

や ERR 等の各種核内受容体について、遺伝子クローニングおよび受容体タンパク質発現・精製系の確立を試みることにした。

表1 ヒト核内受容体ファミリー^a

TR α	TR β	RAR α	RAR β
RAR γ	PPAR α	PPAR β	PPAR γ
Rev-erba	Rev-erv β	ROR α	ROR β
ROR γ	LXR α	LXR β	FXR
VDR	PXR	CAR	HNF4 α
HNF4 γ	RXR α	RXR β	RXR γ
TR2	TR4	TLL	PNR
COUP α	COUP β	EAR2	ER α
ER β	ERR α	ERR β	ERR γ
GR	MR	PR	AR
NGFIB	NURR1	NOR1	SF1
LRH1	GCNF1	SHP	DAX

a: グレーの網かけは今回クローニングした核内受容体を示す。

B. 研究方法

各種核内受容体の cDNA クローニング

(1) 受容体遺伝子の増幅

内分泌かく乱作用が懸念される核内受容体として、GR、ERR α 、ERR β 、ERR 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) の遺伝子を取得するため、それぞれの遺伝子特異的なプライマーをデザインした。これらを用いて、ヒト腎臓もしくはヒト子宮由来の cDNA を鋳型とした PCR を実施することで、目的とする核内受容体遺伝子の全長およびホルモン結合領域 (LBD) に相当する遺伝子断片を増幅した。

(2) 発現コンストラクトの作製

PCR によって得られた核内受容体遺伝子断片を適切な制限酵素 2 種を組合せ用

いて消化し、大腸菌用タンパク質発現ベクターである pGEX6P-1 へ組込んだ。これにより目的の核内受容体タンパク質はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現可能となる。

(3) 大腸菌を用いたタンパク質の発現

作製した核内受容体発現プラスミドを宿主大腸菌 XL1-Blue および BL21 の 2 種へ形質転換した。これらの形質転換体を少量の液体培地中で終夜培養し、大量培地へと植菌して 37°C で本培養を実施した。対数増殖期 ($OD_{600} \sim 0.4$) に達した際に isopropyl 1-thio- β -D-galactoside を最終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 3 時間振盪培養してタンパク質を発現させ、遠心分離によって集菌した。

(4) 受容体タンパク質の抽出

タンパク質発現誘導後に集菌した菌体ペレットに対して、数種のプロテアーゼ阻害剤を含む氷冷緩衝液中でリゾチーム処理を行い、さらに Triton X-100 (2%) および N-lauroylsarcosin (0.7%) 存在下で超音波破碎して受容体タンパク質を抽出した。抽出液を遠心分離し、可溶性画分を得た。

(5) 受容体タンパク質の精製

得られた可溶性画分をグルタチオンセファロース 4B 担体と 4°C でインキュベートし、GST 融合受容体タンパク質を結合させた。担体を洗浄の後、界面活性剤と還元型グルタチオン 10 mM を含む緩衝液によって、目的の受容体タンパク質を溶出させた。Extracti-Gel (PIERCE 社) によって界面活性剤を除去した後、FPLC を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによってタンパク質を精製した。

C. 研究結果

ヒト腎臓および子宮由来 cDNA を鋳型として用いた PCR の結果、GR、ERR α 、ERR β および ERR γ の全長遺伝子および LBD 領域をコードする遺伝子断片が得られた。また、TR β については全長が、PR については LBD 領域の遺伝子断片が増幅できた。得られた核内受容体クローンを発現ベクター pGEX6P-1 へサブクローニングし、宿主菌へ導入してタンパク質発現をさせた結果、発現誘導によって目的とする分子量の発現産物量の増加が電気泳動によって確認された (図 1)。

現在までに、GR、ERR β および ERR γ の LBD 領域について検討を行った結果、これらのタンパク質は界面活性剤を用いた一連の抽出操作によって可溶性タンパク質として比較的少量に得られ、続くグルタチオンセファロース担体によるアフィニティ精製とゲルろ過クロマトグラフィーを経て、本培養液 1 L あたり 1~2 mg の最終精製物を得ることができた。

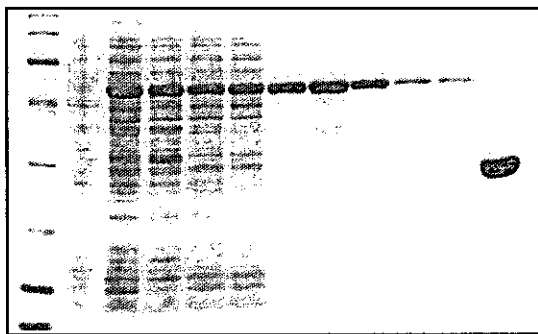


図 1 GR の電気泳動結果

レーン 1: マーカー (上から、200、116、66、45、31、21.5、14 kDa)、2: 発現誘導前、3: 発現誘導後、4: 不溶性画分、5: 可溶性画分、6: アフィニティ担体素通り画分、7: 担体結合画分、8~10: 溶出画分、11: 最終精製物 (GST-GR-LBD; 57.6 kDa)、12: GST 標品 (28.4 kDa)

D. 考察

当初、Triton X-100 存在下での超音波破碎による菌体破碎、タンパク質抽出を試みたが、目的の発現産物のほとんどは不溶性画分として沈殿し、可溶性画分にはトレース量しか回収できなかった。菌体培養や発現誘導剤濃度等の検討を行っても顕著な改善は見られなかった。しかしながら、抽出条件の検討の結果、Triton X-100 に加えて陰イオン性界面活性剤である *N*-lauroylsarcosin を含む緩衝液中での超音波処理を行うことで、目的の受容体タンパク質の多くを可溶性タンパク質として回収することができた。得られた可溶性の GST 融合受容体タンパク質は、アフィニティ担体に対して良好な結合性を示したため、アフィニティ精製も効率的に遂行できた。

