

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.

11. 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。

12. 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。

13. 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。

14. 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。

15. 縄司 奨、野瀬 健、酒井 大樹、錦織 充広、下東 康幸、核内受容体・レチノイド受容体 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。

16. 巢山慶太郎、劉 暁輝、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 2010,12,16-17。

17. 錦織充広、野瀬 健、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体 RORs に特異的に結合するジ-sec-ブチルビスフェノールA 環境ホルモン学会 第13回研究発表会 2010,12,16-17。

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

核内受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ

分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院准教授

研究要旨

一般に核内受容体は、リガンド非結合（アポ型）、アゴニスト結合（ホロ型）、アンタゴニスト結合（ホロ型）の3つの状態において、それぞれ特有の立体構造を持ち、それらのコンホメーションが互いに異なることが知られている。特に、リガンド結合部位のC末端に存在する第12番目のヘリックスの位置取りに大きな差違が見られる。ヒトに存在する48種類の核内受容体それぞれにおいても、異なる3種のコンホメーションが存在すると想定されている。我々は、受容体のアポ型からホロ型へのコンホメーション変化、特に第12ヘリックスの構造変化を抗体で感知・センシングする方法を用いることにより、化学物質の核内受容体への結合、および、その結果引き起こされる内分泌かく乱作用のリスク評価に資するデータを得ることができることを見出した。このセンシング法の最も重要な分子ツールは、受容体のコンホメーション変化を高感度で感知するセンシング抗体である。本分担研究では、センシング抗体アッセイをさらに最適化するために、これまでに作製したセンシング抗体の中でセンシング能が良好でないものを改良するため、新たなエピトープ作製を行い、それを用いた抗体の作製を実施した。また、第12ヘリックスを持たない核内受容体 Rev-erb に対しても、第11ヘリックスC端部分を代りにエピトープとして用いることによりセンシング抗体の作製を試みた。

A. 研究目的

一般に、核内受容体は生体内に存在するさまざまな生理活性を持つホルモンや化学物質などのリガンドと特異的に結合することで多様な作用を引き起こす。すなわち、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である。現在、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ている。今日においては、それらの核内受容体すべてに対する特異的リガンドが判明してはいないが、それらの立体構造およびアミノ酸配列解析の結果から、それらすべての核内受容体においてリガンド既知のステロイドホルモン受容体の活性化機構と類似の活性化機構が存在することを示唆されている。このため、従来化学物質による攪乱が懸念されてきた性ホルモン受容体に加え、それらすべての核内受容体に対しても未知の環境化学物質が結合し、

転写活性に影響を与える危険性が想定され、それらのリスクを正確に評価する必要性が生じた。

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は、互いに高いアミノ酸配列相同性を示す。また、核内受容体は共通構造として5つのドメイン構成からなる。それらのドメイン構造は大きくA～E領域に分けて考えられており、一般に、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領域・リガンド結合ドメイン（Ligand Binding Domain: LBD）で生じると考えられている。（図1）

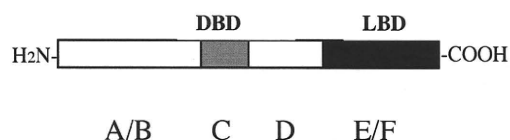


図1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

この LBD 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。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において、活性化にリガンドを必要とする受容体の LBD では次のような立体構造の変化が推定されている。リガンドが LBD に結合することに伴い、第 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。

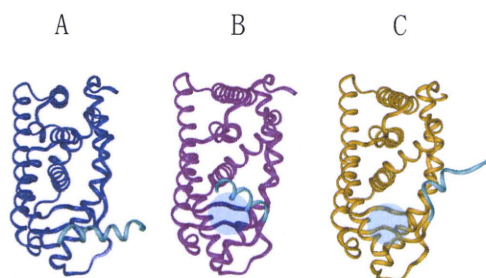


図 2. リガンド結合に伴う核内受容体の構造変化
A: リガンド未結合、B: アゴニスト結合、C: アンタゴニスト結合、
第 1 2 ヘリックスは水色で示す。

そこで、この第 1 2 ヘリックス部分の特異的に認識する抗体を作製することにより、化学物質の受容体結合を評価することが可能となり、我々はこれまでに幾つかの核内受容体系での成功例を既に報告した。本研究では、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核内受容体、SF1 および GCNFI のポリクローナル抗体作製を行った。

