

図 3 に示すように、アゴニストである  $17\beta$ -エストラジオールやジエチルスチルベストール (diethylstilbestrol, DES) を結合した LBD のヘリックス 12 は、右から左上方に向いているが、アンタゴニストであるラロキシフェンや 4-ヒドロキシタモキシフェンを結合している場合、左から右上に向いている。そこで、ヘリックス 12 を含むポリペプチド断片を化学合成し、これを抗原としたポリクローナル抗体を作製したところ、コンホメーション変化のセンシングアッセイに成功した。このヘリックス 12 を含むポリペプチド断片にエピトープが存在することが判明したが、正確にどこがエピトープとなっているのか、その部位を解析するため、ヘリックス 12 近傍の立体構造を詳細に解析した (図 4)。その結果、ヘリックス 12 が非常に明瞭な両親媒性の  $\alpha$ -ヘリックス構造をしていること、リガンドが結合したときこのヘリックス 12 は疎水性面のアミノ酸側鎖で受容体 LBD 本体へ結合すること、そして、疎水性面のアミノ酸側鎖の結合はヘリックスアゴニストが結合した場合とアンタゴニストが結合した場合では異なることが判明した。

ヘリックス 12 を含むペプチドを抗原とした抗体は、リガンドが結合していないときには、ヘリックス 12 と結合できる。しかし、リガンドが結合したときはヘリックス 12 の疎水面が露出しないので、疎水面部分を認識していた抗体はヘリックスと結合できなくなる。したがって、こうしたリガンド結合・非結合に対する抗体の応答差により、抗体がリガンド結合をセンシングしているものと考えられた。

こうしたヘリックス 12 を含むペプチドを抗原とした抗体の、異なる受容体構造を識別する能力は、ヘリックス 12 の

構造特性に基づくと考えられる。この考え方が正しいか検証するため、エストロゲン受容体ヘリックス 12 以後の、C 端全部で検討することにした。すなわち、全体を 4 つに分割し、それぞれのペプチド断片を抗原として抗ラットポリクローナル抗体を作製して調べた。その結果、各抗体の抗原ペプチドに対する特異性・選択性はどれも同等であったが、リガンド E2 の結合によるコンホメーション変化センシング能を有するものは唯一、最も N 端部分のヘリックス 12 を含むペプチドのみであった。したがって、より有効なセンシング抗体を得るためには、ヘリックス 12 を含むことが必須な要因であることが判明した。

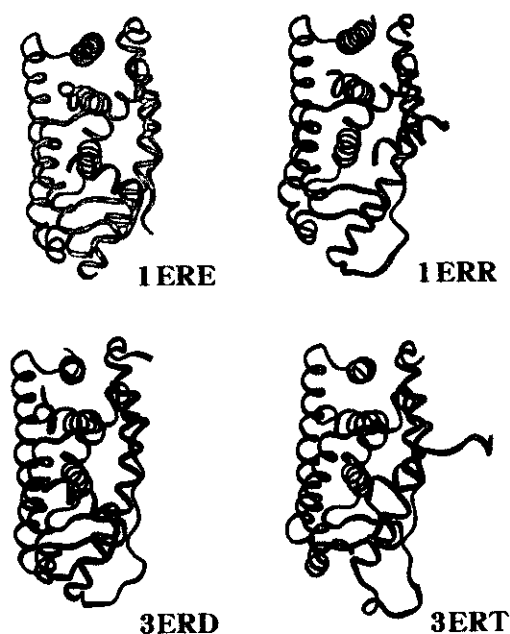


図 3. 異なるリガンドを結合したエストロゲン受容体 LBD の立体構造 X 線結晶構造解析された結晶構造の座標データは PDB より入手した。1ERE, 1ERR, 3ERD, 3ERT は PDB のコード番号を示す。

#### D. 考察

ヒトの核内受容体ファミリーに属する全ての転写因子のリガンド結合ドメイン・LBDの立体構造は、きわめて高い相同性を示すことが知られている。しかしながら、ヘリックス 12 に相当するペプチド部分のアミノ酸構造はそれぞれの核内受容体で特徴があり、単なる両親媒性という構造特性で理解するだけでは不十分かも知れない。今後、こうした核内受容体ごとの構造特性を解析することで、もっと一般的な抗原ペプチド部位の決定、あるいはエピトープ解析が可能になると思われる。こうした解析に、X線結晶構造やホモロジーモデリングによる立体構造のアミノ酸残基解析や、モチーフ構造解析を統合すると、より効率的で確度の高いエピトープのデザインが実施できると思われる。

