

2003/278

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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15年度 総括・分担研究報告書

平成16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 桑田 治-----	13
2. グルココルチコイド受容体等の cDNA クローニングと発現 白須直人-----	19
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-----	23
6. (派遣事業報告) G タンパク質共役受容体作動性の化学物質による HEK293 細胞からの分泌ホルモン hCG α の同定 野瀬 健-----	29
7. (招へい事業報告) ショウジョウバエ脳神経系を用いた化学物質の 神経系リスク評価試験系の確立 下東康幸-----	33
8. (委託事業報告) ショウジョウバエの脳神経および卵産生における 継代的な化学物質応答解析 下東康幸-----	39
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	45
V. 研究成果の刊行物・別刷り-----	46

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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。3年計画の中間となる平成15年度までに、目標の化学物質503種類のすべてについて、調製済みのポリクローナル・センシング抗体を用いてエストロゲン受容体（ER）に関しての試験・解析を完了した。そして、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スキームによって順位予測が可能になったことが明らかとなった。また、ERのモノクローナル抗体を作製して解析し、アゴニスト誘起のコンホメーション変化をセンシングする抗体が2種類、アゴニストおよびアンタゴニストの両方に応答性を示すモノクローナル抗体が1種類得られた。こうして、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体で識別・判定する、統合的な内分泌かく乱作用性順位予測法が確立される見通しが付くに至った。ヒトに存在する48種の核内受容体の全てに化学物質のかく乱作用が懸念されるようになった現在、このセンシング抗体法は核内受容体の全てに適用可能な方法論として期待される。こうした一般の核内受容体へもセンシング抗体法を適用すべく、グルココルチコイド受容体を始めとする受容体のクローニング、タンパク質の発現などの研究実験に着手した。また、HEK細胞でGタンパク質共役型受容体作動薬の投与が妊娠ホルモンhCGサブユニット α の異常産生を誘起することが判明し、化学物質の内分泌かく乱作用を培養細胞系で直接にアッセイする方法開発の基礎的な端緒を得た。一方、生体系 *in vivo* アッセイを可能にするショウジョウバエの食餌継代による化学物質影響試験の基礎解析に着手した。

分担研究者

野瀬 健（九州大学大学院理学研究院
化学部門・助教授）

桑田 治（㈱日本食品衛生協会・九州大
学大学院理学府レサーチレジデント）

白須直人（㈱日本食品衛生協会・九州大
学大学院理学府レサーチレジデント）

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、平成15年度までに、目標の化学物質503種類のすべてについて、調製済みのポリクローナル・センシング抗体を用いてエストロゲン受容体（ER）に関しての試験・解析を完了した。そして、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スキームによって順位予測が可能になったことが明らかとなった。

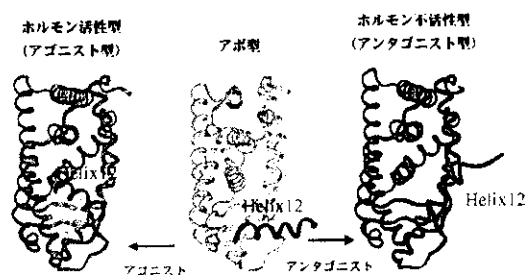


図1. 女性ホルモン・エストロゲン受容体の化学物質結合に伴うコンホメーション変化

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 $^{\circ}$ 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 倍に希釈したものであ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 倍に希釈したものであ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 基質と 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

EC₅₀ 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 Rmax(%)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、Rmax(%)値の 50%に対応する化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC₅₀)として、これを算出した。また、上記のようにして求めた最大抗体応答性 Rmax(%)は、試験化学物質が受容体を活性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、EC₅₀ 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