今回量的に得ることが可能となった GR や ERR に加えて、現在、TR や PR についてもタンパク質発現条件を検討中であり、これらと併行して各受容体に対する特異的抗体の作製を実施している。今後は、得られた受容体タンパク質を抗体スクリーニングに供してセンシング能を有する抗体を選別し、それらを用いたセンシング試験系を構築する予定である。

E. 結論

ER 以外の核内受容体についてのコンホメーションセンシング試験系構築に必要な受容体タンパク質を取得するため、ヒト GR、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、TR β および PR 遺伝子の PCR クローニングを実施し、これを達成した。得られたクローンから大腸菌発現用コンストラクトを作製した。さらに、*N*-lauroylsarcosin を用いたタンパク質抽出によって、GR、ERR β および ERR γ のホルモン結合領域を可溶性タンパク質として量的に回収する系を確立した。

成果が現在のところ得られていない。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はない。

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は現在のところ特に得られていない。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの

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

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教授

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、既にこれらの受容体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を用いることにより、化学物質が核内受容体・エストロゲン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ことができることを見出した。この方法の最も重要な分子ツールは高感度な抗体であり、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は、統合的な化学物質のリスク評価に必要である。本研究では、このセンシング抗体法の原理を解析し、最適なセンシング抗体作製方法を確立する。本年度は、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体に対するセンシング抗体をデザインし、抗体を作製した。X線結晶構造解析された核内受容体の立体構造を精査すると、受容体リガンド結合部位においてセンシング抗体のデザインに必要な第12ヘリックスは高く保存されており、このヘリックスを標的とする抗体デザイン法は核内受容体全般に適応可能である。

A. 研究目的

一般に、核内受容体は特異的なリガンド・ホルモンの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、ヒトゲノム解析プロジェクトが完成し、タンパク質として塩基配列・アミノ酸解析が判明した核内受容体は48種存在する。こうした核内受容体ファミリーは互いに高い構造相同性を示し、その類似な立体構造はA~E領域に分けて考えられている（図1）。受容体に特異的なリガンド・ホルモン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が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内分泌かく乱化学物質が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、本研究においても受容体アッセイに使用している。

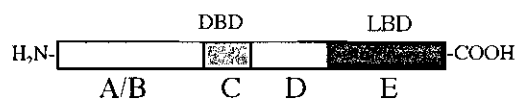


図1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

核内受容体の立体構造を解析するために、LBD 部分タンパク質を遺伝子工学的に発現させ、それを用いてX線結晶構造解析を行う研究が進展してきている。特に、同じ受容体について異なるリガンド（化学物質）が結合した立体構造が明らかとなってきており、このように解析された立体構造を精査することで、より精密な化学物質結合要因が解析される可能性が高い。本研究の目的の一つは、まさにこうしたホモロジーから結合構造を解析することである。

本研究においては、核内受容体のリガンド結合ドメインの立体構造、特に、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つの異なる状態に着目し、その構造変化を解析する方法を新しく開発した。これに基づいて、我々の開発したアッセイ法・センシング抗体法の原理である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し、種々の核内受容体においてこの変化の同定を試みてきた。このリガンド結合時に構造変化を起こす受容体部分ペプチドをエピトープとして抗体を作製すれば、コンホメーション変化を高効率で感知・センシングする抗体となる可能性が高い。

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、エピトープの解析の一般的な方法論を開拓することを目標にしている。そして、リガンド結合により構造変化を起こす核内受容体 LBD の α ヘリックス 12 を中心に見据えた抗体のデザイン法を確立することを最終の目的とする。本年度は、前年度に引き続き女性ホルモン・エストロゲン受容体 α を詳しく解析し、次いで男

性ホルモン・アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、糖質コルチコイド・グルココルチコイド受容体について検討を行うことにした。

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 (Accerlys 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 O2 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、Accerlys 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

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, $\phi = 1.8$ 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 μl に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μl 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 μl) および 0.2 M Na₂HPO₄ (115 μl) 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

先に調製したペプチド-KLH 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た後、2 匹のウサギ (ニュージージーランドホワイト) に対して免疫した。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 法により確認した。

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-

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こ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

昨年度、エストロゲン受容体を用いて核内受容体に対する α-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を実証した。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

