

内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨 内分泌攪乱物質は、ホルモン(エストロゲン、アンドロゲン、etc.)受容体に結合してその作用を現する。ホルモン受容体は、リガンド依存的な構造変化を引き金にその転写因子機能を発現する。個々のリガンドの生体作用は、そのリガンドが結合した受容体構造と関連している。本研究では、内分泌攪乱物質の生体内作用のメカニズムの解明と結果の 3D-QSAR への応用を目的として、リガンド(および内分泌かく乱物質(EDCs))結合が受容体構造に及ぼす影響を検討するため、バイオセンサーを用い、エストロゲンレセプターとそのレスポンスエレメントとの相互作用の速度論的解析を行った。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質(EDCs)の生体への影響については、いまだ不明の部分が多くあるが、化学物質の多くが、エストロゲンをはじめとするホルモン受容体結合活性を有し、またレポーターアッセイ系などでホルモン様もしくは抗ホルモン様作用を示すことから、EDCs は生体内においても主にはそれら受容体を介して内分泌攪乱作用を惹起すると考えられる。エストロゲン受容体(ER)を始めとするホルモン受容体は、いずれも共通にリガンド結合部位(LBD)、DNA 結合部位(DBD)、転写活性化部位から構成されている。リガンドの結合は、受容体の立体構造を変化させて様々な生体内作用の引き金となる。

生体内におけるホルモンの作用は多岐に渡り、たとえばエストロゲンのみについてもその作用の全ては今だ明らかではない。また、生体本来の内分泌系自体のレギュレーション機構についても、in vivo での膨大な研究があるにも関わらず不明の部分も多く存在するため、単一の指標を基に内分泌攪乱物質の生体作用を予測することは困難である。

受容体を介した生体内作用については、それらが結合した受容体構造と関連することが、これまでの研究により示唆されている。すなわち、ER 結合性を有し EDCs と疑われる化合物について、その結合が受容体構造に与える

変化より、生体内での作用をある程度予測することが出来る。ER のリガンド結合部位(LBD)近傍の構造変化に関しては、結晶化構造解析による立体構造データをもとに、未知化合物の結合性およびLBDの構造変化の予測がある程度可能である。しかし、その信頼性に関しては今のところ充分とは言えず、また他のレセプターに関してはそれさえも不可能である。さらに、受容体全体の立体構造は解明されておらず、LBD 以外の部位の構造変化を計算科学的に予測することは出来ない。一方、受容体の構造変化は、受容体とレスポンスエレメントやコファクター等との相互作用に変化を及ぼすことから、それら相互作用の変化より立体構造の変化を解析することが可能である。

そこで、本研究ではバイオセンサーを用いて ER・ERE 相互作用を測定することより、リガンド(および内分泌かく乱物質(EDCs))結合による受容体構造の変化を解析し、それらの化合物の生体内作用との比較より内分泌攪乱物質の生体内作用メカニズムを解明し、得られたデータより新規 3D-QSAR への応用を目的としている。

B. 研究方法

1、ERE 固定化センサーチップの作成

streptavidin をあらかじめコートしたセン

サーチップにエストロゲンのレスポンスエレメントを含むバイオチン合成オリゴヌクレオチド (5'- Biotin- tcgagcaaagtcAGGTCacagTGA CCTgatacat-3')をインジェクトして固定化し、引き続き、相補配列のオリゴヌクレオチドをインジェクトしてセンサーチップ上でアニーリングさせ、ERE センサーチップを作成した。

2、ER-ERE 相互作用の測定

リコンビナント Human ER α を Flow バッファーで希釈して、17 β -Estradiol(E2)もしくは、測定対象の化合物を混合し、氷冷下約1時間インキュベート後、上述の ERE センサーチップにインジェクトして、SPR 装置 (Biacore 3000, Biacore, Sweden)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。加える化合物濃度は、結合試験の結果をもとにした。

3、ER-ERE 相互作用の変化の速度論解析
リガンドの結合による ER-ERE 相互作用への影響を定量的に解析するため、結合解離過程の速度論解析を行った。化合物とインキュベートした ER サンプルを Flow バッファーで4～5段階に系列希釈して、ERE センサーチップにインジェクトした。得られたデータより、結合定数(kd)、解離定数(ka)および結合度(KA)を求め、結合したリガンドがそれぞれのパラメーターに及ぼす変化を検討した。なお、解析にはコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0)を用い、Langmuir 型 1 対 1 結合式によりパラメーターを算出した。