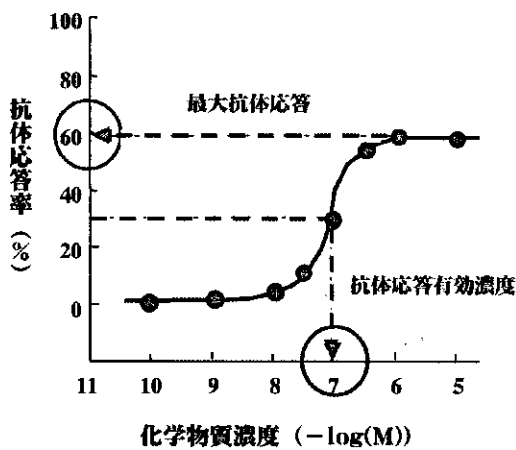


図 2. EC₅₀ 値の算出方法

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。

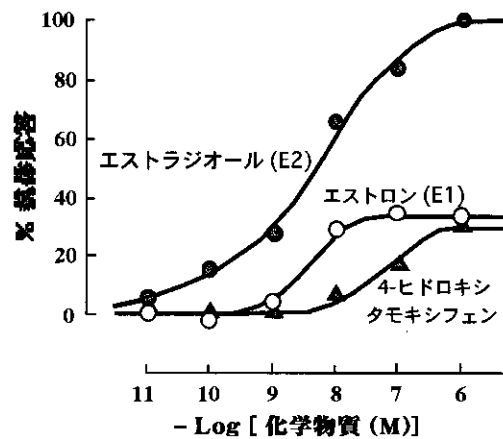


図 3. 各化学物質の用量依存曲線

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 15 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、503 種類のすべてについて上記で調製したセンシング抗体を用いて解析した。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結果、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順位予測が可能なが明らかとなった。

さらに、抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と、受容体結合試験の結果には非常に良い正の相関があることが判明した。一方、最大抗体応答性 R_{max} とレポータージーンアッセイの結果も良い正の相関があるものの、一部の化学物質において抗体応答性のみを示す化学物質のあることが明らかとなった。これらにはアンタゴニスト、あるいはインバースアゴニストである可能性が示唆された。抗体応答有効濃度と最大抗体応答性が算定できた化学物質は 62 種であった。これらの結果を表 1 に示す。

D. 考察

センシング抗体を用いて化学物質についてアッセイした結果に基づいて、グループ化することを前年度に行った。今年度 503 化学物質のアッセイを完遂した結果、このグループ化は可能ではあるものの明確な境界が呈示しにくい状況になった。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結果を例示すると、図 4 のようになる。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一応グループ (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) 51 種類は、抗体応答有効濃度が算定できず、図 4 にはプロットされない (表 2)。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が確立された。

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。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。この進化改良法をエストロゲン受容体について 14 年度より開始した。既に、今年度アゴニストとアンタゴニストを特異的に識別するモノクローナル抗体の選別に成功したので (分担報告書を参照)、これらを用いたセンシングアッセイを実施、ポ

表 1. エストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果

抗体応答有効濃度および最大抗体応答性

順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)	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	1.03	41.0	33	Estriol 3-methylether	269	79.7
2	Estrone	4.88	38.0	34	Nafoxidine	273	34.0
3	Hexestrol	10.1	54.0	35	17 α -Ethynylestradiol-3-cyclopentaether	274	97.3
4	17-Epiestriol	11.6	102	36	Daidzein	324	38.0
5	Estriol	13.0	113	37	2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	329	64.9
6	Diethylstilbestrol	13.5	79.0	38	5 α -Dihydrotestosterone	363	77.0
7	16-Ketoestradiol	14.9	64.4	39	Norethindrone	490	77.7
8	16 α -Hydroxyestrone	16.9	63.6	40	β -Zearalanol	506	47.0
9	Ethynyl estradiol	17.1	91.0	41	Isoliquiritigenin	555	42.1
10	Diethylstilbestrol	22.9	74.1	42	4,4-Dihydroxydiphenyl	565	65.1
11	17 β -Estradiol	23.1	100	43	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	608	12.0
12	6 β -Hydroxyestradiol-17	23.3	42.0	44	4,4'-Dihydroxy benzophenone	610	56.9
13	6-Ketoestradiol	27.2	73.0	45	6-hydroxy-2-naphthyldisulfide	716	37.0
14	β -Zearalenol	28.3	43.0	46	<i>p</i> -naphtholbenzein	833	42.0
15	Mestranol	29.2	82.0	47	6-hydroxyflavanone	969	43.0
16	α -Zearalenol	30.1	61.0	48	3',4',7-Trihydroxy isoflavone	1040	45.3
17	17 α -Estradiol	10.1	54.0	49	2,3,4,4'-Tetrahydroxy benzophenon	1190	48.2
18	Dehydrostilbestrol	32.9	61.0	50	β -Estradiol-3-benzoate	1250	89.4
19	Coumestrol	35.8	61.0	51	Kaempferol	1280	50.6
20	6 α -Hydroxyestradiol	42.3	73.0	52	Norethynodrel	1360	109
21	Equilin	48.3	50.1	53	4-Cyclohexylphenol	1420	33.0
22	Estrone 3-hemisuccinate	54.6	31.9	54	6-Benzoyl-2-naphthol	2050	10.6
23	2-Methoxy- β -estradiol	67.4	80.7	55	Nonylphenol	2470	30.0
24	4-Hydroxyestradiol	81.0	85.0	56	6-Ketoestradiol-6-(<i>o</i> -carboxymethyl)oxime	3310	104
25	2-Hydroxyestriol	94.3	91.0	57	Levonorgestrel	3610	52.9
26	Estrone acetate	106	38.2	58	2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane	4080	78.0
27	5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	107	92.0	59	Benzyl-4-hydroxybenzoate	7660	112
28	2-Hydroxyestradiol	144	88.0	60	Triphenylethylene	8090	58.0
29	Genistein	175	56.0	61	4,4'-Dihydroxy diphenylmethane	55400	44.0
30	4,4'-Dihydroxytetraphenyl methane	177	41.0	62	4-Octylphenol	133000	48.0
31	4-(1-Adamantyl)phenol	194	51.0				
32	4,4'-Thiobis-phenol	241	58.9				

