

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

一般に、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。このリガンド結合部位は、核内受容体に特異的なホルモン等のリガンドが選択的に結合する部位であり、それらの立体構造は、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、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違が見られる。我々は、受容体リガンド結合部位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かった、1種の核内受容体GCNF-1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

本研究において研究対象としている核内受容体は、生体内において生理活性を持つホルモンや化学物質などの様々なリガンドと特異的に結合することにより、多様な生理作用を引き起こす。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。一方、現在のところ、それらの核内受容体すべてに対する特異的リガンドは判明しておらず、いわゆるリガンド未知の孤児（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、それらほぼすべての核内受容体において、性ホルモン受容体に代表される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。

このような類似のリガンド結合に引き続く受容体活性化機構の存在は、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、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させた。このため、本研究においては48種類の核内受容体すべてを研究対象としている。

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。アミノ酸配列相同性とこれまでに解析が終了した、いくつかの核内受容体のドメイン構造から、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いる。F領域は、これを有する受容体と有しない受容体に分けられる。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、前述のように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核内受容体の 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→第 1 2 ヘリックス部分構造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 1 2 ヘリックスの構造と位置を大きく変化させる。

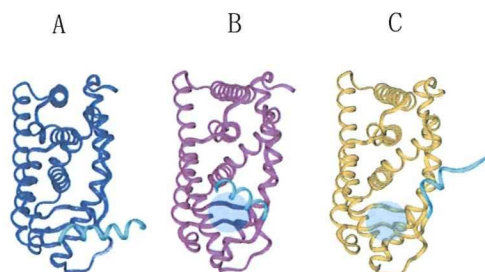


図 2. リガンド結合に伴う核内受容体の構造変化

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 1 2 ヘリックスは水色で示す。

そこで、この第 1 2 ヘリックス部分を特異的に認識する抗体により、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 GCNFI のヘリックス 1 2 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 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 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・GCNFI のエピトープ部位の決定ため、ホモロジーモデリング (Modeller・accelrys) による立体構造の構築を行った。

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こ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、採血等に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。

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、GCNF1 の抗体作製は既に実施されていたが、ウサギに免役後、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役したが、それらにも顕著な力価は確認できなかった。

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

下線部分はヘリックス 1 2 相当部分

| | |
|--------|--------------------------------|
| GCNF1 | QLPLLFKVV <u>LH</u> SCKTSVGK |
| GCNF1S | CQLPLLFKVV <u>LHSS</u> CKTSVGK |

そこで今回、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ていた。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、別の核内受容体 PNR で既に実施済みで (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 末端にリンカー用の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、ウサギに免役した。そ

の結果、調製されたポリクローナル抗体には、図 2 に示すように、抗原ペプチドに対する力価が確認された。

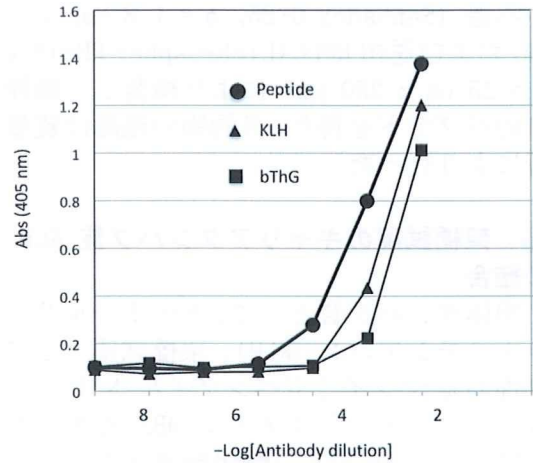


図 2 ウサギ由来 GCNF1-抗ヘリックス 1 2 ポリクローナル抗体の力価の検討

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 48 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することに成功した。今後は、これら調製済抗体を用いたセンシングアッセイ系の構築を進めることとした。

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 1 2 ポリクローナル抗体が作製され、合計 48 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. 健康危険情報

該当する情報は無い。

G. 研究発表

論文発表

1. Exploration of endocrine-disrupting chemicals on estrogen receptor α by the agonist/antagonist differential-docking screening (AADS) method: 4-(1-Adamantyl)phenol as a potent endocrine disruptor candidate, Takeru Nose, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi, *Toxicology Letters.*, 191(1), 33-39 (2009).
2. The Agonist/Antagonist Differential-docking Screening (AADS) Method for Exploration of the Estrogen Receptor-binding Chemicals, Takeru Nose, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi, *Peptide Science 2009*, 463-464 (2010).

学会発表

1. 野瀬 健、下東康幸、アゴニスト/アンタゴニストの差ドッキング計算による女性ホルモン受容体に対する化学物質結合性のスクリーニング、平成21年度日本生化学会九州支部例会、2009. 5. 16-17。
2. Takeru Nose, and Yasuyuki Shimohigashi, In silico screening of endocrine disrupting chemicals for estrogen receptor: A novel docking method for estimation of binding and biological activities, The 19th Joint Seminar between the Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan, 2009. 5.29~30.
3. Mitsuhiro Nishigori, Takeru Nose, Satoshi Murata, Yusuke Nagata, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi, Screening of Endocrine Disruptors for Retinoid-related Orphan Receptor β (ROR β) by the Competitive Receptor Binding Assay, The 19th Joint Seminar

between the Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan, 2009. 5.29~30.

4. 永田祐介、野瀬健、錦織充広、松島綾美、下東康幸、第12 α -ヘリックス欠損ヒト核内受容体 Rev-erb におけるヘム結合性の解析、第46回化学関連支部合同大会、2009. 7. 11。
5. 野瀬 健、下東康幸、ドッキング計算を用いたエストロゲン受容体 α 型に対する化学物質結合性評価法におけるリガンド結合ポケット構造の重要性、第82回日本生化学会、2009. 10. 22~24.
6. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、エストロゲン受容体結合性化学物質のアゴニスト/アンタゴニスト差ドッキング計算法による探索、第46回日本ペプチド学会、2009. 11. 4~6。
7. 永田祐介・野瀬 健・錦織充広・下東康幸核内受容体 Rev-erbs に対するヘム結合性の分光学的測定、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。
8. 野瀬 健、下東康幸、女性ホルモン受容体の化学物質結合性予測計算における受容体構造の役割、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。
9. 野瀬 健、錦織充広、下東康幸、500化学物質のレチノイド関連オーファン受容体 β 型 (ROR β) への結合性、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。

