

# エストロゲン受容体に相互作用するペプチドのコンビナトリアル・ ファージ・ライブラリ・スクリーニングと外来性エストロゲン類の 生物学・薬理学研究への応用

ジュリアン M ホール

米国 国立環境衛生科学研究所

ステロイドホルモンであるエストロゲンは、多様な機能を持つ多種多様な標的組織の増殖、分化、機能発揮における中心的な制御因子です。エストロゲンは、雌性生殖器系の発達、排卵をコントロールする神経分泌に対する命令や、雌性生殖行動の制御において重要な役割を果たします。しかし、このホルモンは生殖関係の組織以外の組織においても、はっきりとした作用を有しています。特に、雄、雌の両性における健全な骨系の発達と維持に関わっており、トリグリセライドとコレステロールの恒常性維持における重要な制御因子でもあります。

エストロゲンの生理作用は、細胞内受容体を介して発揮されます。細胞内受容体は、標的細胞においてリガンド誘導性の転写因子として作用します。ヒトのエストロゲン受容体(ER)が属している核内受容体スーパーファミリーには、ステロイド類、甲状腺ホルモン、レチノイン酸、ビタミン D の受容体や、まだリガンドが見つからないオーファン受容体が含まれます。ER の作用メカニズムは、その他の核内受容体に同じです。ホルモンが存在しない時には、受容体は、多タンパク質性の抑制複合体内に存在する標的細胞の核内において、隔離されています。リガンドが結合すると、ER に立体構造の変化が引き起こされて、ホモ二量化が進み、標的遺伝子の制御領域に存在する特異的な DNA 応答配列(ERE)に対する高い親和性を有する結合が促進されます。DNA に結合した受容体は基本転写因子(GTA)に対して直接的に接触するか、活性化補助因子タンパク質を介して間接的に接触します。こうした結合によって、転写前開始複合体が安定して形成され、最終的には遺伝子転写のアップレギュレーションが引き起こされます。また、ER の働きは、内因性ホルモンだけでなく、内分泌攪乱物質である外来性エストロゲン類によっても変化が起こり得ます。外来性エストロゲン類は ER 標的遺伝子の転写を増強または阻害する、すなわち、ER のアゴニストもしくはアンタゴニストとして作用することによって、エストロゲンの生理作用に影響を与えます。

## エストロゲン類と外来性エストロゲン類は 2 種類の異なる受容体を介して生理活性を発揮する

つい最近まで、エストロゲン類および外来性エストロゲン類の生理作用はすべて、標的細胞の核内にある同一の受容体を介して発揮されるものと考えられてきました。しかし、第 2 の受容体である ER $\beta$ が発見されたことにより、エストロゲンの信号系はそんな単純なものではないことが示されました。ER の 2 つの亜型である ER $\alpha$ と ER $\beta$ は、リガンド結合ドメインと DNA 結合ドメインのアミノ酸配列がひじょうによく共通していますが、アミノ基末端領域の相同性はわずかしかなりません。それゆえに当然ながら、これら 2 種類の受容体の性質はよく似てはいても、リガンド結合特性は完全に同じではなく、同じ DNA 応答配列に結合するものではありません。どちらの受容体にも、カルボキシル基末端に転写活性化機能ドメイン(AF-2)が存在します。この AF-2 は、活性化補助因子タンパク質と結合することにより、受容体の転写のリガンド依存性の活性化に関与します。エストロゲン信号系の分析によって明らかになった、この 2 種類の受容体の間のもっとも明瞭な相違点は、ERE を含む遺伝子の活性化因子としては、ほとんどの状況下で ER $\alpha$ のほうが ER $\beta$ よりも効率的である、という点です。また、ER $\beta$ は標的プロモータに対して構造的に相互作用でき、リガンドで活性化される ER $\alpha$ の転写活性を相殺することが可能であることも示されています。したがって、両方の受容体が発現している細胞においては、全体的なエストロゲン反応性は減弱します。注意すべきなのは、ER $\alpha$ と ER $\beta$ は、結合する外来性リガンドの種類ごとに、結合時の転写反応が互いに異なっていることです。すなわち、外来性エストロゲン類の生理作用において、2 種類の受容体は異なる役割を果たしていることになります。