順位は抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) に基づいて付けられた。

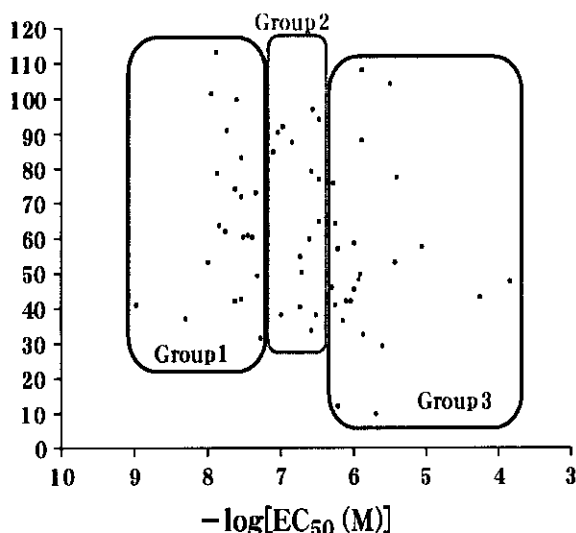


図4. 化学物質のエストロゲン受容体
コンホメーション変化センシング
抗体による相互作用性解析

リクローナル抗体での結果と比較解析し、より精緻な予測法の確立を図る。他の核内受容体についてもモノクローナル抗体法の確立を図る。

なお、分担報告書にあるように、既にグルココルチコイド受容体 (GR)、エストロゲン関連受容体アゴニスト (ERR α 、 β 、 γ)、プロゲステロン受容 (PR)、甲状腺ホルモン受容体 β (TR β) の cDNA クローニングに成功し、一部についてはタンパク質の発現にも成就している。今後、これらの核内受容体についてもセンシング抗体を作成し、抗体アッセイを逐次実行することが肝要である。

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。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。昨年度には 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能が無い旨を報告したが、詳細な検討を続けた結果、わずかながらセンシング能を持つ

表2. グループ4に属する化学物質 51 種一覧

- 6-Dehydroestrone
- Estrone-3-methylethre
- β -Estradiol-17-acetate
- β -Estradiol-3-carboxymethylethre
- β -estradiol-17-enanthate
- Estriol-3-carboxymethylethre
- 5 α -Androstane-3 β -ol
- 4'-Methoxy-biphenyl-4-ol
- 3-Hydroxybenzophenone
- 2,4-Dihydroxybenzophenone
- 4-Fluoro-4'-hydroxybenzophenone
- 2,3,4-Trihydroxybenzophenone
- 4,4'-Oxydiphenol
- 4-Hydroxyazobenzene
- Benz(a)anthracene
- 6-Benzoyl-2-naphthol
- α -naphtholbenzein
- Di-sec-octyl phthalate
- Estriol-3-benzylethre
- Levenorogestrel
- 5 α -Androstane
- Dehydroisoandrosterone
- 4-n-Amylphenol
- p-n-Hexylphenol
- 4-Heptylphenol
- p-sec-Butylphenol
- p-(tert-pentyl)phenol
- 4-Cyclopentylphenol
- Butylparaben
- 4-n-Dodecylresorcinol
- Isopropyl gallate
- 2,5-Di-tert-butyl hydroquinone
- 4-(4-Hydroxyphenyl)cyclohexanone
- p-Phenylphenol
- 4'-Hydroxy-4 biphenylcarboxylic acid
- 4'-Hydroxy-4 biphenylcarbonitrile
- 3,3',5,5'-Tetramethyl-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diol
- 4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane
- 4,4'-Methylenebis(2,6-dimethylphenol)
- o,p'-DDD
- Hydroquinone monobenzylethre
- 4-Hydroxychalcone
- Resorcinol monobenzoate
- 4-Hydroxyazobenzene
- Naringenin
- Luteolin
- 4-n-Butylphenol
- 4-t-Butylphenol
- Propylparaben
- 4-(phenylmethyl)-phenol
- 4'-Hydroxychalcone

ことが判明し、C 端延長部分でもコンホメーション変化が起こっていること、こ

れに抗体が感応することが分かった（分担研究報告を参照）。

派遣事業、招へい事業、委託事業については、核内受容体のみならず、脳内神経系やホルモン系のGタンパク質共役型受容体（膜受容体）での検討を緊要の課題として、新規なアッセイ法の開発に取り組んでいる。これらに関しては、事業報告書に詳述した。