が起きていること、これに抗体が感応することが分かった (学会発表 3 を参照)。

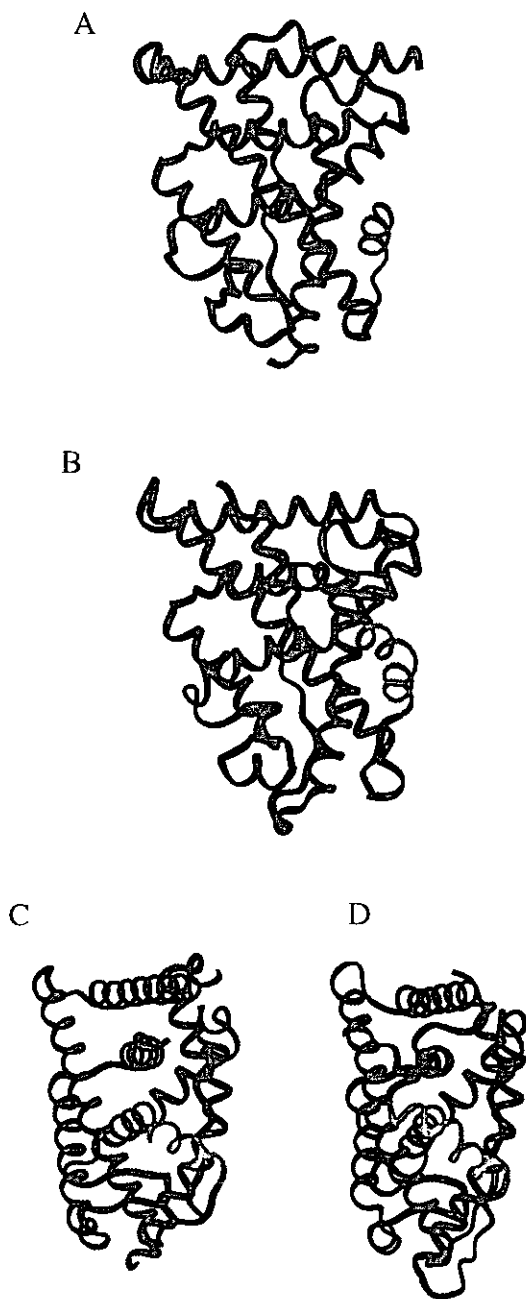


図 2. 分子モデリングで解析したエストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体 LBD 構造

A および C: エストロゲン受容体 (1ERE)
B および D: アンドロゲン受容体 (1E3G)
緑色で示すのがヘリックス 12。

今年度は、エストロゲン受容体以外の核内受容体として、まず、アンドロゲン受容体におけるセンシング抗体のデザインについて検討した。エストロゲン受容体とアンドロゲン受容体のリガンド結合部位の立体構造は既に解明されている。このため、それらの構造情報を入力し、分子モデリング上で比較すると、ヘリックス構造など分子構造を構築する 2 次構造がお互いに非常に良く似ていることが明らかとなった (図 2)。図 2 に示す 2 つの立体構造は互いにアゴニストが結合している構造である。このため、核内受容体へのリガンド結合に伴う受容体の活性化構造は核内受容体間で共通の分子基盤もつことが推定された。

アンドロゲン受容体における α ヘリックス 12 部分のアミノ酸配列を、既にセンシング抗体を得ることに成功しているエストロゲン受容体の例と比較したのが図 3 である。エストロゲン受容体に関しては、上述のようにヘリックス 12 より C 末端部分をエピトープとして作製した抗体においてもセンシング活性が確認されている。

ER-LBD KCKNVVPLYDLLLEML.DAHRLHAPTSR
AR-LBD LIKSHMVSVDFPEMMAEISVQVPKIL
#1

ER-LBD GGASVEETDQSH
AR-LBD SGKVKPIYFHTQ
#2

図 3. エストロゲン受容体 (ER) およびアンドロゲン受容体 (AR) のヘリックス 12 付近のアミノ酸配列

青色で示すのはエストロゲン受容体抗ヘリックス 12 センシング抗体の抗原部位。赤色で示すのは今回抗アンドロゲン受容体抗体エピトープとしてデザインした #1 および #2。

アンドロゲン受容体ヘリックス 12 に相当する部分ペプチドを AR#1、AR#1 より C 末端側のエピトープを AR#2、さらにはその 2 つを連結した AR#1&2 をアンドロゲン受容体センシング抗体用エピトープとすることとした。これらのペプチドは Fmoc 固相法で化学合成した。AR#1 は溶解性が悪く、収量が少なかったが、免疫操作には充分であった。他のペプチドもそれぞれに抗原作製、動物免疫し、得られた抗血清およびアフィニティ精製抗体をセンシングアッセイに供した。

さらに、核内受容体全般にこのセンシング抗体デザイン法が適用可能か検討した。別の核内受容体 2 種類、プロゲステ

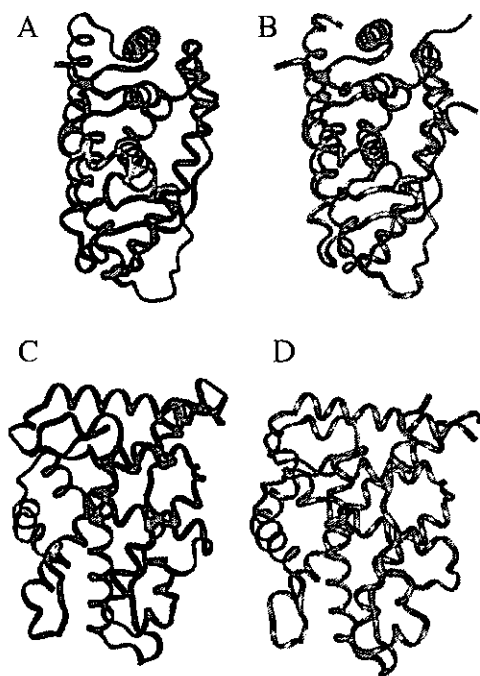


図 4. 分子モデリングで解析した
プロゲステロン受容体およびグルココルチ
コイド受容体 LBD 構造
A および C : PR (1E3K)
B および D : GR (1NHZ)
緑色で示すのが α ヘリックス 12

ロン受容体 (PR) およびグルココルチコイド受容体 (GR) について、センシング抗体作製のためのエピトープデザインを実施した。これらの受容体も X 線結晶構造解析が終了しているため、まず分子モデリングプログラムで分子の立体構造を精査した。その結果、図 4 に示す様に PR および GR は、エストロゲン受容体と非常に良く似た立体構造をしており、ヘリックス 12 に相当する部分の 2 次構造が共通していることが判明した。

このヘリックス 12 近傍の立体構造の類似性から、エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体と同じ様に図 5 に示すようなヘリックス 12 センシング抗体のエピトープ部位を決定した。

PR-LBD SVEFPPEMMSEVIAAQLPKILAGMVKPLLF
GR-LBD SIEFPPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLF

図 5. プロゲステロン受容体およびグルココルチコイド受容体のヘリックス 12 付近の
アミノ酸配列

赤色で示すのが受容体抗ヘリックス 12 センシング抗体の抗原部位。

現在、上記のようにデザインしたエピトープペプチドは、化学合成し、抗体作製作業を実施している。

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 のアミノ酸配列は、高い相同性を示す。このため、2 次構造を含む立体構造も相同性を有していると推定される。今回検討したエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド受容体のヘリックス 12 付近の立体構

造は、非常に似ていた。こうした類似性のため、X線結晶構造解析が完了していない他の核内受容体 LBD においても、少なくともヘリックス 12 付近においては同じ立体構造構築が期待できる。したがって、このヘリックス 12 近傍をエピトープとするセンシング抗体デザインは、構造未知の核内受容体においても適応可能と思われる。一方、立体構造が解析されていない核内受容体においては、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ことで抗体エピトープのデザインが達成されることが考えられる。しかしながら、完全な立体構造はこのセンシング抗体のデザイン法には必須ではなく、部分的な 2 次構造の同定によりエピトープデザインが可能となると考えられた。

E. 結論

本研究により複数の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センシング抗体作製のためのエピトープ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さらに多くの核内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および、結合競争試験やレポーター遺伝子アッセイとの比較が必要である。

F. 健康危険情報

該当する情報はない。

G. 研究発表

学会発表

1. 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、日本内分泌攪乱物質学会第 6 回研究発表会、2003. 12. 2~3。
2. 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。
3. 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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、出願・登録されていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「化学物質リスク研究推進事業」
外国への日本人研究者派遣事業報告

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

派遣研究者 分担研究者・野瀬 健 九州大学大学院理学研究院助教授

近年、核内受容体のみならず、環境化学物質の神経系や内分泌ホルモン系の G タンパク質共役受容体への影響が危惧されている。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン・hCG は、妊娠初期の卵巣黄体を刺激してプロゲステロン産生を高め、妊娠の維持に重要な働きをする一方、腫瘍マーカーとして臨床応用されているタンパク質である。本派遣研究では、培養細胞 HEK293 において、 β -アドレナリン受容体アゴニスト・イソプレテノール刺激が hCG α の量的な産生を引き起すこと確認・同定した。この結果は、内分泌かく乱作用は性ホルモン受容体などの核内受容体と同様に、G タンパク質共役受容体でも起こりうることを直接に示した非常に興味深い成果である。ヒトゲノムの解析では 700 種以上の存在が推定されている 7 回膜貫通型 G タンパク質共役受容体において、多様な化学物質による攪乱の可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

平成 15 年度化学物質リスク研究推進事業「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・野瀬 健をイタリア国・国立衛生研究所（Istitute di Superiore Sanità）の Tommaso Costa 教授のもとに派遣した。化学物質リスク評価研究の進展に伴い、従来内分泌かく乱化学物質、いわゆる環境ホルモンの作用部位として想定されていた核内受容体に加え、別の種類の薬物受容体である 7 回膜貫通型受容体に対するかく乱作用も懸念される様になった。こうしたなか、派遣先の Costa 教授らは化学物質を 7 回膜貫通の G タンパク質共役受容体・ β -アドレナリン受容体の存在する特定の培養細胞 HEK293 に投与すると、その刺激により未知のタンパク質

性物質が強く発現誘導されることを発見した。この結果は、化学物質によりタンパク質産生系が刺激・誘導されて量的な生産を伴う細胞が存在することを示唆した。本研究の第一の目的は、このタンパク質を特定・同定することである。

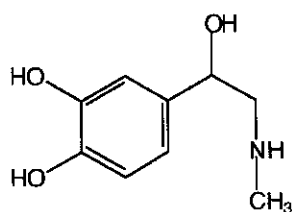
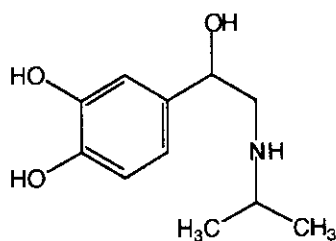
同定されたタンパク質は hCG であった。hCG: ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin; hCG) は、 α および β の 2 つの異なるタンパク質が非共有結合によりサブユニット構造を形成した分子量約 38,000 の糖蛋白ホルモンである。 α サブユニットは LH (黄体形成ホルモン)、FSH (卵胞刺激ホルモン)、TSH (甲状腺刺激ホルモン) に共通である。hCG は主に絨毛組織において産生され、妊娠初期の卵巣黄体を刺激してプロゲステロン産生を高め、妊娠の維持に重要な

働きをしている。このほか、胎児精巣に対する性分化作用や母体甲状腺刺激作用も報告されている。

一方、hCG は絨毛性腫瘍のほか、子宮、卵巣、肺、消化管、膀胱の悪性腫瘍などにおいて異所性発現する事例が多い。このため、腫瘍マーカーとして hCG は実際に臨床検査において使用されている。Costa 教授はヒト胎児腎臓細胞 HEK293 において β -アドレナリン受容体アゴニスト・イソプレテノールの刺激により発現量が上昇する遺伝子を DNA チップを用いた解析から明らかとし、非常に大きく発現量が増加する遺伝子の同定に成功した。その遺伝子が hCG 関連遺伝子であることが判明したため、派遣研究者は、HEK293 細胞を用いてイソプレテノール刺激により分泌量が増加するタンパク質の同定を試みた。

B. 研究方法

① HEK293 細胞のイソプレテノールによる刺激



アドレナリン

図1. イソプレテノールとアドレナリン

まず、HEK293 細胞を培養フラスコ内で DMEM 培地下において培養した。次いで、無血清培地に移して培地交換した後、さらに HEK293 細胞刺激のためイソプレテノール (図1) を加え、48 時間培養した。その後、培地上澄を回収した。

② 培地上澄からのタンパク質の回収

HEK293 細胞を培養した液体培地から、発現タンパク質の回収を行った。まず、分子量で分離を行う遠心濃縮器を使用した。その際、分画分子量 10,000 および 30,000 のセントリコン YM-10 および YM-30 (ミリポア社) を用いた。培地 2 ml をセントリコンに測り取り、遠心機で常温、3,000 x G の条件で遠心濃縮・脱塩操作を行い、液量を約 50 μ l とした。

一方、別の回収法として、アセトン沈殿法を実施した。培地 5 ml について氷酢酸で pH を 5.3 に調整後、2 倍容量のアセトンを加え、氷冷下で 1 時間放置後、生じた沈殿を遠心して回収した。

また、hCG を特異的に吸着することが知られているビタチェンジカラムクロマトグラフィー法を検討した。さらに、サンプルの効率的な前処理法を確立する目的で、アセトン沈殿法の後にセントリコンによる脱塩を行う方法も検討した。これらの方法によるタンパク質の回収効率 は、SDS-PAGE で検討した。

③ SDS-PAGE

SDS-PAGE (12.5%ゲル) を用いて HEK293 細胞培養液中で発現量の上昇するタンパク質の分離・分析を行った。

④ ウェスタンブロッティング

イソプレテノールにより誘導されるタンパク質が hCG α であるかを同定するためにウェスタンブロッティングを実施した。それぞれの方法で処理したタンパク質サ

サンプルを SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜にタンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜において抗ヒト hCG α 特異的抗体（米国立衛生研究所（NIH）製）を用いての抗体応答反応を解析した。

C. 研究結果

① 培地からのタンパク質の回収効率

タンパク質を回収するために当初、遠心濃縮法、アセトン沈殿法、カラム法の3種の方法を検討した。遠心濃縮法およびアセトン沈殿法では効率的にタンパク質が回収されたが、ビタチェンジを用いるカラムクロマトグラフィー法は操作が煩雑であったため、量的な調製には不適であると判断された。さらに、アセトン沈殿法により沈殿タンパク質を回収した後に、引き続きセントリコンによる脱塩を行うことによる、2段階の方法を検討したところ、この組み合わせにより、脱塩およびタンパク質濃縮の効率が大きく向上したため、以後この方法を用いた。これにより簡便で多量にタンパク質沈殿を得ることができることが判明した。

② SDS-PAGE

培地から回収されたサンプルを用いて、SDS-PAGE を行ったところ、分子量約 18,000 のタンパク質が非常に高濃度で検出された。分子量より、このタンパク質は hCG α である可能性が示唆されたので、米国 NIH より入手した hCG α と同一ゲル上で再度 SDS-PAGE を行ったところ、ほぼ同じ泳動距離を示すことが判明した（図2）。

③ hCG α の同定

米国 NIH より入手の抗 hCG α 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、この抗 hCG α 抗体と特異的に結合するタンパク質のバンドが同定された。

その分子量は約 18,000 であることが判明した（図3）。これにより、分子量 18,000 のタンパク質は hCG α であると同定された。

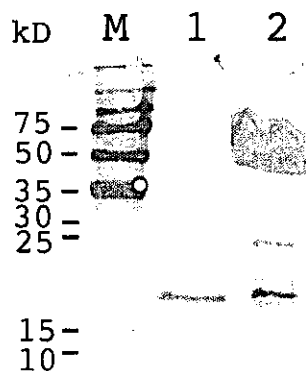


図2. SDS-PAGE による HEK293 細胞からイソプレテノール刺激により分泌されるタンパク質の同定

レーン1 : NIH 標準 hCG α (500 ng) , レー
ン2 : HEK293 培養後培地上澄 150 μ l , M :
アマシャム社製レインボウ分子量マーカー

また、標準 hCG α とのタンパク質バンド濃度の比較による発現タンパク質量の定量を行ったところ培地上澄 150 μ l あたり 500 ng 以上という hCG α の量的な産生 (3.3 μ g/ml に相当) が起っていることが確認された。

現在、このサンプルの質量分析 (MALDI-TOF-MS) での解析を実施している。今後さらに、糖鎖構造の解析を実施し、正常型の糖鎖付加が行われているかの確認を行う予定である。

D. 考察

7 回膜貫通型受容体・ β -アドレナリンの受容体アゴニストである一般の化学物質によりの刺激により、本来 β -アドレナリンと無関係と思われる hCG α というホルモンタンパク質が分泌されることが

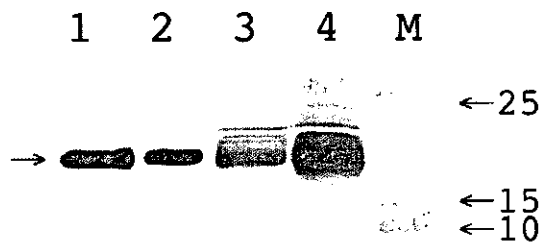


図3. ウェスタンブロット解析による
hCG α の同定と定量

レーン 1 : NIH 標準 hCG α (500 ng)、レーン
2 : NIH 標準 hCG α (250 ng)、レーン 3 : ア
セトン沈殿+セントリコン処理した HEK293 細
胞培養培地上澄 (150 μ l)、レーン 4 : セ
ントリコン処理した HEK293 培養培地上澄
(150 μ l)

判明した。未だその機構は不明であるが、
この結果はヒト胎児腎臓細胞由来の
HEK293 細胞において、化学物質の投与に
より未知のタンパク質発現系が誘導され、
ホルモタンパク質の産生・分泌を促進
したことを示す。この事例は、HEK293 細
胞に特有な事象であるかどうかは不明で
あるが、今後、多くの細胞系であるいは
生体系で 7 回膜貫通型受容体に対する化
学物質のリスク評価を行う必要性を強く

示唆した。

E. 結論

HEK293 細胞を β -アドレナリン受容体
アゴニストであるイソプレテノールで刺
激すると、ホルモタンパク質が発現・
分泌されることが判明した。この結果よ
り、今後の化学物質リスク研究において
より広範な受容体、すなわち、核内受容
体のみならず G タンパク質共役型のホル
モン受容体や神経伝達物質受容体をも標
的とした研究が求められると考えられた。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報はな
い。

G. 研究発表

派遣研究終了直後であり、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

派遣研究研究終了直後であり、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（化学物質リスク研究事業）
「化学物質リスク研究推進事業」
外国人研究者招へい事業研究報告

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

Use of the *Drosophila* central nervous system to examine
neural risk assessment of chemicals

主任研究者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

平成 16 年 3 月 7 日～平成 16 年 3 月 21 日（15 日間）に、カナダ・ダルハウジー大学・生命科学センターのイアン アンソニー マイナーザーゲン（Ian A. Meinertzhagen）教授を表記の共同研究課題で招へいた。3 月 9 日から 3 月 15 日までの間は九州大学大学院理学研究院・構造機能生化学研究室にて、環境化学物質受容体応答解析研究グループのメンバーを交えて、各種受容体試験系の構築に関して、特に、ショウジョウバエ神経系受容体のうち核内受容体の表面プラズモン共鳴（SPR）解析による化学物質の相互作用解析の方法を策定するために、具体的な操作法や解析法等について意見交換を行った。また、共焦点レーザー顕微鏡による受容体免疫染色組織の微細構造観察に関するワークショップを開催し、特に主任研究者側から、モノクローナル抗体作製における精製度の差違が及ぼす影響の具体的な例を示し、実際の精製法について教示・指導した。3 月 16 日にはセミナーハウスにおいて講演会を開催した（参加者 45 名）。3 月 17 日から 3 月 19 日までの間は九州大学大学院理学研究院・構造機能生化学研究室にて、環境化学物質受容体応答解析研究グループおよび共同研究者：福岡大学理学部地球圏科学科生物学教室のメンバーを交えて、ショウジョウバエ卵産生における継代的な化学物質応答解析の再現性を確保するための方策を検討するため、食餌法や卵数カンウント法、ミュータント使用について意見交換を行った。また、受容体免疫染色組織の固定化について Meinertzhagen 教授から凍結置換法などについて技術指導を受けた。このように、研究打合せのみならず、技術交流等で非常に意義深い成果が得られた。

A. 研究目的

平成 15 年度の化学物質リスク研究推進事業の「外国人研究者招へい事業」（社・日本食品衛生協会）において、招へいする外国人研究者・Ian A. Meinertzhagen 教授（カナダ・ダルハウジー大・生命科学センター）は、脳神経系の束一系活動リズムや行動リズムの

神経生理学、免疫組織学等の分野の研究において、国際的に第一人者であり、その精緻な実験構成から成る研究手法と研究展開は高く評価されている。Meinertzhagen 教授と受入の主任研究者・下東とは、昆虫などの動物の活動・行動の日周性リズム（概日リズム）という生物時計の分子機構解明、特に、リズム

ム伝達に関する神経伝達物質の研究で共同している。例えば、最近になって、昆虫・フタホシコオロギの概日リズムペースメーカーホルモンである神経ペプチド PDF の研究において、PDF がリズム伝達の神経情報伝達のみならず、細胞核内へ移行し、リズム発振・振動にも深く関与していることを明らかとした。この事実は、このホルモンペプチド PDF には神経終末シナプスでの細胞膜受容体のみならず、核内受容体を持つことを意味し、現在これらの探索研究を進めている。ところが、概日リズムの乱調やズレに光、音などの外因性刺激に加えて様々な化学物質の受容体応答に起因する可能性が危惧されるに至った。こうした研究の経緯は、環境ホルモン学会等で内分泌攪乱化学物質の神経系での影響が指摘、危惧され始めたことと非常によく符合するものであった。そこで、Meinertzhargen 教授と受入れの主任研究者・下東とは、ヒトに最も近い昆虫モデル系として多くの研究に用いられているショウジョウバエを対象として、化学物質の影響を系統的に試験するアッセイ系の確立をめざして協同することに合意し、昨年より共同研究を開始した。この研究課題は、主任研究者の研究課題「環境ホルモン受容体センシング方による内分泌かく乱性の順位予測」の神経系受容体（核内受容体および細胞膜受容体）の攪乱性、リスク評価の一環をなすものであり、緊要必須な課題と判断される。

B. 共同研究の成果

環境ホルモン、内分泌攪乱物質としての環境化学物質の危険性（リスク）は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ごく最近になってヒトのゲノム

解析の完成を受け、「核内受容体」全般の問題に拡張・拡大して考えられるようになった。さらには、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧され、緊要の課題と位置づけられるようになってきた。ところが、従来の内分泌攪乱化学物質の研究者で、核内受容体と同時に脳神経系受容体について検討できる研究者は、日本国内はもとより、国際的にもきわめて少ない。このため、研究の進展をはかるためには脳神経系研究に経験のある研究者間で高効率な研究展開を企画することが是非に必要である。主任研究者・下東はこの 20 数年来の脳神経系受容体の研究者であり、その研究手法や概念を新たに内分泌攪乱物質研究に導入し、新規な方法論を開拓し、成果をあげてきた。そして、現在、内分泌攪乱物質問題におけるリスク評価を脳神経系受容体、特に概日リズムに関わる脳神経系研究へ展開すべく準備を進めている。この過程で、最適な実験動物として遺伝子研究が容易なショウジョウバエが有力であることが判明し、この分野での世界的な権威である Meinertzhargen 教授との共同研究が必須の要件となってきた。特に、脳神経系での共同研究の成算を得るためにも同教授との密接な連携が必要であり、今回 Meinertzhargen 教授の招へいが実現した。今回の招へい事業では、2 週間の招へい期間に効果的に事業を進めることを目標に以下の事項について特に留意して協同した。まず、共同研究として進めている研究課題の問題点を検討し、その解決法について意見交換・議論すること、さらには、Meinertzhargen 教授および主任研究者・与する核内受容体は両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。特に、CLOCK、CYCLE（ヒトでは BMAL）は時計神経細胞の中核をなす転写因子として機能している。

Meinertzhagen 教授との共同研究では、ショウジョウバエの脳神経の概日リズム振動受容体の化学物質応答を解析する目的で、これらの核内受容体タンパク質について、① CLOCK および CYCLE タンパク質の発現と化学物質応答、② レポーター遺伝子アッセイによる CLOCK/CYCLE 転写活性への影響評価、そして、③ CLOCK および CYCLE の抗体作製と化学物質影響の免疫組織学的解析、の研究課題に取り組んでいる。

①のタンパク質発現においては、核内受容体の一種である CYCLE について、その発現に成功し、精製し、タンパク質の特性について解析が進んでいる。今年度、SPR によって解析の結果、CYCLE がホモダイマーを形成することを初めて明らかとした。これまで、生物時計に関わる核内受容体の発現はほとんど例がなく、こうした生化学研究の重要性が判明した。一方、CLOCK はその分子サイズが CYCLE の約 2 倍あるためか、その全構造発現に成就できないでいる。このため、リガンド等の相互作用性が期待されている C 末端側で完全に保存された構造をもつドメインのみで発現することに合意した。この際、分子サイズの適否を他の核内受容体タンパク質発現の事例を参照しながら詳細に検討した。ところで、打ち合わせのなかで、抗体を用いた免疫組織学的観察による神経細胞内でのタンパク質発現の解析（課題③）の重要性を再確認した。なお、課題③のショウジョウバエの化学物質食餌による解析については委託事業で詳しく解説する。

もう一つの共同研究である「概日リズム伝達の神経ペプチド PDF 受容体の化学物質応答解析」については、① PDF 受容体のクローニング、発現と化学物質応答、② 概日リズム伝達の新規神経ペプチドおよびその受容体の探索、影響評価、そ

して、③ 神経ペプチドおよびその受容体の抗体作製と化学物質影響の免疫組織学的解析、の課題が進行中である。これらの中で、特に②の課題において C 末端に Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ のテトラペプチド構造をもつ FMRamide 関連ペプチド (FaRP) をイエバエ、クロキンバエから同定し、さらにこれらの受容体の cDNA クローニングにも成功したので、今回の招へい期間中はまず、成果の取りまとめについて打ち合わせを行った。FMRamide 受容体は、典型的な GPCR であり、今後は動物細胞に発現させて結合試験系を確立し、化学物質の結合性を検討することとした。この発現については、G タンパク質の α サブユニットを融合させて GDP 結合の解析から化学物質を検討することになった。このように外国人研究者として Meinertzhagen 教授を招へれた。蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による微細構造観察では、切片作製やカバーガラスの重要性が指摘され、カバーガラス製品として日本製のきわめて優れたものがあることが紹介された。こうした細微にわたる技術指導は Meinertzhagen 教授を招へいして初めて可能になることと思われ、非常に有益であった。また、主任研究者側から呈示したモノクローナル抗体を用いた精製度の差違が及ぼす影響については、驚愕するほどの結果の差違に Meinertzhagen 教授も実際の精製について非常に熱心に取り組んだ。このように今回の招へい事業は有意義なうちに終えることができた。

E. 外国人研究者のレポート

First of all I greatly appreciate Japan Food Hygiene Association for giving this marvelous opportunity to visit Japan to facilitate our on-going projects. I had such a wonderful time during the visit,

and enjoyed seeing many friends and colleagues. I enjoyed the seminar, too, with the opportunity to meet so many colleagues, and younger people. The Laboratory of Structure-Function Biochemistry in Kyushu University has a good community of graduate students, and I was especially impressed with the quality of training I saw among them.

I was particularly interested to hear about the endocrine disrupter projects, which will be very important, and which I hope may be applied to the *Drosophila* steroid receptor superfamily. It would be important to develop new ligands and inhibitors for specific receptor isoforms, both for experimental purposes and for control of insect populations. The study to utilize the antibody appears excellent and the idea to detect quantitatively the ligand-induced receptor conformation change is doubtless and definitely promising. The antibody is well known as a protein that has the strict molecular recognition sites in a molecule. There is currently much debate over the health risk associated with the estrogenic activity of compounds that are either present in the environment or used industrially. Therefore, an urgent need has been recognized to establish validated screening methods to test hormonal activities of chemicals. The assay to use antibody would become absolutely a method to assess the hormonal activity of chemicals.

During a relatively short period of my visit this time, we have continuously discussed such projects as expression of

CLOCK and CYCLE proteins and their use for risk assessment, cDNA cloning of FMRFamide peptide gene and its receptor in the housefly *Musca domestica*, and procedures to make slices for observation on microscopes. A successful expression of CYCLE and its biochemical analyses on SPR are tremendous progress and important for future analysis of similar nuclear receptors. CLOCK could be obtained similarly, though we reached a conclusion to try a preparation of the domain with a similar size of CYCLE. It is inherent to remember the importance of microscopically observations of such receptors perhaps including some steroid receptors like ecdysone receptor. Another important progress is, of course, a successful cloning of a series of FMRFamide peptide and receptor genes. The expression of FMRFamide receptor in animal cells, for example in the COS-7 cells, would allow the binding assay of endocrine disrupters and this would a nice initiation to set an assay system for *Drosophila* central nervous system to examine neural risk assessment of chemicals.

Exchange the techniques and the ideas is always a carrier of good luck for on-going research projects especially in elevation of experimental skills. The system there to prepare poly- and monoclonal antibodies is confidently powerful for both of our laboratories in Japan and Canada and I am especially hopeful to continue a collaborative cooperation. Collectively, I am confident to prove a fruitful result from

the reward of this time visit to Japan,
Kyushu University.

G. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報はな
い。

**D. 研究発表
学会発表**

1. 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。

E. 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（化学物質リスク研究事業）
「化学物質リスク総合研究推進事業」
外国の研究機関等への委託研究事業研究報告

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

主任研究者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

委託研究者 Ian A. Meinertzhagen カナダ・ダルハウジー大学・生命科学センター

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体 (dERR) が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズムの関与する核内受容体も、ヒトとショウジョウバエの両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「卵産生」として解析し、これを遺伝子解析からの継代的な分析法に発展させることができれば、有効な内分泌かく乱作用 *in vivo* 解析法として確立できる可能性が高い。そこで今回、専用人工飼料にイーストを加えたショウジョウバエの食餌培地に、一定濃度のノニルフェノールなどの化学物質を混合して調べる世代継代の繁殖毒性試験として、(1) 産卵数および卵の孵化率の算定、(2) オス・メス比の継代変遷、の項目について検討した。その結果、継代によって孵化の性比に大きな差はなかったものの、産卵数および孵化率にはノニルフェノールによって明確な影響が観察され、しかも継代によってそれが増幅される傾向が感知された。しかし、定量的な解析をするには産卵日や交配雄雌の個体数および性比などについてなお詳細な検討が必要であることが判明した。

A. 研究目的

平成 15 年度の化学物質リスク研究推進事業の「外国研究機関等への研究委託事業」(社・日本食品衛生協会)において、「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」の実験研究を、共同研究者であるカナダのダルハウジー大学・生命科学センターの Ian A. Meinertzhagen (イアン アンソニー マイナーザーゲン) 教授に委託した。本研究課題は、特に *in vivo* 生体系での内分泌かく乱作用の影響を評価する実際的な試験系の開発をめざすものであるが、これは女性ホルモン・エストロゲン受容体等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

体法におけるホルモン活性に対応する最大抗体応答性 R_{max} (%) について、生物活性の指標算定を目的とするものである。

環境ホルモン、内分泌かく乱物質としての環境化学物質の危険性(リスク)は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ごく最近になってヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般(ヒトの場合は 48 種類)の問題に拡張・拡大して考えられるようになった。さらには、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧されるようになってきた。特に、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性を、緊要の課題と位置づける考

え方もある。ところが、従来の内分泌攪乱化学物質の研究者・研究グループで、核内受容体と同時に脳神経系受容体について検討できる研究者・研究グループは、日本国内はもとより、国際的にもきわめて少ない。このため、研究の進展をはかるためには脳神経系研究に経験のある研究者間で高効率な研究展開を企画することが是非に必要である。主任研究者・下東はこの 20 数年来の脳神経系受容体の研究者であり、その研究手法や概念を新たに内分泌攪乱物質研究に導入し、新規な方法論を開拓し、成果をあげてきた。そして、現在、内分泌かく乱物質問題におけるリスク評価を脳神経系受容体、特に概日リズムに関わる脳神経系研究へ展開をはかっている。この過程で、最適な実験動物として継代が短期間で起こり、遺伝子研究が容易なショウジョウバエが有力であることが判明し、この分野での世界的な権威である Meinertzhagen 教授との共同研究が必須の要件となってきた。

内分泌攪乱物質リスク評価において、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。しかも、継代的な評価が可能であることは緊要の要素である。化学物質リスク研究における主任研究者の研究課題はホルモン作用を誘起するコンホメーション変化をセンシングする評価法であるが、レポーター遺伝子解析よりもより直接的な *in vivo* 解析が可能な本法は非常に有効な検証法であり、是非に必要な試験法と思われる。

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としては

ヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずか 2 週間程度で進むことであり、また、乾燥酵母などからなるエサの粉末を溶解凝固させたもので食餌するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常として観察することが容易であることである。こうした生体での試験と並行して、試験管 (*in vitro*) での試験については、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものである。「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系の開発は緊急な課題であり、本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立しようとするものであり、これまでにない新規な手法を提供するものである。本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

B. 研究方法

① ショウジョウバエ系統の選出

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の 3 系統の Oregon R、Canton S および white について、適切な系統を選別すべく、12:12 の明暗サイクル、25°C でこれらを飼育した。羽化後 2 時間以内の 3 系統それぞれについて交配し、交配後 1 日目から 14 日目まで、産卵数を毎日数えた。卵の数をカウントにあたっては、ショウジョウバエを炭酸ガス麻酔で新しい培地に移動させたのちに、1 cm マス目のカウント用網目を被せて、実体顕微鏡下でカウンターを用いて実数を算出した。産卵場所は均一でなく、ばらつきがあるために全産卵数を求めた。