残念なことに、ER $\alpha$ と ER $\beta$ の作用の違いの大部分は、*in vitro*で再構成した転写系で観察されたものであり、*in vivo*での ER の生理作用の意義はまだ十分に確立されていません。ですので、それぞれの亜型に感度を持つ

アゴニストやアンタゴニストが必要です。それらがあれば、動物本来の生体内において受容体の機能を一時的に操作できるようになります。ER $\alpha$ と ER $\beta$ のリガンド結合ポケットに相互作用する小型分子のスクリーニングに関して尽力なさっている皆さんの努力を成功させるために、我々は、従来から知られている抗エストロゲン類とは異なる様式でER $\beta$ を抑制する、亜型特異的なアンタゴニストの開発を行ないました。

### ER - 活性化補助因子間の相互作用に着目して、ER 亜型に選択的なアンタゴニストを見つけ出す

現時点で利用できる ER アンタゴニストはすべて、(a) 受容体のリガンド結合ドメインに結合することによりアゴニストの結合を阻害する、または、(b) 受容体内部の立体構造を変化させることで、SRC-1 や GRIP1 などの転写活性化補助因子と受容体との有効な相互作用をさせないようにする、という形で作用するものばかりです。特に、受容体にアゴニストが結合すると、受容体の立体構造に変化が起こって疎水性のポケットが形成され、それによって、ほとんどの有効な活性化補助因子の受容体相互作用ドメインに見られる LXXLL (Leu-X-X-Leu-Leu) モティーフと受容体との相互作用が可能になる、ということが解っています。ER がアンタゴニストと結合することで引き起こされる立体構造の変化では、活性化補助因子との相互作用は起こりません。ER 機能を抑制するもっとも直接的な方法は明らかに、ER $\alpha$ と ER $\beta$ における活性化補助因子結合ポケットに直接的に結合し、活性化補助因子との相互作用を阻害するような分子を開発することです。ER $\alpha$ や ER $\beta$ などの核内受容体における活性化補助因子結合ポケットが構造的に類似しており、既知の活性化補助因子のほとんどは受容体選択性を示さないうちは、受容体 - 補助因子結合ポケットが分子の真の標的であるかどうかは明確になりませんでした。しかし最近になって、LXXLL モティーフは機能的に同等ではなく、LXXLL コアの隣接配列を変更することで、受容体選択性がいくらか得られることが解ってきました。

### ER $\beta$ と相互作用するペプチド類のスクリーニングのためのコンビナトリアル・ファージディスプレイ技術

以上の知見を総合して我々はコンビナトリアル・ファージ・ライブラリをふるい分け、ER $\beta$ と特異的な様式で相互作用するペプチドとして X<sub>1</sub>LXXLLX<sub>7</sub> という形のペプチドを発現するものを選び出しました。このやり方でもって、ER $\beta$ と相互作用することができるファージが全部で 70 種類見つかり、それを補助的なファージ ELISA アッセイで確認しました。クロススクリーニングによって、両方の ER 亜型に結合するファージが 37 種類、ER $\beta$ に選択的に相互作用するものが 33 種類であることが判りました。後者のグループは LXXLL を含むペプチドを発現するものであり、さらに詳しい分析を行ないました。

続いて我々は、哺乳動物 2 ハイブリッドアッセイを行なって、ペプチド(EBIP=ER $\beta$ 相互作用ペプチド)が、天然状態の細胞の ER $\beta$ に相互作用する選択性の強さを評価しました。2 ハイブリッドアッセイで分析してみると、調べた 33 種類のペプチドのうち、ER $\beta$ とは相互作用するが ER $\alpha$ とは相互作用しないものが 15 種類あることが判りました。興味深いのは、リガンドの非存在下で ER $\beta$ に結合することができるペプチドが何種類か有ったという点であり、このことから、ER $\beta$ のリガンド未結合部分が活性コンフォメーションに存在する、もしくは、LXXLL を含むモティーフが受容体に結合することで活性化が促進されるのではないかと考えられました。

