

α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR についてモノクローナル抗体 (scFv) の取得を既に終えている (表 1 参照)。一方で、ER α については、scFv が得られていない。ファージディスプレイ法では、抗体ライブラリーから目的抗体を選別する手法であるため、抗体ライブラリーに目的の抗体が含まれていない場合は決して得ることができない。しかしながら、ER α については、マウスを用いたハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体が既に得られており、ファージディスプレイによる抗体作製が困難である場合についてのみ、従来法を採用することが望ましいと考えられる。

ところで、我々の研究により、ビスフェノール A がエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に強く結合することが明らかとなり、その影響が懸念されている。特に ERR γ のリガンドおよび機能の解明が急がれるなか、BPA 認識抗体の必要性が高くなった。なぜなら、BPA と ERR γ の結合定数が K_D 値で 5.5 nM であることが判明し、生体内のホルモンとその受容体の結合親和性に匹敵するほど強いものであることから、ERR γ の内因性リガンドが存在するのであれば類似した構造を持つと思われるからである。そこで、平成 19 年度より、ファージディスプレイを利用して抗 BPA 抗体の作製に着手したが、リガンド探索に有効なほど高い特異性を持つ scFv が得られていない。そのため、本年度の研究においては、ファージディスプレイにおけるバイオパンニングの際に使用する固定化抗原の構造に改良を加え、高感度な BPA 認識抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

(1) 固定化抗原の調製

BPA と同じ部分構造を持つ化合物である 4,4-Bis(4-hydroxyphenyl)valeric Acid (通称ジフェノール酸: 図 3) のカルボキシル基とキャリアタンパク質を直接的に結合させる方法で行った。5.9 mg の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide · HCl (EDC) と 3.5 mg の N-hydroxysuccinimide (NHS) と 7 mg のジフェノール酸を 1 ml の DMSO 中で反応 (室温で 2 時間攪拌) させ、の 4 ml の BSA 溶液 (45 mg の BSA を 0.1 M NaHCO₃ に溶解) を添加した。さらに室温で 2 時間攪拌した。その後、0.01 M の PBS および水で透析を行った。BSA と同様に OVA を利用した抗原も作製した。

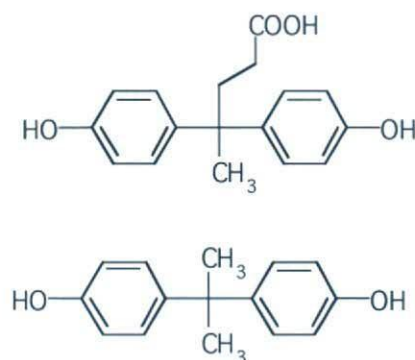


図 1. ジフェノール酸 (上) とビスフェノール A (下) の構造

(2) バイオパンニング用ファージ抗体ライブラリーの調製

ファージ抗体ライブラリーには、これまでと同様に、英国医学会議 (MRC) より入手した Tomlinson I および Tomlinson J ライブラリーを使用した。これらのライブラリーに含まれるファージは、「単鎖型抗体 (scFv) 遺伝子」と「G3P コートタンパク質遺伝子」が融合されたプラスミド (ファージミド) を持っており、対応する scFv がファージ表面に提示される (図 1)。さらに、組み込む抗体タンパク質の遺伝子をランダム化することにより、様々な scFv を提示したファージ抗体ライブラリーとなる。今回使用した 2 つのライブラリーは、ランダム化させた部位が異なるため、重複することのない独立したライブラリーである。これら 2 つのライブラリーは、ファージミドを大腸菌 (TG1 株) にトランスフェクションされた状態で MRC より分与されている。したがって、これを大量培養後、KM13 ヘルパーファージを感染させるファージレスキューと呼ばれる手法によりファージ抗体ライブラリーへの変換を行った。

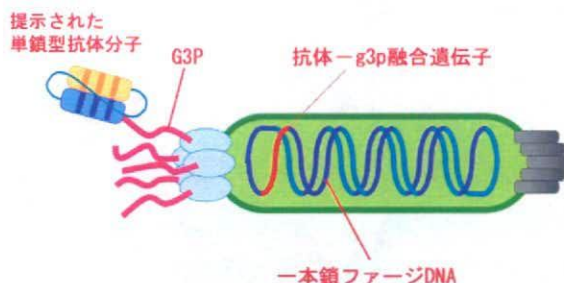


図 2. ファージ抗体の構造

(3) バイオパンニング

一般にファージディスプレイ法では、① 固定化抗原とファージ抗体ライブラリーの結合、② 洗浄による非結合ファージの除去、③ 結合ファージの溶出、④ 溶出ファージの大腸菌への再感染、⑤ 溶出ファージの増幅・回収、というバイオパンニングと呼ばれる一連の操作によって、抗原特異的な抗体を発現したファージ粒子を選択的に濃縮させる。バイオパンニングは、通常2回から4回繰り返す。本研究では、バイオパンニングを3回繰り返す方法を採用した。一般的に、バイオパンニングの回数が増えることで結合親和性の高い抗体が得られるが、単一成分子系に近づくため、少ない数(種類)の抗体しか得られなくなる。

固定化する抗原 (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) をイムノチューブ (Maxisorp, Nunc 社) に加え、終夜インキュベートして固定化した。PBS による洗浄後、2% スキムミルク-PBS (MPBS) にて室温で2時間ブロッキングを行った。4 ml の MPBS 中に 5×10^{12} のファージを含むように調製した Tomlinson I もしくは J ライブラリーをイムノチューブに加え、室温で2時間反応させた。0.1% Tween20-PBS (TPBS) で3回、PBS で3回洗浄後、固定化抗原に結合したファージを通常のスキムであるトリプシン消化、もしくは、1 mM の BPA と競合させることで回収した。500 μl のトリプシン溶液 (1 mg/ml) を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。

溶出ファージを宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成したコロニー群を液体培地によって懸濁させ、50 ml の 2 \times TY 培地 (含 1% グルコース) に植菌して

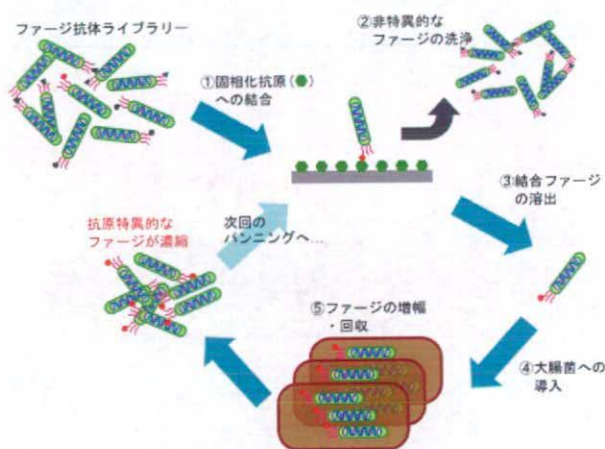


図3. バイオパンニング

対数増殖期にまで 37°C で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の 2 \times TY で再度菌体を懸濁させ、 5×10^{10} の KM13 ヘルパーファージを添加して 37°C にて 30 分間静置した。遠心して上清を除去した後、50 ml の 2 \times TY 培地 (含 0.1% グルコース) で菌体を懸濁させ、30°C で終夜培養した。パッケージングされたファージ粒子は培養上清に含まれるため、これをポリエチレングリコール沈殿法によって回収し、最終的に得られるファージペレットを 2 ml の PBS にて懸濁させた。得られたファージ液のうち 1 ml を次回のパンニングに使用した。2 回目のバイオパンニングについては、より高親和性の抗体を回収するために固定化抗原の濃度を 25 $\mu\text{g/ml}$ とし、3 回目には 10 $\mu\text{g/ml}$ と希釈した。さらに、ライブラリー反応後の洗浄操作を 2 回目以降は TPBS、PBS 共に 20 回と厳しく変更した。また、固定化抗原には、BthG 架橋体と KLH 架橋体を交互に使用することによって、ペプチドを特異的に認識するファージ抗体の選別・回収を行なった。

