

が示されているので、ここが抗原部位として有効であると考えた。そこでこの部位を含むようなペプチドを合成してマウスに免疫し、上記と同様の方法で抗体産生細胞をスクリーニングした。そしてARを競合剤としたELISA法によるスクリーニングによってコンホメーションセンシング抗体の単離を試みた。

C. 研究結果

エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体の作製と順位予測の実施

昨年度までに、局所免疫法による迅速な抗体作成法ならびにELISA法に基づく新しい抗体スクリーニング法により新しい抗体選択法を確立した。これを用いて実際に得られた、ERに対してアゴニスト感受性のセンシング能を有する3つの抗体 mAb1~mAb3 は、アンタゴニストに対しては異なる応答性を示すことが分かり、これらの組み合わせによりアゴニスト活性とアンタゴニスト活性を識別できる可能性が示された。

そこで、アゴニスト感受性のモノクローナルセンシング抗体 mAb1 について、抗体産生細胞をマウスに腹腔内注射する

ことにより、腹水として高濃度の抗体溶液を大量に得ることができた。これを用いて、実際に各種化学物質のコンホメーションセンシングアッセイを実施した。先に報告したポリクローナル抗体を用いたアッセイとの相関を確認するため、試験物質としては、以前のポリクローナル抗体を用いた試験法によって ER との結合性が疑われていた約 60 の化学物質を対象とした。

これまで全ての物質に対して mAb1 を用いて行った2度のアッセイの結果を平均し、50%有効濃度 (EC₅₀) および相対抗体応答性 (RIR) のそれぞれの値につき、ポリクローナル抗体によって得られた値に対する相関分布図をプロットして、回帰直線を求めた (図1)。

その結果、まず EC₅₀ は両者の間で正の相関があり、相関の度合いも全体的に高かった (図1A)。相関係数は1よりは小さかったが、回帰直線の定数項が負であることから、モノクローナル抗体のほうが受容体親和性を検出する感度が高いといえる。一方、RIR も互いに正の相関をもっていたが、相関の度合いはそれほ

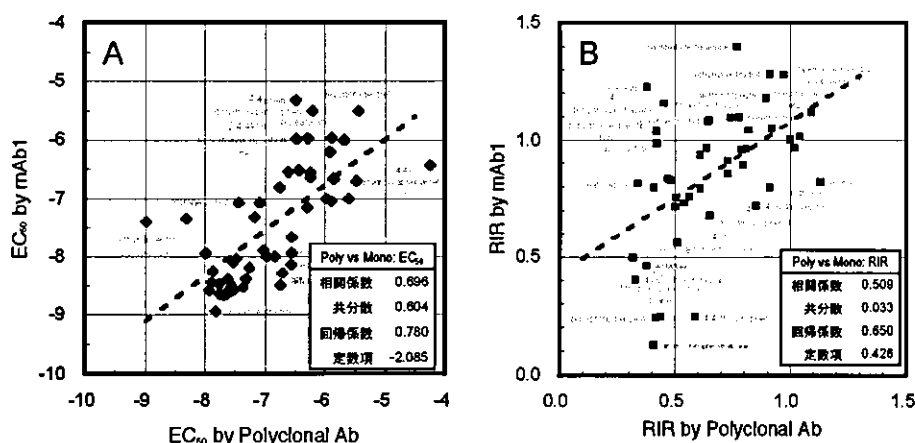


図1 モノクローナル抗体 mAb1 を用いたセンシングアッセイの結果のポリクローナル抗体との相関図。50%有効濃度 (EC₅₀, A) および相対抗体応答性 (RIR, B) のそれぞれについて、横軸にポリクローナル抗体による値、縦軸にmAb1による値をプロットした。

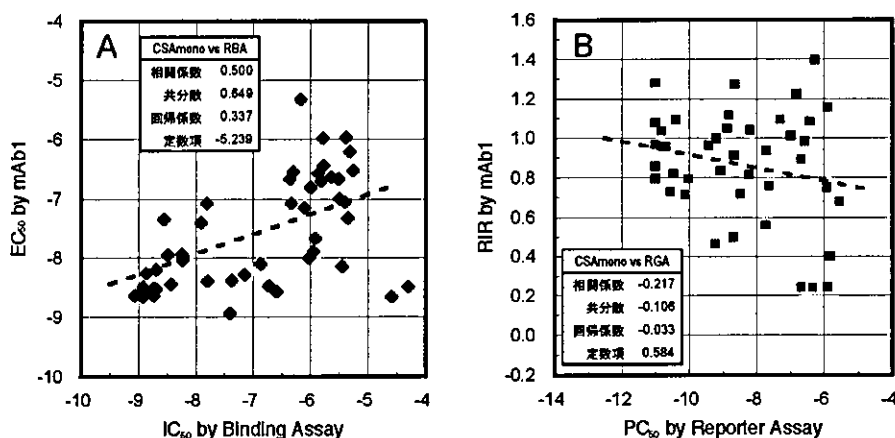


図2 モノクローナル抗体 mAb1 によるセンシングアッセイの結果を、受容体結合試験 (A) およびレポーター遺伝子アッセイ (B) と比較した。二つの試験法による結果を横軸に取り、それぞれと対応していると考えられる mAb1 による EC₅₀ または相対抗体応答の値を縦軸にプロットした。

ど大きくなかった (図 1 B)。

続いて、mAb1 を用いたセンシングアッセイによって得られた結果を、従来の関連する試験法によって得られていた値と比較した。すなわち、EC₅₀ を受容体競争結合試験の IC₅₀ と、また抗体応答性をレポーター遺伝子アッセイによる PC₅₀ の値とに対して相関性を調べた (図 2)。その結果、mAb1 によるセンシングアッセイは、結合試験との間には正の相関がある (図 2 A) 一方、レポーターアッセイとは明瞭な相関は見られなかった (図 2 B)。EC₅₀ については回帰直線の近くに集まった相関性の高い物質が多数ある一方で、それらから外れた物質もかなりあった。また RIR については一部の化合物は値が小さくて判定不能 (図には現れない) となった。

以上を踏まえて、mAb1 によるセンシングアッセイにより評価した各種化学物質の EC₅₀ および RIR の値を EC₅₀ の大きさの順に並べた (表 1)。

その結果、これまでのポリクローナル抗体によるアッセイと全体的には同様の順位付けが得られた。これにより、モノ

クローナル抗体による化学物質の環境リスクの順位付けが実現した。

アンドロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体の作製の試み

AR についても同様のセンシング抗体作製を試みたが、これまでのところ、センシング能をもつ抗体のクローンを得るには至っていない。約 300 の抗体産生細胞の一次スクリーニングから単離した 22 クローンに対して、アンドロゲン受容体を競合剤とする二次スクリーニングを行ったところ、9 クローンが競合反応を示した (図 3)。しかしいずれも、男性ホルモンであるジヒドロテストステロンに依存した抗体応答の変化は示さなかった。

二次スクリーニングを実施する際には競合 ELISA 法の反応条件の最適化なども注意深く行ったので、これらのクローンのセンシング能を見逃してしまったとは考えにくい。一方、別途作製したポリクローナル抗体については、センシング能をもつ抗体が得られている。従って、今後はさらに免疫からスクリーニングまでの操作を繰り返して、センシングモノク

表1 mAb1によるセンシングアッセイで得られた各化学物質の有効濃度と抗体応答性。

#	化合物名	有効濃度 (log[EC ₅₀])	抗体 応答性	#	化合物名	有効濃度 (log[EC ₅₀])	抗体 応答性
1	16-ketoestradiol	-8.93	1.08	24	diethylstilbestrol dipropionate	-7.39	0.80
2	Ethynyl estradiol	-8.63	1.28	25	Estrone	-7.34	0.46
3	Diethylstilbestrol	-8.63	1.09	26	2-methoxy-β-estradiol	-7.31	0.96
4	17-epiestriol	-8.58	0.97	27	Norethindrone	-7.15	1.10
5	α-zearalenol	-8.57	0.79	28	4-hydroxyestradiol	-7.07	0.72
6	17β-estradiol	-8.55	1.00	29	Coumestrol	-7.07	0.94
7	6α-hydroxyestradiol	-8.52	0.91	30	β-estradiol-3-benzoate	-7.04	1.18
8	6-ketoestradiol	-8.50	0.86	31	3',4',7-trihydroxyiso-flavone	-7.00	1.16
9	Dihydroxytetraphenyl-methane	-8.49	0.13	32	Genistein	-6.81	0.76
10	17α-estradiol	-8.48	1.00	33	6-ketoestradiol-6-carboxymethyl)oxime (o-	-6.70	1.01
11	16α-hydroxyestrone	-8.47	0.96	34	Norethynodrel	-6.66	1.12
12	Estriol	-8.44	0.82	35	4-cyclohexylphenol	-6.66	0.40
13	6β-hydroxyestradiol-17β	-8.39	1.04	36	isoliqurtigenin	-6.63	0.98
14	Equilin	-8.38	0.72	37	4,4'-dihydroxydiphenyl	-6.56	0.68
15	4-(1-adamantyl)phenol	-8.28	0.56	38	4,4'-thiobis-phenol	-6.54	0.24
16	Diethylstilbestrol	-8.25	0.96	39	5α-dihydrotestosterone	-6.52	1.40
17	Estrone 3-hemisuccinate	-8.20	0.50	40	4,4'-dihydroxydiphenyl-methane	-6.43	0.25
18	estriol 3-methyl ether	-8.13	0.89	41	2,3,4,4'-tetrahydroxy-benzophenone	-6.20	0.83
19	Mestranol	-8.10	1.04	42	2,4,4'-trihydroxybenzo-phenone	-5.98	1.08
20	Dehydrostilbestrol	-8.04	0.79	43	β-zearalenol	-5.97	0.83
21	5a-androstane-3β,17β-diol	-7.99	1.05	44	kaempferol	-5.96	0.75
22	2-hydroxyestriol	-7.89	0.80	45	daizein	-5.32	1.22
23	17α-ethynylestradiol-3-cyclopenta ether	-7.66	1.27				

ローナル抗体の単離を目指すことが必要である。

D. 考察

昨年度までに示すことのできたモノクローナル抗体によるコンホメーション変化センシングアッセイ法の有効性を受けて、今年度には実際に得られたセンシングモノクローナル抗体を用いて化学物質の環境影響評価を実施した。その結果は、全体として既報のポリクローナル抗体による結果と同様であったが、一部の物質については順位付けが異なっていた。

この差について考察する際に重要なことは、ポリクローナル抗体には特異性の異なる抗体が混在していると考えられるのに対して、モノクローナル抗

#	dilution range									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
8							1.01	0.94	0.89	
10	1.43	0.64	0.40							
16		0.90		0.77	0.59					
21	-0.0	-0.0								
26				0.82	0.83	0.80				
27		0.77	0.75	0.79						
30				0.90	0.97	0.83				
46		0.74		0.35	0.09					
47	1.12	0.83	1.03							
51	1.05	0.95	0.92							
55	1.03	0.72	-0.0							
58				1.02		1.05	1.01			
64				0.93		0.84	0.96			
66		1.00		0.91	0.88					
69			0.68	0.84	0.56					
89	0.99	1.09	1.13							
90		1.30		0.95	0.95					
96		1.19		1.03	1.00					
100		1.03		0.74	0.76					
111		1.20		0.86	0.89					
115	1.15	1.14	1.02							
117		1.03		0.81	0.73					

図3 抗ARモノクローナル抗体の二次スクリーニングにおける競合ELISAの最適化の結果。クローンごとに、競合反応(1に対する相対値)を示した希釈倍率(横軸)の範囲を下線で示した。

体はその名の示す通り均一な性質を持っていることである。今回用いた mAb1 という抗体は、アゴニストリガンドである 17β-エストラジオールに感受性であることが分かっているから、この mAb1 を用いた順位予測の結果は、化学物質の受容体に及ぼす影響のうちから、女性ホルモン様のアゴニスト活性を特異的に取り出して評価の指標としていると言える。一方、同時に得られたセンシング抗体 mAb2 の方は、アンタゴニストであるヒドロキシタモキシフェン(OHT)に対して逆位相の感受性を示す、すなわち OHT 非結合型より OHT 結合型への応答性が低下することが分かったので、mAb2 を用いてセンシングによる順位付けを行えば、その結果はアンタゴニスト活性をも併せたような異なったものとなることが予想される。

このように、今後はモノクローナル抗体の特性をさらに活かして、リガンド感受性の異なるような複数の抗体を探索し、それらの抗体のセットを組み合わせて用いることで、実際の多種多様な化学物質の環境リスクを総合的に評価する本試験法の有用性が実証されたものと考えられる。

E. 結論

- 1) 初年度に導入・整備した実験環境を利用し、局所免疫による迅速な抗体作成法の採用と併せて、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昨年度に確立できた。これにより実際に高い力価を示す多数の抗体産生細胞が得られ、そのうちセンシングアッセイ能を有する3つの抗体を単離することができた。
- 2) 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効率

のよいアッセイが可能であり、またリガンド感受性の異なる複数の抗体が得られたことで、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のあることが示された。

- 3) アゴニスト感受性のモノクローナル抗体を大量に得て、実際に各種化学物質のコンホメーションセンシングアッセイを実施した結果、従来のポリクローナル抗体によるアッセイ法とも高い相関をもちながら、より効率よく多数の化合物の受容体結合能を評価することができた。これにより化学物質の環境リスクの順位予測を行うことに成功した。

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

論文発表

1. Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor. O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 333-334 (2005).

学会発表

1. 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.
2. 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、Highly Sensitibe

Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor, 1st Asia-Pacific, International Peptide Symposium 41st Japanese Peptide Symposium (APIPS-JPS 2004)、2004.11.1~3。

3. 徳永隆俊、桑田 治、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、毛利資郎、小泉修、下東康幸、男性ホルモン・アンド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の確立、平成 16 年度環境ホルモン学会、2004.12.14-15。

4. 徳永隆俊、桑田 治、渋谷あゆみ、浅井大輔、毛利資郎、小泉 修、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、下東康幸、The ELISA-based Conformation Change

Sensing Assay: Simultaneous Evaluation of Receptor Binding and Hormonal Activity of Endocrine Disruptors、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005.1.22~23。

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究によって初めて実現したモノクローナル抗体を用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法について、今後さらに有用な抗体を得たうえで特許を出願することを検討している。

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

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

研究要旨

一般に核内受容体は、リガンド非結合、アゴニスト結合、アンタゴニスト結合の3つの異なる状態において、それぞれ立体構造・コンホメーションが異なる。ヒトには48種類の核内受容体の存在がゲノム解析の結果より示されているが、それらにおいてもこれら3つのコンホメーションが存在すると想定される。我々は、こうした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のできるアッセイ法の構築に成功した。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。こうしたなか、すべての核内受容体に対して高効率的にコンホメーションをセンシングする抗体を作製する一般的な方法論の開発は、化学物質のリスク評価に必要である。そこで本研究では、汎用的設計法の開発の一環としてERR（エストロゲン受容体関連受容体）に対するセンシング抗体をデザインし、抗体を作製することにした。まず、抗体抗原部位となる分子モデリングによりERR α 、 β 、 γ の立体構造を精査した。その結果、ERRリガンド結合部位において第12ヘリックスは高く保存されており、この第12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広く適応可能であると考えられた。

A. 研究目的

今日まで、環境ホルモンの影響を最も顕著に受ける核内受容体として、女性ホルモン（エストロゲン）受容体（ER）が注目されてきた。それは、ERが主に生殖に関与し、人類の子孫、特に個体数の減少に直結するとの考えから重要視されたものである。ヒトゲノム解析研究が終了した結果、48種類の核内受容体が存在することが判明し、それらに対する化学物質・環境ホルモンの影響が懸念されるようになった。このようななか、オーファン受容体に分類されるERR（Estrogen Related Receptor）は、ERに相同性の高い遺伝子として実際にクローニングされた。その後、ERRはERと標的遺伝子や転写に関わるコファクター、さらには

結合するリガンドまでも共有する事例が報告されている48種類の核内受容体全般に対する内分泌かく乱作用性の解析の必要性が指摘されている。昨今、ERとERRの例に見るような相同な受容体、しかも複合体を形成する系は真っ先に検討する必要がある。こうした研究の緊急性のため、本研究では、ERと同様に生殖系に関与する可能性がきわめて高いERRに対する環境ホルモン・化学物質の影響評価系を構築する目的で、センシング抗体の作製を実施した。

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。これまでに、タンパク質としてアミノ酸解析が判明した核内受容体は48種存在するが、

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 が内分泌かく乱化学物質の主な作用・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る。また、ERR は α 、 β 、 γ の 3 つのサブタイプからなるファミリーを形成しているが、それらと ER とのホモロジーは DBD において 70% 弱、LBD においては 35% 程度である。(図 2)。ただし、 α 、 β 、 γ 間ではホモロジーはそれぞれ 36~47% である。

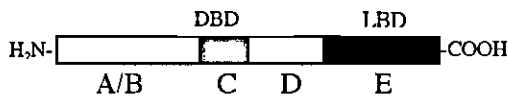


図 1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

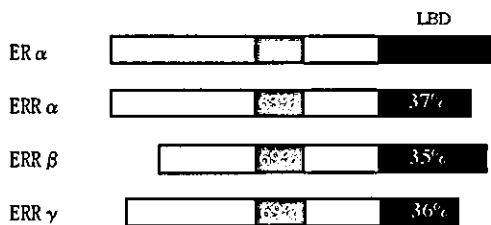


図 2. ER と ERR のホモロジー
LBD: Ligand Binding Domain.

化学物質の核内受容体 LBD への結合性を解析するためには、LBD の立体構造を解析する必要がある。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。しかしながら、立体構造の解析は簡便に行える実験操作ではなく、今日においても高度な専門的技量と高額な装置を必要とする。一方、本研究課題はコンピュータを用いてアミノ酸配列のホモロジーから立体構造をコンピュータ計算により構築し、さらにはセンシング抗体の抗原部位を決定するという計算化学を基盤とするものであり、比較的短時間でアミノ酸配列のみの情報から受容体や LBD の立体構造を構築することができる。本年度の研究では、近年注目されている ERR-LBD の立体構造を構築し、センシング抗体の抗原部位を決定して、ポリクローナル抗体作製を行うこととした。

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 (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 ERR-LBD の立体構造はホモロジーモデリング法で作製した。ホモロジーモデルの作製には、Accelrys 社製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

分子モデリングにより同定した受容体の第 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抗原として設定し、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/ 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。

⑥ 抗原ペプチドの 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、4°C で終夜インキュベートした。沈殿した抗 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

昨年度までにおいて、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。そこで、今年度はその重要性が指摘されているが特異的な内在性リガンドが未知のため立体構造が解明されていなかった ERR について、立体構造をホモロジーモデリング法で構築することとした。一般にホモロジーモデリング法は、相同性が 30% 程度のタンパク質間において、一方の立体構造が既知である場合に実施可能である。図 2 に示すように、ERR

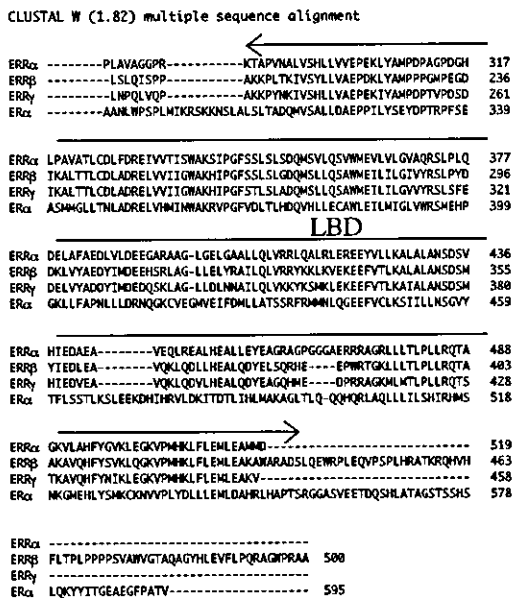


図 3. ERR および ER の LBD におけるアミノ酸配列アラインメント
矢印部分は ER α における LBD 部分を示す。

の 3 つのサブタイプ α 、 β 、 γ の LBD においては、立体構造既知の ER α とそれ

らの相同性は 35~37% であり、ホモロジーモデリングは実施可能である。

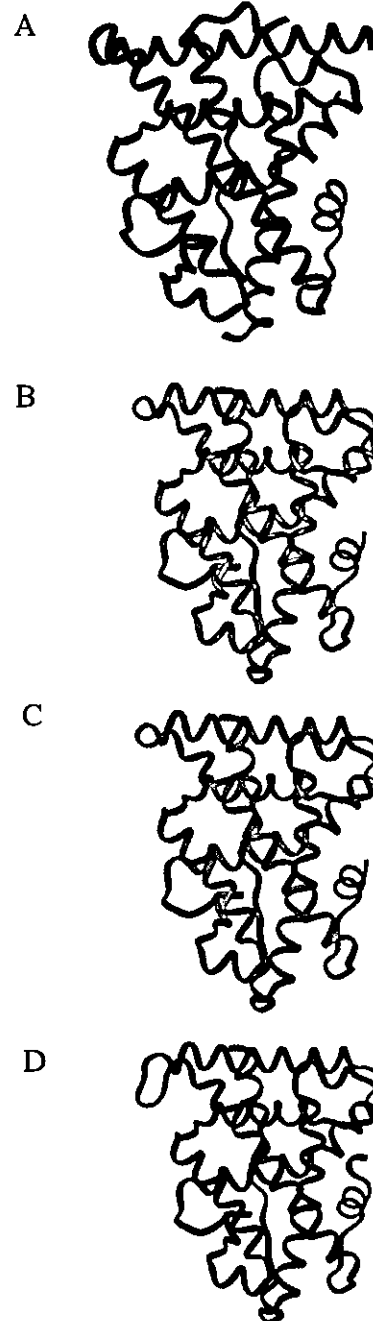


図 4. 分子モデリングで構築した ERR-LBD の立体構造
A: エストロゲン受容体 (IERE)
B~D: 順に ERR α 、 β および γ
緑色で示すのがヘリックス 12。

ホモロジーモデリングのためのアミノ酸配列のアラインメントは CLUSTAL W プログラムを用いて行った (図 3)。ERR-LBD の立体構造は、Modeler プログラムを用いたホモロジーモデリング法により構築した (図 4)。その結果、ERR-LBD の立体構造においても C 端のヘリックス構造は保持されていることが判明した。昨年度までの研究において、センシング抗体のエピトープ部位は、LBD の C 端側でヘリックス 12 を含む部分が有効であることが明らかとなっている。また、ERR サブファミリー間においてはヘリックス 1 2 近傍のアミノ酸配列は相同であるため、この部分について前後に 4 残基移動させた 2 種類の部分ペプチドを抗体作製のエピトープとして用いた (図 5)。

#1 GKVPMHKLFLLEMLA
#2 MHKLFLLEMLA

図 5. ERR センシング抗体作製のためのエピトープ部位

2つの抗原ペプチドは C 末端に Cys 残基を付加した形で、Fmoc 自動固相合成機により合成した。その後、ポリクローナル抗体作製のために KLH との複合体とし、ウサギに免疫を行った。約 2 ヶ月後に採血を行い、抗体価を合成ペプチドについて検討したところ、有為な特異的結合性が確認された (図 6)。よって、抗原ペプチドを認識する抗体が作製されたことが明らかとなった。

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 ERR・エストロゲン受容体関連受容体のリガンド結合構造については 2004 年 6 月に Greschik らにより X 線結晶構造が報告された (*J. Biol. Chem.* **279** pp. 33639 (2004))。そのヘリックス 12 付近の立体構造は、他の核内受容体の立体構造に非常に似ていた。こうした類似性のため、ホモロジーモデリングによる立体構造の構築が可能であり、X 線結晶構造解析が完了していない他の核内受容体 LBD においても計算化学的に立体構造が構築されるのである。そして、本研究にとって重要なことは、少なくともヘリックス 12 付近においてはかなり精密な立体構造を構築し得ること大きくが期待できることである。このことは、センシング抗体のデザインを可能と、今後、立体構造未知の核内受容体に対しても同様にセンシング抗体のデザイン・調製が実行可能となるものと考えられた。

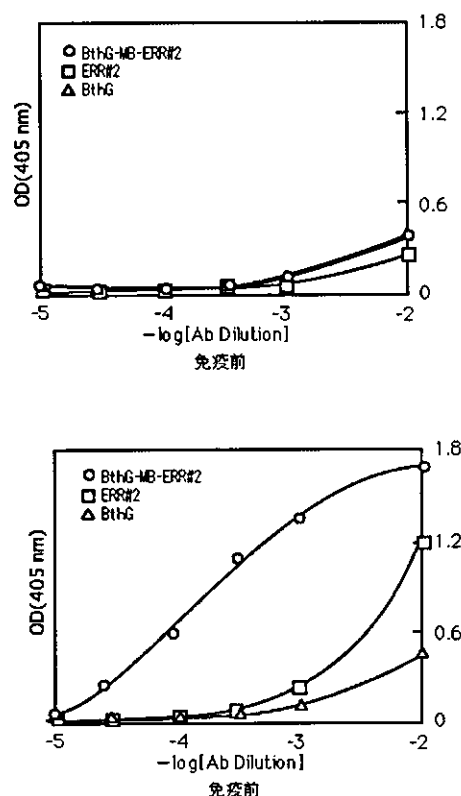


図 6. 抗 ERR 抗体の抗原認識能

なお、報告された ERR の立体構造を用いての直接的なホモロジーモデリングが実施可能となった。今回の研究で構築した立体構造モデルと新たに構造解析された ERR の立体構造を鋳型として用いたモデルはほぼ同様の結果を与えることが示された。

E. 結論

本研究によりエストロゲン受容体 (ER) と密接に関連した生理作用を担っている ERR (エストロゲン受容体関連受容体) についてのセンシング抗体の作製が可能であることが示された。今後は、この方法論を用いて ERR に関する化学物質のリスク評価を実施するとともに、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. 劉 曉輝、松島綾美、白須直人、富永佳也、下東美樹、下東康幸、野瀬 健、
Structural Characteristics of *Drosophila* Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium、2004. 10. 31~11. 3。

2. 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、
Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies. 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium、2004. 10. 31~11. 3。

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）
分担研究報告

ファージディスプレイ法によるエストロゲン受容体センシング抗体の作製

分担研究協力者 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

研究要旨

我々はこれまでに、リガンド依存的なエストロゲン受容体のコンホメーション変化をセンシングするポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製し、当該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、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 種類の核内受容体が複合的に関与する複雑な制御機構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きわめて強く、他の核内受容体群に対しても、化学物質の内分泌かく乱作用性を評価する必要がある。このためには、各受容体に対するコンホメーションセンシング抗体を作製せねばならないが、動物免疫や細胞融合を行う従来の抗体作製法は、費用と時間の双方において高コストで操作自体も煩雑であるため、多種類のセンシング抗体を得るためには、必ずしも最良の方法とはいえない。そこで本研究では、近年発展が著しい抗体ファージディスプレイ法を用いて、センシング抗体の取得を試みた。その結果、ヒト ER α のリガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングする抗体を産生するファージを選別できる可能性が示された。本法は、従来のセンシング抗体作製法と比較してはるかに迅速かつ簡便であり、48 種という多種の核内受容体に対するセンシング抗体作製に適用できるものと考えられる。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析の完成により、ヒトには 48 種の核内受容体が存在することが明らかにされた。環境化学物質による内分泌かく乱作用は、これらの核内受容体群が複合的に関与する複雑な制御システムに対する影響の結果生じる可能性が強い。事実、内分泌かく乱作用に直接的に関与するエストロゲン受容体 (ER) に加えて、エストロゲン関連受容体 3 種 (ERR α 、 β 、 γ) の存在が明らかとなっており、これらは一部の外因性リガンドをエストロゲン受容体と同じくすることが知られている。

ER にも α 、 β の 2 種が存在するため、合計 5 種の受容体が相互に関連した機能調節機構の存在と、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。従って、

48 種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の予測・順位付けを行うことはきわめて重要である。我々は、核内受容体断片ペプチドを抗原とした動物免疫によって、コンホメーションセンシング能を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製に成功している。しかしながら、従来の動物免疫やハイブリドーマを用いた抗体作製法では、経済的・時間的なコストが非常に高く、免疫するホスト動物種にウサギやマウスなどを使用するため、哺乳類間で高度に保存されているような抗原に対する高親和性抗体を得ることが難しい。また、動物免疫を経て得られる抗体は、ホスト内で強力に取捨選択されたものであるため、抗原認識や機能の多様性が低く抑えられる。これらのことは、48 種という数

多い核内受容体に対するコンホメーションセンシング抗体を得る上では大きなネックとなる。

一方、近年ではファージディスプレイ技術を用いた抗体作製法が発展してきた。ファージと呼ばれるウイルスの一種に抗体タンパク質を産生させるこの技術は、生体内の免疫システムを試験管の中で再現するものである。本法は、動物免疫を行うことなく抗体を得ることができるために上述のような従来の抗体作製法が内包していた種々の問題点が回避され、高効率にコンホメーションセンシング抗体が得られる可能性が高い。本研究では、ファージディスプレイ法を用いてヒト ER α に対するコンホメーションセンシング抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

(1) 抗原ペプチド・抗原タンパク質の調製

リガンドの結合時に大きく構造変化を起こすことが知られている ER リガンド結合ドメイン (LBD) の 12 番目のヘリックス (H12) 付近の配列をもつペプチドを化学合成した。一方で、ER-LBD に相当する遺伝子断片をタンパク質発現ベクターである pGEX6P-1 へ組み込み、宿主大腸菌 BL21 へ導入した。これにより、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 ER-LBD を発現させ、グルタチオンセファロース 4B 担体を用いたアフィニティ精製を行って抗原タンパク質として用いる GST-ER-LBD を得た。

(2) バイオパンニング

ファージ抗体ライブラリーには、英国医学会議 (MRC) より入手した Tomlinson J ライブラリーを使用した。このライブラリーに含まれるファージは、抗体タンパク質の変換領域を単鎖化した遺伝子と G3P コートタンパク質遺伝子とが融合された遺伝子をもつため、対応する単鎖型抗体タンパク質がファージ表面に提示される (図 1)。

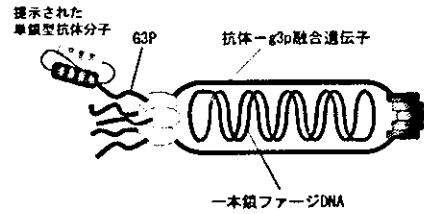


図 1. ファージ抗体の構造

一般にファージディスプレイ法では、①固定化抗原とファージライブラリーの結合、②洗浄、③結合ファージの溶出、④溶出ファージの大腸菌への再感染、⑤溶出ファージの増幅・回収、というバイオパンニングと呼ばれる一連の操作によって、抗原特異的な抗体を発現したファージ粒子を選択的に増幅させる。通常、このパンニングを 2～4 回程度繰り返すことで目的の抗体を得る (図 2)。

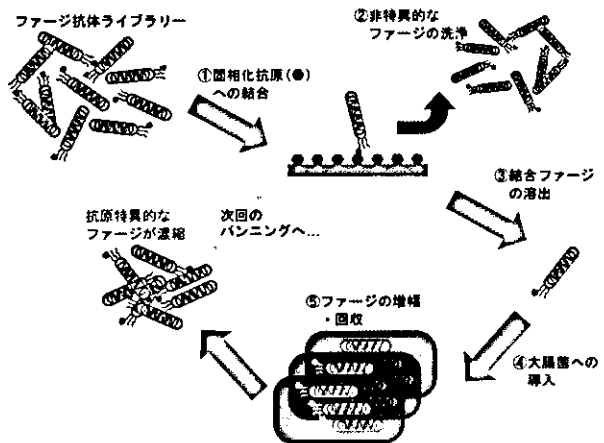


図 2. バイオパンニング

1 回目のパンニング

H12 ペプチド (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS、含 10% トリフルオロエタノール (TFE)) をイムノチューブ (Maxisorp, Nunc 社) に加え、終夜インキュベートして固定化した。洗浄の後、2% スキムミルク-PBS (MPBS、含 10% TFE) にて 2 時間ブロッキングを行った。4 ml の

MPBS(10%TFE)中に 5×10^{12} のファージを含むように調製した Tomlinson J ライブラリーをイムノチューブに加え、計 2 時間反応させた。0.1%Tween20-PBS (TPBS、含 10%TFE) で 1 回、PBS-10%TFE で 2 回洗浄した後、500 μ l のトリプシン溶液(1 mg/ml)を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。溶出ファージを宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成したコロニー群を液体培地によって懸濁させ、50 ml の 2 \times TY 培地(含 1%グルコース)に植菌して対数増殖期にまで 37 $^{\circ}$ C で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の 2 \times TY で再度菌体を懸濁させ、 5×10^{10} の KM13 ヘルパーファージを添加して 30 分間静置した。遠心して上清を除去した後、50 ml の 2 \times TY 培地(含 0.1%グルコース)で菌体を懸濁させ、30 $^{\circ}$ C で終夜培養した。パッケージングされたファージ粒子は培養上清に含まれるため、これをポリエチレングリコール(PEG)沈殿法によって回収し、最終的に得られるファージペレットを 2 ml の PBS にてけん濁させた。得られたファージ液のうち 1 ml を次のパンニングに使用した。

2 および 3 回目のパンニング

抗 GST 抗体(100 μ g/ml in PBS)をイムノチューブに固定化した。洗浄後、MPBS にて 2 時間ブロックした。次に、100 μ g の GST-ER-LBD を含むように調製した 2 ml の MPBS をイムノチューブに加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。チューブを洗浄した後、50 μ g の GST タンパク質と前回のパンニングで得られたファージとを含む 2 ml の MPBS を添加して、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後の洗浄は、パンニング 2 回目では、TPBS で 1 回、次いで PBS で 3 回の洗浄操作を行った。3 回目のパンニング時には、TPBS で 10 回、PBS で 20 回洗浄した。チューブから洗浄液を完全に除いた後、500 μ l の 10 μ M 17 β -エストラジオール(E2)/PBS を加えて 4 $^{\circ}$ C で 30 分間転倒混和することにより、結合ファージの

溶出を行った。溶出ファージ液のうち 250 μ l を用い、1 回目と同様の操作によりファージの増幅・回収を実施した。

(倫理面への配慮)

一般の抗体作製法とは異なり、ファージディスプレイ法は実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、今回の研究では動物愛護の観点からの倫理上の問題が大幅に軽減されている。また、研究に用いたファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。

C. 研究結果

初回のパンニング時には、H12 ペプチドを抗原としてイムノチューブに固定化した。抗原ペプチドの α ヘリックス性増大を見込んで、抗原固定化時から一連のパンニング操作にかけて、10%TFE を含む緩衝液を使用した。なお、トリプシン消化による結合ファージの溶出時には TFE を使用していない。溶出ファージの力価を調べた結果、 9.2×10^7 の感染性を有するファージが溶出されたことが分かった。溶出ファージは TG-1 に感染させて増幅し、KM13 ヘルパーファージによってパッケージングを行い、PEG 沈殿法によって回収した。回収したファージを用いて、2 回のパンニングを実施した。

2 回目のパンニングには、抗原として GST-ER-LBD を用いた。抗原のイムノチューブへの固定化は、ウサギ抗 GST 抗体を介した間接固定化法にて行った。ファージの結合反応時に相当量の GST タンパク質を共存させることで、不要な抗 GST ファージ抗体がチューブ中に多く残存することを抑えた。ファージの溶出には 10 μ M E2 溶液を用いた。これによって溶出してくるファージは、E2 の結合により誘起された ER-LBD のコンホメーション変化によって結合親和性が低下したものの、すなわち、ER のセンシング抗体を提示したファージであると期待される(図 3)。実際に、E2 溶液とのインキュベートによって 2.1×10^8 のファージが溶出された。

このうち半量を 3 回目のパンニングに使用した。

3 回目のパンニングにおいても、2 回目同様に GST-ER-LBD を抗原として用い、E2 溶液を結合ファージの溶出に使用したが、結合ファージの洗浄条件を厳しくした。E2 溶液による結合ファージの溶出によって、 4.8×10^5 のファージが得られた。

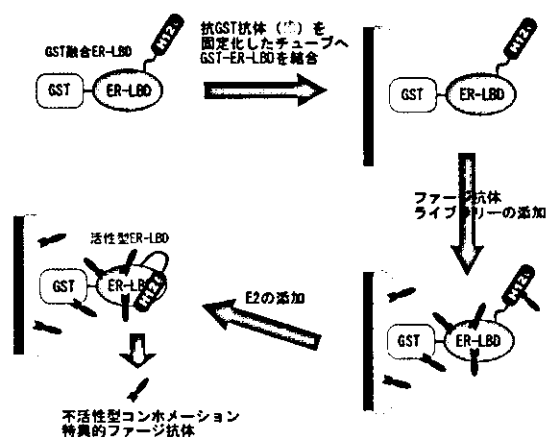


図3. センシングファージ抗体取得を指向したパンニング法 (2、3回目のパンニング時に実施)

D. 考察

センシング抗体を産生するファージを高効率に得るために、まず、1 回目のパンニングの抗原として、TFA 存在下の H12 ペプチドを使用した。円二色性スペクトル解析によって H12 ペプチドの α ヘリックス性が TFA 存在下で顕著となることを確認しており、ヘリックス構造を特異的に認識するという要件に適うファージ抗体のパンニングに有効であろうと考えた。続く 2、3 回目のパンニングにはタンパク質抗原である GST-ER-LBD を用いた。

ファージライブラリー法を用いた抗体作製では天然型構造のタンパク質をそのまま抗原として使用できるため、構造特異的な抗体を得るにはきわめて有効な手段であると考えられる。また、E2 結合による ER-LBD のコンホメーション変化が固相への吸着に

よって妨げられないように、抗 GST 抗体を介して間接的に GST-ER-LBD の固定化を行った。今回、センシング能を有する抗体を提示したファージを選択的に溶出させるために E2 を含む緩衝液を用いた。これは、酸による pH 変化や酵素消化などの一般的に用いられる結合ファージの溶出法と比較すると、非常に緩い条件での溶出法と考えられるため、多くの結合ファージは溶出されないものと予想されたが、洗浄の条件が緩いためか、2 回目のパンニング時にも多数のファージが回収された。洗浄条件を厳しくした 3 回目のパンニング後では溶出ファージ数が 2 回目よりも減少していたが、それでも相当数のファージが溶出しており、E2 依存的にファージ抗体が溶出しているものと期待される。今後、これらの中から真に ER のコンホメーション変化をセンシングできるファージをクローニングするため、モノクローナルファージ ELISA を実施する必要がある。目的の抗体を産生するファージが得られれば、これを大腸菌に再感染させることにより、大量に単一の抗体タンパク質を作製することが可能となる。

一方で、実験に使用した Tomlinson J ライブラリーは、 1.37×10^8 のファージ抗体のレパートリーを含むが、これは高い抗原親和性を持った抗体を得るのに必ずしも十分な数とはいえないため、48 種という多くの核内受容体を標的としたセンシング抗体を得るには、より多様性をもったライブラリーの作製を要するかもしれない。

E. 結論

ファージディスプレイ法を用いた抗体スクリーニングによって、ヒト ER α のリガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングする抗体を産生するファージを選別できる可能性が示された。本法は、従来のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体作製法と比較してはるかに迅速かつ簡便であり、48 種という多種の核内受容体に対するセンシング抗体作製に適用できるもの

と考えられる。

発表を行うまでの成果は現在のところ得られていない。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

知的所有権を取得するまでの成果は現在のところ得られていない。

G. 研究発表

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

研究要旨

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。本研究では、本年度は、昨年度に確立したショウジョウバエ生体への影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系を用いて、雌生体へのノニルフェノールの影響を産卵数の変遷で検討することとした。特に、ノニルフェノールの影響が幼虫時に食餌開始する場合と、成虫になってから開始する場合でどのように異なるかを検討した。その結果、成虫開始の場合には産卵数が5～20%増加することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、孵化直後の幼虫から化学物質を含む飼育培地で育った次世代のショウジョウバエの産卵数は、10～25%と著明に減少した。この傾向はその次の世代、すなわち、継代テストの第2世代で、さらに強い影響として観察された。これらはエストラジオールでも同様であった。さらに、ノニルフェノールの高濃度 (10^{-3} mol/l) では、親世代でも産卵数の減少が観察された。今後、個体群の一生を通じての総産卵数や卵母細胞から卵への減数分裂の速度の検討の必要性とともに、多様な化学物質での検討が必要と思われる。

A. 研究目的

平成15年度に引き続き、平成16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証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、ここ数年、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）の問題に拡張して考えられている。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

の解析が緊要の課題と考えられるようになった。ところが、従来の内分泌かく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と考えられた。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かく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。

内分泌かく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。実地には、雌の産卵数を計数するのみで、雄雌の生物体への直接的な生殖影響を観察・監修できる貴重な実験系である。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。

本年度は、昨年度に確立したショウジョウバエ生体への影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系を用いて、雌生体へのノニルフェノールの影響を産卵数の変遷で検討した。特に、この化学物質の影響が誕生と同時の食餌する場合と、成虫になってから開始する場合でどのように異なるかを検討した。

B. 研究方法

① ショウジョウバエの系統

通常研究に用いられているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の野生型には Oregon R と Canton S があるが、産卵数の評価には昨年の実験結果から Canton S が適切であることが分かっていたので、本年度は Canton S を用いた。産卵数の計数・カウントにあたっては、プレート培地に産卵させ、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定した(図1)。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。

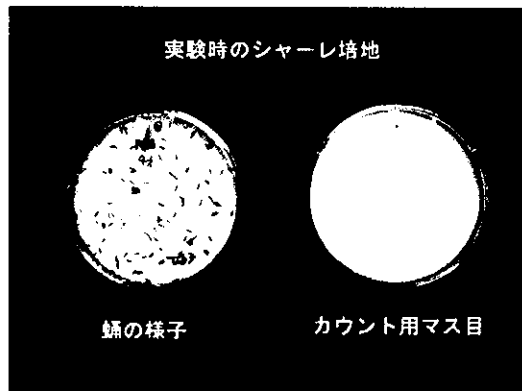


図1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雌の化学物質食餌投与試験における実験

飼育培地は次のようにして作製した。水 1ℓに、粉末寒天 8g、砂糖 100g、とうもろこし粉 40g、乾燥酵母 60gを入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 9.2 mm のシャーレに液体培地を 24 ml 入れて冷蔵保存する。

② 継代テストの次世代に用いる卵

次世代への継代に用いる卵は、産卵された日が一定であることが望ましい。産卵数が急激な変化がなく、また、一定の数が確保できる日として、昨年の実験結果から、3日目を選び3日目に産卵された個体群から次世代へ継代した。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数

昨年の実験結果から、キイロショウジョウバエ Canton S では、雌雄 10:10 で交配させると、雌の産卵能力を反映することがわ

かったので、1つのプレートに雌雄各 10 匹を交配させた。交配後、4日目まで毎日の産卵数をカウントした。

④ 化学物質のショウジョウバエ産卵数の継代テスト

キイロショウジョウバエ Canton S の継代的な飼育試験において、食餌培地に 17β-エストラジオールとノニルフェノールを加えてその影響を評価した。用いた培地での最終濃度は、ノニルフェノールについては 10^{-3} mol/ℓ、 10^{-5} mol/ℓ、 10^{-7} mol/ℓ、17β-エストラジオールでは 10^{-5} mol/ℓ になるように調整し、飼育培地を作製した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

親世代 (P) は通常の培地で生育し、羽化後これらの化学物質の入った培地に移した。その成虫の産卵数をカウントした。第1子世代 (F1) および第2世代 (F2) は、培地に生みつけられた卵から孵化し、幼虫時から同じ食餌培地で育った成虫を示す。

雄への化学物質の影響を排除し、雌への化学物質の産卵数への影響を調べるために、第1子世代 (F1) 以降は化学物質を含む飼育培地に羽化後 3日目に産卵させたプレートから育った個体群から処女雌のみを選出し、その雌 10 匹に対して通常培地で飼育した雄 10 匹を交配させた。化学物質を含む新しい培地で、4日目まで産卵数をカウントした。本研究では、第2世代 (F2) まで、産卵数をカウントすることができた。

C. 研究結果

キイロショウジョウバエ Canton S の親世代を、化学物質を含む飼育培地で産卵させた場合、ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ、17β-エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において4日目までの産卵数が 5 ~ 20% 増加することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、孵化直後の幼

虫から化学物質を含む飼育培地で育った次世代のショウジョウバエの産卵数は、ノニルフェノール 10^{-5} mol/l および 10^{-7} mol/l、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l において 10~25%と著明に減少した。この傾向はその次の世代、すなわち、継代テストの第2世代 (F2) で、さらに強い影響として観察された。ノニルフェノール 10^{-3} mol/l では、親世代でも産卵数の減少が観察された (図2)。

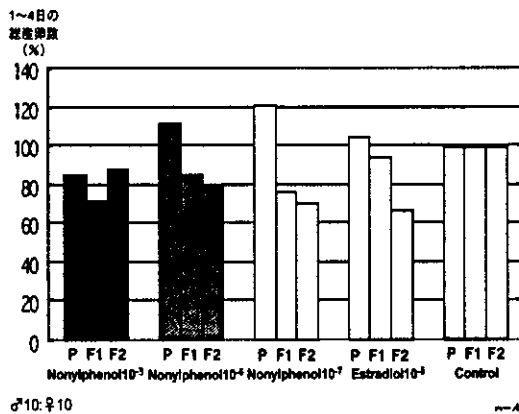


図2 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雌の産卵数に及ぼす化学物質食餌投与による影響

D. 考察

ショウジョウバエのゲノムプロジェクトが完成して、その中でヒト・エストロゲン受容体と相同な遺伝子が確認され、*Drosophila* ERR (ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体) と呼ばれている。ショウジョウバエ ERR はヒト・エストロゲン受容体と非常に類似しており、ショウジョウバエにもエストロゲン受容体があると強く示唆される。現在は、この受容体のリガンドは明らかになっていないが、*in vivo* での内分泌かく乱作用の評価法を確立する意義は高い。ショウジョウバエは、約 10 日で卵から成虫になる。したがって、高等動物に比べると短い期間で何代もの経過を見ることが可能である。例えば、我々ヒトで 10 代の経過を見るのに約 200 年かかるのに比べ、

ショウジョウバエは約 100 日で経過を見ることができる。このため、ショウジョウバエによる評価法を確立することは重要な意味があると考えられる。

現在、F2 までの実験を実施したが、興味深い結果とともに、問題点もいくつか明らかとなった。結果をまとめると、コントロールと比較して、羽化後に、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l とノニルフェノール 10^{-5} mol/l、 10^{-7} mol/l を摂取した個体群は羽化後 4 日までの産卵数が増加する傾向がある。逆に、ノニルフェノール 10^{-3} mol/l を摂取した個体群は産卵数が減少していた。孵化直後から、化学物質を含む飼育培地で生育した第 1 世代、第 2 世代の雌の産卵数は減少していた。親世代では幼虫時の卵巣における卵母細胞が正常に分化し、羽化後はじめて化学物質を摂取するのに対して、第 1 世代、第 2 世代の雌は幼虫時から化学物質を摂取しているので、幼虫時における卵巣の発達、そこで進行する卵母細胞の分化に化学物質が影響を及ぼした可能性が高いと考えられた。しかし、濃度の濃いノニルフェノール (10^{-3} mol/l) では、成虫になってからの暴露でも産卵数の減少が観察された。これは、薄い濃度のノニルフェノール (10^{-5} mol/l、 10^{-7} mol/l) と 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l による影響とはまったく逆の現象である。この結果を説明するためには、化学物質を暴露した個体群の一生を通じての総産卵数を調べる必要がある。本研究では、羽化後 4 日目までの産卵数をカウントしたので、産卵数の減少が、これらの個体群の一生を通しての全産卵数が減少しているのか、あるいは、卵母細胞から卵への減数分裂の速度に変化が起こったのかを特定することができない。個体群の総産卵能力を評価するための方法として、例えば、組織学的な評価法の検討が求められる。

今回、ノニルフェノールとエストラジオールを用いて検討した。最近になって、主任研究者らはショウジョウバエ・ERR に果