

(3) 飽和結合試験

発現・精製した RAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBD それぞれの GST 融合タンパク質の機能性を確認するため、特異的リガンドである ^3H ATRA を用いて飽和結合試験を行った。それぞれ一定量のタンパク質を 0~30 nM の ^3H all-*trans* retinoic acid (^3H ATRA) と binding buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 10% glycerol, 1 mg/ml ovalbumin, 0.3 mg/ml γ -globulins (pH 7.5)) 中で混合したものを全結合として測定した。次いで、この混合液中に未標識の 10 μM ATRA を添加して測定し、これを非特異的結合とした。反応は 20°C で 2 時間静置した。その後、リガンド未結合の放射リガンドを除去するために、0.4% のデキストラン被膜活性炭 (dextran coated charcoal; DCC) を反応溶液に添加し、氷上で 10 分間静置後、遠心分離もしくはフィルタープレートを用いて遊離の ^3H ATRA を除去し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。なお、「全結合」から「非特異的結合」の数値を差し引くことにより「特異的結合」を算出した。また、Scatchard Plot 解析を用いて、RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する ^3H ATRA の K_d 、 B_{max} 値を求めた。

(4) 競争結合試験

200 種の化学物質における RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する結合能は、 ^3H ATRA と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濃度依存的 (10^{-5} ~ 10^{-10}M) に ^3H ATRA、RAR α -LBD、RAR β -LBD、RAR γ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、20°C で 2 時間をインキュベートした。遊離の ^3H ATRA を DCC により除去し、TopCount NXTTMマイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンターで放射活性を測定した。対象化学物質の IC_{50} 値 (^3H ATRA の受容体結合を 50% 阻害する値) は、プログラム ALLFIT により算出した。

C. 研究結果

(1) RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する飽和結合試験

飽和結合試験を行ったところ、RAR α (図 1)、RAR β (図 2)、RAR γ (図 3) ともに ^3H ATRA の特異的結合を確認することができた。Scatchard Plot 解析により、RAR α では $K_d = 7.58$ nM、 $B_{\text{max}} = 5.74$ nmol/mg、RAR β では $K_d = 7.35$ nM、 $B_{\text{max}} = 2.52$ nmol/mg、RAR γ では $K_d = 11.6$ nM、 $B_{\text{max}} = 3.23$ nmol/mg と算出された。

文献によると、内在性リガンド ATRA は、シリコナイズしてもガラス、プラスチックに非常に吸着されるため、非特異的な結合が多いとされている (Sablonnière S, *et al.* Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement. *Analytical Biochem.*, 217, 110-118 (1994))。本研究グループでは当初よりこうした「化学物質の吸着性」については、対策を取っており、ここでは「1 mg/ml ovalbumin, 0.3 mg/ml γ -globulins」による保護法を用いて吸着を防いだ。

飽和結合曲線から特異的結合は全結合の 40~50% あり、スキヤッチードプロット解析の結果より、 K_d および B_{max} について算定したところ、上記のように、良好な解析値が得られた。この結合試験を行うに十分と判断された。また、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。

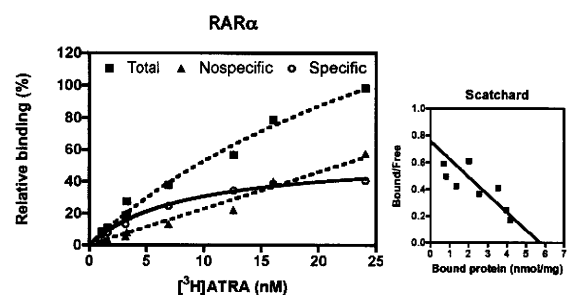


図 1. RAR α 飽和結合試験

RAR α に対する ^3H ATRA の全結合(■)、特異的結合(O)、非特異的結合(▲)を示す。

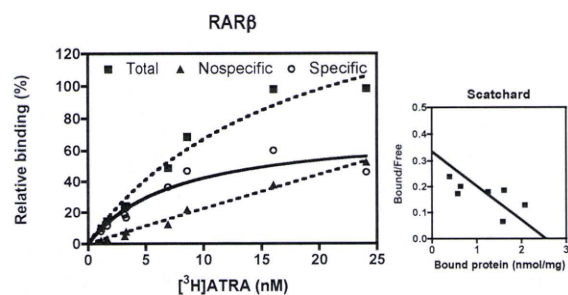


図 2. RAR β 飽和結合試験

RAR β に対する ^3H ATRA の全結合(■)、特異的結合(O)、非特異的結合(▲)を示す。

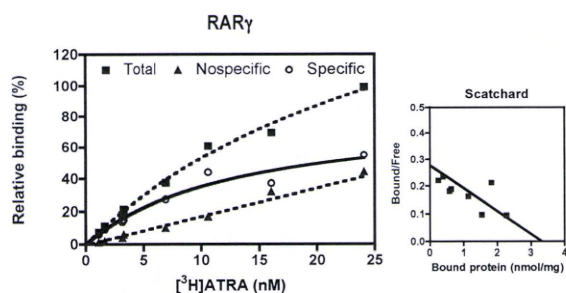


図 3. RAR γ 飽和結合試験

RAR γ に対する ^3H ATRA の全結合(■)、特異的結合(O)、非特異的結合(▲)を示す。

(2) RAR α 、RAR β 、RAR γ に対する競争結合試験：応答性化学物質の探索

競争結合試験により、RAR α 、RAR β およびRAR γ に結合応答する化学物質を探索するため、本試験では、ビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、合成エストロゲン、脂肪酸類および

表 1 スクリーニングに用いた化学物質リスト

ビスフェノール A アナログ	(43 種)
ビスフェノール AF タイプ	(10 種)
ビスフェノール A 関連化合物	(24 種)
ベンゾフェノン	(24 種)
ジフェニルメタン	(25 種)
ジフェニル 17-ケトステロイド	(1 種)
ステロイド類	(12 種)
フラボノイド	(4 種)
アルキルフェノール	(18 種)
塩素化合物	(2 種)
XENO 外因性リガンド	(6 種)
脂肪酸類	(9 種)
レチノイド類	(5 種)
その他	(8 種)

精巢毒性関連物質など約 200 種の代表的な化学物質を選定した (表 1)。

3 nM ^3H ATRA を用いてそれぞれ受容体の競合結合試験を行った。その結果、対照として用いた内在性リガンドである ATRA は RAR α 、RAR β 、RAR γ に IC₅₀ 値は、それぞれ 12.9 nM、14.6 nM、22.5 nM で、非常に強く結合することが確認された。また、RARs のリガンドである 9cRA は ATRA と同程度の結合性を示し、13 cRA においても、ATRA の 2 倍ほど弱くなって、RAR に強く結合することが判明した。ヒドロキシ基を持つレチノールは RAR に ATRA の 30~50 倍弱く結合し、アルデヒド基を持つレチナルは RAR にほとんど結合しなかった (図 4)。今回実験に対象としたその他の化学物質について、いずれも、どのサブタイプにも結合性を示さないことが判明した。

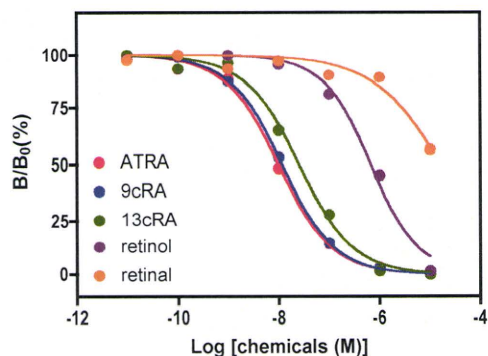


図 4. RAR α 競争結合試験

3 nM の ^3H ATRA を用いたレチノイド類化学物質の RAR α に対する結合性を示す。(RAR β 、RAR γ の結果はほぼ同様のため、省略)

D. 考察

^3H ATRA を用いた RAR α 、RAR β 、RAR γ 飽和結合試験の構築を試みた。本研究で得られた K_d 値は、これまで報告されているものとはほぼ同じであった。飽和結合試験の結果を基に、競争結合試験を実施したところ、標準化学物質はいずれも妥当な IC₅₀ 値を示し、強い結合性が証明された。ただし、12~22 nM 程度であり、 K_d 値 7~12 nM に比べて約 2 倍小さくなるため、ATRA の構造安定性純度について課題が残った。この競争結合系を用い

て、約 200 種化学物質を試験した結果、いずれの RARs 受容体とも結合しないことが分かった。

RARs の X 線結晶構造解析により、リガンドである ATRA は、そのカルボキシル基が受容体の K236 (H3) および R278 (H5) との静電結合、S289 (β ターン) との水素結合により受容体に強く結合している。これまで報告された RARs と結合する内在性リガンドである ATRA や 9cRA、合成リガンドである TTNPB や BMS204493 など、すべてカルボキシル基を持つ化学物質であることから、カルボキシル基は RARs に結合する重要な構造要因でと思われる。しかし、今回、カルボキシル基を持つ一連の脂肪酸類化学物質の RAR に対する結合性を調べるところ、いずれも結合性が示さなかった。これらの結果より、RAR に強く結合するのは、カルボキシル基が塩基性アミノ酸と結合するために必須であり、その他の構造、トリメチルヘキセン、二重結合鎖も重要な構造要因である。今後、カルボキシル基以外の構造的特性を解明することも大切である。RARs は生命活動の根源に関わる遺伝子、タンパク質の発現調節に関与していることから、外因性化学物質

は重大な攪乱作用をもたらす可能性が強く適正な結合性評価が急務である。

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

F. 研究発表

論文発表

特になし。

学会発表

1. 縄司 奨、野瀬 健、酒井大樹、錦織充広、下東康幸：核内受容体・レチノイン酸受容体 α 型に対する化学物質の結合試験系の構築、第 47 回化学関連支部合同九州大会、2010. 7. 10。
2. 縄司 奨：レチノイン酸受容体 RAR α 型に対する化学物質の結合試験系の構築、第 10 回目泉屋コロキウム、2010. 08. 31-09. 01。

G. 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

核内受容体レチノイドX受容体（RXR） α 、 β 、 γ 型に対する
化学物質の受容体応答解析

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

化学物質の内分泌かく乱作用が、核内受容体を介したシグナル毒性であり、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 ）に特異的に非常に強く結合することを発見されて以来、核内受容体全48種類の結合、生理活性を調査することが必須の状況となった。こうしたなか、レチノイドシグナルの伝達を介して恒常性維持、免疫応答、細胞増殖などの重要な機能を制御しているレチノイド受容体（レチノイン酸受容体、RAR；レチノイドX受容体、RXR；レチノイド関連オーファン受容体、ROR）に対する化学物質の結合親和性に関する研究も進められてきた。本研究では、RXRに着目し、内在性リガンドである $[^3\text{H}]9\text{-cis retinoic acid}$ ($[^3\text{H}]9\text{cRA}$)を用いた受容体結合試験系を構築し、それを用いた競合結合試験でビスフェノールAアナログ、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、XEON 外因性リガンドなど22に分類した合計500種化学物質に対しRXR α 、 β 、 γ への結合応答解析を実施した。その結果、内在性リガンド9cRAおよび、既に報告されているトリブチルスズ（tributyltin；TBT）はRXRに対して非常に強く結合が確認された。また、ビスフェノール誘導体やアルキルフェノール類など、RXRと比較的に強く結合する化学物質が幾つか存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用はこれまで、女性ホルモン受容体（estrogen receptor；ER）、男性ホルモン受容体（androgen receptor；AR）、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られている。ヒト・ゲノム解読が完了した現在では、ヒト核内受容体には合計48種類を存在し、これらすべてに内分泌かく乱物質の問題が存在すると考えられる。我々は最近、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 ）に特異的に非常に強く結合することを発見された。これまで、BPAは女性ホルモン作用を示し、その作用は女性ホルモン受容体であるエストロゲン受容体（estrogen receptor；ER）を

介するとされてきた。しかし、BPAのERへの結合能、活性は天然ホルモンであるエストロゲン（E2）に比べると1/1,000~1/10,000と非常に弱く、このER説には疑問が呈されていた。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「低用量問題」についても、低用量作用が実際にERを介しているのか、議論になっていた。こうしたなか、BPAがERではなく、ERR γ と非常に強く結合することから、化学物質のリスクを正確に評価することが必須である。

核内受容体は、ステロイドやビタミン等を含む低分子量の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。こうしたな

か、レチノイドシグナルの伝達を介して恒常性維持、免疫応答、細胞増殖などの重要な機能を制御しているレチノイド受容体(レチノイン酸受容体、RAR；レチノイドX受容体、RXR；レチノイド関連オーファン受容体、ROR)に対する化学物質の結合親和性に関する研究も進められてきた。本研究では、レチノイドX受容体 (retinoid X receptor; RXRs) に着目した。

RXR はレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor ; RARs) と共にレチノイン酸シグナル伝達に関与する核内受容体であり、3種類のサブタイプ α 、 β 、 γ が知られている。9-*cis* retinoic acid (9cRA) はRXRs共通の内在性リガンドとして報告されており、その結合性は極めて高い。近年では、内分泌かく乱物質であるトリブチルスズが、RXRsと強力に結合し、生殖系および内分泌系に影響を及ぼす可能性が指摘されている。RXRsは、TRs、PPARs、VDR、RARs、PXR、CAR、LXR、FXRのような、主にサブファミリーIに属する核内受容体とヘテロ二量体を形成することにより、特異的な標的遺伝子の転写制御を介し、発達・分化・代謝等を含む様々な生理作用を調節している。

RXR α は、肝臓、腎臓、表皮、小腸に多く発現しており、皮膚において主要なRXRである。RXR α 欠損マウスは胎仔期において致死性であり、心筋と目の奇形が見られることが報告されている。また、マウス精巣では2種類のRXR α アイソフォームの存在が確認されているが、それらの機能的役割についてはよくわかっていない。RXR β は生体内の様々な組織で偏在的に発現している。RXR β 欠損マウスも、RXR α 欠損マウスと同様に50%程度は胚性致死性である。また、生存したRXR β 欠損マウスは無精子症や生殖細胞の変異などの症状をきたす。このことは、RXR β が精細胞の支持等に関わるセルトリ細胞中で必要不可欠な機能を担っていることを反映したものであるという報告がなされている。RXR γ は主として筋肉中に存在するが、部分的に脳や脂肪細胞中にも発現している。他の2つのアイソフォームの場合と異なり、RXR γ 欠損マウスは外見的には正常であるが、空腹時の血漿中におけるトリグリセリド量の減少、骨格筋中のリポタンパクリパ

ーゼ活性の増強、体重の減少などを引き起こすことが報告されている。

現在、世界では10万種類以上の化学物質が流通し、日本においても毎年約300種化学物質が新規市場に投入されている。これまで、RXRに対する生理機能に関する知見が増えつつあるものの、RXRを内分泌攪乱物質の標的の一つとして網羅的に調査した研究はほとんど実施されていない。本研究ではRXR α 、 β 、 γ の受容体結合試験系を確立し、それを用いて応答性化学物質を探索し、それら構造的特性の解明を目的として取り込んだ。

B. 研究方法

(1) 対象化学物質の選定と調整

ビスフェノールAアナログ、ビスフェノール類、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、XEON 外因性リガンドなど22に分類した合計500種化学物質を選定した。化学物質の溶液調製は、それぞれ 1.0×10^{-2} Mになるようにした。当初、DMSOで溶解して調製した。また、原液はガラスバイアルに保存した。

(2) 受容体RXR α 、 β 、 γ タンパク質の調製

Origene社から購入したRXR α 、 β 、 γ 全長cDNAより、PCRを用いてそれぞれの受容体リガンド結合ドメイン(RXR α -LBD、RXR β -LBD、RXR γ -LBD)領域のクローニングを行った。得られたPCR産物をタンパク質発現ベクターpGEX-6p-1に組み換え、塩基配列を解読した。配列を確認後、大腸菌(BL21)を用いてRXR α -LBD、RXR β -LBD、RXR γ -LBDタンパク質の大量発現を行った。RXR α -LBDタンパク質の発現は、大腸菌のO.D.₆₀₀値が0.2~0.4の間で0.2 mMのIPTGを添加し、16°Cで18時間振盪培養することにより行った。RXR β 及びRXR γ は、大腸菌のOD₆₀₀値が0.5~1.0の間で1 mMのIPTGにより37°Cで3時間振盪培養し、タンパク質を発現した。この際、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されることになる。その後、細胞を遠心分離により回収し、超音波処理で破碎した。タンパク質の精製は、GSTと特異的に結合するグルタチオンセファロース4Bビーズ次いで、ゲルろ過によって行った。精製タ

ンパク質は、SDS-PAGE で純度を確認し、Bradford 法で濃度定量を行った。

(3) 飽和結合試験

発現・精製した RXR α -LBD、RXR β -LBD、RXR γ -LBD それぞれの GST 融合タンパク質の機能性を確認するため、特異的リガンドである ^3H 9cRA を用いて飽和結合試験を行った。それぞれ一定量のタンパク質を 0~40 nM の ^3H 9-*cis* retinoic acid (^3H 9cRA) と binding buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 8% glycerol, 1 mg/ml ovalbumin, 0.5% CHAPS (pH 7.4)) 中で混合したものを全結合として測定した。次いで、この混合液中に未標識の 10 μM 9cRA を添加して測定し、これを非特異的結合とした。反応は 4°C で 1 時間静置した。その後、リガンド未結合の放射リガンドを除去するために、1%のデキストラン被膜活性炭 (dextran coated charcoal; DCC) を反応溶液に添加し、氷上で 10 分間静置後、遠心分離もしくはフィルタープレートを用いて遊離の ^3H 9cRA を除去し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。なお、「全結合」から「非特異的結合」の数値を差し引くことにより「特異的結合」を算出した。また、Scatchard 解析を用いて、RXR α 、RXR β 、RXR γ に対する ^3H 9cRA の K_d 、 B_{max} 値を求めた。

(4) 競争結合試験

500 種の化学物質における RXR α 、RXR β 、RXR γ に対する結合能は、 ^3H 9cRA と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 ^3H 9cRA、RXR α -LBD、RXR β -LBD、RXR γ -LBD タンパク質と共に binding buffer 中で混合し、4°C で 1 時間をインキュベートした。遊離の ^3H 9cRA を DCC により除去し、TopCount NXT™マイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンターで放射活性を測定した。対象化学物質の IC_{50} 値 (^3H 9cRA の受容体結合を 50%阻害する値) は、プログラム ALLFIT により算出した。

C. 研究結果

(1) RXR α 、RXR β 、RXR γ に対する飽和結合

試験

飽和結合試験を行ったところ、RXR α (図 1)、RXR β (図 2)、RXR γ (図 3) ともに ^3H 9cRA の特異的結合を確認することができた。Scatchard 解析により、

RXR α では $K_d = 19.6 \pm 1.58$ nM、

$B_{\text{max}} = 12.6 \pm 1.02$ nmol/mg、

RXR β では $K_d = 21.5 \pm 0.39$ nM、

$B_{\text{max}} = 8.07 \pm 1.16$ nmol/mg、

RXR γ では $K_d = 16.3 \pm 0.74$ nM、

$B_{\text{max}} = 3.71 \pm 0.06$ nmol/mg

と算出された。

本研究で得られた RXRs と 9cRA の結合性は報告値と同等であり、この試験系を用いることにより RXRs に対する 9cRA の強い特異的結合が再現性よく観測されることが明らかとなった。

飽和結合曲線から特異的結合は全結合の 40~50% あり、スキッチャードプロット解析の結果より、 K_d および B_{max} について算定したところ、上記のように、良好な解析値が得られた。この結合試験を行うに十分と判断された。また、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。

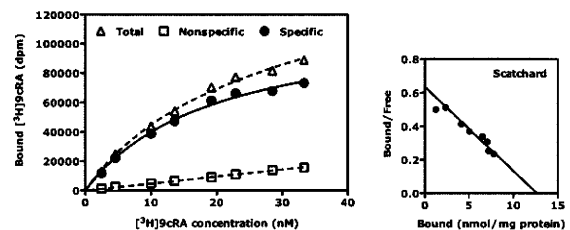


図 1. RXR α 飽和結合試験とスキッチャードプロット解析の結果

RXR α に対する ^3H 9cRA の全結合(Δ)、特異的結合(\bullet)、非特異的結合(\square)を示す。

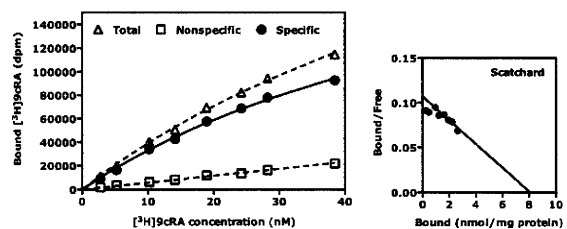


図 2. RXR β 飽和結合試験とスキッチャードプロット解析の結果

RXR β に対する ^3H 9cRA の全結合(Δ)、特異的結合(\bullet)、非特異的結合(\square)を示す。

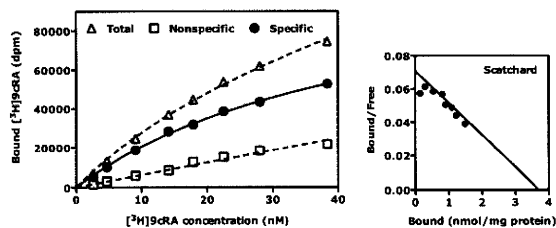


図 3. RXR γ 飽和結合試験とスキッチャードプロット解析の結果
RXR γ に対する $[^3\text{H}]9\text{cRA}$ の全結合(Δ)、特異的結合(\bullet)、非特異的結合(\square)を示す。

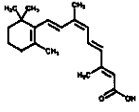
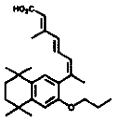
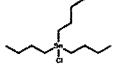

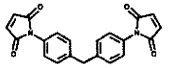
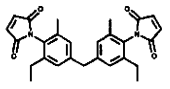
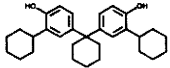

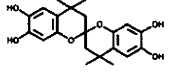
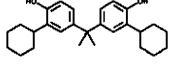
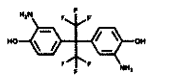
(2) RXR α 、RXR β 、RXR γ に対する競争結合試験：応答性化学物質の探索

競争結合試験により、RXR α 、RXR β および RXR γ に結合応答する化学物質を探索するため、本試験では、ビスフェノールAアナログ、ステロイド類、フラボイド類、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、XEON 外因性リガンドなど 22 に分類した合計 500 種化学物質に対しを選定した。

1 nM $[^3\text{H}] 9\text{cRA}$ を用いて競争結合試験を行った。陽性対照として用いた 9cRA の IC₅₀ 値は、RXR α 、RXR β 、RXR γ でそれぞれ 21.3 nM、18.5 nM、48.7 nM であった。

供試した全 500 種の中で、既に報告された TBT、Ttphenyltin chlorid (TPT)、LG100754 (RXR のアンタゴニスト) が RXR α 、 β 、 γ

表 1. RXR と結合した化学物質の構造と 9cRA に対する結合結合能

化学物質名/構造	相対結合能 (%)		
	RXR α	RXR β	RXR γ
9-cis Retinoic acid (9cRA) 	100	100	100
LG100754 	74	119	279
Tributyltin chloride (TBT) 	45	709	383
Triphenyltin chloride (TPT) 	12	57	21.3
4,4'-Bismaleimidodiphenylmethane 	8.1	2.0	非常に弱く結合
Bis(3-ethyl-5-methyl-4-maleimidophenyl)methane 	6.5	3.5	非常に弱く結合
1,1-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)cyclohexane 	4.9	51	143
p-Dodecylphenol 	3.1	33	47.5
6,6',7,7'-Tetrahydroxy-4,4,4',4'-tetramethyl-2,2'-spirobichroman 	2.6	13.9	12.8
2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane 	1.2	7.9	6.4
2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane 	0.9	4.3	7.1

に強く結合することが確認された。その他、約40種の化合物がRXRに有意に結合を示した。特に注目すべきことに、代表的な内分泌攪乱物質ビスフェノールA (BPA)と同様の骨格をもつ1,1-ビス(3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンが、RXRの三つのサブタイプとも結合性が見られた。特にRXR β に対して、9cRAと同程度の強さ(IC₅₀ = 約30 nM)で結合することが明らかとなった。また、ジフェニルメタンやアルキルフェノールなどにも、強い結合性を示す化合物がいくつか存在することが分かった。表1は、RXRと結合した主な化学物質について、9cRAに対する相対結合能(%)をまとめたものである。

(4) RXR レポーター遺伝子アッセイ：結合性化学物質におけるアゴニスト/アンタゴニスト活性の評価

RXRはリガンドが結合によって、転写活性を示す「リガンド結合型核内受容体」である。RXRsはDR1型のRXRs Response Elements (RXRE; AGGTCA)に結合して、homodimerを形成することが報告されている(Mangelsdorf *et al.*, *Cell* **66**, 555-561, 1991; Mader *et al.*, *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **12**, 5029-5041, 1993)。そこで、これまで発表されているラット *cellular retinol binding protein II* (rCBPII) 遺伝子上流プロモーター領域に存在するRXRE (-639 GCTGTCACAGGTCA CAGGTCA CAGGTCA CAGTTCA -605)を3回コピーした応答配列を組込んだレポータープラスミドの作製し、HeLa細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。まず、IC₅₀は1 μ M以下に結合する化学物質について、RXRに対するアゴニスト/アンタゴニスト活性を解析した。

9cRAがアゴニストとして作用することが報告されているため、まず対象化学物質を単独処理することにより、アゴニスト/アンタゴニスト活性を評価した。その結果、RXR α 、 β 、 γ の転写活性は9cRAにより5~10倍に増加した。しかし、TBTやTPTはRXRのアゴニストであることが報告されたが、HeLaに細胞毒性強く、10⁻⁷ Mで50%の転写活性化を示し、それ以上の濃度で、細胞が死んでいるため、最大活性が見られなかった。

その他に結合性が判明した化学物質ではほとんど変化しなかった。次に、9cRAのRXRに最大活性を示す濃度(10⁻⁶ M)と対象化学物質を複合処理したところ、9cRAにより促進されたRXR転写活性は1,1-ビス(3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンにより抑制した。対照化学物質としてLG100754にも強く抑制しされ、アンタゴニスト活性が見られた。その他の化学物質について、RXRに対する結合性が弱いため、有効なアンタゴニスト活性が見られなかった。

D. 考察

[³H]9cRAを用いたRXR α 、RXR β 、RXR γ 飽和結合試験の構築を試みた。本研究で得られたK_d値は、これまで報告されているものと同様であった。飽和結合試験の結果を基に、競争結合試験を実施したところ、標準化学物質はいずれも妥当なIC₅₀値を示し、強い結合性が証明された。その試験系を用いて500化合物の結合親和性を測定した結果、約40種の化合物が有意に結合を示した。特に注目すべきことに、代表的な内分泌攪乱物質ビスフェノールA (BPA)と同様の骨格をもつ1,1-ビス(3-シクロヘキシル-4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンが、RXR β 、 γ に9cRAと同程度の強さで結合し、RXR α にも比較的強く結合することが明らかとなった。また、ジフェニルメタンやアルキルフェノールなどにも、強い結合性を示す化学物質がいくつか存在することが分かった。結合親和性を示した化学物質の構造の比較から、強く結合する化合物は、一つ以上の親水性官能基やかさ高い疎水性部位など、類似した構造的特徴を有することが判明した。また、有機スズ化合物はRXR α 、 β 、 γ に対して非常に強い結合を示すという結果が得られ、既存の報告の内容を裏付けた。

RXRは生命活動の根源に関わる遺伝子、タンパク質の発現調節に関与していることから、外因性化学物質は重大な攪乱作用をもたらす可能性が強く適正な結合性評価が急務である。本研究により、内分泌かく乱物質BPAの生理作用はRXRを介したものではないことが分かった。しかし、疎水性の高いBPAアナログの結合が観測されたことから、

「新世代ビスフェノール」が RXR を介した内分泌かく乱作用を持つ可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

F. 研究発表

論文発表・学会発表

1. 巢山慶太郎、酒井大樹、西垣内 誠、下東康幸：核内受容体 RXR β への化学物質の結合親和性。平成 22 年度日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22-23 日。

2. 巢山慶太郎：核内受容体 RXR β に結合する化学物質の親和性の構造要因。第 10 回泉屋コロキウム、2010 年 8 月 31 日~9 月 1 日。

3. 巢山慶太郎、劉 曉輝、酒井大樹、西垣内 誠、下東康幸：核内受容体 RXR β に結合親和性を示す化学物質の構造要因。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2010)、2010 年 12 月 7-10 日。

4. 巢山慶太郎、劉 曉輝、酒井大樹、西垣内 誠、錦織充広、縄司 奨、松島綾美、野

瀬 健、下東康幸：レチノイド受容体に結合する化学物質の構造要因。環境ホルモン学会 第 13 回研究発表会、2010 年 12 月 16-17 日。

5. 劉 曉輝、酒井大樹、巢山慶太郎、西垣内 誠、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：レチノイド X 受容体 (1) : α 型 (RXR α) に結合する化学物質の構造要因。環境ホルモン学会 第 13 回研究発表会、2010 年 12 月 16-17 日。

6. 巢山慶太郎、劉 曉輝、酒井大樹、西垣内 誠、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：レチノイド X 受容体 (2) : β 型 (RXR β) に結合する化学物質の構造要因。環境ホルモン学会 第 13 回研究発表会、2010 年 12 月 16-17 日。

7. 西垣内 誠、劉 曉輝、酒井大樹、巢山慶太郎、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：レチノイド X 受容体 (3) : γ 型 (RXR γ) に結合する化学物質の構造要因。環境ホルモン学会 第 13 回研究発表会、2010 年 12 月 16-17 日。

G. 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

プロゲステロンX受容体（PXR）に対する結合試験系の構築と
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 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

近年、ポリカーボネート・プラスチックや、エポキシ樹脂の工業原料であるビスフェノールAのヒト健康への悪影響が危惧されている。我々は、ビスフェノールA（BPA）が、エストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）ではなくエストロゲン関連受容体 γ 型（estrogen-related receptor γ ; ERR γ ）に非常に強く結合することを世界で初めて発見した。その後、このERR γ とBPA類似の多種の化合物の構造-活性相関解析研究を精力的に展開し、高機能性プラスチックの原料として、最近生産量がふえている「新世代ビスフェノール」も、ERR γ とかなり強く結合することを明らかにした。すなわち、多くのBPA類似構造をもつ化合物が、ERR γ と結合すること、そして、なかでもビスフェノールEは、BPAよりERR γ に強く結合する唯一の化合物であることを世界に先駆けて報告した。（平成20年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク評価事業）。これは、BPAのみではなく、BPA類似化合物の化学物質リスク評価の重要性を端的に示すものである。さらに、試験対象の核内受容体は、女性ホルモン・エストロゲン受容体や、男性ホルモン・アンドロゲン受容体のみではなく、ヒト核内受容体全てを視野に入れる必要性を示すものである。そこで今回、まだあまり試験研究が進んでいない、プロゲステロンX受容体（progesterone X receptor: PXR）について、放射リガンドを用いた競合結合試験系の構築を行った。この受容体は、大腸菌で発現すると構造が不安定らしく、失活しやすかったため、アッセイ系の構築は困難をきわめた。しかし、最終的にはトリチウム標識の clotrimazole を用いた放射リガンド競合結合試験系の構築に成就した。さらに、BPAFをはじめとするBPA類似化合物など約30種の結合試験を行った。その結果、4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）が、既知のリガンドである clotrimazole よりやや弱く結合することが判明した。また、BPZが4-OHTと同程度結合した。さらに、弱いながらBPAFも結合することが明らかになった。

A. 研究目的

BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの工業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。しかし、その安全性について、現在未だ明確な回答が得られておらず、特に近年では胎児や幼児における脳・神経系への影響が危惧される非常に注目されている化学物質である。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。このBPAの核内受容体に対する非常に強い結合は、BPAおよびBPA類似化合物には、潜在的な化学物質リスクがあることを示唆すると考えられる。

BPAの規制に関する国際動向は、次の通りである。1990年代後半より、マウスなど実験動物で、ビスフェノールAの「低用量効果」が指摘された。「低用量効果」とは、BPAが規制値（2.5~3.0 ppm）よりはるかに低い量で

生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすことである。これを受け、2000年には米国厚生省所轄National Toxicology Program (NTP) が Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review を行った。この調査では、低用量効果は一部では認定され、一部では否定されたため、統合的には認定されなかった。しかし、その後もBPAの低用量効果を指摘する実験が相次ぎ、2008年4月にカナダ政府は、乳幼児への危険性があるという理由で、世界に先駆けてBPAの工業利用に強い規制を発動した。同年4月、米国厚生省所轄・国家毒性プログラム (NTP) も、乳幼児等の神経や行動等に影響を及ぼす懸念の見解草案を、さらに9月に最終報告を発表した。欧州では、2009年に欧州食品安全期間 (EFSA) に神経発達影響についての新たな実験動物に関する評価が諮問され、2010年5月に完了を目指して評価中である。このように、BPAの化学物質リスクは非常に注目されている。

さらに、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。こうした世界情勢をうけて、EUでも、2011年1月に、ビスフェノールAのホ乳瓶に対する使用を禁じた。

ところで、ヒトにはエストロゲン受容体のような核内受容体が、合計48種も存在する。これらの核内受容体全てが、BPA類似化合物の標的となりうる。そこで、今回、ERR γ と同様に、はじめから活性型構造をとる、すなわち、リガンド結合ポケットが小さく、ERR γ 同様に、リガンドとしては比較的小さな

BPA類似化合物の結合が危惧される、プロゲステロン X 受容体 (progesterone X receptor: PXR) について、発現系の構築および結合試験系の構築を行った。さらには新規なPXR結合化合物の探索を目的として、BPA類似化合物約30化合物の結合スクリーニングを実施した。

B. 研究方法

(1) 受容 PXR の調製

試験に用いる受容体は、大腸菌での発現タンパク質を用いた。大腸菌で発現する場合には、まず、ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて PXR 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 PXR-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) 0.2 mM 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 ビーズを用いてアフィニティー精製後、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。得られた PXR-LBD は -80°C で保存し、実験に供出した。

(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°C でゆっくりと受容体タンパク質を解凍して行った PXR-LBD と各濃度の放射標識された放射標識 Clotrimazole (^3H Clotrimazole) を binding buffer 中で混合し、4°C で 2 時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の Clotrimazole を ^3H Clotrimazole と併に加えることにより調べた。最終的な B/F 分離の条件としては、遊離の ^3H Clotrimazole は 0.4% デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で 10 分間インキュベートし、14,000rpm で 10 分遠心することにより取り除いた。同様に、 ^3H 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) および ^3H ビスフェノール A (BPA) についても試験を実施した。

(3) 競争結合試験

BPA 類似化合物など、PXR-LBD への結合スクリーニングに供した化学物質については、 ^3H Clotrimazole の受容体結合を阻害する

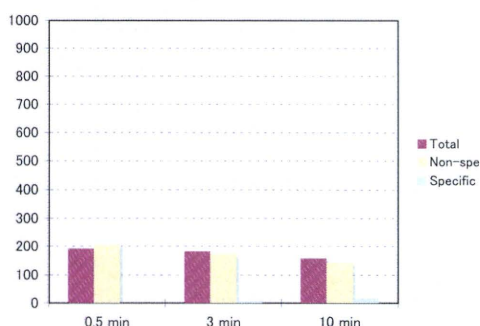
能力でPXRへの結合性を評価した。まず、評価すべき一連の化学物質を ^3H ClotrimazoleとPXRと共にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。その後、遊離の ^3H Clotrimazoleは0.4%デキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加え、氷上で10分間インキュベートし、96穴フィルタープレートで吸引ろ去することにより取り除いた。化学物質の IC_{50} 値(^3H Clotrimazoleの受容体結合を50%阻害する値)はプログラムALLFITにより算定した。

