

研究区分	教員特別研究推進（地域振興）
------	----------------

研 究 テーマ	ダイオキシン受容体 AHR の組換えタンパク質を用いた AHR の活性化評価系の構築				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	志津 怜太
	研究協力者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	吉成 浩一
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	大岡 央
		所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
	発 表 者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	志津 怜太

講演題目
ヒト AHR リガンド評価系の構築に向けた組換えタンパク質の構造解析
研究の目的、成果及び今後の展望 芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor, AHR）は、ダイオキシン類をはじめとする多様な外因性化学物質により活性化されるリガンド依存性転写因子であり、毒性発現に中心的な役割を果たすことが知られている。近年では、内因性代謝物や食事由来成分にも応答し、免疫応答や恒常性維持にも関与することが明らかとなり、創薬標的としても注目されている。一方で、化学物質開発においては、被験物質の AHR 活性化作用の有無が安全性評価および開発判断（go/no-go）において重要な指標となる。しかしながら、従来の評価法は主に培養細胞を用いたレポーターアッセイや初代細胞を用いるものであり、設備依存性や操作の煩雑さ、再現性の課題が存在する。したがって、より簡便かつ高再現性な in vitro 評価系の構築が求められている。本研究では、ヒト AHR 組換えタンパク質の調製および構造解析を通じて、生物物理学的手法に基づく新規 AHR リガンド評価系の構築を目的とした。 AHR のリガンド結合ドメインである PAS-B 領域を GST 融合タンパク質として大腸菌により発現・精製したところ、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて 600kDa を超える高分子側にピークが観察され、凝集体形成が示唆された。一方、AHR は単独では不安定である一方、ヘテロダイマーパートナーである ARNT との複合体形成により安定化することが知られており、近年報告された構造解析においても AHR/ARNT 複合体として調製されている。したがって本研究では、この知見に基づき、二遺伝子共発現ベクター（pCOLADuet-1）を用いて AHR および ARNT の共発現系を構築し、機能的複合体の調製を試みた。その結果、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいてヘテロダイマーと思われる約 80 kDa 付近に主ピークが確認され、単独発現時に認められた凝集体は大きく抑制された。さらに、該当フラクションについて SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った結果、AHR および ARNT の発現がそれぞれ確認された。 これらの結果から、AHR は単独では不安定で凝集しやすい一方で、ARNT との複合体形成により安定化されることが示唆された。本成果は、機能的な AHR 構造を維持した組換えタンパク質調製において、複合体形成が重要であることを示すものである。 今後は、ARNT の共存を明確に確認するとともに、得られた AHR/ARNT 複合体を用いて、蛍光偏光（FP）法や時間分解蛍光（TR-FRET）法などの生物物理学的手法により、リガンド依存的な DNA 結合および共役因子との相互作用解析を行う予定である。これにより、細胞を用いない簡便かつ高再現性な AHR 活性評価系の確立を目指し、創薬および化学物質安全性評価への応用が期待される。