

学位論文要旨

Fluorescence Assay of Ligands for Nuclear Receptors in Living Cells (生細胞内における核内リセプターリガンドの蛍光アッセイ法)

Muhammad Awais

核内受容体 (NR) はリガンド結合依存的に活性化される転写因子の大ファミリーを構成し、胚発生、分化細胞の表現型の維持、代謝および細胞死に関与する特定の標的遺伝子の発現を制御する。NR ファミリーには、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、プロゲステロン受容体 (PR)、グルココルチコイド受容体 (GR) のようなステロイド受容体；甲状腺ホルモン受容体、レチノイック X 受容体、レチノイン酸受容体；およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) のようなオーファン受容体が含まれる。一般的に使用される医薬品の中には NR の作用物質 (アゴニスト) あるいは拮抗物質 (アンタゴニスト) としてはたらくものがあり、たとえば、ER に結合するタモキシフェン (乳がん治療薬)、AR に結合するフルタミド (前立腺がん治療薬)、PPAR γ に結合するチアゾリジンジオン (2型糖尿病治療薬)、GR に結合するデキサメタゾン (炎症性疾患治療薬) が挙げられる。リガンドが結合した NR が効率的に転写制御を行うためには、転写共役活性化因子 (コアクチベーター) タンパク質が必要である。リガンドが結合することによって、受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) 上に特徴的な高次構造の変化が引き起こされ、その結果コアクチベーターと受容体との結合が促進、もしくは妨害される。一次配列の比較、および X線結晶構造解析の結果から、LBD の折りたたみ構造はすべての NR ファミリーにおいてほぼ共通していることが示唆されている。アゴニストが NR に結合すると、LBD の高次構造が変化して LBD の表面にコアクチベーター結合部位が露出する。続いてコアクチベーターが NR に結合して転写活性を促進する。対照的に、アンタゴニストが結合した場合には、LBD の高次構造変化によってコアクチベーターの結合が妨害される。コアクチベータータンパク質は、保存された疎水的な LXXLL モチーフ (L はロイシン、X は任意のアミノ酸を示す) を介して受容体と結合する。

本研究では、ER、AR、および PPAR γ について、遺伝的にコードされた蛍光プローブの開発を行い、生細胞内において各受容体の内因性および外因性リガンドの評価を行った。

原理

図 1 は、原理を模式的に示したものである。NR の LBD と、LXXLL モチーフを有するコアクチベーターペプチドとを、柔軟なリンカーで連結した。この融合タンパク質の両端に、

シアン色蛍光タンパク質 (CFP, ドナー) および黄色蛍光タンパク質 (YFP, アクセプター) を連結した。CFP と YFP の励起および蛍光スペクトルは、CFP から YFP への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に適したものである。アゴニストが結合することによって LBD の高次構造が変化し、コアクチベーターが受容体に結合する。続いて CFP が YFP に接近し、そ

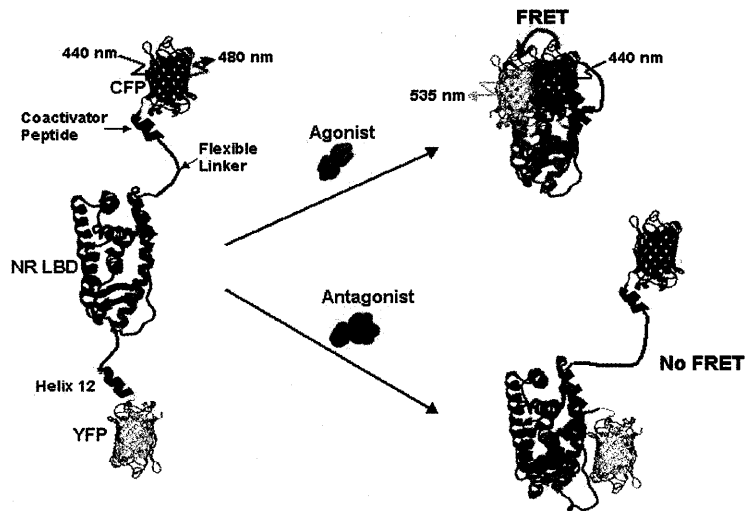


図 1. NR (ER, AR, および PPAR γ) の SCCoR の原理. LBD のヘリックス 12 の位置がリガンド依存的に変化することが、コアクチベーターの結合に重要な役割を果たす。