C. 研究結果

ER α は、リガンドの存在なしで ERE に対する結合活性を示す。17 β -Estradiol(E2)の結合により ERE への親和性は濃度依存的に増加した(図 1)。一方、対照として用いたアンドロゲンレセプターレスポンスエレメントや一本鎖 ERE を結合したセンサーチップに対しては、E2 結合、非結合 ER のいずれも結合しない事などから、ER が2本鎖 ERE を特異的に認識して結合する事が確認された。

エストロゲンアゴニストの DES や、Yeast や MCF-7 を用いた系でエストロゲン様作用が示されている Bisphenol-A(BPA)の結合によっても同様に ER-ERE アフィニティーの増大が示された。しかし、BPA や Gen が結合した ER では、E2 結合 ER に比べて、ERE からの解離が遅いことが示され(図 2)、それぞれの化合物が結合した ER における DBD 構造の違いが示された。一方、アンタゴニストである ICI-182,780 や 4OH-Tamoxifen では、ER の ERE からの解離が非常に遅くなることが示された(図 2)。また、ICI-182,780 と 4OH-Tamoxifen では、阻害の作用機序が異なっており、結果はそうした違いをも明確に反映するものと考察された。

一方、3D-QSAR によりエストロゲンレセプターへの結合が予測されたフラボン誘導体について同様の検討を行ったところ、いずれの誘導体とも、BPA 型の ER-ERE 相互作用の速度論的特徴を現すことが示された(図 3)。また、このときの ER-ERE アフィニティーは、COS1 細胞レポーターアッセイ系における転写活性化レベルと相関することが示唆された。

D. 考察

今回の結果より、ER-ERE 相互作用はリガンド依存的に変化し、生体内作用の異なる化合物では、その速度論的特徴が異なることが示された。特にアンタゴニストでは、アゴニストと比較してERのEREからの解離が遅く、この系を用いることでこれらを区別できる可能性が示唆された。また今回、アゴニストとして用いた BPA や Gen について ER の ERE からの解離が E2 に比べ遅い事が示された。これらの化合物はレポーターアッセイでは、E2 と同様の転写活性を示すが、in vivo では組織ごとに E2 とは異なる作用を示す可能性が示唆されている。さらに 3D-QSAR でセレクトされたフラボン類について BPA と同様の結果が示された。これらの化合物の in vivo でのデータは無いが、BPA もしくは Gen 様の作用を

示す可能性がある。ER-ERE 相互作用の変化はリガンド結合によるERのDBD構造の変化を示しており、今回の結果は、その変化がリガンド特異的であることを示している。作用の異なるリガンドの結合による受容体(ER)構造の差について、これまでに LBD に関しては、E2 と 4OHT 結合 ER・LBD の結晶解析などにより示されている。一方、DBD に関してはゲルシフトアッセイなどの結果からリガンド依存的な変化は、ほとんど認められないとされている。しかし、今回、ER へのリガンド結合による構造変化が、LBD 近傍構造のみではなくDBD 構造、おそらくは受容体全体、にまで及んでいる事が示された。またさらに、その構造的特徴がリガンドとして結合した化合物の生体内作用との相関が示唆された。

本研究に用いたバイオセンサーでは、生体物質の相互作用を速度論的に解析する事が可能であり、これまでの結合度のみを対象とする他の系に比較してより詳細な検討を行えることを特徴としている。この方法によれば、ホルモンレセプターを介したシグナル伝達系各ステップに対する、内分泌攪乱化学物質の mode of action を解析する事が可能であり。今後、ERE のみでなく co-factor との相互作用などの検討をあわせ、受容体全体構造への影響から、化合物の生体への本質的影響の予測を可能にできるものと考察された。

E. 結論

化学物質による受容体を介した生体作用は、その受容体結合により惹起される。受容体の立体構造変化は、他の生体分子との相互作用に影響することから、その立体構造は結合した化学物質の生体作用を反映することがこれまでにも指摘されてきており、今回の結果においても、化合物が結合した ER の構造のプロパティーは生体内作用の予測に有用な情報を与えることが示された。

現在のところ、ER 全体の3次元構造は不明であり、計算科学的手法による 3D-QSAR では計算モデルとなる情報を必要とするため、

LBD のみを対象にその構造変化を検討可能である。しかし、今回の結果はリガンド結合による影響がDBDにまで及び、ER 全体構造に及ぼす影響の検討が必要である事をしめしている。本研究による方法では3次元構造そのものを決定することなく、実験解析的にレセプター構造に関するプロパティーを求め、得られた各パラメーターと生体内作用とのリレーションを構築するにより、化合物のホルモンレセプターシグナル伝達系各ステップに対する修飾を検討することが可能である。

本研究から得られる知見は、単に化学物質の内分泌攪乱作用を予測するものではなく、生体への本質的影響までを予測可能にし、またさらに動物試験などのデータと組み合わせ、得られた情報を計算科学的解析にフィードバックすることで、新規 3D-QSAR の発展に寄与すると結論づけられた。

F. 研究発表

学会発表

A.Ono, M.Yamamoto, A.Takagi, J.Kanno, and T.Inoue, Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) American Association of Cancer Research special conference on The Steroid Receptor Superfamily, 1999.