コンホメーション変化のセンシング抗体は、リガンド結合・非結合に対する応答差により識別能力を発揮していると思われる。したがって、抗体はリガンドの受容体への結合により、変化する受容体構造に対応できるか、できないかによってセンシングしているものと考えられる。こうしたセンシングについては、2種類の抗体成分で対応している可能性がある。一つはヘリックス 12 全体を認識できる抗体成分であり、リガンドの結合によりこの成分は認識できる受容体構造が大きく減少することになる。一方、両親媒性のヘリックス 12 の疎水性面を特異的に認識する抗体成分も同様にリガンドの結合によりこの成分は認識できる受容体構造が大きく減少することになる。

C末端部分を4分割して抗原とした抗体の作製実験で判明した結果は、コンホメーション変化センシング抗体にとってヘリックス 12 の絶対的な必要性を明らかとした。一方、ヘリックス 12 よりN

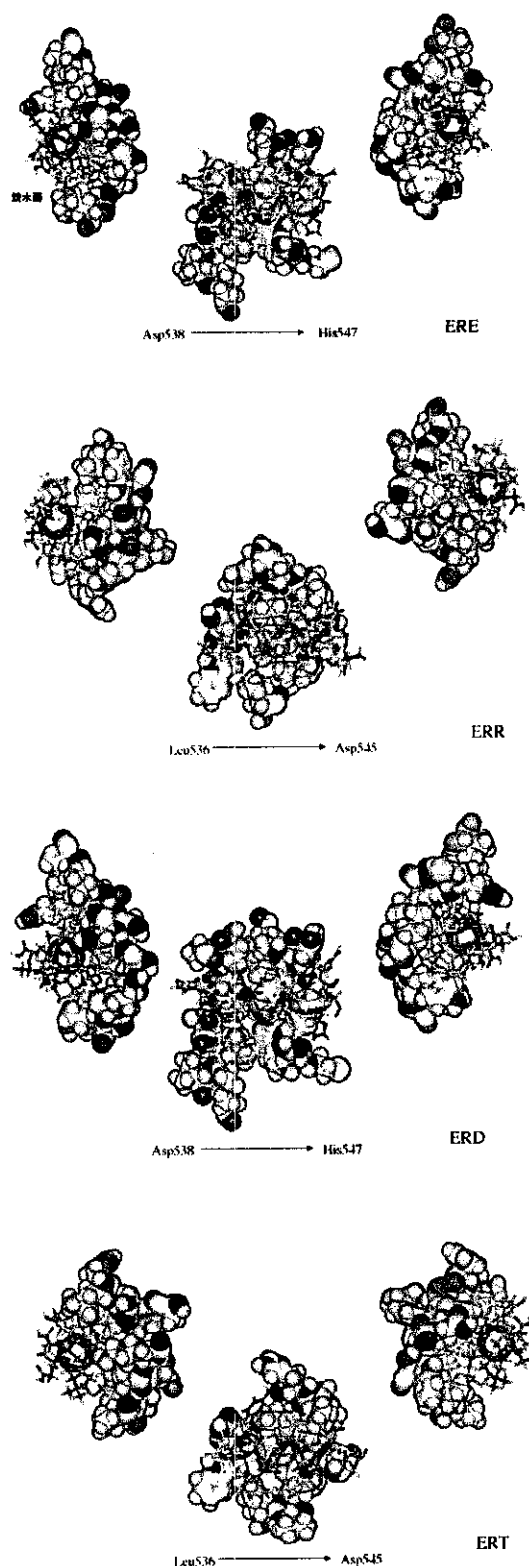


図4. ヘリックス 12 近傍と相互作用する受容体構造の解析

端側に存在するペプチド部分も重要であることが推察された。これは、ヘリックス 12 がリガンド結合により構造変化するとき、その手前のループ部分も大きく構造を変化していることに起因している (図 3)。

## E. 結論

本研究により核内受容体に対するヘリックス 12 を含むペプチド断片を抗原とする抗体作製のデザイン法の有用性が実証された。

今後は、この方法論を用いて新たな受容体に対するセンシング抗体の作製を行い、その能力を確認することが必要である。立体構造が解析されていない核内受容体のリスク評価においては、コンピュータ計算でのホモロジーモデリングで、ヘリックス 12 を推定し、これを含む抗原部位ペプチドの決定を実行する必要がある。本方法論はこれを実現するものであることが証明された。

## F. 健康危険情報

該当する情報はない。

## G. 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  $\alpha$ -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、矢可部芳州、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 $\alpha$ -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。

## 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。

## 別添6

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose and Y. Shimohigashi	Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing the estrogen receptor conformation changes	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	127-130	2003
H. Ishimori, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose and Y. Shimohigashi	The effect of the peptide corresponding to the No.12 $\alpha$ -helix on the conformation change in the estrogen receptor activation	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	437-438	2003

20020928

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.22の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。