の結果 FRET が増大する。一方、アンタゴニストが結合した場合には LBD は先ほどとは異なる高次構造をとり、コアクチベーターは結合することができない。したがって FRET は起こらない。ER, AR, および PPAR γ についてプローブを開発し、SCCoR (Single Cell-Coactivator Recruitment) と命名し、このプローブを用いて行うアッセイ法を蛍光 SCCoR アッセイ法と命名した。リガンド依存的な受容体 LBD の高次構造変化とコアクチベーターの結合を FRET 顕微鏡を用いてリアルタイムに観察することにより、これらの受容体に対する天然および合成リガンド (アゴニスト, アンタゴニスト) のスクリーニングを行うことができた。

ER の SCCoR

ER-SCCoR を作製するに当たり、ER の LBD (第 305-550 アミノ酸) とステロイド受容体コアクチベーター1 のペプチド (HKILHRLLQEG) とを連結した。この融合タンパク質の両端に CFP と YFP を連結した。このプローブを CHO-K1 細胞に発現させて、エストロゲン様物質のスクリーニングを

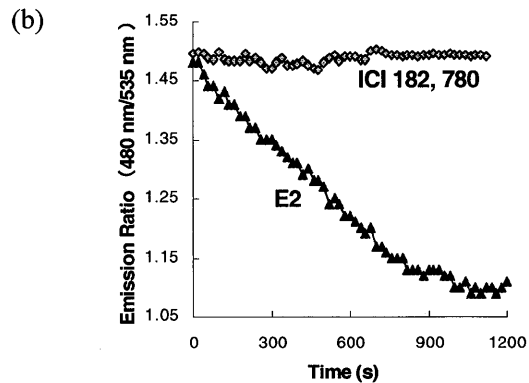
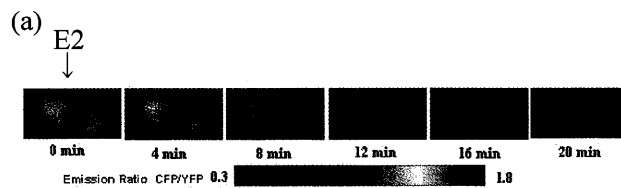


図 2. (a) E2 刺激時における CFP/YFP 蛍光強度比の擬似カラー画像. (b) CHO-K1 細胞に E2 および ICI 182,780 を添加したときの FRET 応答の時間経過。

行った。アゴニストである 17 β -エストラジオール (E2) の添加によって、CFP/YFP 蛍光強度比が減少 (FRET が増大) し、図 2 に示すように擬似カラー表示の上では青色シフトする様子が観察された。一方、同様の条件下でアンタゴニストである ICI 182,780 を添加したときには、何の変化も起きなかった。内分泌かく乱物質 (EDC) の多くは ER に対して高い結合能を有している。図 3 に示すように、E2 およびいくつかの EDC (ジエチルスチルベストロール [DES], ゲニステイン [Gen], ノニルフェノール [NP], ビスフェノール A [Bis-A]) について、濃度依存的な応答を測定してスクリーニングを行った。この結果から、E2 > DES > Gen > NP > Bis-A の順に結合能が低くなることを見出された。

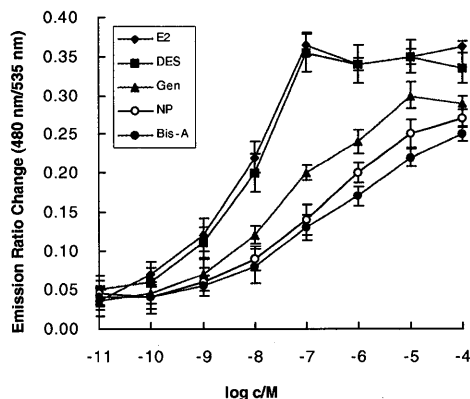


図 3. ER のアゴニスト (E2, DES, Gen, NP, Bis-A) 添加による FRET 応答の濃度依存性。

乳がんの治療において、天然エストロゲン E2 の活性を抑えるために抗エストロゲン剤 (ER のアンタゴニスト) が用いられることがある。そこで、アンタゴニストである ICI 182,780 および 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) の E2 活性抑制能についても評価を行った。ICI 182,780 あるいは OHT の存在下では、E2 活性は完全に抑えられた。また ICI 182,780 あるいは OHT を E2 で置換して活性を回復するためには、100 倍の濃度の E2 が必要であることが確かめられた (図 4)。