A.Ono, J.Kanno and T.Inoue, Differences of Estradiol and non-steroidal agonists and/or antagonist effects on the estrogen receptor and estrogen response element interaction kinetics. Keystone Symposia conference on Endocrine Disruptors, 1999.

A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology

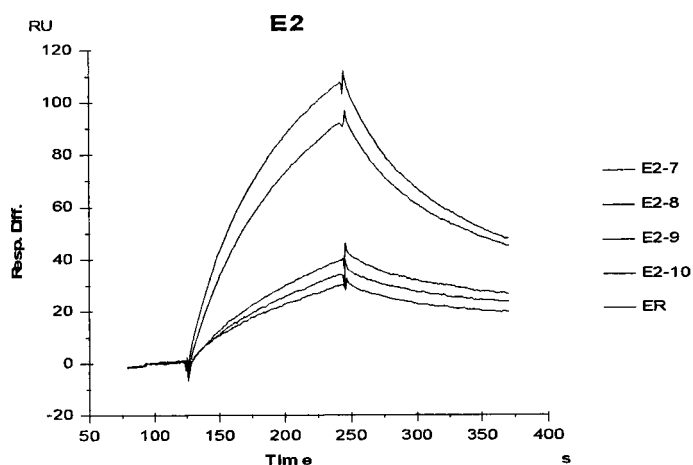


図 4 ER-ERE 相互作用における 17 β -Estradiol(E2)濃度依存性

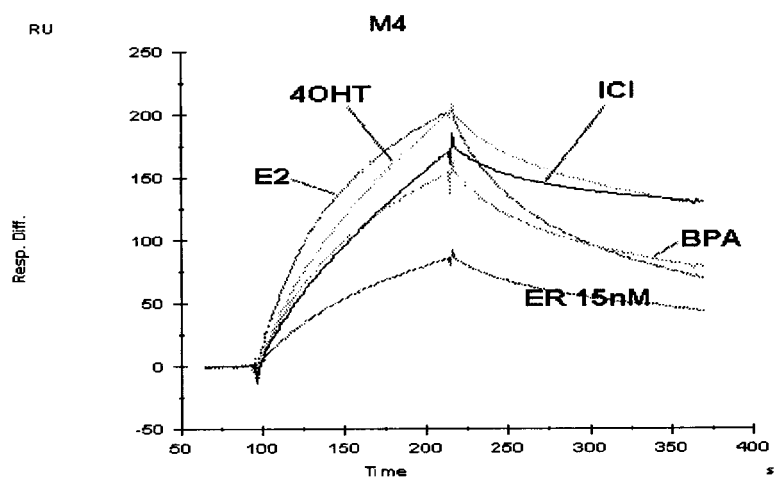


図 2 化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)の結合による ER-ERE 相互作用の変化: 結合した化合物に特異的な相互作用から、それぞれの化合物が ER 立体構造に及ぼす変化の違いが示された。

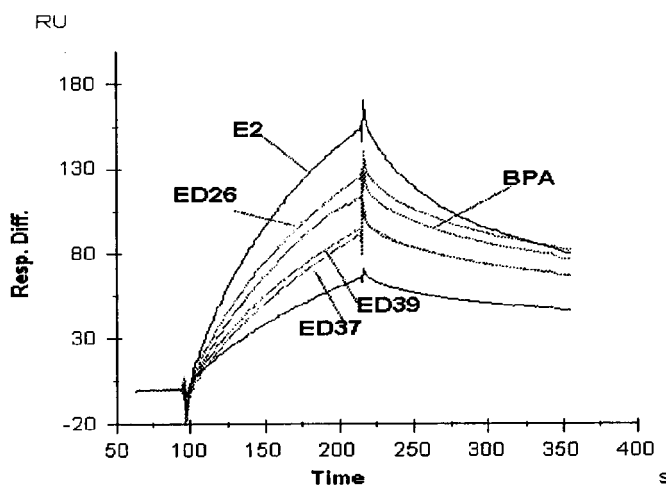


図 3 3D-QSAR で活性が予想された化合物(ED26,37 および39)の ER-ERE 相互作用への影響: いずれも BPA に近い変化を示した