

The Structure-activity Study on the Collaborative Activity Reinforcement of Thyroid Hormone Receptors by Self-activated Nuclear Receptors

松山, 祐昂

<https://hdl.handle.net/2324/1806819>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 松山 祐昂

論 文 名 : **The Structure-activity Study on the Collaborative Activity Reinforcement of Thyroid Hormone Receptors by Self-activated Nuclear Receptors**
(甲状腺ホルモン受容体の自発活性化型核内受容体による協働的活性増強に関する構造活性相関研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

我々の日常生活に溢れている携帯電話やパソコンなどのプラスチック製品の原料・ビスフェノール A (BPA) は、胎児や乳幼児の脳神経系や生殖腺系に低用量で悪影響を及ぼす。長年に亘る研究にも関わらず、その分子メカニズムは明らかでない。BPA の標的タンパク質の一つは核内受容体であり、我々の研究室では BPA 受容体としてエストロゲン関連受容体 $ERR\gamma$ を発見した。さらに、女性ホルモン受容体 $ER\alpha$ に $ERR\gamma$ を共発現させると転写活性が大きく増強される協働効果を発見し、BPA も低用量で非常に強い活性を示すこの現象が BPA の低用量効果の本質であると考えられるに至った。 $ERR\gamma$ はリガンド無しでも恒常的にフルに活性な自発活性化型核内受容体であり、エストロゲンをリガンドとする $ER\alpha$ に対する協働効果であることから、「リガンド活性化型核内受容体に対して自発活性化型核内受容体が協働作用し、転写活性を増強する生理機能をもつ」可能性が強く示唆された。そこで本研究では、この作業仮説を証明し、検証するために、ヒト核内受容体 48 種のうち、すべての自発活性化型核内受容体 13 種がリガンド活性化型核内受容体の転写活性に及ぼす影響を調査することにした。本博士論文では、以下のような章立てに従って、研究・実験の経緯、及び結果、考察を記述した。

第一章では、BPA の標的となる核内受容体を探索するために、*in silico* のドッキングシミュレーションに *in vitro* の受容体結合試験の結果を活用する新規な方法の確立に取り組んだ。まず、受容体結合試験により BPA との結合性が明らかとなっている 6 つの核内受容体について BPA とのドッキング計算からドッキングエネルギー $U\text{-dock}$ 値を算出し、結合親和性 (IC_{50} 値) に対するプロットから相関性の高い検量線を得た。X線結晶構造が明らかになっている核内受容体について、BPA とのドッキング計算を実施し、この検量線から受容体結合親和性を推定した。その結果、甲状腺ホルモン受容体をはじめとするいくつかの核内受容体が BPA 受容体候補としてリストアップされた。実際の結合試験による検証実験が必要であるが、現状における計算化学的な *in silico* 受容体結合試験の改良法として一つの有効性が示された。

第二章では、まず甲状腺ホルモン受容体 α 型 ($TR\alpha$) に対して、BPA の転写活性調べた。しかし、十分な活性は認められなかった。しかし、受容体結合親和性が示唆されていたことより、結合するものの活性はなく、アゴニストの活性を阻害する可能性があり、天然の甲状腺ホルモン triiodothyronine (T_3) に対するアンタゴニスト活性を調べた。結果的には、全く効果が見られなかった。こうしたなか、 $TR\alpha$ の T_3 による転写活性が一連の自発活性化型核内受容体によって増強され

るか？ を系統的に調べた。**ER α** に対して増強作用を示した **ERR α** や **ERR γ** を **TR α** と共発現して **T $_3$** の活性を測定したところ、**TR α** の転写活性は著しく増強された。一方、**ER α** では増強を示さなかった **ERR β** が **TR α** の活性を最も強く増強することが判明した。これらの結果は、自発活性化型核内受容体は活性増強する核内受容体を識別する能力を持つことを明らかにした。さらに、**T $_3$** の用量依存的な活性を **ERR α** 、**ERR β** 、**ERR γ** の3つについて比較したところ、① 最大活性の著しい増大、所謂「overexpression 過剰発現」、及び ② **TR α** 単独の最大活性を示す濃度の著しい低用量化（10～1,000倍）、という二つの効果で **TR α** 単独の活性は大きく増強された。自発活性化型核内受容体の全13種と **TR α** との共発現について、活性増強度（fold-elevation）の考え方を導入して比較・検討した結果、いくつかの注目すべき事項が明らかとなった。（i）合計10の核内受容体が **ERR β** 、**HNF4 α** 、**SF-1**、**ERR α** 、**ERR γ** 、**PXR**、**CAR**、**ROR γ** 、**NURR1**、**ROR α** が、この順番で活性増強を示した。特に最初の5つは非常に大きな活性増強を示した。（ii）**LRH-1**、**NGF1B**、**HNF4 γ** は活性増強を示さず、**HNF4 γ** はむしろ **TR α** の活性を抑制した。さらに、（iii）**ERR α** 、**ERR γ** は、そのリガンド結合ドメイン（LBD）のみでも活性増強を示した。この結果から、活性増強には自発活性化型核内受容体のLBDが関連していることが明らかとなった。また、（iv）**TR α -ERR β** 共発現系において **BPA**は弱いながらも明確なアゴニスト活性を示した。以上より、「リガンド活性化型核内受容体の活性は自発活性化型核内受容体によって増強される」ことの一般性が実証され、その増強活性の構造活性相関の解析には、さらに他の核内受容体での検討が必要であることが明らかになった。

第三章では、甲状腺ホルモン受容体 β 型 **TR β** について、自発活性化型核内受容体による活性への影響を調べた。アッセイ結果を活性増強度（fold-elevation）で比較・検討したところ、次のようなことが判明した。（i）明確な活性増強を示した核内受容体は **ERR β** 、**HNF4 α** 、**ERR α** 、**SF-1**、**ROR α** の5つのみで、その程度は **TR α** の場合よりずっと小さかった。（ii）**ERR β** と **ERR α** の活性増強は過剰発現と低用量効果で特徴付けられた。（iii）**ROR γ** 、**HNF4 γ** 、**ERR γ** 、**NURR1**はほとんど効果を示さず、一方、**CAR**、**LRH-1**、**NGF1B**、**PXR**は抑制的な効果を示すことが明らかとなった。（iv）**ERR α -LBD**がほとんど活性増強は示さず、**ERR γ -LBD**が強い活性増強を示すことが明らかとなった。こうして、活性増強に関わる構造要因として **LBD**その自体の関与のみならず、**TR β /ERR α** ヘテロダイマー形成が重要であることが明らかとなった。さらに、（v）**TR β -ERR β** 共発現系においても **BPA**は弱いながらも明確なアゴニスト活性を示した。以上より、「リガンド活性化型核内受容体の活性は自発活性化型核内受容体によって増強される」ことの一般性がさらに証明され、結果的に検証された。

本研究において、甲状腺ホルモン受容体の転写活性が自発活性化型核内受容体によって増強されることを証明し、さらには抑制する自発活性化型核内受容体も存在するという全く新しい現象をも発見した。また、その活性増強機構は、過剰発現と低用量効果であることを始めて証明し、甲状腺ホルモン受容体においても内分泌攪乱物質が低用量効果を示す可能性があることが初めて示された。