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 503 種類の化学物質のアッセイを実施・完遂し、その結果、ポリクローナル抗体を用いる内分泌かく乱作用性の解析、作用性順位付けについて、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のフローチャートを完成し、503 化学物質について、第 1 グループ 22 種、第 2 グループ 17 種、第 3 グループ 23 種、第 4 グループ 51 種、第 5 グループ 390 種であった。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を確立することに成就するとともに、さらに今後モノクローナル抗体を用いた精密分析に取り組むことになった。

F. 研究発表

論文発表

1. Cloning and characterization of estrogen receptor α in *mummichog*, *Fundulus heteroclitus*, H. Urushitani, M. Nakai, H.

Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu, and T. Uiguchi, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **203**, 41-50 (2003).

2. Structure-function studies on the ligand-receptor π interactions, T. Nose, *Peptide Science 2002*, 9-12 (2003).

3. 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).

4. The structure-activity studies of *Drosophila* FMR/Famide-related peptides, T. Tokunaga, M. Otani, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, S. Aimoto, and Y. Shimohigashi, *Peptide Science 2002*, 265-268 (2003).

5. 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).

6. cDNA Cloning of the Housefly Pigment-dispersing Factor (PDF) Precursor Protein and Its Peptide Comparison among the Insect Circadian Neuropeptides, A. Matsushima, S. Sato, Y. Chuman, Y. Takeda, S. Yokotani, T. Nose, Y. Tominaga, Y. Shimohigashi and M. Shimohigashi, *J. Pept. Sci.*, **10**, 82-91 (2004).

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。
5. 徳永隆俊、浅井大輔、桑田 治、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、小泉 修、下東康幸、アンドロゲン受容体コンホメーション変化センシング抗体の作製、平成 15 年度日本生化学会九州支部例会、2003. 6. 1。
6. 渋谷あゆみ、浅井大輔、徳永隆俊、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体によるエストロゲン受容体応答の解析、平成 15 年度化学関連支部合同九州大会、2003. 7. 5。
7. 中垣雅之、山本典史、野瀬 健、下東康幸、関谷 博、環境ホルモン関連分子塩化ビフェニル類に関する幾何構造と電子構造、第 40 回化学関連支部合同九州大会、2003. 7. 5。
8. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、モノクローナル抗体を用いた高感度なエストロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイ法、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2～3。
9. 徳永隆俊、浅井大輔、渋谷あゆみ、桑田 治、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸、化学物質のエストロゲン受容体応答解析：コンホメーション変化センシング抗体による受容体結合能およびホルモン活性の同時評価、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2～3。
10. 野瀬 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、本田 健、桑田 治、白須直人、下東康幸、核内受容体コンホメーション変化センシング抗体を用いる内分泌かく乱物質リスク評価法における抗体設計法、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2～3。
11. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、化学物質のエストロゲン受容体結合に伴うコンホメーション変化とモノクローナル抗体を用いる高感度センシングアッセイ法、平成 15 年度内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23～24。

12. 徳永隆俊、浅井大輔、近藤 薫、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、蛍光トレーサーを用いた環境化学物質の核内受容体（エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体）に対する高効率結合試験、平成 15 年度内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23～24。

13. 野瀬 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、本田 健、桑田 治、白須直人、下東康幸、受容体のアポ／ホロ構造の差構造解析による受容体結合性予測用センシング抗体の開発、平成 15 年度内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23～24。

14. 松島綾美、横谷 聡、金木淳史、Ian A. Meinertzhagen、下東美樹、下東康幸、イエバエの脳神経ペプチド FMRFamide の cDNA クローニングと筋収縮活性、平成 16 年度日本生化学会九州支部例会、2004. 5. 29～30。

15. 渋谷あゆみ、徳永隆俊、浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体 C 末端可動部分のコンホメーション変化と抗体によるセンシング、平成 16 年度日本生化学会九州支部例会、2004. 5. 29～30。

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（化学物質リスク研究事業）
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 桑田 治 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

エストロゲン受容体の α ヘリックス 12 (H12) 部位に対して作製された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）することを先に示した。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するためには、より特異性の高いモノクローナル抗体を創製することが重要である。そこで、H12 部位のペプチドを抗原としてマウスを免疫し、ミエローマ細胞融合法により得られた多数の抗体産生細胞について、ペプチド抗原および受容体を競合剤として用いる競合 ELISA 法でスクリーニングを実施した。その結果、リガンド濃度依存的に受容体への親和性を変化させるようなモノクローナル抗体を得ることに成功した。これらの抗体はポリクローナル抗体を用いた場合と比べてより高い感度をもっており、コンホメーション変化センシングアッセイの効率がより高いことが判明した。加えて、ポリクローナル抗体では不可能と思われるアゴニストとアンタゴニストとの識別ができる可能性が示された。