H. 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

神経分化におけるビスフェノール A の内分泌攪乱作用の解析
- ショウジョウバエ株化ニューロンを実験モデルとして -

研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部 講師
分担協力研究者 中川裕之 福岡大学理学部 准教授

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してきた。今年度は、化学物質の神経分化へ及ぼす影響の作用機序解明を目指し、ショウジョウバエ幼虫の神経系から樹立された株化ニューロンを実験モデルとして用いて、神経分化の過程における核内受容体を介した内分泌攪乱作用を解析することを目指した。その結果、培養液中のビスフェノールA (BPA) の濃度が溶出基準の2.5 ppmで成長中のニューロンの突起伸長を阻害すること、また、エクジソン遺伝子の発現が昂進される事が明らかとなった。

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。

昨年までに確立した多世代繁殖毒性試験系を用いた研究により、ビスフェノールAが脳の遺伝子発現に影響を与えること、また、多動性の現象に似た行動異常を引き起こす確立が増加することが明らかになった。そこで、本年度は、ショウジョウバエの株化ニューロン成長を神経分化の実験モデルとして、ビスフェノールAのリスク評価を行った。

B. 研究方法

① 培養細胞と培養液

研究室で継代培養しているショウジョウバエ幼虫脳組織から樹立した株化細胞BG2-c6を本研究に用いた。10%ウシ胎児血清を含むM3昆虫細胞培養液(以下、培養液)中に懸濁したBG2-c6細胞をシャーレに移し、25°Cのインキュベーターで培養した。ビスフェノールA暴露による影響評価の実験においては、細胞密度がシャーレの底面積に対して8万個/cm²となるように調整した。シャーレに移すと同時に10ppmとなるように調整した昆虫の変態ホルモンエクジソン(20E)を加え、突起伸長の過程を画像解析した。Figure 1はBG2-c6細胞のエクジソン添加72時間後の顕微鏡画像である。画像は軸索状の突起が伸長し、互いにネットワーク状の構造を形成する様子をとらえている。この突起を

構成する成分は、微小管とアクチンであることが分担者らの研究によりわかっており

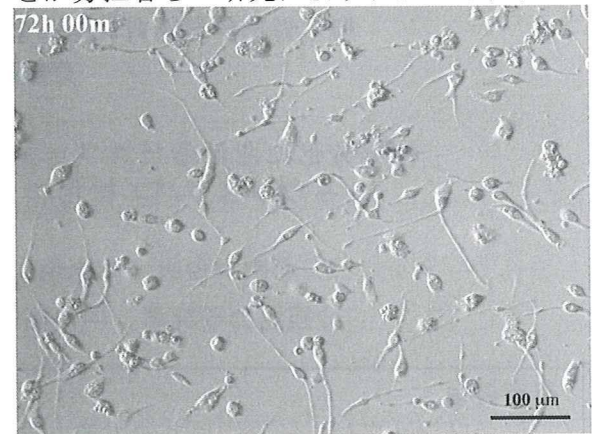


Fig. 1 神経突起を伸長させた培養細胞BG2-c6

(Fig. 2)、また、この細胞系は神経伝達物質アセチルコリンを生産することがUiら(1994)により報告されている。

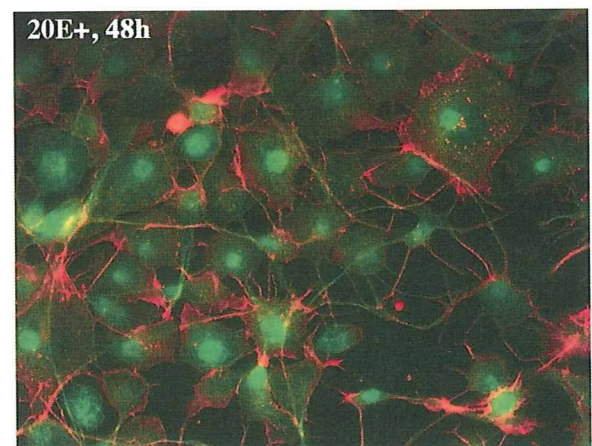


Fig. 2 BG2-c6細胞の神経突起のアクチン(赤シグナル)と微小管(緑シグナル)染色像

②BG2-c6細胞のBPA暴露によるリスク評価

シャーレの底面積に対して8万個/cm²となるように細胞数を調整した懸濁液に10ppmとなるように調整した昆虫の変態ホルモンエクジソンと内分泌攪乱物質ビスフェノールA(以下BPA)を2、3、4ppmとなるように加えた。コントロールには、BPA溶液の代わりにBPAの溶解に使用したエチルアルコールを等量加えた。エクジソン添加後、12時間毎に、一枚のシャーレを4分割し4枚の顕微鏡画像を取得した。顕微鏡画像から、生存している全細胞の数、突起を伸長した細胞数、突起の長さ、他の細胞と突起を接触した場合の接点数をアプリケーションImage-J

を用いてカウントし、4枚の画像から得られたそれらの数値を平均した。

C. 研究結果

①BPA 暴露による BG2-c6 細胞

Figure 3 はエクジソンおよび BPA 添加 60 時間後の細胞の顕微鏡像である。コントロールの細胞では、突起をのぼし始めた細胞が全細胞の約 45% であるのに対して、BPA 暴露の細胞では約 30~38% であるのがわかる。3 サンプルの平均値の時間経過による変化を Figure 5 に示した。