一方、核内受容体 Rev-erb は第 1 2 ヘリックスを欠くという、構造的な特徴を有している。Rev-erb では、通常核内受容体の LBD の C 端部分に存在する第 1 2 ヘリックスの代りを、第 1 1 ヘリックスの C 末端部分が果たしていると考えられている (図 3)。

そこで、この第 1 1 ヘリックスを特異的に認識し、かつその構造変化を検知可能な抗体、センシング抗体を作製して新規な Rev-erb における結合性化学物質のスクリーニング法を構築することとした。なお、これまでも Rev-erb に対するセンシング抗体の作製は試みられており、本研究では、センシング抗体の構造変化識別能をより高めることを目指した。

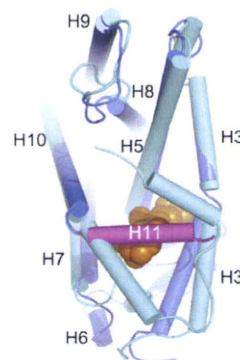


図 3. 第 12 α ヘリックスを欠損した Rev-erb β -LBD の立体構造

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 立体構造データの検索と入手

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

② 受容体構造の解析

PDB より入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム InsightII / Discover (Accelrys 社製) で解析した。

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

ブ部位の決定

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

⑤ 抗原ペプチドの合成

SF1、GCSF1 では、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、Rev-erb では第 11 ヘリックスの C 端部分、それぞれに相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、このペプチドを Fmoc 固相法による自動固相合成機・ABI433A によって合成した。タンパク質担体との結合のために、抗原配列中にシステインを持たないペプチドの N 末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8$ cm, $l = 75$ cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e), $\phi = 25$ cm x 250 mm) により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析により行った。

⑥ 架橋試薬のキャリアタンパク質 KLH への結合

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

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

⑦ エピトープペプチドの KLH への結合

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

⑧ ウサギへの免疫

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

⑨ 抗体の精製

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

⑩ 免疫沈降

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

⑪ アフィニティ精製

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

⑫ ELISA 法による抗原ペプチド応答性の確認

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-ethylbenzthiazoline-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。

⑬ 調製した抗体の受容体に対する応答の解析

調製した抗体の Rev-erb に対する応答を競合 ELISA により調べた。Rev-erb (0.01~10 μ g) を用いて、イムノプレートに固定した抗原ペプチド (0.5 μ g/ml, 50 μ l/well) との ELISA を実施した。ELISA は⑫で記載したと同様の方法を用いた。

⑭ センシングアッセイ

Rev-erb (0.01~10 μ g, 90 μ l) に対して、Rev-erb に対して結合性を有することが確認されている化学物質 2 種・ヘミンおよび GSK4112 (10 μ M, 10 μ l) を室温で 1 時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製した。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイログロブリン (bthG) に結合した抗原ペプチドをイムノプレートに吸着させ、室温インキュベート後、洗浄し、ブロッキングを行った。リガンド受容体複合体溶液を移した 96 穴イムノプレートにセンシング抗体溶液 (10 μ l/well) を加えて 4 $^{\circ}$ C で終夜反応させた。溶液を一括除去により捨て、プレートを洗浄後、HRP 標識 2 次抗体溶液 (50 μ l) を加えて室温で 1 時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTS を基質とした酵素反応により溶液を発色させた。405 nm の吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

リガンドの濃度変化は、ヘミンおよび GSK4112 の濃度を 10^{-10} ~ 10^{-4} M の間で変化させて調べた。

(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。

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

C. 研究結果

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

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

その結果、SF-1 においては、抗体価の有為な上昇が見られ、抗体の作製に成功した事が確認された (図 4)。

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

SF-1	CNEMPRNLLI <u>E</u> MLQAKQ
GCNF1	QLPLLFKVVL <u>H</u> SKTSVKG
GCNF1S	CQLPLLFKVVL <u>H</u> SSKTSVKG

一方、GCNF1 においては、再度の免疫後も有為な抗体価の上昇がほとんど見られなかった。そこで新たに、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ー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、ウサギに免疫した。その結果、調製されたポリクローナル抗体には、図 5 に示すように、抗原ペプチドに対する力価が確認された。