この研究の主目的の一つが、ER の 2 種類の亜型がエストロゲン信号系において寄与する比率を評価できるようにする、特異性の高いインヒビターの開発です。必然的に我々は次の段階として、15 種類の ER $\beta$  選択性ペプチドが、核内受容体スーパーファミリーに属するその他の受容体と相互作用する機能を調べました。この調査は、哺乳動物 2 ハイブリッドアッセイを用いて、それぞれのペプチドと 11 種類の核内受容体との相互作用を調べることで行ないました。こうした実験からは、それぞれの受容体が明瞭なペプチド結合親和性を示すというような、はっきりとしたパターンは見られませんでした。その結果に基づけば、ほとんどの受容体は活性化補助因子ごとに異なる親和性を示す可能性が強まりました。しかし得られた結果でもっとも重要だったのは、LXXLL を含むペプチドである EBIP-56 と EBIP-92 はもっぱら ER $\beta$ のみと相互作用し、行なった実験の範囲内ではその他の受容体とは相互作用しなかった、というものです。以上の結果は、受容体 - 活性化補助因子間の相互作用に的を絞ることで、核内受容体に特異的なアンタゴニストの開発が可能であることを示しています。

## ERβに特異的な様式で相互作用するペプチドのアンタゴニスト特性の評価

次に、ERβ特異的なペプチドである EBIP-56 と EBIP-92 のアンタゴニストとしての効力の評価を行ないました。有効性の評価が十分に行なわれている活性化補助因子のほとんどは、その核内受容体相互作用領域に複数の LXXLL ドメインを有していることが判っています。このドメインは、これらのタンパク質と、標的受容体の AF-2 活性化補助因子結合ポケットとの間の相互作用を促進させる働きがあります。この知見を受けて我々は、我々のペプチドの2コピーと Gal4DBD とを融合させたものを作成しました。2つの LXXLL モティーフの間は、活性化補助因子である GRIP1 の LXXLL モティーフ 2 とモティーフ 3 との間をつなぐ領域に相当する配列でつながっています。哺乳動物細胞内で発現させると、GRIP1 の NR-box 配列は ERαの活性を 60%抑制するのに対して、2×EBIP-56 および 2×EBIP-92 のペプチドは、転写反応にまったく影響を及ぼさないことが判りました。しかし ERβで試験してみると、2×EBIP-56 および 2×EBIP-92 のペプチドは、エストロゲンで刺激された転写活性をそれぞれ 82%および 97%抑制しました。ウェスタン・イムノブロットによれば、これらペプチドは ERβの細胞内レベルを変化させないことが判りました。すなわち、LXXLL を含むペプチドによって特異的な様式でもって活性化補助因子の相互作用を阻害することで、ERβの転写活性を抑制することが可能であるわけです。

## ERβに相互作用するペプチドのアミノ酸配列の比較

次に、ERβに相互作用する 2 つのクラス(ERβ選択的と ERβ特異的)のペプチドのアミノ酸配列を調べました(表 I)。驚いたことに、同じクラスに属するメンバー同士であっても、LXXLL モティーフが保存されていること以外に、相同性はわずかしは見られませんでした。したがって、LXXLL モティーフの隣接領域の残基は、ペプチドの高次構造の決定に重要である可能性が出てきました。面白いのは、2 種類の ERβ特異的ペプチドである EBIP-56 および EBIP-92 は中心の LXXLL モティーフからみて-5 の位置にトリプトファン(W)を有していますが、最初のふり分けで選り出された ERβに相互作用するその他のペプチド 68 種類にはそれと共通の特徴を持つ残基が無い、という点です。そこで我々は、ペプチド-ERβ間の相互作用の特異性にはトリプトファンが影響しているとの仮説を立てました。この仮説を検証するために、EBIP-92 ペプチドのトリプトファン残基をグルタミンに置き換えてみました。グルタミンは、多くのペプチドのこの位置に見られるアミノ酸です。哺乳動物 2 ハイブリッドアッセイで分析してみると、野生型の EBIP-92 は ERβとホルモン依存性に相互作用するのに対して、-5 位のトリプトファン残基を置き換えた変異型ペプチドは ERβと相互作用することが出来ませんでした。以上の実験により、LXXLL モティーフを取り囲む配列が受容体選択性の決定に重要であるということが判り、見つけだされたペプチドの標的タンパク質に対する相互作用を最大にするためには、部位特異的な変異が利用できるのではないか、という発想が得られました。