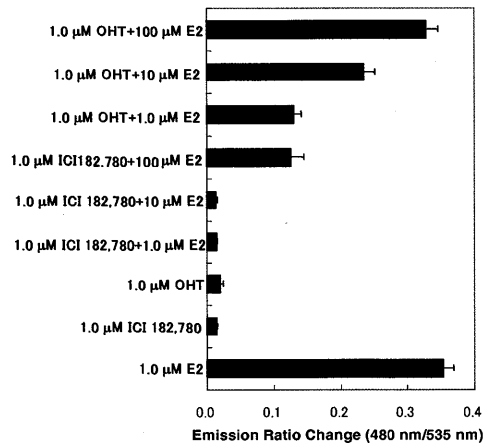


図 4. アンタゴニストの E2 活性抑制能。

AR の SCCoR

アンドロゲンは AR と結合して、生理学的には発生の段階における前立腺の形成に重要な役割を果たす一方、前立腺がんの発がんにも深く関与している。AR-SCCoR を作製するに当たり、AR の LBD と Tip-60 コアクチベーターのペプチドとを柔軟なリンカーで連結した。この融合タンパク質に CFP と YFP を連結し、顕微鏡下で FRET を観察した。DHT やテストステロンのようなアンドロゲン類の添加によってコアクチベーターは AR に結合し、FRET が誘起された。一方、抗アンドロゲン剤であるフルタミドやプロシミドンを添加した場合

には FRET は起こらなかった。図 5 に示す通り、FRET 応答はアンドロゲン濃度依存的であることが確かめられた。前立腺がんの治療において、天然アンドロゲンであるテストステロンを AR のリガンド結合部位から解離させるために、フルタミドのような抗アンドロゲン剤を投与することがある。テストステロンがフルタミドによって置換される様子を *SCCoR* を用いて観察した結果を図 6 に示す。

PPAR γ の *SCCoR*

PPAR γ は、がん、糖尿病、喘息、炎症性疾患などさまざまな病気を治療する上での分子標的となる。そこで、PPAR γ に対する *SCCoR* プロブを作製して、この受容体に対する内因性リガンドおよび外因性リガンド（2型糖尿病治療薬）のスクリーニングを行った。各種 PPAR γ リガンドの添加によって得られた応答曲線を図 7 に示す。

結論

本研究では、生細胞内においてさまざまな NR に対する内因性、外因性リガンドのスクリーニングおよび特性評価を行うための、蛍光プローブを用いたアッセイ法の開発を行った。このプローブは、リガンド濃度依存性からアゴニストの強弱を高感度に識別することができた。また、アゴニストとアンタゴニストの識別を効率的に行うことができた。本アッセイ法は高スループットで各種リガンドを評価することができるため、未知のリガンドがアゴニスト、アンタゴニスト、あるいは部分アゴニスト/アンタゴニストのいずれであるかを識別するのに適しており、乳がん、前立腺がん、炎症性疾患、および糖尿病治療薬の候補物質の開発、スクリーニングへの応用が期待できる。