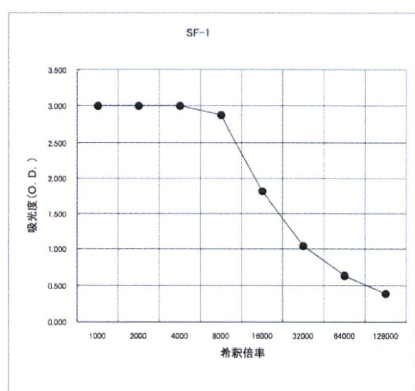


図4 ウサギ由来抗 SF-1 ヘリックス 1 2 ポリクローナル抗体の力価の検討

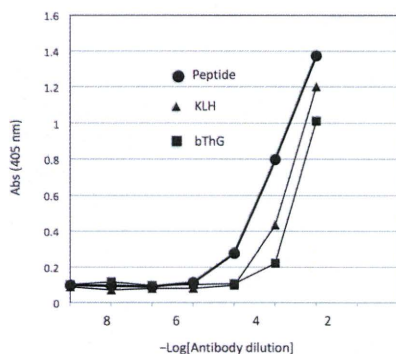


図5 ウサギ由来 GCNF1-抗ヘリックス 1 2 ポリクローナル抗体の力価の検討

Rev-erb には 2 種類のサブタイプ α と β が存在している。これまでの研究で、それぞれの LBD の C 末端部分に対して抗体作製のためのエピートープを設定し、抗体を作製した (図 6 : α 、 β それぞれの # 1 に相当)。# 1 に

おいては、第 1 1 ヘリックス全体を抗原部位として用いていたが、今回、よりコンホメーション変化を鋭敏に検知できるよう、LBD の C 末端部分のみをエピートープとした # 2 および # 3 を抗原とした。特に、より C 端部に特化した、# 3 では、AsnAsnMet (アミノ酸 3 文字標記) のアミノ酸配列をグリシン (Gly) で置換し、より C 末端部分の認識性を高めた。

Rev-erb α

α #1 --KLPDLRLNNMHSEKLLSFRVDAQ--

α #2 -----GGGHSEKLLSFRVDAQ--

α #3 -----NNMHSEKLLSFRVDAQ--

Rev-erb β

β #1 --KLPDLRLNNMHSEELLAFAKVHP--

β #2 -----GGGHSEELLAFAKVHP--

β #3 -----NNMHSEELLAFAKVHP--

図6 Rev-erb α および β に対するセンシング抗体作製のためのエピートープ

アミノ酸 1 文字標記。

下線部はヘリックス構造領域。

本研究では、図 6 に示す 6 種類のエピートープのうち # 2 および # 3 の 4 種類をエピートープとして調製後、それぞれをペプチド合成、ウサギに免疫することで抗体を作製した。その結果、すべての抗体を得ることができた。

Rev-erb α -# 2 を抗原とした抗体は、図 7 に示すように高い受容体認識能を示すことが ELISA アッセイによって確認された。

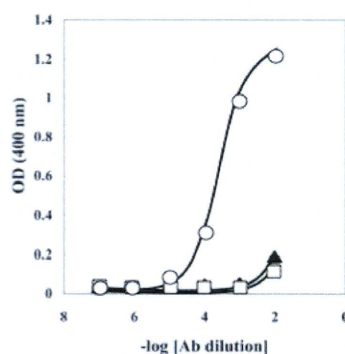


図7 Rev-erb α -# 2 の受容体認識

(\blacktriangle) KLH, (\square) bthG, (\circ) bthG-MB-Rev-erb α .