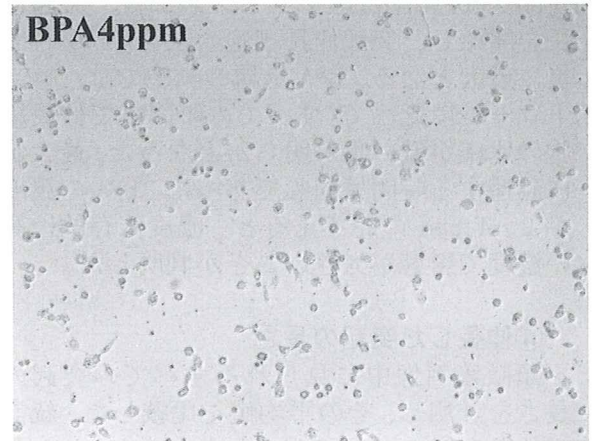
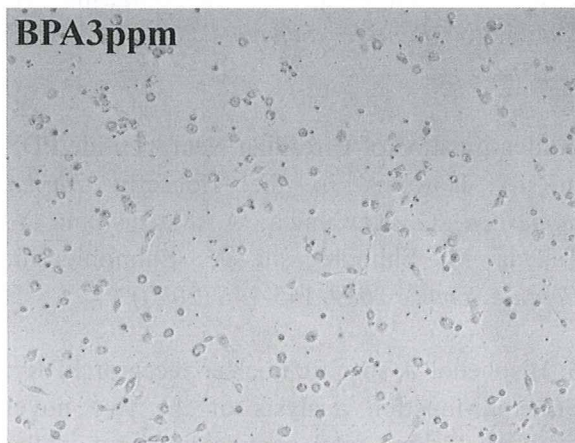
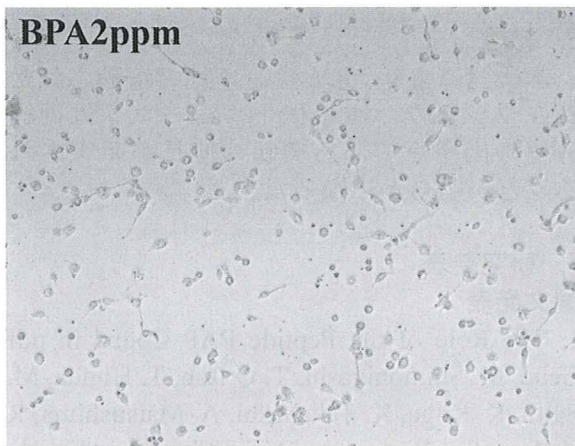
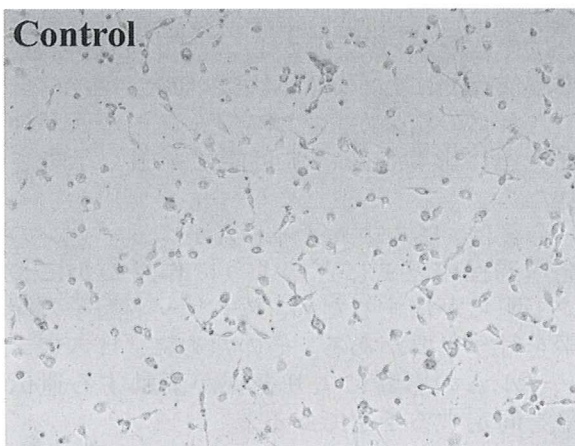


Fig. 3 エクジソンおよび BPA 添加後 60 時間の BG2-c6 細胞



②生存率の変化

BG2-c6 細胞はエクジソン添加後、一定の割合でアポトーシスが起これ、生存細胞は減少する。BPA 暴露の細胞群と比較した (Figure 4)。

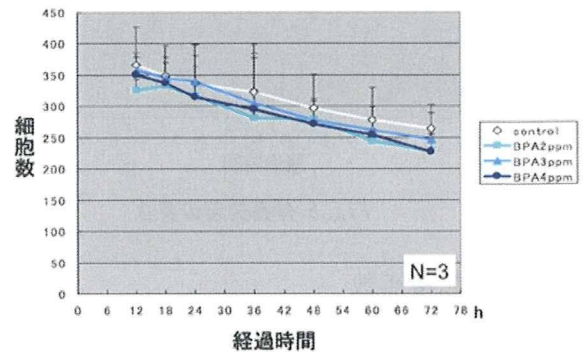


Fig. 4 BPA 暴露による細胞数の変化

BPA 暴露の細胞群では、BPA の濃度に依存して細胞数の減少が大きいことが観察された。しかし、統計学的には有意の差は見られなかった。

③突起伸長細胞の割合

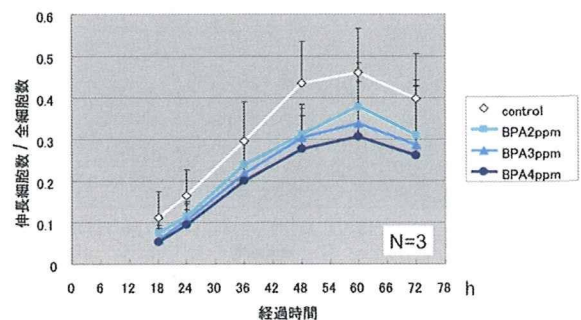


Fig. 5 BPA 暴露による突起伸長細胞数の変化

BG2-c6 細胞はエクジソン添加後、突起伸長を開始し、突起伸長細胞の割合は 60 時間後に最大となる。BPA 暴露の細胞では、コントロールに比べて、すべての時間帯で伸長細胞の比率が低い事が明らかとなった。最大値に到達する時間は同じであった。BPA の濃度が 2~4 ppm の間で見ると、濃度依存的に高い濃度で影響が大きいことが判明した。

④伸長した突起の長さ

顕微鏡画像中に見られるすべての突起の長さを計測し、その平均値を比較した。統計学的な有意の差は証明されなかった。しかし、暴露した BPA の濃度に依存して、突起の長さが短くなる傾向がみられた (Figure 6)。

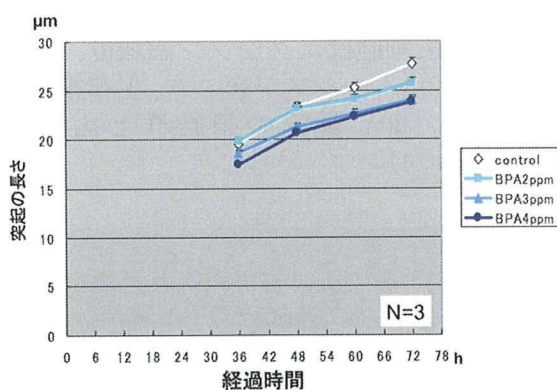


Fig. 6 伸長突起の長さ

⑤突起接点数

中枢神経系が十分に機能するためには、発達段階において、神経細胞が突起を伸長し、最終的に複雑な神経ネットワークを構築することが重要である。72 時間の BG2-c6 細胞の突起伸長過程は、シンプルな系ではあるが、本研究では、神経ネットワークの複雑さを示す一つの指標として、ひとつの細胞あたりの突起接点数に注目して評価した (Figure 7)。

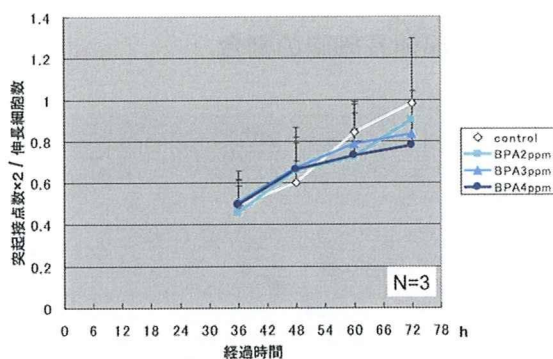


Fig. 7 1細胞あたりの突起接点数

突起をのばす細胞の割合が急増する 36 時間後から一つの細胞あたりの他の細胞と突起

が接する接点数を求めた (Figure 6)。総ての細胞系列で緩やかな増加をたどったが、コントロール群と 72 時間後には比較して、BPA 暴露の細胞群はその値が低い事が判明した。

D. 考察

ショウジョウバエの株化ニューロンを実験モデルとして用いて、BPA が神経分化に及ぼす影響について溶解基準濃度についてリスク評価を行った。その結果、細胞の生存率については、有意の影響は見られなかったが、細胞が突起をのばす現象についてコントロール群と比較すると約 78%に減少した。細胞の生存率や伸長した突起の長さ、また突起の複雑さについては、有意の差と断定することはできなかった。しかし、いずれの場合も、濃度依存的にわずかに阻害された。

これらの結果から、ビスフェノールAが神経発達に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。

今後は、ビスフェノールAがニューロンの発達過程のどこにどのように作用のかについて明らかにするため、ターゲット因子の探索を行う必要がある。そのために、ビスフェノールAの影響により発現が変動する遺伝子を同定する予定である。

E. 結論

本研究により、BPA 含有培地で培養されたショウジョウバエの株化ニューロンは神経分化の出発点である突起の伸長が阻害されることが明らかになった。

F. 研究発表

論文発表

1. The Role of the Peptide PAP Coded in pdf Gene. M. Shimohigashi, T. Q Itoh, T. Honda, M. Saito, K. Koga, K. Takahashi, A. Matsushima, R. Ueda, T. Tanimura, Y. Shimohigashi, A. Matumoto *Peptide Science* 2009, 217-218 (2010).

2. Identification of Circadian Neuropeptide PDF mRNA Isoforms in the Housefly *Musca domestica*. C. Kawanaka, A. Matsushima Y. Takeda M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2009, 145-146 (2010).

3. Bisphenol A-specific nuclear receptor ERRγ: 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).

4. 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*, 146(1):113-122 (2009).

学会発表

1. M. Shimohigashi, T. Q Itoh, T. Honda, M. Saito, K. Koga, K. Takahashi, A. Matsushima, R. Ueda, T. Tanimura, H. Nakagawa, A. Matsumoto, Y. Shimohigashi, PAP Peptide Coded in pdf Gene is Necessary to persist the Circadian Locomotor Rhythm in Insect. 3rd *Asia-Pacific International Peptide Symposium*, Nov.8-11, 2009

2. M. Sumiyoshi, Y. Takeda, K. Koga, S. Seiji, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi, Daily Change of pdf Gene Expression Levels in Brains of the Honeybee *Apis mellifera*. 3rd *Asia-Pacific International Peptide Symposium*, Nov.8-11, 2009.

3. 武田行正、劉 暁輝、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 前駆体 mRNA の選択的スプライ

シングによる分子多様性、第 82 回日本生化学会大会合同大会、2009. 10. 21-24。

4. 下東美樹、久間祥子、山田隆弘、住吉美保、古賀啓太、下東康幸、中川裕之、株化細胞 BG2-c6 による環境ホルモンの影響評価、第 34 回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会、2009. 10. 22-24。

5. 下東美樹、松永裕美、住吉美保、岡田浩幸、古賀啓太、松島綾美、下東康幸、内分泌攪乱物質・ビスフェノールAのショウジョウバエ核内受容体発現に及ぼす影響、第 82 回日本生化学会大会合同大会、2009. 10. 21-24。

6. 下東康幸、劉 暁輝、岡田裕幸、松島綾美、下東美樹、ビスフェノール AF は受容体 ER α には強いアゴニスト、ER β には強いアンタゴニストである。環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009. 12. 7-8。

7. 下東美樹、山田隆弘、久間祥子、住吉美保、古賀啓太、中川裕之、下東康幸、株化細胞 BG2-c6 を実験モデルとした環境ホルモンビスフェノールAのリスク評価、環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会、2009. 12. 7-8。

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

エストロゲン受容体 α 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、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。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、BPA 類似化合物の各種の核内受容体に対する結合スクリーニングを実施したところ、BPA 類似化合物は様々な核内受容体に結合することが明らかとなった。中でも女性ホルモン受容体であり、最も内分泌攪乱作用の標的となりうると期待される代表的核内受容体の一つである、エストロゲン受容体 α 型 (estrogen receptor α ; ER α) について、BPA 類似化合物を含む約 500 化合物の結合スクリーニングを実施した。その結果、22 種もの BPA 類似化合物が、BPA より強い結合性を示すという驚くべき事実が明らかとなった。さらに ER β に対する結合試験系を構築し、ER α に強く結合した BPA 類似化合物の結合試験を行ったところ、米国衛生局の国家毒性プログラム (NTP) において、BPA 類似化合物の中でも特に注目されているビスフェノール AF (BPAF) が、ER α よりもむしろ ER β に強く結合するという興味深い事実が明らかになった。そこで、レポーター遺伝子アッセイ系を構築して転写活性を測定した。これより、BPAF は ER α のアゴニストであり、且つ ER β のアンタゴニストであるという非常に面白い結果が得られた。この構造要因を明らかにするためには、BPAF と ER α の複合体の X 線結晶構造解析が非常に有用である。そこで今回、ER α -LBD と BPAF との複合体の X 線結晶構造解析を試みた。文献調査により、ER α に存在する 3 つのシステイン残基は、システインの側鎖の SH 基が持つ高い反応性のために、結晶化を阻害すると考えられたため、これら全てをセリンに置換した。さらに、フレキシブルな F ドメインも、結晶化の邪魔になると考えられたためを削除した。こうして作製した ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD を用いて BPAF 複合体の結晶化を行ったところ、結晶様のものは生成するが、今まで十分な分解能を持つ結晶は得られていない。

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。一方で、最近になっ

て、BPA類似化合物に対する安全性の懸念が高まっている。米国厚生省では、2008年のNTPの報告で指摘されたBPA類似化合物に対する内分泌攪乱物質としての懸念を受けて、BPAには及ばないが比較的プラスチック原料として多く使用されているビスフェノールAF (BPAF) を毒性試験の対象化合物として取り上げた。米国における、BPAFの1986年から2002年における生産量は、10,000～500,000ポンドであり、この量は'moderate

production'に分類される。2008年9月の報告書によると、BPAFはポリマー原料として用いられており、フッ素含有高分子化合物 (fluoroelastmer) として、食品加工・製造装置のホース等に用いられていることが報告されている。しかし、特定の用途や、ヒト暴露の可能性、世界生産量、さらには、環境放出量などについては、一切不明となっている。また、ラットにおける経口の半数致死量 (LD₅₀) は3,400mg/kgであり、これはBPAのLD₅₀ (3,250mg/kg) とほぼ同程度である。

我々は、このBPAFが、ER α よりもむしろER β に強く結合するという興味深い事実を明らかにしたそこで、レポーター遺伝子アッセイ系を構築して転写活性を測定した。これより、BPAFはER α のアゴニストであり、且つER β のアンタゴニストであるという非常に面白い結果が得られた (本年度報告書 ヒト・エストロゲン受容体 α に対するビスフェノールA関連物質の結合スクリーニング 研究分担者 松島綾美 参照)。この構造要因を明らかにするためには、BPAFとER α の結合体のX線結晶構造解析が非常に有用である。そこで今回、BPAFとER α の結合体のX線結晶構造解析に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 受容体 ER α -LBD 発現プラスミドの構築

ER α の結晶構造に関しては、既に多くの報告がなされている。そこで、まず文献調査を行った (表 1)。

表 1. ER α の結晶構造解析文献

| 文献 | LBD発現領域 (全長595aa) | 変異 | 精製法の特徴 |
|--|-------------------|---------------------|---|
| nature 389, 753, 1997 | 301-553 | | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 |
| Protein Expr. Purif. 22, 165, 2001 | 301-553 | | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 |
| PNAS, 95, 5998, 1998 | 297-554 | | 5M urea, E2存在下巻き戻し |
| JBC, 276, 15059, 2001 | 302-552 | C381S, C417S, C530S | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 |
| PNAS, 100, 11273, 2003 | 304-550 | C381S, C417S, C530S | PenVera社が発現、精製 |
| Cell, 1998 Dec 23;95(7):927-37 | 297-554 | | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 |
| J Med Chem. 2003 Jul 3;46(14):2945-57 | 301-553 | C381S, C417S, C530S | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 変異体でないと結晶が出なかった |
| J Am Chem Soc. 2004 Nov 24;126(46):15106-19 | | | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, CM化 |
| Structure, 2004 Dec;12(12):2197-207 | 301-554 | | 4M urea存在下estradiol-Sepharose |
| J Med Chem. 2005 Jan 27;48(2):364-79 | 301-553 | | |
| J Biol Chem. 2006 Jun 30;281(26):17909-19 | | | magic strain E. Coliスクリーニングに特化した方法 |
| Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Mar 8;102(10):3593-8. | FDメイン無し | | estradiol-Sepharose, 可溶性画分, アセチル化 |
| EMBO Rep. 2007 Jun;8(6):563-8 | 298-554 | Y537S | 6xHis and TEVprotease |
| Chem Biol. 2007 Jun;14(6):659-69 | 298-554 | Y537S | 6xHis and TEVprotease |

その結果、381位、417位、530位の3カ所のシステイン残基 (C) をセリン (S) に置換しするか、カルボキシメチル化によりシステイン残基を化学修飾した場合のみに、結晶化に成功していることが明らかとなった。そこで今回は、381位、417位、530位の3カ所のシステイン残基 (C) をセリン (S) に置換した ER α (C381S, C417S, C530S) を発現することにした。さらに、全ての報告において、フレキシブルな F ドメインは削除されていたのでこれに従った。

(2) ER α (C381S, C417S, C530S) -LBD の発現

大腸菌 (BL21) を用いて ER α (C381S, C417S, C530S) -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 ER α (C381S, C417S, C530S) -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 ER α (C381S, C417S, C530S) -LBD から切り離して ER α (C381S, C417S, C530S) -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

ER α (C381S, C417S, C530S) -LBD と BPAF 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。ER α (C381S, C417S, C530S) -LBD の物理量の3倍量になる BPAF を ER α (C381S, C417S, C530S) -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で 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、3 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。

(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℃で行った。ER α (C381S, C417S, C530S)-LBD と各濃度の放射標識された BPAF 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 [3 H]BPAF 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) BPAF と ER α 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 はプレシ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、PEG3350 液中で塩化ナトリウムを晶出剤として結晶を得ることに成就した (図 1)。

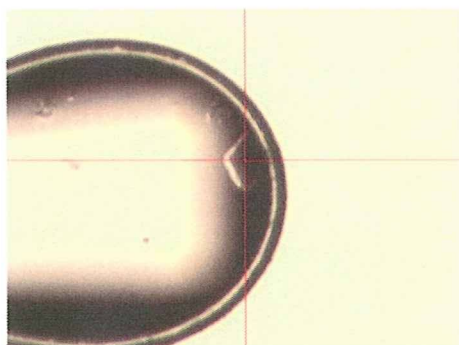


図 1. BPAF と ER α の結合体の結晶
中心付近の赤線が交差するとことに
結晶がある。

(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、分解能が全く足りず、構造解析ができなかった (図 2)。

