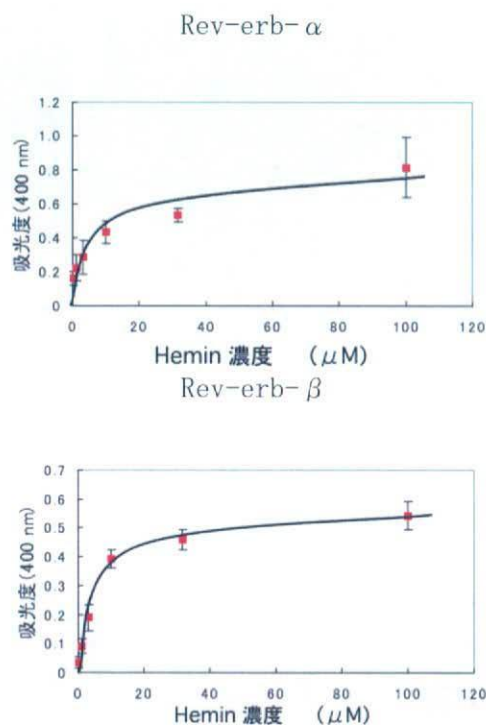


図 3. Rev-erb α および β へのヘム結合性

(4) Rev-erbに対する4-ヒドロキシタモキシフェンの結合能

4-OHTは多くの核内受容体LBDに対して結合活性を有する事が知られている。また、放射標識リガンドとして市販されており、Rev-erbに4-OHTが高い親和性で結合すると、結合競争試験が可能となる。このため、4-OHTを用いた結合競争試験を実施した。しかしながら、Rev-erbには4-OHTは顕著な結合性を示さなかった。

D. 考察

本研究において、ROR β に対する結合競争試験系の確立に成功したため、スクリーニング試験が可能となった。今回、試験した化合物群からは顕著な結合性を示す化合物は見つからなかったが、DDTやノニルフェノールなど、既に内分泌攪乱物質として懸念されていた化合物が結合性を示したことは興味深い。

一方、Rev-erbに関しては、有効な放射標識リガンドが現在のところ入手できないため、別の試験法の検討を行なった。その結果、吸光度法によりヘム結合試験が可能となった。この方法によるスクリーニングが可能と

なったが、アッセイとしての感度は高くないため、より高感度の試験法が必要である。

E. 結論

今年度の研究により、ROR β に対する結合競争試験系と、Rev-erbに対する吸光度測定法によるヘム結合試験系の構築に成功した。

F. 研究発表

論文発表

1. A docking modelling rationally predicts strong binding of bisphenol A to estrogen-related receptor γ , Takeru Nose, Yasuyuki Shimohigashi, *Protein and Peptide Letters*, 15, 290-296, (2008).

学会発表

1. 錦織充広、野瀬 健、劉 暁輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体 (ROR) のコンホメーション変化認識抗体、日本生化学会九州支部例会 2008. 5. 17-18

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、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

ヒト核内受容体に対する化学物質のレポーター遺伝子アッセイおよび
Two-hybridアッセイ

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

ビスフェノールA (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きた。しかし、我々は、受容体結合試験により、BPAがエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合することを、世界で初めて発見した。ERR γ はERの標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列 (ERE) と結合し、逆に、ERもERR γ の応答配列 (ERRE) を認識する。このことから、低用量問題の本質は、BPAが結合したERR γ がERの機能を干渉することである可能性が高い。しかし、BPAは、ERR γ に結合しても、ERR γ が自発的にもつ高い転写活性を全く変化させないことから、活性を指標とする既存のレポーター遺伝子アッセイやtwo-hybrid試験系では検出が困難であった。そこで、BPAのように、強く結合するが活性を変化させない化学物質のスクリーニング系の確立は、必須・緊要の課題であると考えられた。ところで、ERR γ は、リガンドの結合なしに初めから高い転写活性を持つ「自発活性化型」核内受容体である。ERR γ にBPAが結合してもERR γ の持つ高い転写活性は全く変化しない。しかし、ERR γ には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) が知られており、ERR γ に4-OHTが結合するとその転写活性を抑制する。そこで、ERR γ の活性をまず4-OHTにより抑制し、その後にBPAを加えることによりERR γ の転写活性が回復する「インバーサアンタゴニスト」活性が検出できると期待して、レポーター遺伝子アッセイおよびtwo-hybrid試験系の構築、最適化を行った。レポーター遺伝子アッセイにはHela細胞、two-hybrid試験系には酵母とHela細胞をそれぞれ用いた。レポーター遺伝子アッセイ系では、BPAの他に、ビスフェノールE (BPE) および4-tert-ブチルフェノールの結合検出に成功した。two-hybrid試験系では、発現系として酵母を用いた場合には、BPAの検出は不可能であり、発現系としてHela細胞を用いた場合のみ検出可能であることが初めて判明した。すなわち、酵母two-hybrid試験系では、酵母の高いタンパク質発現能がインバーサアンタゴニストの検出には不適であり、ホ乳類細胞two-hybrid試験系でのみインバーサアンタゴニスト活性が検出できることが初めて明らかとなった。

A. 研究目的

我々は、2006年にBPAはエストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に非常に強く結合する事を発見し、報告した。BPAのERR γ に対する解離定数は5.50 nMであり、これは天然ホルモン並に強い結合である。しかし、ERR γ は、リガンドの結合無しで初めから活性化型構造をとる「自発活性

化型」核内受容体であり、BPAはERR γ の高い自発活性を全く変化させない。そのため、活性の変化を指標とする既存の試験系では、検出されてこなかった。ゲノムプロジェクトの完了により、ヒト核内受容体には全48種が存在することが知られており、これらのうち13種が自発活性化型の核内受容体である。これらの自発活性化型核内受容体に結合する化

学物質は、ERR γ の場合と同様に、既存の試験系では検出出来ない可能性があり、自発活性化型核内受容体に適した試験系の構築は緊要の課題である。

BPAは、1891年にロシアのDianinによ初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にはドイツの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。BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの原料として幅広く使用されており、身の回りに非常に多く存在する一方、代表的な内分泌かく乱物質としても知られている。BPAを原料としたプラスチックには、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、これを取り除くことが困難であり、その漏出が問題になっている。したがって、「この低用量のBPAが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である。一方で、BPAは、女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体

(estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされてきたが、BPAのERへの結合能、活性は、正常なホルモンであるエストロゲンに比べると1/1,000~1/10,000と非常に弱く、そのため、BPAは内分泌かく乱物質になり得ないとも議論されてきた。しかしながら、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BPAの低用量作用のメカニズムは不明であり、「低用量問題」として議論が続いている。こうしたなか、我々は、低用量問題の本質がERを介さない別の経路(別の受容体)にある可能性を考えて研究を展開し、「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。

ERR γ には、これまでに、その自発活性を抑制するインバーサゴニストとして、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)が知られている。我々のトリチウム標識4-OHTを放射トレーサーとした結合競合試験により、BPAの結合が初めて検出できたことから、我々は、活性を指標とする試験系でも同様の手法をとれば検出できるはずであると確信した。すなわち、BPAの結合を検出するためには、まず、ERR γ に4-OHTを作用させてERR γ が初めから持つ高い自発活性を抑制し、その後BPAを添加することにより、BPAが4-OHTと競合し

て結合することにより、ERR γ の自発活性が回復することでBPAの結合が評価できると考えた。これは、BPAが、インバーサゴニストである4-OHTの機能をアンタゴニズすることから、BPAの「インバーサアンタゴニスト」としての活性を検出するものであると我々は命名した。

転写活性を直接に検出する試験系として、レポーター遺伝子アッセイがある。また、転写活性化に至る途中過程である、リガンド結合ドメインと転写活性化因子の相互作用を検出する系として、two-hybrid試験系がある。そこで、今回は、これらレポーター遺伝子アッセイとtwo-hybrid試験系の両方で、自発活性化型核内受容体ERR γ に対するBPAのインバーサアンタゴニスト活性試験系を構築し、最適化した。

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後、Sephadex G-25によるサイズ排除クロマトグラフィーにて精製を行った。

(2) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞であるHeLa細胞に、ERR γ の発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、ERR γ の活性を検出するために、ERR γ の結合により発現が促進されるルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを導入した。24時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに24時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質によるERR γ の活性への影響を評価した。

(3) 酵母 two-hybrid 試験

Matchmaker Gal4 two-hybrid system3 (Clontech社)を用いた。相互作用を検出するためのタンパク質として、ER α -LBD、ERR γ -LBDと、転写活性化因子SRC1の570-782

残基(LXXLLモチーフが3個)をヒト腎臓cDNAよりクローニングして、それぞれ pGADT7 および pGBDT7 ベクターに導入した。さらに、転写活性化因子の RIP140、転写抑制因子として知られる NcoRI、SMRT1 も pGBDT7 ベクターに導入して比較実験を行った。これら2つのプラスミドを酵母に遺伝子導入し、安定発現させた株を培養して実験に用いた。使用した酵母は、AH109 と Y187 株である。これらの酵母は bait と prey が相互作用すると、レポーターとして β -ガラクトシダーゼを発現する。AH109 はいわゆる非特異的な相互作用を減らせる (two-hybrid 試験の培養条件を厳しくできるので弱い相互作用のものは排除できる) が、 β -ガラクトシダーゼの発現量は少ない、Y187 は β -ガラクトシダーゼがシングルコピーではなく 2 つあると推定さ

れているので多く発現し活性がはっきり見えるという利点がある。また、 β -ガラクトシダーゼの検出には、汎用的に用いられる発色基質ではなく、感度の優れた発光基質を用いた。

(4) 哺乳類培養細胞 two-hybrid 試験

ERR γ 全長、ERR γ -LBD をそれぞれ pFN10A ベクターに導入した。また、上述の SRC1 の相互作用領域を pFN11A に導入した。また、ERR γ と同じ自発活性化型核内受容体である ERR α -LBD も pFN11A ベクターに導入した。pFN10A および pFN11A を用いて作成したプラスミドと、さらに相互作用のレポーターとなるルシフェラーゼを発現する pGL4.31 レポータープラスミドの合計 3 種のプラスミドを HeLa 細胞および HEK293 細胞に導入し、一

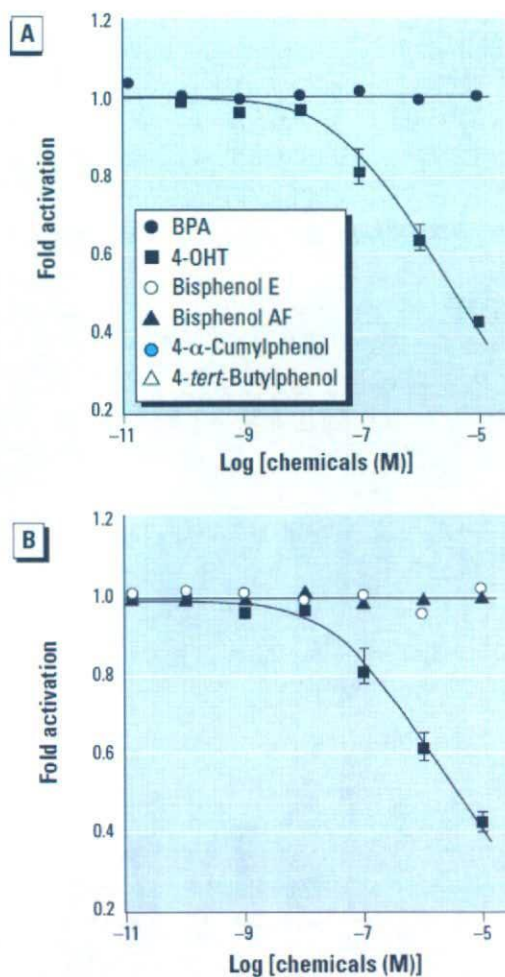


図 1 (A, B). レポーター遺伝子試験①
BPA は ERR γ に結合しても基盤活性に影響を与えない。4-OHT はインバースアゴニストとして機能する。試験化合物はすべて基盤活性に影響を与えなかった。