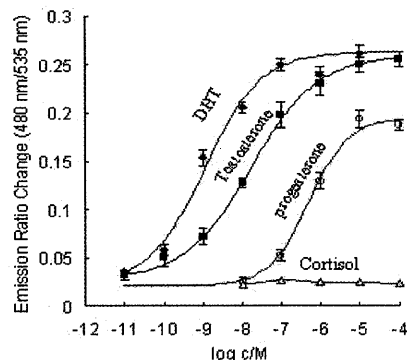


図 5. AR のアゴニスト添加による FRET 応答の濃度依存性。

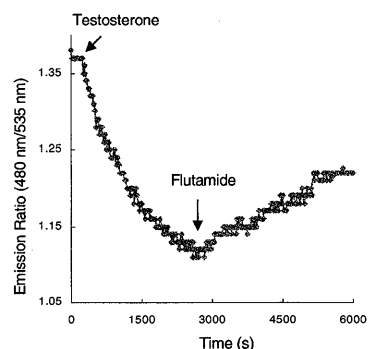


図 6. テストステロンによって誘起された FRET 応答が、抗アンドロゲン剤フルタミドの添加によって反転した。

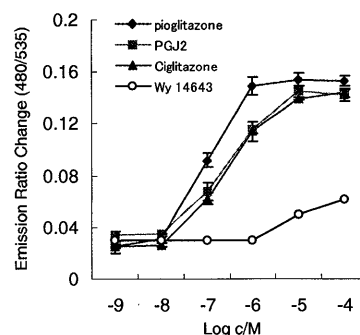


図 7. ピオグリタゾン、15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J_2 、シグリタゾン、および Wy 14643 添加による FRET 応答の濃度依存性。

Thesis Abstract

Fluorescence Assay of Ligands for Nuclear Receptors in Living Cells

Muhammad Awais

Nuclear receptors (NRs) constitute a large family of ligand-activated transcription factors that regulate the expression of specific target genes involved in embryonic development, maintenance of differentiated cellular phenotypes, metabolism and cell death. The members of NRs family include steroid receptors such as estrogen, androgen, progesterone, glucocorticoid receptors (ER, AR, PR, GR); thyroid, retinoic X and retinoic acid receptors; and orphan receptors e.g. peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Pharmaceutical NR agonists and antagonists, such as tamoxifen for ER (targeted in breast cancer), flutamide for AR (targeted in prostate cancer), thiazolidinediones for PPAR γ (targeted in type II diabetes) or dexamethasone for GR (targeted in inflammatory diseases), are among the most commonly used drugs. Coactivator proteins are required by ligand bound-NRs for efficient transcriptional regulation. Ligand binding to a receptor induces a distinct conformational change in the ligand binding domain (LBD) that facilitates or precludes coactivator interaction with the receptor. The sequence alignment and X-ray crystallographic studies suggest that all members of NR family share similar folding of their LBDs. An agonist binding to a NR induces a conformational change in the LBD that exposes a coactivator-docking site on the LBD surface. The subsequent recruitment of coactivator to the NR stimulates the transcriptional activity. In contrast, the conformational change in a NR LBD induced by an antagonist blocks the coactivator recruitment. A coactivator protein interacts with a receptor via a conserved hydrophobic LXXLL motif (L = leucine, X = any amino acid).

In the present study, genetically encoded fluorescent indicators for ER, AR, and PPAR γ were developed for screening of their endo- and exogenous ligands in live cells.

Principle. The principle is shown schematically in Figure 1. LBD of a NR was connected with a coactivator peptide that includes the LXXLL motif via a flexible linker. This fusion protein was sandwiched between cyan (a donor) and yellow (an acceptor) fluorescent proteins (CFP and YFP, respectively) in such a way that the excited and emission spectra of these fluorescent units are suitable for fluorescence resonance-energy transfer (FRET) from CFP to YFP. An agonist binding promotes coactivator recruitment by inducing a conformational change in the LBD that allows

coactivator binding to the receptor. Subsequently, CFP is oriented in the proximity of YFP that results in the FRET increase. By contrast, an antagonist binding induces a different conformation in the LBD, which is not favourable for coactivator interaction.

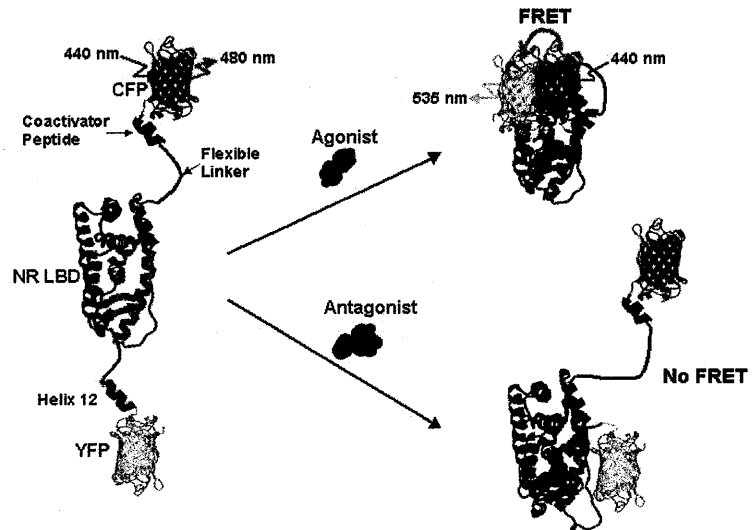


Figure 1. Principle of the *SCCoR* indicator for NRs (ER, AR, and PPAR γ). The ligand-induced positioning of helix 12 of LBD plays an important role for coactivator recruitment.