表 I : ERβに相互作用するペプチドのアミノ酸配列の比較  
ERβ-選択的ペプチド

					<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>	<u>L</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>+1</u>	<u>+2</u>	<u>+3</u>				
Peptide EBIP-37	T	G	G	G	V	S	L	L	L	H	L	L	N	T	E	Q	G	E	S
Peptide EBIP-41	R	R	D	D	F	P	L	L	I	S	L	L	K	D	G	A	L	S	Q
Peptide EBIP-44	Y	G	L	K	M	S	L	L	E	S	L	L	R	E	D	I	S	T	V
Peptide EBIP-45	M	S	Y	D	M	L	S	L	Y	P	L	L	T	N	S	L	L	E	V
Peptide EBIP-51	F	P	A	E	F	P	L	L	T	Y	L	L	E	R	Q	G	M	D	E
Peptide EBIP-96	V	E	S	E	F	P	Y	L	L	S	L	L	G	E	V	S	P	Q	P
Peptide EBIP-49	V	S	S	E	G	R	L	L	I	D	L	L	V	D	G	Q	Q	S	E
Peptide EBIP-53	D	T	P	Q	S	P	L	L	W	G	L	L	S	S	D	R	V	E	G
Peptide EBIP-60	G	G	T	Q	D	G	Y	L	W	S	L	L	T	G	M	P	E	V	S
Peptide EBIP-66	S	L	P	E	E	G	F	L	M	K	L	L	T	L	E	G	D	A	E
Peptide EBIP-70	V	M	G	N	N	P	I	L	V	S	L	L	E	E	P	S	E	E	P

Peptide EBIP-76	V	L	V	E	H	P	I	L	G	G	L	L	S	T	R	V	D	S	S
Peptide EBIP-87				Q	T	P	L	L	E	Q	L	L	T	E	H	I	Q	Q	G
ER $\beta$ -特異的ペプチド																			
Peptide EBIP-56	G	S	W	Q	D	S	L	L	L	Q	L	L	N	R	T	E	L	M	A
Peptide EBIP-92	S	V	W	P	G	P	E	L	L	K	L	L	S	G	T	S	V	A	E

ER $\beta$ に相互作用するペプチドを、ER $\beta$ 選択的と ER $\beta$ 特異的の 2 つのクラスに分けた。後者には EBIP-56 と EBIP-92 が属しており、LXXLL モティーフから見て-5 の位置にトリプトファンが、+3 の位置にスレオニンが共通している。共通するアミノ酸を太字で示した。

我々は、コンビナトリアル・ファージ・ディスプレイ・スクリーニングという新しい手法を用いて、既知の抗エストロゲン類とは異なる様式によって ER $\beta$  作用を抑制する亜型特異的なアンタゴニストの開発を、当初の目的通りに成功することが出来ました。現在我々は、*in vivo* での ER $\beta$  作用研究で動物に使用するのに適した、これらのペプチドの量産型を開発しているところです。それが出来上がれば、エストロゲンおよび外来性エストロゲン類が作用の標的とする組織の特定、および、外来性エストロゲン類の生理作用における ER $\alpha$  と ER $\beta$  の寄与比率の決定が可能になります。

#### 環境内毒性物質のエストロゲン作用性を評価するツールとしての ER 相互作用ペプチド

SCR-1 や GRIP1 などの LXXLL を含む活性化補助因子および、ER $\alpha$  と ER $\beta$  との相互作用には、アゴニストによる受容体の活性化が必要であり、それはアンタゴニストによって阻害されることが判っています。そこで我々は、ファージ・ライブラリ・スクリーニングで見つけ出された LXXLL の結合能力には、同様のアゴニスト特異性が示されるはずであり、内分泌攪乱作用の可能性があるが特性の解明がなされていない環境内毒性物質のエストロゲン作用性の評価にそれが利用できるのではないかと、考えました。ペプチド相互作用のアッセイによって ER リガンドのアゴニスト活性の予測が可能かどうかを確かめるために、哺乳動物 2 ハイブリッドアッセイを用いて、既知の ER リガンド類(アゴニストとアンタゴニスト)が、天然状態の細胞内でのペプチド結合に対して及ぼす影響について調べました。