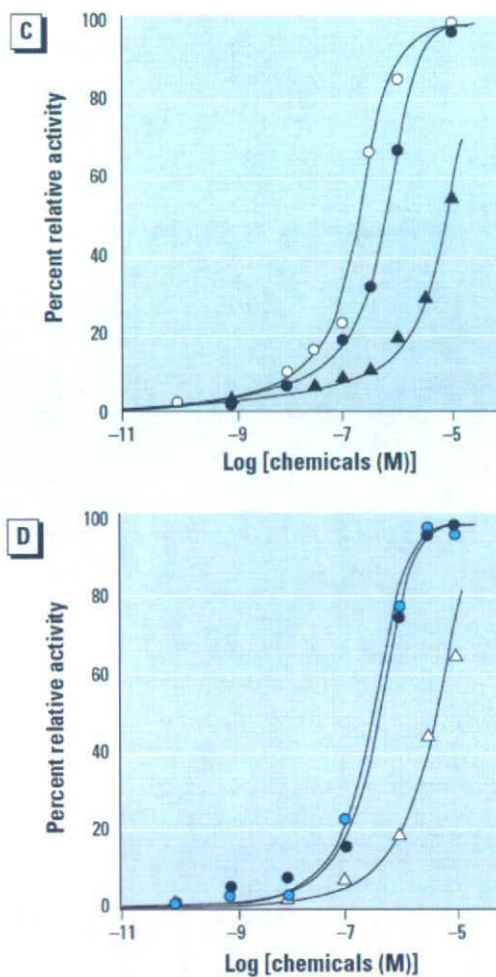


図 1 (C, D). レポーター遺伝子試験②
4-OHT 存在下 (活性を下げた状態) で、試験化合物による活性の変化を測定した場合、インバースアンタゴニスト活性が観測された。

過性発現を行った。遺伝子導入から6時間後に化学物質BPAを暴露し、さらに24時間後にルシフェラーゼ活性を発光基質を用いて測定した。

C. 研究結果

(1) レポーター遺伝子試験によるBPAおよび類似化合物のインパースアンタゴニスト活性測定

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 -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 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パースアンタ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1A, 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、インパースアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。インパ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。

(2) 酵母 two-hybrid 試験によるBPAおよび類似化合物のインパースアンタゴニスト活性

測定

まず、ER α -LBDとSRC1のyeast two-hybrid試験系を用いて菌体の種類AH109とY187のどちらが適切かを検討した。図2のとおり、AH109を用いるとエストラジオール濃度依存的な β -ガラクトシダーゼ活性上昇が見られた。Y187を用いると濃度依存性は観察しにくい、最大濃度とエストラジオール無しを比較すると大きな差が見られた。AH109は β -ガラクトシダーゼをシングルコピー (ゲノム上に1つ)、Y187は2コピー (ゲノム上に2つ) コードしている。2コピーでは、相互作用の有無で活性に大きな差が出るので、その有無は検出しやすいが、その強さを厳密に反映しにくい。シングルコピーの方が転写翻訳される部位が1つなので、ER α -LBDとSRC1が相互作用の強さを反映しやすいと考えていた予想通りだったので、本試験ではAH109を用いることに決定した。そこで、ERR γ -LBDとSRC1のyeast two-hybrid試験を、上述のER α -LBDとSRC1と同じ条件で実験すると、リガンドの添加無しで高い β -ガラクトシダーゼの活性が見られた。従って、ERR γ -LBDとSRC1が相互作用していると考えられる。この状態でリガンドとして4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT)を用いて濃度依存的に相互作用の減少、すなわち β -ガラクトシダーゼの活性の低下が見られるか試験した。菌体量、培養時間、培養条件等の剣道を行ったが、残念ながらはっきりとした活性低下が見られなかった。これは、酵母では β -ガラクトシダーゼのタンパク発現が非常に高いために、4-OHTによる抑制がみられないと考えられた。

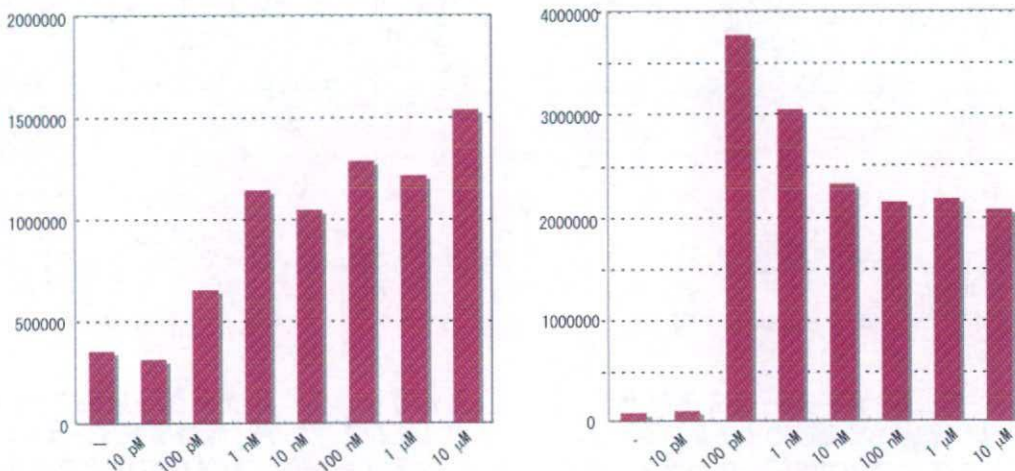


図2 酵母AH109とY187を用いた場合のエストラジオール濃度依存性

そこで、転写活性化因子の RIP140、転写抑制因子として知られる NcoRI、SMRT1 を相互作用の相手に用いて実験を行った。RIP140 は複数ある LXXLL モチーフのうち、どこが相互作用に適切か文献的に不明だったので全長を相互作用部位として用いたところ、ERR γ -LBD との相互作用が観察されなかった。これは、RIP140 が大きい (約 1000 アミノ酸残基) ので、適切に発現されていない可能性が考えられる。NcoRI、SMRT1 は予想通り相互作用しなかった (図 3)。

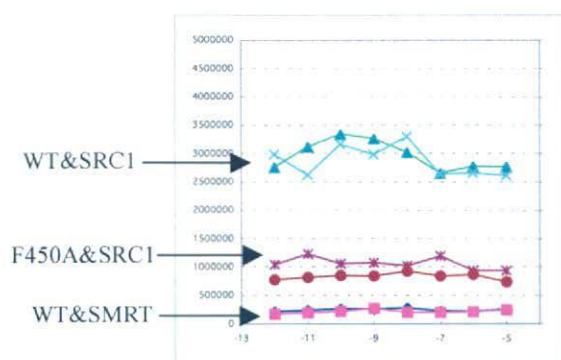


図 3. 野生型 (WT) および変異体とコアクチベータ SRC1、コリプレッサー SMRT の相互作用

コリプレッサー SMRT は WT と相互作用しないので活性はほとんどない。F450A 変異体は、WT より SRC1 との相互作用が弱い。グラフは duplicate で行った実験結果を示す。いずれも 4OHT による活性抑制は見られない。

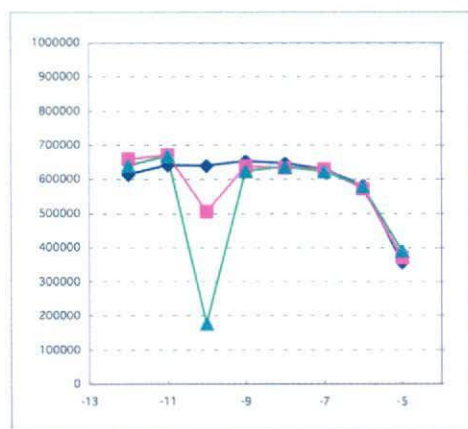


図 4. F450A 変異体と SRC1 の組み合わせによる 4OHT の活性抑制

しかし、実験系としては機能していると考えられたので、ERR γ -LBD の変異体 E274A、R316A、H434A、F435A、F450A を用いて実験したところ、F450A では培養がごく短い条件のときには 4-OHT による相互作用の減少傾向が見ら

れた (図 4)。この要因は、F450A と SRC1 の相互作用が WT と SRC1 の相互作用程に強くないためであると考えられる。これは「タンパク質発現が少なければ two-hybrid アッセイ系が作製できる」ということである。そこで、酵母ほどタンパク質発現能が高くない、ホ乳類培養細胞ならインバースアンタゴニスト活性の測定が適切に出来ると考え、その構築を行った。

(2) ホ乳類培養細胞 two-hybrid 試験による BPA および類似化合物のインバースアンタゴニスト活性測定

ヒト培養細胞を用いるため、核内受容体全長を用いた方が生体内条件に近く、発現効率も高い可能性がある。そこで、まず ERR 全長と SRC1 および ERR γ -LBD と SRC1 の 2 つの条件でホ乳類培養細胞 two-hybrid 試験を行った。細胞は、実施例が多い HEK293 を用いた。その結果、全長を発現すると、SRC1 を発現していなくても比較的高い転写活性がある (理論的には ERR と SRC1 が相互作用しないとレポーターは発現されないのだが、ERR γ は転写因子なので、細胞内にあるコアクチベータと相互作用してレポータープラスミドのどこかの塩基配列を DBD が認識して転写活性化してしまう)。そこで、LBD のみを発現することに決定した。次に培養細胞を Hela 細胞と HEK293 細胞で比較検討したところ、Hela 細胞を用いた場合の方がレポーターから転写されるルシフェラーゼの活性が高かったため、Hela 細胞が核内受容体の two-hybrid 試験には最適であることが判明した。さらに、文献的に、培養細胞を用いた試験系では、結合試験と比較して活性が低くなる傾向があるが、これは安定発現系ではないからではないかという指摘があったので、安定発現系の構築を試みた。two-hybrid 試験では 3 種のプラスミドを導入するひつようがある。2 種のプラスミドが取り込まれた安定発現細胞は得られるが、3 種のプラスミドが同時に入ったものはなかなか出来なかったため、一過性発現で実験を進めた (なお、後の実験で、インバースアンタゴニスト活性の検出には、一過性発現が最適であると判明した。)

遺伝子導入後、4-OHT を暴露するまでの培養時間を 6 時間、12 時間、24 時間で比較したところ、一番短い 6 時間培養後に 4-OHT を暴露した場合に一番 4-OHT のインバースアンタゴニスト活性が検出できることが判明した。

これは、細胞内でタンパク質があまりまだ発現していない状態で 4-OHT を暴露しなければ、レポーターであるルシフェラーゼの発現量が多すぎて活性の抑制が見えないためであると考えられた。すなわち、常にタンパク質が発現する安定発現系ではインバースアゴニストの検出はおそらく困難であり、一過性発現がインバースアゴニストの検出には必要であると考えられた。

次に、BPA のインバースアンタゴニスト活性を評価した。BPA 濃度を 0、1 μM 、10 μM 存在下で 4-OHT 濃度を変化させたところ、BPA 濃度依存的に活性の回復が検出された (図 5)。

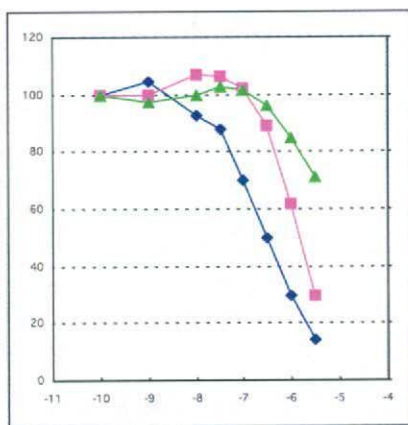


図 5. BPA の $\text{ERR}\gamma$ に対するインバースアンタゴニスト活性
青: BPA 0、マゼンタ: BPA 1 μM 、緑: BPA 10 μM 。

こうした two-hybrid 試験系による BPA のインバースアンタゴニスト活性の測定系の構築および最適化に成功した。さらに、コアクチベータとして SRC1 だけではなく、PGC1 α を用いた試験系も構築した。ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせ、および ERR γ -LBD と PGC1 α の組み合わせで、two-hybrid 試験を行ったところ、ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせのほうが 4-OHT の活性抑制をよりよく検出できることが判明した (図 6)。

D. 考察

BPA は、エポキシ樹脂などに代表されるプラスチック製品の原料として 50 年以上に渡って大量に使用されてきた化合物である。その用途は多岐に渡り、特に、缶詰類の内側のコーティング剤や歯科治療のための詰め物としても使用されるなど、我々の生活環境中に広く存在するだけでなく、少なからず経口接種している可能性が高い化合物である。実際に、約 6.6 $\mu\text{g}/\text{person-day}$ で BPA を体内

に接種しているという報告や、妊娠女性の血

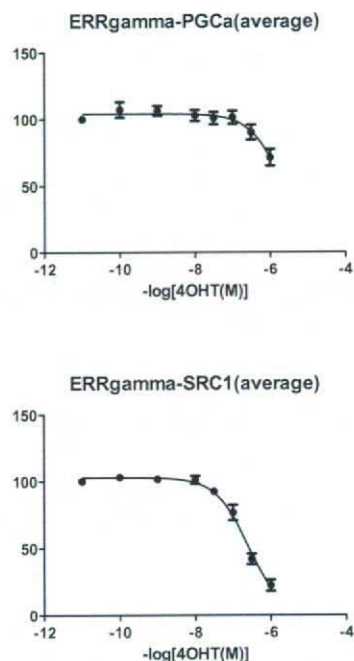


図 6. $\text{ERR}\gamma$ と SRC1 および $\text{ERR}\gamma$ と PGC1 α を用いた場合の 4OHT の活性抑制

清および羊水中から 1~10 ppb (約 4 nM に相当) の濃度で BPA が検出されたとの報告がある。したがって、BPA と $\text{ERR}\gamma$ が「 $K_D = 5.5 \text{ nM}$ 」で結合するという実験結果は、看過できないものである。また、5.5 nM という数値は、生体内のホルモンとその受容体の親和性に相当するものである。こうした BPA の結合でさえ、いままで活性を指標とした試験系では見過ごされてきた。そのため、本研究によるインバースアンタゴニスト検出系の創出は、きわめて重要なものである。

Two-hybrid 試験には、培養の簡便さ、コストパフォーマンス、実験設備の観点から、酵母が一般的に用いられる。しかし、本研究により、酵母では活性を上げるアゴニスト活性は検出できても、活性を下げるインバースアゴニスト活性は検出できないというあらたな事実が判明した。インバースアゴニスト活性が評価できなければ、当然これを阻害するインバースアンタゴニスト活性も評価できない。これは、活性を指標とするスクリーニング系を用いる場合に留意すべき重要な課題である。すなわち、 $\text{ERR}\gamma$ をはじめとする自発活性化型核内受容体のスクリーニングには、酵母 two-hybrid 試験は不適切であることを意味する。

スクリーニングには、酵母 two-hybrid 試

験系ではなく、ホ乳類のしかも Hela 細胞を用いた two-hybrid 試験系を用いるべきであると考えられる。これは、導入遺伝子の発現量に起因する。酵母は、導入遺伝子の発現量がきわめて高いため、その抑制を検出するのは、厳密な条件が必要であり、化学物質のスクリーニングには使えない。しかし、ホ乳類培養細胞、特に Hela 細胞を用いた試験系では、インバースアゴニスト活性が可能であり、したがって、BPA のようなインバースアゴニストの評価も可能である。

また、相互作用ドメインとしてのコアクチベータの選択も重要である。核内受容体との相互作用の強さ、性状はコアクチベータに依存する。ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせ、および ERR γ -LBD と PGC1 α の組み合わせで、two-hybrid 試験を行ったところ、ERR γ -LBD と SRC1 の組み合わせのほうが 4-OHT の活性抑制をよりよく検出できた。これは、PGC1 α の方が、SRC1 より ERR α や ERR γ より強く相互作用して、4-OHT の阻害を受けにくいことを意味すると考えられる。これまでに行なわれたコアクチベータペプチドと ERRs の X 線結晶構造解析は、ERR α -PGC1 α の組み合わせと、ERR γ -SRC1 の組み合わせのみである。これを重ね合わせたと、コアクチベータペプチドの LXXLL (LLXXL) の位置が異なるため、これが核内受容体との相互作用の差になる可能性が考えられた (図 7)。

PGC1 α	SRC1
Leu210	Leu690
Leu211	His691
Lys212	Arg692
Tyr213	Leu693
Leu214	Leu694

図 7. SRC1 と PGC1 α の結晶構造中の LXXLL モチーフの違い

E. 結論

自発活性化型核内受容体のスクリーニングには、Hela 細胞を用いた two-hybrid 試験系が適する。これにより、インバースアゴニストおよびインバースアゴニストの検出が可能である。さらに、標的とする核内受容体によって、two-hybrid 試験に用いる相互作用ドメインとなるコアクチベータあるいはコリプレッサの種類を検討する必要がある。ERR γ の場合には、ERR γ -LBD と SRC1 の

組み合わせが最適であることが判明した。

F. 研究発表

論文発表

1. Induced-fit type ligand binding guided by free-rotatory Leu residue present in the 7th α -helix peptide in the estrogen-related receptor γ (ERR γ). Matsushima, A., Okada, H., Liu, X., Tokunaga, T., Teramoto, T., Kakuta, Y., Shimohigashi, Y.: *Peptide Science* 2008, 521-522 (2009).
2. ER α /ERR α Nuclear Receptor Heterodimer Directly Linked by A Flag Peptide. Ikeda, S., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: *Peptide Science* 2008, 511-512 (2009).

学会発表

1. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 暁輝1、角田佳充、木村 誠、下東康幸、ビスフェノールA類似化合物のERR γ 結合要因解析、平成20年度日本生化学会九州支部例会、2008.5.17-18。
2. エストロゲン関連受容体 γ 型第ヘリックスペプチドのLeu側鎖の自由回転による適誘導型リガンド結合、松島綾美、岡田浩幸、劉 暁輝、徳永隆俊、寺本岳大、角田佳充、下東康幸、第45回ペプチド討論会、2008.10.29-31。
3. エストロゲン関連受容体 γ 型と内分泌攪乱物質ビスフェノールAおよびその誘導体4- α -クミルフェノールの誘導適合による結合様式、松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.9-12。
4. エストロゲン受容体 α 型に選択的に結合する環境ホルモン・ビスフェノールAF、岡田浩幸、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008.12.14。
5. ビスフェノールAおよびその類似体とエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とのX線結晶構造解析による結合要因解析、松島綾美、岡田浩幸、寺本岳大、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、環境ホルモン学会 第11回研

究発表会、2008.12.14。

G. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ、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

核内受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ

分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院准教授

研究要旨

多くの核内受容体のリガンド結合部位は、12個の α -ヘリックス構造からなる。これまでの研究結果より、それら核内受容体は、リガンド非結合（アポ型）、アゴニスト結合（ホロ型）、アンタゴニスト結合（ホロ型）の3つの状態において、それぞれ特有の立体構造を持ち、それらのコンホメーションが互いに異なることが知られている。特に、リガンド結合部位のC末端に存在する第12番目のヘリックスの位置取りに大きな差が見られる。ヒトゲノム解析により明らかにされた48種類の核内受容体それぞれにおいても、それらの異なるコンホメーションは存在すると想定されている。我々は、受容体のアポ型からホロ型へのコンホメーション変化、特に第12ヘリックスの構造変化を抗体で感知・センシングする方法を用いることにより、化学物質の核内受容体への結合、および、その結果引き起こされる内分泌かく乱作用のリスク評価に資するデータを得ることができることを見出した。このセンシング法の最も重要な分子ツールは、受容体のコンホメーション変化を高感度で感知するセンシング抗体である。このため、本分担研究では、このセンシング法をすべての核内受容体に適応させるため、センシング抗体をポリクローナル抗体として作製してきた。今年度は、これまでの研究において作製されたセンシング抗体のなかから、十分な認識能が得られていない2種の核内受容体に対するセンシング抗体をポリクローナル抗体として調製した。