今回作製した抗体 4 種類はすべて受容体タンパク質に対して高い認識能を示した。これらについて、Rev-erb に対するリガンド

結合を識別するセンシング能があるか検討を行った。その結果、Rev-erb α -#2 抗体においては、顕著なセンシング能があることが確認された。リガンドフリーのアポ型受容体に比べ、Rev-erb のリガンド、ヘミンおよび GSK4112、それぞれと結合したホロ型受容体に対する抗体の認識能に大きな差が確認された (図 8)。

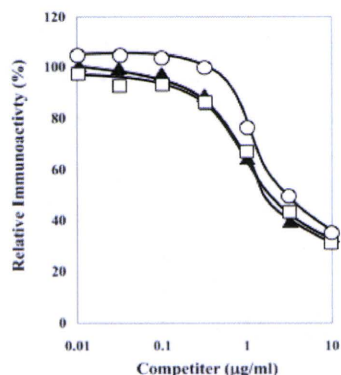


図 8 Rev-erb α -#2 抗体のセンシング能
○ : APO、▲ : ヘミン結合、□ : GSK4112 結合

この試験系においてリガンド濃度を変化させたところ、図 9 に示すように濃度依存的な抗体応答性が確認された。このように Rev-erb に対する化学物質の結合性を今回作製したセンシング抗体により解析することが可能となった。

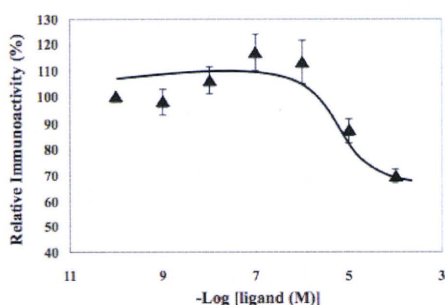


図 9 Rev-erb α -#2 抗体のセンシング能 : リガンド濃度変化
Ligand:ヘミン結合 (▲)

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 および Rev-erb に対してはヘリックス 11 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した。これらのヘリックス 12 近傍をエピトープとして作製したセンシング抗体は全般的に充分構造変化認識プローブとして機能しており、本調製法の有用性が確認された。

E. 結論

本分担研究により、従来行われてきた研究と合わせて、ヒトに存在する 48 種類の核内受容体に対して、抗ヘリックス 12 ポリクローナル抗体が核内受容体に対するコンホメーションセンシング抗体として作製された。これらにより、ヒトにおけるほとんどすべての核内受容体に対して、センシング抗体アッセイの構築が可能となった。

F. 研究発表

論文発表

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

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、特になし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

ファージディスプレイ法によるヒト核内受容体 48 種
センシング抗体の作製

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

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

我々は、核内受容体断片ペプチドを抗原とした動物免疫によって、コンホメーションセンシング能を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製に成功し、それを用いた内分泌かく乱作用性の簡便な評価系構築に成功している。しかしながら、動物免疫を経る抗体作製法では、① 経済的・時間的なコストが高い ② 核内受容体のように

哺乳類間で高度に保存された分子への高親和性抗体を得ることは困難 ③ 免疫動物体内での強力な取捨選択により、得られる抗体の抗原認識および機能の多様性が低い などの問題を内包しており、48 種という数多くの核内受容体についてセンシング抗体を得る上では大きなネックであった。

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

本研究では、これまで、生体内のほぼ全ての細胞で発現する一般的な核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) についてセンシング抗体の作製を行ない、抗体選別操作に適切な抗原ペプチドをデザイン・使用することで目的の結合特異性を持つ抗体を選別することが可能であることを示し、実際にセンシング抗体を得ることに成功した。さらに、本手法を ER α に展開する際には、バイオパンニング (抗体選別操作) のスキームを確立させ、ファージディスプレイのメリットである「迅速な抗体作製」すなわち、多くの抗原についての抗体作製を同時並行に行う系の確立を行った。これにより、昨年度までに、ステロイドホルモン受容体 9 種に対してバイオパンニングを展開した。

しかしながら、センシング抗体法によるアッセイのためには、ファージ抗体 (ファージに scFv が結合した状態) ではなく、scFv (単鎖可変抗体) に変換して行わなければならない。その理由は、ファージそのものが非常に大きいため、抗体の機能としては物理的に不安定な状態となるからである。scFv への変換は、大腸菌を使ったタンパク質発現の要領で行うことができる。つまり、得られたクローン由来の scFv を大腸菌内で発現すれば良い。そこで、ER α のバイオパンニングによって選別されたファージ抗体から scFv の作製を試みた。しかしながら、昨年度までに scFv として機能するクローンは 1 つも得られて