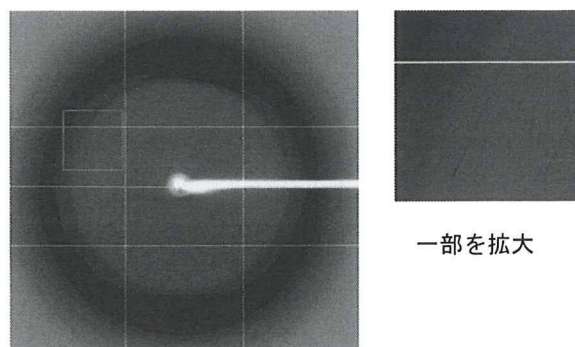


図 2. 結晶の回折結果
回折点が分離しておらず、
構造解析できなかった。

D. 考察

結晶はできるが質が悪い、すなわち、X線が上手く回折しない場合の対処は厄介である。今回見出した結晶化条件では、いずれも同様の結晶が得られたため、全く違うスクリーニング条件を 1 から探し出すのも一つの方法である。また、タンパク質の濃度を上げる、あるいは下げる、さらには、精製グレードを上げるものまた別のアプローチ方法である。報告されている ER α の結晶構造には、それほど分解能が高くないものが多く、本質的に ER α の高分解能の結晶は得られにくい。今後は、さらに精製したタンパク質を用いて、数多くの結晶化を行うことにより、良質な結晶ができる可能性を上げていき構造解析を達成する予定である。

E. 結論

大腸菌で 3 箇所システイン残基をセリン残基に置換した ER α を発現した。これと BPAF の結合体の結晶作製を行い、結晶は得られたものの X線が回折しなかった。現在引き続き、結晶を作成中である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

本件に関連する論文発表はまだ無い。

学会発表

本件に関連する学会発表はまだ無い。

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

複数の鋳型を用いたドッキング計算によるリガンド結合性解析

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

一般に核内受容体の天然リガンドは、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の最初期のイベントである。一方で、核内受容体に対して結合し攪乱する化学物質も同様に受容体リガンド結合部位へと結合することで、その活性を発揮する。従来実施されてきた *in vitro* 試験法や *in vivo* 試験法により、現在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たが、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、迅速とは言い難い。そこで我々は、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受容体 α 型は、これまでに最も研究が進んだ核内受容体として注目されている。この受容体においては、複数の異なる活性を持つリガンドが結合した立体構造が同定されている。そこで本研究では、このエストロゲン受容体受容体 α 型のリガンド結合部位構造を複数用いたドッキング計算を用いて、化学物質の受容体結合性が予測可能かの検討を行った。その結果、アルキルフェノール類、特に、1-アダマンチルフェノールの高親和性結合を予測可能であるなど、ドッキング計算の有用性が示された。

A. 研究目的

核内受容体は、シグナル分子である内在性のリガンドを特異的に自身のリガンド結合部位（Ligand Binding Domain: LBD に結合することでシグナルを受領し、転写因子として働くことにより情報伝達系で重要な役割を持つ。また、外来の内分泌攪乱物質と呼ばれる化学物質も核内受容体の LBD と結合して、受容体活性化、不活性化など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も初期段階のイベントである。

現在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。それらの多くは、*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* 試験である。それらを用いた検討の結果、これまでに多くの有用な試験結果が報告され、それらの試験法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ため、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るようになった。そこで、環境化学物質の影響を正確に知るためには、多数の化学物質有するすべての核内受容体への影響を迅速に検討する必要性が高まった。

ところで、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、膨大な手間がかかる。また、ラジオアイソトープの使用には制限が多く、放射標識リガンドの入手も簡便ではない。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、我々はバ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と考えた。

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・LBDは、リガンドを結合することで立体構造を変化させる。このLBDは12個の α -ヘリックスからなっている。リガンド未結合状態とLBDにアゴニスト、もしくはアンタゴニストが結合した構造は互いに異なっている。(図1)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。

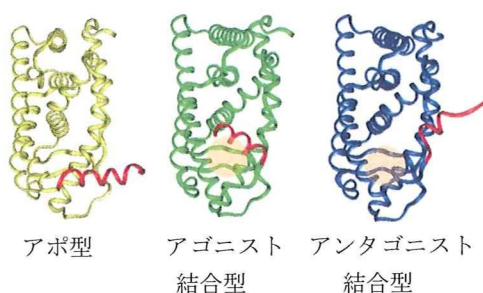


図1 核内受容体リガンド結合ドメインにおけるリガンド結合
赤で示す部分が第12 α -ヘリックス。

本研究では、上記の様に結合したリガンドの生物活性により立体構造を変化させるLBDを複数用いることで、リガンドの受容体結合性ひいては、生物活性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する。まずは、女性ホルモン受容体 α 型とアルキルフェノール類を題材として検討した(図2)。

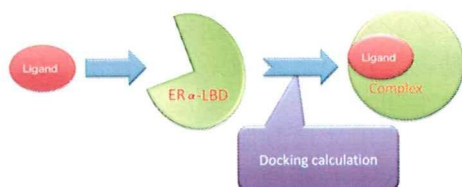


図2 ドッキング計算を用いた核内受容体リガンド結合ドメイン・リガンド複合体の予測

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、エストロゲン受容体 $ER\alpha$ -LBD のアゴニスト結合型 (1ERE, 3ERD)、アンタゴニスト結合型 (1ERR, 3ERD) 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 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Fuel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

アルキルフェノール類と $ER\alpha$ -LBD のドッキング計算は、4種類の受容体構造に対しドッキング計算プログラム AutoDock 3.0により行なった。

(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

一般に、ドッキング計算により結合性化学物質を探索する研究は、新薬のシード(種)を探す目的で薬学関連研究において広く実施されている。本研究では、この探索手法における結合性表すスコアを利用して、環境化学物質の核内受容体結合性を評価できないか検討したものである。

エストロゲン受容体 α 型 ($ER\alpha$) は、いわゆるホルモン受容体で、リガンドが受容体LBDに結合することで活性化コンホメーションを取っている。この活性化コンホメーションは、リガンドを結合したポケットに覆いかぶさるように第12番目の α -ヘリックスが位置している(図1)。一方、アンタゴニス

トがリガンド結合ポケットに結合した場合、第12番目の α -ヘリックスは活性化コンホメーションで位置を占めていた場所には存在できなくなり、結果として活性化能を失っている(図1)。この位置取りを変化させているのはアンタゴニスト分子の構造そのものであり、 $ER\alpha$ は分子構造が異なる様々なアゴニストとアンタゴニストを自分のリガンド結合ポケットの構造を変化させることで結合させている。ところで、環境化学物質の受容体結合リスクを適切に評価するには、アゴニストと同様に受容体に結合する化学物質のみならず、アンタゴニストと同様に受容体と結合する化学物質をもスクリーニングする必要がある。そこで、本研究においては、アゴニスト結合型の受容体構造2種およびアンタゴニスト結合型の受容体構造2種の計4種類の受容体構造を用いて検討を実施した。ドッキングに使用した化学物質は、合計18種類のフェノール基を有する化合物である。