注目すべきなのは、試験したすべてのペプチドの相互作用が、アゴニストである 17 $\beta$ -エストラジオール(エストロゲン)やゲニステインと併用すると増強されたことです。しかし、アゴニストの非存在下で抗エストロゲン類を使用すると、ペプチドが結合できなくなっただけでなく、基本の受容体-ペプチド相互作用も拮抗されました。興味深いことに、ペプチド EBIP-92 は、エストラジオールよりもゲニステインで活性化された ER $\beta$  とより強く相互作用するようです。これらのデータは、ゲニステインとエストラジオールは、ER $\beta$  でアッセイを行なった場合には同じ様式で作用するのではないことを示しており、最近になって判ったゲニステイン独特の特性を考えると、興味深いものです。効力における同様の違いは、全範囲にわたる濃度のリガンドを反復投与する実験においても注目されています。以上の所見は、最新の結晶学研究の成果に一致しており、エストラジオールとゲニステインが、それぞれ独自の立体構造変化を ER $\beta$  に引き起こすこと、および、ゲニステインがリガンドとなった ER $\beta$  はエストラジオールで活性化された受容体とは異なる様式で活性化補助因子と相互作用する可能性のあることを示しています。2 種類の ER アゴニストがそれぞれ個々の生理活性を発揮するメカニズムには違いがあるということ、申し上げておきます。

LXXLL ペプチドの結合は完全にアゴニスト依存性であるという観察結果を受けて、我々は、ペプチド結合アッセイによって環境内毒性物質のエストロゲン作用性を予測できる可能性について調べることにしました。この研究には、ファージ・ディスプレイ・スクリーニングで見つかった LXXLL ペプチド類のうち、ER $\alpha$  と ER $\beta$  の双方と相互作用する能力を持つものを利用して、受容体の両亜型についてのアッセイ法の開発が可能かどうかを判定しました。我々は盲検法を用いて、3 種類の内分泌攪乱物質(毒性物質 X、Y、Z)の存在下における、ER $\alpha$  と ER $\beta$  へのペプチド結合を測定しました。このアッセイにおける ER $\alpha$  の分析では、ペプチド EBIP-52 は、化学物質のそれぞれの存在下で、効力の違いはあれども ER $\alpha$  と相互作用することが判りました。とりわけ、

各物質のエストロゲン作用性は、ペプチド相互作用の定量的測度と直接的な相関関係があります。興味深いことに、ペプチド結合のパターンが ER $\beta$  で試験した場合は異なっており、このことは、この 2 種類の受容体に対して異なる化学物質は異なる立体構造変化を引き起こす可能性を示しています。しかし、ER $\alpha$  で見られたのと同じように、ペプチド結合の相対的大きさは、それぞれの毒性物質が ER $\beta$  を介して転写を活性化する能力の大きさに、直接的に並行していました。以上の結果は全体としては、ペプチドの結合が各々のリガンドのエストロゲン作用性に相関していることを示しており、特性が不明の化学物質の生理作用を予測する上で、その物質に結合した ER とペプチドとの相互作用でもって、予測が可能であることが示されました。このことによりエストロゲンの生理を崩壊させる環境内毒性物質の発生可能性を分析する高度な能力を併せ持った新しい機能的なスクリーンが提供されます。