A. 研究目的

内分泌かく乱性が懸念される多数の化学物質について、それらのホルモン受容体に対する影響を効率よく検定することが急務となっているが、これまでのところそのためには化学物質の受容体への結合性、ホルモン活性、抗ホルモン活性という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、その操作および解析はきわめて煩雑である。こうしたなか主任研究者らは先に、化学物質の結合により受容体の構造（コンホメーション）が変化することを抗体を用いて感知（センシング）するという新しい発想に基づき、受容体結合能および活性化能を同時に評価できることをウサギのポリクローナル抗体を用いて示した。本分担研究では、この「受容体コンホメーション変化

センシング法」の効率良い実現のために、新たにマウスのモノクローナル抗体を創製し、それを用いて多数の化学物質について実際に活性のリスク判定および順位予測を実施する。

本研究室では既に、ウサギを免疫して得られた抗血清の抗体応答から、女性ホルモンであるエストロゲンの受容体に対するホルモン様物質の結合性とホルモン活性の両者を同時に評価測定すること、また、活性域値について大きく5つのグループに分画化することに成功している。しかし、血清がポリクローナル抗体であることから、その中には特異性の異なる抗体が混在している可能性がある。そこで、より特異性の高いモノクローナル抗体を得ることができれば、各種のリガンドのうち、エストロゲンのようなアゴニス

トのみならずアンタゴニストによる構造変化を検知するような抗体が得られる可能性が考えられる。これによりホルモン作用の検定に加えて抗ホルモン作用との区別もつけられるような系の確立が期待できる。加えてモノクローナル抗体の特異性の高さからアッセイの感度や定量性などの向上も期待され、測定の効率を高めることが可能になる。そこで、このような「センシングモノクローナル抗体」を用いて、各種の化学物質の活性の判定と内分泌かく乱作用の順位付けを行うことが本研究の目的である。

本分担研究においては、平成 14 年 9 月より開始した第 1 年度の施行により、モノクローナル抗体作製に必要な機器や試薬などの実験環境を整備した結果、多数の抗体を作製してスクリーニングを実施することができるようになった。そこで本年度ではこれらを用いて実際に高選択的・特異的なモノクローナル抗体の創製に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 抗原の調製とマウスへの免疫

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出されている α ヘリックス 12 (H12) 部位付近の配列をもつペプチドを合成し、ポリクローナル抗体を作製した時と同様にキャリアタンパク質 KLH と結合させて免疫源とした。これを Balb/c マウスの足蹠に局所免疫し、9 日目に後肢大腿部より肥大したリンパ節を摘出した。リンパ細胞とマウス由来ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールにより融合させて 96 ウェル培養プレート播き込んで培養した。ウェル中のハイブリドーマ細胞を順次 DMEM 培地に移して継代培養し、その培養上清を回収してスクリーニングに用いた。

(2) 抗体産生細胞のスクリーニング

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。まず、ペプチドまたは ER を抗原とする間接 ELISA 法を一次スクリーニングとして実施し、これらの抗原に実際に結合する抗体の産生細胞を選別した。続いてペプチド抗原を固定化し ER を競合剤として用いた競合 ELISA 法による二次スクリーニングを実施した。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間で ER への結合に差異のあるような抗体を探索した。

(3) センシングアッセイ法の確立

二次スクリーニングにおいてリガンドの有無に応じて異なる免疫反応性を示した抗体について、リガンド濃度を変化させて競合の程度が変化するかどうかを調べた。さらに競合 ELISA における抗体濃度、抗原量、受容体濃度などについての至適実験条件を詳細に検討した。その結果、女性ホルモンである 17β -エストラジオール (E_2) を基準アゴニスト物質として用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法を確立した。さらにアンタゴニストの一つとして 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) を同様に用いて試験した。

(4) クローン化と腹水調製

センシング能を有するモノクローナル抗体の産生が確かめられたハイブリドーマは、それぞれ限界希釈法でクローン化を進めた。さらにそのうちの一つについては、ハイブリドーマをマウスの腹腔内へ注射して飼育後に腹水を回収することにより、高濃度の抗体溶液を得た。

(5) 抗原認識部位の解析

センシング抗体の ER に対する認識部位を調べるため、免疫源および固相化抗原として用いたペプチドに加えて、配列が一部重複して N 端寄りの配列を持つペプチドを併用した間接 ELISA を行って、抗体の反応性を比較した。