いない。一般的に、得られた scFv がファージとの融合タンパク質として機能を発揮していたとしても、それらが単独で機能するとは限らないと報告されている。特に scFv の発現においては、封入体 (不溶性タンパク質) を形成したり、発現しても scFv 単独で安定な構造をとることができず、重合体を形成するなどの問題に遭遇することが多い。

そこで、平成 19 年度の研究においては、確実に機能的な scFv を得ることを目的に、スクリーニング手法の改良を行った。具体的には、スクリーニングによって得られたクローンから scFv を発現するのではなく、単独で機能的に発現することが可能な scFv を提示したクローンをスクリーニングすれば良いと考え、「scFv スクリーニング」という手法を新規に考案し、確立した。これにより、きわめて高い確率で機能的な scFv を得ることができるようになり、ファージディスプレイによるモノクローナル抗体作製系の技術は、ほぼ完成に至った。

モノクローナル抗体によるセンシングアッセイは、ポリクローナル抗体によるセンシングアッセイの高効率化を目的としており、ポリクローナル抗体でのセンシングアッセイが不可能な場合や、より高感度な検出抗体が必要である場合、アンタゴニスト応答を特異的に検出する必要がある場合等に適宜テラーメードに作製する必要がある。つまり、ポリクローナル抗体での結果と並列して抗体の作製と抗体機能の評価を行う必要がある。この点において、平成 19 年度までに、ポリクローナル抗体の作製を終えている RAR

表 1. センシング抗体 (scFv) 作製に使用したエピトープ配列

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

青字で示すのは、X線結晶構造解析から同定された、ヘリックス 12 部位

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 \cdot 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。

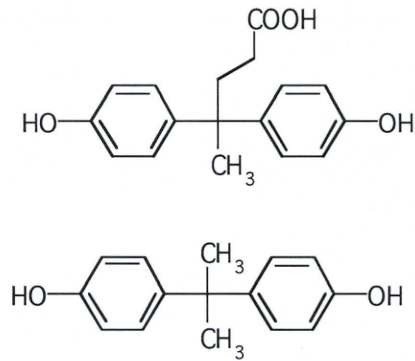


図 1. ジフェノール酸 (上) とビスフェノール A (下) の構造

(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。

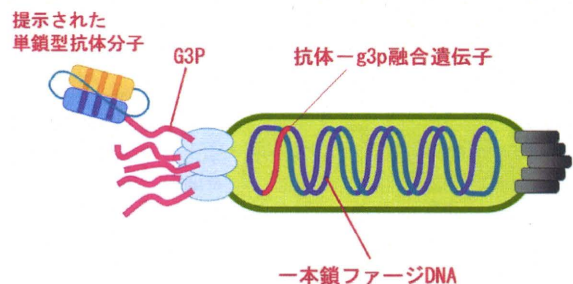


図 2. ファージ抗体の構造

(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 µg/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ー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×TY培地(含1%グルコース)に植菌して

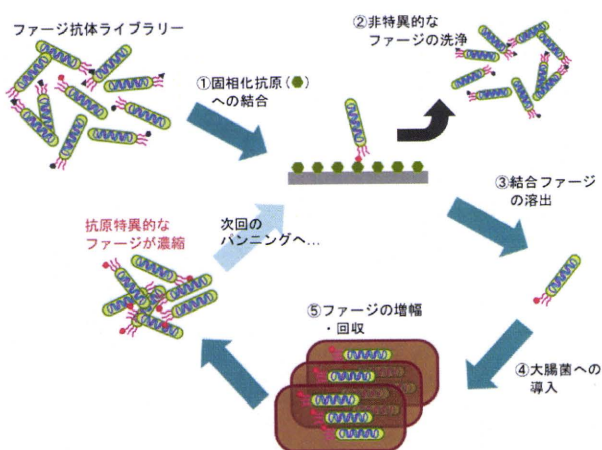


図3. バイオパンニング

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×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×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 µg/mlとし、3回目には10 µg/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 µg/mlを固定化抗原としたscFv-ELISAを行った。まず、各100 µlの2×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×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×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 (サブプレッサー株) から HB2151 (非サブプレッサー株) 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。