(3) scFv でのスクリーニング

回収したファージは、過剰量の scFv 発現用の宿主菌 HB2151 (非サプレッサー株) に感染させ、培養プレートに播種した。育成後のプレートからシングルコロニーを回収することで、得られたファージ抗体群をモノクローナル化した。

得られたファージクローンの中から、BPA 構造を特異的に認識する機能的な scFv を発現可能なクローンを同定するため、抗原 10 $\mu\text{g/ml}$ を固定化抗原とした scFv-ELISA を行った。まず、各 100 μl の 2 \times TY 培地 (含 1% グルコース) にモノクローナル化したシングルコロニーを植菌し、37°C、300 rpm で終夜培養した。培養液 2 μl を新たな各 100 μl の 2 \times TY 培地 (グルコースなし) に植菌し、37°C、300 rpm で 2 時間培養後、50 μl の 2 \times TY 培地 (含 0.3 mM IPTG) を添加した。これにより、細胞内で scFv の発現が開始され、発現された scFv は細胞内のペリプラズムと呼ばれる細胞膜付近の領域に分泌される。分泌された scFv の一部は、培養上清に放出される。そこで、30°C、300 rpm で 24 時間培養後、遠心により菌体を除いた上清を一次抗体として使用した。一次抗体を添加して室温 1 時間後、二次抗体 (Anti-c-myc-peroxidase) を添加した。さらに室温 1 時間後、ABTS/H₂O₂ によって発色させ、405 nm の吸光度測定に

より抗体応答の検出を行った。

(倫理面への配慮)

一般の抗体作製法とは異なり、ファージディスプレイ法は実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、今回の研究では動物愛護の観点からの倫理上の問題が大幅に軽減されている。また、研究に用いたファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。

C. 研究結果

(1) バイオパンニング

固定化抗原に対して、Tomlinson I および J ライブラリーよりバイオパンニングを行った。合計3回のバイオパンニングを行い、各パンニングを終えるごとに回収されたファージの個体数を算出した。この結果、それぞれの受容体の3回目のバイオパンニングにおいて、回収されるファージ個体の数が増加に転じた。これにより、目的の抗原を認識する抗体を提示したファージが濃縮されたことが示唆された (図4上)。

(2) 結合ファージ回収方法の検討結果

BPA を特異的に認識する抗体を作製するために、バイオパンニングの後にトリプシン消化ではなく、BPA との競合によってファージを回収した。BPA との競合によってファージを回収した場合、回収効率がファージの個体数にして 10^2 個程度低下することが判明した。しかしながら、これはBPA 構造ではない部分を認識するファージが回収されなくなったと考えられ、BPA を特異的に認識しているファージを回収するという目的に対しては良好な結果であると判断した (図4下)。

(3) scFv スクリーニングの結果

バイオパンニングにおいて回収されたファージを TG-1 (サプレッサー株) から HB2151 (非サプレッサー株) に組み換えた。さらに、これらをモノクローン化し、96 穴プレートにて scFv の発現を行った。得られた scFv (培養上清) を用いて抗原に対する抗体力価を測定した。その結果、BPA 競合法による回収の場合において抗原を特異的に認識する scFv が多く得られることが判明した (図5)。また、キャリアタンパク質への認識力が弱く、リンカーを使用せずに抗原を作製した方が効果的であることが判明した。

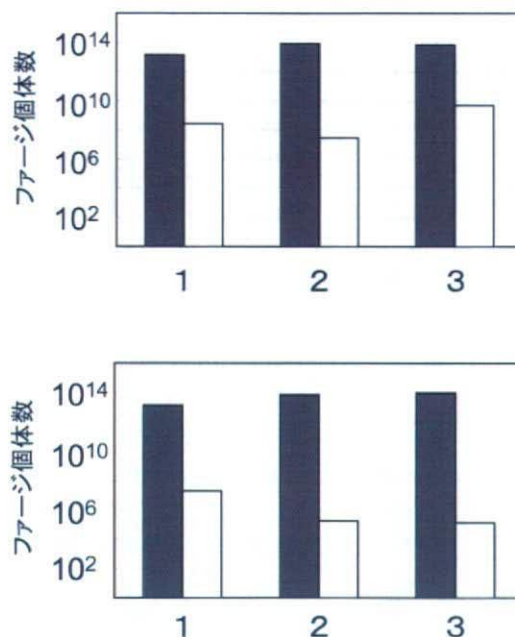


図4. バイオパンニングによるファージ個体数の変化とファージ回収方法の検討結果
上図がトリプシン消化による回収、下図が BPA 競合法による回収。(■) バイオパンニングに使用したファージの個体数、(□) バイオパンニング後に回収されたファージの個体数。

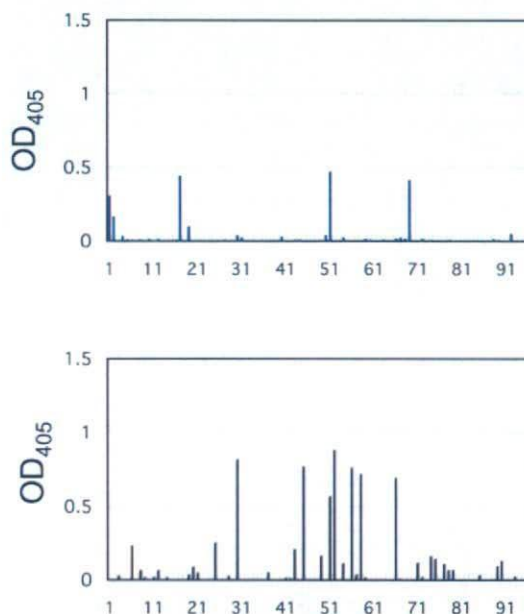


図5. scFv-ELISA の結果
値はキャリアタンパク質への認識力を差し引いた結果であり、BPA 構造の特異的な認識力を示す。
上図がトリプシン消化による回収、下図が BPA 競合法による回収での結果。

D. 考察

核内受容体におけるセンシング抗体法のための scFv 作製方法として、前年度（平成 19 年度）までに、①バイオパンニングにおける抗原ペプチドの固定化方法の最適化、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、④scFv-ELISA により機能的な scFv がきわめて高確率で得られることなどを明らかにし、技術的な基盤を築いてきた。実際に GR、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、PPAR γ 、FXR、RAR α 、RAR γ について scFv を取得することに成功した。こうしたスキームの構築において、特に、scFv-ELISA 法の考案・確立の功績は大きく、同時に多数の機能性 scFv を得ることができるようになった。また、本研究で使用している Tomlinson I および J ライブラリーからの scFv の取得が難しいと判断された ER α についても、既に動物免疫法によるモノクローナル抗体の作製に成功しており、ファージディスプレイ法でカバーできない特殊な場合についてのみ、動物免疫法で個別に対応が可能であると判断した。以上を持って、ファージディスプレイを利用した scFv 取得の技術基盤は、ほぼ完成したと言える。今後は、ポリクローナル抗体によるセンシング抗体法での化合物スクリーニングの結果を踏まえ、より高感度なセンシング抗体が必要である場合やアンタゴニスト構造を特異的に検出する抗体が必要な場合など、テーラーメイドな抗体作製が必要とされる場合に本技術を応用していく予定である。