## まとめ

コンビナトリアル・ファージ・ライブラリ・スクリーニングを用いることで、既知の抗エストロゲン類とは異なる様式で ER 作用を抑制する ER 亜型特異的なアンタゴニスト類を同定しました。現在は、アンタゴニストであるこれらペプチドを動物に使用する手法の開発を研究しています。その手法があれば、*in vivo* で受容体機能を一時的に操作することが可能になり、エストロゲンおよび外来性エストロゲン類の生理作用における ER $\alpha$  と ER $\beta$  の寄与比率の評価が可能になります。ER に相互作用するペプチドには、アンタゴニストとしての性質の他にも、内分泌攪乱作用の可能性を持つ環境内毒性物質のエストロゲン作用性の予測などといった応用範囲が広くあります。さらにこれらペプチドを立体構造プローブとして用いることで、エストロゲンと外来性エストロゲン類ではそれぞれ独特の立体構造変化を ER に引き起こすことが明らかになり、内因性と外来性の ER リガンドの間にはメカニズムに違いがあり、それはそれぞれの物質の生理作用に相関していることが示されました。ファージ・ディスプレイ技術は、プロゲステロン類、アンドロゲン類、レチノイド類、甲状腺ホルモンなどその他の内分泌系の核内受容体に特異的なアンタゴニストペプチドを見つけ出すことにも利用可能であり、内分泌攪乱作用を持つ毒性物質がさまざまなホルモン信号経路を介して発揮する生理作用を評価するための新たなツールになるものと、我々は考えています。

## 質疑応答

菅野：質問とコメントをどうぞ。

質問：新しいタンパク質を作り出したとお考えですか？それとも ER $\beta$  もブロックできる内因性ペプチドである可能性はないのですか？

ホール：すみません、もう一度お願いします。

質問：あなたが作られた LXXLL モチーフにおいて、新しいタンパク質を作り出したとお考えですか？それとも、使われたペプチドによく似たものを細胞が持っていたのではと考えられませんか？

ホール：それは良い質問で、実際、我々はよくそのことを訊かれます。私はすべてのペプチドをスクリーニングし、その配列を分析しましたが、その中で一つだけ、既知のタンパク質に相関があるものがありました。それがコリプレッサー-RIP140 です。

LXXLL を含むその他のペプチドはすべて、ナンセンスなタンパク質、つまり単なる理論上のタンパク質でした。それらは現実のタンパク質ではありません。つまり、細胞内に実際に存在するタンパク質にはほとんど該当しません。受容体の構造と活性を分析するのにこうしたペプチドを用いることの利点の一つとして、これらの物質が、実際の補助因子から得られた実際の LXXLL モチーフよりもはるかに強い親和性でもって結合することが挙げられます。これらは、受容体に対して超強力に相互作用するタンパク質であると言えます。

質問：たいへん面白い講演でした。これら新しいタンパク質である EBIT56 と 92 や、その他の結合タンパク質の分布について教えてください。標的組織においてそれらタンパク質はどこに存在していますか？

ホール：すみません。質問がよく分らないのですが。

質問：それらタンパク質が *in vivo* の精細管内に存在していると思うのですが……それとも、それらはすべて人工のタンパク質なのですか？

ホール：ああ、EBIT56 と 92 ですか？そうです。これらは合成ペプチドです。実際のタンパク質とは関連がありません。

質問：細胞内に存在する可能性のあるタンパク質に、きわめて類似したタイプのものはあるのですか？

ホール：LXXLL モチーフは実際のタンパク質に含まれていますが、我々が同定した特異的タンパク質のほとんどは、実際のタンパク質とは関連がありません。

質問：類似した構造を持つタンパク質が *in vivo* の一部の標的組織に存在する可能性についてはどうお考えですか？個体における ER $\beta$  と ER $\alpha$  の発現には違いがあることが分っています。これらのタンパク質がもし *in vivo* の細胞内に存在するとしたら、これらのタンパク質には、それら受容体との相関など、何らかの作用があるはずですよ。分りますでしょうか？

ホール：よい質問です。ER $\alpha$  と ER $\beta$  は分布に重なりがありますが、それぞれ独自の分布を持っています。多くの組織で両受容体がともに発現しますが、その分布もやはり独自です。ここで重要なのは、両受容体と同じ組織で発現している場合でもほとんどは、それぞれ異なる細胞に存在しているという点です。

質問：あなたが発見されたペプチドについてはどうですか？

ホール：本日お見せした我々の仕事は、哺乳類の培養組織で行なっただけです。我々は、動物にそれらを導入するためのウイルス送達系を開発しようと思いい、今現在、それに取り組んでいるところであり、あなたがおっしゃった類の標的組織にそれらを導入することができています。なんらかの外因性エストロゲン作用がある組織もあれば、その作用がない組織もあります。

質問：ありがとうございました。

カブロック：ありがとうございました。