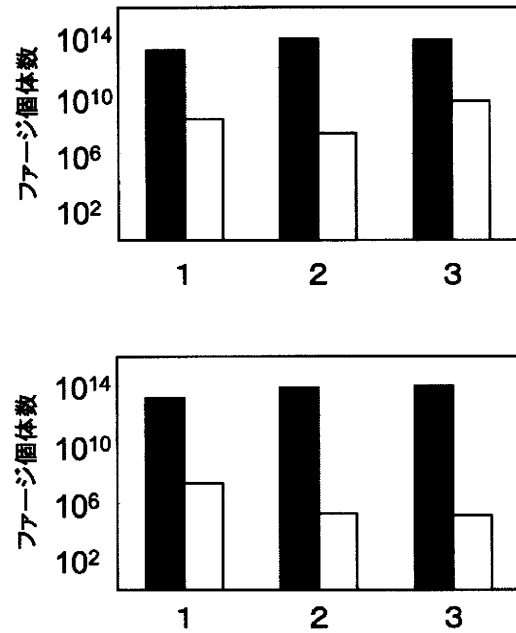


図 4. バイオパンニングによるファージ個体数の変化とファージ回収方法の検討結果
上図がトリプシン消化による回収、下図が BPA 競合法による回収。(■) バイオパンニングに使用したファージの個体数、(□) バイオパンニング後に回収されたファージの個体数。

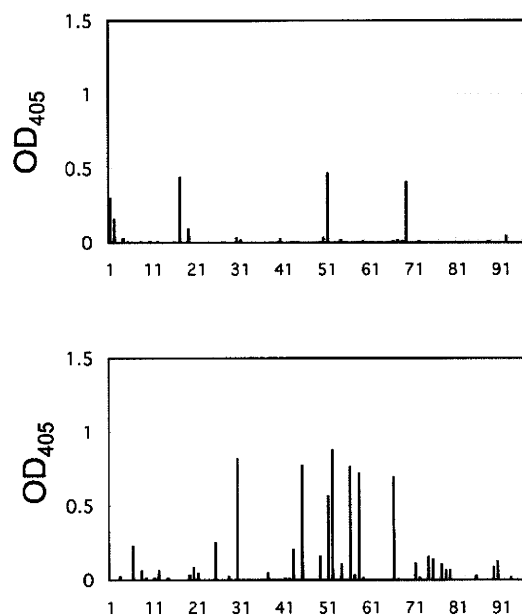


図 5. scFv-ELISA の結果
値はキャリアタンパク質への認識力を差し引いた結果であり、BPA 構造の特異的な認識力を示す。
上図がトリプシン消化による回収、下図が BPA 競合法による回収での結果。

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、同時に多数の機能的 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

該当する情報はない。

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

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

研究分担者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院 助教

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

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

BPAは、1891年にロシアのDianinによ初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にはドイツのZinkeによる合成法の改良で、アセトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。BPAは、高分子ポリカーボネートプラスチックの原料として幅広く使用されており、身の回りに非常に多く存在する一方、代表的な内分泌かく乱物質としても知られている。BPAを原料としたプラスチックには、高分子化されずに残留するBPA単量体が極微量ながら存在し、これを取り除くことが困難であり、その漏出が問題になっている。したがって、「この低用量のBPAが内分泌かく乱作用を示す」ことが事実であれば、その影響ははかり知れないほど重大である。一方で、BPAは、女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされてきたが、BPAのERへの結合能、活性は、正常なホルモンであるエストロゲンに比べると1/1,000~1/10,000と非常に弱く、そのため、BPAは内分泌かく乱物質になり得ないとも議論されてきた。しかしながら、最近になって、BPAが規制値 (2.5~3.0 ppm) よりはるかに濃度が低い「低用量」で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼす、という報告が相次いだ。このようなBPAの低用量作用のメカニズムは不明であり、「低用量問題」として議論が続いている。こうしたなか、我々は、低用量問題の本質がERを介さない別の経路 (別の受容体) にある可能性を考えて研究を展開し、「BPAは、ERではなく、エストロゲン関連受容体 γ 型 (estrogen-related receptor γ ; ERR γ) に強く結合する」ことを発見した。

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

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

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

B. 研究方法

(1) 受容体 ERR γ の調製

ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて ERR γ の LBD 領域のクローニングを行った。得られた PCR 産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いて ERR γ -LBD の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製後、Sephadex G-25 によるサイズ排除クロマトグラフィーにて精製を行った。

(2) レポーター遺伝子試験

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

(3) 酵母 two-hybrid 試験

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

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

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

(4) 哺乳類培養細胞 two-hybrid 試験

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

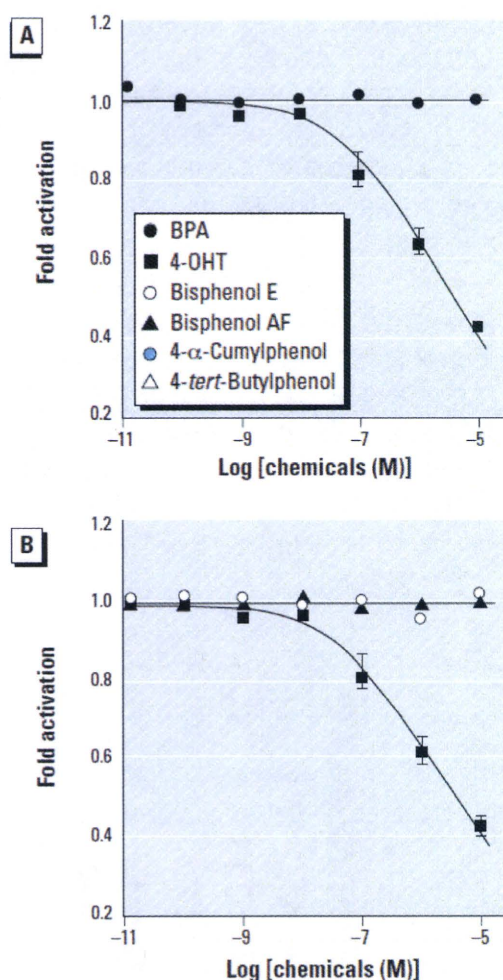


図 1(A, B). レポーター遺伝子試験①

BPA は ERR γ に結合しても基盤活性に影響を与えない。4-OHT はインバースアゴニストとして機能する。試験化合物はすべて基盤活性に影響を与えなかった。

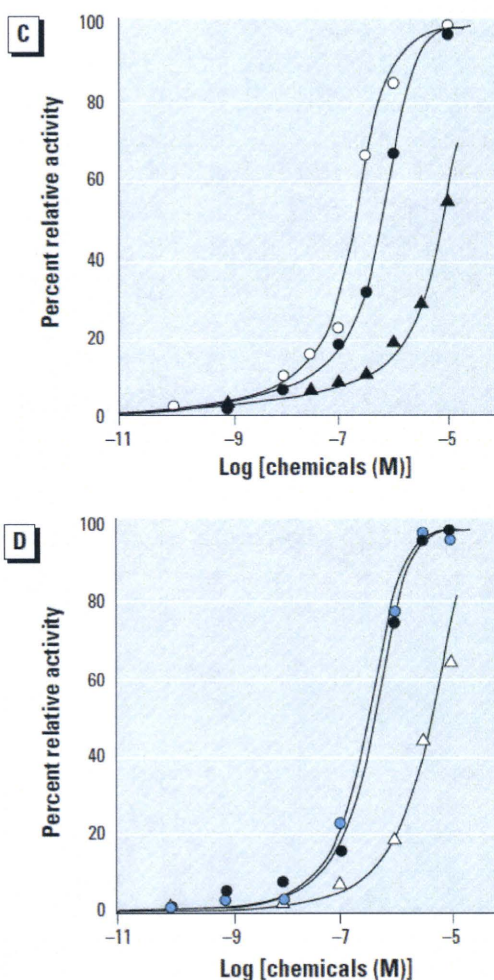


図 1(C, D). レポーター遺伝子試験②

4-OHT 存在下 (活性を下げた状態) で、試験化合物による活性の変化を測定した場合、インバースアンタゴニスト活性が観測された。

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

C. 研究結果

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