A. 研究目的

一般に、核内受容体は生体内に存在する生理活性を持つホルモンや化学物質など様々なリガンドと特異的に結合することにより多様な作用を引き起こす。核内受容体は、そのようなホルモン（リガンド）によって活性調節を受ける転写因子の一つのグループである。ヒトゲノム解析研究が終了した結果、ヒトには少なくともステロイドホルモン受容体などと構造や機能に類似性を示す48種類の核内受容体が存在することが判明した。今日においては、それらの核内受容体すべてに対する特異的リガンドが判明してはならず、いわゆる孤児（オーファン）受容体も存在しているが、それらの立体構造およびアミノ酸配列解析の結果から、それらすべての核内受容体においてリガンド既知のステロイドホルモン受容体の活性化機構と類似の活性化機構が存在する

ことを示唆されている。そこで、従来化学物質による攪乱が懸念されてきた性ホルモン受容体に加え、それらすべての核内受容体に対する環境化学物質の影響を検討する必要性が生じた。このため、本研究においては48種類すべてを対象として研究を実施している。

核内受容体タンパク質のアミノ酸配列は、この核内受容体ファミリーに属する受容体タンパク質同士において高いアミノ酸配列相同性を示すことが判明している。また、核内受容体は共通構造として5つのドメイン構造からなることが明らかとなっている。それらのドメイン構造は大きくA~E領域に分けて考えられており、一般には、内分泌かく乱作用は、リガンド・ホルモンとの特異的な結合に関与するEの領域・リガンド結合ドメイン(Ligand Binding Domain: LBD)で主に生じると考えられている。(図1)

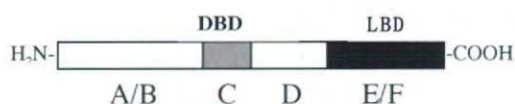


図1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

このLBDは、リガンドが結合することにより立体構造を変化させ、遺伝子転写の制御を行っている。それゆえ、このLBDにリガンドではない化学物質が結合し、誤った転写制御を引き起こすことが内分泌かく乱作用の本質であると考えられる。すなわち、内分泌かく乱化学物質はLBDに対してリガンドと同様に、もしくはリガンドの結合を遮断するように結合して、LBDの立体構造を変化させたり、その変化を阻害すると推定されている。これまでにX線結晶構造解析の結果が報告された核内受容体の立体構造から、活性化にリガンドを必要とする受容体のLBDにおいては次のような立体構造の変化が推定されている。リガンドがLBDに結合することに伴い、第12ヘリックス部分を大きく変化させる。すなわち、図2において、リガンド未結合のAの状態から、結合したリガンドがアゴニストの場合はBの状態に、アンタゴニストの場合にはCの状態へと、水色で示す第12ヘリックスの構造と位置を大きく変化させる。

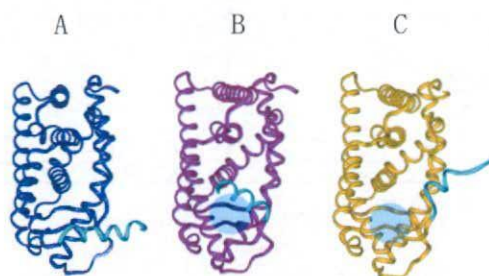


図2. リガンド結合に伴う核内受容体の構造変化

A: リガンド未結合、B: アゴニスト結合、C: アンタゴニスト結合、
第12ヘリックスは水色で示す。

そこで、この第12ヘリックス部分を特異的に認識する抗体を作製することにより、

化学物質の受容体結合を評価することが可能となり、我々はこれまでに幾つかの核内受容体系での成功例を既に報告した。

本年度の研究では、これまでに作製したセンシング抗体のなかで、その力価が不十分であった2種の核内受容体、SF1 および GCNFI のヘリックス12部分を含む抗原作製用ペプチドをデザイン・化学合成して、ポリクローナル抗体作製を行った。

B. 研究方法

① 立体構造データの検索と入手

核内ホルモン受容体LBDのリガンド結合状態（アゴニストもしくはアンタゴニストが結合したもの）の立体構造は、PDB (Protein Data Bank)に登録されている。これらのX結晶構造解析データを、インターネットを通じて直接に入手した。

② 受容体構造の解析

PDBより入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム InsightII / Discover (Accelrys社製)で解析した。コンピュータはSGI社製、グラフィックワークステーション02を使用した。

③ アミノ酸配列データの検索と入手

核内受容体のアミノ酸配列は、NCBI (National Center for Biotechnology Information)の遺伝子・タンパク質配列データベースEntrezから、それぞれ最新の配列取得した。また、配列相同性解析・およびドメイン構造の同定には解析プログラム・ClustalXを使用した。

④ ホモロジーモデリングによるエピトープ部位の決定

立体構造未知の核内受容体のエピトープ部位の決定ため、ホモロジーモデリングによる立体構造の構築を行った。ホモロジーモデリングソフトウェア・Modellerを用いて、構造未知の受容体LBDに対してアミノ酸配列の相同性が高く、かつ立体構造既知の核内受容体をPSI-BLASTで探索し、その中から相同性高い3種類の立体構造を鋳型構造として用い、立体構造を構築した。

⑤ 抗原ペプチドの合成

構造解析により同定した受容体の第12ヘリックスを含むC端部分に相当する断片ペ

プチドをエピトープとして設定し、このペプチドを Fmoc 固相法による自動固相合成機・ABI433A によって合成した。タンパク質担体との結合のために、抗原配列中にシステインを持たないペプチドの N 末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8$ cm, $l = 75$ cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e), $\phi = 25$ cm x 250 mm) により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析により行った。

⑥ 架橋試薬のキャリアタンパク質 KLH への結合

担体タンパク質として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、架橋試薬として 2 価性の *m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた。

KLH の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) (16 mg/ μ l) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μ l) を 9.3 μ l 添加し、室温で 30 分攪拌した。反応液を遠心分離後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

⑦ エピトープペプチドの KLH への結合

上記で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500 μ l に、トリス-(2-シアノエチル)ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μ l 加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、先に調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230 μ l) および 0.2 M Na_2HPO_4 (115 μ l) を加え、室温で 3 時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

⑧ ウサギへの免疫

先に調製したペプチド-KLH 抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとした後、ウサギ (ニュージーランドホワイト) に対して免疫した。約 3 ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA 法により確認した。

⑨ 抗体の精製

まず、採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分画し、血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除

去し、次いで合成ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

⑩ 免疫沈降

終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加えて、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してなくなるまで繰り返し行った。

⑪ アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel :Pierce 社) に Cys(SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

⑫ アフィニティ精製

調製した抗体の抗原ペプチドに対する応答を酵素免疫測定 (ELISA) により調べた。ELISA に用いるプラスチックプレートの調製は、次のように行った。1) ウシサイログロブリンに結合させたペプチドをプレートに吸着 (2.5 mg/ml, 50 ml/well)、2) 1.5 時間インキュベート、3) 洗浄、4) 非特異的な吸着を防ぐ為に 2%BSA によりブロッキング。その後、試験に用いる抗体溶液を 1 時間・室温でインキュベートした後、洗浄操作を行い、HRP 標識された 2 次抗体 (anti-rabbit IgG 抗体) によりペプチドに対する抗体応答を調べた。HRP の基質には過酸化水素を用い、酵素作用により生じた酸素原子が 2,2'-azinobis(3-ethyl- benzthiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (ABTS) を発色させることにより 405 nm の吸光度をプレートリーダー検出した。

(倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作成するに当たり、ウサギを実験動物として使用する。こうした実験動物はきちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられている。また、採血等の際しても麻酔をするなど痛みの無いように配慮するなど、倫理面の問題が生じない状況で行っている。所属部局・理学研究院においては「動物実験審査」

システムが確立されており、本研究は審査を承認の上許可された。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多種取り扱うが、量的には極めて微量であり、しかも、スクラパー付属のドラフトチャンバーが設備されており、特に危険性は無い。また、揮発性試薬に対応するドラム式換気装置を実験室に備えている。

C. 研究結果

コンホメーション変化センシングアッセイに用いる抗体は、受容体 LBD へのリガンド結合に伴う構造変化を感知する抗体である。そのセンシング抗体は、リガンド結合に伴い構造変化する核内受容体 LBD のヘリックス 1 2 部分を主なエピトープとする。それゆえ、ヘリックス 1 2 部分の同定が、センシング抗体作製に重要な作業となる。エピトープの決定作業はこれまでと同様に行った。エピトープの決定にあたり、X線立体構造解析やホモロジーモデリングソフトウェア「Modeller」により立体構造を構築し、それらよりヘリックス 1 2 を直接同定したうえ、その前後 1 ~ 8 残基を含む部分をエピトープとした。

今回設定したエピトープを表 1 に示す。本研究において、SF1 および GCNF1 の抗体作製は既に行われていたが、ウサギに免疫後、精製された抗体の力価は低いものであった。この原因として、ウサギ個体間の抗体産生能の差にあると考え、同じ配列のペプチドキャリアタンパク質複合体を再度作製し、それらをウサギに免疫した。

その結果、SF-1 においては、抗体価の有意な上昇が見られ、抗体の作製に成功した事が確認された (図 2)。

表 1 推定核内受容体 LBD・ヘリックス 1 2 領域と設定したエピトープペプチド

下線部分は何リックス 1 2 相当部分

SF-1	CNEMPRNLL <u>IEMLQAKQ</u>
GCNF1	QLPLLLFKVVL <u>H</u> SCKTSVGK
GCNF1S	CQLPLLLFKVVL <u>H</u> SSKTSVGK

一方、GCNF1 においては、再度の免疫後も有意な抗体価の上昇がほとんど見られなかった。このため、エピトープペプチドのアミノ酸配列に関する検討を実施した。GCNF1 のエピトープ配列には、ヘリックス 12 相当部分にシステイン残基が存在している。このシ

ステイン残基をこれまではキャリアタンパク質とのリンカーとして使用した。このような、配列の中間部分にシステインを有するエピトープペプチドを用いた抗体の作製は、既に PNR で実施済みで (KTIGNTPMEKLLCDMFK)、この場合には抗体の作製に成功しているが、GCNF1 においては、この部分に問題が生じているのではという仮定のもと、N 末端にシステインを付加し、配列中のシステインをセリンに置換した表 1 の GCNF1S に示す配列を新たにデザイン、化学合成、ウサギに免疫し、現在、ポリクローナル抗体の作製を実施中である。

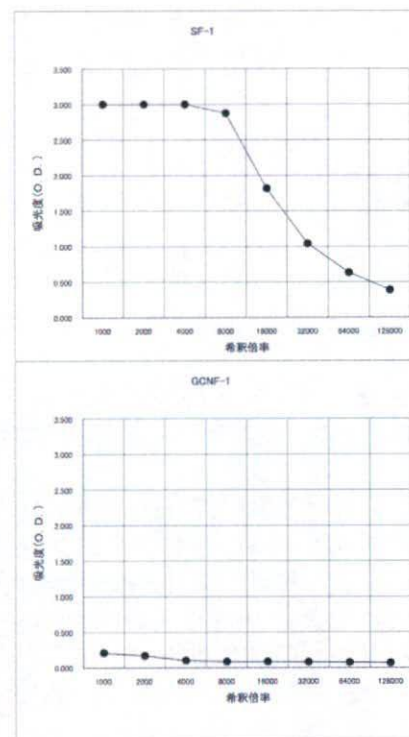


図 2 ウサギ由来抗ヘリックス 1 2 ポリクローナル抗体の力価の検討

D. 考察

本分担研究では、センシング抗体アッセイ法に用いるセンシング抗体をポリクローナル抗体として調製した。センシング抗体作製に使用するエピトープは、核内受容体の LBD に存在するヘリックス 12 を含む合成ペプチドを用いた。現在までに計 47 種類の核内受容体に対するセンシング抗体をポリクローナル抗体として作製した。一方で、

GCNF-1 では、これまでに有為な認識能を示すポリクローナル抗体が得られず、現在も、この問題を解決すべく、エピトープ配列を再検討し、抗体を再度調製している。しかしながら、ヘリックス12近傍をエピトープとして作製したセンシング抗体は一般的に充分構造変化認識プローブとして機能しており、本調製法の有用性が確認された。

E. 結論

今年度の本分担研究により、1種類の核内受容体 LBD 抗ヘリックス12ポリクローナル抗体が作製され、合計47種類の核内受容体に対するコンホメーションセンシング抗体が作製された。これらにより、ヒトにおけるほとんどの核内受容体に対しての構築が可能となった。

F. 研究発表

論文発表

1. A docking modelling rationally predicts strong binding of bisphenol A to estrogen-related receptor γ , Takeru Nose, Yasuyuki Shimohigashi, *Protein and Peptide Letters*, 15, 290-296, (2008).

学会発表

1. 錦織充広、野瀬 健、劉 暁輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイド関連オーファン受

容体 (ROR) のコンホメーション変化認識抗体、日本生化学会九州支部例会 2008. 5. 17-18

2. 村田 聡史、野瀬 健、劉 暁輝、錦織 充広、徳永 隆俊、下東 康幸、エストロゲン受容体 α 型のリガンド認識における Leu387 を介した分子間相互作用の解析、第45回化学関連支部合同大会、2008. 7. 5.

3. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、ドッキング計算を用いた探索法により見いだされた 4-(1-アダマンチル)フェノールのエストロゲン受容体 α 型への高親和性結合、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008)、2008. 12. 9~12.

4. 野瀬 健、錦織充広、下東康幸、複数の鑄型構造を用いるドッキング計算による化学物質の核内受容体結合性解析、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008. 12. 13~14.

5 Takeru Nose, A novel sophisticated screening method to estimate the nuclear receptor activities of endocrine disrupting chemicals, The 4th Pukyong University-Kyushu University Joint Symposium on Sciences, 2009.3.7.

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、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

ファージディスプレイ法によるヒト核内受容体 48 種
センシング抗体の作製

協同研究担当者 岡田浩幸 九州大学大学院理学府 学術振興会特別研究員
研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教
研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部 講師

研究要旨

我々が開発したセンシング抗体法は、1段階の試験で化学物質の受容体結合性とホルモン活性についての評価を同時に与えるハイスループットな評価系であり、膨大な数の化学物質を 48 種の核内受容体について評価するためには非常に有効な評価法である。そこで本研究では、48 種の核内受容体において高効率なセンシング抗体法の確立を目的に、モノクローナル抗体を作製することにした。そのスキームは、まず、ファージディスプレイ法を利用し、次いで必要な場合、マウス・ハイブリドーマモノクローナル抗体で最適なセンシング抗体法の確立を行うことにした。本年度は、ファージディスプレイ法について、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の最適化、②アンタゴニスト結合型構造を認識抗体の選別、③複数のライブラリーを使うことの有効性、④scFv-ELISA による機能的 scFv の高確率取得、等から、技術基盤を完成した。本年度の研究では、いわゆる「低分子化合物認識抗体」であり作製することが難しい抗 BPA 抗体の作製について、ファージディスプレイの技術・抗体作製スキームを適用して、取り組んだ。その結果、抗原であるジフェノール酸とキャリアタンパク質を直接固定化し、バイオパンニングの際に BPA 競合法でファージを回収することで、BPA を特異的に認識する抗体の取得に成功した。我々の最近の研究により BPA の標的受容体が、ERR γ であることが明らかとなり、ERR γ の機能解明が BPA のかく乱作用の本質を解明する端緒となる可能性が高い。その有効なツールとして抗 BPA 抗体を使用することが可能となった。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析の完成により、ヒトには 48 種の核内受容体が存在することが明らかにされ、環境化学物質による内分泌かく乱作用は、これらの核内受容体群が複合的に関与する複雑な制御システムに対する影響の結果生じる可能性が強いと懸念されている。事実、内分泌かく乱作用に直接的に関与するエストロゲン受容体 2 種 (ER α 、 β) の他にエストロゲン関連受容体 3 種 (ERR α 、 β 、 γ) の存在が明らかとされ、これらが一部の外因性リガンドを同じくすることから、5 種の受容体が相互に関連した機能調節機構へ及ぼす環境化学物質の複合的な影響が危惧されている。

さらに、我々の調査の結果、核内受容体 48 種のうち、実に 20 種を超える受容体が脳

神経系において機能発現していることが明らかとなった。その他にも、代謝系や免疫系において核内受容体が機能していることが報告され、かく乱作用の標的は内分泌系にとどまらず、脳神経系、代謝系、免疫系にまで及ぶ危険性が高いことが判明した。したがって、すべての核内受容体において環境化学物質のかく乱作用の予測・順位付けを行うことは緊要な課題である。

我々は、核内受容体断片ペプチドを抗原とした動物免疫によって、コンホメーション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 免疫動物体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おり、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った。

そこで我々は、平成 16 年度よりファージディスプレイによる抗体作製法を導入した。本手法は、ファージと呼ばれるウイルスに抗体タンパク質を産生させる手法で、試験管内でテラーメードな抗体作製を可能にするものであり、高効率にセンシング抗体を得ることが期待される。したがって、本研究の目的は、48 種のヒト核内受容体に対してコンホメーションセンシング能を有するモノクローナル抗体を効率よく作製し、さらに、化学物質の評価（センシングアッセイ）に必要な抗体を大量に供給することである。こうした「モノクローナル抗体産生システム」の構築に平成 16 年度より取り組んできた。

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、バイオパンニング (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ンニングを展開した。

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 のバイオパン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、平成 19 年度の研究においては、確実に機能的な 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、単独で機能的に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、「scFv スクリーニング」という手法を新規に考案し、確立した。これにより、きわめて高い確率で機能的な scFv を得ることができるようになり、ファージディスプレイによるモノクローナル抗体作製系の技術は、ほぼ完成に至った。

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しており、ポリクローナル抗体でのセンシングアッセイが不可能な場合や、より高感度な検出抗体が必要である場合、アンタゴニスト応答を特異的に検出する必要がある場合等に適宜テラーメードに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、平成 19 年度までに、ポリクローナル抗体の作製を終えている RAR

表 1. センシング抗体 (scFv) 作製に使用したエピトープ配列

	名称	受容体	配列
1	NR1B1	RAR α	CKMEIPGSMPLIQEMLEN
2	NR1B2	RAR β	CKMEIPGSMPLIQEMLEN
3	NR1C3	PPAR γ	CSLHPLLQEIQDLY
4	NR1H4	FXR	HKFTPLLCEIWDVQ
5	NR1I1	VDR	CSMKLTPLVLEVFNGEIS
6	NR3A1	ER α	CLYDLLLEMLDAHRLHA

青字で示すのは、X 線結晶構造解析から同定された、ヘリックス 12 部位