C. 研究結果

(1) スクリーニング

マウス 2 匹を局所免疫して得られた 325 個のハイブリドーマについて、段階的なスクリーニングを実施した。まず、一次スクリーニングとして固相化ペプチド抗原との反応性を間接 ELISA で調べて、39 の抗体産生細胞を選択した。一方、固相化した受容体での間接 ELISA では 29 個しか有意な反応性をもっていないことが分かった。一部の細胞は漸次抗体価を喪失した。

続いて、二次スクリーニングとして ER 構造変化識別試験、すなわちリガンド非結合型 ER または E₂ 結合型 ER を競合剤として用いた競合 ELISA を行うことによって、モノクローナル抗体 mAb3 が E₂ 添加によって ER への親和性の低下を示すことが見いだされた。さらに OHT もリガ

ドとして併用した再度のスクリーニングにより、新たに mAb1 および mAb2 が選出された。このうち mAb2 は、他とは異なり OHT が ER に結合することによって親和性の増大を示した。これら 3 つの抗体について、受容体への親和性などの性質を表 1 にまとめた。

表 1 モノクローナル抗体の受容体への親和性のリガンド依存的な変化などの性質

抗体	受容体への親和性	アゴニストによる応答	アンタゴニストによる応答	アイソタイプ
mAb1	大	親和性低下	変化なし	IgG _{2b}
mAb2	大	親和性低下	親和性上昇	IgM
mAb3	中	親和性低下	変化なし	IgM

抗体はいずれも細胞培養の上清を回収して、カートリッジ式遠心フィルターユニット（分画分子量 100,000）による限外濾過で高分子量成分を粗精製したものを使用した。各々の力価測定を行い、抗体の希釈倍率を決定した。また、イムノグロブリンアイソタイプ特異抗体を二次

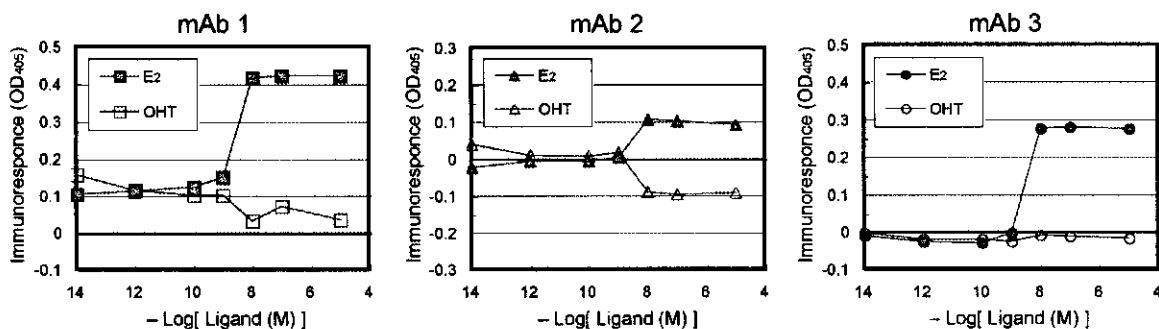


図 1 モノクローナル抗体を用いたセンシングアッセイの結果の一例。3 種類の抗体は、リガンドとしてアゴニスト (E₂) またはアンタゴニスト (OHT) を用いたときではそれぞれ異なる濃度依存性を示した。縦軸は 405nm における吸光度の変化値をあらわし、大きいほど受容体への親和性がより低下することを意味する。

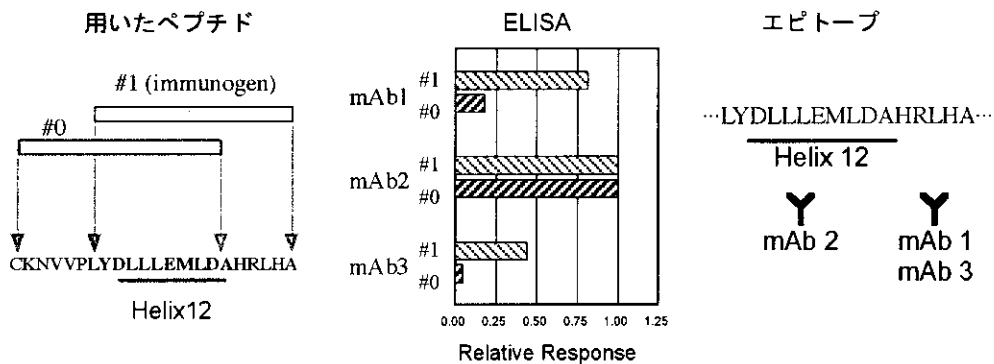


図2 H12部分が重複する2つのペプチドを用いた間接ELISAによるエピトープ解析の結果。OHTによる構造変化に感受性のあるmAb2は、mAb1およびmAb3とは抗原認識の領域が異なっていた。