平成 19 年度に行った BPA 認識抗体の作製においては、リンカーを介してジフェノール酸とキャリアタンパク質を結合させた。しかしながら、この方法では BPA 構造を認識する scFv が得られたものの、リンカー部分まで認識する抗体が多く得られた。原因として、BPA 構造がペプチドと比較してきわめて小さな分子であることが考えられる。センシング抗体を作製する際の抗原は、約 20 アミノ酸から成るペプチドであり、リンカーを介してキャリアタンパク質に結合させることで、ペプチドの立体構造を保持した状態で抗原を作製することができる。一方、BPA の場合、低分子化合物であるため、リンカーの構造が BPA とほぼ同等の大きさに相当する。そのため、BPA のみを特異的に認識する抗体が得られにくいと考えられる。このような、リンカ

一構造まで認識する抗体は、ERR γ の生体内リガンドを探索・単離することを目的としたツールとしては望ましくない性質であり、使用することはできない。そこで、ジフェノール酸を直接キャリアタンパク質に固定化する方法で抗原を作製し、改めて抗体作製を行った。また、昨年度の抗 BPA 抗体の作製と同様に、バイオパンニングの後のファージ回収方法として、トリプシン消化法と BPA 競合法について比較検討しながら作製を行った。その結果、リンカーをなくしたことで、BPA 構造に対する特異性が改善され、また、BPA 競合法によるファージの回収を行うことで、より高い確立で BPA 認識抗体が得られた。また、こうした実験においても scFv-ELISA 法の貢献度は高く、今回得られたクローンについても機能的な scFv として大量生産が可能であることが期待される。

今後は、本年度に作製した抗 BPA 抗体のクローンの中から、よりリガンド探索に適している scFv クローンを選択し、scFv の大量生産を行う予定である。また、受容体結合試験やポリクローナル抗体によるセンシングアッセイによって化学物質スクリーニングのデータが多く得られている PPAR γ や RAR α などについては、ファージディスプレイによる scFv を用いた解析による相関性の確認およびアンタゴニスト結合型構造を特異的に検出できる scFv の作製などに着手する予定である。

E. 結論

scFv-ELISA 法の確立により、ファージディスプレイによる抗体作製のスキームとしては完成に近いものとなった。今後は、各種受容体における化学物質応答の解析過程において必要となる抗体（より高感度な抗体やアンタゴニスト結合型の受容体構造を特異的に認識する抗体など）をテーラーメイドに作製する。

抗 BPA 抗体の作製については、使用する抗原とバイオパンニングにおけるファージ回収法の改良により BPA を特異的に認識する抗体の取得に成功した。これにおいても scFv-ELISA 法により、機能的な scFv を発現することができるクローンが選別されており、今後、大量生産を予定している。得られた抗 BPA 抗体は、免疫染色および内因性の類似化学物質（ERR γ の内因性リガンドであることが期待される）の探索等に利用する見込

みであり、今後の研究展開の有効なツールと
なることが期待される。

F. 健康危険情報

該当する情報は無い。

G. 研究発表

研究発表を行うまでの成果は現在のところ
得られていない。

G. 知的所有権の取得状況

知的所有権を取得するまでの成果は現在の
ところ得られていない。

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

ショウジョウバエの生殖機能、行動、遺伝子発現における
多世代化学物質応答解析

研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部 講師

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体・エストロゲン関連受容体 (*Drosophila* estrogen-related receptor: dERR) が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズム(サーカディアンリズム)に関与する核内受容体様タンパク質・転写因子も、ヒトとショウジョウバエの両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。本研究は、ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「生殖機能」や「行動」、あるいは「遺伝子発現」を指標として用いた *in vivo* 多世代解析法として確立し、化学物質の生体へのリスク評価の解析に応用することを目指している。本研究では、これまでの多世代繁殖試験系を改良して、ビスフェノールA含有培地で継代飼育してきたショウジョウバエオス、メスへの生殖能と歩行活動へのビスフェノールAの影響について調べた。その結果、ビスフェノールAに多世代暴露されることにより、オスでは交尾能の成熟が早くなること、メスでは卵産生のピークが遅くなること、また、歩行活動リズムのピークが低く活動性が分散し、多動性様活動の個体、活動量が非常に低い低活動量の個体の出現頻度が高くなることが分かった。

A. 研究目的

環境ホルモン、内分泌かく乱物質としての環境化学物質の危険性(リスク)は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ここ数年、ヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般(ヒトの場合は48種類)の問題として拡張して考えるようになった。また、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧されるようになってきたのを受け、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性の解析が緊要の課題と考えられるようになった。内分泌かく乱物質リスク評価においては、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。さらに、継代的な評価も不可欠な要素である。これらの観点から、継代が短期間で起こり、遺伝子研究が容易なショウジョウバエが実験動物として有力であることから、ショウジョウバエを用いた試験系の構築への期待が大き

くなった。

本研究課題は、特に *in vivo* 生体系での内分泌かく乱作用の影響を評価する実際的な試験系において、申請代表者らが確立した女性ホルモン・エストロゲン受容体等の核内受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体法におけるホルモン活性に対応する最大抗体応答性 R_{max} (%) について、生物活性の指標算定を目的とするものである。

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るが、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という実験動物としての利便性も兼ね備えている。これまでに、雌の産卵数および成虫の羽化数を計数するのみで、生物体への直接的な生殖影響を雌雄独立に観察・評価できる貴重な実験系を構築している。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り、「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系としての緊急な課題に対応するものである。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、これまでにない新規な手法を提供する。そして、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さらに改良し、ビスフェノール A 含有培地で継代飼育したショウジョウバエを用いて、生殖機能および行動へのビスフェノール A の影響を調べた。

B. 研究方法

① ショウジョウバエの系統と飼育培地

これまでの研究で、産卵数が安定していることがわかっている *Canton S* を研究材料として用いた。飼育培地はこれまでと同様に作製した。水 10 に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 3 cm の管瓶あるいは 9.2 cm のシャーレに入れて冷蔵保存したのち、使用した。ビスフェノール A 含有の培地は、ビスフェノール A の最終濃度が 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mol/l になるように調整した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

② 生殖能への多世代暴露の影響

化学物質を含む飼育培地で多世代にわたり飼育されたオス、あるいはメスを、通常培地で飼育されたメスあるいはオスと交配して、オスの場合は次世代の個体数、メスの場合は産卵数を調べた。成虫時に受ける影響を排除するために実際のテストには通常培地を使用した。

オスの生殖能を反映するためには、メスの個体数を過剰に与え、さらにメスが未受精卵を産卵する可能性が高いため、羽化個体をカウントする必要がある。これまでの研究で、オスの約 10 倍の数のメスを交配させるとオスの生殖能を反映した個体数の次世代が生育することがわかっている (図 1)。試験管の限られたスペースでも次世代の個体が過剰にならず、再現性のある結果を得るために、また、オス個体の特性を評価するために、ビスフェノール A 含有培地で飼育された 13 代目のオス 1 匹に対して通常培地で飼育されたメス 10 匹 (いずれも羽化直後のもの) を試験管培地で交配させ、24 時間毎に新しい試験管培地に移して、その培地から羽化する個体数をオスの次世代繁殖数とした。次世代繁殖数がピークになる羽化後の経過日数をオス個体の交配能の成熟期間、羽化後 8 日目までの次世代繁殖数の合計を生殖能として評価した。

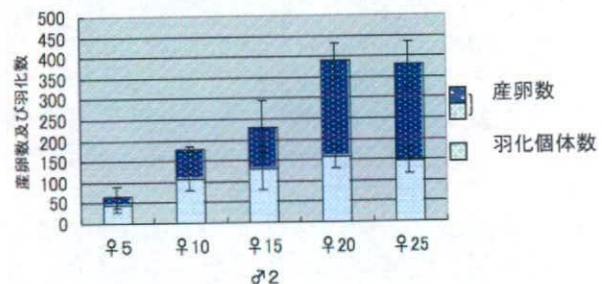


Fig. 1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* *Canton S* 雌雄比による羽化個体数の変異

メスの生殖能を反映するためには、メス個体数と同数のオス個体を交配すれば良い事がすでにわかっている。ビスフェノール A 含有培地で飼育された 8 代目のメス 5 匹 (羽化直後のもの) と通常培地で飼育されたオス 5 匹をシャーレ培地にいれ、24 時間ごとに新しいシャーレ培地に移し、産卵した卵を数え、メスの産卵能とした。

③歩行活動の記録

羽化後 1~3 日目のオスのハエを LD12:12 で 3 日間歩行活動を記録した後、光周期に同調できるかを見るため、LD の時刻を 6 時間前進させた。その後、恒常暗黒中で 8 日間以上記録し、恒常暗黒中で自由継続させた活動の周期を計算した。

④時計タンパク質の発現量の解析

LD 条件下で飼育すると時計タンパク質 PERIOD は light on の 1 時間前に発現量のピークを迎えることがわかっているので、この時刻に羽化後 5 日目のショウジョウバエを液体窒素で瞬間冷凍固定し、100 匹分の頭部を採取した。吸光度測定によりタンパク質量を概算し、等量のタンパク質を含む容量を計算した。ショウジョウバエ PERIOD の N 端側の 19 アミノ酸残基のペプチドに対するポリクローナル抗体 (Santa Cruz Bio) を使ってウェスタンブロッティング法により時計タンパク質 PERIOD を検出した。

C. 研究結果

①多世代暴露によるオス個体とメス個体の生殖能発達に及ぼす影響

BPA 10^{-5} mol 含有培地で継代飼育された 13 代目のオスの次世代繁殖数は羽化後 2 日目にピークが訪れることが判明した。通常のアエと比較すると、ピークに到達するのが 1 日早く、したがって、交尾能の成熟が早くなったと考えられた (Fig. 2)。

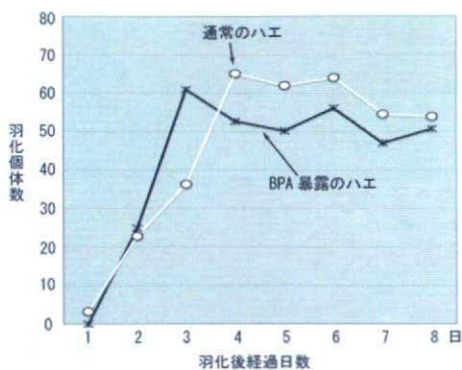


Fig. 2 BPA 暴露 13 代目オスの次世代繁殖数 (n=10)

メスの 24 時間毎の産卵数を見ると、通常のアエでは産卵数のピークが羽化後 2 日目であるのに対して、BPA 含有培地で継代飼育された 8 代目のアエでは、1 日遅い 3 日目にピークが訪れた。BPA に多世代にわたって暴露されることにより、メスでは卵発達がおくれ

る事が考えられた (Fig. 3)。

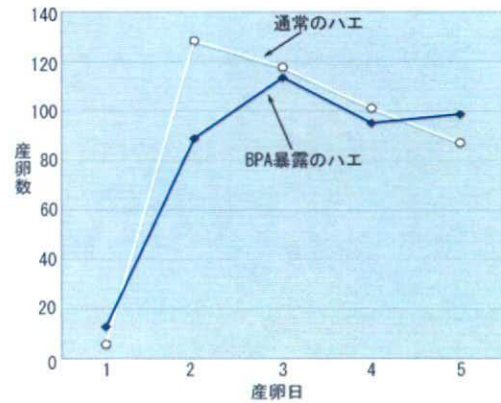


Fig. 3 BPA 暴露 8 代目メスの産卵数 (n=10)

②継代飼育による BPA 暴露オス個体の次世代繁殖数の変遷と次世代個体の性比

図 4 に BPA 10^{-5} mol 含有培地で継代飼育されたオス個体の次世代繁殖数の変遷を示した。

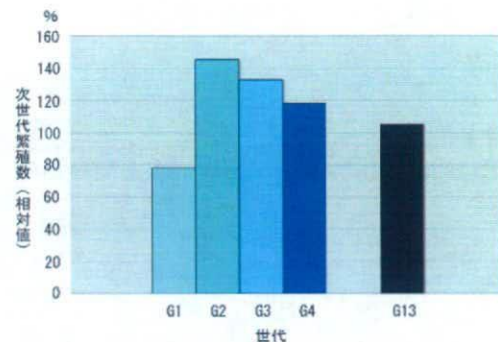


Fig. 4 BPA 多世代暴露によるオスの次世代繁殖数変遷

昨年までの研究で、BPA 含有培地で継代飼育されたオス個体の次世代繁殖数は、1 代目で減少するものの、2 世代目で急激な上昇が見られ、その後は、世代を追う毎に次第に減少する傾向にあった。本年度、さらに継代を進めた 13 代目では、通常のアエに近い値まで減少した。さらに継代がすすむと、通常のアエより低い値になるのか、あるいは、有意の差がない値で安定するのか今のところ不明である。

継代飼育されたオス個体の次世代個体の性比 (図 5) を見ると、次世代個体数が減少した 1 代目ではメスの割合が多く、4 代目までは、通常のアエと差がない値で推移した。しかし、13 代目では、オスの割合が約 5% 減少

した。この減少が有意であるのかを現在検討中である。

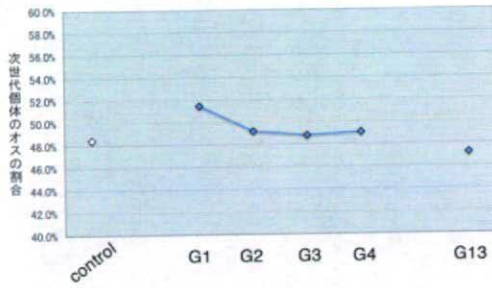


Fig. 5 BPA 多世代暴露による次世代個体の性比

③多世代暴露による歩行活動パターンの変化

BPA 10^{-5} mol 含有の飼育培地で継代飼育された個体では、自由継続歩行活動に異常が見られる個体の割合が増加した。通常のアエでは、恒常暗黒中の歩行活動の活動頻度に明確な二峰性のピークが見られ、その後に低活動期が続く。しかし、図6に示したように、活動周期(Fig. 6B)は計算できるもののピーク時の活動性が低く、低活動期には活動性が高い活動分散型の個体が通常の約4倍の割合で現れた。

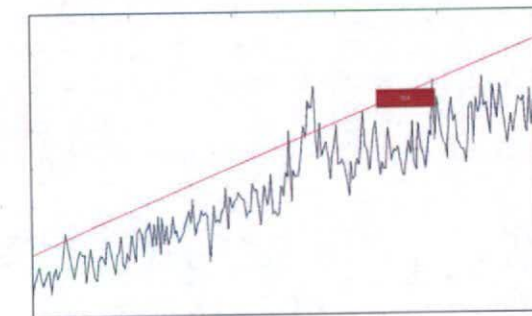
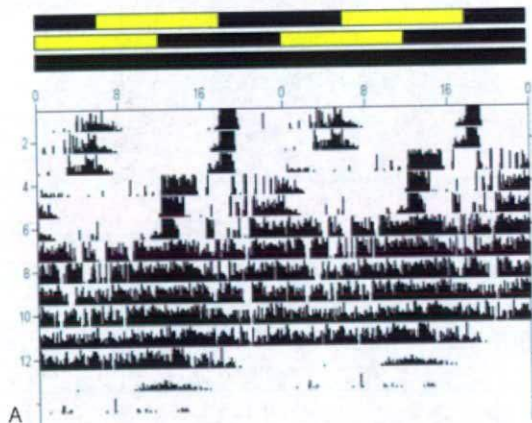


Fig. 6 BPA 多世代暴露による行動変異 (A) とピリオドグラム (B)

一方、BPA 10^{-4} mol 含有の飼育培地で継代飼育された個体群では、活動分散型の個体は少ないものの、活動レベルが非常に少ない個体の割合が約15%に増加した。これは通常のアエの個体群と比較すると約30倍の高頻度であった。

④多世代暴露による時計タンパク質発現に及ぼす影響

図6で示したように、BPA含有培地で継代飼育された個体群で、歩行活動パターンに変異が見られたので、これらの原因を探るために、時計タンパク質 PERIOD の発現を調べ、通常アエと比較した。

ショウジョウバエ PERIOD の N 端側ペプチドに対する抗体でのウェスタンブロッティング解析により、約20KDaの通常型 PERIOD (A および B 型) と約13KDaのスプライシングアイソフォーム C 型が検出された。多世代暴露のアエの脳通常型および C 型 PERIOD の発現量は図7に示す通りである。

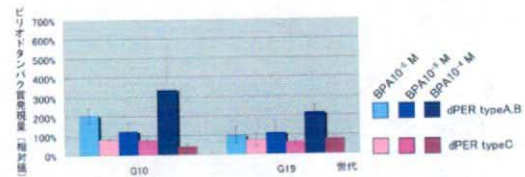


Fig. 7 BPA 多世代暴露によるピリオドタンパク質の発現変動

多世代暴露10代目と13代目のオスの脳では、通常型 PERIOD (A および B 型) は増加し、アイソフォーム C 型は減少する傾向であった。ビスフェノール A の含有濃度が高いほど、変動が大きかった。このことから、BPA 暴露によりスプライシング機構に影響を与えることが推測された。

D. 考察

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 がショウジョウバエオスの交尾能の発達、および生殖能に及ぼす影響を、さらに世代を進めて観察することができた。また、メスの産卵能の発達、および産卵能及ぼす影響も世代をすすめて観察することができた。BPA 暴露が世代を越えて続けると、オスの交尾能の発達は早く、メスの産卵能の発達はおそくなることが判明した。また、多世代にわたって、暴露し続ける事で、次世代総繁殖数が次第に減少すること、また、羽化後の交尾能の発達が早くなることから、生殖腺における精原細胞の通常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た。次世代個体の性比にはおおきな変動は見られなかった。メスでは、産卵数のピークが後退したことから、BPA 暴露により卵成熟が抑制されることが推測された。

これらの結果から、ビスフェノール A に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性により異なること、また複数の側面で影響を受けること、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

本研究により、BPA 含有培地で継代飼育されたショウジョウバエの交尾能、あるいは産卵能の発達に変異が見られた。多世代にわたってビスフェノール A を摂取あるいは体表に暴露されると、次世代個体数の減少がさらにすすむ傾向があった。また、歩行活動にも変異が観察され、時計タンパク質発現に関するスプライシング機構、また、内因性生物時計に制御される活動レベル調節機構にも影響を及ぼす可能性が推測された。

F. 研究発表

論文発表

1. Bisphenol A-specific nuclear receptor ERR γ : Structure-function analysis of the two novel isoforms lacking vital peptide fragment in the ligand binding domain. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2008*, 517-518 (2009).

2. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR γ among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR γ isoform. Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Journal of Biochemistry*, in press (2009).

学会発表

1. Yukimasa Takeda, Xiaohui Liu, Miho Sumiyoshi, Ayami Matsushima, Miki

Shimohigashi, and Yasuyuki Shimohigashi. Diversity of bisphenol A-specific nuclear receptor ERR γ due to the alternative pre-mRNA splicings. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.

2. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール A 特異的核内受容体 ERR γ : リガンド結合ドメインにペプチドフラグメントを欠失した 2 種類の新規アイソフォームの構造機能解析、第 45 回ペプチド討論会、2008. 10. 29-31。

3. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール A 受容体 ERR γ のリガンド結合ドメイン一部欠損型アイソフォームの詳細なヒト組織分布と新規分子機構、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. 下東美樹、堤 俊博、劉 曉輝、松島綾美、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、エストロゲン関連受容体に結合するビスフェノール A 食餌によるショウジョウバエ *in vivo* 継代試験、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。

5. 武田行正、劉 曉輝、住吉美保、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール A 受容体 ERR γ のリガンド結合ドメイン欠如型の組織分布と新規分子機構、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

6. 下東美樹、府本 優、伊藤太一、劉 曉輝、松島綾美、谷村禎一、Ian A. Meinertzhagen、中川裕之、松本 顕、下東康幸、環境ホルモン・ビスフェノール A 暴露によるショウジョウバエの行動リズム変異、環境ホルモン学会 第 11 回研究発表会、2008. 12. 13-14。

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録する内容の成果は、現在のところ特に得られていない。

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誘導体の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、2006年に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。一方で、工業原料として用いられる化学物質には、BPA類似物質が複数ある。そこで、本研究では、BPA類似物質とERR γ の結合の分子メカニズムに焦点をあて、BPA類似物質と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。今年度は、ビスフェノールZ（BPZ）とERR γ -LBDの結合体の結晶化を行った。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類似物質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と同様に、BPZ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、BPZ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と、BPZのシクロヘキシル環が反発し、BPAの場合と比較して、ERR γ -LBDのリガンド結合部位のLeuが回転していることが判明した。このように、BPZとERR γ の結合体のX線結晶構造解析により、BPZとERR γ の間には複数の相互作用があり、BPZのERR γ に対する強い結合が形成され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、分子量228.29の比較的小さな化学物質である。これは、HO-C₆H₄-C(CH₃)₂-C₆H₄-OHの対称な構造をしており、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。

