

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

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 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

ホルモンレセプターシグナル伝達系の作用メカニズムを応用した内分泌攪乱物質の新規高速分析系開発のため、エストロゲン様作用物質および抗エストロゲン作用物質のエストロゲンレセプター(ER)への結合が ER におよぼす影響を表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサーを用いて解析した。リガンドのエストロゲンレセプター(ER)への結合は、ER とそのレスポンスエレメント(ERE)との相互作用を変化させた。このとき ER-ERE 相互作用の速度論的特徴は、リガンドとして用いた化学物質の生体内作用と関連した。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質のについての対応は、その候補物質であるホルモン作動性化学物質がすでにヒトを取り巻く環境中に存在し、日常的に暴露されていると考えられるものも含まれている事などから緊急性を有している。同時にその影響の大きさから科学的に裏付けられた厳正な対応の必要性が求められている。

しかし、一方で生体本来の内分泌系自体の機能やレギュレーション機構については、これまで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。結果として、これまでに様々な化学物質についてその内分泌攪乱性が指摘されているが、それらの生体へ及ぼす真の影響やその危険性については依然不明のままである。想定される化学物質による内分泌かく乱のメカニズムは様々で、例えば内因性ホルモンの生合成、代謝系、フィードバックに影響を与えることによって内分泌系はかく乱される。しかし、多くの化合物について、すでにエストロジェンを始めとしたホルモン受容体との結合性が示されており、それらの化合物ではレセプターとの結合を介してその作用を惹起すると考えられる。エストロジェンを始めとするホルモンは、その「特異的」レセプターと結合することでその作用を発現する。ホルモンと結合したレセプターは、DNA 上のレスポンスエ

レメントに結合し、さらに補因子が結合して転写因子として機能しこれに続く生体反応を引き起こす。これら相互作用の変化はリガンド結合による受容体立体構造の変化によるものであり、これまでの研究から化合物のリガンドとしての生体作用は、その化合物が結合した受容体の構造と関連する事が指摘されている。

本研究では、内分泌かく乱物質の生体作用メカニズムの解析のため、ホルモンレセプターシグナル伝達系の個々のステップへ与える影響を検討し、その結果をもとにした新規ハイスループット(HTPS)系への応用を目的としている。本年度は、表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー(BIAcore™)を用い、化学物質のエストロゲンレセプター(ER)への結合が ER とそのレスポンスエレメント(ERE)との相互作用に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1、ERE 固定化センサーチップの作成

ストレプトアビジンを予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ビオチン化合成オリゴヌクレオチド(5'- Biotin- tcgagcaagtcAGGTCAcagTGACCTgatcaat-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

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。ER α は、リコンビナント Human ER α を、加える化合物濃度は、結合試験の結果をもとにした。

3. バッファーおよび測定条件の検討

バッファー組成の影響及びアッセイに最適な条件の検討のため、バッファー中の KCl、Tween20 の濃度、緩衝剤及び pH を変えてそれぞれ測定を行い、この結果をもとに測定用バッファーの組成を決定し、Flow バッファーとして用いた。

4. 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)及び結合度(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を算出した。

C. 研究結果

精製 ER は、リガンドの存在なしで ERE に対する結合活性を示した。さらに、17 β -estradiol(E2)の結合は ER の ERE への親和性を濃度依存的に増加させた。また ER-ERE 相互作用に変化を及ぼす E2 の濃度範囲は結合試験による濃度範囲と同じであることから相互作用の変化は E2 結合に

よるものである事が示された(図 1)。E2 結合による変化を速度論的に解析した結果、E2 の結合は、ER-ERE 相互作用の結合、解離反応のいずれをも増加させ、この時、ka の増加が kd の増加に比べ大きいことにより見かけの結合定数(KA)が増大することが示された。

