

20020928

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

環境ホルモン受容体センシング法による
内分泌かく乱性の順位予測

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年4月

主任研究者
九州大学大学院理学研究院化学部門

下東 康幸

目 次

| | |
|--------------------------------|----|
| I. 総括研究報告 | |
| 環境ホルモン受容体センシング法による内分泌かく乱性の順位予測 | |
| 下東康幸----- | 1 |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. エストロゲン受容体センシングのモノクローナル抗体の作製 | |
| 坂口和靖----- | 9 |
| 2. グルココルチコイド受容体の基礎生化学的解析 | |
| 坂口和靖----- | 12 |
| 3. ポリクローナル抗体の設計作製、エピトープ解析および試験 | |
| 野瀬 健----- | 16 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- | 22 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷り----- | 23 |

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
総括研究報告

環境ホルモン受容体センシング法による内分泌かく乱性の順位予測

主任研究者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

研究要旨

本研究課題では、抗体を受容体コンホメーション変化のセンシングトレーサーとして用いて、ホルモン受容体結合性、ホルモン作用、抗ホルモン作用の3つの異なる活性を統合的に評価し、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法を確立し、特定のパラメータを解析することで内分泌かく乱性の順位付けを行うことを目的とする。この方法は、厚生労働行政の「化学物質総合対策研究分野」の内分泌かく乱性の順位付けに関する研究課題を直接的に実現するものである。3年計画の初年度となる平成14年度は、女性ホルモン・エストロゲン受容体のコンホメーション変化センシング抗体を用いた一連の化学物質のアッセイを実施し、その結果の解析からの内分泌かく乱作用性の解析する方法論を確立するための検討および得られた解析法からの結果に基づいて作用性順位付けの検討を行った。その結果、抗体応答有効濃度を指標として活性の強弱について合計5種類のグループ化に成功した。このように、応答有効濃度によるグループ化、次いで最大抗体応答性の序列化というスキームによって、エストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用性の順位予測について受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法の概要を確立することに成功した。この方法は、ゲノム解析の結果から判明した、ヒトに存在する48種の核内受容体の全てに適用可能な方法論の確立の成就を意味する。なお、モノクローナル抗体の作製についても年度計画を前倒して着手し、また、グルココルチコイド受容体を始めとする一般の核内受容体への適用についても受容体の基礎生化学的解析などの研究に着手した。

分担研究者

坂口和靖（九州大学大学院理学研究院
化学部門・助教授）

野瀬 健（九州大学大学院理学研究院
化学部門・助手）

質（ホルモン性か？、抗ホルモン性か？）、強さについて精度の高い予測法が求められている。化学物質の内分泌かく乱作用の評価においては、①ホルモン受容体に結合するのか、結合しないのか？結合するとき、どの位強く結合するのか？②受容体結合したのち、ホルモン作用を示すのか？③ホルモン作用を持たずに阻害・遮断作用（抗ホルモン作用）なのか？を判別しなければならない。現在検討されているスクリーニング法は、こうしたホルモン受容体への結合性、ホ

A. 研究目的

内分泌かく乱作用が懸念される非常に多数の既存の化学物質を、迅速にスクリーニングする方法が必要とされている。さらに、それらの内分泌かく乱作用の性

ルモン活性、抗ホルモン活性の3つの活性についてそれぞれ別途に試験されねばならず、きわめて煩雑であり、非効率的である。したがって、これら3つの異なる活性を統合的に評価し、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論の開発が急務である。

こうしたなか最近、我々は「化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする」という、全く新しい着想に基づく「ホルモン受容体結合能および活性化能の同時評価測定法」の開発に成功した。この方法は、ホルモン受容体にホルモンや化学物質が結合すると受容体がホルモン活性型（アゴニスト型）、あるいは不活性型（アンタゴニスト型）に構造（コンホメーション）変化する（図1）のを特異的な抗体で感知（センシング）しようとするものである。この方法は、化学物質のホルモン受容体結合活性のスクリーニングのみならず、ホルモン活性について同時に測定・評価することを可能にする方法である。本申請課題では、この方法を「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立しようとするものである。この方法は原理的には、細胞核内の転写因子をホルモン受容体とする一連の核内受容体のすべてに適用できる方法である。これが確立すると、いわゆる「環境ホルモンの内分泌かく乱作用」問題について、化学物質の適正な評価基準策定の基盤データを与えられる。さらに、この方法は、厚生労働行政の「化学物質総合対策研究分野」の内分泌かく乱性の順位付けに関する研究課題を直接的に実現するものである。

本研究では、転写因子であり有機化合物をリガンドとする核内受容体について、化学物質の内分泌かく乱作用性の評価法を開発することを目的に、以下の項目に

ついて実施する。

- ① 女性ホルモン・エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体を用いた、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法の確立
- ② 核内受容体全般についての一般的な内分泌かく乱作用性の順位予測法の確立
- ③ 受容体コンホメーション変化センシングモノクローナル抗体の作製による予測法の進化改良

なお、初年度である平成14年度では、女性ホルモン・エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体を用いた一連の化学物質のアッセイを実施し、その結果の解析からの内分泌かく乱作用性の解析法の検討および作用性順位付けの検討を行う。

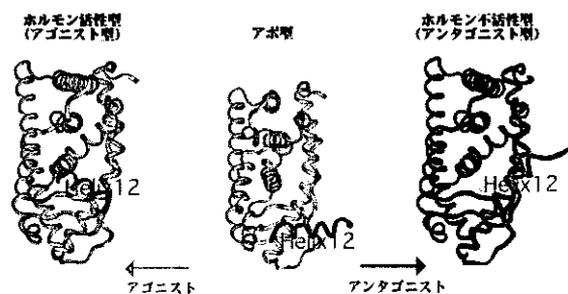


図1. 女性ホルモン・エストロゲン受容体の化学物質結合に伴うコンホメーション変化

B. 研究方法

(1) 抗原ペプチドの合成

女性ホルモン受容体の第12ヘリックスに相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、このペプチドをFmoc固相法により合成した。タンパク質担体との結合のために、ペプチドのN末端にシ

ステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8$ cm, $l = 75$ cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e), $\phi = 25$ cm x 250 mm) により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析 (MALDI-TOF) により行った。

(2) 架橋試薬のキャリアタンパク質への結合

担体タンパク質として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、架橋試薬として 2 価性の *m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた。KLH の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) 溶液 (16 mg/ μ l) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μ l) を 9.3 μ l 添加し、室温で 30 分攪拌した。反応液を遠心分離後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

(3) エピトープペプチドの KLH への結合

上記(1)で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500 μ l に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μ l 加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、(2)で調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230 μ l) および 0.2 M Na_2HPO_4 (115 μ l) を加え、室温で 3 時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

(4) ウサギへの免疫

(3)で調製した抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとし、ウサギ (ニュージーランドホワイト) (2 匹) に免疫した。約 3 ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA により確認した。

(5) 抗体の精製

ウサギより採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分画し、血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。すなわち、まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除去し、次いで合成ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

① 免疫沈降：最終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加えて、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してこなくなるまで繰り返し行った。

② アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel : Pierce 社) に Cys(SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

(6) 調製した抗体のエストロゲン受容体に対する応答の解析

調製した抗体の女性ホルモン・エストロゲン受容体に対する応答を ELISA により調べた。エストロゲン受容体 (10^{-7} ~ 10^{-12} M, 90 μ l) を 17β -エストラジオール (10^{-6} ~ 10^{-10} M もしくは 0 M; 10 μ l) と反応させた。この溶液をあらかじめ調製しておいた抗原ペプチドを吸着させた 96 穴イムノプレートに全量移し、作製した抗体溶液 (10 μ l) を加えて 4°C で終夜インキュベートした。ELISA プレートの調製は、ウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着 (2.5 μ g/ μ l, 50 μ l/well) させ、室温 1.5 時間インキュベート後、洗浄し、ELISA キット (ELISAmate, KPL 社) 付属の BSA

Diluent/Blocking Solution Concentrate を 10 倍に希釈したものによるブロッキングという操作手順により行った。そして、プレートを洗浄後、HRP 標識の 2 次抗体を反応させた。そして、洗浄後に基質（過酸化水素 / 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)）を反応させて発色させ、405 nm の吸光度を測定した。基質は、ABTS Peroxidase Substrate と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 μ l/well とした。

分析の結果、リガンド未処理時（リガンド非存在下）ではエストロゲン受容体の濃度依存的に吸光度が小さくなった。一方、 10^{-6} M の 17β -エストラジオール処理時（ 17β -エストラジオールを受容体に結合させた状態）では、受容体の有無に関わらず吸光度はほぼ一定であった。受容体を加えていない系の吸光度と比較して、吸光度が小さいほど抗体は受容体に結合したことを意味する。したがって、抗体はリガンド非存在下でエストロゲン受容体を強く認識・結合し、一方、天然のエストロゲン・ 17β -エストラジオールを受容体に結合させた状態では、抗体は受容体に結合できなくなることが判明した。

(7) センシングアッセイ

女性ホルモン受容体（40 nM, 90 μ l）に対して化学物質（ 10^{-11} ~ 10^{-5} M, 10 μ l）を室温で 1 時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製した。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着（2.5 μ g/ μ l, 50 μ l/well）させ、室温 1.5 時間インキュベート後、洗浄し、ELISA キット（ELISAmate, KPL 社）付属の BSA Diluent/Blocking Solution Concentrate

を 10 倍に希釈したものによるブロッキングにより行った。リガンド受容体複合体溶液を移した 96 穴イムノプレートにセンシング抗体溶液（10 μ l/well）を加えて 4 $^{\circ}$ C で終夜反応させた。溶液を一括除去により捨て、プレートを洗浄後、1/500 希釈の Horseradish Peroxydase (HRP) 標識 2 次抗体溶液（50 μ l）を加えて室温で 1 時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTS を基質とした酵素反応により溶液を発色させた。基質は、ELISA キット付属の ABTS Peroxidase Substrate と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 μ l/well とした。405 nm の吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

(8) センシングアッセイの解析法

受容体のコンホメーション変化量（抗体応答）は、基準の女性ホルモン・ 17β -エストラジオールに対する相対値として、プレートに残存する 2 次抗体の酵素活性値の測定値から、次式により算出できる。

$$D(\%) = (A - B) \times 100 / (C - B)$$

D: コンホメーション変化量（抗体応答）

A: 受容体および試験化学物質を添加したときの測定値

B: 受容体のみ添加したときの測定値

C: 受容体および過剰量の女性ホルモンを添加したときの測定値

EC_{50} 値の算出は以下のように行った（図 2）。まず、各化学物質の濃度に対して抗体応答をプロットし、抗体応答がプラトーに達したときの値を最大抗体応答性 $R_{max}(\%)$ として、これをグラフより算出した。さらに、得られたシグモイド様曲線を解析プログラム ALLFIT で数理解

析し、 $R_{max}(\%)$ 値の 50% に対応する化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC_{50}) として、これの値を算出した。また、上記のようにして求めた最大抗体応答性 $R_{max}(\%)$ は、試験化学物質が受容体を活性化型コンホメーションに転化できる割合の最大値を示し、試験化学物質のホルモン活性を表すパラメータとなる。すなわち、評価としては、抗体応答 (縦軸) はホルモン活性の強さの指標となり、 EC_{50} 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

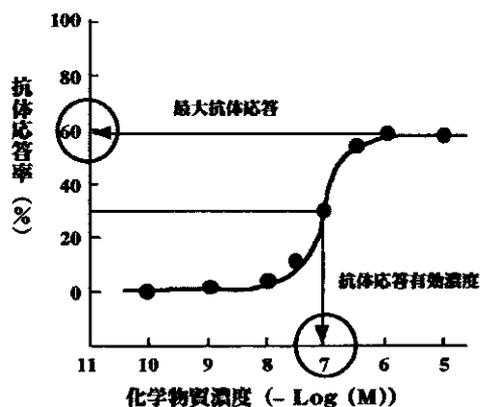


図 2. EC_{50} 値の算出方法

C. 研究結果

受容体に 17β -エストラジオール (E2) (アゴニスト) が結合すると、受容体が構造変化し、抗体の受容体への結合量が減少する。この減少の程度を E2 の濃度を変えて測定すると、用量依存的な相関曲線が描かれた。これは、E2 の受容体結合能とそれが引き起こす受容体構造変化の程度を定量的に相関させた受容体結合活性試験の構築が可能であることを示す。また、同じ天然の女性ホルモンのエストリオール (E3) や合成女性ホルモンについても同様の結果が得られた。しかし、エストロン (E1) は E2 に比較して格段

に応答性が低く、E1 の実際の受容体結合性および転写活性の結果とよく符合することが判明した。さらに、アンタゴニスト・ヒドロキシタモキシフェンについて検討したところ、E1、E2、E3、そして合成女性ホルモンいずれの場合とも異なる抗体応答を示した。ジエチルスチルベストロールおよび 4-ヒドロキシタモキシフェンの濃度に対して抗体応答をプロットした結果を 17β -エストラジオールと併せて図 3 に示す。

これらの結果より本法は、化学物質が結合して引き起こした構造変化が活性型か、不活性型の判別により、ホルモン活性の有無を、また、その抗体応答の強さで受容体結合の強さを同時に判定できるアッセイ系であることが判明した。しかしながら、不活性型でアンタゴニストをアゴニストから峻別するには基本的には、アンタゴニストの結合に伴うコンホメーション変化のみを感知する抗体、あるいはアゴニストの結合に伴うコンホメーション変化のみを感知する抗体が必要となる。

平成 14 年度には、ER について内分泌かく乱作用が懸念されるとされた化学物質 503 種類のうち、受容体結合性が確認された約 300 種から約 150 種についてセンシング抗体を用いて解析した。現在までに分析したこれら約 150 種のうち有効な解析を与えた 57 種の化学物質について、得られたプロットデータから各々の受容体へ結合能を表す抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) とホルモン活性の程度を表す最大抗体応答性 ($R_{max}(\%)$) を求める二次解析を実施した。測定可能な濃度領域において、抗体応答性の最大値 $R_{max}(\%)$ が算定できたのは 57 種の化学物質のうち 33 種のみであった。これらについて、抗体応答有効濃度と最大抗体応答性の結果を表 1 に示す。

表 1. 各化学物質の抗体応答と EC₅₀ の値

| 順位 | 化合物名 | 抗体応答有効濃度 (nM) | 最大抗体応答性 (%) |
|----|--|---------------|-------------|
| 1 | Diethylstilbestrol dipropionate | 1.4 | 41 |
| 2 | Estrone | 5.8 | 38 |
| 3 | Hexestrol | 6.4 | 54 |
| 4 | 17-Epiestriol | 7.3 | 102 |
| 5 | 6β-Hydroxyestradiol | 15 | 42 |
| 6 | Estriol | 16 | 113 |
| 7 | Diethylstilbestrol | 16 | 79 |
| 8 | 6-Ketoestradiol | 17 | 73 |
| 9 | Ethinylestradiol | 21 | 91 |
| 10 | Dehydrostilbestrol | 21 | 61 |
| 11 | 17β-Estradiol | 24 | 100 |
| 12 | 6α-Hydroxyestradiol | 27 | 73 |
| 13 | β-Zearalenol | 29 | 43 |
| 14 | α-Zearalenol | 30 | 61 |
| 15 | Coumestrol | 43 | 61 |
| 16 | 4-Hydroxyestradiol | 51 | 85 |
| 17 | 2-Hydroxyestradiol | 91 | 88 |
| 18 | Genistein | 210 | 56 |
| 19 | 4,4'-Dihydroxytetraphenyl methane | 230 | 41 |
| 20 | 4-(1-Adamantyl)phenol | 270 | 51 |
| 21 | p-Naphtholbenzein | 270 | 42 |
| 22 | Daizein | 390 | 38 |
| 23 | 5α-Dihydrotestosterone | 480 | 77 |
| 24 | β-Zearalanol | 510 | 47 |
| 25 | 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-penane | 850 | 12 |
| 26 | 6-Hydroxy-2-naphthyl disulfide | 930 | 37 |
| 27 | 6-Hydroxyflabone | 1,300 | 43 |
| 28 | 4-Vyclohexylphenol | 1,400 | 33 |
| 29 | Nonylphenol | 2,200 | 30 |
| 30 | 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane | 5,400 | 78 |
| 31 | Triphenylethylene | 11,000 | 58 |
| 32 | 4,4'-Dihydroxydiphenylmethane | 50,000 | 44 |
| 33 | 4-n-Octylphenol | 130,000 | 48 |

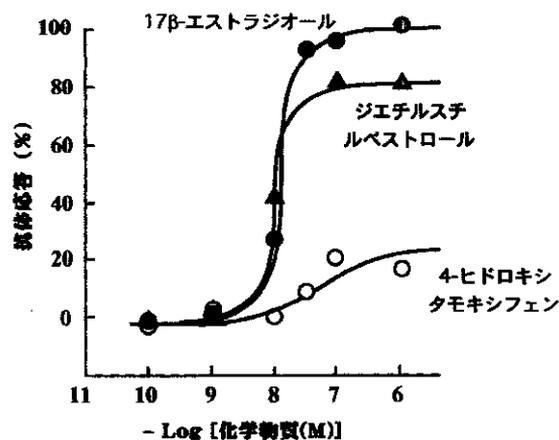


図 3. 各化学物質の用量依存曲線

D. 考察

表 1 に示すセンシング抗体アッセイにより得られた解析結果に基づいて、抗体応答有効濃度を横軸に、最大抗体応答性を縦軸にして、ホルモン受容体の抗体応答性を各化学物質について解析した。その結果、図 4 に示すように、抗体応答有効濃度（横軸）を指標として見たとき、活性の強弱についてグループ（第 1～第 3 グループ）に分けられることが判明した。受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、抗体応答有効濃度がきわめて小さく、最大濃度での最大抗体応答性が非常に小さい化学物質群（第 4 グループ）は、図 4 にはプロットされない。また、エストロゲン受容体に全く結合しない化学物質群（第 5 グループ）も図 4 にはプロットされない。こうして、応答有効濃度によるグループ化、次いで最大抗体応答性の序列化という手順・スキームによって、女性ホルモン・エストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用性の順位予測について受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法の概要が確立できた。

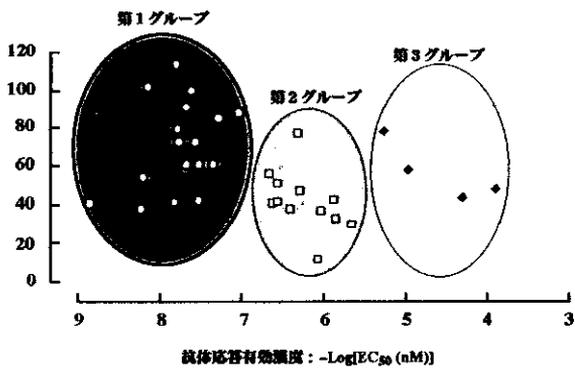


図4. 化学物質のエストロゲン受容体
コンホメーション変化センシング
抗体による相互作用性解析

ところで、例えば最大活性の化学物質群・第1グループについては、最大抗体応答性が40~120%の領域に分布する(図4)。これらの抗体応答性を識別・解析するためには、モノクローナル抗体の作製が必須と考えられる。このため、平成15年度より取組む予定のモノクローナル抗体作製を今年度から開始し、クローン選別の段階まで進んだ。今後、アゴニスト、あるいはアンタゴニスト特異的な抗体の選別をはじめ、有効なモノクローナル抗体の獲得のため、抗体効率を試験する受容体アッセイを洗練することとした。

一方、エストロゲン受容体は、ヘリックス12のC端側にさらに延長ペプチドを持っており、ここをエピトープとする抗体にさらに良好なセンシング抗体を与える可能性がある。当初の計画にはなかったが、C端延長部分に抗原ペプチドを3種類設定して、抗体作製を試みた。しかしながら、分担報告書にあるように、これら3種の抗体はいずれもコンホメーション変化センシングには適しておらず、抗原ペプチドにはヘリックス12が含まれていることが必須であることが判明した(分担研究報告を参照)。

E. 結論

本研究課題では、女性ホルモン・エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体を用いた一連の化学物質のアッセイを実施し、その結果の解析からの内分泌かく乱作用性の解析法の検討および作用性順位付けの検討を行った。その結果、抗体応答有効濃度を指標として見たとき、活性の強弱について合計5種類のグループ化に成功した。このように、応答有効濃度によるグループ化、次いで最大抗体応答性の序列化のフローチャートを完成した。これによって、女性ホルモン・エストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用性の順位予測について受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法の概要を確立することに成就した。

F. 研究発表 論文発表

1. Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing the estrogen receptor conformation changes, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 127-130 (2003).

2. The effect of the peptide corresponding to the No. 12 α -helix on the conformation change in the estrogen receptor activation, H. Ishimori, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 437-438 (2003).

学会発表

1. 野瀬 健、中井 誠、浅井大輔、河野道昭、矢可部芳州、下東康幸、エストロゲン・女性ホルモン受容体のホモロジーモデリング、平成 14 年度日本生化学会九州支部例会、2002. 5. 18～19。

2. 浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体による内分泌かく乱物質のホルモン応答の生化学的評価、第 39 回ペプチド討論会、2002. 10. 16～18。

3. 石盛英樹、浅井大輔、中井 誠、矢可部芳洲、野瀬 健、下東康幸、

エストロゲン受容体コンホメーション変化における第 12 α -ヘリックス相当ペプチドの受容体活性化への効果、第 39 回ペプチド討論会、2002. 10. 16～18。

4. 浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、坂口和靖、下東康幸、ホルモン受容体コンホメーションセンシング抗体による内分泌かく乱化学物質の統合的評価、日本内分泌攪乱物質学会第 5 回研究発表会、2002. 11. 25～26。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告

エストロゲン受容体センシングのモノクローナル抗体の作製

分担研究者 坂口和靖 九州大学大学院理学研究院助教授

エストロゲン受容体のヘリックス 12 (H12) を抗原とするポリクローナル抗体は、化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする。一方、コンホメーション変化の認識において、異なるリガンドによる変化を高い選択性で識別認識できる抗体が期待される。こうした抗体としてモノクローナル抗体が有力であり、モノクローナル抗体の作製が緊要である。本課題では、高選択的・特異的なモノクローナル抗体の創製を目指し、ミエローマ細胞融合法により抗体作製に取り組んだ。ポリクローナル抗体を作製した時に使用した同じ抗原ペプチドを、マウス下肢に免疫後、リンパ節細胞を摘出しミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを培養し、ELISA によるスクリーニングを実施した。その結果、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローン約 45 種を見出した。これらの抗体をさらに受容体認識能の観点からスクリーニングし、目的に叶うセンシング抗体を得て、抗体アッセイ系を構築する予定である。

A. 研究目的

エストロゲン受容体の H12 を抗原とするポリクローナル抗体は、化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする。ところで、ポリクローナル抗体は、それぞれのコンホメーション変化構造に特異的な抗体の集合体と考えられる。したがって、もしこれらをモノクローナル抗体として別途に調製することができれば、アゴニストとアンタゴニストを区別ながら特異的に定量・測定できるアッセイ系の構築が可能になる。本研究課題では、こうした異なるリガンド（アゴニストとアンタゴニスト）によるコンホメーション変化を高い選択性で識別認識できる抗体を作製すべく、モノクローナル抗

体の作製を実施することとした。

高選択的・特異的なモノクローナル抗体の創製のため、ミエローマ細胞融合法を採用し、高効率での抗体作製に取り組んだ。

B. 研究方法

モノクローナル抗体の作製法

(1) 抗原ペプチドの調製

エストロゲン受容体(ER)のうち、リガンドの結合により構造変化を起こすことが見いだされているヘリックス 12 (H12) 部位を抗原として選定した。そして、これに相当する配列の N 末端にシステインを付加し、合計 17 アミノ酸残基から成るペプチドを化学合成した。合成は Fmoc 自動固相合成法により実施した。

(2) キャリアタンパク質との結合

合成ペプチドを MBS 架橋剤によりシステイン残基を介して Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) と結合させ、ゲルろ過により精製して抗原とした。

(3) マウスへの免疫

免疫増強剤との混合するため、40 ng 相当量の抗原ペプチド溶液を等量のフロインド完全アジュバンドと混合した。この混合溶液を超音波破碎装置を用いて乳濁液エマルジョンにした。

(4) 皮下への注射

業者より購入した 8 週令オスの Balb/c マウス 2 匹をクロロホルム麻酔し、後肢の足蹠に抗原エマルジョンを 50 μ L ずつ注射皮下し、引き続き飼育した。

(5) 細胞融合

ミエローマ細胞の培養のため、マウス由来ミエローマ細胞 P3X63Ag8U.1 をヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。これを 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地中で、37°C・5% CO₂ 環境下で培養した。

(6) マウスのリンパ節の摘出

免疫後 9 日目に、マウス後肢大腿部より合計 4 個の肥大したリンパ節を摘出し、DMEM 培地中で破碎・ろ過した。そして、回収されたリンパ節細胞数を計数した。

(7) 細胞融合と選択培養

リンパ細胞とミエローマとを 5:1 の割合になるよう混合して遠心の後、ポリエチレングリコールを添加して細胞を融合させた。遠心による洗浄後、HAT 選択培地で再懸濁し、これを 96 ウェル培養プレート 4 枚に播き込んで培養した。

(8) 抗体産生細胞のスクリーニング

培養上清を採取するため、培養開始後 10 日目頃から生存が認められたウェル中の細胞を順次 DMEM 培地で継代培養し、その培養上清を回収した。培養上清に含まれる抗体を以下の 2 段階のスクリーニングで検定した。

(9) ELISA 法による一次スクリーニング

抗原として用いたペプチド、またはキャリアタンパク質を、96 穴ウェルイムノプレート中に固相化した。そして、酵素標識抗マウス二次抗体を用いた間接 ELISA 法を実施した。これにより、ペプチドに反応するがキャリアタンパク質には反応しないような抗体を産生する細胞を選別した。

(10) ELISA 法による二次スクリーニング

一次スクリーニングで陽性であった細胞の培養上清を各々カートリッジ式フィルターユニットを用いて限外ろ過して低分子夾雑物を除去した。これらについて、ペプチド抗原を固相化し、ER を競合剤として用いた競合 ELISA 法を実施した。ここで、ER のみを競合剤として用いた場合と ER にあらかじめリガンドであるエストラジオールを添加して用いた場合との抗原抗体反応を比較することで、リガンド結合型 ER と非結合型 ER への結合に差異のあるような抗体の産生細胞を探索した。

C. 研究結果

平成 14 年度に、若手研究者育成活用事業（リサーチ・レジデント）において 1 名（桑田 治氏）を採用し、エストロゲン受容体の H12 を抗原とするモノクローナル抗体の作製を開始した。現在までに、マウス下肢にポリクローナル抗体を作製した時に使用した同じ抗原ペプチド

を免疫後、リンパ節細胞を摘出し、ミエローマ細胞と融合させて得たハイブリドーマを培養し、ELISA によるスクリーニングを実施した。その結果、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローン約 45 種を見出した。現在、これらをエストロゲン受容体存在下でホルモンおよび化学物質共存での応答からクローンを特定するために、アゴニスト（ 17β -エストラジオールおよびエストロン）を用いてスクリーニングを実施している。

D. 考察

高いセンシング能が期待されるモノクローナル抗体を作製することは、抗体を用いた化学物質のリスク評価法を大きく改良することが期待される。一方で、個々のモノクローナル抗体をスクリーニングし、必要なクローンを得る操作が重要となる。新規な受容体にセンシング抗体を適応するとき、この両者の兼ね合いを考慮し、初期スクリーニングにはポリクローナル抗体法、精密なスクリーニングにはモノクローナル抗体法が有用であると考察された。

現在は未だ抗体のスクリーニングの段階であるが、もし選択的なモノクローナル抗体が得られるならば、少なくとも以下の3点でポリクローナル抗体を凌ぐ優秀な抗体が創製される可能性が強い。まず、抗体応答有効濃度（EC₅₀）が非常に小さくなる、即ち、化学物質の受容体結合親和性に相応する濃度での抗体応答が期待される。さらには、ホルモン活性を誘起

するエストロゲンのみならず、これを遮断するアンタゴニストの結合によるコンホメーション変化のみに感知する抗体の創製が期待される。また、コンホメーション変化に対するモノクローナル抗体の絶対的な応答の上昇のため、抗体応答率の向上、すなわち、抗体感度の向上が期待される。これらのため、まずは、アゴニストに対する認識能がはるかに向上した抗体の創製が肝要と思われる。

E. 結論

平成 15 年度開始予定のモノクローナル抗体法に着手した。現在、優れたセンシング能を有する抗 H12 センシングエストロゲン受容体モノクローナル抗体を選別中である。今後、これらの抗体を用いるセンシング抗体アッセイ系を構築する予定である

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報は無い。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告

グルココルチコイド受容体の基礎生化学的解析

分担研究者 坂口和靖 九州大学大学院理学研究院助教授

副腎皮質ホルモン・グルココルチコイドは、末梢 T 細胞系において免疫抑制に重要である。一方、グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現しており、その機能も多岐に及んでいる。こうしたなか、環境化学物質の GR への影響が危惧され、特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されている。平成 14 年度の研究者派遣事業において、この GR に関する生化学的な基礎研究を実施した。その結果、合成グルココルチコイド・デキサメタゾン (16α -methyl- 9α -fluoro- Δ^1 -hydrocortisone:Dex) を用いた解析から、① GR 以外の受容体、あるいは結合タンパク質 3 種を同定、② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子として *Lcn2* を発見、③ Dex により培養上清にアポトーシスを誘導する因子が分泌されており、その可能な因子として Lipocalin 2 を同定するという、非常に興味深い成果が得られた。

A. 研究目的

平成 14 年度の食品・化学物質安全総合研究推進事業の「外国への日本人研究者派遣事業」(社・日本食品衛生協会)において、分担研究者・坂口和靖をアメリカ合衆国・国立衛生研究所 (NIH)、国立癌研究所 (NCI) のアッシュウェル博士のもとに派遣し、グルココルチコイド受容体の基礎生化学的解析の研究に従事した。本研究課題は、15 年度以降に実施予定であった、女性ホルモン・エストロゲン受容体以外の核内受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体法において、特に受容体分子の生化学的基盤を得るため、最もありふれて、どの細胞にも存在するグルココルチコイド受容体について検討するものである。この課題は交付申請の段階では上梓していなかったが、興味深い結果が一部えられたので、別途に分担研究報告として作成するもの

である。

副腎皮質ホルモン・グルココルチコイドは、末梢 T 細胞系において免疫抑制に重要であり、一方、グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現しており、その機能も多岐に及んでいる。こうしたなか、環境化学物質の GR への影響が危惧されている。なかでも、特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されている。グルココルチコイドは副腎皮質ホルモンであり、エストラジオールやアルドステロン等と同様にコレステロールを前駆体として生合成される。グルココルチコイド受容体 (GR) はステロイド/甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーに属し、グルココルチコイドが結合することによりホモ二量体となり細胞質より核内に移項しその機能を発揮する。デキサメタゾン (16α -methyl- 9α -fluoro- Δ^1 -hydrocortisone:Dex) は合成

グルココルチコイドであり、強力な抗炎症・抗アレルギー作用を持つ。ところで、GR ノックアウトマウスにおいても、胸線におけるグルココルチコイド応答が見られ、GR 以外の核内受容体の存在が示唆されている。Dex は医薬品としても重要であり、その機能は主にグルココルチコイド受容体を介すると考えられているが、T 細胞に対するアポトーシス誘導機構は明らかとはなっていない。

本研究においては、Dex による T 細胞アポトーシス誘導機構の解明のために、① GR 以外のグルココルチコイドに対する受容体あるいは結合タンパク質の同定、② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子の解析、③ 胸線リンパ球のアポトーシスにおいてきわめて重要な働きをしている IAP-TRAF 系のユビキチン化経路を解析するために、TRAF2 タンパク質の cIAP1 によるユビキチン部位の同定を試みた。

B. 研究方法

① GR 以外のグルココルチコイドに対する受容体あるいは結合タンパク質の同定

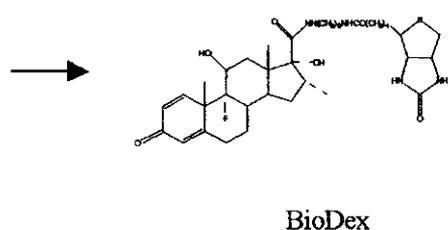
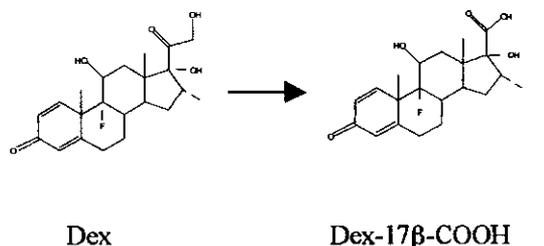


図1 BioDex の合成スキーム

まず、Dex の 17β位を過ヨウ素酸処理によってカルボキシル化した後、リンカーを付加したビオチン誘導体 5-(biotin-amido)pentylamine と EDC-HOBt 法によりカップリングすることによってビオチン化 Dex (BioDex) を合成した (図1)。

② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子の解析

野生型 (WT) および GR ノックアウト (GRKO) マウスの 18d 胎児の胸線リンパ球について、DNA マイクロアレイ (10,000-cDNA element mouse expression microarray, NCI) を用いて Dex 制御遺伝子の解析を実施した。

③ TRAF2 タンパク質の cIAP1 によるユビキチン部位の同定

IAP (inhibitor of apoptosis) 分子は、T 細胞において種々のアポトーシス刺激を阻害することが知られているが、その正確な機能は明らかではない。IAP ファミリーの一員である cIAP1 はユビキチンリガーゼ E3 活性を持ち、cIAP1 自身や TRAF2 分子をユビキチン化し、その機能を調節することが示されている。今回、TRAF2 のユビキチン部位を同定する目的で、*in vitro* translation 法により [³⁵S-Met]ラベル化 HA-TRAF2 を発現し、48 位 Lys 残基を Arg 残基に置換した K48R ユビキチンを用いてユビキチン化実験を実施した。この際、E1 および E2 としては小麦 E1 およびヒト UbcH5B をそれぞれ使用し、E3 酵素には GST-cIAP1 を用いた。

C. 研究結果

① GR 以外のグルココルチコイドに対する受容体あるいは結合タンパク質の同定

合成した BioDex は TLC で単一バンドであり、質量分析によってその分子量は計算値と一致した。この BioDex を用いて、ヒト末梢血単核球より得られた可溶化物より、アビジンビーズにより Dex 結

合タンパク質をアフィニティー精製した。その結果、SDS-PAGE 上で 70~100 kDa に少なくとも 3 本のバンドが確認された。これらのバンドを切り出した後、タンパク質をゲル中でトリプシンにより酵素消化した。現在、これらのバンドについてマスペクトルを用いた解析を実施中である。

② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子の解析

DNA マイクロアレイ実験の結果、興味ある遺伝子のひとつとして *Lcn2* を見出した。*Lcn2* の遺伝子産物 Lipocalin 2 は、分泌タンパク質である Lipocalin ファミリーに属し、脂肪類、ステロイド、胆汁酸などの疎水性の有機小分子を結合することが知られている。半定量的 PCR 法において、WT では Dex により *Lcn2* が 10 倍以上転写活性化されていることが示された。一方 GRKO では、その誘導は低かった。

一方、T 細胞系 2B4 細胞を用いた予備実験において、細胞を BioDex 存在下と 24 時間培養した後、その培養上清をアビジンビーズ処理して BioDex を取り除いた。これを新しい 2B4 細胞に加えたところ、その細胞の 74% がアポトーシスを起こした。

これらの結果は、Dex により培養上清にアポトーシスを誘導する因子が分泌されており、Lipocalin 2 がその因子である可能性を示唆する。

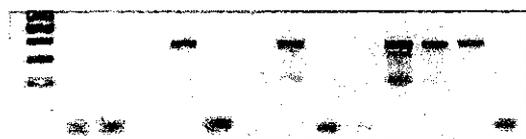


図2 *Lcn2* 遺伝子の発現 テンプレートには 1-3:GR2KO, 4-6:GR2KO/Dex, 7-9:WT, 10-12:WT/Dex, 13:genomic を使用した。

希釈は、1, 4, 7, 10=1/1、2, 5, 8, 11=1/5、
3, 6, 9, 12=1/25

③ TRAF2 タンパク質の cIAP1 によるユビキチン部位の同定

ユビキチン化実験により、主としてモノ、ジユビキチン体の生成が見られたが、より大きなポリユビキチン体も観察された。これは、ポリユビキチン化が 48 位以外の Lys 残基を介して起こっている可能性を示している。プロテアソームの認識に重要な役割を果たしているポリユビキチン化は 48 位 Lys 残基を介し、63 位 Lys 残基を介したポリユビキチン化は DNA 修復やエンドサイトシスなどの調節に深く関わっていることが知られている。このことより、TRAF2 のユビキチン化による調節は、プロテアソーム分解系ではなく、局在化などの他の機構による可能性を示唆している。

D. 考察

以上のように、GR と他の核内受容体スーパーファミリーのクロストークによる機能調節機構の可能性を含めた研究の基盤を構築するために、グルココルチコイド応答における一連のシグナル伝達に関する研究を実施し、2、3 の興味深い結果を得た。

グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現している、いわば万能受容体である。留意したいのは、GR の機能が非常に多岐に及んでいることである。そして、環境化学物質の GR への影響が危惧されていることである。特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されており、グルココルチコイド受容体に対する環境化学物質の精確な応答解析はきわめて大切である。グルココルチコイドは副腎皮質ホルモンであり、エストラジオールやアルドステロン等と同様にコレステロールを前駆体として生合成される。このため、多種多様な化学物質が結合し、ホルモン活性を誘導する可

能性がある。その受容体解析は必須である。

E. 結論

末梢 T 細胞系において免疫抑制に重要である副腎皮質ホルモン・グルココルチコイドの受容体 (GR) は、ほとんどすべての細胞に発現している。こうしたなか、環境化学物質の GR への影響が危惧され、特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されている。平成 14 年度の研究者派遣事業において、この GR に関する生化学的な基礎研究を実施した。特に、合成グルココルチコイドの 1 つであるデキサメタゾン (16α -methyl- 9α -fluoro- Δ^1 -hydrocortisone:Dex) を用いた解析から、い① GR 以外の受容体、あるいは結合タンパク質 3 種を同定、② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子として *Lcn2* を発見、③ Dex により培養上清にアポトーシスを誘導する因子が分泌されており、その可能な因子として *Lipocalin 2* を同定するという、非常に興味深い成果が得られた。今後、

こうした生化学的な解析研究と並行して、GR を介した内分泌かく乱作用性の解析を本研究事業の重要な研究標的として取り組むことにし、平成 15 年度以降にエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) に加えて GR をまず取り上げることにした。既にこの遺伝子クローンを入手したので、これを用いた量的な受容体タンパク質発現系を構築する予定である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報は無い。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告

ポリクローナル抗体の設計作製、エピトープ解析および試験

分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院助手

核内受容体は、リガンド非結合状態、アゴニスト結合状態、アンタゴニスト結合状態の3つの異なる状態で、それぞれで立体構造・コンホメーションが異なる。我々は、これらのコンホメーション変化を抗体で感知・センシングする方法は、化学物質が核内受容体を介して示す内分泌かく乱作用のリスクを評価する統括的な方法としてきわめて有効であることを見出した。この方法の最も重要な分子ツールは、高感度な抗体である。このため、すべての核内受容体に対して、高効率的にセンシング抗体を作製できる一般的な方法論の開発が必要となった。本研究では、この核内受容体の異なる3つの立体構造を精査することにより、センシング抗体法の原理を解析する。今回、核内受容体のアミノ酸配列のアラインメント、立体構造のホモロジーモデリング等の解析の結果、内分泌かく乱作用の懸念される核内受容体全般に対するセンシング抗体のデザイン法を確立するに至った。特に、この方法の検証の意味も含めてエストロゲン受容体ヘリックス 12 を含む受容体C端部分に対して、どの部分がより有効なエピトープとなるかについて解析したところ、ヘリックス 12 のN端部分を含むペプチドフラグメントをエピトープとした抗体のみに、センシング活性が見られた。

A. 研究目的

一般に、核内受容体はリガンド結合により調節を受ける転写因子の1グループである。現在までに、多くのゲノム解析プロジェクトが進展し、タンパク質として解析された核内受容体についても、動物種によりかなりの種類の受容体が明らかとなった。その判明した一次構造から、例えば、ヒトでは48種の核内受容体が存在すると推定されている。こうした核内受容体ファミリーは互いに高い相同性を示し、その立体構造はA~E領域に分けて考えられている(図1)。リガンドの結合に関与する部位はEの領域で、リガンド結合ドメイン(Ligand Binding Domain:LBD)と呼ばれる。

このLBDは主に、内分泌かく乱化学物

質の作用・結合部位と考えられ、LBDに対してリガンドと同様に、もしくはリガンドの結合を遮断するように結合すると考えられている。このLBDは部分タンパク質として、遺伝子工学的に発現され、受容体結合試験等に用いられている。一方、

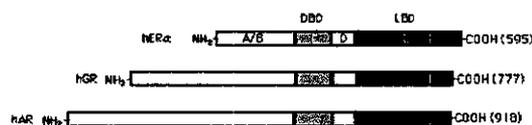


図1. 核内受容体のドメイン構造
hER α : ヒト・エストロゲン受容体 α ,
hGR: ヒト・グルココルチコイド受容体
hAR: ヒト・アンドロゲン受容体
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

発現 LBD を用いた X 線結晶構造解析による立体構造解析も近年大幅に進展してきている。

こうしたなか、計算科学の進展に伴って、コンピュータ計算モデリングにより立体構造を非常に精度良く推定することが可能になってきた。本研究においては、この核内受容体のリガンド結合ドメインの立体構造をリガンド非結合状態（アポ型構造）、リガンド結合状態（ホロ型構造：アゴニスト結合状態、アンタゴニスト結合状態）の 3 つの異なる状態で、分子軌道計算モデリングにより精査する。そして、これに基づいてセンシング抗体法の原理を確立することを目的とする。その原理の基礎となるのは、アポ型構造からホロ型構造への転換において最も基本的な構造変化・コンホメーション変化の部位を解析することであり、これをエピトープとして抗体作製すれば、コンホメーション変化と高効率で感知・センシングする抗体になると期待される、という考え方である。したがって、本研究では、コンホメーション変化部位の解析、この変化部位、あるいは変化誘導部位の核内受容体での共通性の解析、エピトープの解析などが課題となる。こうして、核内受容体全般に適用可能なセンシング抗体のデザイン法を確立することを最終の目的とする。

B. 研究方法

① 立体構造データの検索と入手

核内ホルモン受容体のリガンド結合状態（アゴニストが結合、もしくはアンタゴニストが結合したもの）の立体構造は、PDB (Protein Data Bank) に登録されている。これらは全て LBD 部分の X 結晶構造解析データであり、インターネットを通じて直接に入手した。

② 受容体構造の解析

PDB より入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム InsightII/Discover (Accelrys 社製) で解析した。コンピュータは SGI 社製、グラフィックワークステーション 02 を使用した。

③ 受容体立体構造の分子モデリング

構造未知のリガンド非結合型構造立体構造はホモロジーモデリング法で作製した。ホモロジーモデル構造の作製には、Accelrys 社製ホモロジーモデリングプログラム一式、Homology, Modeler, DiscoverII を使用した。

④ 抗原ペプチドの合成

女性ホルモン受容体の第 12 ヘリックスを含む C 端部分に相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、このペプチドを Fmoc 固相法により合成した。タンパク質担体との結合のために、ペプチドの N 末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8 \text{ cm}$, $l = 75 \text{ cm}$) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e), $\phi = 25 \text{ cm} \times 250 \text{ mm}$) により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析により行った。

⑤ 架橋試薬のキャリアタンパク質 KLH への結合

担体タンパク質として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、架橋試薬として 2 価性の *m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた。

KLH の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) (16 mg/ μl) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μl) を 9.3 μl 添加し、室温で 30 分攪拌した。反応液を遠心分離後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により

精製し、目的物を得た。

⑥ エピトープペプチドのKLHへの結合

上記で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500 μ l に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μ l 加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、先に調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230 μ l) および 0.2 M Na₂HPO₄ (115 μ l) を加え、室温で 3 時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

⑦ ウサギへの免疫

先に調製した抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとし、2 匹のウサギ (ニュージーランドホワイト) に免疫した。約 3 ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA により確認した。

⑧ 抗体の精製

まず、採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分離し、血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除去し、次いで合成ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

⑨ 免疫沈降

終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加えて、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してなくなるまで繰り返し行った。

⑩ アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel : Pierce 社) に Cys(SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

C. 研究結果

エストロゲン受容体のリガンド結合による構造変化を解析するため、リガンド非結合型 (アポ型) 受容体の立体構造が必要である。しかし、アポ型構造は現在まで解析されていないため、コンピュータ上で構築しなければならない (図 2)。一方、種々の異なるリガンドを結合したエストロゲン受容体の LBD の立体構造を図 3 に示した。

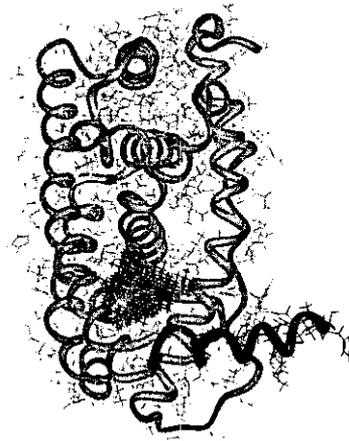


図 2. 分子モデリングで作成したエストロゲン受容体 LBD アポ型構造 + で示すのは推定リガンド結合部位、濃色で示すのがヘリックス 12。