国際的には、カナダ政府が世界に先駆けてBPAの規制に乗り出しており、2008年10月17日付の発表で、「the Government of Canada announced it will immediately proceed with drafting regulations to prohibit the importation, sale and advertising of polycarbonate baby bottles that contain bisphenol A (BPA). The Government will also take action to limit the amount of bisphenol A that is being released into the environment. (カナダ政府は、BPAを含有するホ乳瓶の輸入や販売、広告の規制案を速やかに進める予定である。政府はまた、環境中に放出されるBPAの量を規制するための行動を起こすだろう。)」と紹介されている。

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ェン (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。

さらに、BPAとERR γ -LBDのX線結晶構造解析により、このインバースアンタゴニストの分子メカニズムは、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し、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した。

BPA類似体も「特殊ビスフェノール」として工業的に利用されている。日本の公開特許公報には、こうした特殊ビスフェノールの用途が様々に述べられており、ビスフェノールZ、ビスフェノールC (BPC)、ビスフェノールE、ビスフェノールMなどが用いられている。従って、将来的に、こうしたビスフェノール類の利用が増大する可能性がある。そこで今回、特殊ビスフェノールの一つであるビスフェノールZとERR γ の結合体のX線結晶構造解析を行い、BPA同様に結合するののかについて検討した。

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 樹脂に 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 BPC 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 線回折データ収集およびプロセッシング

結晶の X 線による回折データは、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 BPC 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。

(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) BPC 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、最終的に分解能 1.7 Å の良好な構造が得られた (表 1, 図 1.)。

Table 1. Data collection and refinement statistics for X-ray crystal analysis of the estrogen-related receptor γ (ERR γ) ligand binding domain (LBD) and complex with bisphenol Z.

Data set	
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell parameters	a = 63.84 Å b = 63.84 Å c = 135.89 Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Data collection	SPring-8 BL38B1
Beam line	
Wavelength (Å)	1.0
Resolution Range (Å)	31.93-1.70
Number of reflections	
Observed	446410
Unique	31815
R_{sym} ^{a,b}	0.071 (0.487)
I/ σ (I) ^c	64.72 (4.8)
Completeness (%)	99.8
Refinement statistics	
Resolution Range (Å)	31.93-1.70
Number of reflections	
Working set	30224
Test set	1591
Completeness (%)	99.8
R_{work} ^d (%)	19.9
R_{free} ^e (%)	23.3
Average B-factor (Å ²)	
Protein	25.7
BFZ	27.7
Glycerol	54.6
Water	35.2
Number of atoms	2153
Protein	1965
BPA	20
Glycerol	12
Water	156

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

表 1. 結晶構造データ

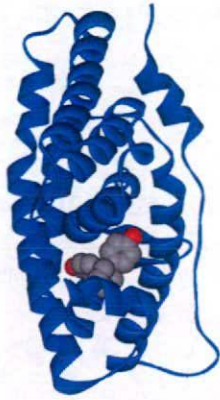


図1. BPZとERR γ の複合体構造

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の活性型構造および我々が既に報告しているBPA/ERR γ -LBD複合体の構造とスーパーインポーズすることにより、BPZ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。また、BPZがERR γ -LBDに非常に強く結合する要因は、BPAの場合と同様に、BPZ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、BPZと強固に結合していることが判明した。

BPA/ERR γ -LBD複合体の構造では、リガンド無しのアポ体と比較すると、Leu345が回転してBPAと誘導適合する。これまでに報告されているERR γ の構造、全15種類のなかで、BPA/ERR γ -LBD複合体と同じLeu345の配向を取るものは、BPAと結合しているものも含め

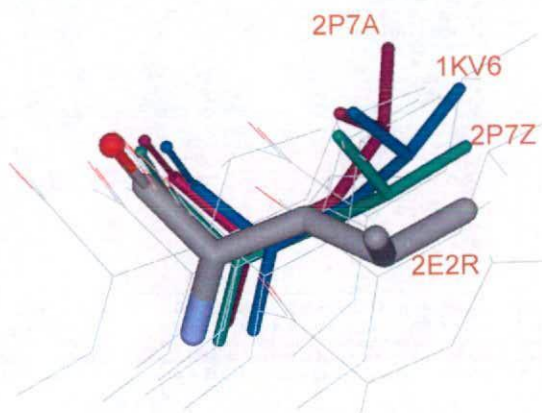


図2. BPAとの複合体を同じLeu345の配向をとる結晶構造

て4種のみであり、BPAとの複合体を除くとわずか2種である。これらのうち、一つはリ

ガンドなしのアポ体、もう一つはBPAと非常に構造が類似した4-chloro-3-methyl phenolである(図2.)。なお、リガンド無しのアポ体は、これまでに4種の構造が報告されており、1種がBPA/ERR γ -LBD複合体と同じ配向をとる。つまり、Leu345は、配向の自由度が高いアミノ酸残基であり、これがリガンドを適切に受容している。したがって、BPA類似の化合物を受容する場合には、Leu345がBPAの場合と同様の配向をとると期待された。しかし、BPZはBPAときわめて類似した構造を持つにも関わらず、Leu345の配向がBPA複合体の場合と異なる。これは、BPZに存在するシクロヘキシル基が、近隣に存在するPhe435とPhe450と反発するために、BPZが押される形となる。そのためLeu345がアポ体のまま、すなわち、リガンド結合部位の方向を向いたままBPZを安定に受容できると考えられる。

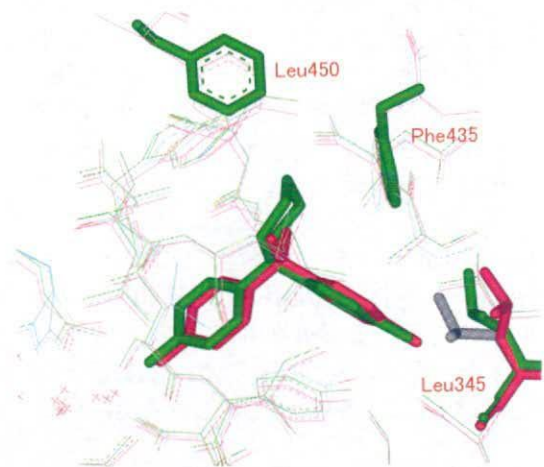


図3. BPZとERR γ の複合体、BPAとERR γ の複合体、さらにリガンド無しのERR γ の活性型構造の重ね合わせ
灰色がリガンド無しのERR γ 活性型構造、緑がBPZとERR γ の複合体構造、マゼンタがBPAとERR γ の複合体構造である。

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。BPZ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BPZ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BPZをしっかりと保持している。また、BPAとBPZの違いは、2つのフェノール骨格を結ぶ炭素原子に、2つのメチル基がつくか、その部分がシクロヘキシル基かである。このように、この炭素原子近傍のわずかな空間に適合できる様々なBPA類似化合物が結合できる。しかし、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-C₆H₄-C(CF₃)₂-C₆H₄-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CF₃基は、CH₃基のように近傍のPhe435とはかなり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。

E. 結論

BPZとERR γ -LBD複合体のX線結晶構造解析に成功した。得られた結晶は分解能1.7Åの良好な結晶であった。構造解析の結果、我々がこれまでに報告したBPA/ERR γ -LBD複合体の場合と同様に、リガンド結合部位にすっぽりと取り込まれており、ERR γ の活性型構造を保持していた。BPA/ERR γ -LBD複合体とBPZ/ERR γ -LBD複合体を詳細に比較すると、受容体のLeu345の配向が異なっており、これは、BPZに存在するシクロヘキシル基が、受容体のPhe435およびPhe450と反発することにより、BPZが押されるためであった。

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. 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).

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. Structural flexibility of human nuclear receptor ERR to adopt endocrine disruptor bisphenol A and its derivatives. Ayami Matsushima, Hiroyuki Okada, Xiaohui Liu, Takatoshi Tokunaga, Takamasa Teramoto, Yoshimitsu Kakuta, and Yasuyuki Shimohigashi. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), 2008.8.26-29.

3. 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合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。

4. 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。

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。

6. Endocrine disruptor bisphenol A as an inverse antagonist of estrogen-related receptor γ , Ayami Matsushima, The 4th International Workshop on Future Molecular Systems 2008, 2008.12.13.

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

ドッキング計算を用いたリガンド結合性解析

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

一般に天然リガンドや内分泌攪乱物質は、核内受容体のリガンド結合部位と結合して様々な作用を引き起こす。この、化学物質と核内受容体のリガンド結合部位との間で起こる化学結合の形成が、正常なホルモン活性や内分泌攪乱作用の最初期のイベントである。従来の *in vitro* 試験法や *in vivo* 試験法により、これまでに多くの化学物質の受容体結合性に関する試験結果が報告され、それらの有効性は広く認められている。しかし、アッセイ系の構築などに手間が掛かるなど、それらの試験系は簡便、迅速とは言いがたい。そこで、近年発展の著しい計算化学的手法を用いた、ドッキング計算手法に基づくリガンドの受容体結合性をスクリーニングする手法の開発に着手した。

エストロゲン受容体関連受容体 γ 型は、ビスフェノールAの受容体として注目されている。そこで本研究では、このエストロゲン受容体関連受容体 γ 型とビスフェノールAが結合した複合体構造が正確に予想されるかについて、ドッキング計算を用いて精査した。その結果、X線結晶構造解析の結果に高く一致を示す複合体が計算により得られ、ドッキング計算の有用性が示された。

A. 研究目的

一般に生体内に存在するホルモンなどのリガンドや外来の内分泌攪乱物質は、核内受容体のリガンド結合部位（LBD）と結合して様々な作用を引き起こす。このリガンドとLBDとの間で起こる化学結合の形成が、正常なホルモン活性や内分泌攪乱作用の最初期のイベントである。これまでに多くの化学物質の受容体結合性を解析する試験法が開発されてきた。それらは、*in vitro*の試験法である結合競争試験やレポーター遺伝子試験や実験動物を用いた *in vivo* 試験であり、これまでに多くの試験結果が報告され、それらの有効性は広く認められている。ところで、核内受容体には、女性ホルモン受容体、男性ホルモン受容体などの性ホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体が含まれている。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48種類の核内受容体が存在することが判明した。そこで、これらすべての核内受容体に対する環境化学物質の影響が懸念され、それらの影響を迅速に検討する必要性が生じた。

すべての化学物質の受容体結合性をタンパク質や細胞を用いた試験系、実験動物を用いた試験系で調査するには、膨大な手間がかかり、特に実験動物の使用は、近年代替法を用いるべきとして困難になってきている。そこで、パーチャルスペースにおいて計算化学的手法によりリガンドと受容体の結合性を予測する方法が構築されれば、近年のコンピュータの高速化と相まって、迅速な化学物質のリスクのスクリーニング法が構築されることが考えられた。

一般に、内分泌かく乱作用は、核内受容体の特異的なリガンド・ホルモンの結合に関与する領域・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）このLBDは12個の α -ヘリックスからなっている。一般的なホルモン受容体は、リガンドがLBDに結合するとLBDのC末端に存在する第12番目の α -ヘリックスが構造と位置取りを変化させる。この構造変化が次なる情報伝達を引き起こす。

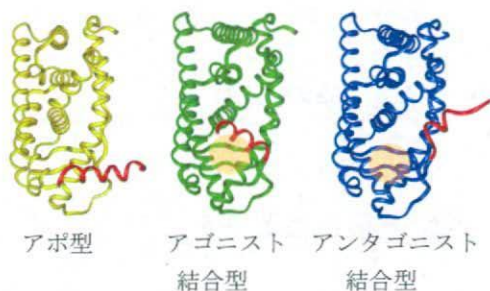


図1 核内受容体リガンド結合ドメインにおけるリガンド結合

赤で示す部分が第12 α ヘリックス。リガンド結合に伴い、第12 α ヘリックスは位置と構造を変化させる。

本研究では、LBDにリガンドが安定に結合できるかを予測する事がドッキング計算により可能であるか検討することを目的とし、まずは、リガンド-LBD複合体構造の構造を正しく予測できるかをビスフェノールA・女性ホルモン受容体 γ 型複合体を題材として検討した(図2)。

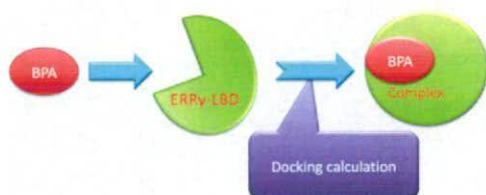


図2 ドッキング計算を用いた核内受容体リガンド結合ドメイン・リガンド複合体の予測

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、エストロゲン関連受容体ERR γ -LBDのアポ型(リガンド未結合の構造)、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 もしくは Discovery Studio (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 水素原子の付加および構造最適化

PDBから入手したLBDの3次元構造データには水素に関する情報が無いため、Discovery studioを用いて水素原子を付加した後、分子力学計算モジュールCHRAMmにより構造最適化計算を行なった。

④ ドッキング計算

BPAとERR γ -LBDのドッキング計算は、フレキシブルドッキング計算モジュールAffinityにより行なった。計算の初期構造依存性を回避する目的で、3通りの初期構造から計算を開始した。

⑤ エネルギー計算

ドッキング計算後の複合体構造について、フラグメント分子軌道法(FMO法)計算プログラムABINIT-MPを用いて、リガンド-LBD間の分子間相互作用エネルギーを計算した。

(倫理面への配慮)

本研究は、すべてをコンピューター上のバーチャル空間で実施するため、倫理上の問題は生じていない。

C. 研究結果

エストロゲン関連受容体 γ 型(ERR γ)は、いわゆる構成活性受容体で、リガンド無しで活性化コンホメーションを取る。近年、ERR γ に内分泌攪乱作用が懸念されているポリカーボネートプラスチックの原料の一つ、ビスフェノールA(BPA)が高い親和性で結合することが報告された。このような、新規に化学物質が大きなリスクを伴い出現したことは、迅速な化学物質のリスクスクリーニング法の開発を強く促すものである。また、今日では合成されていないが、近未来に出現が想定される、もしくは、未解明の代謝物などにより引き起こされる内分泌攪乱作用を精査するためには、実際には物質を必要としないコンピューター上でのスクリーニング法は、非常に有効であると考えられる。

本研究においては、そのようなコンピューターを用いたスクリーニング法を構築することを最終的な目的として、本年度において

は、ERR γ に対するBPAの結合状態を正確に計算化学的手法により予測できるかどうかの確認を行なった。

ドッキング計算においては、まず、受容体の立体構造情報が必要となる。ERR γ においては、既に複数の立体構造情報がPDBに登録されている。それらの中から、アポ型(1TFC)、ホロ型として、分子の小さなジエチルスチルベストロール(DES)結合型(1S9P)、分子の大きな4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)結合型(1S9Q)の3つの構造について、どの構造をドッキング計算に用いる事が最適であるかの検討を行なった。図3に3つの立体構造を示す。