Bisphenol-A(BPA)や Genisteine(Gen)でも同様に ER の ERE へのアフィニティーの増大が示された。しかし解析の結果、BPA や Gen が結合した状態では、E2 が結合した時に比べて、ERE からの解離が遅いことが示された(図 2)。これらの差はわずかであるがそれぞれの化合物が結合した ER では DBD の構造が異なり、生体においては特異的な障害を惹起する可能性が示唆された。一方、アンタゴニストである ICI-182,780 や パーシャルアンタゴニストの 4OH-Tamoxifen では、いずれも ER の ERE からの解離が非常に遅くなることが示された(図 3)。しかし 4OH-Tamoxifen に比べ ICI-182,780 では、解離がより遅くそれぞれが結合した ER は互いに構造が異なることが示された。

D. 考察

今回、ER は E2 の結合により ERE への親和性が濃度依存的に増加し、リガンド結合が ER の DBD 構造変化を引き起こす事が明らかとなった。細胞内では ER は HSP 等と結合して存在することが示されており、それらが ERE への結合を抑制しているとも考えられる。E2 結合構造の ER では ERE に対して結合、解離反応のどちらも増加し、ER が E2 の結合により結合し易くより離れやすい状態になっていると考察された。一方、アゴニストとして知られる Bisphenol-A(BPA)や植物性エストロジェンの Genisteine(Gen)結合 ER は、ER-ERE 相互作用の違いから E2 結合 ER とは異なる立体構造を持つことが示された。アンタゴニストである ICI-182,780 や 4OH-Tamoxifen では、これら化合物の阻害の機序については、ER の ERE への結合阻害によるともいわれているが、実際、結合速

度は非常に遅いものの同時に解離速度も非常に遅くなっていることがわかる。興味深いことに、ICI-182,780 が完全なアンタゴニストであるのに対して 4OH-Tamoxifen はパーシャルアンタゴニストとして働くことが知られており、結果はそうした違いを反映しているものと考察された。今回の結果は、ER-ERE 相互作用の差として示される ER 構造の違いが結合した化合物特異的な生体作用と関連する事を示唆した。特に他のアッセイにおいては、単にアゴニストとして示される BPA や Gen が ER に引き起こす構造変化は、E2 と異なり、このことより生体内においては E2 とは異なる特異な作用を惹起する可能性が示唆された。現在、用いられているいずれの系においても、そのエンドポイントはエストロジェンの一部の作用、すなわち単一のレポーター遺伝子発現や子宮肥大といった単一の作用におけるエストロジェンとの同等性をのみ捕らえることを目的としている。これに対して、我々の方法ではエストロジェンレセプターへ与える影響のエストロジェンとの差について感度良く捕らえる事が出来る。こうした構造の差が生体内でどのような異なる effects として現されるのかについては、今のところ不明であるが、今後、これらの化合物の *in vivo* 系における作用の詳細な検討(特にそれぞれの化合物のより転写活性化される遺伝子の違い等)との比較において明らかになるものと考察された。

E. 結論

SPRによる方法は生体分子間の相互作用をリアルタイム解析するシステムであり、これにより内分泌かく乱物質による、受容体の DNA 結合性、および受容体と共役因子との相互作用への影響を、それぞれの結合・解離過程の変化を解析することで、内分泌かく乱性の検討を行う。更に本系は生体内でのホルモン作用機構に即した解析を特徴としており、個々の化合物の生体内作用の予測性の高い解析が可能である。この方法によれば、他の HTPS 系と同様にロボティカ

ルなアッセイシステムを構築できるのと同時に、単にホルモン様の作用を有するか否かではなく、ホルモンレセプターを介したシグナル伝達系に対する機能修飾をリアルタイムに速度論的に測定すること、また対象とする化学物質の作用プロファイルを極短時間に鋭敏に検出することが可能となる。

今回、エストロジェン受容体に作用する化学物質では、アゴニストとアンタゴニストそれぞれで特徴的な変化を示すことが明らかとなり、今後、アンドロジェンなど他のレセプターに関しての同様の解析および co-factor との相互作用の解析などを行い、EDCs の内分泌かく乱のメカニズムの解析を進める。

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) A merican 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 biosensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし