

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07044

研究課題名(和文)より現実的な化学物質のリスク評価を目指した生体異物センサー機能調節機序の解明

研究課題名(英文) Understanding of the regulatory mechanisms of the xenoreceptors for chemical risk assessment

研究代表者

児玉 進 (Kodama, Susumu)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：20621460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核内受容体CARとPXRが、パートナー核内受容体RXRとヘテロ二量体として機能することに着目し、それぞれのヘテロ二量体のRXRアゴニスト応答した転写活性化能の調節をインビトロ手法により解析した。その結果、両核内受容体は、或る一定の条件下において、RXRアゴニストに応答した活性調節を受けることが見出された。また、リガンド結合に誘導される転写共役因子との相互作用を足場にした分割発光酵素の再構成を検出する新しい化学物質とPXRとの相互作用評価系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内受容体CARとPXRは、体外から侵入した多種多様な化学物質に誘導される多岐にわたる生体応答の起点となる。これまでに、両核内受容体の多くの生理的役割やその分子機序の理解が進展してしてきたが、これらのRXRと協働することに着目した研究の実施例は少ない。本研究では、RXRとの協働という点からCARとPXRによる転写調節のメカニズムの解析を実施し、化学暴露に対する応答機構を理解する上で有用な知見を得ると共に、それらの機能に基づいた新しい化学物質との相互作用評価法を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, focusing on the fact that the nuclear receptors CAR and PXR function as heterodimers with their partner nuclear receptor RXR, we investigated the regulation of the transcriptional activity of each heterodimer in response to RXR agonists using in vitro methods. The results showed that both nuclear receptors undergo regulation based on their responsiveness to RXR agonists under certain conditions. A novel system for the evaluation of chemical-PXR interactions was also developed, which detects the reconstitution of split-luminescent enzyme based on receptor-transcriptional cofactor interaction induced by ligand binding.

研究分野：衛生薬学

キーワード：核内受容体 異物センサー ヘテロ二量体 転写調節

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核内受容体は、リガンド依存性転写因子として働き、生体内外の化学物質に応答して様々な生物学的プロセスの調節に関わる。中でも、CAR 及び PXR は、特にリガンド特異性が低く、多様な外因性化学物質を認識することから生体の異物センサー機能を担う。両受容体は、化学物質の主たる毒性標的臓器である肝臓に高発現し、多岐の肝生理機能の調節に関わることから、化学物質による毒性発現の標的分子及び生体への影響を測る指標として注目されている。これまでに、多くの研究グループにより CAR と PXR の生理的役割やその分子機序が明らかにされると共に、化学物質の両核内受容体に対する活性化作用のインビトロ評価が網羅的になされ、その試験データはインシリコ解析に利用されている。ところで、CAR と PXR は、パートナー核内受容体 RXR とヘテロ二量体を形成し協働して機能する。これまでに、一部の核内受容体はパーミッシブ RXR パートナーとして機能し、これらの RXR とのヘテロ二量体は、自身のリガンドに加えて、RXR リガンドによっても機能調節を受けることが知られている。一方、CAR と PXR について、RXR アゴニストに応答した調節など、RXR と協働して機能するという点については、不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

近年、CAR 及び PXR の生理的な役割やその分子機序の解明は進展してきたが、これらの多くは CAR もしくは PXR のみに着目していた。そこで、両核内受容体を介した異物に対する応答機構のより詳細な理解には、RXR と協働することを含めることが重要であると考えた。本研究では、RXR アゴニストに対する応答性に焦点を当て、CAR 及び PXR の転写活性化能における RXR の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