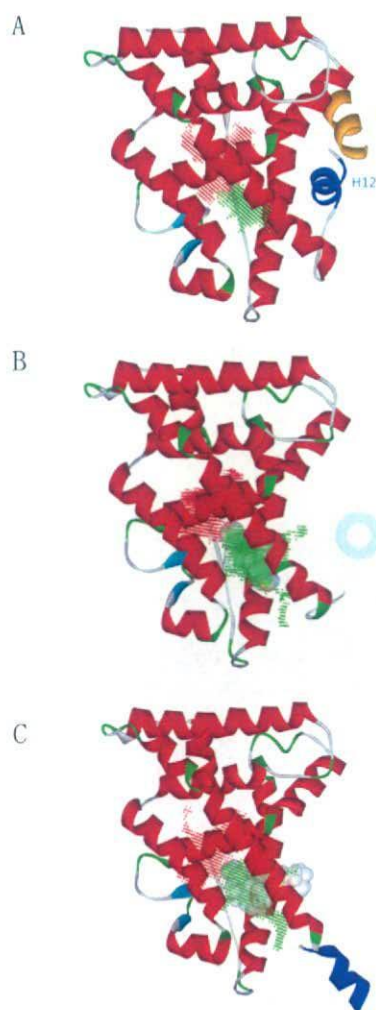


図3 ERR γ LBDの立体構造

A: 1TFC (PDB)、アポ型(リガンド未結合): 活性化コンホメーション、B: 1S9P、ホロ型(DES結合): 活性化構造に重要な第12 α ヘリックスが未同定、C: 1S9Q、ホロ型(4-OHT結合): 第12 α ヘリックスの位置が活性化コンホメーションと大きく異なる。

リガンド未結合のアポ型を図3-Aに示す。青色で示すヘリックス構造は第12 α -ヘリックスで、活性化コンホメーションの形成に重要である。このヘリックスが、図3-Aの位置に存在する事が、ERR γ の活性化には必要である。一方、図3-Bと-Cに示すホロ型は、どちらもアンタゴニスト結合型の不活性化構造である。この不活性化は、結合したDESおよび4-OHTの分子構造、特に大きな分子サイズのため、第12 α ヘリックスが活性化コンホメーションの位置に存在できないことにより生じる。

一方、これまでの研究から、BPAはERR γ の活性化能にはほとんど影響しない事が知られている。すなわち、BPAはアンタゴニストではない。また、*ab initio*分子軌道法を用いた分子体積計算によると、BPAの分子サイズは約295Å³と4-OHTの562Å³に加えて小さく、また、A~CのLBDにおけるリガンド結合ポケット(図3: 緑と赤のドットで表示)の空間体積はおよそ293~560Å³とすべてがBPAを収納可能と判断された。よって、これらから、図3-Aに示す、アポ型の構造がドッキング計算に最適であると判断された。

ERR γ -LBDとBPAのドッキング計算は、異なる3種類の初期構造から開始した。これは、図3-Cにおける4-OHTの3つの芳香環の位置のうち、2ヶ所をBPAの2つの芳香環で占めるように、計算開始時にBPAをERR γ のリガンド結合ポケットに置いたものである。それぞれの初期構造を用いてAffinityにより計算された、3つの計算結果(最も良い結合スコアを与えた構造)を図4に示す。

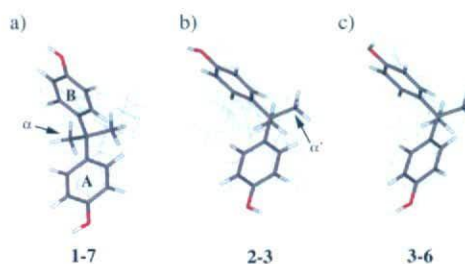


図4 ドッキング計算により予測されたBPAのERR γ LBDとの結合構造

A~Cはそれぞれ異なる初期構造から出発した計算結果を示す。

得られた、3つのBPA-ERR γ 複合体の構造は互いによく似ていたが、BPAの2つのメチル基の配向が異なっていた。これらの3つの

構造のどれが最安定であるかを判定するため、分子軌道法を用いた分子間相互作用エネルギーの計算を実施した。

その結果、図4の2-3で示す構造が最安定であることが判明した(表1)。また、計算手法に電子相関の影響を折り込む事が可能なMP2法を用いる事により、正確な分子間相互作用のエネルギーが求められることが判明した。これは、BPAの2つのメチル基が弱い分子間相互作用であるCH/ π 相互作用を形成していることを説明した。この2-3が示す分子間相互作用のエネルギーは既知の結合性を示す化学物質DESや4-OHTに匹敵した。この結果は、BPAがERR γ に結合性を示すことを計算化学的に説明可能であることを示している。

表1. BPAのERR γ への結合エネルギー

複合体	結合エネルギー (rHF)	結合エネルギー (MP2)
1-7(BPA)	4.75	-46.4
2-3(BPA)	4.03	-46.5
3-6(BPA)	18.5	-37.3
1S9Q(4-OHT)	37.5	-42.4
1S9P(DES)	6.65	-59.7

rHF: Hartree-Fock法、MP2: 2次摂動論

一方、本研究における研究分担者の松島らによって同定されたBPA/ERR γ -LBD複合体の構造(2e2r:PDB)と計算結果を比較したところ(図5)、お互いのBPAの結合構造および結合位置はよく一致しており、計算的に複合体構造を得る事が可能である事が判明した。

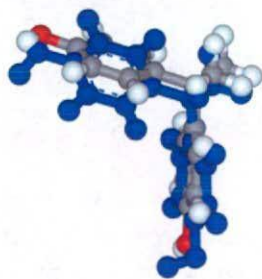


図5 ドッキング計算により予測されたBPAのERR γ LBDとの結合構造とX線結晶構造解析結果の比較

青で示す構造は、PDB:2e2rを示す。

D. 考察

本研究では、ドッキング計算を用いて化学物質・BPAとERR γ -LBDの複合体構造を予測可能か、また、得られた複合体構造は、化学物質と受容体の分子間相互作用エネルギーを適切に与えるかについてを調べた。その結果、計算されたBPA/ERR γ -LBDの構造は、実験的にX線結晶構造解析により決定された構造とよく似ており、BPAの生理活性を説明することができた。また、分子軌道法により得られた分子間相互作用エネルギーは、既知のERR γ 結合性化合物に極めて近い値を示し、BPAのERR γ -LBDへの結合活性を合理的に説明可能であった。今後は、ドッキング計算を用いた化学物質の受容体結合活性のスクリーニングが一般的に可能となるか、他の受容体を用いて検討する予定である。

E. 結論

今年度の本研究では、エストロゲン受容体関連受容体 γ 型とビスフェノールAが結合した複合体構造が正確に予想されるかについて、ドッキング計算を用いて精査した。その結果、X線結晶構造解析の結果と高く一致を示す複合体が計算的に得られ、ドッキング計算の有用性が示された。

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 Letter*, 15, 290-296, (2008).

学会発表

1. 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。

2. 野瀬 健、錦織充広、下東康幸、複数の鋳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。

3. 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。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。