抗体として用いた間接ELISAにより、各抗体のアイソタイプを決定した(表1)。

(2) コンホメーション変化センシングアッセイの条件と結果

条件検討の結果、固相化抗原として用いるペプチドの量を、ポリクローナル抗体の場合より少ない25 pmol/wellに、また競合剤として用いるERを10 nMという同様により低い濃度に設定することができた。リガンドとしてE₂およびOHTの濃度を1 nMから10 μMまで変化させてERに添加し、そこへそれぞれの抗体を加えて競合ELISAを実施した(図1)。3つの抗体ともポリクローナル抗体と同様にE₂に対しては濃度依存的に親和性の低下を示した。他方OHTに対してはmAb1とmAb3は変化しなかった。そして、mAb2だけはアンタゴニスト濃度の増大に伴って逆に親和性を上昇させた。

(3) リガンド感受性とエピトープの関係

mAb2が他とは異なるリガンド感受性を示したことから、3つの抗体の受容体への結合様式が互いに異なることが考えられた。そこで、これらの抗原ペプチドに対する認識部位の解析を試みた。その結

果、mAb2のみがH12部位そのものをエピトープとしていることが分かり(図2)、3つの抗体のリガンド感受性の違いと認識部位の違いが対応していた。このことから、H12部位付近が結合するリガンドの種類によって異なる構造変化を起こすという結晶構造解析法による知見が、抗体を利用することによって実際に評価し得ることが初めて示された。

(4) 化学物質試験の試行

mAb1については、E₂をリガンドとして用いたセンシングアッセイの条件を踏まえて、実際に代表的なエストロゲン様化合物の受容体結合能の評価を試みた。そして得られた抗体応答有効濃度の値と、受容体競争結合試験によって求められる結合親和性の値との間の相関について、従来のポリクローナル抗体を用いた場合と比較した。その結果、モノクローナル抗体を用いた場合も、競争結合試験との間に正の高い相関を示した。一方、モノクローナル抗体を用いたセンシングアッセイ法の場合の方が、全体としてより低い抗体応答有効濃度の値を得たことから、ポリクローナル抗体よりも高い感度をもつことが示された。

(5) モノクローナル抗体によるセンシングアッセイの特徴

ここまでのモノクローナル抗体を用いた試験法を従来のポリクローナル抗体の場合と比べると次のようであった。

- ▶ リガンドの抗体応答有効濃度の値がより低く、受容体結合試験の結果に近かった。すなわち、より高感度である。
- ▶ アッセイに用いる受容体とリガンドの量が少なく済んだ。すなわち、より効率的な試験法である。
- ▶ リガンド感受性が異なる複数の抗体が得られ、ER の E₂ 結合型と OHT 結合型とで親和性が逆転するものもあった。従って、アンタゴニストも識別できる。

(6) 今後の計画

既に確立したポリクローナル抗体によるセンシング法で、503 化学物質のグループ化が済んでいる。しかしながら、新たにモノクローナル抗体が得られたことで、これらに対して化学物質が示す応答性は必ずしもそれと同一ではないことが予想される。このため、基本的には 503 物質全てに対してアッセイを改めて実施することになると思われる。こうしたなか、以下について重点的に実験・研究を行うことにする。

1) アゴニストとアンタゴニストとに対して異なる感受性を持つモノクローナル抗体のセットを用いたセンシングアッセイを、実際の化学物質に対して実施する。そのために、試験法の大規模化に備えて、必要な条件の探索をさらに進める。そして、従来の受容体競争結合試験およびレポーター遺伝子アッセイの結果との相関について検討する。それらを総合的に評価して多数の環境化学物質の内分泌攪乱

作用の順位付けを行う。

2) リガンド感受性の異なる複数のセンシング抗体が得られ、それらの抗原認識部位は大まかに分類できることが分かったので、各々のより詳細なエピトープ決定を実施することで、ER の C 末端部分についての構造活性相関の解析を行う。

3) 上記の ER での評価系の確立の成果を踏まえて、他の核内受容体についても同様のセンシングアッセイ法を確立して、多様な環境化学物質のリスク評価に取り組む。

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の有用性は、主として特異的相互作用の抽出にあると思われる。こうしたスクリーニングからの選別の効率は、より多くの抗体種の蓄積と、その多重化から創出されるものと予想され、この点、抗体スクリーニングの効率化の重要性は言うまでもない。

また、モノクローナル抗体のもう一つの利点として予想された感度の高さが実証され、得られた抗体応答有効濃度の値は化学物質の受容体結合親和性に相応していると考えられた。これは、モノクローナル抗体を用いた場合の方が、受容体の実際の構造変化をよりよく反映しているためである。