レポーターアッセイ：既知の CAR/RXR 及び PXR/RXR ヘテロ二量体応答配列 (DR3、DR4 及び ER6 など) を 2 連結で tk プロモーターの 5' 上流側に挿入した Luc レポーターコンストラクトを構築した。mCAR、hPXR 及び hRXR の各種変異体 (DNA 結合領域欠失型、AF2 機能欠損型) の発現プラスミドは、既報のものを鋳型に部位特異的変異導入法で作製した。コアクチベーター発現プラスミドは既報のものを使用した。適当な組み合わせのレポーターコンストラクトと発現プラスミドをヒト肝がん由来 HepG2 細胞に導入後、被験物質を 24 時間処理し、レポーター活性を測定した。hRXR の解析には、CRBP11-tk-Luc をレポーターコンストラクトとして使用した。

哺乳類細胞ツーハイブリッドアッセイ：pGL4.35 レポーターと各種発現プラスミド (GAL4-核内受容体 LBD、VP16-コアクチベーター-NR1D) を HepG2 細胞に導入後、被験物質を 24 時間処理し、レポーター活性を測定した。

蛍光プローブを用いた競合結合アッセイ：hRXR LBD、蛍光性 RXR リガンド及び各種被験物質を室温で 1 時間反応後、蛍光偏光度を測定した。

ドッキングシミュレーション：AutoDock Vina を用いて、各種被験物質の hRXR LBD (PDB ID: 6SJM) に対する結合ポーズを予測した。

遺伝子発現解析：被験物質を 24 時間処理した HepG2 細胞から総 RNA を抽出して cDNA を合成し、定量的 PCR 法を用いて目的遺伝子の mRNA 発現レベルを測定した。

NanoBiT アッセイ：rPXR 及び hPXR の LBD と各種コアクチベーター由来断片を NanoLuc 断片と組み合わせたキメラ蛋白質発現プラスミドを作製した。適当な組み合わせの発現プラスミドを HepG2 に導入後、被験物質を 24 時間処理し、発光変動を測定した。

なお、核内受容体名の前に記載した h、r 及び m はそれぞれヒト、ラット及びマウスを表す。

### 4. 研究成果

#### (1) RXR アゴニストに応答したヘテロ二量体の転写活性化作用

より単純化した条件下で CAR 及び PXR の RXR との協働を解析するため、既知の各種ヘテロ二量体応答配列と tk プロモーターを組み込んだ Luc レポーターコンストラクトを作製した。RXR ホモ二量体及び他のヘテロ 2 量体が作用しないこと、mCAR/RXR 及び hPXR/RXR による活性化レベルを指標にして最適な応答配列として *CYP2B6* 遺伝子プロモーター由来の DR4 を選定した。mCAR 及び RXR を共導入発現下、RXR アゴニストの bexarotene (BEX) 処理はレポーター活性を

有意に増強した。なお、mCAR は構成的に活性化状態にあり、自身のアゴニスト TCPOBOP には応答しない。よって、mCAR/RXR ヘテロ二量体の転写活性化作用は RXR のアゴニストに応答した活性化によって増強されることが示された。次いで、両核内受容体の AF2 ドメイン変異型を用いたところ、mCAR/RXR 変異型共発現下では BEX に応答したレポーター活性増強のみが消失した一方、mCAR 変異型/RXR 共発現下ではレポーター活性が消失した。以上のことから、BEX に応答したヘテロ 2 量体の転写活性化作用の増強にはコアクチベーターの RXR へのリクルートが関与し、これには CAR が活性化状態にあることが必要であると考えられた。次いで、SRC1 などのコアクチベーター共導入発現下での解析を試みたところ、何れの場合もプラスに作用した。また、一部については BEX 応答性が強く認められ、RXR 変異型を組み合わせた場合に著しく減弱した。これらの結果は、mCAR LBD と各コアクチベーターとの相互作用における RXR の寄与を検討した哺乳類細胞ツーハイブリッドアッセイの結果と一致していた。よって、ヘテロ二量体の転写活性化作用に対する RXR 活性化の寄与はコアクチベーターによって異なると考えられた。

hPXR/RXR ヘテロ二量体についても、同様に、転写活性化作用に対する RXR 活性化の寄与を解析した。hPXR/RXR 共発現下、BEX は、単独処理では有意な変動を起こさないが、hPXR アゴニスト SR12813 (SR) との共処理では SR 単独処理に対して相加的にレポーター活性を増強した。また、コアクチベーターを共導入発現させた場合、BEX 単独処理でもレポーター活性が増強した。さらに、変異型 RXR はこれらの SR 応答性には影響を与えずに BEX 応答性のみを消失させた一方、変異型 hRXR は SR 応答性を消失させ、コアクチベーターによる増強作用を消失させた。よって、hPXR/RXR の場合も、RXR の活性化は副次的にヘテロ二量体の転写活性化作用に寄与すると考えられた。