まず、既知のアゴニスト(17 β -エストラジオール(E2)、DES)およびアンタゴニスト(ラロキシフェン(RAL)、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT))を用いて検討を実施した。この結果、アゴニストは、 $ER\alpha$ の活性化型コンホメーションと、アンタゴニストはアンタゴニスト結合型コンホメーションとより高い結合親和性を持つことが判明した。

今回研究に用いた化学物質の計算結果を図3に示す。縦軸に計算された予想結合エネルギー(ΔG)を、横軸にアゴニスト型とアンタゴニスト型のどちらの受容体構造に親和性を示すかを示すパラメータ($\Delta\Delta G$)を取り、計算に用いた化学物質をプロットしたところ、既知のアゴニスト(E2、DES)は左側、結合エネルギー-8 kcal/mol以下の領域に、既知のアンタゴニスト(RAL、4-OHT)は右側、結合エネルギー-8 kcal/mol以下の領域に位置した。また、4-アダマンチルフェノール(ADA)は、アゴニスト性の結合物質として指摘された。そこで、ADAに対して結合競争試験とレポーター遺伝子試験を実施したところ、受容体結合性とアゴニスト活性が確認された。

D. 考察

本研究では、ドッキング計算を用いて種々の化学物質と $ER\alpha$ -LBDの結合性を予測可能か検討した。また、得られた計算結果

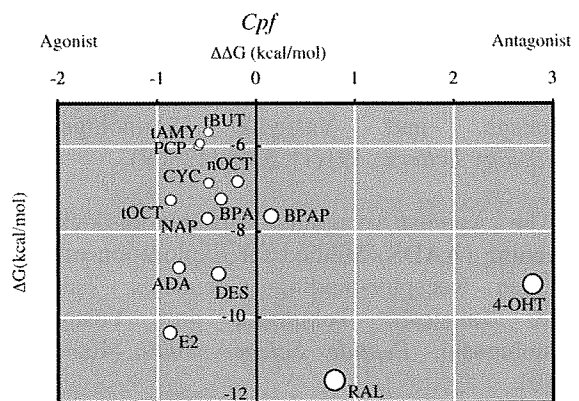


図3 4つの鑄型を用いたドッキング計算により予測された種々の化学物質の $ER\alpha$ -LBDとの結合性と生物活性

縦軸(ΔG):ドッキング計算により算出された平均の結合性パラメータ(単位 kcal/mol)
横軸($\Delta\Delta G$):ドッキング計算により算出された、アゴニスト結合型およびアンタゴニスト結合型への結合性パラメータの差
○印は、分子の大きさを示す。

から、化学物質の生物活性を推定することが可能かについても検討を行った。今回の結果からは、類似の構造要因(フェノール基)を持つ化合物群においては、計算による結合性リスク評価と生物活性の予測が可能であることが示された。今後は、さらに多様な化学物質に対する計算によるリスク評価が可能となるように、計算手法の最適化、適切な受容体構造の選択等を実施して行く必要があると考えられた。

E. 結論

今年度の本研究では、エストロゲン受容体 α 型とアルキルフェノールの結合性が正しく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、既知のアゴニスト、アンタゴニストおよび結合性を示す4-(1-アダマンチルフェノール)における結合性と生物活性を正しく予測した計算結果が得られ、ドッキング計算の有用性が示された。

F. 健康危険情報

該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. Exploration of endocrine-disrupting chemicals on estrogen receptor α by the agonist/antagonist differential-docking screening (AADS) method: 4-(1-Adamantyl)phenol as a potent endocrine disruptor candidate, Takeru Nose, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi, *Toxicology Letters.*, 191(1), 33-39 (2009).

2. The Agonist/Antagonist Differential-docking Screening (AADS) Method for Exploration of the Estrogen Receptor-binding Chemicals, Takeru Nose, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi, *Peptide Science* 2009, 463-464 (2010).

学会発表

1. 野瀬 健、下東康幸、アゴニスト/アンタゴニストの差ドッキング計算による女性ホルモン受容体に対する化学物質結合性のスクリーニング、平成21年度日本生化学会九州支部例会、2009. 5. 16-17。

2. Takeru Nose, and Yasuyuki Shimohigashi, In silico screening of endocrine disrupting chemicals for estrogen receptor: A novel docking method for estimation of binding and biological activities, The 19th Joint Seminar between the Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan, 2009. 5.29~30.

3. Mitsuhiro Nishigori, Takeru Nose, Satoshi Murata, Yusuke Nagata, Ayami Matsushima, and Yasuyuki Shimohigashi, Screening of Endocrine Disruptors for Retinoid-related Orphan Receptor β (ROR β) by the Competitive Receptor Binding Assay, The 19th Joint Seminar between the Busan Branch of the Korean Chemical Society and the Kyushu Branch of the Chemical

Society of Japan, 2009. 5.29~30.

4. 永田祐介、野瀬健、錦織充広、松島綾美、下東康幸、第12 α -ヘリックス欠損ヒト核内受容体 Rev-erb におけるヘム結合性の解析、第46回化学関連支部合同大会、2009. 7. 11。

5. 野瀬 健、下東康幸、ドッキング計算を用いたエストロゲン受容体 α 型に対する化学物質結合性評価法におけるリガンド結合ポケット構造の重要性、第82回日本生化学会、2009. 10. 22~24.

6. 野瀬 健、徳永隆俊、下東康幸、エストロゲン受容体結合性化学物質のアゴニスト/アンタゴニスト差ドッキング計算法による探索、第46回日本ペプチド学会、2009. 11. 4~6。

7. 永田祐介・野瀬 健・錦織充広・下東康幸核内受容体 Rev-erbs に対するヘム結合性の分光学的測定、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。

8. 野瀬 健、下東康幸、女性ホルモン受容体の化学物質結合性予測計算における受容体構造の役割、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。

9. 野瀬 健、錦織充広、下東康幸、500化学物質のレチノイド関連オーファン受容体 β 型 (ROR β) への結合性、環境ホルモン学会 第12回研究発表会、2009. 12. 7~8。

H. 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

エストロゲン関連受容体 γ の変異受容体による化学物質結合部位解析

研究分担者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院 教授
研究実施者 劉 曉輝 九州大学大学院理学研究院 学術研究員