C. 研究結果

(1) 結合試験の条件検討

これまでに、我々が行った発現、結合試験では、PXRの結合が検出できていなかった。文献の詳細調査によると、既報の論文では、コアクチペータとともに共発現することにより、可溶性画分にタンパク質を得ていた。これは、このタンパク質が不安定であり、大腸菌で折りたたみが正常に行きにくい可能性を示唆すると考えられた。そこで、まず、リガンドとして知られるClotrimazol存在下でタンパク質を発現し、Clotrimazolと結合する構造を持つPXRの発現を試みた。このタンパク質を用いて、結合試験の反応時間、温度、B/F分離条件の検討を行った。その結果、やはり、このタンパク質は失活しやすく、凍結融解に耐えないことが判明した。しかも、室温の反応でも容易に失活することが明らかになった。つまり、 4°C で反応しなければならないことが判明した。B/F分離の時間は、長くなるにつれtotalもnon-specificも下がることから、少なくとも10 min以上インキュベートすべきではない。毎回条件を同じにできるなら3 minが最適と思われた(図1)。

25°C for 1h



4°C for 1.5h

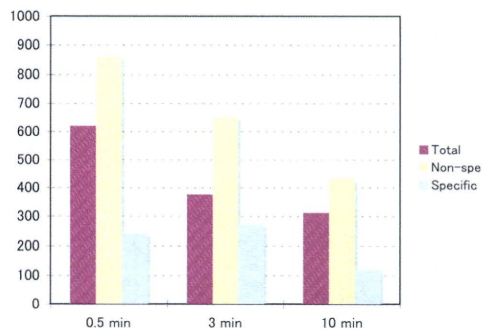
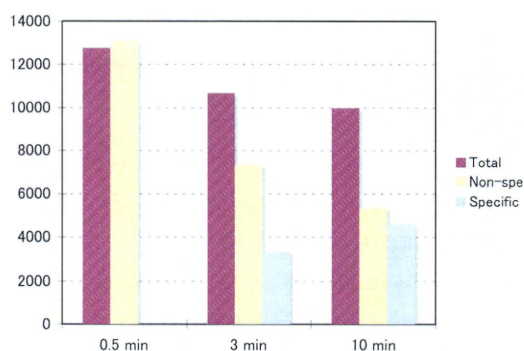


図1. 10 nM ^3H Clotrimazolを用いた反応条件およびB/F分離検討

次に、トレーサーとして ^3H 4OHTが使えるのか、同様に検討を行った。その結果、 ^3H 4OHTもPXRに対する特異的結合が確かにあることが判明した。 ^3H 4OHTをトレーサーとする場合は、必ず10 minインキュベートしなければB/F分離できないが、 ^3H Clotrimazolは短時間でB/F分離できることが良くわかった。PXRはあまり安定なタンパク質ではないようなので、やはりB/F分離時間は短い方が望ましいと思われる。他の受容体同様、非特異的結合が ^3H 4OHTは高いので、まずは ^3H Clotrimazolで結合試験系を構築することに決定した(図2)。

4°C for 15 h by ^3H 4OHT



4°C for 15 h by ^3H Clotrimazol

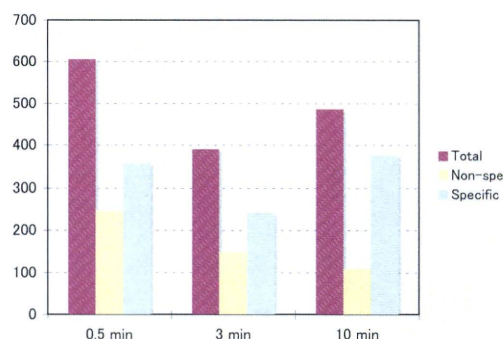


図2. ^3H 4OHTと ^3H Clotrimazolの反応条件およびB/F分離検討

(2) PXR の飽和結合試験

(1) で決定した条件で、飽和結合試験を行った (図 3)。

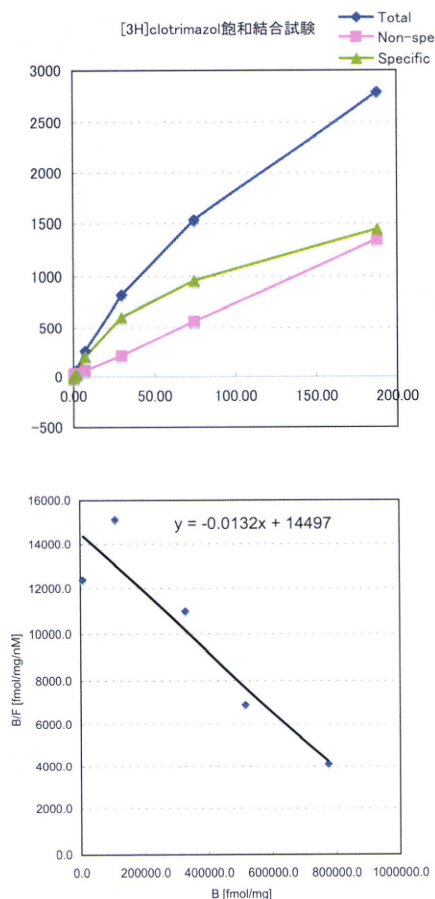


図 3. $[^3\text{H}]$ Clotrimazol の飽和結合試験

スキャッチャードプロット解析を行った結果、 K_D 値は 75 nM であった。この結果より、Clotrimazole の PXR に対する結合能は、十分強く、発現した受容体が機能的であり実験に使用可能であることが確認された (図 3)。

これらの特異的結合が、反応溶液等の組成成分に由来するのではなく、PXR と Clotrimazole の結合に由来することを押さえる為に、競合結合試験を行った。その結果、確かに競合するので、PXR と Clotrimazol の結合を検出していることが判明した。また、40HT が少し弱いながら同等に結合することが判明した (図 4)。

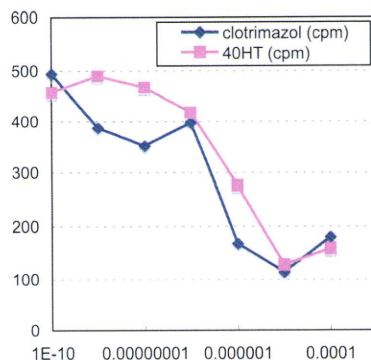


図 4. 20 nM $[^3\text{H}]$ Clotrimazol を用いた競合結合試験

また、20 nM の $[^3\text{H}]$ Clotrimazol で競合結合試験を行ったところ、Clotrimazol 自身の $IC_{50} =$ 数百 nM であった。現時点では、 $[^3\text{H}]$ BPA は結合せず、 $[^3\text{H}]$ 40HT が Clotrimazol と同等か、少し弱い程度で結合した。BPAF は Clotrimazol より 2 オーダー程度弱い IC_{50} のようであった (10^{-5} M でやっと完全に 0 におちた)。

(3) PXR に対する BPA 類似化合物の結合スクリーニング

こうして確定した結合試験系を用いて、ビスフェノール類似化合物約 30 種の $[^3\text{H}]$ Clotrimazol による競合結合試験を行った。その結果、そのなかでは、BPZ が少なくとも 40HT と同程度に、PXR に強く結合することが判明した。図 5 に結果の一例を示す。

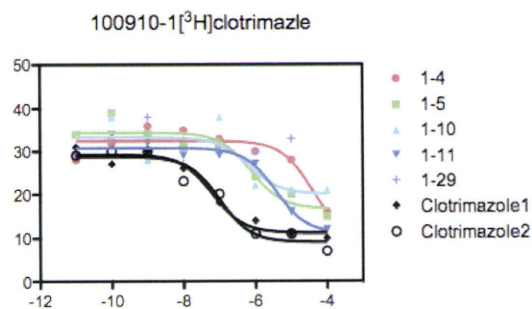


図 5. $[^3\text{H}]$ Clotrimazol を用いた PXR に対する BPA 類似化合物の結合スクリーニングの例

D. 考察

Clotrimazole は^[3H] Clotrimazole を用いた競合結合試験において、PXR に対して IC₅₀ 値で 70 nM 程度の結合能を示すことが判明した。さらに、これを用いた放射リガンド競合結合試験により、4-OHT がそれより若干弱い、同様に結合することが判明した。BPAF はさらに 100 倍以上弱くではあったが、PXR に結合できた。新世代ビスフェノールとしては、BPZ が 4-OHT と同程度強く結合した。これらの結果は、PXR にも、ビスフェノール類似化合物が結合することを直接示している。

E. 結論

PXR に強く結合する BPA 類似化合物として、BPZ を新規に見出した。これは BPAF よりもはるかに強く結合した。今後、レポーター遺

伝子アッセイが必要であり、また、全ての新世代ビスフェノールに対する試験が不可欠である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報は無い。

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

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

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

これまで研究が中心に行われてきた性ホルモン受容体以外の受容体に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。そのような現状を踏まえ、我々はヒトに存在する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、レチノイド関連オーファン受容体（ROR）および Rev-erb 受容体に関する化学物質の結合性評価のための試験系の構築を実施した。この試験系の確立のために、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を実施した。これらの試験系により、それぞれの受容体に対して複数の受容体への結合性活性を示す化合物が同定された。現在のところ、既知のリガンドを大きく上回る結合性を示す化学物質は見つかっていないが、予期しない分子が受容体結合性を示す事例が見られることから、今回確立された試験系を用いて、今後も出現が続く新規の化学物質の評価を継続して実施していく必要があると判断された。

A. 研究目的

環境中の化学物質が生体に与える問題、すなわち環境ホルモン問題においては、従来女性ホルモン（エストロゲン）受容体（ER）を介する攪乱作用が注目を集めてきた。これは、ERは主に生殖に関与すること、また、野性生物に多くの生殖異常が発見されたことから、人類においてもERのかく乱作用が子孫、特に人口の減少を引き起こす原因となるもの考えられているためである。

ところが近年、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されたことから、ER以外の核内受容体を介した化学物質の攪乱作用も強く危惧される様になった。そこで我々は、ヒトに存在する48種類の受容体すべてを対象に研究を展開している。

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・レチノイド関連オーファン受容体RORに対する種々の化学物質の結合性を調べることとした。

RORは3つのサブタイプを持ち、それぞれ 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た。今回、ROR α 、ROR γ に対しては25-ヒドロキシコレステロールを用いた、一方、ROR β には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み、構築された試験系を使用した化学物質の結合性スクリーニングを行うこととした。

また、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の試験法の構築を実施した。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。

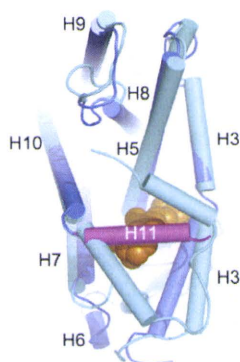


図1. 第12 α ヘリックスを欠損した Rev-erb β -LBD の立体構造

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 α 、 β 、 γ 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 α -LBD および γ -LBD においては、各濃度の [3 H] 標識された 25-hydroxycholesterol を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。また、GST-ROR β -LBD では、 [3 H] 標識された all-trans-retinoic acid を使用した。さら

に、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 α および ROR γ に対する結合能は、 [3 H]25-hydroxycholesterol 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]25-hydroxycholesterol と ROR と共に binding buffer 中で混合し、インキュベートした。遊離の放射標識リガンドはデキストラン被膜活性炭により取り除いた。ROR β に対する結合能は、 [3 H] all-trans-retinoic acid を使用し検討した。化学物質の IC $_{50}$ 値 (放射標識化合物の受容体結合を 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 α 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 α 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1)。次に、結合試験系を構築するために ROR α と結合が報告されている 25-hydroxycholesterol 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] 25-hydroxycholesterol の特異的結合を十分量与える要件の設定に成功した。スキッチャードプロット解析を行った結果、 K_d 値は 15 nM であり、特異的結合は全結合の 60~70%あり、結合試験を行う

に十分と判断された。

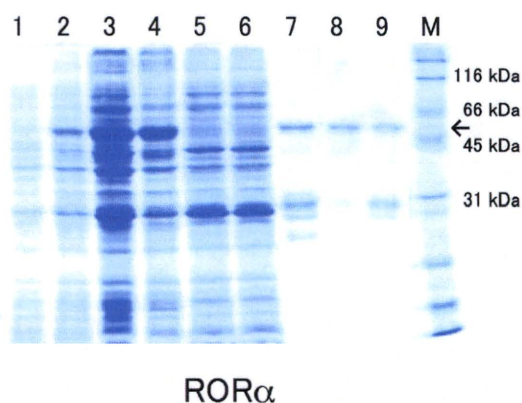


図2. ROR α の発現-SDS-PAGE解析

GST-ROR α -LBDの分子量は約54 kDa。

レーン1: IPTG発現誘導前、レーン2: IPTG発現誘導後、レーン3: ソニケーション後、レーン4: ペレット、レーン5: 上清、レーン6: 素通り、レーン7: 溶出、レーン8: ゲル残り、レーン9: 脱塩後、レーンM: 分子量マーカー

(2) 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 ^3H -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、 ^3H 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。

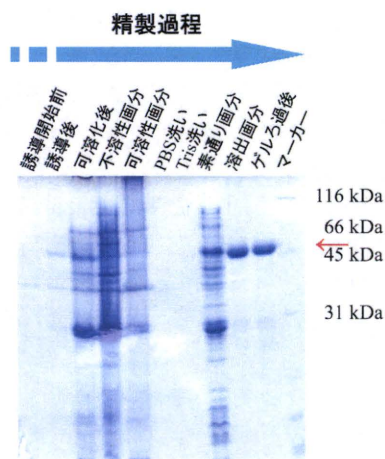


図3. ROR β の発現-SDS-PAGE解析

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 ^3H 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。

(3) ROR γ 受容体の発現と飽和結合試験

ROR α と同様にヒトのcDNAライブラリーからクローニングよりROR γ 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、結合試験系を構築を25-hydroxy-cholesterolの ^3H -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することで行った。その結果、 ^3H 25-hydroxy-cholesterolの特異的結合を十分量与える要件の設定に成功した。

スキッチャードプロット解析を行った結果、 K_d 値は16 nMであり、特異的結合は全結合の70~80%あり、結合試験を行うに十分と判断された。

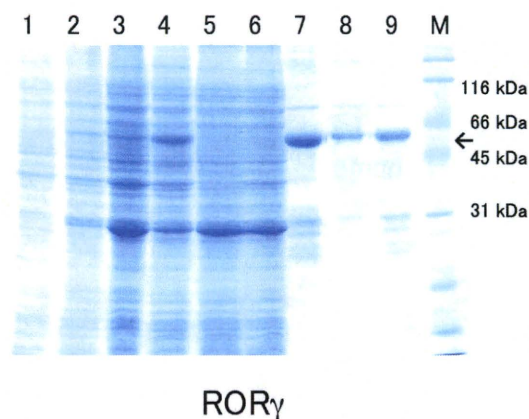


図4. ROR γ の発現-SDS-PAGE解析

GST-ROR γ -LBDの分子量は約54 kDa。

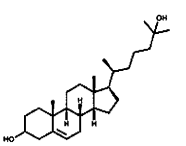
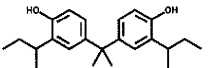
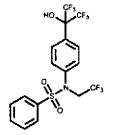
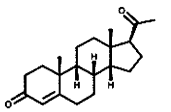
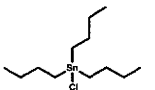
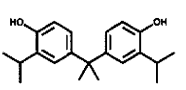
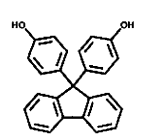
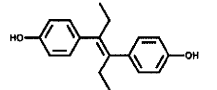
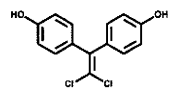
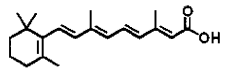
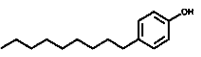
各レーンは図と同じ。

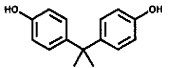
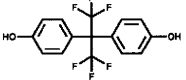
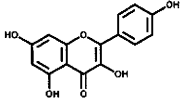
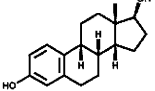
(3) ROR α および γ 受容体に結合性を示す化学物質のスクリーニング

結合試験に必要なGST-ROR α -LBDおよびGST-ROR γ -LBDが十分量確保できたことにより、 ^3H 25-hydroxycholesterolを用いて様々な化学物質、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、種々の化学物質について受容体競争結合試験によるスクリーニングを行った (表 1)。

表 1. ROR α , γ の結合競争試験

chemical	structure	IC ₅₀ (nM)	
		ROR α	ROR γ
25-hydroxycholesterol		~100	~100
2,2-bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane		~100	~150
T0901317		~1000	14
progesterone		~100	N.D.
tributyltin chloride		N.D.	>1000
2,2-bis(4-hydroxy-3-isopropylphenyl)propane		N.D.	N.D.
9,9-bis(4-hydroxyphenyl)fluorene		N.D.	N.D.
diethylstilbestrol		N.D.	N.D.
bisphenol C		N.D.	N.B.
all-trans retinoic acid		N.D.	N.B.
4-nonylphenol		N.B.	N.B.

bisphenol A		N.B.	N.B.
bisphenol AF		N.B.	N.B.
kaempferol		N.B.	N.B.
17 β -estradiol		N.B.	N.B.

その結果、既知の 25-hydroxycholesterol は ROR α および ROR γ に高い結合能を持つことが分った。一方、ビスフェノール A に類似の構造を有する 2,2-bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane も 25-hydroxycholesterol より若干弱いながら ROR α および ROR γ の両方に結合性を示した。また、既報の合成リガンド・T0901317 は ROR γ に強く結合することが確認された。黄体ホルモン・プロゲステロンは ROR α にのみ結合性を示した。トリブチルスズは ROR γ にのみ非常に弱く結合した。しかしながら、他の化学物質で ROR α および γ に顕著な結合性を示すものは見いだされなかった。特に、ROR γ への結合性が報告されていた all-trans-レチノイン酸については、明確な結合性は確認されなかった。

(4) ROR β 受容体に結合性を示す化学物質のスクリーニング

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、³H]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 2)。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。

表2. ROR β の結合競争試験結果(1)

Chemicals	IC ₅₀ (nM)	
all- <i>trans</i> retinoic acid (ATRA)	441	± 68
13- <i>cis</i> 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- <i>cis</i> retinoic acid	N.B.	
bisphenol F	N.B.	
D- α -tocopherol	N.B.	
corticosterone	N.B.	
sitosterol	N.B.	
2,2'-dihydroxydiphenylmethane	N.B.	

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3)。

表3. ROR β の結合競争試験結果(2)

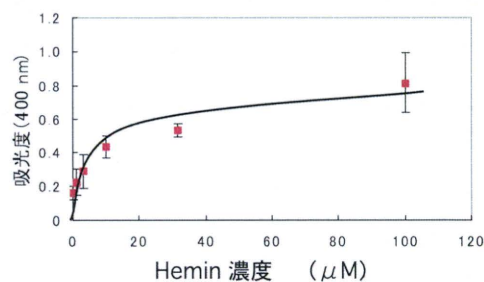
Chemicals	IC ₅₀ (nM)	
all- <i>trans</i> retinoic acid (ATRA)	441	± 68
4-dodecylphenol	2,660	± 520
4-nonylphenol	2,500	± 380
4- <i>tert</i> -octylphenol	2,180	± 650
4- <i>n</i> -octylphenol	N.D.	
4-heptylphenol	N.D.	
4-hexylphenol	N.D.	
4- <i>tert</i> -amylphenol	N.D.	
4- <i>tert</i> -butylphenol	N.D.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

(5) 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。

Rev-erb- α



Rev-erb- β

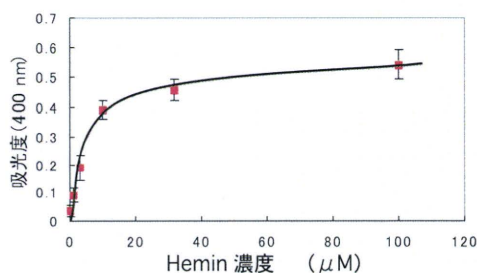


図5. Rev-erb α および β へのヘム結合性

(6) 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 α およびROR γ に対する結合競争試験系の確立に成功したため、化学物質の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極めて強力な結合性を示す化合物は見つからなかったが、ビスフェノール類・2,2-bis(3-*sec*-butyl-4-hydroxyphenyl)propaneが結合性を示したことは興味深い。また、別のトレーサーを用いるROR β に対する結合競争試験系の確立にも成功したため、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も注目された。

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。

今後は、結合性を示した化学物質の生物活性を同定することが必要であり、また、本研究で確立した試験法を用いスクリーニングに供する化学物質の数をさらに増やし、未知の結合性を有する化学物質を同定する予定である。

E. 結論

ROR α 、 β 、 γ に対する結合競争試験系の確立に成功した。また、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。現状においては、極めて強く結合する化学物質は発見されなかったが、ビスフェノール類など結合性を示すものが見いだされたため、今後、さらなる内分泌攪乱作用を精査する必要性が確認された。

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 Letters*, 15, 290-296, (2008).
2. 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).
3. 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. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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