上述の解析を行うとともに、大腸菌発現系を用いた核内受容体蛋白質の調整法の検討を進めた。今後、継続して調製法の確立を進め、ヘテロ二量体とコアクチベーターとの相互作用などのより詳細な解析に利用する予定である。

## (2)RXR アゴニスト活性を有する一般化学物質の探索と構造活性相関

RXR アゴニストに応答したヘテロ二量体の転写活性化作用を幅広く検討することを意図し、一般化学物質の中から新規 RXR アゴニストの探索を試みた。そこで、これまでに実施した一般化学物質の網羅的評価から RXR アゴニスト活性を有することを見出していた 1,3-ビス-*tert*-ブチル単環ベンゼン誘導体に着目した。なお、これらは、既知の内因性及び合成 RXR アゴニストとは異なる単純な化学構造を有する。新たに入手可能な誘導体を加えて、レポーターアッセイ、競合結合アッセイ、遺伝子発現解析及びドッキングシミュレーションを実施した結果、5 位に嵩高い疎水性置換基の導入がアゴニスト活性を増強する一方、水酸基の導入はアゴニスト活性を減弱させることを明らかにした。また、最も強い RXR アゴニスト活性を示す 1,3,5-*tri-tert*-butylbenzene は、BEX と同様に mCAR/RXR ヘテロ二量体の転写活性化作用を増強することを確認した。今後、引き続き、これらを用いてヘテロ二量体の転写活性化作用に関する解析を進める予定である。

## (3)化学物質と PXR との新規相互作用評価系

加えて、化学物質と PXR との相互作用のより簡便で効率的な評価を目指し、リガンド結合に誘導される転写共役因子との会合・解離を検出する新しい評価系の構築を試みた。ラット及びヒト PXR LBD とコアクチベーター由来断片をそれぞれ NanoLuc 断片と融合させたキメラ蛋白質を HepG2 に発現させ、NanoLuc 再構成による発光強度の変動を指標にして、最適なキメラ蛋白質の連結と組み合わせを選定した。選定したペアは検出に十分な発光強度を示したが、アゴニストに応答した相対発光変化量は著しく乏しかった。そこで、LBD へのコリプレッサー由来配列の付加及び既報に基づいた変異導入によりアゴニスト応答性の向上を試みたところ、rPXR と hPXR、どちらの場合もアゴニスト応答性が著しく向上した。また、構造最適化したラット及びヒト評価系の既知アゴニストに対する用量反応性を評価した結果、それぞれの EC<sub>50</sub> 値は従来法 (Luc レポーターアッセイ) と同等かより低値であった。本評価系では、PXR と転写共役因子との相互作用を足場に発光酵素の再構成を検出することから、従来法 (Luc レポーターアッセイ) と比べ、被験物質の処理時間を大幅に短縮した。今後さらに、大腸菌での組み換え蛋白質調製法の改良を進め、精製蛋白質を用いた評価法の構築を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kodama Susumu, Matsumoto Shuzo, Takamura Yuta, Fujihara Michiko, Watanabe Masaki, Ono Atsushi, Kakuta Hiroki	4. 巻 373
2. 論文標題 Structural characterization of 1,3-bis-tert-butyl monocyclic benzene derivatives with agonistic activity towards retinoid X receptor alpha	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2022.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加来田 博貴  (Kakuta Hiroki)		
研究協力者	真野 寛生  (Mano Hiroki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------