ERR γ への結合が確認された化合物の中から、BPA、BPE、ビスフェノールAF (BPAF)、4- α -クミルフェノール、4-*tert*-ブチルフェノールについて、レポーター遺伝子アッセイによる活性の評価を行った。既に報告の通り、BPAはERR γ の基盤活性に影響を与えず、レポーター遺伝子の変化量は見られなかった。また、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT)は基盤活性を下げるインバースアンタゴニスト活性を示した。試験に使用した化合物は全て、ERR γ の基盤活性を変化させず、BPAと同じ性質であることが判明した(図1A, B)。また、1 μ Mの4-OHT存在化で試験化合物によるリガンド応答を測定したところ、4-OHTで不活性化された基盤活性が、リガンド濃度依存的に回復した。つまり、これらの化合物もBPAと同様に、インバースアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。インバースアンタゴニスト活性の強さは、各化合物の結合親和性の強さに相関しており、BPEで最大の活性を示した。

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

測定

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

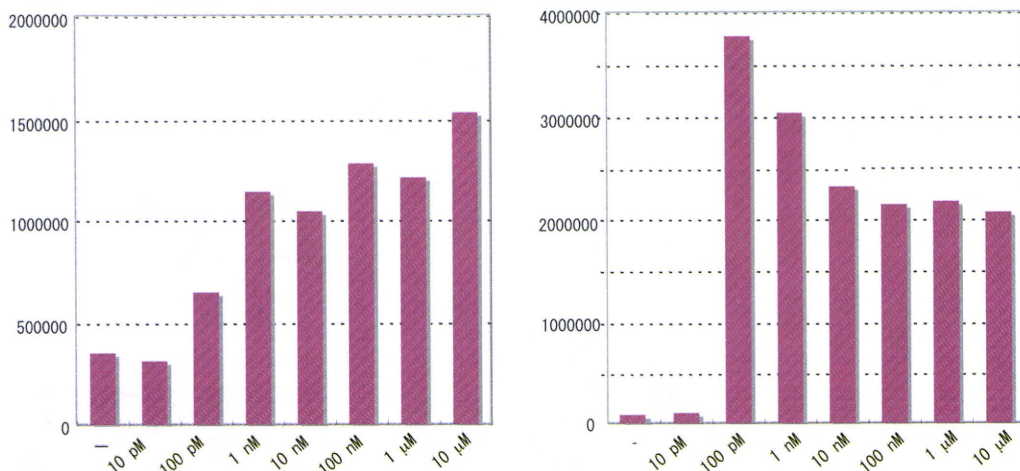


図2 酵母 AH109 と Y187 を用いた場合のエストラジオール濃度依存性

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

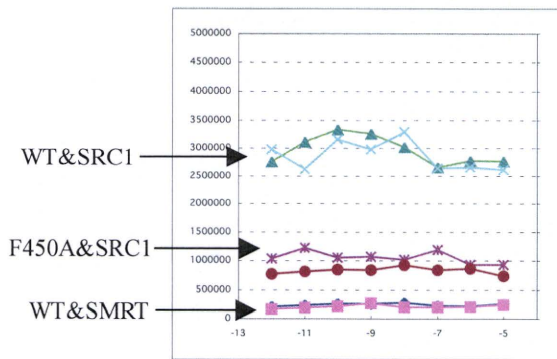


図 3. 野生型 (WT) および変異体とコアクチベータ SRC1、コリプレッサー SMRT の相互作用

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

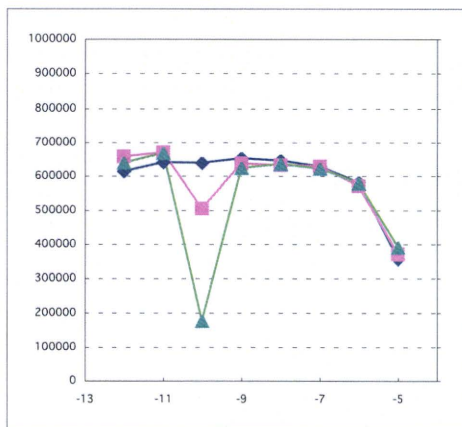


図 4. F450A 変異体と SRC1 の組み合わせによる 4OHT の活性抑制

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

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

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

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

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