Thus, the FRET does not occur. The indicators

developed for ER, AR and PPAR γ were named *SCCoR* (Single Cell-Coactivator Recruitment), and the assay was called as **fluorescence *SCCoR* assay**. Monitoring real-time ligand-induced conformational changes in the receptor LBD to recruit coactivator allowed screening of natural and synthetic ligands (agonists and antagonists) for these receptor in single living cells by FRET microscopy.

SCCoR for ER

To construct ER-*SCCoR*, the ER LBD (305-550 aa) was connected with a peptide (HKILHRLQEG) of steroid receptor coactivator 1. This fusion protein then sandwiched between CFP and YFP. The screening of estrogens was done by expressing this construct in CHO-K1 cells.

Upon stimulation with an agonist, 17 β -estradiol (E2), a decrease in

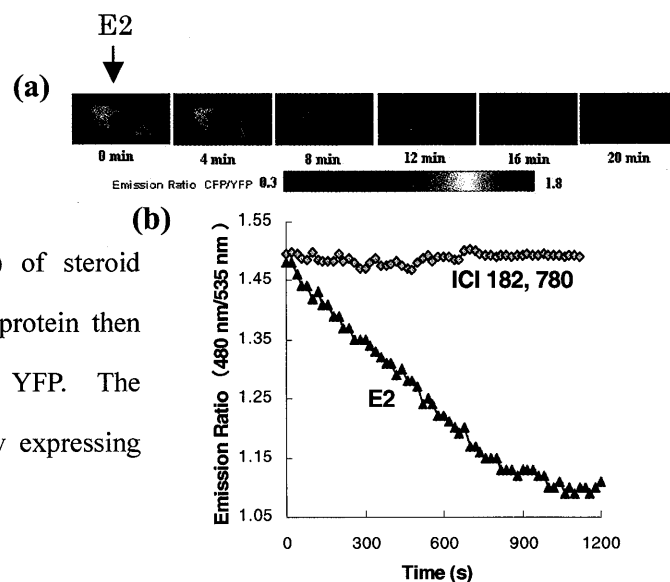


Figure 2. (a). Pseudocolor images of the CFP/YFP emission ratio upon E2 stimulation. (b) Time course of the FRET response upon addition of E2 and ICI 182,780 to CHO-K1 cells, respectively.

the CFP/YFP emission ratio (increase in the FRET) was observed along with the a blue shift of the pseudocolor in the cells images as shown in Figure 2, but no change was observed with the addition of an antagonist, ICI 182,780, under otherwise identical experimental conditions. Most of the endocrine disrupting chemicals (EDCs) have high binding affinity for ER. Screening of E2 and several EDCs (diethylstilbestrol, DES; genistein, Gen; nonylphenol, NP; and bisphenol A, Bis-A) was performed in a dose-dependent fashion as shown in Figure 3. The results are as follows in their decreasing order: E2 > DES > Gen > NP > Bis-A.

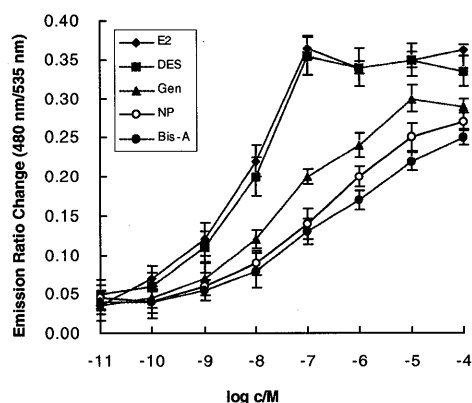


Figure 3. Dose-response curves for agonists (E2, DES, Gen, NP, and Bis-A).

In the case of breast cancer management, the activity of natural estrogen E2 is inhibited by using the anti-estrogens (ER-antagonist drugs). The ability of estrogen antagonists such as ICI 182, 780 and 4-hydroxytamoxifen (OHT) to inhibit E2 activity was also evaluated. The activity of E2 was inhibited completely in the presence of ICI 182,780 or OHT. A 100-fold higher concentration of E2 was required to displace ICI 182, 780 or OHT in order to restore its activity (Figure 4).