さらに、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たが、実際に得られたクローンのうちの一つは、アゴニストに加えてアンタゴニストの一つ OHT に対しても感受性を有していた。今後はアンタゴニストにのみ感受性を持つような抗体が得られないか、さらに異なる種類のアンタゴニストにそれぞれ特異的に感受性を持つよう

な複数種の抗体の可能性をさらに探索することが有用と思われる。このような抗体を組み合わせることで、実際の多種多様な化学物質の環境リスクを効果的にスクリーニングする試験法の重要性が一層高まってきたものとする。

E. 結論

- 1) 昨年度までに導入・整備した実験環境を実際に利用し、局所免疫による迅速な抗体作成法の採用と併せることにより、大規模な抗体スクリーニングの実施が実現した。
- 2) スクリーニング法の詳細な検討から、受容体構造変化の識別能を効率良く評価できる抗体選択法を確立でき、実際に高い力価を示す多数の抗体産生細胞が得られた。そのなかからセンシングアッセイ能を有する3つの抗体を得ることができた。
- 3) 従来のポリクローナル抗体を用いたアッセイ法との比較から、モノクローナル抗体を用いた場合の方がより高感度で効率のよいアッセイが可能であり、モノクローナル抗体の使用が有用であることが実証された。
- 4) 3つの抗体がアンタゴニストに対して異なる反応性を示したことから、こ

れらの組み合わせによりポリクローナル抗体では不可能であった化学物質のアゴニスト活性とアンタゴニスト活性との識別もできる可能性が示された。

- 5) 抗体のリガンド依存性と抗原認識部位の検討から、エストロゲン受容体のH12部位付近の構造と活性の相関についての新しい知見が得られた。

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

上記の内容をまとめたものを、環境ホルモン学会の第6回研究発表会（12月2日～3日、仙台国際センター）にて「モノクローナル抗体を用いた高感度なエストロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイ法」と題して口頭で発表した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究によって実現した、モノクローナル抗体を用いたセンシングアッセイ法についての特許を出願する予定である。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

グルココルチコイド受容体等の cDNA クローニングと発現

分担研究者 白須直人 九州大学大学院理学研究院・リサーチ・レジデント
((社) 日本食品衛生協会)

我々は昨年度までに、エストロゲン受容体を介した環境化学物質の内分泌かく乱性の順位予測について、コンホメーションセンシング抗体を用いた測定評価系の構築に成功している。しかしながら、内分泌かく乱作用はヒトに存在する 48 種の核内受容体が複合的に関与する複雑な制御システムに対して化学物質が影響を及ぼした結果発現される可能性が高い。このため、性ホルモン受容体以外の核内受容体に対しても化学物質の内分泌かく乱作用性を評価する必要がある。本研究では、当面解析・評価がきわめて重要な核内受容体についてもコンホメーションセンシング試験を拡張させるため、必須となる各種核内受容体遺伝子のクローニングと受容体タンパク質の発現・精製を実施した。その結果、グルココルチコイド受容体 (GR)、エストロゲン関連受容体 (ERR α 、 β 、 γ)、甲状腺ホルモン受容体 β (TR β) およびプロゲステロン受容体 (PR) の cDNA クローニングに成功した。また、GR および ERR β 、 γ については大腸菌を用いたタンパク質発現系を確立し、受容体タンパク質を量的に確保する目処をつけるに至った。

A. 研究目的

平成 15 年度までに、エストロゲン受容体 (ER) を介した環境化学物質の内分泌かく乱性の順位予測について、化学物質の ER への結合に伴う受容体のコンホメーション変化を感知する抗体を用いた測定評価系の構築を達成している。しかしながら、内分泌かく乱作用はヒトに存在する 48 種 (表 1) の核内受容体が複合的に関与する複雑な制御システムに対する化学物質の影響の結果生じる可能性が高い。なかでも、副腎皮質ホルモン・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、その生理機能も多岐に及んでいるが、これに対する環境化学物質の影響が危惧されている。また、ヒトゲノム解析の完成によって、

内分泌かく乱作用に直接的に関与する ER に加えて、エストロゲン関連受容体 3 種 (ERR α 、 β 、 γ) の存在が明らかになっており、ER α 、ER β を加えた 5 種の受容体が相互に関連した機能調節の存在と、これへの化学物質の複合的な影響が懸念されるようになった。したがって、これらの核内受容体に対する環境化学物質の内分泌かく乱作用性の予測・順位付けを行うことはきわめて重要である。ER に対して構築に成功しているコンホメーションセンシング試験をこれらの受容体についても拡張するためには、センシング能を有する特異的抗体のスクリーニング時および実試験において必要となる受容体タンパク質の取得が必須である。本研究では、当面の解析・評価が重要かつ必須な GR