研究要旨

ヒト・エストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ : ERR γ ）は、リガンドなしで活性化状態にある「自発活性化型」核内受容体である。内分泌攪乱化学物質・ビスフェノールA（BPA）は、低用量で脳神経系や生殖系で悪影響を及ぼす化学物質として、ヒトへのリスクが強く懸念されている。我々は最近、BPAがERR γ に非常に強く結合することを発見した。さらに、BPA/ERR γ -LBD（リガンド結合ドメイン）複合体のX線結晶構造解析では、この結合にはERR γ ヘリックス12（H12）のPhe450による結合ポケット充填が必須であると示唆された。一方、ERR γ を不活性にする4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）は、H12との相互作用はなく、むしろ、受容体の構造要因が必要では？と推定された。そこで、本研究では、ERR γ -H12の受容体のリガンド結合選択性および受容体活性化機構への関与の解明を目的とし、H12を段階的に削除して、部分的欠損変異受容体はBPAおよび4-OHTとの結合性、受容体の自発活性化への影響を解析した。これらの解析により、ERR γ のビスフェノールA結合および自発活性化には、H12が必須な構造要因であることが証明された。昨年度よりの解析が今年度ほぼ完成したので、すべての解析結果をまとめて報告する。

A. 研究目的

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、ステロイドホルモン受容体グループに分類される。ヒトでは α 、 β 、 γ 型の3つのサブタイプが存在し、これらのいずれについても内在性リガンドや生理機能に関してはほとんど何も分かっていない。さらに、ERRはリガンドなしで活性化コンホメーションとなる、いわゆる「自発活性化型核内受容体」（self-activated nuclear receptors, SA-NR）である。ERR γ は、ヒト成人では脳や膵臓、肺、骨髄、副腎、前立腺、胃など高濃度に発現しており、また、胎盤には最も高濃度の発現している。特に注目されるのは、ヒト胎児で脳

に非常に高濃度に発現していることである。さらに、ERR γ は、脳の性分化や成熟、脳神経系の発達に関与していると推測されている。

一方、内分泌攪乱化学物質、いわゆる「環境ホルモン」の問題は、数年前までは女性ホルモン受容体（estrogen receptor; ER）、男性ホルモン受容体（androgen receptor; AR）および甲状腺ホルモン受容体（thyroid receptor; TR）の3種類の核内受容体に限って調べていたが、現在は、ヒト・ゲノム解析から判明したヒト核内受容体の合計48種類すべてにきわめて高リスクである可能性が強く懸念されるようになってきた。こうしたなか、我々は2006年に、内分泌攪乱物質であるビスフェノールA（BPA）はERR γ と非

常に強く結合し、ERR γ の高い自発活性を保持することを明らかにした。

BPA は、女性ホルモン様作用を示すとされてきた内分泌攪乱物質であるが、ER への直接の作用は人間の体内で作られるエストロゲン 17 β -estradiol の 1/1,000~1/10,000 と非常に弱いものである。しかしながら、近年、BPA についてきわめて低濃度において脳の性分化、成熟、さらに生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす「低用量効果」が明らかとなり、この作用機序、分子メカニズムの解明が急務となっている。こうしたなか、BPA が ERR γ に非常に強く結合するということから、BPA が「低用量で攪乱作用を示す機構」と「脳神経系の発達を攪乱する分子機構」に ERR γ が関与している可能性が強い。

我々は最近、BPA/ERR γ -LBD (LBD;リガンド結合ドメイン) 複合体の X 線結晶構造解析に成功した。この結合には、ERR γ ヘリックス 12 (H12) の Phe450 および Leu454 の結合ポケット充填が必須であると示唆された。その結果、ERR γ を不活性化する 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は、H12 との相互作用はなく、むしろ、他の受容体構造要因が必要では? と推定された。

そこで、本研究では、受容体自発活性化およびリガンド結合の選択性における構造要因の解明を目指して、ERR γ の H12 を段階的に削除して受容体のリガンド結合性および自発活性化への影響を解析することにした。このことは、BPA の結合に必要な構造要因のみならず、受容体活性コンホメーションについての構造情報をもたらすと期待される。

B. 研究方法

(1) ERR γ 変異体の設計

ERR γ の自発活性およびリガンド結合選択性に関して H12 どのぐらい残基が必要なのか? を調べるため、ERR γ の C 端側からアミノ酸 1 残基ずつ削除して 3 種類、さらには、H12 から 1 または 3 残基ずつ削除して 10 種類、合計 13 種類の部分欠損 ERR γ 変異受容体を設計した。

(2) 変異受容体の作製

ヒト腎臓の cDNA を鋳型として、PCR の

```

          420          430          440          450          458
WT : ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLEAKV*
A458: -----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLEAK*
A457-458: -----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLEA*
A456-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLE*
A455-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLE*
A454-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLE*
A453-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLE*
A450-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVPMHKLFLEMLE*
A447-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGKVP*
A444-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIKLEGK*
A441-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFYNIK*
A438-458: ----TLPLLRQTSTKAVQHEFY*
A435-458: ----TLPLLRQTSTKAVQH*
A432-458: ----TLPLLRQTSTKA*

("___": H11 相当する部位; "____": H12 相当する部位)
(C 端側 458 の 1 アミノ酸残基削除を  $\Delta$ 458 で表記、以下表記方法同じ)

```

増幅より、ERR γ の LBD (222-458 aa) および全長領域のクローニングを行った。さらに、得られた野生型 (WT) の WT-ERR γ -LBD および WT-ERR γ -full length を鋳型として 13 種類の LBD および full-length 変異受容体を作製した。変異された LBD および全長はそれぞれ発現ベクター pGEX-6p-1 および pcDNA3.1(+)に組み換えた後、塩基配列を確認した。

(3) 変異受容体タンパク質の調製

得られた ERR γ LBD/ pGEX-6p-1 変異受容体は、大腸菌 (BL21) を用いて GST との融合タンパク質として大量発現をした。1 mM イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で 37 $^{\circ}$ C、3 時間、発現誘導させ、グルタチオンセファロース 4B ビーズを用いてアフィニティー精製した。20 mM のグルタチオンでビーズより溶出後、Sephadex G-10 で脱塩して、Bradford 法でタンパク質濃度を測定した。

(4) 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。野生型および各種変異受容体 GST-ERRg-LBD と各濃度の放射標識された BPA または 4-OHT を binding buffer 中で混合し、2 時間インキュベートした。非特異的な