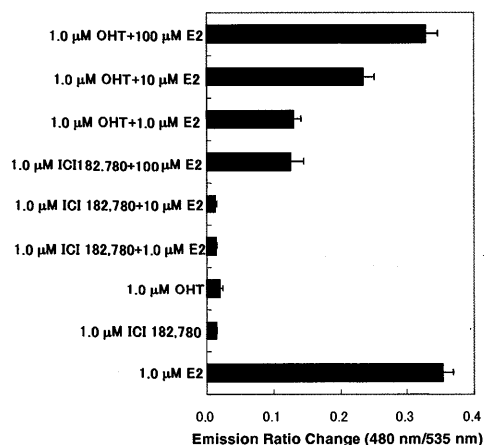


Figure 4. The ability of antagonists to inhibit the activity of E2.

SCCoR for AR

Androgens play a critical role not only in the physiological development of prostate but also in the genesis of prostate cancer by interacting with AR. For constructing AR-SCCoR, AR LBD was connected with Tip-60 coactivator peptide through a flexible linker. The resulted fusion protein was connected with CFP and YFP for FRET microscopy. Androgens such as DHT or testosterone

promoted coactivator recruitment to the AR and induced FRET. But antiandrogens such as flutamide or procymidone were unable to promote FRET. Androgens promoted FRET in a dose-dependent manner as shown in Figure 5. In the case of prostate cancer management, the natural androgen testosterone is replaced from the ligand binding pocket of AR, which is done by using the antiandrogen drugs such as flutamide. The ability of flutamide to displace the testosterone was evaluated by using *SCCoR* indicator. The result is shown in Figure 6.

SCCoR for PPAR γ

PPAR γ is a molecular target for the treatment of several diseases such as cancer, diabetes, asthma, and inflammation. We extended our *SCCoR* approach to develop an indicator for PPAR γ for the screening of endo- and exogenous ligands (drugs for type II diabetes) for this receptor. The response curves for different PPAR γ ligands were obtained as shown in Figure 7.

In conclusion, we have devised a versatile fluorescence assay for screening and characterization of endo- and exogenous ligands for NRs in living cells. The high sensitivity of the present indicators made it possible to distinguish between strong and weak agonists in a dose-dependent fashion. Discrimination of agonists from antagonists was efficiently achieved using the present study. This fluorescence assay for ligands in a high-throughput manner can be used for classifying unknown ligands as agonists, antagonists or partial agonists/antagonists for NRs. The approach described here may be promising in the development and screening of potential drugs against breast cancer, prostate cancer, inflammation, and diabetes.

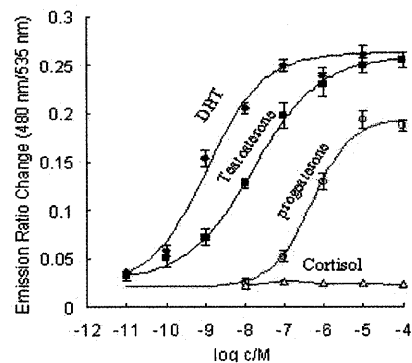


Figure 5. Dose-response curves for AR agonists.

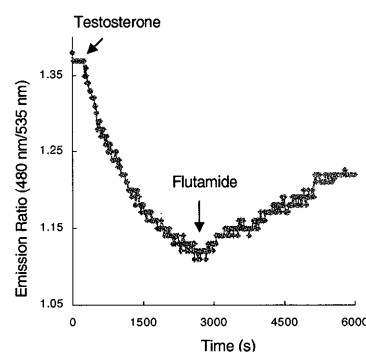
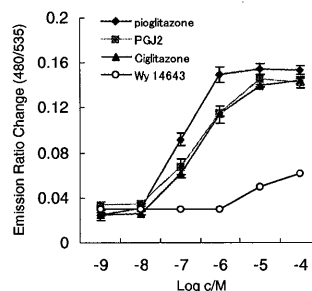


Figure 6. Testosterone induced ratio change was reversed back upon addition of an antiandrogen flutamide.



pioglitazone, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 , (PG J_2), ciglitazone, and Wy 14643.